

**EVALUASI PENGGUNAAN JANGKA PANJANG
VITAMIN D₃ TERHADAP SISTEM IMUN ALAMIAH NF-κB
DAN JAK-STAT**

**EVALUATION OF LONG-TERM USE OF VITAMIN D₃
ON NF-κB AND JAK-STAT INNATE IMMUNE SYSTEM**

WIDYA HARDIYANTI

N012221040



**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2024

**EVALUASI PENGGUNAAN JANGKA PANJANG VITAMIN D₃
TERHADAP SISTEM IMUN ALAMIAH NF-κB DAN JAK-STAT**

WIDYA HARDIYANTI

N012221040



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**EVALUATION OF LONG-TERM USE OF VITAMIN D₃
ON NF-κB AND JAK-STAT INNATE IMMUNE SYSTEM**

WIDYA HARDIYANTI

N012221040



**GRADUATE PROGRAM
HASANUDDIN UNIVERSITY
MAKASSAR, INDONESIA
2024**

Tesis
Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Ilmu Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

WIDYA HARDIYANTI

N012221040

Kepada

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

**EVALUATION OF LONG-TERM USE OF VITAMIN D₃
ON NF-κB AND JAK-STAT INNATE IMMUNE SYSTEM**

Thesis

As one of the requirements for achieving a magister degree

Study Program Magister of Pharmacy

Prepared and submitted by

WIDYA HARDIYANTI

N012221040

To

**GRADUATE PROGRAM
HASANUDDIN UNIVERSITY
MAKASSAR, INDONESIA
2024**

LEMBAR PENGESAHAN

**EVALUASI PENGGUNAAN JANGKA PANJANG VITAMIN D₃
TERHADAP SISTEM IMUN ALAMIAH NF- κ B DAN JAK-STAT**

WIDYA HARDIYANTI

NIM: N012221040

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Studi Magister Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 29 Februari 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui :

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



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

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Farmasi



Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.
NIP.19800101 200312 1 004



Prof. Yulia Yusrini Djabir, M.Si., MBM.Sc, Ph.D, Apt.
NIP. 19780728 200212 2 003

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. ret. mat. Marianti A. Manggau., Apt.
NIP.19670319 199203 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Evaluasi Penggunaan Jangka Panjang Vitamin D₃ Terhadap Sistem Imun Alamiah NF- κ B Dan Jak-Stat" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (Prof. Firzan Nainu, S.Si.,M.Biomed.Sc.,Ph.D., Apt.) sebagai Pembimbing Utama dan (Prof. Yulia Yusrini Djibir, M.Si., MBM.Sc, Ph.D, Apt.) sebagai Pembimbing Pendamping). 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 Submitted di Jurnal (ACS Omega) sebagai artikel dengan judul "Evaluating the Impact of Vitamin D on NF- κ B and JAK-STAT Signaling Pathways in *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, Februari 2024



Widya Hardiyanti
N012221040

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanallahu wa ta'ala atas berkat, rahmat, dan petunjuk-Nya, sehingga tesis ini dapat diselesaikan. Dalam pembuatan tesis penulis tidak terlepas bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Untuk itu, penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt selaku pembimbing utama dan dosen penasehat akademik yang telah membimbing, memberikan arahan dan motivasi, serta telah meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan masa studinya di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Ibu Prof. Yulia Yusrini Djabir, M.Si., MBM.Sc, Ph.D, Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah membimbing, memberikan masukan, motivasi dan sarannya serta meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis ini.
3. Ibu Dr. Risfah Yulianty, M.Si., Apt, dan Rina Agustina, M.Pharm., Sc.Ph.D. Apt, dan Bapak Prof. Subehan, M.Pharm., Sc.,Ph.D., Apt selaku tim penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan saran dan masukan yang membangun kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis ini.
4. Dekan, Wakil Dekan, seluruh staf dosen dan pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas ilmu, bantuan, dan fasilitas yang diberikan kepada penulis selama menempuh studi hingga menyelesaikan tesis ini.
5. Kedua orang tua tercinta Ibu Halimah dan Bapak Wismanto, beserta saudara terkasih kakak Widya Putra. S.H., dan serta adik Widya Astuti. S.Si., atas doa yang tulus tiada henti di setiap situasi apapun yang dirasakan oleh penulis serta perhatian, kasih sayang dan dukungan baik secara moril maupun materil selama menempuh studi hingga menyelesaikan tesis ini.
6. Penghargaan yang besar juga penulis sampaikan kepada teman-teman UFRG terutama Avi, Rasul, Dewita, Dewi, Mukarram, Nadil, Kiya, Asbah, Nadiyah, Jihan, Hiday, Ayzia, Ismi, Gimas, Adit dan Ilham serta teman-teman sahabat 5 Perkasa memeberikan dukungan dan bantuan yang luar biasa yang diberikan kepada penulis selama menempuh studi hingga menyelesaikan tesis ini.
7. Teman-teman pascasarjana angkatan 2022, yang telah memberikan banyak kenangan, dukungan, dan pengalaman selama menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

8. Semua pihak yang telah membantu dan tidak sempat disebutkan namanya satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penyusunan tesis masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan masukan yang membangun dari berbagai pihak. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya ilmu farmasi. Aamin.

Makassar, Februari 2024



Widyahardiyanti

ABSTRAK

WIDYA HARDIYANTI. **Evaluasi Penggunaan Jangka Panjang Vitamin D₃ Terhadap Sistem Imun Alamiah NF- κ B Dan JAK-STAT** (dibimbing oleh Firzan Nainu dan Yulia Yusrini Djabir).

Latar belakang. Sistem imun memiliki peran dalam melawan berbagai penyakit, termasuk infeksi, peradangan, penyakit autoimun, dan kanker. Sistem imun dapat diatur melalui penggunaan imunomodulator salah satunya vitamin D₃ yang dapat meningkatkan sistem imun. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa vitamin D₃ dapat berperan dalam mengatur dan meningkatkan imunitas seluler dengan mengurangi kejadian badai sitokin yang diinduksi oleh sistem imunitas non adaptif. **Tujuan.** untuk mengetahui pengaruh pemberian vitamin D₃ sebagai imunomodulator dan efek penggunaan jangka panjang vitamin D₃ terhadap ekspresi gen terkait sistem imun alamiah khususnya NF- κ B dan JAK-STAT pada *Drosophila melanogaster*. **Metode.** Penelitian ini terbagi atas 4 pengujian yakni: 1) Uji survival perkembang lalat setelah diberikan Vitamin D₃; 2) Reproduksi lalat setelah pemberian vitamin D₃; 3) Analisis ekspresi gen menggunakan RT-qPCR terkait sistem imun; dan 4) Analisis pengujian menggunakan *GraphPad Prism*[®] 9. **Hasil.** vitamin D₃ memengaruhi kelangsungan hidup, terutama pada *Drosophila*. Vitamin D₃ menurunkan ekspresi gen *dpt* (NF- κ B) dan gen *totA* (JAK/STAT). Selain itu, vitamin D₃ dapat menurunkan aktivasi gen *sod1* dan *sod2* terkait antioksidan endogen pada respon sistem imun karena adanya stres seluler. **Kesimpulan.** Vitamin D₃ yang yang diberikan dalam jangka waktu panjang dapat meningkatkan kelangsungan hidup drosophila *PGRP-LB^A* pada konsentrasi 100 mM dan 10 mM dan konsentrasi tinggi 1000 mM menunjukkan efek toksik, vitamin D₃ pada sistem imun *Drosophila* pada jalur NF- κ B dan JAK/STAT berefek sebagai immunosupresan.

Kata Kunci: Vitamin D₃; profil fenotip; *Drosophila melanogaster*

ABSTRACT

WIDYA HARDIYANTI. **Evaluation of Long-term Use of Vitamin D₃ on Natural Immune System Nf-kb and Jak-Stat** (supervised by Firzan nainu and Yulia Yusrini Djabir).

Background. The immune system has a role in fighting various diseases, including infection, inflammation, autoimmune diseases, and cancer. Regulating immune system responses can be done through the use of immunomodulators, with vitamin D3 identified as an immunomodulator that can improve immune system function. Previous studies have shown that vitamin D3 can act as an antimicrobial, antibacterial, and antiviral. **Aim.** to determine the effect of vitamin D3 administration as an immunomodulator and the effect of long-term use and to determine the effect of vitamin D3 administration on gene expression related to the natural immune system, especially NFκB and JAK-STAT in *Drosophila melanogaster*. **Results.** vitamin D3 affects survival, especially in flies with compromised immune system function. Vitamin D3 affects the expression of NF-κB and JAK/STAT-related genes. In addition, vitamin D3 can decrease the activation of genes related to endogenous antioxidants, indicating an immune response and cellular stress. Administration of vitamin D3 at a concentration of 10 mM causes an increase in reproduction in *Drosophila* autoinflammatory model. **Conclusion.** Vitamin D3 administered over a long period of time can increase survival in the *Drosophila* immune system

Keywords: vitamin D₃; phenotypic profile; *Drosophila melanogaster*

DAFTAR ISI

| | |
|--|------|
| LEMBAR PENGESAHAN | v |
| PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA | vi |
| UCAPAN TERIMA KASIH | vii |
| ABSTRAK | ix |
| DAFTAR ISI | xi |
| DAFTAR TABEL | xiii |
| DAFTAR GAMBAR | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xv |
| DAFTAR SINGKATAN..... | xvi |
| I.1. Latar Belakang | 1 |
| I.2. Rumusan Masalah | 2 |
| I.3. Tujuan Penelitian | 2 |
| I.4. Manfaat Peneitian | 3 |
| BAB II METODE PENELITIAN | 4 |
| 2.1. Tempat dan Waktu..... | 4 |
| 2.2. Alat dan Bahan..... | 4 |
| 2.3. Metode Penelitian | 5 |
| 2.3.1 Penyiapan Hewan Uji..... | 5 |
| 2.3.2 Pembuatan Pakan Drosophila | 5 |
| 2.3.3 Pembuatan Larutan Stok | 5 |
| 2.3.4 Pembuatan Heat-killed E. coli..... | 5 |
| 2.3.5 Analisis Survival | 6 |
| 2.3.6 Analisis Reproduksi..... | 6 |
| 2.3.7 Penyiapan sampel RNA..... | 6 |
| 2.3.8 Analisis Ekspresi Gen | 7 |
| 2.3.9 Analisis Data | 8 |
| KERANGKA TEORI | 9 |
| KERANGKA KONSEP | 10 |
| BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN | 11 |
| 3.1. Hasil | 11 |

| | |
|---|----|
| 3.1.1 Vitamin D ₃ tidak memengaruhi perkembangan larva menjadi lalat dewasa | 11 |
| 3.1.2 Vitamin D ₃ memengaruhi perkembangan lalat dewasa dengan berbagai konsentrasi..... | 11 |
| 3.1.3 Vitamin D ₃ menurunkan ekspresi gen terkait sistem imun NFκB..... | 12 |
| 3.1.4 Vitamin D ₃ menurunkan ekspresi gen terkait sistem imun JAK-STAT .. | 13 |
| 3.1.5 Vitamin D ₃ menurunkan ekspresi antioksidan endogen sehingga memengaruhi ekspresi gen terkait sistem imun | 14 |
| 3.1.6 Pengaruh vitamin D ₃ terhadap reproduksi Drosophila | 14 |
| 3.2. Pembahasan | 15 |
| BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN | 17 |
| 4.1. Kesimpulan..... | 17 |
| 4.2. Saran..... | 17 |
| LAMPIRAN..... | 20 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 1. Sekuens primer gen..... | 8 |
| Tabel 2. Hasil perbandingan tukey uji survival larva ke pupa setelah terpapar vitamin D ₃ + Heat-killed <i>E. coli</i> | 24 |
| Tabel 3. Hasil perbandingan tukey uji survival pupa ke lalat dewasa setelah terpapar vitamin D ₃ + Heat-killed <i>E. coli</i> | 25 |
| Tabel 4. Hasil perbandingan tukey uji survival lalat dewasa kontrol setelah terpapar vitamin D ₃ + Heat-killed <i>E. coli</i> | 25 |
| Tabel 5. Hasil perbandingan tukey uji survival lalat dewasa dihari ke 7 setelah terpapar vitamin D ₃ + Heat-killed <i>E. coli</i> | 26 |
| Tabel 6. Hasil perbandingan tukey ekspresi gen dpt | 26 |
| Tabel 7. Hasil perbandingan tukey ekspresi gen totA..... | 26 |
| Tabel 8. Hasil perbandingan tukey ekspresi gen sod2 | 27 |
| Tabel 9. Hasil perbandingan tukey ekspresi gen sod1 | 27 |
| Tabel 10. Hasil perbandingan tukey uji reproduksi pupa setelah terpapar vitamin D ₃ + Heat-killed <i>E. coli</i> | 28 |
| Tabel 11. Hasil perbandingan tukey uji reproduksi lalat dewasa setelah terpapar vitamin D ₃ + Heat-killed <i>E. coli</i> | 28 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar 1. (A) Tahap perkembangan larva hingga lalat dewasa pemberian vitamin D ₃ | 11 |
| Gambar 2. Vitamin D ₃ memengaruhi pada tahap perkembangan lalat dewasa pemberian vitamin D ₃ | 12 |
| Gambar 3. Ekspresi gen <i>dpt</i> | 13 |
| Gambar 4. Ekspresi gen <i>totA</i> | 13 |
| Gambar 5. Ekspresi gen superoksida dismutase <i>sod1</i> dan <i>sod2</i> | 14 |
| Gambar 6. Uji reproduksi. | 15 |
| Gambar 7. Pengamatan perkembangan larva <i>Drosophila</i> menjadi pupa hingga menjadi lalat dewasa | 22 |
| Gambar 8. Pengamatan uji Reproduksi | 22 |
| Gambar 9. Pengukuran total RNA | 23 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| Lampiran 1. Skema kerja penelitian | 20 |
| Lampiran 2. Skema kerja penelitian uji reproduksi | 20 |
| Lampiran 3. Perhitungan konsentrasi vitamin D ₃ | 21 |
| Lampiran 4. Perhitungan konsentrasi vitamin D ₃ pada pakan drosophila | 22 |
| Lampiran 5. Gambar Penelitian | 22 |
| Lampiran 6. Analysis Of Variance (ANOVA) | 24 |

DAFTAR SINGKATAN

| Singkatan | Arti |
|------------------------|--|
| ANOVA | Analysis of Variance |
| BSC | Biosafety Cabinet Class |
| cm | Sentimeter |
| CO ₂ | Karbondioksida |
| <i>D. melanogaster</i> | <i>Drosophila melanogaster</i> |
| TNF- α | <i>Tumor Necrosis Factor</i> |
| g | gram |
| JAK/STAT | Janus Kinase/ Signal Transducer Activator of Transcription |
| MAPK | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| mg | Miligram |
| mL | Mililiter |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| RNA | Ribonucleic Acid |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| Rp49 | Ribosomal Protein 49 |
| RT-qPCR | Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction |
| HKE | <i>Heat-killed E. coli</i> |
| PGRP-LB ^Δ | Peptidoglycan recognition protein LB |
| <i>dpt</i> | Diptericin |
| <i>sod</i> | Superoksida Dismutase |
| <i>totA</i> | Turandot A |
| Upd | Unpaired |
| mM | Milimolaritas |
| M | Molaritas |
| IMD | Imunodefisiensi |

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Sistem imun dalam tubuh berperan dalam melawan suatu penyakit. Hampir setiap kondisi penyakit berkaitan dengan respons sistem imun, termasuk infeksi, peradangan, penyakit autoimun, dan kanker. Sistem imun dapat mengalami perubahan dan dapat diatur dengan berbagai cara, termasuk melalui penggunaan imunomodulator. Imunomodulator memiliki potensi yang signifikan dalam pengobatan berbagai penyakit. Imunomodulator adalah substansi atau zat yang dapat mempengaruhi sistem imun dengan efek penekanan (disebut sebagai immunosupresan) atau peningkatan respons imun (disebut sebagai immunostimulan). Imunomodulator adalah senyawa yang dapat membantu meningkatkan fungsi respon imun (Chirumbolo et al., 2017, Ismailova and White, 2021).

Zat yang dapat digunakan sebagai imunomodulator adalah vitamin D₃. Adapun fungsi vitamin D₃ untuk membantu mengatur dan meningkatkan imunitas seluler dengan mengurangi kejadian badai sitokin yang diinduksi oleh sistem imunitas non adaptif (Ismailova and White, 2021). Pemberian vitamin D₃ menurunkan ekspresi sitokin pro inflamasi sebagai respon infeksi dan bakteri, seperti yang terjadi pada pasien COVID-19 dengan menurunkan produksi sitokin Th1 yang bersifat pro inflamasi, misalnya Tumor Necrosis Factor (TNF)- α dan interferon (INF)- γ (Goulart, 2022, Huang et al., 2020). Berdasarkan pedoman tatalaksana COVID-19 edisi IV, vitamin D₃ direkomendasikan untuk pasien terkonfirmasi COVID-19 dengan gejala ringan, sedang, hingga berat dengan dosis 1.000-5.000 UI/hari. Penelitian sebelumnya menunjukkan vitamin D₃ berperan dalam regulasi sistem imun. Ketika kadar vitamin D₃ rendah dalam tubuh mengurangi kemampuan sistem imun, sehingga membuat tubuh rentan terkena infeksi (Stroehlein et al., 2021, Erlina Burhan et al., 2022).

Konsumsi suplemen vitamin D₃ dalam jangka waktu yang lama dengan dosis tinggi dapat menyebabkan peningkatan kalsium yang berlebih di tubuh (hiperkalsemia) dan gangguan di ginjal sehingga terjadi penumpukan kalsium pada urin (hiperkalsiuria). Hal ini dapat menyebabkan gangguan pada tulang dan ginjal (Kumar et al., 2016). Namun belum ada yang melaporkan efek vitamin D₃

terhadap sistem imun alamiah bila diberikan dalam waktu yang Panjang oleh karena itu perlu dilakukan pengujian efek tersebut. Sebelum obat aman digunakan pada manusia terlebih dahulu diuji secara pra-klinik menggunakan hewan coba.

Adapun hewan coba yang biasa digunakan pra-klinik adalah hewan pengerat seperti mencit, tikus dan spesies non-hewan pengerat lainnya merupakan hewan coba yang umumnya digunakan kedalam pengujian pra-klinik (Centanni, 2017) akan tetapi hewan tersebut memiliki beberapa kekurangan seperti harganya yang mahal, kode etik, masa hidup yang lebih lama. Sehingga diperlukan hewan coba yang lebih murah dan tidak terkendala kode etik dan memiliki kemiripan genetik dengan mamalia. Salah satu alternatif hewan coba yang dapat digunakan untuk uji pra-klinik adalah menggunakan *D. melanogaster*.

Lalat buah (*Drosophila melanogaster*) telah dibuktikan secara ilmiah sebagai salah satu organisme model (Nainu, 2018), *D. melanogaster*. memiliki kemiripan genetik sekitar 70% dengan manusia, murah, mudah dipelihara, pertumbuhan lebih cepat, dan mudah dimanipulasi secara genetik (Nainu et al., 2022). Selain itu, *D. melanogaster* diketahui mengekspresikan relish, faktor transkripsi yang homolog dengan NF- κ B manusia. Ketersediaan jalur mutan yang membawa peningkatan ekspresi antimikroba peptida (AMP) menyerupai kondisi badai sitokin merupakan salah satu alasan mengapa *D. melanogaster* dipilih sebagai organisme model dalam penelitian ini untuk melihat efek penggunaan jangka panjang vitamin D₃ pada ekspresi gen NF- κ B dan JAK-STAT.

I.2. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini yaitu menganalisis vitamin D₃ sebagai Imunomodulator pada organisme *D. Melanogaster* dan bagaimana efek penggunaan jangka panjang vitamin D₃ terhadap sistem imun alamiah khususnya NF- κ B dan JAK-STAT melalui pemantauan ekspresi gen menggunakan organisme *D. melanogaster*?

I.3. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini yaitu untuk menganalisis pengaruh pemberian vitamin D₃ sebagai imunomodulator dan efek penggunaan jangka panjang terhadap ekspresi gen terkait sistem imun NF- κ B dan JAK-STAT pada *Drosophila melanogaster*.

I.4. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini yaitu penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi efek jangka panjang penggunaan imunomodulator vitamin D₃ terhadap sistem imun alamiah NF- κ B dan JAK-STAT dengan menggunakan *Drosophila melanogaster*.