

SKRIPSI

**PENGARUH ETANOL TERHADAP EKSPRESI GEN
ANTIOKSIDAN *cat* DAN *dpt* PADA *Drosophila
melanogaster***

**EFFECT OF ETHANOL ON THE EXPRESSION OF
cat ANTIOXIDANT GENES AND *dpt* IN *Drosophila
melanogaster***

Disusun dan diajukan oleh

**NUR ISLAMIAH SYAHRIR
N011171012**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**PENGARUH ETANOL TERHADAP EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN
cat DAN *dpt* PADA *Drosophila melanogaster***

**EFFECT OF ETHANOL ON THE EXPRESSION OF *cat* ANTIOXIDANT
GENES AND *dpt* IN *Drosophila melanogaster***

SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

NUR ISLAMIAH SYAHRIR

N011 17 1012

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

PENGARUH ETANOL TERHADAP EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN *cat*
DAN *dpt* PADA *Drosophila melanogaster*

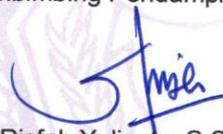
NUR ISLAMIAH SYAHRIR

N011 17 1012

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



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

Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19780716 200312 2 001

Pada tanggal, 20 Mei 2021

LEMBAR PENGESAHAN

PENGARUH ETANOL TERHADAP EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN
cat DAN dpt PADA Drosophila melanogaster

Disusun dan diajukan oleh :

NUR ISLAMIAH SYAHRIR
N011 17 1012

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin pada tanggal 20 05 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



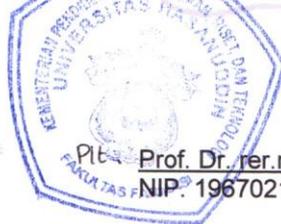
Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19820610 200801 1 012

Pembimbing Pendamping,



Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19780716 200312 2 001

PLT Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Pt. Prof. Dr. rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt.
NIP. 19670219 199203 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Nur Islamiah Syahrir
NIM : N011171012
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul "Pengaruh Etanol Terhadap Ekspresi Gen Antioksidan *cat* dan *dpt* pada *Drosophila melanogaster*" adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 20 05 2021

Yang Menyatakan



Nur Islamiah Syahrir

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah swt atas berkat, rahmat, dan petunjuk-Nya, maka skripsi ini dapat diselesaikan. Berkat bantuan dan dorongan dari berbagai pihak penulis dapat melewati berbagai macam hambatan untuk menyelesaikan skripsi ini. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan, arahan, dorongan, semangat, serta motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
2. Ibu Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan, arahan, dan pelajaran berharga yang telah diberikan kepada penulis dalam proses penyelesaian skripsi ini.
3. Ibu Yulia Yusrini Djibir, S.Si., MBM.Sc., M.Si., Ph.D., Apt. dan Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. selaku tim penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan banyak saran dan masukan yang membangun dalam penyelesaian skripsi ini.
4. Dekan dan para Wakil Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, serta seluruh staf dosen dan pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas ilmu, motivasi, bantuan, dan segala fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini.

5. Ibu Dra. Aisyah Fatmawaty, M.Si., Apt. dan Ibu Yuyu Mulsiani Evary, S.Si., M.Pharm.Sci., Apt. selaku penasehat akademik yang telah memberikan banyak nasehat dan arahan kepada penulis selama menempuh studi di Fakultas Farmasi.
6. Kedua orang tua tercinta, Ayahanda Syahrir dan Ibunda Asharia Gaffar yang selama ini telah memberikan perhatian, kasih sayang, semangat, motivasi, dukungan materi serta doa yang tiada henti-hentinya terpanjat demi kelancaran dan kesuksesan penulis dalam menyelesaikan studi di Fakultas Farmasi.
7. Teman-teman Banana Squad, Arini Putri Erdiana, Windy Winalda Oktaviani, Indhira Azhari Gazali, Khansa, Kadek Saka Dwipayanti, Rahmatillah Tamrin, Muh. Rezky Pratama, dan Hasriandi yang telah memberikan semangat, motivasi, serta dukungan moril kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
8. Teman-teman UFRG, terkhusus Khansa, LM. Alif Fauzan Tamar, Kak Reski Amalia Rosa, kak Nadila Pratiwi Latada, dan kak Sri Wahyuni M. yang senantiasa memberikan bantuan, semangat dan kebersamaan selama menjalankan penelitian dan dalam penyusunan skripsi ini.

9. Teman-teman angkatan 2017 (CLOSTRI17IUM), yang telah memberikan banyak dukungan, semangat, serta pengalaman berharga yang tidak terlupakan baik dalam menjalankan kepanitiaan dan kegiatan selama perkuliahan baik di dalam kelas maupun di laboratorium.
10. UKM Lege Artis FF-UH atas segala pelajaran dan pengalaman berorganisasi yang telah diberikan kepada penulis.
11. Teman-teman penulis, terkhusus kepada Haswinda, Sohra, Nur Amalia Ramadani, Nur Insani Asdar, dan Muh. Syahir Hariawan yang selalu memberikan semangat, motivasi, dan selalu menjadi pendengar yang baik tentang semuanya kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
12. Semua pihak yang telah membantu yang tidak sempat disebutkan namanya satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan tanggapan dan saran yang membangun dari berbagai pihak.

Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya ilmu farmasi. Aamiin.

Makassar, 20 05 2021


Nur Islamiah Syahrir

ABSTRAK

NUR ISLAMIAH SYAHRIR. Pengaruh Etanol Terhadap Ekspresi Gen Antioksidan *cat* dan *dpt* pada *Drosophila melanogaster* (dibimbing oleh Firzan Nainu dan Risfah Yulianty).

Etanol telah dilaporkan memicu apoptosis dan kematian organisme model *Drosophila melanogaster*, namun mekanismenya belum diketahui. Apoptosis dapat dipicu oleh penurunan kapasitas antioksidan endogen dan hiperaktivasi *antimicrobial peptides* (AMPs) yang berujung pada inflamasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek paparan etanol terhadap ekspresi gen antioksidan endogen *cat* dan gen terkait *antimicrobial peptides* (AMPs) *dpt* pada *Drosophila melanogaster*. Pada penelitian ini dilakukan pemberian paparan etanol selama enam menit secara inhalasi dengan konsentrasi 5, 25, 45, 65, dan 85% pada *Drosophila melanogaster* jantan genotipe *w¹¹¹⁸*. Kemudian, dilakukan isolasi RNA dan pengujian menggunakan RT-qPCR. Hasil penelitian molekuler diperoleh bahwa ekspresi gen *cat* menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi etanol yang dipaparkan. Namun, ekspresi gen *dpt* meningkat pada paparan etanol dengan konsentrasi tinggi. Sebagai kesimpulan, penelitian ini mengindikasikan bahwa etanol mempengaruhi level antioksidan endogen katalase dan *antimicrobial peptides* dipterisin, yang kemungkinan berhubungan dengan inisiasi apoptosis pasca paparan etanol pada *Drosophila melanogaster*.

Kata Kunci : Etanol, Apoptosis, *Drosophila melanogaster*, Lokomotor, *cat*, *dpt*.

ABSTRACT

NUR ISLAMIAH SYAHRIR. Effect Of Ethanol On The Expression Of *cat* Antioxidan Genes And *dpt* In *Drosophila melanogaster* (Supervised by Firzan Nainu and Risfah Yulianty).

Ethanol has been shown to induce apoptosis and death in the *Drosophila melanogaster* model organism, although the mechanism remains unknown. Apoptosis can be triggered by a decrease in the level of endogenous antioxidant and hyperactivation of *antimicrobial peptides* (AMPs) which leads to inflammation. The aim of this study was to investigate whether ethanol exposure could alter the expression of endogenous antioxidant genes *cat* and antimicrobial peptides (AMPs) genes *dpt* in *Drosophila melanogaster*. In this study, male *w¹¹¹⁸* *Drosophila melanogaster* were exposed to ethanol for six minutes by inhalation at concentrations of 5, 25, 45, 65, and 85%. The RNA was then isolated and analyzed using RT-qPCR. The results demonstrated that when the concentration of ethanol exposure increased, the expression of the *cat* gene decreased. In addition, when exposed to high concentrations of ethanol, the expression of the *dpt* gene increased. In conclusion, this research suggests that the ethanol could alter the level of endogenous antioxidant catalase and *antimicrobial peptides* dipteracin, which might be related to the apoptosis initiation in response to ethanol exposure in *Drosophila melanogaster*.

Keywords: Ethanol, Apoptosis, *Drosophila melanogaster*, Locomotor, *cat*, *dpt*.

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1. Latar Belakang	1
I.2. Rumusan Masalah	3
I.3. Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1. Etanol	4
II.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	6
II.3. Apoptosis	9
II.4. Stres Oksidatif	12
II.5. Antioksidan Endogen	13
II.6. <i>Antimicrobial Peptide (AMP)</i>	13
II.7. Ekstraksi Asam Nukleat	14
II.8. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	16

BAB III METODE PENELITIAN	19
III.1. Alat dan Bahan	19
III.2. Metode Kerja	19
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
IV.1. Pemeriksaan Level Ekspresi Gen Antioksidan	
<i>Catalase dan Diptericin Drosophila melanogaster</i>	25
IV.2. Pengamatan Uji Lokomotor <i>Drosophila melanogaster</i>	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	32
V.1. Kesimpulan	32
V.2. Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	37

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Sekuens primer masing-masing gen	23
2. Hasil analisis <i>one-way ANOVA</i> ekspresi gen <i>cat</i> <i>Drosophila melanogaster</i> jantan	40
3. Hasil analisis lanjutan <i>Tukey test</i> ekspresi gen <i>cat</i> <i>Drosophila melanogaster</i> jantan	40
4. Hasil analisis <i>one-way ANOVA</i> ekspresi gen <i>dpt</i> <i>Drosophila melanogaster</i> jantan	41
5. Hasil analisis lanjutan <i>Tukey's test</i> ekspresi gen <i>dpt</i> <i>Drosophila melanogaster</i> jantan	41
6. Hasil analisis <i>one-way ANOVA</i> uji lokomotor <i>Drosophila melanogaster</i> jantan	42
7. Hasil analisis lanjutan <i>Tukey test</i> uji lokomotor <i>Drosophila melanogaster</i> jantan	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Morfologi <i>Drosophila melanogaster</i>	7
2. Siklus hidup <i>Drosophila melanogaster</i>	8
3. Proses apoptosis	10
4. Jalur apoptosis	11
5. Prinsip PCR	18
6. Profil ekspresi gen <i>cat</i>	26
7. Perbandingan level ekspresi gen <i>cat</i> antara kontrol sehat dengan yang dipaparkan etanol konsentrasi 5, 25, 45, 65, dan 85%	26
8. Profil ekspresi gen <i>dpt</i>	28
9. Perbandingan level ekspresi gen <i>dpt</i> antara kontrol sehat dengan yang dipaparkan etanol konsentrasi 5, 25, 45, 65, dan 85%	28
10. Data lokomotor <i>w¹¹¹⁸</i> jantan setelah paparan etanol	30
11. BSC II	43
12. <i>Microscope zoom stereo</i>	43
13. <i>Sentrifuge</i>	43
14. Pembuatan pakan	43
15. Satu set alat PCR (<i>Thermal cycler</i>)	43
16. <i>Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸</i>	44

17. <i>Termomixer</i>	44
18. Pengamatan uji lokomotor	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja	37
2. Komposisi Pakan (<i>Fly Food</i>)	39
3. Hasil analisis uji molekuler dan fenotip	40
4. Gambar Penelitian	44

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) adalah senyawa kimia yang molekulnya mengandung gugus hidroksil (-OH) dan terikat pada atom karbon. Etanol merupakan bahan yang sering dikonsumsi dan ditemukan pada bir, anggur, serta minuman beralkohol lainnya yang dapat menyebabkan rasa mabuk. Etanol dibuat dengan fermentasi bahan biologis yang berbeda, misalnya *wine* yang dibuat dari gula dalam anggur (Gunasekara, 2012) (Onyekwelu, 2016). Saat ini, prevalensi perilaku mengonsumsi alkohol menurut WHO pada penduduk Indonesia sekitar 7,1%. Dalam beberapa dekade terakhir, prevalensi pengonsumsi alkohol jauh lebih tinggi pada pria dewasa dibandingkan pada wanita (Kristina *et al.*, 2018). Konsumsi alkohol berat dikaitkan dengan peningkatan risiko penyakit kanker, sedangkan konsumsi alkohol ringan hingga sedang dikaitkan dengan peningkatan risiko penyakit kardiovaskular (Cao and Giovannucci, 2016).

Metabolisme etanol secara langsung menghasilkan produk sampingan berupa spesies oksigen reaktif (ROS) dan spesies nitrogen reaktif (RNS), yang mendukung timbulnya stres oksidatif (Das and Vasudevan, 2007). Keberadaan ROS ini, terutama radikal $\bullet\text{OH}$, dapat menyebabkan stres oksidatif yang berujung pada induksi apoptosis pada sel hati bahkan berujung pada kerusakan organ hati (Wu *et al.*, 2006).

Untuk mencegah adanya peningkatan ROS yang berujung pada apoptosis sel, tubuh memerlukan senyawa dikenal sebagai antioksidan.

Sel tubuh memiliki beberapa senyawa antioksidan yang disebut antioksidan endogen, salah satunya adalah Katalase (Wu and Cederbaum, 2003). Dalam keadaan sel mengalami stres oksidatif yang disebabkan oleh ROS, terdapat AMP (*Antimicrobial Peptides*) yang merupakan sistem imun yang terdapat pada *Drosophila melanogaster*. Ekspresi gen berlebih dari Salah satu AMP pada *Drosophila melanogaster* adalah *Diptericin (dpt)* dapat menghambat terjadinya stres oksidatif dengan cara meningkatkan aktivitas enzim antioksidan salah satunya adalah katalase. Sehingga, hal ini dapat mencegah terjadinya peningkatan kadar ROS (Zhao *et al.*, 2011).

Apoptosis secara umum adalah proses normal tubuh dalam mempertahankan homeostasisnya. Namun, apoptosis juga dapat terjadi karena adanya stimulus tertentu salah satunya etanol. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa paparan etanol dapat menginduksi terjadinya apoptosis. Berdasarkan Zhou *et al.* (2001) diketahui bahwa induksi etanol secara *in vivo* pada tikus dapat menyebabkan terjadinya apoptosis pada hati tikus. Selain itu, berdasarkan Neuman *et al.* (1999) menyatakan bahwa induksi etanol secara *in vitro* menggunakan sel hepatosit primer manusia dapat menyebabkan terjadinya apoptosis. Penelitian yang dilakukan oleh Edwin (2018) melaporkan bahwa paparan

etanol secara inhalasi dapat menyebabkan apoptosis yang berujung pada kematian lalat buah *Drosophila melanogaster*.

Dalam studi genetika penelitian modern saat ini, *Drosophila melanogaster* telah banyak digunakan dalam riset karena menawarkan beberapa keuntungan, diantaranya lebih dari 65% gen manusia homolog dengan genom *Drosophila*. Selain itu, lalat buah mudah dipelihara, memiliki siklus hidup yang cepat, dan tidak membutuhkan kode etik dalam penggunaannya (Nainu, 2018).

Berdasarkan uraian diatas, oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui mekanisme molekuler etanol dalam menyebabkan apoptosis yang berujung pada kematian, ditinjau dari ekspresi gen antioksidan endogen katalase (*cat*) dan dipterisin (*dpt*) menggunakan organisme model lalat buah (*Drosophila melanogaster*).

I.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek paparan etanol terhadap ekspresi gen antioksidan endogen *cat* dan gen terkait *Antimicrobial Peptides* (AMPs) *dpt* pada *Drosophila melanogaster*?

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui efek paparan etanol terhadap ekspresi gen antioksidan endogen *cat* dan gen terkait *Antimicrobial Peptides* (AMPs) *dpt* pada *Drosophila melanogaster*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Etanol

Alkohol merupakan senyawa organik yang terkandung pada minuman keras (seperti wine, beer, dan wisky), dimana jenis alkohol yang biasanya terkandung adalah etil alkohol (etanol) (Roche *et al.*, 2004). Alkohol digolongkan dalam obat penenang hipnotis yang bekerja dengan menekan sistem saraf pusat pada dosis tinggi. Akan tetapi, pada dosis lebih rendah, alkohol dapat bertindak sebagai stimulan serta memicu perasaan euforia. Selain efek obat penenang akut dan berpotensi mematikan pada dosis tinggi, alkohol memiliki efek pada setiap organ dalam tubuh, dan efek ini bergantung pada konsentrasi alkohol dalam darah (BAC) dari waktu ke waktu (Gunasekara, 2012).

Sekitar 2,3 miliar orang yang mengonsumsi minuman beralkohol di seluruh dunia, terdapat sekitar 76,3 juta atau 3,9% memiliki masalah terkait alkohol akibat penyalahgunaannya, naik dari angka 3,0% pada tahun 1990. Selain itu, sekitar 3 juta orang akan meninggal karena bahaya terkait alkohol, sehingga konsumsi minuman beralkohol yang berbahaya menyumbang 5,3% dari semua kematian di seluruh dunia. Alkohol termasuk penyebab kelima tertinggi dari beban penyakit global setelah masa kanak-kanak dan ibu dengan berat badan kurang, seks yang tidak aman, hipertensi dan tembakau. Oleh karena itu, alkohol diperkirakan

menyebabkan 20 sampai 30% kanker esofagus dan hati, sirosis hati dan serangan epilepsi di seluruh dunia (Stockley *et al.*, 2019).

Etanol praktis tidak larut dalam lemak dan minyak, meskipun seperti air, etanol dapat melewati membran biologis. Etanol didistribusikan dari darah ke semua jaringan dan cairan sesuai dengan kandungan relatif airnya. Konsentrasi etanol dalam jaringan bergantung pada kandungan air relatif jaringan, dan mencapai kesetimbangan dengan cepat dengan konsentrasi etanol dalam plasma. Tidak ada protein plasma yang mengikat alkohol. Dosis alkohol yang sama per unit berat badan dapat menghasilkan konsentrasi alkohol dalam darah yang sangat berbeda pada setiap individu yang berbeda karena variasi jumlah dalam proporsi lemak dan air dalam tubuh dan rendahnya kadar lipid. Wanita umumnya memiliki volume distribusi alkohol yang lebih kecil daripada pria karena persentase lemak tubuh mereka yang lebih tinggi. Wanita akan memiliki kadar alkohol dalam darah puncak yang lebih tinggi daripada pria jika diberikan dosis alkohol yang sama dengan gram per kg berat badan, tetapi tidak ada perbedaan yang terjadi saat diberi dosis yang sama per liter air tubuh (Cederbaum, 2012).

Setelah alkohol dikonsumsi dan masuk ke dalam tubuh, alkohol akan segera terabsorpsi. Akan tetapi, sejumlah kecil alkohol akan mengalami metabolisme lintas pertama (*first pass metabolism*). Metabolisme alkohol, sebagian besar melalui jalur oksidatif yang melibatkan dua enzim yaitu alkohol dehidrogenase dan aldehid dehidrogenase. Selain itu, sejumlah

kecil juga mengalami oksidasi oleh enzim CYP450 di hati. Terdapat pula enzim lain seperti katalase yang juga mampu memetabolisme alkohol dalam jumlah kecil (Dasgupta, 2015).

II.2 *Drosophila melanogaster*

Lalat buah termasuk dalam genus *Drosophila* yang terdiri dari sejumlah spesies yang banyak digunakan sebagai model organisme dalam berbagai bidang biologi. Sebagian besar spesies *Drosophila* memiliki genetika, tahap perkembangan, dan ekologi yang jelas. Selain variasi antar spesies yang berbeda, siklus hidup yang singkat menjadikan *Drosophila* sebagai model organisme yang ideal untuk digunakan dalam penelitian. Dari beberapa spesies *Drosophila*, *Drosophila melanogaster* merupakan model yang paling banyak digunakan (Dasgupta, 2015).

Drosophila melanogaster biasa juga disebut *vinegar fly* atau lalat cuka. Dimana *Drosophila melanogaster* hingga kini telah digunakan secara luas sebagai organisme model untuk menjelaskan berbagai fenomena biologi seperti fagositosis dalam perkembangan, imunitas, peranan apoptosis, makna cacat genetik terhadap gangguan fenotip pada suatu organisme, serta pengaruh nutrisi dalam pengaturan fungsi biologis dan usia individu yang terdapat pula pada manusia (Nainu, 2018).

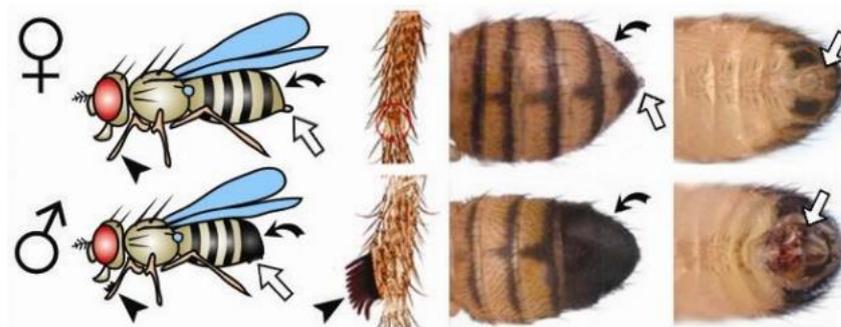
II.2.1 Klasifikasi *Drosophila melanogaster*

Berikut merupakan klasifikasi ilmiah dari *Drosophila melanogaster* :

(Perveen, 2018)

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Divisi	: <i>Eumetazoa</i>
Filum	: <i>Arthropoda</i>
Kelas	: <i>Insecta</i>
Ordo	: <i>Diptera</i>
Famili	: <i>Drosophilidae</i>
Genus	: <i>Drosophila</i>
Spesies	: <i>Drosophila melanogaster</i>

II.2.2 Morfologi *Drosophila melanogaster*

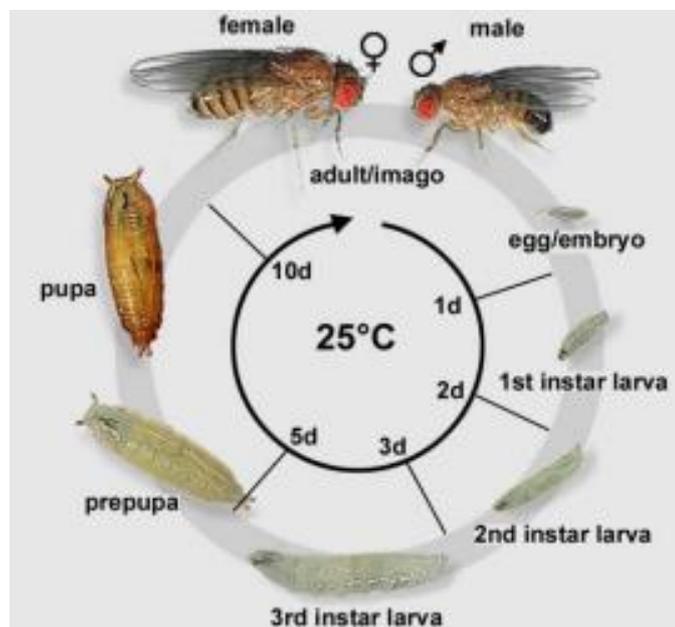


Gambar 1. Morfologi *Drosophila melanogaster* : Lalat betina (atas) dan jantan (bawah) ; tampilan seluruh tubuh lateral (kolom 1), tampilan kaki depan yang diperbesar (kolom ke-2), tampilan punggung (kolom ke-3) dan tampilan ventral (kolom ke-4) dari abdomen (Prokop, 2015)

Pada *Drosophila melanogaster*, hanya lalat jantan yang memperlihatkan sisir kelamin pada sepasang kaki pertama (kepala panah hitam). Pada lalat betina sedikit lebih besar dan menampilkan garis-garis gelap terpisah di ujung posterior perut, sedangkan pada lalat jantan

terdapat warna hitam yang menyatu pada perutnya (panah melengkung). Pelat anal (panah putih) lebih gelap dan lebih kompleks pada lalat jantan sedangkan pada lalat betina menampilkan ekstensi seperti pin. Abdomen dan anal terlihat pucat pada lalat jantan. Selama periode yang sangat singkat setelah eklosi, lalat menunjukkan bintik kehijauan gelap yang terlihat pada abdomen yang dapat digunakan sebagai indikator untuk memastikan keperawanan lalat betina walaupun terdapat lalat jantan yang subur dalam satu tempat (Prokop, 2015).

II.2.3 Siklus hidup *Drosophila melanogaster*



Gambar 2. Siklus hidup *Drosophila melanogaster* (Prokop, 2015)

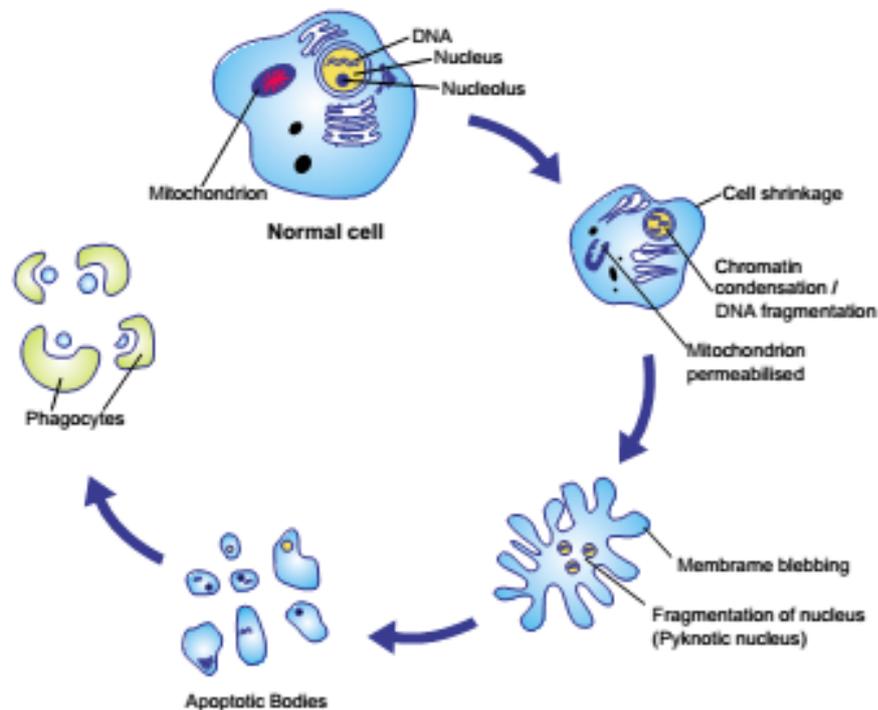
Siklus hidup atau perkembangbiakan dari *Drosophila melanogaster* dimulai dari lalat buah dewasa betina yang dibuahi oleh lalat buah dewasa jantan yang menyimpan sperma dalam *seminis receptaculum* mereka untuk membuahi ratusan telur untuk disimpan selama beberapa hari.

Pada suhu 25°C perkembangan embrio berlangsung kurang lebih selama 21 jam. Setelah itu, larva yang menetas (instar pertama) membutuhkan waktu selama 2 hari untuk meranggas menjadi larva instar kedua kemudian menjadi larva instar ketiga. Kemudian larva instar ketiga melanjutkan makan selama satu hari lagi (tahap mencari makan) sebelum meninggalkan sumber makanannya dan bermigrasi (tahap pengembaraan) dan akhirnya menjadi kepompong (prapupa lalu pupa). Selama dalam tahap kepompong, semua organ merosot (histolisis) dan merestrukturisasi menjadi bentuk dewasa (metamorfosis). 10 hari setelah bertelur, lalat dewasa muncul dari kantong kepompong. Setelah menetas, lalat jantan membutuhkan waktu hingga 8 jam untuk matang secara seksual, yang dapat digunakan untuk koleksi lalat betina yang belum dibuahi atau biasa disebut dengan *virgin female* (Prokop, 2015).

II.3 Apoptosis

Apoptosis merupakan mekanisme alami untuk kematian sel secara terprogram. Ini Apoptosis memainkan peran penting dalam perkembangan serta homeostasis. Hal ini berfungsi untuk menghilangkan sel yang tidak perlu atau tidak diinginkan dan merupakan proses yang telah diatur. Begitu apoptosis memberikan sinyal, perubahan mulai terjadi di dalam sel. Perubahan ini termasuk aktivasi caspases yang membelah komponen seluler yang diperlukan untuk fungsi seluler normal seperti protein sitoskeletal dan nukleus. Akibat aktivitas caspase, sel apoptosis mulai

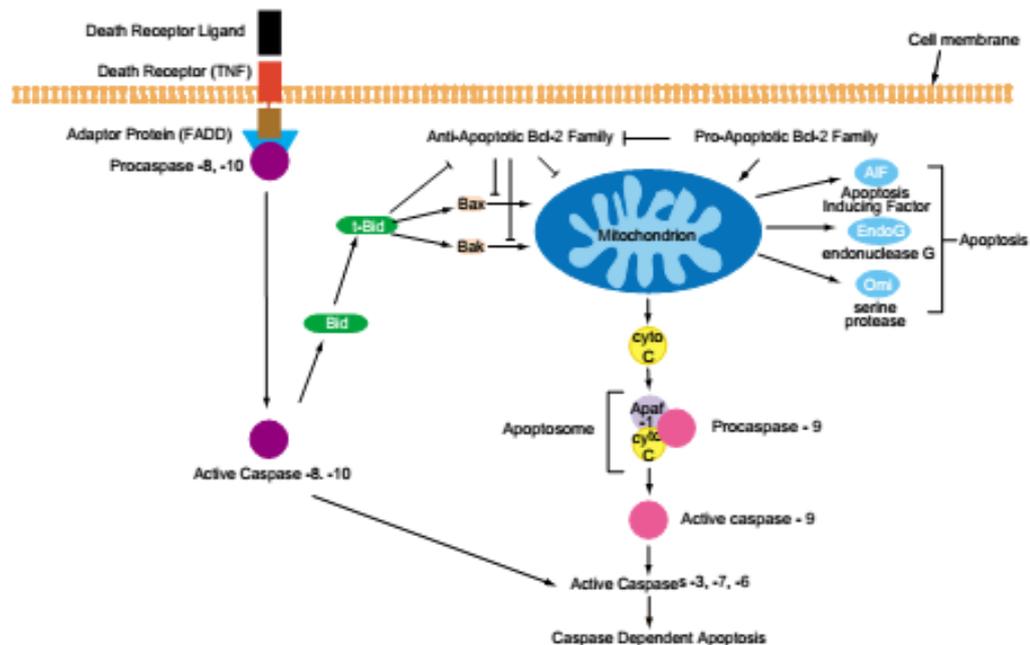
menyusut dan mengalami perubahan membran plasma yang menandakan respon dari makrofag (Pfeffer and Singh, 2018).



Gambar 3. Proses apoptosis (Guerin *et al.*, 2006)

Apoptosis ditandai dengan karakteristik biokimia dan morfologi yang khas. Ini termasuk kondensasi kromatin, penyusutan sel, *blebbing* membran plasma, DNA dan fragmentasi inti dan fragmentasi sel menjadi vesikel terikat membran yang disebut "badan apoptosis", yang kemudian difagositosis oleh makrofag atau sel tetangga (Guerin *et al.*, 2006).

Apoptosis terjadi akibat aktivasi oleh *caspase* (*protease cysteine aspartyl-specific*) yang merupakan kelas protein sistein yang dapat membelah protein target. Aktivitas *caspase protease* penting untuk keberhasilan apoptosis karena mereka membelah hingga ratusan dari berbagai protein (Guerin *et al.*, 2006).



Gambar 4. Jalur apoptosis (Guerin *et al.*, 2006)

Terdapat dua jalur apoptosis utama di dalam sel. Jalur ekstrinsik (kiri) melibatkan pengikatan ligan ekstraseluler ke reseptor pemicu kematian, menghasilkan pembentukan *death inducing complex* (DISC). DISC, melalui adaptor protein *Fas-associated death domain* (FADD), kemudian berikatan dengan *procaspase-8*, yang mengaktifkan *caspase-8*. Jalur intrinsik (tengah) diatur oleh serangkaian molekul pemicu kematian spesifik yang dilepaskan dari mitokondria. Famili BCL-2 pro dan anti-apoptotik bersaing di permukaan mitokondria untuk mengontrol pelepasan sitokrom-c. Setelah dilepaskan, sitokrom-c bergabung dengan Apaf-1 dan *procaspase-9*, dengan cara berikatan dengan dATP untuk membentuk apoptosom, yang kemudian mengaktifkan *caspase-9*. Jalur ekstrinsik dan intrinsik berbagi titik akhir yang sama pada tingkat aktivasi *caspase-3*. Interaksi antara jalur ini disediakan oleh pembelahan *caspase-8* yang

dipicu oleh *Bid*. Interaksi *Bid* dengan *Bax* atau *Bak* di membran luar mitokondria menghasilkan pelepasan sitokrom-c. Famili anti-apoptosis BCL-2 dapat mencegah pelepasan tersebut melalui interaksi langsung dengan *Bax* dan / atau *Bak*. Jalur kaspase-independen lebih lanjut (kanan) dapat terjadi melalui pelepasan molekul apoptogenik seperti (AIF), *Endonuclease G* (EndoG) dan *Omi / HtrA2* (Guerin *et al.*, 2006).

II.4 Stres Oksidatif

Stres oksidatif merupakan suatu kondisi ketidakseimbangan antara radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS) dengan enzim antioksidan sebagai agen penstabil dalam tubuh. Radikal bebas dalam konsentrasi rendah berperan penting dalam regulasi fisiologis serta proses pensinyalan selular, akan tetapi pada konsentrasi yang tinggi radikal bebas dapat mengakibatkan terjadinya perubahan fisiologis yang dapat merusak sel (Manisha *et al.*, 2017).

Kadar ROS harus dikontrol dengan beberapa mekanisme pertahanan yang melibatkan sejumlah reaksi enzim antioksidan dan detoksifikasi. Dimana antioksidan merupakan suatu molekul yang memiliki kemampuan untuk mencegah atau memperlambat proses oksidasi dalam bentuk makromolekul. Peran antioksidan adalah untuk menurunkan atau menghentikan reaksi berantai dengan menghilangkan radikal bebas atau menghambat reaksi oksidasi lainnya dengan cara mengoksidasi dirinya sendiri (A Adwas *et al.*, 2019).

Antioksidan merupakan agen pereduksi seperti polifenol atau tiol. Meskipun reaksi oksidasi sangat penting bagi sel, mereka memiliki efek merusak; karenanya, tumbuhan dan hewan mengandung berbagai antioksidan, seperti vitamin C dan E dan glutathione, serta berbagai sistem enzimatik yang mengkatalisasi reaksi antioksidan sebagai katalase, superoksida dismutase (SOD) dan peroksidase (A Adwas *et al.*, 2019).

II.5 Antioksidan Endogen

Katalase adalah enzim yang mengandung besi yang ditemukan terutama dalam komponen sel tertutup membran kecil yang disebut peroksisom yang berfungsi untuk mendetoksifikasi hidrogen peroksida dan berbagai molekul lainnya. Salah satu cara katalase menghilangkan hidrogen peroksida adalah dengan mengkatalisis reaksi antara dua molekul hidrogen peroksida, menghasilkan pembentukan air dan O₂. Selain itu, katalase dapat mendorong interaksi hidrogen peroksida dengan senyawa yang dapat berfungsi sebagai donor hidrogen sehingga hidrogen peroksida dapat diubah menjadi satu molekul air, dan donor tereduksi menjadi teroksidasi (suatu proses yang kadang-kadang disebut aktivitas peroksidatik katalase) (Wu and Cederbaum, 2003).

II.6 *Antimicrobial peptide* (AMP)

Antimicrobial peptide (AMP) merupakan peptida pertahanan inang yang efektif pada bakteri (gram positif, gram negatif), jamur (ragi dan berserabut) dan parasit, dan dalam beberapa kasus pada virus yang

terbungkus. *Antimicrobial peptide* (AMP) adalah komponen yang sangat diperlukan dari sistem kekebalan bawaan di berbagai spesies termasuk manusia, hewan dan tumbuhan dan menjadi pertahanan lini pertama melawan serangan asing (Imler and Bulet, 2005). *Drosophila melanogaster* memiliki jalur respons O_2 yang serupa dengan mamalia, dimana pada masa lalu melalui rancangan seleksi eksperimental telah berhasil ditemukan bahwa *Drosophila melanogaster* dapat mentolerir stres oksidatif akibat O_2 yang sangat tinggi. Berdasarkan analisis *microarray*, telah ditemukan bahwa ekspresi berlebih bahkan dari satu gen AMP pada satu waktu seperti *Diptericin* (*dpt*) memungkinkan lalat tipe liar untuk bertahan hidup jauh lebih baik pada keadaan tingginya kadar O_2 (Zhao *et al.*, 2011).

II.7 Ekstraksi asam nukleat

Dalam pengujian yang berbasis DNA atau RNA, terdapat berbagai metode dalam mengekstraksi asam nukleat untuk dianalisis. Pemilihan teknik harus mempertimbangkan sumber sampel dan sifat pengujian akhirnya. Baik DNA dan RNA dapat memberikan informasi klinis yang berharga (Bogner and Killeen, 2012). Ekstraksi asam nukleat merupakan proses pemisahan asam nukleat dari selnya dengan menggunakan berbagai metode yang terdiri atas penghancuran sel tanpa menyebabkan kerusakan pada DNA. Pada umumnya, penghancuran sel dilakukan menggunakan buffer ekstraksi yang dapat menghambat kerja dari enzim RNase dan DNase (Corkill and Rapley, 2008).

II.7.1 DNA (*Deoxyribosa Nucleic Acid*)

DNA tersusun atas dua rantai polinukleotida yang saling berpilin dalam bentuk heliks ganda. Nukleotida merupakan bahan penyusun dasar DNA. Nukleotida terdiri dari fosfat yang bergabung dengan gula, yang dikenal sebagai 2-deoksiribosa, yang ditempelkan dengan basa nitrogen. Gula disebut 2-deoksiribosa karena tidak ada hidroksil pada posisi 2 (hanya dua hidrogen). Basa dalam DNA terbagi menjadi dua kelas, purin dan pirimidin. Purin adalah adenin dan guanin, dan pirimidin adalah sitosin dan timin. Purin diturunkan dari struktur cincin ganda. Adenin dan guanin berbagi struktur esensial ini tetapi dengan kelompok yang berbeda. Demikian juga, sitosin dan timin adalah variasi pada struktur cincin tunggal (Van Holde, 1989).

II.7.2 RNA (*Ribosa Nucleic Acid*)

RNA mengandung ribosa. RNA mengandung urasil sebagai pengganti timin. Urasil memiliki struktur cincin tunggal yang sama dengan timin, kecuali urasil tidak memiliki 5 gugus metil. RNA biasanya ditemukan sebagai rantai polinukleotida tunggal. Kecuali untuk kasus virus tertentu, RNA bukanlah materi genetik dan tidak perlu berfungsi sebagai template untuk replikasinya sendiri. Sebaliknya, RNA berfungsi sebagai perantara, mRNA, antara gen dan mesin penyintesis protein. Fungsi lain dari RNA adalah sebagai adaptor, tRNA, antara kodon dalam mRNA dan asam amino. RNA juga dapat memainkan peran struktural seperti dalam kasus komponen RNA ribosom. Namun peran lain untuk RNA adalah sebagai molekul pengatur, yang melalui sekuens saling mengikat, dan

mengganggu terjemahan, mRNA tertentu. Akhirnya, beberapa RNA (termasuk salah satu RNA struktural ribosom) adalah enzim yang mengkatalisasi reaksi esensial dalam sel. Dalam semua kasus ini, RNA disalin sebagai untai tunggal dari hanya satu dari dua untai cetakan DNA, dan untai pelengkap tidak ada. RNA mampu membentuk heliks ganda yang panjang, tetapi sifatnya tidak biasa (Van Holde, 1989)

II.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) adalah teknik yang banyak digunakan untuk menganalisis gen. DNA genom yang ada dalam sel mengandung ribuan gen. Hal ini membuat sulit untuk mengisolasi dan menganalisis gen individu mana pun. PCR memungkinkan sekuens DNA tertentu, biasanya sesuai dengan gen atau bagian gen, untuk disalin dari DNA genom dalam reaksi enzim sederhana. Satu-satunya persyaratan adalah bahwa beberapa urutan DNA di kedua ujung wilayah yang akan disalin diketahui. DNA yang sesuai dengan urutan yang diinginkan disalin atau diperkuat oleh PCR lebih dari satu juta kali lipat dan menjadi molekul DNA yang dominan dalam reaksi. DNA yang cukup diperoleh untuk analisis rinci atau manipulasi gen yang diperkuat (Ehtisham *et al.*, 2016).

II.8.1 Teknik *Polymerase chain reaction* (PCR)

Teknik PCR adalah metode amplifikasi DNA secara in-vitro dengan cara enzimatik pada tingkat eksponensial yang melibatkan proses siklus berulang yang terdiri dari tahapan yang ditentukan berikut: (Giasuddin, 1995)

II.8.1.1 Denaturation

Tahap pertama adalah denaturasi DNA untai ganda (*ds*-DNA) yang diekstraksi dari bahan yang diteliti (DNA target). Proses ini melibatkan peningkatan suhu hingga 95-98°C selama 60 detik dan menghasilkan dua untai tunggal DNA (*ss*-DNA). *Ss*-DNA ini berfungsi sebagai pola atau *template* untuk pelekatan primer sintetik (Giasuddin, 1995).

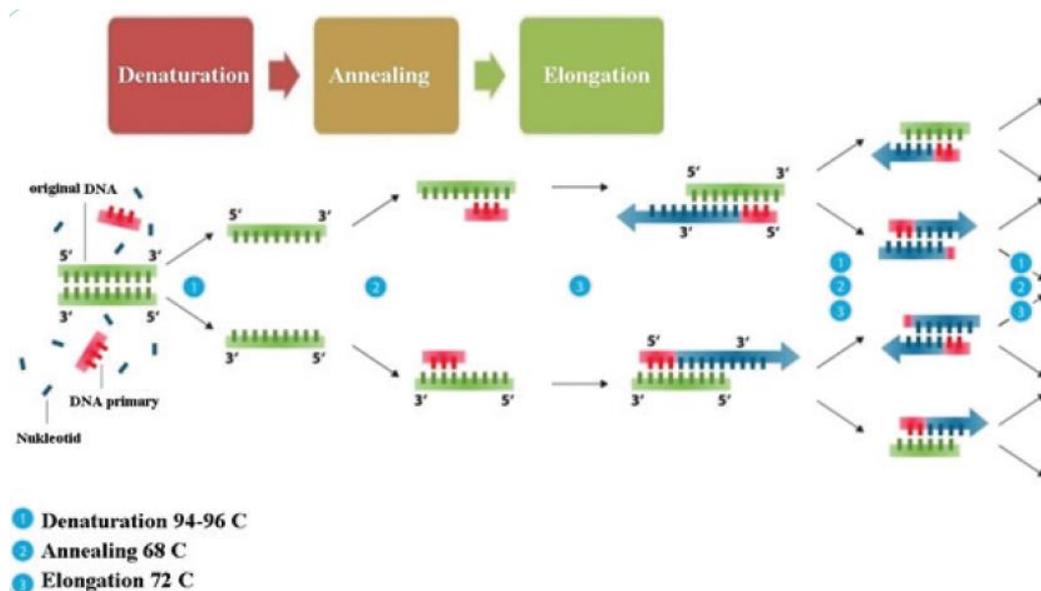
II.8.1.2 Annealing

Tahap kedua adalah tahap annealing, di mana suhu dikurangi menjadi sekitar 37-50°C selama 60-120 detik dan primer ditambahkan ke campuran reaksi secara berlebihan (primer adalah oligonukleotida sintesis, potongan pendek untai tunggal DNA, terdiri dari pasangan basa nukleotida yang panjang). Penurunan suhu memungkinkan primer untuk mengikat sekuens *ss*-DNA komplementernya (*template*), satu untuk masing-masing dari dua untai tunggal *template* yang dihasilkan pada langkah sebelumnya (Giasuddin, 1995).

II.8.1.3 Extension

Tahap ketiga dan terakhir adalah reaksi ekstensi yang dilakukan oleh DNA-polimerase termostabil tambahan, dimana enzim mampu mensintesis salinan pelengkap dari untai tunggal awal dengan perpanjangan ujung 3' (tetapi tidak 5') dari primer *annealing*. Langkah terakhir ini, biasanya dilakukan pada suhu 72°C selama 60-120 detik, merupakan akhir dari siklus pertama dari prosedur dimana dua untai ganda DNA telah terbentuk, yaitu penggandaan molekul DNA target awal

telah tercapai. Siklus kedua dari prosedur ini kemudian dimulai dengan menaikkan suhu untuk memisahkan untai DNA, kali ini menghasilkan empat ss-DNA, dan siklus berulang melalui tiga langkah pemanasan secara eksponensial meningkatkan jumlah produk DNA panjang yang ditentukan yang dihasilkan (DNA target) (Giasuddin, 1995).



Gambar 5. Prinsip PCR (Oksuz *et al.*, 2019)