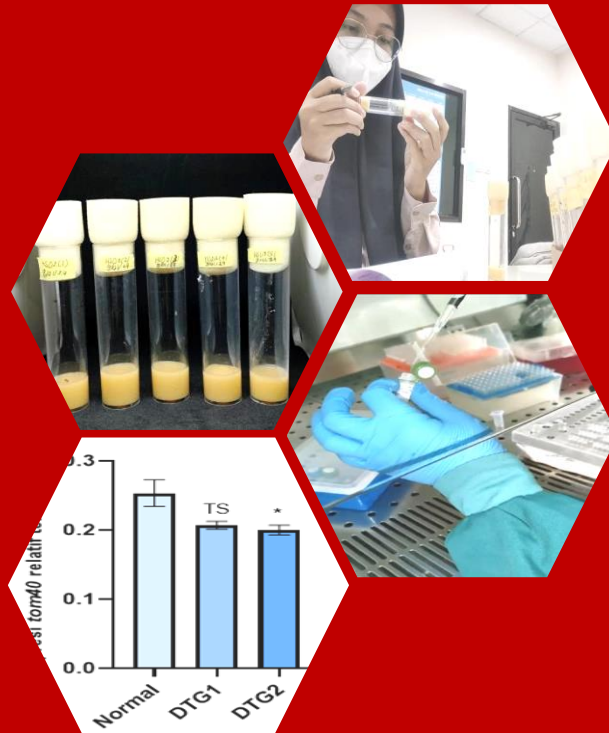


**ANALISIS EKSPRESI GEN *tom40* DAN *indy* PADA MODEL
HIPERGLIKEMIA *Drosophila melanogaster***



**NUR ISMI KURNIA ASRORY
N011201091**



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

**ANALISIS EKSPRESI GEN *tom40* DAN *indy* PADA MODEL
HIPERGLIKEMIA *Drosophila melanogaster***

NUR ISMI KURNIA ASRORY

N011 20 1091



PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

**GENE EXPRESSION ANALYSIS *tom40* AND *indy* IN A HIPERGLIKEMIA
OF *Drosophila melanogaster***

NUR ISMI KURNIA ASRORY

N011 20 1091



STUDY PROGRAM PHARMACY

FACULTY PHARMACY

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

**ANALISIS EKSPRESI GEN *tom40* DAN *indy* PADA MODEL
HIPERGLIKEMIA *Drosophila melanogaster***

NUR ISMI KURNIA ASRORY
N011201091

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Farmasi

pada

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

SKRIPSI

**ANALISIS EKSPRESI GEN *tom40* DAN *indy* PADA MODEL
HIPERGLIKEMIA *Drosophila melanogaster***

**NUR ISMI KURNIA ASRORY
N011201091**

Skripsi

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Farmasi pada 19
Agustus 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
pada

Program Studi Farmasi
Departemen Farmasi
Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:
Pembimbing,

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

Mengetahui
Ketua Program Studi,

Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009



**PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "ANALISIS EKSPRESI GEN *tom40* DAN *indy* PADA MODEL HIPERGLIKEMIA *Drosophila melanogaster*" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Prof. Firzan Nainu, S.Si., 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 skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi 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 skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 19 Agustus 2024


KURNIA ASRORY
N011201091

Ucapan Terima Kasih

Bismillahirrahmanirrahim, alhamdulillah dengan segala puji dan Syukur saya panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas berkat, kehidupan, dan rahmat-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Analisis Ekspresi Gen *tom40* dan *indy* Pada Model Hiperglikemia *Drosophila melanogaster*" dengan baik. Shalawat dan salam tak lupa diberikan kepada junjungan besar Rasulullah Shallallahu 'alaihi wasallam, yang menjadi suri tauladan yang baik bagi umat manusia.

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan Prof. Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt. sebagai pembimbing. Saya mengucapkan berlimpah terima kasih atas bimbingan, arahan dan motivasi dalam penelitian hingga penyusunan skripsi ini. Terima kasih kepada Bapak Usmar, S.Si., M.Si., Apt dan Bapak Rangga Meidianto Asri, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt. Selaku penguji yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran membangun kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini. Terima kasih kepada Bapak Afdil Viqar Viqhi, S.Si., M.Si., Apt. Selaku dosen penasehat akademik penulis atas segala ilmu, dan arahnya selama perkuliahan. Terima kasih kepada Dekan dan Wakil Dekan, serta seluruh staff dosen dan pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah berkontribusi dalam peningkatan mutu dan kualitas serta fasilitas yang diberikan sehingga dapat digunakan dalam penelitian ini.

Dengan rendah hati, saya ingin menyampaikan terima kasih kepada teman-teman satu penelitian Nadiyah, Jihan, Hiday, Aizia, Adit, Gimas dan Ilham yang saling membantu dan menyemangati selama penelitian. Terima kasih kepada kakak-kakak UFRG S2, serta kak Nadil, dan kak Mukkarram yang telah mendukung, memberikan motivasi, dan membantu selama penelitian. Teruntuk sahabat-sahabat penulis, Annisa, Ame, Nurba, Putri, Inna, Rahma, Wia, dan Atting. Terima kasih telah menjadi penyemangat yang tiada henti serta selalu menjadi tempat penulis berbagi cerita. Terima kasih juga kepada HE2OIN (Angkatan 2020) dan teman-teman posko Ko'mara yang sudah menjadi warna dan cerita tersendiri. Terima kasih semoga kita semua bisa sukses dikemudian hari '*Aamiin ya Rabbal'alam*in'.

Saya mengucapkan banyak terima kasih kepada kedua orang tua saya atas semua doa, pengorbanan, dan motivasi yang diberikan kepada saya selama menempuh pendidikan dan menjalani hidup sehingga memberikan energi yang tak ternilai. Saya juga mengucapkan terima kasih banyak untuk kakak-kakak saya karena sudah memahami saya ketika kesulitan dan membantu saya. Semoga semua pihak yang telah membantu saya selama ini akan dibalas oleh Allah Subhanahu Wa Ta'ala. Saya berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis,

Nur Ismi Kurnia Asrory

ABSTRAK

NUR ISMI KURNIA ASRORY. **Analisis Ekspresi Gen *tom40* dan *indy* Pada Model Hiperglikemia *Drosophila melanogaster*** (dibimbing oleh Prof. Firzan Nainu. S.Si., M.Biomed., Ph.D., Apt.).

Latar belakang. Hiperglikemia merupakan kondisi medis yang menunjukkan kadar glukosa darah yang tinggi. Kondisi ini akan menyebabkan gangguan pada tingkat molekuler karena terjadi peningkatan ROS (*Reactive Oksidatif*). Sehingga dapat menyebabkan gangguan mitokondria yang berperan dalam metabolisme, hal tersebut dapat dilihat dengan level ekspresi gen *tom40* dan *indy*, serta *developmental toxicity* yang merupakan parameter dalam melihat kerusakan mitokondria dan gangguan metabolisme. **Tujuan.** Untuk mengetahui pengaruh hiperglikemia pada ekspresi gen *tom40* dan gen *indy*. **Metode.** Penelitian dibagi menjadi lima tahap, yaitu: 1) Penyiapan hewan uji; 2) Pembuatan pakan model hiperglikemia; 3) uji *developmental toxicity*; 4) Isolasi RNA; 5) Analisis ekspresi gen *tom40* dan *indy* menggunakan metode RT-qPCR. Hasil yang diperoleh, diolah dan dianalisis menggunakan *software* GraphPad Prism[®]. **Hasil.** Uji *developmental toxicity* menunjukkan pemberian pakan tinggi gula pada *Drosophila melanogaster* tidak signifikan memengaruhi perkembangan. Analisis ekspresi gen *tom40* menunjukkan peningkatan ekspresi gen pada kelompok perlakuan Diet Tinggi Gula (DTG) 2 yang mengandung 24,5% sukrosa. Hasil analisis ekspresi gen *indy* didapatkan perlakuan Diet Tinggi Gula (DTG) 1 dan Diet Tinggi Gula (DTG) 2 tidak memengaruhi ekspresi gen tersebut. **Kesimpulan.** *Drosophila melanogaster* yang diberikan pakan tinggi gula menyebabkan level ekspresi gen *tom40* mengalami penurunan dan dapat memengaruhi pertumbuhan *Drosophila melanogaster* dibandingkan kelompok pakan normal. Namun pemberian pakan tinggi gula hingga 24,5% sukrosa tidak memengaruhi level ekspresi gen *indy*.

Kata kunci: Hiperglikemia, *Drosophila melanogaster*, *tom40*, *indy*.

ABSTRACT

NUR ISMI KURNIA ASRORY. **Expression Analysis of *tom40* and *indy* Genes in *Drosophila melanogaster* Hyperglycemia Model** (supervised by Prof. Firzan Nainu. S.Si., M.Biomed., Ph.D., Apt.).

Background. Hyperglycemia is a medical condition that shows high blood glucose levels. This condition will cause disturbances at the molecular level due to an increase in ROS (Reactive Oxidative). So that it can cause mitochondrial disorders that play a role in metabolism, this can be seen by the level of expression of the *tom40* and *indy* genes, as well as developmental toxicity which is a parameter in seeing mitochondrial damage and metabolic disorders. **Aim.** To determine the effect of hyperglycemia on the expression of the *tom40* gene and *indy* gene. **Method.** The research was divided into five stages, namely: 1) Preparation of test animals; 2) Preparation of hyperglycemia model feed; 3) developmental toxicity test; 4) RNA isolation; 5) Analysis of *tom40* and *indy* gene expression using RT-qPCR method. The results obtained were processed and analyzed using GraphPad Prism® software. **Results.** The developmental toxicity test showed that feeding high-sugar diets to *Drosophila melanogaster* did not significantly affect development. Analysis of *tom40* gene expression showed increased gene expression in the High Sugar Diet (HSD) 2 treatment group containing 24.5% sucrose. The *indy* gene expression analysis result showed that the High Sugar Diet (HSD) 1 and High Sugar Diet (HSD) 2 treatments did not affect the gene expression. **Conclusion.** *Drosophila melanogaster* fed a high-sugar diet causes the *tom40* gene expression level to decrease and can affect the growth of *Drosophila melanogaster* compared to the normal feed group. However, feeding high-sugar diets up to 24.5% sucrose did not affect the expression level of the *indy* gene.

Keywords: Hyperglycemia, *Drosophila melanogaster*, *tom40*, *indy*.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I	13
PENDAHULUAN.....	13
1.1 Latar Belakang.....	13
1.2 Tujuan dan Manfaat	14
BAB II	15
METODE	15
2.1 Tempat dan Waktu	15
2.2 Alat dan Bahan	15
2.3 Metode Penelitian	15
BAB III	18
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	18
3.1 Hasil	18
3.2 Pembahasan	20
BAB IV.....	22
KESIMPULAN DAN SARAN	22
4.1 Kesimpulan.....	22
4.2 Saran.....	22
DAFTAR PUSTAKA.....	23
LAMPIRAN	25

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Komposisi Pakan <i>Drosophila melanogaster</i>	15
2. Sekuens primer gen dan profil RT-qPCR	16
3. Hasil one-way anova uji <i>developmental toxicity</i> larva menjadi pupa	25
4. Hasil Tukey.s Multiple Comparisons uji <i>developmental toxicity</i> larva Menjadi Pupa	25
5. Hasil one-way anova uji <i>developmental toxicity</i> pupa menjadi lalat dewasa ...	25
6. Hasil Tukey.s Multiple Comparisons uji <i>developmental toxicity</i> pupa menjadi Lalat dewasa	25
7. Hasil one-way anova ekspresi gen <i>tom40</i>	26
8. Hasil Tukey.s Multiple Comparisons ekspresi gen <i>tom40</i>	26
9. Hasil one-way anova ekspresi gen <i>indy</i>	26
10. Hasil Tukey.s Multiple Comparisons ekspresi gen <i>indy</i>	26

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Grafik uji <i>developmental toxicity</i>	17
2. Data pengamatan uji <i>developmental toxicity</i> dari larva menjadi pupa dan pupa menjadi lalat dewasa	17
3. Grafik ekspresi gen <i>tom40</i>	18
4. Grafik ekspresi gen <i>indy</i>	18
5. Penyiapan hewan uji	27
6. Pengamatan <i>developmental toxicity</i>	27
7. Proses isolasi RNA	27
8. Preparasi analisis RT-qPCR	27
9. Proses analisis RT-qPCR	27

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Skema kerja.....	24
2. Data statistika.....	25
3. Dokumen penelitian.....	27

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hiperglikemia merupakan kondisi medis yang menunjukkan kadar glukosa darah melebihi normal. Kondisi tersebut menjadi karakteristik untuk beberapa penyakit terutama diabetes melitus. Kadar glukosa darah yang dimaksud hiperglikemia apabila lebih besar dari 125 mg/dL saat puasa dan lebih besar 180 mg/dL 2 jam setelah makan. Apabila hiperglikemia tidak diobati maka dapat menyebabkan penyakit lain seperti gagal ginjal, neuropati, retinopati, penyakit kardiovaskular dan penyakit serebrovaskular (Alexandra dkk., 2023).

Hiperglikemia disebabkan oleh asupan glukosa yang berlebihan, sehingga tidak mampu ditoleransi oleh tubuh (Tosur et al., 2020). Hal ini dipengaruhi oleh adanya peningkatan kadar glukagon, penurunan kadar insulin dan sensitivitas insulin (Alexandra dkk., 2023). Insulin merupakan hormon polipeptida yang dihasilkan dari sel beta pankreas, berfungsi dalam mengatur kadar glukosa dalam darah dan penggunaan glukosa pada sel (Ojo et al., 2023). Kadar glukosa darah yang tinggi dapat menyebabkan gangguan pada tingkat molekuler seperti disfungsi mitokondria karena terjadi peningkatan ROS (*reactive oxygen species*) yang berujung pada stres oksidatif (Galicia-Garcia et al., 2020). Gangguan pada tingkat molekuler yang terjadi terus menerus dapat menyebabkan kerusakan beberapa jaringan, organ, dan berujung pada kematian (Alexandra dkk., 2023).

Mitokondria berperan dalam sintesis ATP, menjaga homeostasis sel, dan pembersihan ROS (*reactive oxygen species*) (Hanif Sayyed & Mahalakshmi, 2022). Salah satu gangguan molekuler yang disebabkan oleh peningkatan kadar gula darah adalah disfungsi mitokondria (Galicia-Garcia et al., 2020). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Xiao dkk 2019 menyebutkan gen yang signifikan dalam mengidentifikasi disfungsi mitokondria adalah penurunan ekspresi *Translocase of Outer Mitochondrial membrane 40* atau gen *tom40*. Parameter lainnya yaitu analisis ekspresi gen *i'm not dead yet (indy)* yang homolog dengan gen NaCT / SLC13A5 pada mamalia berperan dalam transpoter sitrat, regulasi *lifespan* dan metabolisme (Rogina & Helfand, 2013; Kopel et al., 2021). Penurunan ekspresi gen *indy* memberikan efek menguntungkan pada metabolisme dan *lifespan*, namun apabila ekspresi gen meningkat maka akan memberikan efek merugikan pada metabolisme dan *lifespan* (Rogina, 2017). Seperti yang diketahui gen tersebut memiliki peran pada metabolisme, dimana hal tersebut berpengaruh pada perkembangan. Oleh karena itu, pengujian lain yang dapat mendukung hasil analisis ekspresi gen tersebut adalah *developmental toxicity*.

Berdasarkan penjelasan sebelumnya, penelitian molekuler menarik dilakukan untuk mendapatkan pemahaman yang lebih komperhensif mengenai kondisi tubuh pada saat hiperglikemia. Penelitian seperti analisis genetik telah banyak dilakukan menggunakan *Drosophila melanogaster*. *Drosophila melanogaster* adalah hewan coba yang paling sering digunakan dalam penelitian ilmiah khususnya genetik, selain itu *Drosophila melanogaster* juga digunakan untuk mempelajari patofisiologi penyakit (Younes et al., 2020). Berdasarkan genetik

Drosophila melanogaster homolog dengan manusia hingga 75%. Alasan lain dari penggunaan *Drosophila melanogaster* sebagai hewan uji karena beberapa keuntungan seperti pemeliharaan yang mudah, lebih murah, memiliki siklus hidup singkat, jumlah reproduksi banyak, dan masalah etika tidak begitu rumit sehingga waktu penelitian lebih efisien (Nainu, 2018).

Oleh karena itu, penelitian secara molekuler mengenai pengaruh kondisi glukosa darah tinggi pada gen *tom40* dan gen *indy* perlu dilakukan. Penelitian ini akan menggunakan hewan model hiperglikemia *Drosophila melanogaster* untuk ekspresi gen *tom40* dan *indy*. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini akan memberikan gambaran secara molekuler melalui analisis level ekspresi di kedua gen tersebut dalam kondisi hiperglikemia.

1.2 Tujuan dan Manfaat

1.2.1 Tujuan

Berdasarkan uraian latar belakang yang digunakan, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ekspresi gen *tom40* dan gen *indy* pada model hiperglikemia *Drosophila melanogaster*.

1.2.2 Manfaat

Berdasarkan tujuan penelitian ini maka manfaat dari penelitian tersebut adalah diketahuinya pengaruh hiperglikemia terhadap gen *tom40* dan *indy* dan hasil tersebut dapat digunakan untuk melakukan pengujian terapi yang baru bagi penderita hiperglikemia.

BAB II

METODE

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, laboratorium farmakologi dan toksikologi, dan laboratorium biofarmaka. Penelitian dilaksanakan pada Maret-Mei 2024.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex®), BSC II (*Biosafety Cabinet Class II*), kompor listrik (Maspion® S- 302), mikropipet (Dragonlab), *micropestle* (Geneaid®), Autocheck®, papan CO₂, spin cartridge (Invitrogen™), *Thermal cycler* qPCR (Rotor-Gene Q, Qiagen®), timbangan analitik, vial dan *plugs* *Drosophila* (Biologix®), *zoom stereo microscope* (Motic®).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah agar, air suling, asam propionat, *brewer's yeast*, etanol 96% (Onemed®), gas CO₂, metil paraben, microtube (Gene follower), *RNAse-free water*, *treff tube* (Treff lab), *RNAqueous™* Total RNA Isolation Kit (Invitrogen™), satu set primer *indy*, satu set primer *tom40*, satu set primer *rp49* dan kit SuperScript™ III One-Step RT-qPCR (Invitrogen™).

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Penyiapan hewan uji

Penelitian ini menggunakan larva instar tiga dari *Drosophila melanogaster* genotip *Canton S*. Lalat buah tersebut merupakan bagian Laboratorium Farmakologi-Toksikologi Universitas Hasanuddin, sebagai hibah dari *Laboratory Host Defense and Responses* (Kanazawa University, Jepang). Pengujian menggunakan tiga kelompok perlakuan yaitu: kontrol sehat, Diet Tinggi Gula 1 (DTG 1), dan Diet Tinggi Gula 2 (DTG 2). Setiap kelompok perlakuan terdiri dari lima replikasi, masing-masing replikasi menggunakan 10 lalat dewasa (5 jantan dan 5 betina). Hewan uji tersebut dipelihara dalam vial kultur pada suhu sekitar 25°C untuk digunakan dalam uji *developmental toxicity*, dan analisis ekspresi gen) (Lourido et al., 2021).

2.3.2 Pembuatan pakan model hiperglikemia

Pembuatan pakan perlakuan sebanyak 100 mL, dilakukan dengan menimbang bahan yang diperlukan yaitu tepung jagung, ragi, agar, sukrosa, dan dicukupkan menggunakan air suling hingga 100 mL. Selanjutnya bahan diaduk dan dipanaskan pada suhu 100°C hingga mencapai kekentalan yang diinginkan. Kemudian ditambahkan asam propionat dan metil paraben. Hasil pencampuran dimasukkan ke dalam vial dan didibiarkan mengeras selama 24 jam. Komposisi pakan perlakuan pada **Tabel 1**, digunakan untuk membuat hewan model hiperglikemia adalah pakan diet tinggi gula (Musselman et al., 2019) (Tennessee et al., 2014).

Tabel 1. Komposisi pakan *Drosophila melanogaster*

Bahan	Kelompok Perlakuan		
	Kontrol Sehat	DTG 1	DTG 2
Tepung jagung	7,5 g	7,5 g	7,5 g
<i>yeast</i>	2,5 g	2,5 g	2,5 g
Agar	0,9 g	0,9 g	0,9 g
Sukrosa	4,5 g	15 g	24,5 g
Asam propionat	400 μ L	400 μ L	400 μ L
Metil paraben	450 μ L	450 μ L	450 μ L
Air suling	Ad 100 mL	Ad 100 mL	Ad 100 mL

2.3.3 Uji *developmental toxicity*

Pengujian dilakukan untuk melihat perbedaan pengaruh antara pemberian pakan tinggi gula dengan pakan normal terhadap *lifespan D. melanogaster*. Pengujian dilakukan menggunakan 10 larva instar tiga *D. melanogaster* dengan tiga kelompok perlakuan. Kelompok pertama diberikan pakan kontrol dengan sukrosa 4,5% (normal), kelompok dua diberikan pakan tinggi gula dengan sukrosa 15%, dan kelompok tiga diberikan pakan tinggi gula dengan sukrosa 24,5%. Kemudian, setiap kelompok diamati tiap hari untuk mengetahui perkembangan dari larva hingga menjadi lalat dewasa.

2.3.4 Analisis Molekuler

2.3.4.1 Penyiapan sampel RNA

Isolasi RNA dilakukan menggunakan RNAqueous™ total RNA *isolation Kit* (Invitrogen™). Sebanyak 10 larva *D. melanogaster* dimasukkan ke dalam *treff tube*. Reagen *lysis buffer* disiapkan dengan mencampur *lysis buffer* 300 μ L tiap sampel dan 2-mercaptoethanol sebanyak 1% dari total volume *lysis buffer*. Kemudian reagen ditambahkan ke dalam masing-masing *treff tube* sampel sebanyak 300 μ L, dan larva dihancurkan menggunakan micropastle. Selanjutnya disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Lisat dipindahkan ke *treff tube* baru, lalu ditambahkan etanol 70% sebanyak 300 μ L dan divortex selama 10 detik. Selanjutnya, sampel dimasukkan ke *spin cartridge* dan dipisahkan menggunakan sentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 14.000 rpm. Setelah itu, ulangi proses sebelumnya sebanyak 2 kali. Kemudian filtrat dibuang dan *spin cartridge* dimasukkan kembali pada *treff tube* yang sama. Tambahkan *wash buffer I* sebanyak 700 μ L ke dalam *spin cartridge*, lalu disentrifugasi selama 15 detik dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang. Filtrat dibuang dan *spin cartridge* dipindahkan ke *collection tube* yang baru. Kemudian etanol 96% ditambahkan ke dalam *spin cartridge* sebanyak 500 μ L dan disentrifugasi selama 15 detik dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang. Filtrat dibuang dan ditempatkan kembali di *collection tube* yang sama. Setelah itu, proses sebelumnya diulangi 2 kali (Ambion, 2012).

Spin cartridge disentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang. Kemudian bagian tengah *spin cartridge* ditambahkan RNase-free water sebanyak 40 µL. Selanjutnya, proses sebelumnya diulang dengan menambahkan kembali RNase-free water dengan jumlah yang sama. Kemudian sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Setelah itu, ditambahkan kembali RNase-free water ke dalam *spin cartridge* sebanyak 40 µL, lalu disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. *Spin cartridge* dibuang, lalu *collection tube* yang berisi RNA disimpan pada suhu -80°C (Ambion, 2012).

2.3.4.2 Analisis ekspresi gen

Pengukuran level ekspresi gen dilakukan *real-time* PCR menggunakan kit SuperScriptTM III Platinum® SYBR® *Green One-Step* qRT-PCR with ROX (InvitrogenTM). *Real-time* PCR dijalankan menggunakan satu set primer *tom40_F* dan *tom40_R*, satu set primer *indy_F* dan *indy_R*, dengan satu set primer sebagai kontrol internal *rp49_F* dan *rp49_R* yang dijalankan sesuai prosedur RT-qPCR. Reaksi *real-time* RT-qPCR dilakukan dalam tube dengan volume 10 µL menggunakan mesin RotorGene (Qiagen). Daftar sekuens primer gen dan profil RT-qPCR yang digunakan dapat dilihat pada **Tabel 2.** (Rosa et al., 2021) (Asfa et al., 2023)

Tabel 2. Sekuens primer gen dan profil RT-qPCR

Nama Gen	Sekuens Primer		Kondisi
	Forward	Reverse	
<i>tom40</i>	5'-TGCACGTGTGCTA CTACCAG-3'(20 mer)	5'-ATTCCGCCTCTGA AGACCAG-3'(20 mer)	1. Siklus PCR: 40 2. <i>Hold</i> : 37°C, 10 menit 3. <i>Hold</i> 2: 95°C, 10 menit 4. <i>Denaturation</i> : 95°C, 10 detik 5. <i>Annealing</i> : 60°C, 30 detik 6. <i>Extension</i> : 72°C, 30 detik
<i>indy</i>	5'-CTGCCCAACTCTG TCCTCTTACTG-3' (22 mer)	5'-CAGGATCAGGTAC AGAGGATGGAT-3' (22 mer)	
<i>rp49</i>	5'-GAC GCT TCA AGG GAC AGT ATC TG-3' (23 mer)	5'-AAA CGC GGT TCT GCA TGA G-3' (19 mer)	

2.3.5 Analisis data dan penarikan kesimpulan

Data yang didapatkan dari semua uji akan dianalisis menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism 9. Dari hasil uji survival dan data ekspresi gen dianalisis menggunakan metode *one way Anova*.