

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obesitas adalah suatu kondisi di mana terjadi penumpukan lemak tubuh secara berlebihan sehingga berat badan seseorang jauh melebihi batas normal. Kondisi ini muncul akibat ketidakseimbangan antara asupan energi dari makanan yang masuk dengan energi yang digunakan oleh tubuh, menyebabkan akumulasi jaringan lemak adiposa. Obesitas menjadi masalah kesehatan global yang prevalensinya terus meningkat di negara maju maupun berkembang. Menurut *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2016, lebih dari 1,9 miliar orang dewasa mengalami kelebihan berat badan, dengan 650 juta di antaranya tergolong obesitas (WHO, 2021). Di Indonesia, prevalensi obesitas dewasa meningkat drastis dari 10,5% pada tahun 2007 menjadi 21,8% pada tahun 2018 berdasarkan Riskesdas Kemenkes RI (2018). Obesitas merupakan faktor pemicu sindrom metabolik yang secara signifikan meningkatkan risiko penyakit kardiovaskular dan diabetes tipe 2, serta dapat berujung pada kematian akibat komplikasi (Koliaki et al., 2019). Penggunaan obat sintetis sering menimbulkan berbagai efek samping, sehingga diperlukan alternatif pengobatan berbasis bahan alam yang lebih aman dan berpotensi efektif.

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) mengandung senyawa aktif utama yaitu andrographolide (2-4% berat kering) yang merupakan kandidat terapi berbahan alam yang potensial. Pada model hewan, andrographolide terbukti memiliki efek antiobesitas dengan menurunkan akumulasi lemak, memperbaiki profil lipid, dan meningkatkan sensitivitas insulin (Zhang et al., 2021; Dai et al., 2019). Namun, penelitian pada mamalia menghadapi kendala seperti biaya tinggi, waktu penelitian yang panjang, dan memerlukan kode etik. Selain itu, mekanisme molekuler terkait efek antiobesitas sambiloto, terutama pada tingkat ekspresi gen, masih belum sepenuhnya dipahami (Son & Kim, 2020).

Untuk mengatasi keterbatasan penelitian pada mamalia, *Drosophila melanogaster* menjadi model organisme yang efektif dan ekonomis. Sekitar 75% gen penyebab penyakit pada manusia memiliki homolog fungsional pada *D. melanogaster* (Ugur et al., 2016). Dengan siklus hidup yang pendek dan biaya pemeliharaan rendah sehingga *D. melanogaster* ideal untuk mempelajari penyakit metabolik, termasuk obesitas (Palu et al., 2019; Baenas & Wagner, 2022). *Obesity-like phenotype* pada *D. melanogaster* dapat diinduksi melalui diet tinggi sukrosa atau lemak, yang menyebabkan peningkatan trigliserida, intoleransi glukosa, dan resistensi insulin (Musselman et al., 2011). Sistem endokrin *D. melanogaster* memiliki kemiripan fungsional dengan mamalia, terutama melalui kemampuannya menghasilkan *Drosophila* Insulin-Like Peptides (*dilp*) yang merupakan homolog insulin pada manusia. Dari beberapa isoform *dilp* yang telah diidentifikasi, *dilp2* dipilih dalam penelitian ini karena perannya yang sentral dalam pengaturan homeostasis glukosa dan metabolisme lipid, serta sensitivitasnya terhadap kondisi Diet Tinggi Lemak (DTL). Pada model obesitas *D. melanogaster*, ekspresi *dilp2* dilaporkan mengalami penurunan yang signifikan, mencerminkan

terjadinya disregulasi sinyal insulin dan resistensi insulin yang merupakan karakteristik utama sindrom metabolik (Bai et al., 2012; Chatterjee & Perrimon, 2021).

Selain menyebabkan disregulasi insulin, obesitas juga berkaitan erat dengan peningkatan stres oksidatif. Akumulasi lemak berlebih dapat memicu produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebihan sehingga menyebabkan kerusakan seluler (Manna & Jain, 2015). Enzim katalase (*cat*) berperan penting dalam menetralkan hidrogen peroksida sebagai salah satu bentuk pertahanan antioksidan.

Namun, pada kondisi obesitas, kapasitas sistem antioksidan sering kali tidak mencukupi, yang pada akhirnya memperburuk kerusakan sel dan meningkatkan risiko komplikasi metabolik (Loh et al., 2023). Pada *D. melanogaster*, obesitas telah dilaporkan menurunkan ekspresi gen *cat* serta aktivitas katalase, mencerminkan melemahnya sistem pertahanan antioksidan akibat gangguan metabolik (Loh et al., 2023).

Berdasarkan kesenjangan pengetahuan dan potensi yang ada, penelitian ini diajukan. Jika ekstrak sambiloto terbukti mampu memodulasi ekspresi gen *dilp2* (sebagai penanda jalur insulin) dan gen *cat* (sebagai penanda respons stres oksidatif) pada *D. melanogaster* yang mengalami *obesity-like phenotype*, maka hal ini akan memberikan bukti mekanistik baru mengenai efek anti-obesitas sambiloto. Hal ini tidak hanya memperkuat landasan ilmiah pemanfaatan sambiloto sebagai agen terapi sindrom metabolik, tetapi juga menegaskan peran *D. melanogaster* sebagai platform screening *in-vivo* yang efektif dan efisien.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap ekspresi gen *Drosophila* Insulin-Like Peptide 2 (*dilp2*) dan gen *Catalase* (*cat*) pada *D. melanogaster* dengan *obesity-like phenotype*?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh pemberian ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap ekspresi gen *Drosophila* Insulin-Like Peptide 2 (*dilp2*) dan gen *Catalase* (*cat*) pada *D. melanogaster* dengan *obesity-like phenotype*.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas laboratorium, mikropipet (Dragonlab®), papan CO₂ (CO₂ stage), GraphPad Prism®, *Real-Time PCR machine* (Qiagen®), sentrifuge, tabung reaksi mikro (eppendorf®), vial dan *plugs Drosophila* (Biologix®), vortex mixer, dan *water bath zoom stereo microscope* (Motic®).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah agar, *aquadest*, asam propionat, *corn meal*, *D. melanogaster* (FB GAL4 UAS), daun sambiloto (*Andrographis paniculata*), etanol 70% dan 96% (onemed®), gula pasir (Gulaku®), kertas saring, kit isolasi RNA, kit PCR, metil paraben, minyak kelapa, ragi (*brewer's yeast*), serta primer.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Pembuatan Ekstrak Sambiloto dan Uji Kualitatif

Ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata*) dibuat menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 100 g serbuk simplisia sambiloto dimaserasi dalam 10 L etanol 96% selama 24 jam sambil diaduk secara periodik. Setelah itu, maserat disaring dan residu diekstraksi kembali dengan cara yang sama menggunakan 10 L pelarut baru. Proses ini diulangi sebanyak tiga kali (3 x 24 jam). Filtrat yang dihasilkan diuapkan menggunakan *water bath* pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental (Riyo et al., 2019). Identifikasi kualitatif senyawa andrographolide dalam ekstrak dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak n-heksan : etil asetat (2:8). Pemisahan diamati di bawah lampu UV 254 nm dan disemprot dengan H₂SO₄ 10% untuk visualisasi noda (Riyo et al., 2019).

2.2.2 Penyiapan Hewan Uji

Lalat buah (*D. melanogaster* FB GAL4 UAS) dipelihara dan dikembangbiakkan dalam media pakan standar pada suhu 25°C dengan kelembapan 60% dan siklus terang-gelap 12 jam (Baenas & Wagner, 2022). Untuk keperluan eksperimen, lalat dewasa dikawinkan dan telurnya dikumpulkan. Larva yang menetas akan digunakan sebagai hewan uji.

2.2.3 Pembuatan Pakan Standar dan Pakan Tinggi Lemak

Pakan standar dibuat dengan komposisi agar 1,8 g; gula pasir 9 g; ragi 5 g; tepung jagung (*corn meal*) 15 g; dan air yang dicukupkan hingga 200 mL. Campuran dipanaskan sambil diaduk hingga membentuk pasta kental. Setelah suhu turun, ditambahkan asam propionat 900 µL dan metil paraben 800 µL sebagai pengawet. Pakan kemudian dituang ke dalam vial lalat. Pakan tinggi lemak dibuat dengan penambahan minyak kelapa 10% (b/v). Untuk perlakuan, ekstrak sambiloto dicampurkan ke dalam pakan tinggi lemak pada variasi konsentrasi 0,04%; 0,08%; dan 0,16% (Liao et al., 2021).

2.2.4 Induksi *Obesity-Like Phenotype* dan Pakan Tinggi Lemak

Larva *D. melanogaster* instar II dipindahkan dari pakan standar dan dibagi secara acak ke dalam beberapa kelompok perlakuan. Kelompok tersebut meliputi Kontrol Tanpa Perlakuan (KTP), yaitu larva yang tetap diberi pakan standar; kontrol positif Diet Tinggi Lemak (DTL), yaitu larva diberi pakan tinggi lemak mengandung 2% minyak kelapa untuk menginduksi *obesity-like phenotype*, serta kelompok perlakuan (DTL + Ekstrak), yaitu larva dengan *obesity-like phenotype* yang diberi pakan tinggi lemak yang telah dikombinasikan dengan ekstrak sambiloto pada konsentrasi 0,04%; 0,08%; dan 0,16%.

Telur yang dihasilkan dari lalat induk diinkubasi, dan larva yang menetas dikumpulkan setelah lima hari. Selanjutnya, pupa dibiarkan berkembang hingga muncul lalat dewasa yang diperoleh pada hari ke-4 atau ke-5 pascamenetas dan digunakan untuk tahap eksperimen berikutnya. Pada tahap perlakuan larva, lalat induk dikawinkan secara terpisah pada pakan standar dan pakan tinggi lemak. Larva instar II yang dihasilkan dari induk dengan pakan tinggi lemak kemudian dipindahkan secara acak ke dalam kelompok perlakuan, yaitu pakan normal, pakan tinggi lemak, serta pakan tinggi lemak yang dikombinasikan dengan ekstrak sambiloto pada konsentrasi 0,04%; 0,08%; dan 0,16%.

Sementara itu, pada fase dewasa, lalat dikelompokkan ke dalam tiga kelompok utama, yaitu kelompok kontrol pakan normal, kelompok kontrol pakan tinggi lemak, serta kelompok perlakuan yang menerima kombinasi pakan tinggi lemak dengan ekstrak sambiloto pada konsentrasi yang sama, sebagaimana dimodifikasi dari metode yang dilaporkan oleh Nayak dan Mishra (2021).

2.2.4 Analisis Ekspresi Gen *dilp2* dan *cat* dengan Real-Time PCR (qPCR)

Tahap awal analisis diawali dengan isolasi RNA dari 10 larva *D. melanogaster* menggunakan *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen™). Pada tahap ini, jaringan dilisis dalam larutan lisis yang telah ditambahkan β -mercaptoethanol. RNA kemudian dimurnikan melalui serangkaian tahap pencucian dan dielusi menggunakan *RNAse free water*. Kualitas dan kuantitas RNA yang dihasilkan diperiksa secara spektrofotometri sebelum diproses lebih lanjut. Sebagai gen referensi, digunakan *rp49* yang telah divalidasi menunjukkan ekspresi stabil pada semua kelompok perlakuan dalam penelitian pendahuluan. RNA hasil isolasi tersebut berperan sebagai sumber RNA dalam analisis ekspresi gen *dilp2* dan *cat* yang dilakukan dengan metode *Real-Time* PCR (qPCR). Reaksi qPCR ini menggunakan kit *SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step RT-qPCR with ROX* (Invitrogen™). *Real-time* PCR dijalankan menggunakan satu set primer gen *dilp2* dan *cat* di dalam tube PCR dengan volume 10 μ L (Baenas dan Wagner, 2022).

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk qPCR

Nama Gen	Sekuens Primer	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>dilp2</i>	5'AAC GAC GTG CTG AGT ATG GT -3'	5'CGA ACT CCT GGA CAA ACT GC -3'
<i>cat</i>	5'- TTC CTG GAT GAC ATG TCG CAC T - 3'	5'- TTC TGG GTG TGA ATG AAG GTG G - 3'
<i>rp49</i>	5'- CGC TTC AAG GGA CAG TAT CTG - 3'	5' – AAA CGC GGT TCT GCA TGAG – 3'

2.2.5 Analisis Data

Data ekspresi gen yang diperoleh dari qPCR dianalisis secara statistik menggunakan uji *one-way* ANOVA dan perangkat lunak *GraphPad Prism®* 8. Hasil analisis selanjutnya dibahas dan disimpulkan sesuai dengan tujuan penelitian.