

# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

Penurunan kualitas hidup masyarakat pada masa tua yang dipengaruhi oleh penyakit kronis seperti diabetes dengan komplikasinya, menjadi suatu target permasalahan global yang dapat mengancam. Berdasarkan data *The Global Burden of Diseases Study* (GBD), penyakit diabetes menempati peringkat kedelapan penyebab kematian dengan kasus yang diperkirakan meningkat hingga 1,31 miliar jiwa pada tahun 2050 (Ong dkk., 2023). Sedangkan, Indonesia menempati urutan kelima dengan kasus tertinggi diabetes mencapai 19,5 juta dan akan meningkat menjadi 28,6 juta kasus pada tahun 2045 (IDF, 2021). Dampak prevalensi tersebut lebih mengkhawatirkan dengan adanya komplikasi diabetes yang berperan dalam peningkatan angka disabilitas sebesar 22% pada 10 tahun terakhir (Pivari dkk., 2021). Oleh karena itu, diperlukan suatu upaya untuk mencegah diabetes beserta komplikasinya di masa depan.

*Diabetic Sensory Neuropathy* (DSN) menjadi salah satu komplikasi paling umum dan diperhatikan diantara komplikasi lainnya. Sebab, lebih dari 40 juta penderita diabetes terdampak neuropati secara global, serta meningkatkan beban ekonomi pada penderita diabetes. Komplikasi tersebut juga bertanggung jawab terhadap adanya amputasi ekstremitas bawah sebanyak 40-60% tiap kasusnya yang disebabkan oleh hilangnya respon sensorik atau biasa dikenal dengan kondisi mati rasa (Baxi dkk., 2020). Respon sensorik pada penderita diabetes yang kurang sensitif dapat disebabkan oleh kerusakan penghantaran sinyal stimulus terkhusus disfungsi sel saraf nosiseptor yang berperan dalam progresivitas DSN.

Respon sensorik yang kurang baik terhadap stimulus eksternal dapat dikaitkan dengan *insulin-signaling* yang memiliki kaitan kuat dengan kondisi diabetes. Salah satu bentuk stimulus yakni suhu dan respon terhadap suhu disebut dengan *thermosensation*. *Thermosensation* diregulasi oleh sebuah kanal yang dikenal sebagai *Transient Receptor Potential* (TRPV). Disregulasi terhadap TRPV menjadi salah satu kemungkinan penyebab kurangnya sensitivitas terhadap stimulus yang mengancam pada lingkungan eksternal. Menurut Lezama-Garcia dkk (2022), diperoleh kemampuan kurang baik dalam mendeteksi suhu panas pada vertebrata *knockout* TRPV1. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat keterkaitan antara disregulasi TRPV dengan kemampuan respon *thermosensation* (Lezama-Garcia dkk., 2022). Oleh karena itu, pengkajian secara molekuler patogenesis dari DSN yang dapat

TRPV dan model hiperglikemik perlu dilakukan.

*Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) sebagai hewan model respon nosiseptik dengan fenotip hiperglikemia dapat menjanjikan. *D. melanogaster* memiliki beberapa kemiripan dengan manusia, seperti *insulin-like peptide* (*dilp*) yang mirip manusia, sehingga sesuai untuk digunakan dalam eksplorasi (ILS) pada model hiperglikemia (Im dkk., 2018; Wang dkk.,



2023). *D. melanogaster* juga dapat digunakan dalam mengkaji aktivitas TRPV1 karena *D. melanogaster* memiliki homolog TRPV1 spesifik pada suhu yang dikenal dengan nama *painless (pain)*. Gen *pain* dapat teraktivasi pada paparan suhu 38-42°C (Chiang dkk., 2023; Imambocus dkk., 2022). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Suzuki dkk (2022), terdapat perubahan perilaku menghindari terhadap suhu pada *D. melanogaster* mutan gen *pain* yang diberikan DTG. Namun, ekspresi gen *pain* belum dikaji dalam penelitian tersebut serta kaitan antara ekspresi gen *pain* dengan regulasi insulin yang ditinjau dari ekspresi gen *dilp2*.

Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian yang menelusuri adanya pengaruh *thermal sensitivity* terhadap ekspresi gen *pain* pada kondisi hiperglikemia,

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh *thermal sensitivity* terhadap profil ekspresi gen *pain* pada *D. melanogaster* model hiperglikemia

## 1.3 Tujuan

Untuk mengetahui pengaruh *thermal sensitivity* terhadap profil ekspresi gen *pain* pada *D. melanogaster* model hiperglikemia?



## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### II.1 Alat dan Bahan

##### II.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas kimia (*Pyrex*<sup>®</sup>), kompor listrik, *micropestle* (*Geneaid*<sup>®</sup>), plugs *Drosophila* (*Biologix*<sup>®</sup>), timbangan analitik (*Ohaus*<sup>®</sup>), sentrifuge, spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu*<sup>®</sup>), *Thermal cycler qPCR* (*RotorGene Q*, *Qiagen*<sup>®</sup>), termometer, vial *Drosophila* (*Biologix*<sup>®</sup>).

##### II.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah agar (*Swallow*<sup>®</sup>), aluminium foil, asam propionat, *aquadest*, *brewer's yeast*, *Drosophila melanogaster* (*w<sup>1118</sup>*), etanol 70% (*Onemed*<sup>®</sup>), *GoTaq*<sup>®</sup> 1-Step RT-qPCR System (*Promega*<sup>®</sup>) larutan NaCl 0,9% (*Otsuka*<sup>®</sup>), metil paraben, metformin (*Wellgreen*<sup>®</sup>), *PureLink*<sup>™</sup> RNA Mini Kit (*Invitrogen*<sup>™</sup>), primer *pain*, primer *dilp2*, primer *rp49*, reagen GOD-PAP (*Linear Chemicals*<sup>®</sup>), standar glukosa (*Linear Chemicals*<sup>®</sup>), sukrosa (*Smartlab*<sup>®</sup>), *treff tube* (*Treff lab*<sup>®</sup>), tepung jagung.

#### II.2 Metode Kerja

##### II.2.1 Penyiapan hewan coba *D. melanogaster*

Dalam penelitian ini digunakan larva instar III yang diperoleh dari hasil perkembangbiakan *D. melanogaster* jenis *w<sup>1118</sup>*. Perkembangbiakan dilakukan dengan mengawinkan masing-masing 10 lalat jantan dan 10 lalat betina di dalam vial yang telah berisi pakan, kemudian disimpan dalam suhu sekitar 25°C.

##### II.2.2 Pembuatan pakan dan penyiapan hewan model hiperglikemia

Pada penelitian ini pakan *D. melanogaster* terdiri atas tiga jenis yakni pakan standar untuk kelompok kontrol tanpa perlakuan (KTP), pakan DTG untuk *D. melanogaster* model hiperglikemia, serta pakan DTG metformin dengan konsentrasi yang telah ditetapkan seperti yang tertera pada **Tabel 1**. Tiap kelompok perlakuan terdiri atas 10 larva instar III dan disiapkan lima replikasi masing-masing kelompok.



Tabel 1. Komposisi pakan *Drosophila melanogaster*

100 mL	Kontrol Tanpa perlakuan (KTP)	Kontrol Negatif (30% Sukrosa)	Diet Tinggi Gula (DTG) Metformin (MTF)	
			1	2
Tepung jagung	7,5 g	7,5 g	7,5 g	7,5 g
Yeast	2,5 g	2,5 g	2,5 g	2,5 g
Agar	0,9 g	0,9 g	0,9 g	0,9 g
Sukrosa	4,5 g	30 g	30 g	30 g
Metformin	-	-	5 mM	25 mM
Asam propionat	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl
Metil paraben	450 µl	450 µl	450 µl	450 µl
Air suling	ad 100 mL	ad 100 mL	ad 100 mL	ad 100 mL

Penggunaan gula sukrosa sebesar 30% digunakan sebagai komposisi untuk pakan diet tinggi gula dikarenakan penelitian yang telah dilakukan oleh Catalani dkk (2021), sukrosa 30% menggambarkan kondisi diet dengan tinggi gula yang berlebihan (hiperglikemia), sedangkan konsentrasi 20% menggambarkan diet tinggi gula sedang dan 5% menggambarkan kondisi normal asupan gula (Catalani dkk., 2021). Sukrosa merupakan jenis gula disakarida dari fruktosa dan glukosa yang sama manisnya seperti sirup jagung fruktosa. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa pemberian DTG dengan sukrosa menghasilkan kondisi patofisiologi seperti model diabetes melitus tipe 2 (DMT2) seperti hiperglikemia dan resistensi insulin (Musselman dkk., 2019).

### II.2.3 Pembuatan larutan stok dan pakan perlakuan metformin

Pembuatan larutan stok metformin dibuat dalam konsentrasi 500 mM dengan mencampurkan 0,414 g metformin kedalam 5 mL *aquadest*. Dari larutan stok tersebut kemudian dicuplik sesuai dengan konsentrasi yang diujikan (5 mM dan 25 mM) yaitu 50 µL dan 250 µL. Setelah dicuplik kemudian ditambahkan ke setiap pakan standar sebanyak 5 mL. Pakan perlakuan metformin dibuat dalam lima replikasi masing-masing konsentrasi.

### II.2.4 Pengujian kadar glukosa pada *D. melanogaster*

Uji kadar glukosa dilakukan dengan metode GOD-PAP (*Glucose Oxidase-Peroxidase Aminoantipirin*). Metode ini merupakan metode yang menggunakan prinsip enzimatik melibatkan enzim glukosa oksidase. Enzim ini akan mengkatalisis



in melepaskan hidrogen peroksida yang selanjutnya akan gen dan menghasilkan kompleks berwarna merah. Pengujian menyiapkan 10 µl hemolimfa larva dari masing-masing kelompok dan disentrifugasi selama 10 menit, 4000 rpm, 4°C. Supernatan an dengan reagen lalu diinkubasi selama 10 menit pada 25°C (1). Sampel kemudian diukur kadar glukosanya menggunakan

Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Kadar glukosa diukur dengan rumus:

$$\text{Kadar Glukosa (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Faktor pembagi}} \times 100\%$$

### II.2.5 Pengujian *crawling thermal sensitivity D. melanogaster*

Pengujian ini dilakukan untuk mengukur sensitivitas larva *D. melanogaster* terhadap stimulus berupa suhu panas. Prosedur yang dilakukan sesuai yang protokol yang dilakukan Dhar dkk (2020) dalam *Chapter 18: Various Behavioural Assays to Detect the Neuronal Abnormality in Flies* (hlm. 225-235) dari buku yang diedit oleh Mishra, yang telah dimodifikasi. Pengujian dilakukan dengan menyiapkan plat agar 2% terlebih dahulu. Plat agar 2% disiapkan dengan menimbang 0.3 g agar serbuk pada labu Erlenmeyer, kemudian ditambahkan *aquadest* sebanyak 15 ml untuk membuat larutan agar 2%. Aduk larutan dengan hingga tercampur merata, kemudian panaskan di kompor listrik hingga campuran menjadi bening. Setelah bening, keluarkan campuran lalu tuang sebanyak  $\pm 5$  mL pada vial dan disiapkan sebanyak tiga vial. Kemudian, dinginkan selama 20 menit dan tunggu hingga memadat. Setelah memadat, plat agar 2% bisa digunakan. Selanjutnya dilakukan prosedur pengujian. Panaskan air sebanyak  $\pm 20$  mL pada gelas beaker dengan suhu 40°C. Ukur temperatur dengan menggunakan termometer. Setelah mencapai suhu tersebut, siapkan plat agar 2% yang telah disiapkan serta siapkan 10 larva instar III yang telah dicuci dengan larutan NaCl 0,9%. Larva yang telah dicuci kemudian dipindahkan ke plat agar yang telah disiapkan. Letakkan vial agar diatas air dengan suhu 40°C. Amati aktivitas larva selama 5 menit, kemudian keluarkan vial dan hitung jumlah larva yang berhasil menjauhi agar dan yang tetap berada di agar (Dhar dkk., 2020).

### II.2.6 Penyiapan sampel RNA dan analisis ekspresi gen

RNA diisolasi menggunakan *PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™)* berdasarkan prosedur Green dan Sambrook (2020) dengan beberapa modifikasi. Sepuluh larva dimasukkan ke *treff tube*, ditambahkan 300  $\mu$ L lysis buffer dan 3  $\mu$ L 2-mercaptoethanol, lalu larva dihancurkan menggunakan *micropestle*. Campuran disentrifugasi selama 2 menit pada 14.000 rpm, dan filtrat dipindahkan ke *treff tube* baru. Selanjutnya, 300  $\mu$ L etanol 70% ditambahkan dan divortex selama 10 detik, kemudian sampel disentrifugasi dalam *spin cartridge* selama 15 detik pada 14.000 rpm, proses ini diulang dua kali.



ur dengan 700  $\mu$ L *Wash Buffer I* dan disentrifugasi selama 15  
 ahkan ke *treff tube* baru, ditambahkan 500  $\mu$ L *Wash Buffer II*  
 lu, *spin cartridge* disentrifugasi 14.000 rpm 1 menit, lalu  
 f tube yang baru. Tambahkan 40  $\mu$ L *RNAse-free water*,  
 2 menit, dan RNA disimpan pada -80°C. Analisis ekspresi gen  
 kan real-time PCR dengan *GoTaq® 1-Step RT-qPCR System*  
 yang digunakan adalah *pain* untuk gen termosensitif, *dilp2* untuk

parameter sekresi insulin dan *rp49* sebagai gen referensi. Volume reaksi PCR adalah 10  $\mu$ L, dengan siklus: 95°C selama 10 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 10 detik (Green dan Sambrook, 2020).

**Tabel 2. Sekuens primer masing-masing gen**

Nama Gen	Sekuens Primer		Kondisi
	Forward	Reverse	
<i>pain</i>	5'-CAC TCT CAA CAC CAG GTT GTC- 3'	5' -AGG TTT CCT GGA TCC CTA GAG- 3'	1. PCR cycle: 40 Siklus 2. Reverse transcription: 37°C, 15 menit 3. Hot start: 95°C, 10 menit
<i>dilp2</i>	5'- TCT GCA GTG AAAAGC TCA ACGA- 3'	5'- CAA ACT GCA GGGG ATT GAGG- 3'	4. Denaturasi: 95°C, 10 detik 5. Annealing: 60°C, 30 detik
<i>rp49</i>	5'- GAC GCT TCA AGG GAC AGT ATC TG - 3'	5' - AAA CGC GGT TCT GCA TGA G - 3'	6. Extension: 72°C, 10 detik

### II.2.7 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil pengujian *thermal sensitivity*, kadar glukosa dan hasil analisis ekspresi gen digunakan metode *t-test* dan *one-way ANOVA*. Semua hasil analisis statistik diolah dengan software *GraphPad Prism® 9*. Data hasil *one-way ANOVA* kemudian dilakukan uji lanjutan yakni pendekatan *post-hoc Tukey* dan *Dunnett*.

