

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Hiperglikemia merupakan peningkatan kadar glukosa darah, yaitu di atas 125 mg/dL saat puasa dan lebih dari 180 mg/dL dua jam setelah makan. Jika tidak ditangani, hiperglikemia dapat menyebabkan resistensi insulin, yang merupakan faktor risiko utama diabetes melitus tipe 2 (DM tipe 2) (Tomás et al., 2002). Pada tahun 2021, sekitar 529 juta orang di seluruh dunia hidup dengan diabetes, dengan sekitar 96% kasus disebabkan oleh DM tipe 2. Angka ini diproyeksikan meningkat menjadi 1,31 miliar pada tahun 2050 (Ong et al., 2023), menunjukkan tren yang mengkhawatirkan dan kebutuhan mendesak untuk intervensi yang efektif.

Selain itu, individu dengan hiperglikemia memiliki kecenderungan terhadap inflamasi kronis, yang dikaitkan dengan peningkatan risiko penyakit kardiovaskular, penurunan kualitas hidup, dan angka kematian yang lebih tinggi (Gujral et al., 2021; Matuschik et al., 2022; Paolisso et al., 2021; Upur et al., 2022; Yang et al., 2024; Zhang et al., 2021). Respon inflamasi ini dipicu oleh aktivasi sistem imun, yang dipicu melalui produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebihan di mitokondria, yang menyebabkan stres oksidatif dan memperburuk resistensi insulin (Yuan et al., 2019). Sistem imun humoral, khususnya melalui aktivasi *Toll Like Receptors* (TLRs), memainkan peran sentral dalam proses inflamasi ini (Pahwa & Jialal, 2016). Aktivasi TLR, seperti TLR4, diketahui memicu inflamasi yang memperburuk resistensi insulin pada mamalia. Bukti dari studi pada tikus menunjukkan bahwa penghapusan TLR4 dapat mengurangi resistensi insulin dan disfungsi sel beta pankreas, menegaskan peran pentingnya dalam jalur ini (Jia et al., 2014; Mukhuty et al., 2021).

Fenomena serupa juga telah diamati pada organisme model seperti *Drosophila melanogaster*, yang memiliki sistem imun humoral serupa dengan manusia, termasuk jalur Toll dan Imd (De Gregorio et al., 2002; Tanji & Ip, 2005). Jalur Toll, yang secara fungsional analog dengan TLR pada mamalia, mengaktifkan faktor transkripsi *Dorsal-related Immunity Factor* (Dif), yang menginduksi ekspresi gen peptida antimikroba untuk melindungi terhadap infeksi dan kerusakan sel (Buchon et al., 2014; Leulier et al., 2000). Selain itu, aktivasi jalur Toll pada *D. melanogaster* terbukti memengaruhi sinyal insulin dengan menghambat fosforilasi Akt (Roth et al., 2018).

Sebagai model organisme yang berguna dalam penelitian biomedis, *D. melanogaster* memiliki kesamaan genetik sekitar 75% dengan manusia serta siklus hidup yang singkat, yaitu sekitar 10–14 hari (Lloyd & Taylor, 2010; Pandey & Nichols, 2011). Karakteristik ini mendukung penggunaannya untuk mempelajari mekanisme molekuler yang berkaitan dengan penyakit metabolik, termasuk hiperglikemia, yang dipicu oleh



ula. *D. melanogaster* memiliki *Insulin Producing Cells* (IPCs) yang kreas mamalia. IPCs menghasilkan *Drosophila Insulin-like Protein* 1 hingga *dilp8*, yang berfungsi menyerupai insulin pada manusia *melanogaster* berperan dalam pensinyalan insulin dengan pola iriasi pada setiap tahap perkembangan. *dilp1* berperan dalam insulin dan aktivitas hormon, dengan ekspresi maksimal pada tahap kan jalur pensinyalan insulin untuk metabolisme dan pertumbuhan,

dengan ekspresi tertinggi pada larva awal, sementara *dilp3* memiliki fungsi serupa namun mencapai ekspresi maksimal pada larva tahap akhir dan pre-pupa. *dilp4* berperan dalam mengatur perilaku makan larva dan terekspresi paling tinggi pada tahap embrio. *dilp5* berfungsi dalam pensinyalan insulin dengan ekspresi maksimal pada periode larva, awal pupa, dan dewasa. *dilp6* mendorong pertumbuhan selama kondisi kelaparan, dengan ekspresi tertinggi sepanjang periode pupa. *dilp7* menunjukkan ekspresi maksimal pada pupa tahap akhir, sedangkan *dilp8* merupakan anggota *dilp* yang berbeda karena mengkode protein Lg3, yang mengoordinasikan status pertumbuhan jaringan selama perkembangan, dengan ekspresi tertinggi pada tahap pupa (Alfa & Kim, 2016; Nässel et al., 2013).

Selain yang berhubungan dengan insulin, kondisi hiperglikemia juga erat kaitannya dengan biogenesis mitokondria. Gen *spargel* (*srl*), homolog dari *PGC-1 $\alpha$*  pada mamalia, berperan dalam respirasi mitokondria, biogenesis, dan sinyal insulin (Tiefenböck et al., 2010). Selain itu, gen *tom40* mengkodekan *Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane 40* (TOM40), yang penting dalam transportasi dan penyortiran protein ke mitokondria, dengan ekspresi yang terkait erat dengan fungsi mitokondria seperti proliferasi, migrasi, dan invasi sel (Sayyed & Mahalakshmi, 2022). Adapun gen *Indy* (*I'm dead not yet*) homolog dengan gen *SLC13A5* yang mengkode NaCT, merupakan transporter membran plasma mamalia yang berperan dalam pengangkutan sitrat selama proses metabolisme. Aktivitas gen ini secara langsung memengaruhi metabolisme sitrat, yang menjadikannya relevan dalam penelitian terkait penyakit metabolik (Rogers & Rogina, 2015). Beberapa gen penting yang terkait dengan perkembangan dan metabolisme *D. melanogaster*, seperti *dilp2*, *dilp3*, *dilp5*, *srl*, *tom40*, dan *indy*, telah dianalisis pada kondisi hiperglikemia (Ecker et al., 2017; George & Jacobs, 2019; Palanker Musselman et al., 2011; Rogers & Rogina, 2015). Gen-gen ini menunjukkan hubungan erat dengan jalur metabolisme dan sinyal insulin yang serupa dengan mekanisme pada mamalia. Oleh karena itu, dengan berbagai keunggulan genetik dan fisiologisnya, *D. melanogaster* menjadi model yang sangat berguna untuk mempelajari gangguan metabolik seperti hiperglikemia (Baenas & Wagner, 2022; Loreto et al., 2021; Meshrif et al., 2022).

Meskipun berbagai temuan telah diungkap, dampak stres metabolik seperti hiperglikemia dalam kondisi imunodefisiensi humoral pada jalur Toll masih belum dipahami secara menyeluruh. Secara khusus, bagaimana mutasi pada gen-gen yang terlibat dalam sistem imun humoral jalur Toll, seperti *psh* (Persephone) dan *modSP* (modular serine protease), memengaruhi respons tubuh terhadap stres metabolik pada *D. melanogaster* tetap menjadi pertanyaan yang belum terjawab sepenuhnya.

Persephone dan *modSP* adalah sensor imun yang bekerja di luar sel untuk mendeteksi sinyal ekstraseluler, memainkan peran penting dalam interaksi antara protein Toll (Buchon et al., 2009; Chamy et al., 2008). Protein-protein ini oleh patogen tetapi juga oleh kerusakan sel, termasuk keberadaan *Molecular Patterns* (DAMPs) dan sinyal nekrotik (Buchon et al., 2008). Telah diketahui meningkatkan apoptosis (Rani et al., 2020), yang dapat memicu kematian sel yang mungkin dikenali oleh Persephone sebagai bagian dari respons imun. Mutasi pada protein-protein ini dapat mengganggu kemampuan sel untuk mendeteksi sinyal stres ekstraseluler. Mutasi pada protein-protein ini dapat mempengaruhi respons tubuh terhadap stres metabolik, seperti hiperglikemia,



dengan mengganggu aktivasi imun dan mengubah interaksi antara sistem imun dan metabolik normal.

Untuk upaya mengatasi keterbatasan pengetahuan mengenai hubungan antara sistem imun dan regulasi metabolik, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis dampak imunodefisiensi humoral pada jalur Toll akibat diet tinggi gula. Fokus penelitian ini adalah pada mutan *D. melanogaster* yang membawa mutasi pada gen *psh* (yang mengkode Persephone) dan *modSP* (yang mengkode modular serine protease), serta responnya terhadap diet tinggi gula sebagai induksi kondisi hiperglikemia. Mengingat peran sentral jalur Toll dalam respon imun dan regulasi metabolik, disfungsi jalur Toll dihipotesiskan akan menyebabkan perubahan respon metabolik terhadap paparan DTG, termasuk perubahan ekspresi gen, tingkat kelangsungan hidup, dan sinyal insulin. Penelitian ini diharapkan memberikan pemahaman yang lebih mendalam tentang hubungan antara fungsi imun dan regulasi metabolik, mengungkap bagaimana imunitas dapat berkontribusi pada perkembangan penyakit metabolik seperti diabetes tipe 2, serta menawarkan wawasan untuk strategi terapi potensial.

## 1.2 Perumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana dampak imunodefisiensi humoral jalur Toll pada fenotip dan profil ekspresi gen *D. melanogaster* yang diberi diet tinggi gula.

## 1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Penelitian

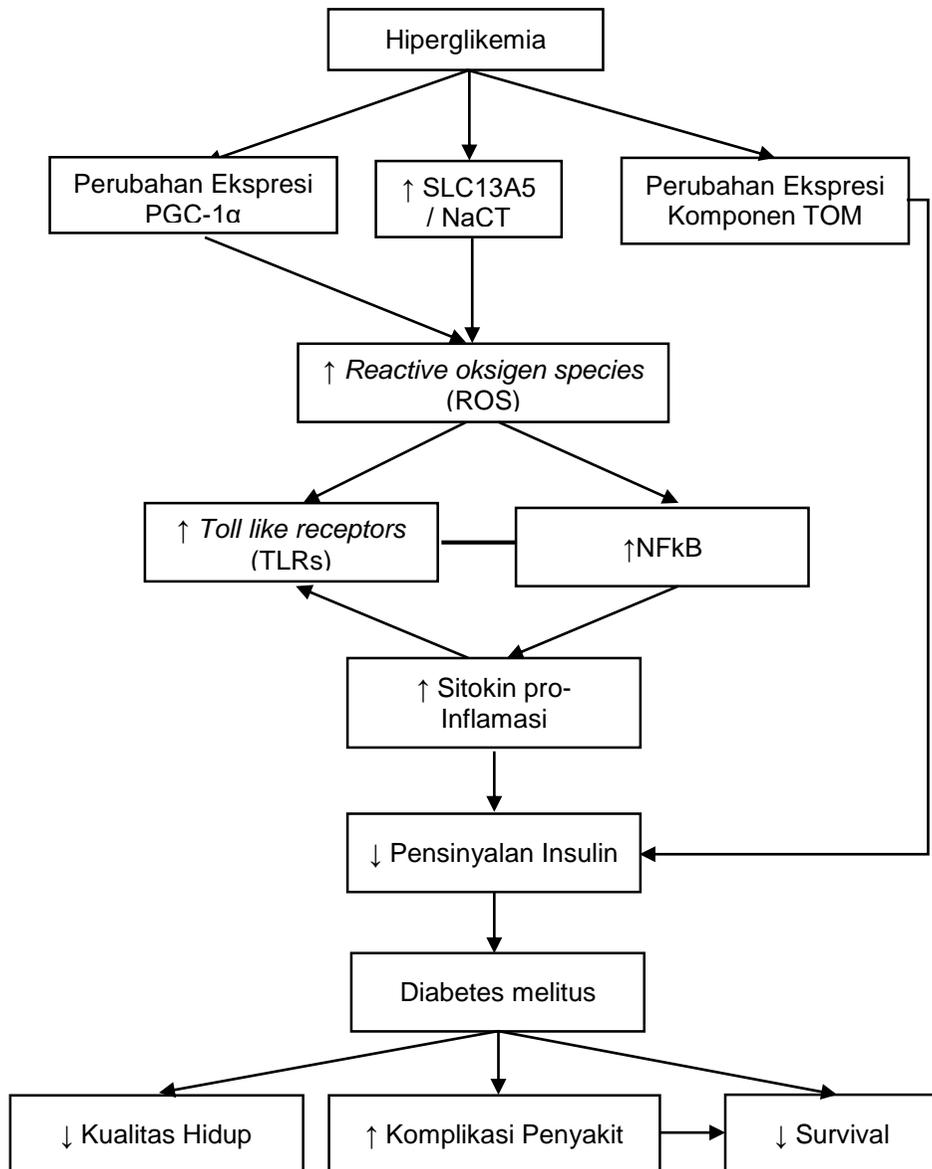
Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis dampak imunodefisiensi humoral jalur Toll pada fenotip dan profil ekspresi gen *D. melanogaster* yang diberi diet tinggi gula.

### 1.3.2 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan menjadi landasan yang kuat dalam pengembangan ilmu pengetahuan di bidang ilmu farmasi khususnya pada mengembangkan model pengujian *in vivo* untuk penelusuran target terapi maupun kandidat obat baru yang lebih efektif dalam penanganan diabetes melitus.



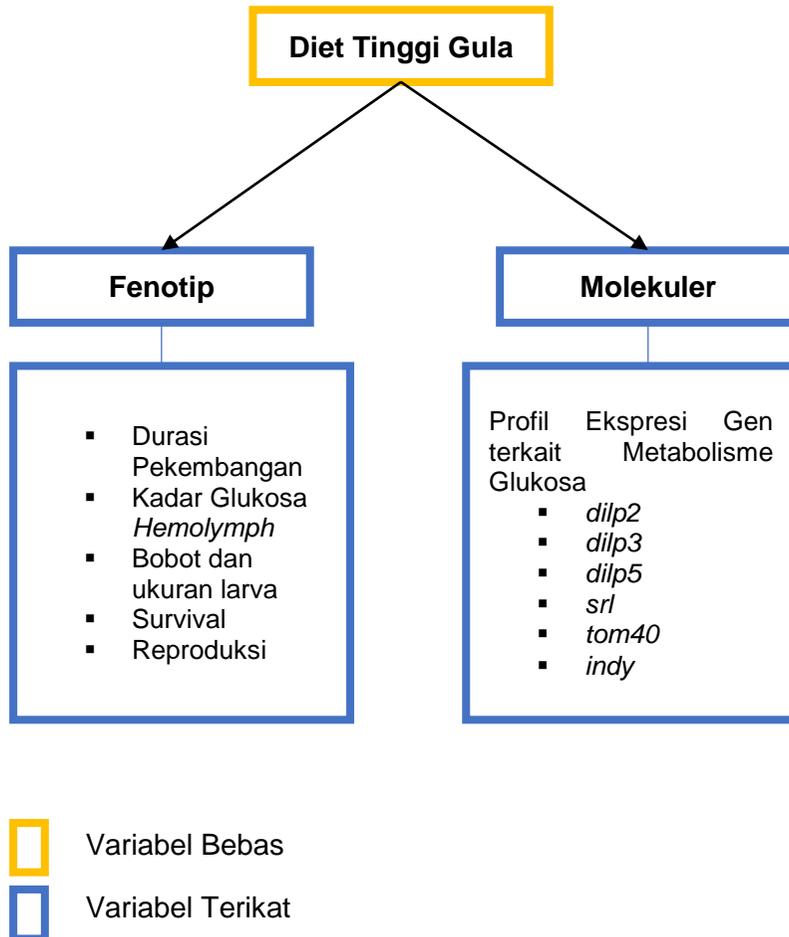
#### 1.4 Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori Penelitian



## 1.5 Kerangka Konsep



**Gambar 2.** Kerangka Konsep Penelitian



## BAB II METODE PENELITIAN

### 2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk menganalisis dampak imunodefisiensi humoral pada organisme model *Drosophila melanogaster* yang diberi diet tinggi gula dengan parameter pengamatan secara fenotip dan molekuler. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi-Toksikologi dan Laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar. Waktu penelitian terhitung mulai dari perencanaan penelitian, pelaksanaan penelitian dan perolehan hasil penelitian. Pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Juni-November 2024.

### 2.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2-mercaptoethanol, agar (Swallow®), air suling, alkohol 70%, asam propionat, ragi, GOD-PAP (Glory), metil paraben, natrium klorida 0,9%, primer gen (*dilp2*, *dilp3*, *dilp5*, *srl*, *tom40*, *indy* dan *rp49*), *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen™), *Universal One-Step RT-qPCR Kit* (Luna™), sukrosa (Smart-Lab®), tepung jagung (Mugo®) dan *treff tube* (Treff lab®).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex®), centrifuge, jangka sorong analitik, kompor listrik (IKA C-MAG HS®), micropestle, mikropipet (Dragonlab), papan CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> stage), plug vial (Biologix®), spektrofotometer (Shimadzu UV-Vis 1800), spin cartridge (Invitrogen™), thermal cycler qPCR (RotorGene Q, Qiagen®), timbangan analitik (Ohaus®), tip mikropipet (Gen Follower®), vial (Biologix®), dan zoom stereo microscope (Motic®).

### 2.3 Metode Penelitian

#### 2.3.1 Penyiapan Hewan Coba

Lalat buah (*D. melanogaster*) yang digunakan yaitu strain genotip *w<sup>1118</sup>* dan mutan *psh[1];modSP[KO]* yang diperoleh 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. Lalat dipindahkan pada pakan baru setiap 3-5 hari.

#### 2.3.2 Pembuatan Pakan Perlakuan *D. 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 mineral hingga mencapai volume 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 paraben sebagai pengawet. Komposisi pakan dapat dilihat pada



**Tabel 1.** Komposisi pakan *D. melanogaster*

Bahan	Diet Normal (UFRG)	Diet Tinggi Gula
Tepung jagung	7,5 g	7,5 g
Ragi	2,5 g	2,5 g
Agar	0,9 g	0,675 g
Sukrosa	4,5 g	30 g (Ecker et al., 2017)
Asam propionat	400 µL	400 µL
Metil paraben	450 µL	450 µL
Air mineral	Ad 100 mL	Ad 100 mL

### 2.3.3 Pemberian Perlakuan

Sebanyak 30-40 lalat berumur 4-7 hari, terdiri atas 15-20 ekor jantan dan 15-20 ekor betina, dipelihara pada pakan diet normal (DN) dan diet tinggi gula (DTG) sesuai yang tertera pada tabel 1. Lalat dibiarkan kawin selama 5-7 hari hingga menghasilkan larva instar kedua dan instar ketiga, yang selanjutnya digunakan sebagai sampel untuk pengujian.

### 2.3.4 Analisis Fenotip

#### 2.3.4.1 Analisis Durasi Perkembangan

Analisis durasi perkembangan dilakukan untuk mengamati pengaruh pemberian DTG terhadap perkembangan *D. melanogaster*. Pengujian dilakukan berdasarkan metode sebelumnya dengan sedikit modifikasi (Pasco & Léopold, 2012). Pengujian dimulai dengan mengawinkan lima ekor lalat betina virgin (berumur 5-8 jam setelah eklosi) dan lima ekor lalat jantan di dalam pakan perlakuan. Lalat dibiarkan kawin selama 48 jam, kemudian diamati waktu perubahan dari tahap embrio menjadi pupa dan dari pupa menjadi imago (lalat dewasa).

#### 2.3.4.1 Analisis Kadar Glukosa *Hemolymph*

Pengukuran kadar glukosa *hemolymph D. melanogaster* dilakukan dengan menggunakan larva instar tiga sebanyak 70-100 ekor untuk memperoleh 10 µL *hemolymph* (Lourido et al., 2021). Larva dimasukkan ke dalam tabung *microcentrifuge* dan dihancurkan menggunakan *micropestle*. Larutan yang telah dihancurkan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 16.000 rpm. *Hemolymph* sebanyak 10 µL dipipet dan dicampurkan ke dalam tabung *microcentrifuge* yang berisi 1 mL reagen GOD-PAP (Glucose Oxidase – Peroxidase Aminoantipirin). Campuran tersebut dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit.

Absorbansi campuran diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Sebagai pembanding, absorbansi larutan standar dengan kadar ga diukur. Kadar glukosa *hemolymph* dihitung menggunakan rumus



$$\frac{\text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Standar}} \times K. \text{Standar mg/dL}$$

### 2.3.4.2 Analisis Ukuran Panjang dan Bobot Badan Larva

Uji 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 sepuluh larva setiap kelompok untuk mendapatkan bobot rata-rata menggunakan timbangan analitik (Lourido et al., 2021). Sedangkan pengukuran panjang serta lebar badannya diukur menggunakan jangka sorong analitik.

### 2.3.4.3 Analisis Survival

Uji kelangsungan hidup (*survival*) *D. melanogaster* dilakukan mulai dari tahap larva instar dua. Sebanyak sepuluh larva dari setiap kelompok perlakuan dimasukkan ke dalam vial yang berisi pakan baru sesuai dengan perlakuan masing-masing kelompok. Selanjutnya, diamati jumlah larva yang berhasil bermetamorfosis menjadi pupa serta jumlah pupa yang berkembang menjadi lalat dewasa. Setelah lalat menetas dari pupa, seluruh kelompok diberikan pakan normal untuk mengevaluasi pengaruh perbaikan pakan terhadap lalat yang sebelumnya menerima perlakuan DTG selama tahap awal kehidupannya. Pengamatan terhadap angka kematian harian dilakukan hingga seluruh lalat dalam setiap kelompok mati (Ismail et al., 2023).

### 2.3.4.3 Analisis Reproduksi

Uji reproduksi pada *D. melanogaster* dilakukan dengan menggunakan lalat betina perawan (*virgin*) yang berumur 5–7 jam setelah oklusi. Sebanyak lima ekor lalat betina dikawinkan dengan lalat jantan pada media pakan perlakuan. Proses perkawinan berlangsung selama 72 jam, setelah itu diamati dan dihitung jumlah pupa yang dihasilkan (Koliada et al., 2020).

## 2.3.5 Analisis Secara Molekuler

### 2.3.5.1 Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan menggunakan *RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit* (Invitrogen®). Sepuluh larva *D. melanogaster* yang masih hidup dimasukkan ke dalam *treff tube*. Sebelum proses lisis dan homogenisasi dilakukan, larutan *Lysis Buffer* segar disiapkan dengan menambahkan 10 µL *2-mercaptoethanol* untuk setiap 1 mL Buffer Lisis hingga mencapai konsentrasi akhir sebesar 1%. Buffer Lisis yang telah disiapkan ditambahkan ke dalam sampel menggunakan ujung pipet yang steril dan bebas RNase. Jaringan larva dihancurkan menggunakan *micropestle* steril dalam tabung *treff tube* dengan gerakan naik-turun dan memutar hingga jaringan terdispersi secara sempurna. Setelah homogenisasi selesai, *micropestle* dikeluarkan dari tabung, dan sampel disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke tabung mikrosentrifus bebas RNase untuk dilakukan tahap pengikatan, pencucian, dan elusi.



ktan, pencucian, dan elusi dimulai dengan menambahkan satu inol 70% ke homogenat jaringan. Homogenat dicampur hingga igocok atau memutar menggunakan sentrifus pada kecepatan 10 detik untuk menghilangkan endapan yang mungkin terbentuk etanol. Sebanyak 700 µL sampel, termasuk endapan yang tersisa, artridge, lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 gan. Aliran yang keluar dibuang, dan *spin cartridge* dimasukkan

kembali ke *collection tube* yang sama; langkah ini diulang hingga seluruh sampel selesai diproses. Selanjutnya, sebanyak 700  $\mu\text{L}$  *Wash Buffer I* ditambahkan ke *spin cartridge*, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik pada suhu ruangan. Aliran yang keluar dibuang, dan *cartridge* dipindahkan ke tabung pengumpul baru. Sebanyak 500  $\mu\text{L}$  *Wash Buffer II* dengan etanol ditambahkan ke kartrid putar, lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik pada suhu ruangan; langkah ini diulang sekali. Untuk mengeringkan membran yang mengikat RNA, *spin cartridge* disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruangan, kemudian *collection tube* dibuang, dan *cartridge* dipindahkan ke tabung pemulihan. Sebanyak 40  $\mu\text{L}$  air bebas RNase ditambahkan ke tengah membran *spin cartridge*, diinkubasi pada suhu ruangan selama 1 menit, lalu disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 14.000 rpm. Langkah ini diulangi sekali lagi dengan volume air bebas RNase yang sama. RNA yang telah dimurnikan disimpan di atas es jika digunakan dalam beberapa jam ke depan, atau disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  untuk penyimpanan jangka panjang.

### 2.3.5.2 Uji Profil Ekspresi Gen menggunakan RT-qPCR

Pengukuran level ekspresi gen dilakukan dengan metode *real-time reverse transcription PCR* (RT-PCR) menggunakan kit *Universal One-Step RT-qPCR Kit* (Luna<sup>®</sup>) yang dijalankan berdasarkan protokol dari pabrik. Setiap kelompok perlakuan diperiksa secara terpisah dengan *RotorGene Q* (Qiagen) dalam volume reaksi masing-masing 10  $\mu\text{L}$ . Profil pengoperasian RT- qPCR sebagai berikut : Suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit,  $95^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit, diikuti dengan 40 siklus amplifikasi ( $95^{\circ}\text{C}$  selama 10 detik,  $60^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, dan  $72^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik adalah digunakan untuk setiap siklus). Verifikasi produk amplifikasi yang diharapkan dilakukan berdasarkan profil kurva leleh standar berkisar  $60^{\circ}\text{C}$  hingga  $95^{\circ}\text{C}$ . RT-qPCR dijalankan dengan masing-masing satu set primer dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2.** Sekuens primer gen

Gen	Forward primer	Reverse primer
<i>dilp2</i>	TCTGCAGTGAAAAGCTCAACGA	CAACTGCAGGGGATTGAGG
<i>dilp3</i>	ATCCTTATGATCGGCGGTGT	GTTACGGGGTCCAAAGTTC
<i>dilp5</i>	CCCCGCCTTGATGGACATG	CATGTGGTGAGATTCGGAGCTA
<i>srl</i>	CTCTTGGAGTCCGAGATCCGCAA	GGGACCGCGAGCTGATGGTT
<i>tom40</i>	TGCACGTGTGCTACTACCAG	ATTCCGCCTCTGAAGACCAG
<i>indy</i>	TACTTTGGCTTATCCGATGCC	GTGCTGTCCATATCCTCCATTC
<i>rp49</i>	CGCTTCAAGGGACAGCATCTG	AAACGCGGTTCTGCATGAG

## 2.4 Analisis Data dan Statistik



Analisis data pada alat dewasa dilakukan menggunakan uji log-rank dan disajikan Kaplan-Meier. Selain itu, uji *Student's t-test* digunakan untuk perkembangan, kadar glukosa, bobot dan ukuran larva, *survival* uji, serta hasil RT-qPCR. Seluruh analisis statistik dilakukan dengan perangkat lunak *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 9 (GraphPad software).