

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penuaan merupakan proses biologis alami yang dianggap sebagai faktor risiko bagi banyak penyakit pada manusia. Proses ini menyebabkan penurunan fungsi fisik progresif dan bersifat ireversibel akibat akumulasi kerusakan seluler, yang berhubungan erat dengan berbagai gangguan kronis pada manusia, contohnya diabetes, penyakit Alzheimer, Parkinson, penyakit kardiovaskular, penyakit paru obstruktif kronik (PPOK), osteoporosis, dan banyak penyakit lainnya. Penyakit-penyakit tersebut tentunya akan menurunkan kualitas hidup seseorang, sehingga diperlukan pencegahan atau terapi yang efektif terkait penuaan (Hou et al., 2019). Salah satu faktor utama yang berpengaruh dalam proses penuaan adalah stres oksidatif.

Stres oksidatif merupakan kondisi ketidakseimbangan dalam pembentukan dan netralisasi *reactive oxygen species* (ROS). Proses ini akan berdampak pada kerusakan oksidatif pada biomolekul sel sehingga menyebabkan perubahan DNA, peroksidasi lipid, oksidasi protein, dan disfungsi mitokondria (Di Carlo and Sorrentino, 2024).

Efek merugikan dari stres oksidatif dapat dikurangi dengan menetralkan ROS dengan antioksidan. Secara fisiologis, manusia memiliki sistem pertahanan antioksidan yang terdiri atas antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan eksogen, seperti vitamin C, vitamin E, dan polifenol, umumnya bekerja dengan cara menangkap radikal bebas. Namun, berbagai studi menunjukkan bahwa hasil terapi yang diperoleh masih bersifat inkonsisten dan sulit direproduksi secara klinis (Manful et al., 2025). Oleh karena itu, strategi terapeutik yang mampu memodulasi aktivitas antioksidan endogen dinilai lebih menjanjikan dibandingkan sekadar suplementasi antioksidan eksogen.

Salah satu pendekatan yang digunakan dalam mendukung strategi terapeutik ini adalah melalui *drug repurposing*. Obat yang menarik perhatian sebagai kandidat *drug repurposing* dalam konteks ini adalah metformin. Metformin merupakan obat golongan biguanid yang disetujui oleh *Food and Drug Administration* pada tahun 1994 dan merupakan terapi lini pertama pada pasien diabetes melitus tipe 2. Akan tetapi, selain efek antihiperglikemik, metformin menunjukkan aktivitas antioksidan yang berhubungan dengan stres oksidatif. Berbeda dengan antioksidan pada umumnya yang bekerja dengan menangkap ROS, metformin terbukti pada studi *in vitro* yang dilakukan pada sel endotel vena umbilikalis manusia, bahwa metformin dapat menghambat NADPH melalui jalur *AMP-activated protein kinase*. Dengan penghambatan NADPH, metformin dapat membantu untuk mengurangi pembentukan ROS, sehingga meningkatkan efek perlindungan antioksidannya. Selain itu, metformin dapat menyebabkan peningkatan ekspresi antioksidan endogen enzimatis seperti superoksida dismutase (*sod*), katalase (*cat*), dan glutathione peroksidase (*GPx*). Enzim-enzim tersebut bekerja menetralkan ROS melalui reaksi katalitik, menjaga keseimbangan redoks dan mencegah kerusakan makromolekul (Buczyńska et al., 2024; Manful et al., 2025).

Namun, mekanisme molekuler spesifik yang mendasari efek antioksidan pada metformin, terutama terkait dengan aktivitas antioksidan endogen pada kondisi inflamasi kronis, masih memerlukan kajian lanjutan. Untuk mengkaji hal tersebut, diperlukan organisme model yang genetiknya mudah dimanipulasi serta dapat diamati secara jelas.

Salah satu organisme model yang dapat digunakan dalam studi aktivitas antioksidan adalah *Drosophila melanogaster*. Banyak dari penyakit yang diderita oleh manusia, memiliki homolog pada *Drosophila*. Lebih dari 70% gen yang berhubungan dengan penyakit penuaan pada manusia juga diekspresikan pada organisme ini. Keunggulan dari *Drosophila* meliputi siklus hidup yang singkat, tingkat reproduksi yang tinggi, serta fleksibilitas genetik yang kuat. Oleh karena itu, *D. melanogaster* merupakan hewan coba yang ideal untuk studi aktivitas antioksidan (Wu, 2025).

Di antara enzim antioksidan, gen yang dapat diperiksa terkait aktivitas antioksidan endogen adalah gen *sod* (superoksida dismutase). Superoksida dismutase merupakan metaloenzim yang memegang peran penting dalam mekanisme pertahanan seluler dalam melawan stres oksidatif, yaitu sebagai lini pertahanan utama dalam melawan kerusakan oksidatif sistem biologis yang diinduksi oleh ROS. Saat ini, terdapat tiga bentuk *sod* yang ditemukan dalam mamalia, yaitu superoksida dismutase ekstraseluler (EcSOD, SOD3), mangan superoksida dismutase (Mn-SOD, SOD2), dan tembaga-seng superoksida dismutase (Cu,Zn-SOD, SOD1) (Anwar et al., 2025).

Oleh karena itu, melalui penelitian ini akan diuji secara lebih lanjut mengenai efek metformin terhadap aktivitas antioksidan endogen melalui ekspresi gen *sod1* dan *sod2* pada *D. melanogaster* model autoinflamasi yang merepresentasikan kondisi stres oksidatif kronis.

1.2 Teori

1.2.1 Metformin

Metformin merupakan obat yang memiliki efek antihiperlipidemik yang pertama kali disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) pada tahun 1994 dan menjadi obat lini pertama pada pasien diabetes melitus tipe 2. Saat ini, metformin juga digunakan untuk pengobatan diabetes gestasional, manajemen penambahan berat badan akibat antipsikotik, dan pengobatan sindrom ovarium polikistik (PCOS). Selain itu, metformin juga menunjukkan aktivitas antioksidan yang berkontribusi dalam reduksi stres oksidatif (Buczyńska et al., 2024).

1.2.2 Antioksidan endogen

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralkan ROS dengan cara mendonorkan elektron secara langsung untuk mereduksi spesies tersebut atau mengkatalisis reaksi yang mengarah pada reduksi kimia. Antioksidan terbagi atas 2 yaitu endogen dan eksogen. Antioksidan endogen merupakan jenis antioksidan yang dapat diproduksi secara alami oleh tubuh sebagai sistem pertahanan melawan ROS (Korczowska-Łacka et al., 2023).

1.2.3 Superoksida dismutase

Superoksida dismutase merupakan enzim metalo yang berperan dalam mengkatalisis reaksi dismutasi radikal superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. Enzim ini memiliki beberapa isoform yang berbeda berdasarkan struktur serta jenis kofaktor logam yang dikandungnya. Salah satu jenis isoformnya adalah *sod1* yang mengandung tembaga dan seng. Enzim ini diekspresikan terutama pada astrosit, serta dapat ditemukan dalam plasma. Selain itu, sebagian kecil *sod1* juga terlokalisasi pada ruang intramembran plasma. Selain *sod2*, terdapat isoform lain dari superoksida dismutase,

yaitu *sod2* yang mengandung mangan dan terlokalisasi pada matriks mitokondria (Korcowska-Łącka et al., 2023).

1.2.4 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster merupakan jenis organisme model yang digunakan dalam penelitian genetika dan biologi molekuler. Organisme model ini memiliki berbagai keunggulan yang menjadikannya model yang efektif dan efisien dalam penelitian biologi. Beberapa keunggulan utamanya adalah efektivitas biaya, laju reproduksi yang tinggi karena dapat menghasilkan sekitar 100 telur per hari, serta siklus hidupnya yang singkat. Studi perbandingan genom menunjukkan bahwa sekitar 60% gen *Drosophila* memiliki homolog dengan manusia dan sekitar 75% di antaranya berkaitan dengan gen penyakit manusia yang telah diketahui. Selain itu, minimnya pembatasan etis dan hukum dalam penggunaannya menjadikan *D. melanogaster* menarik untuk digunakan dalam studi biologi molekuler (Giansanti et al., 2025).

1.3 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana efek metformin terhadap aktivitas antioksidan endogen pada *D. melanogaster*?

1.4 Tujuan dan Manfaat

1.4.1 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek metformin terhadap aktivitas antioksidan endogen pada *D. melanogaster*.

1.4.2 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memperkenalkan pendekatan *drug repurposing* menggunakan *D. melanogaster* sebagai organisme model yang efisien untuk skrining efek farmakologis obat yang telah beredar terhadap target molekuler baru. Selain itu, penelitian ini dapat menyediakan bukti eksperimental *in vivo* yang mendukung metformin sebagai kandidat *drug repurposing* yang melibatkan stres oksidatif.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, bunsen, cawan petri, *deep freezer* -80°C, inkubator, korek api, kuas halus, mikropipet 1-10 µL, mikropipet 100-1000 µL, mikropipet 20-200 µL, ose steril, penutup vial, sendok tanduk, spoit 10 mL, *thermal cycler* qPCR (*RotorGene Q*, Qiagen®), timbangan analitik, tip biru, tip kuning, tip putih, tisu, dan vial *Drosophila* (Biologix®).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah agar (Swallow®), aluminium foil, *aquadest*, asam propionat, biakan *Escherichia coli*, *D. melanogaster* *PGRP-LB*⁴, etanol 70%, gula pasir, media Luria-Bertani (LB) *Broth* (HIMEDIA Lab Chemicals & Biochemicals®), Metformin HCl (Wellgreen Technology Co., LTD), metil paraben, *microtube*, *Total RNA Miniprep Kit* (Monarch®, New England Biolabs, Massachusetts, USA), *Universal One-Step RT-qPCR Kit* (Luna™, New England Biolabs, Massachusetts, USA), satu set primer *sod1*, satu set primer *sod2*, tepung jagung, dan *yeast*.

2.2 Metode Kerja

2.2.1 Penyiapan hewan coba *D. melanogaster*

Dalam penelitian ini digunakan larva instar 2 yang diperoleh dari hasil perkembangbiakan *D. melanogaster* strain *PGRP-LB*⁴ (Laboratory Host Defense and Response, Kanazawa University, Jepang). Lalat buah dikembangbiakkan dan dipelihara pada vial kultur berisi pakan serta disimpan pada suhu 25°C. Pengujian dibagi dalam beberapa kelompok uji yakni kelompok kontrol tanpa perlakuan, kontrol *heat-killed E. coli*, dan kelompok pemberian metformin dengan konsentrasi 1, 5, dan 25 mM. Masing-masing kelompok percobaan terbagi atas 5 replikasi yang akan digunakan untuk analisis ekspresi gen dan uji persentase eklosi.

2.2.2 Pembuatan larutan uji metformin

Pada pembuatan larutan uji metformin, terlebih dahulu dibuat larutan stok metformin HCl 500 mM yang dilakukan dengan melarutkan 0,414 gram metformin HCl dalam 5 mL air suling. Selanjutnya, dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 100 mM dan 20 mM.

2.2.3 Pembuatan *heat-killed E. coli*

Biakan *E. coli* strain FNCC 0091 dikultur dalam media LB *broth* pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, kultur *E. coli* diautoklaf suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 30 menit untuk mematikan bakteri (Hardiyanti et al., 2024).

2.2.4 Pembuatan pakan *D. melanogaster*

2.2.4.1 Pembuatan pakan standar *D. melanogaster*

Setiap 200 mL pakan dibuat dengan mencampurkan 15 gram tepung jagung (Tepung Jagung Instan, PT. Lancar Jaya Indonesia), 5 gram *yeast* (*Nature's Wonder Food*

Brewers Yeast, Jerman), 1,8 gram agar-agar (*Swallow Grass Cap* Rumput Walet, PT. Agrindo Bogatama), 9 gram gula pasir (Gulaku), kemudian ditambahkan air suling hingga mencapai volume 200 mL. Campuran tersebut dihomogenkan dan dipanaskan sampai suhu 100°C hingga mengental. Setelah dipanaskan, ditambahkan 800 µL asam propionat dan 900 µL metil paraben dan dihomogenkan. Selanjutnya, campuran dimasukkan ke dalam vial dan didiamkan sampai memadat.

2.2.4.2 Pembuatan pakan *D. melanogaster* yang mengandung *heat-killed E. coli*

Setiap 200 mL pakan dibuat dengan mencampurkan 15 gram tepung jagung (Tepung Jagung Instan, PT. Lancar Jaya Indonesia), 1,8 gram agar-agar (*Swallow Grass Cap* Rumput Walet, PT. Agrindo Bogatama), 9 gram gula pasir (Gulaku), kemudian ditambahkan media *LB Broth* yang mengandung *heat-killed E. coli* hingga mencapai volume 200 mL. Campuran tersebut dihomogenkan dan dipanaskan sampai suhu 100°C hingga mengental. Setelah dipanaskan, ditambahkan 800 µL asam propionat dan dihomogenkan. Selanjutnya, campuran dimasukkan ke dalam vial yang telah disterilkan menggunakan 70% sebelumnya dan didiamkan sampai memadat.

2.2.4.3 Pembuatan pakan perlakuan metformin

Pembuatan pakan perlakuan *D. melanogaster* yang mengandung metformin dilakukan dengan cara mencampurkan larutan stok metformin dengan konsentrasi 500 mM, 100 mM, dan 20 mM ke dalam pakan yang mengandung *heat-killed E. coli*. Sehingga, didapatkan konsentrasi pakan perlakuan yaitu 25 mM, 5 mM, dan 1 mM. Kemudian, campuran pakan dipindahkan ke dalam vial yang telah disterilisasi sebelumnya.

2.2.5 Perlakuan hewan uji

Larva instar 2 dikoleksi secara hati-hati menggunakan kuas halus yang dibasahi akuades steril untuk menghindari kerusakan fisik, kemudian dipindahkan ke vial berisi pakan standar, kontrol *heat-killed E. coli*, metformin 1 mM, 5 mM, dan 25 mM dan dibiarkan berkembang hingga mencapai tahap larva instar tiga. Selanjutnya, larva dikoleksi kembali menggunakan kuas halus dan diisolasi sesuai dengan prosedur kit.

2.2.6 Uji persentase dan waktu eklosi

Uji persentase dan waktu eklosi dilakukan untuk menilai kemampuan pupa dalam bertahan hingga menjadi lalat dewasa pada kondisi perlakuan yang diberikan. Pupa *D. melanogaster* yang sebelumnya telah diberikan induksi *heat-killed E. coli* dan diberikan metformin 1, 5, dan 25 mM serta KH dan KTP diamati setiap hari. Pencatatan dilakukan terhadap jumlah pupa yang berhasil menetas dan waktu menetas menjadi lalat dewasa hingga seluruh pupa pada kelompok KTP telah menetas atau mengalami kematian (Hardiyanti et al., 2024).

2.2.7 Penyiapan sampel RNA

Isolasi RNA total dilakukan menggunakan *Monarch® Total RNA Miniprep Kit* (New England Biolabs, USA) sesuai dengan protokol pabrikan. Sebanyak 10 larva instar ketiga dikoleksi dan dimasukkan ke dalam *microtube* dan dihancurkan menggunakan *micropestle*, kemudian ditambahkan 300 μL *DNA/RNA Protection Reagent* yang telah diencerkan. Selanjutnya, sampel ditambahkan 30 μL *Proteinase K Reaction Buffer* dan 15 μL *Proteinase K*, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 55°C.

Setelah inkubasi, sampel divortex hingga homogen dan disentrifus selama 2 menit pada kecepatan 13.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke *RNAse-free tube*, kemudian ditambahkan 15 μL *RNA Lysis Buffer* dan dihomogenkan kembali dengan vortex selama 10 detik. Sampel selanjutnya dipindahkan ke *gDNA Removal Column* yang dilengkapi dengan *collection tube* dan disentrifus selama 30 detik pada kecepatan 13.000 rpm. Kolom pemisah gDNA dilepaskan, sementara filtrat dalam *collection tube* digunakan untuk tahap berikutnya.

Ke dalam filtrat tersebut ditambahkan etanol 95%, kemudian dihomogenkan secara perlahan hingga tercampur merata. Campuran dipindahkan ke *RNA Purification Column* yang telah dilengkapi dengan *collection tube*, lalu disentrifus selama 40 detik pada kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C. Cairan pada *collection tube* dibuang, kemudian ke dalam kolom ditambahkan 5 μL *DNase I* yang dicampur dengan 75 μL *DNase Reaction Buffer*, dan larutan dipipetkan langsung ke permukaan matriks kolom. Kolom diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang untuk menghilangkan kontaminasi DNA genom.

Setelah inkubasi, kolom ditambahkan 500 μL *RNA Priming Buffer* dan disentrifus selama 30 detik pada kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C, kemudian filtrat dibuang. Proses pencucian dilanjutkan dengan penambahan 500 μL *RNA Wash Buffer*, disentrifus selama 30 detik, dan filtrat dibuang. Tahapan pencucian ini diulangi sebanyak dua kali. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi kering selama 1 menit pada kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C untuk menghilangkan sisa etanol.

Kolom kemudian dipindahkan ke *RNAse-free tube* yang baru, lalu RNA dielus dengan penambahan 40 μL *Nuclease-Free Water* (NFW) dan disentrifus selama 30 detik. Filtrat yang diperoleh merupakan RNA total dan disimpan pada suhu -80°C hingga digunakan untuk analisis selanjutnya.

2.2.8 Analisis ekspresi gen

Analisis ekspresi gen dilakukan menggunakan *Luna™ Universal One-Step RT-qPCR Kit* (New England Biolabs, USA) sesuai dengan petunjuk yang tercantum pada panduan produk. Metode ini digunakan untuk mengukur tingkat ekspresi gen target secara *real-time* dari RNA total yang telah diisolasi sebelumnya. Analisis dilakukan menggunakan satu set primer *sod1* dan satu set primer *sod2*. Reaksi RT-qPCR dijalankan menggunakan *Rotor-Gene Q Real-Time PCR System* (Qiagen, Jerman) dengan kondisi termal meliputi tahap *hold 1* pada 50°C selama 10 menit, *hold 2* pada 95°C selama 2 menit, dan 35 siklus PCR yang terdiri atas denaturasi pada 95°C selama 10 detik, *annealing* pada 60°C selama 30 detik, dan elongasi pada 72°C selama 30 detik, diakhiri dengan *melt curve analysis* pada suhu 60–95°C untuk memastikan spesifisitas produk

amplifikasi. Ekspresi gen ribosomal protein (*rp49*), yang berfungsi sebagai kontrol internal, dianalisis menggunakan primer *rp49* dengan protokol yang sama seperti gen target (Nainu et al., 2024).

Tabel 1. Sekuens primer gen (Hardiyanti et al., 2024)

Nama Gen	Sekuens Primer		Kondisi
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
<i>sod1</i>	5' -AGG TCA ACA TCA CCG ACT CC-3'	5' -GTT GAC TTG CTC AGC TCG TG-3'	1. Siklus PCR : 35 siklus 2. Hold1: 50°C, 10 menit 3. Hold2 : 95°C, 2 menit 4. Cycling : 95°C 10 detik, 60°C 30 detik, 72°C 30 detik 5. Melt: 60-95°C
<i>sod2</i>	5'-TGG CCA CAT CAA CCA CAC-3'	5'-TTC CAC TGC GAC TCG ATG -3'	
<i>rp49</i>	5' – GAC GCT TCA AGG GAC AGT ATC TG – 3'	5' – AAA CGC GGT TCT GCA TGA G – 3'	

2.2.9 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil RT-qPCR analisis ekspresi gen diolah dengan metode *one way* ANOVA yang diikuti dengan analisis *Dunnnett's*. Seluruh hasil analisis diolah dengan *software* GraphPad Prism®10. Data yang disajikan adalah sebagai rata-rata $\pm$ SD dan nilai $p < 0,05$ yang dianggap signifikan secara statistik.