

SKRIPSI

**PENGARUH PEMAPARAN ETANOL
TERHADAP EKSPRESI GEN *atg5* DAN *atg8a*
TERKAIT AUTOFAGI PADA *Drosophila
melanogaster***

**EFFECT OF ETHANOL EXPOSURE ON THE
EXPRESSION OF AUTOPHAGY-RELATED GENES
atg5 AND *atg8a* IN *Drosophila melanogaster***

Disusun dan diajukan oleh

LM. ALIF FAUZAN TAMAR

N011 17 1311



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

**PENGARUH PEMAPARAN ETANOL TERHADAP EKSPRESI GEN *atg5*
DAN *atg8a* TERKAIT AUTOFAGI PADA *Drosophila melanogaster***

**EFFECT OF ETHANOL EXPOSURE ON THE EXPRESSION OF
AUTOPHAGY-RELATED GENES *atg5* AND *atg8a* IN *Drosophila
melanogaster***

SKRIPSI

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

**LM. ALIF FAUZAN TAMAR
N011 17 1311**

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

**PENGARUH PEMAPARAN ETANOL TERHADAP EKSPRESI GEN *atg5*
DAN *atg8a* TERKAIT AUTOFAGI PADA *Drosophila melanogaster***

LM. ALIF FAUZAN TAMAR

N011 17 1311

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 10-5-2021

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini ;

Nama : LM. Alif Fauzan Tamar
NIM : N011171311
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul "Pengaruh Pemaparan Etanol Terhadap Ekspresi Gen *atg5* dan *atg8a* Terkait Autofagi 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

LM. Alif Fauzan Tamar

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas berkat, rahmat, karunia, dan petunjuk-Nya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan. Dalam penyusunan skripsi ini, penulis mendapatkan banyak bantuan dari berbagai pihak berupa bimbingan, saran, hingga ucapan semangat sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan, khususnya dukungan dari orang tua yang penulis sayangi. Oleh sebab itu penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Bapak Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama penulis dalam penyusunan skripsi ini, dimana beliau telah memberikan bimbingan dengan baik dan banyak masukan dari awal penelitian hingga tahap akhir pembuatan skripsi ini.
2. Ibu Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping penulis yang juga telah memberikan banyak sekali masukan dan saran terkait penelitian dan skripsi ini.
3. Seluruh pihak terkait Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, meliputi bapak dekan, wakil dekan, dosen-dosen, hingga staf-staf terkait yang bertugas, baik secara langsung maupun tidak langsung turut membantu penulis selama perkuliahan beberapa tahun ini.
4. Teman-teman baik sekampung penulis, yakni Ilmi Kalam, Kosim Alkadri, Radinal Barkah, Sabry Abdullah, Rizki Fitriani, Bagus Putra, Ghea Farmaning Thias, Muh. Al-Ikhsan Mansur, yang telah menjadi teman seperjuangan dari kampung halaman hingga berkuliah.

5. Teman baik penulis selama berkuliah di Farmasi yaitu Andi Asna Abdullah, Khansa, Nur Zadila, Zilfrida Aura Bening Azizy, Indhira Azhari Gazali, Nurhalisa Amalia Achmad, Andharini Rusmana Putri, Muh. Rezky Pratama, Risa Aulia Achmad, dan Ananda Pratiwi.
6. Teman-teman UFRG yakni Khansa, Nur Islamiah Syahrir, Dhandy Kashar Pratama, Nur Rahmah, Reski Amelia Kamri, Muhammad Iqbal. Serta kakak-kakak hebat yang selalu membimbing kami yakni Kak Nadil, Kak Ocha, dan Kak Rahmah.
7. Keluarga besar CLOSTR17IUM KEMAFAR-UH selaku teman angkatan 2017 yang penulis sayangi.
8. Keluarga UKM Redaksi Lege Artis FF-UH yang telah menjadi keluarga kecil penulis dalam menyalurkan minat bakat dalam bidang jurnalistik.
9. Pengurus BEM KEMAFAR-UH Kabinet Karya yang telah menjadi wadah pengembangan diri dalam aspek kegiatan organisasi.
10. Segenap anggota Keluarga Mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah menjadi media pengembangan diri penulis selama menjalani kehidupan mahasiswa.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak.

Makassar, 2021



LM. Alif Fauzan Tamar

ABSTRAK

LM. ALIF FAUZAN TAMAR. Pengaruh Pemaparan Etanol Terhadap Ekspresi Gen *atg5* dan *atg8a* Terkait Autofagi Pada *Drosophila melanogaster* (dibimbing oleh Firzan Nainu dan Risfah Yulianty).

Autofagi merupakan mekanisme yang bersifat conserved pada berbagai tingkatan makhluk hidup dan mekanisme ini dapat terjadi sebelum apoptosis. Pemberian etanol secara inhalasi diketahui dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada *Drosophila melanogaster*, sehingga terdapat kemungkinan mekanisme autofagi juga terjadi akibat pemberian paparan etanol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek paparan etanol terhadap ekspresi gen *atg5* dan *atg8a* pada *Drosophila melanogaster* sebagai penanda terjadinya mekanisme autofagi. Pada penelitian ini dilakukan pemberian paparan etanol selama enam menit dengan konsentrasi 5%, 45% dan 85% pada *Drosophila melanogaster*, lalu dilanjutkan dengan isolasi RNA dan pengujian RT-qPCR. Hasil dari pengujian molekuler menunjukkan tidak ada perbedaan ekspresi gen *atg5* dan *atg8a* pasca paparan etanol. Kesimpulan dari penelitian ini adalah tidak ditemukan adanya indikasi aktivasi autofagi sebelum apoptosis pada *Drosophila melanogaster* pasca paparan etanol dengan konsentrasi 5%, 45%, dan 85%.

Kata Kunci : Etanol, Autofagi, *Drosophila melanogaster*

ABSTRACT

LM. ALIF FAUZAN TAMAR. *Effect of Ethanol Exposure To the Expression of atg5 And atg8a Genes Related to Autophagic in Drosophila melanogaster* (supervised by Firzan Nainu and Risfah Yulianty).

Autophagy is a conserved mechanism across metazoan species and this mechanism can occur before apoptosis. Ethanol exposure by inhalation has been known to induce apoptosis in *Drosophila melanogaster*, thus there is a possibility that the autophagy mechanism can occur beforehand. The purpose of this study was to determine the effect of ethanol exposure on the expression of *atg5* and *atg8a* in *Drosophila melanogaster* as a marker of the autophagy mechanism. In this study, *Drosophila melanogaster* was exposed to ethanol for six minutes with concentrations of 5%, 45%, and 85%, then followed by RNA isolation and RT-qPCR analysis. Results of the molecular analysis demonstrated that there was no difference in the level of *atg5* and *atg8a* gene expression upon ethanol exposure. In conclusion, the autophagy mechanism seems not activated prior to apoptosis in *Drosophila melanogaster* upon ethanol exposure at concentrations of 5%, 45%, and 85%.

Keywords: Ethanol, Autophagy, *Drosophila melanogaster*

DAFTAR ISI

| | halaman |
|--|---------|
| UCAPAN TERIMA KASIH | vi |
| ABSTRAK | viii |
| ABSTRACT | ix |
| DAFTAR ISI | x |
| DAFTAR TABEL | xiii |
| DAFTAR GAMBAR | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xv |
| 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. Alkohol | 4 |
| II.1.1. Etanol | 5 |
| II.1.2. Metabolisme Alkohol | 6 |
| II.1.3. Efek Konsumsi Etanol | 9 |
| II.2. Autofagi | 11 |
| II.2.1. <i>atg8a</i> dan <i>atg5</i> | 14 |
| II.2.2. Autofagi & <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS) | 15 |
| II.2.2. Autofagi & Reproduksi <i>Drosophila melanogaster</i> | 16 |

| | |
|---|----|
| II.3. Lalat Buah (<i>Drosophila melanogaster</i>) | 17 |
| II.3.1. Klasifikasi | 17 |
| II.3.2. Morfologi | 17 |
| II.3.3. <i>Drosophila melanogaster</i> Sebagai Hewan Coba | 18 |
| II.4. <i>Real Time PCR</i> | 18 |
| BAB III METODE PENELITIAN | 21 |
| III.1. Alat dan Bahan | 21 |
| III.2. Metode Kerja | 21 |
| III.2.1. Penyiapan Hewan Uji | 21 |
| III.2.2. Pembuatan Pakan <i>Drosophila melanogaster</i> | 22 |
| III.2.3. Uji Reproduksi | 22 |
| III.2.4. Analisis Level mRNA | 23 |
| III.2.4.1. Isolasi RNA | 23 |
| III.2.4.2. <i>Real Time Reverse Transcriptase PCR</i> | 24 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 26 |
| IV.1. Hasil & Pembahasan Ekspresi Gen | 26 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN | 31 |
| V.1. Kesimpulan | 31 |
| V.2. Saran | 31 |
| DAFTAR PUSTAKA | 32 |
| LAMPIRAN | 37 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | halaman |
|--|---------|
| 1. Rincian Sekuens dan Prosedur Pengujian PCR | 25 |
| 2. Hasil <i>One-way Anova</i> Pada Ekspresi Gen <i>atg5</i> | 39 |
| 3. Hasil <i>One-way Anova</i> Pada Ekspresi Gen <i>atg8a</i> | 39 |
| 4. Hasil <i>One-way Anova</i> Pupa Pada Jumlah Pupa | 39 |
| 5. Hasil <i>One-way Anova</i> Pupa Pada Jumlah Lalat Baru | 39 |
| 6. Hasil Uji Lanjutan <i>Tukey</i> Pada Jumlah Pupa | 39 |
| 7. Hasil Uji Lanjutan <i>Tukey</i> Pupa Pada Jumlah Lalat Baru | 40 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | halaman |
|--|---------|
| 1. Struktur Etanol | 6 |
| 2. Metabolisme Alkohol | 8 |
| 3. Mekanisme Autofagi | 13 |
| 4. <i>Drosophila melanogaster</i> | 17 |
| 5. Grafik Jumlah Pupa | 26 |
| 6. Grafik Jumlah Lalat Baru | 26 |
| 7. Profil Ekspresi Gen <i>atg5</i> | 28 |
| 8. Grafik Hasil Ekspresi Gen <i>atg5</i> | 29 |
| 9. Profil Ekspresi Gen <i>atg8a</i> | 29 |
| 10. Grafik Hasil Ekspresi Gen <i>atg8a</i> | 29 |
| 11. Sampel Hasil Isolasi RNA | 41 |
| 12. Perhitungan Lalat Baru | 41 |
| 13. Pengamatan Uji Reproduksi | 41 |
| 14. Alat <i>Thermal Cycler</i> | 41 |
| 15. Meja Kerja BSC | 42 |
| 16. Alat Mikroskop | 42 |
| 17. Proses Pembuatan Pakan Lalat | 42 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | halaman |
|--------------------------------------|---------|
| 1. Skema Kerja Uji Reproduksi | 37 |
| 2. Skema Kerja Isolasi RNA & Uji PCR | 38 |
| 3. Hasil Analisis Statistik | 39 |
| 4. Dokumentasi Penelitian | 41 |

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang

Alkohol merupakan salah satu substansi adiktif yang banyak disalahgunakan. Masalah umum yang timbul dari pengonsumsian alkohol antara lain gangguan sistem kekebalan tubuh, tekanan darah tinggi, gangguan ritme jantung, gangguan otot jantung, stroke, resiko tinggi kanker, sirosis dan gangguan hati lain (Pribadi, 2017; Žuškin *et al.*, 2006). Satu-satunya jenis alkohol yang dapat dikonsumsi merujuk pada etanol dengan rumus kimia C_2H_5OH . Efek jangka pendek dari konsumsi etanol antara lain gangguan emosi, gangguan tidur, dan penurunan suhu tubuh. Selain itu, efek jangka panjang dari penggunaan etanol dapat menyebabkan kematian sel dan melemahkan kekebalan tubuh (Onyekwelu, 2019; Palaniappan *et al.*, 2017).

Etanol secara umum telah diketahui dapat meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dalam sel, yang memicu terjadinya stres oksidatif, dan berujung pada kematian sel, salah satunya apoptosis (Wu and Cederbaum, 2014). Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa Etanol dapat menginduksi terjadinya apoptosis. Pada penelitian Hui *et al.*, (2016) misalnya, etanol diketahui dapat menginduksi apoptosis pada sel hepatosit tikus. Edwin (2018) juga melaporkan bahwa paparan etanol pada *Drosophila* secara inhalasi dapat menyebabkan apoptosis yang berujung pada penurunan lokomotor dan kematian *Drosophila*.

Dalam kondisi berbahaya akibat adanya stimulus tertentu, sel akan berusaha bertahan hidup melalui beberapa mekanisme salah satunya mengaktifkan respon autofagi. Autofagi adalah proses katabolisme yang diatur oleh lisosom, yang memiliki peran penting dalam mengatur homeostasis dari proses sintesis, degradasi dan daur ulang sel serta perkembangan reproduksi (Dolganiuc *et al.*, 2012, Gao *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian, disebutkan bahwa beberapa organisme uji seperti *yeast*, nematoda, lalat buah, dan tikus yang mengalami defisiensi sel autofagi akan mengalami kelainan reproduksi bahkan pada beberapa kondisi menyebabkan kemandulan (Gao *et al.*, 2016).

Pada kondisi peningkatan ROS dalam sel secara tidak langsung akan mengaktifasi respon autofagi melalui beberapa proses, salah satunya dengan menghambat *negative regulator* autofagi (Shiomi *et al.*, 2014). Mekanisme autofagi sendiri melibatkan beberapa protein yang disebut *Autophagy-related (atg)*. Saat ini diketahui terdapat 30 jenis protein *atg* diantaranya adalah *atg5* dan *atg8a* (Bednarczyk *et al.*, 2018).

Pada penelitian ini, peneliti mencoba mencari tahu hubungan antara induksi apoptosis akibat paparan etanol dengan respon autofagi yang dapat dilihat dari pendekatan secara fenotipik melalui uji reproduksi dan genotipik dengan mengukur ekspresi gen *atg5* dan *atg8a* menggunakan organisme uji *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster merupakan salah satu invertebrata yang banyak digunakan dalam penelitian terkait efek etanol terhadap

perubahan genetik. Berdasarkan data, 65% gen lalat buah homolog dengan manusia. Termasuk gen *atg5* dan *atg8a* yang terdapat pada manusia dan *Drosophila* (Zirin and Perrimo, 2010). Selain itu *Drosophila* juga memiliki beberapa keuntungan diantaranya siklus hidup yang cepat, kemampuan reproduksi yang banyak, dan biaya pemeliharaannya yang relatif murah (Nainu, 2018).

I.2 Rumusan Masalah

Apakah paparan etanol berpengaruh terhadap ekspresi gen *atg5* dan *atg8a* pada *Drosophila melanogaster*?

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh paparan etanol terhadap ekspresi gen *atg5* dan *atg8a* pada *Drosophila melanogaster*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Alkohol

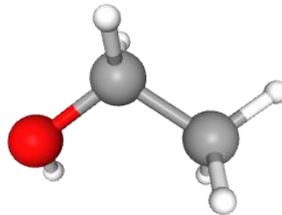
Alkohol telah lama dikenal sebagai faktor risiko penyakit. Konsumsi alkohol terkait dengan efek biologis dan sosial jangka panjang sebagai hasil dari mekanisme berbeda: keracunan, ketergantungan dan efek biokimia secara langsung. Contoh efek biokimia tersebut adalah peningkatan disolusi dari trombosit dan efek toksik secara langsung pada sel-sel asinar yang memicu kerusakan pankreas. Efek biokimia langsung dari konsumsi alkohol dapat mempengaruhi penyakit kronis. Efek alkohol pada sistem saraf pusat menentukan perasaan subjektif pada efek kemabukan. Efek ini dirasakan dan dapat diukur bahkan pada tingkat konsumsi yang ringan sampai sedang (Eckardt *et al.* 1998). Ketergantungan alkohol adalah gangguan tersendiri, tetapi juga sangat kuat mekanisme yang menopang konsumsi alkohol dan dampaknya pada konsekuensi gangguan fisiologis akut dan sosial kronis (Drummond 1990; De La Rosa *et al.*, 2012). Efek langsung dari pengonsumsi alkohol menyebabkan berbagai jenis cedera yang berakibat dari penurunan kesadaran. Hal ini dikarenakan kadar alkohol darah yang tinggi dapat mengganggu proses berpikir otak dan koordinasi otot, menyebabkan otot kaku dan kesulitan berjalan. Efek umum dari konsumsi alkohol termasuk luka, memar, keseleo dan patah tulang. Risiko cedera setelah enam jam pengonsumsi alkohol berlebih dapat meningkat dengan cepat.

Sedangkan dalam efek jangka panjang, penggunaan alkohol dalam jumlah sedang dapat melindungi dari osteoporosis (penipisan tulang, yang membuat tulang lebih banyak kemungkinan besar akan pecah). Namun, konsumsi alkohol kronis dapat mengganggu penyerapan kalsium dan pembentukan tulang dan dapat menyebabkan osteoporosis. Konsumsi alkohol kronis juga dikaitkan dengan kondisi di mana jaringan tulang mati (osteonekrosis), encok (sejenis artritis atau radang sendi, sering mempengaruhi sendi jempol kaki), pengurangan massa dan pelemahan otot (Gunasekara, 2012).

II.1.1 Etanol

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) adalah alkohol, sekelompok senyawa kimia yang molekulnya mengandung gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada atom karbon. Ketika minuman beralkohol dikonsumsi, maka akan melewati lambung ke usus halus di mana dengan cepat diserap dan didistribusikan ke seluruh tubuh. Etanol adalah substansi dengan efek yang menguntungkan maupun merugikan. Etanol berupa cairan bening yang dibuat dengan fermentasi bahan biologis yang berbeda. Etanol tidak dapat disimpan di dalam tubuh dan oleh karena itu, tubuh harus memetabolisme untuk membuangnya. Etanol hanya dapat dimetabolisme di hati oleh enzim yang terdapat di hati. Etanol dimetabolisme di dalam tubuh untuk menyediakan energi dan tidak mengandung mineral, vitamin, karbohidrat, lemak atau protein yang terkait dengannya dan sebagai akibatnya, secara langsung berkontribusi pada malnutrisi. Malnutrisi

umum sering tercermin dalam penurunan berat badan, terutama jaringan lemak dan otot. Hilangnya cadangan nutrisi ini sebagian karena asupan



protein yang tidak memadai dalam menghadapi konsumsi alkohol yang berkelanjutan (C. Onyekwelu, 2019).

Gambar 1. Struktur Etanol (Pubchem)

II.1.2 Metabolisme Alkohol

Enzim utama yang terlibat dalam metabolisme alkohol adalah aldehid dehidrogenase (ALDH), alkohol dehidrogenase (ADH), sitokrom P450 (CYP2E1), dan katalase. Variasi gen untuk enzim ini telah ditemukan mempengaruhi konsumsi alkohol, kerusakan jaringan terkait alkohol, dan ketergantungan alkohol. Konsekuensi metabolisme alkohol termasuk defisit oksigen (hipoksia) di hati; interaksi antara produk sampingan metabolisme alkohol dan komponen sel lainnya, menghasilkan pembentukan senyawa berbahaya (*adduct*); pembentukan molekul yang mengandung oksigen reaktif (ROS) yang dapat merusak komponen sel lainnya; perubahan rasio NADH ke NAD⁺ (keadaan redoks sel), kerusakan jaringan, kerusakan janin, gangguan proses metabolisme

lainnya, kanker, dan interaksi obat. Beberapa masalah terkait metabolisme alkohol memerlukan penelitian lebih lanjut (Zakhari, 2006).

Lebih dari 90% alkohol yang dikonsumsi dimetabolisme melalui jalur oksidatif yang dimediasi oleh alkohol *dehydrogenase* (ADH) dan *aldehyde dehydrogenase* (ALDH) (Lieber, 2005). Dalam jalur oksidatif utama ini, alkohol dioksidasi menjadi aldehida oleh ADH, diikuti oleh ALDH yang memediasi metabolisme aldehida menjadi asetat. Keseimbangan antara berbagai isoform ADH dan ALDH sangat penting dalam mengatur konsentrasi seluler aldehida yang sangat sitotoksik (Cederbaum, 2012). Selain metabolisme alkohol, ADH dan ALDH juga berpartisipasi dalam peristiwa seluler lainnya, seperti biosintesis asam retinoat, metabolisme folat, metabolisme asam amino, dan peroksidasi lipid (Vasillou *et al.*, 2004). Lebih jauh, telah dilaporkan bahwa Enzim ADH dan ALDH memainkan peran penting dalam metabolisme berbagai obat klinis (Evans and Relling, 1999). Selain itu, enzim ADH dan ALDH dapat berfungsi sebagai enzim jalur oksidatif alternatif untuk beberapa obat yang terutama dimetabolisme oleh sitokrom P450s (CYP) (Benedetti and Whomsley, 2006).

Asetaldehida merupakan senyawa hasil metabolisme alkohol yang dengan cepat dimetabolisme menjadi asetat, terutama oleh ALDH2 (dalam mitokondria), untuk membentuk asetat dan NADH. NADH kemudian dioksidasi oleh serangkaian reaksi kimia di mitokondria (yaitu rantai transpor elektron mitokondria atau respirasi sel). Asetaldehida

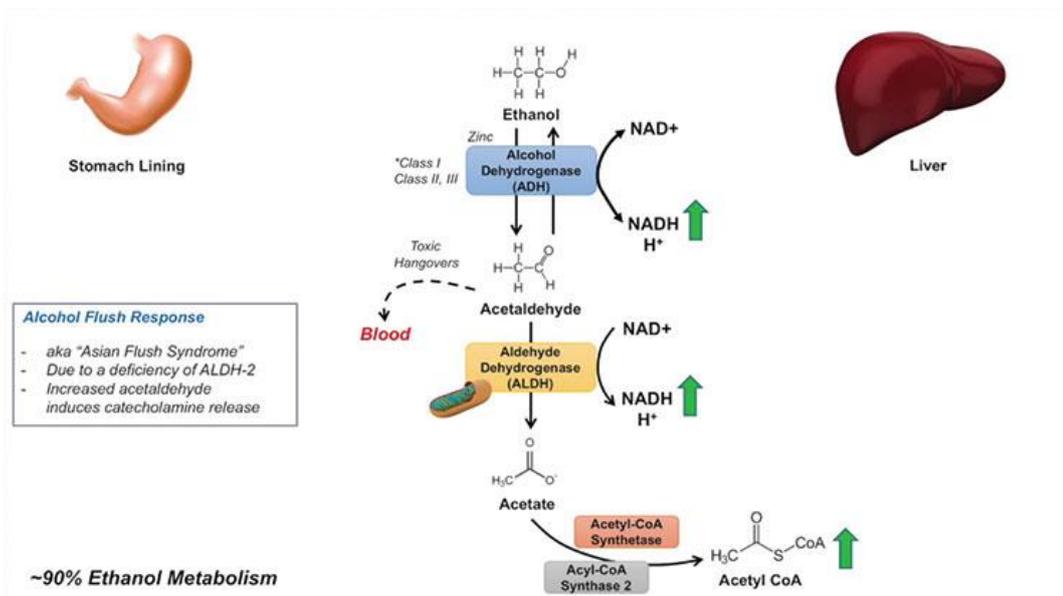
memiliki kapasitas untuk mengikat protein seperti enzim, protein mikrosolam, dan mikrotubulus. Senyawa ini juga membentuk adduct dengan zat kimia pensinyalan otak (neurotransmitter) dopamin untuk membentuk salsolinol, yang dapat berkontribusi pada ketergantungan alkohol, dan dengan DNA untuk membentuk *adduct* DNA karsinogenik seperti *1, N2-propanodeoxyguanosine*. Pembentukan *adduct* protein dalam hepatosit mengganggu sekresi protein, yang telah terbukti berperan dalam pembesaran hati (hepatomegali). Asetat, yang dihasilkan dari oksidasi asetaldehida, dioksidasi menjadi karbon dioksida (CO₂). Sebagian besar asetat dihasilkan dari metabolisme alkohol lolos dari hati ke darah dan akhirnya dimetabolisme menjadi CO₂ di jantung, otot rangka, dan sel otak. Asetat bukanlah produk inert, senyawa ini meningkatkan aliran darah ke hati dan menekan sistem saraf pusat serta mempengaruhi berbagai proses metabolisme (Israel *et al.*, 1994). Asetat juga

dimetabolisme menjadi asetil CoA, yang terlibat dalam biosintesis lipid dan kolesterol di mitokondria jaringan perifer dan otak (Zakhari, 2006).

Gambar 2. Metabolisme Alkohol (Microbenotes)

II.1.3 Efek Konsumsi Etanol

Etanol mengganggu struktur fisik membran sel. Membran paling cair termasuk kolesterol adalah yang paling mudah dirusak oleh etanol. Meskipun efeknya dalam skala kecil, ada bukti farmakologis, temporal, dan genetik bahwa efek yang ditimbulkan cukup berbahaya. Hewan yang tahan terhadap keracunan etanol karena latar belakang genetik atau karena paparan etanol sebelumnya ditemukan memiliki selaput otak yang tidak mudah rusak secara *in vitro*. Pengecualian pada peningkatan



kepekaan perilaku pada hewan yang menua, yang tidak cocok dengan perubahan di selaputnya. Ketika hewan diperlakukan secara kronis

dengan etanol, membran mereka menjadi lebih kaku, suatu respons yang bisa dianggap adaptif. Etanol meningkatkan penyerapan kolesterol atau asam lemak jenuh ke dalam membran, sehingga mengurangi efeknya sendiri (Goldstein, 1986).

Hubungan antara gangguan hati dan pengonsumsian alkohol berat telah diketahui lebih dari 200 tahun yang lalu (Smart and Mann, 1992). Penggunaan alkohol berat dalam jangka panjang adalah yang paling umum sebagai penyebab penyakit dan kematian akibat penyakit liver di Amerika Serikat. Ketika alkohol dimetabolisme dalam hati, sejumlah produk sampingan yang berpotensi berbahaya dihasilkan seperti asetaldehida dan molekul reaktif yang disebut radikal bebas. Kemungkinan lebih dari alkohol itu sendiri, produk sampingan tadi berkontribusi pada pemicu kerusakan hati. Hati adalah salah satu organ terbesar di tubuh; ia tidak hanya memiliki kekuatan pemulihan yang cukup besar tetapi juga kemampuan untuk meregenerasi dirinya sendiri. Karena itu, gejala kerusakan hati mungkin tidak muncul hingga kerusakan pada organ tersebut cukup luas. Konsumsi alkohol dalam jangka panjang jelas memainkan peran utama dalam perkembangan kerusakan hati. Namun, tidak lebih dari setengah peminum berat mengembangkan hepatitis alkoholik atau sirosis (French *et al.*, 1993). Kerusakan hati terkait alkohol dapat terjadi dibagi menjadi tiga kategori:

- a. Hati berlemak, beberapa derajat penumpukan lemak di hati terjadi di hampir semua peminum berat. Hal ini juga mungkin terjadi

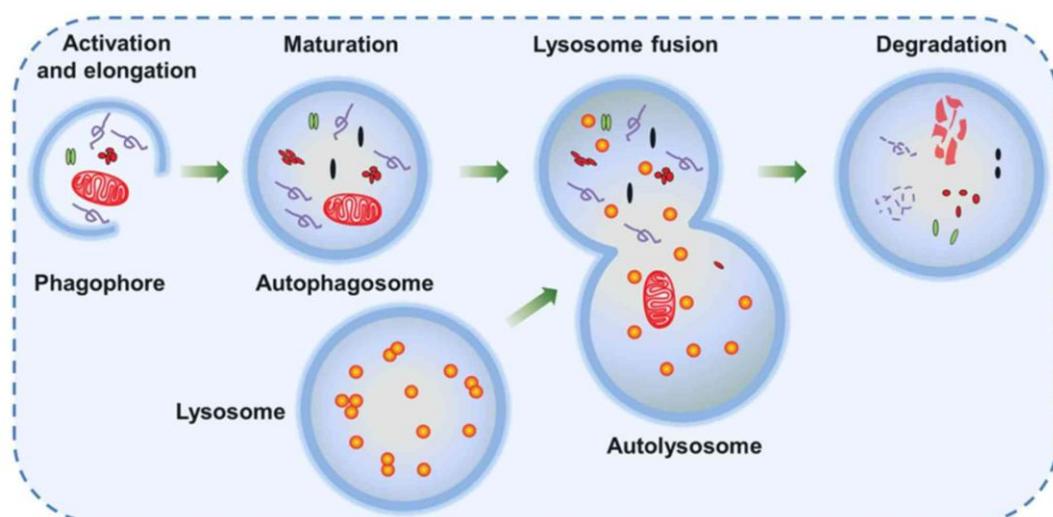
sementara pada non-alkoholik setelah konsumsi alkohol tunggal. Penyakit hati berlemak bersifat reversibel dan tidak diyakini menyebabkan kerusakan yang lebih serius.

- b. Hepatitis alkoholik. Gangguan ini ditandai dengan peradangan dan kerusakan yang meluas (yaitu, nekrosis) jaringan hati. Jaringan yang mengalami kerusakan mulai menggantikan jaringan hati yang sehat. Proses ini disebut fibrosis. Gejala hepatitis alkoholik mungkin termasuk demam, ikterus, dan sakit perut. Kondisi ini bisa berakibat fatal tetapi mungkin dapat diurungkan dengan abstinensi. Hepatitis alkoholik terjadi hingga 50 persen dari peminum alkohol
- c. Sirosis alkoholik. Bentuk penyakit hati yang paling lanjut ini didiagnosis pada 15-30 persen penderita peminum alkohol. Antara 40-90 persen dari 26.000 kematian tahunan akibat sirosis berhubungan dengan alkohol (Dufour dkk. 1993). Sirosis hati yang ditandai dengan fibrosis yang luas mengeraskan pembuluh darah dan mendistorsi struktur internal hati. Hal ini menyebabkan hasil kerusakan struktural yang parah gangguan fungsional, yang mungkin menyebabkan kerusakan fungsi kedua organ lain, seperti otak dan ginjal. Meskipun sirosis alkoholik biasanya berakibat fatal karena komplikasi (misalnya, gagal ginjal dan hipertensi pada vena yang membawa darah ke hati), namun hal ini bisa stabilkan dengan abstinensi.

II.2 Autofagi

Autofagi adalah mekanisme dalam sel berupa mencerna diri sendiri untuk menghilangkan organel yang rusak, protein yang cacat selama biosintesis, dan protein berumur panjang nonfungsional oleh lisosom. Istilah autofagi terdiri dari kata "fagi" (makan) dan bagian diri sel (auto) dari pemecahan ekstraseluler (heterophagy) (Klionsky, 2007). Nama tersebut diambil dari dari observasi studi mikroskop elektron yang menunjukkan membran tunggal atau ganda, yaitu vesikel, yang mengandung organel dalam berbagai tahap degradasi (Clark, 1957; De Nève and Wattiaux, 1966) yang mana hal ini membedakannya dari jalur Ub-proteosom yang spesifik untuk degradasi protein yang berumur pendek atau rusak. Autofagi dibagi menjadi tiga tipe umum tergantung pada mekanisme dimana bahan intraseluler dikirim ke lisosom untuk degradasi yaitu, *microautophagy*, *chaperon-mediated autophagy* (CMA), dan *macroautophagy*. Autofagi pertama kali diamati pada sel mamalia dengan mekanisme molekuler telah digambarkan dalam ragi (Nakatogawa *et al.*, 2009; Klionsky, 2007). Sejumlah protein kompleks, dan jalur pensinyalan yang mempengaruhi regulasi autofagi, telah diidentifikasi dalam ragi dan banyak yang memiliki ortolog dengan mamalia. Identifikasi gen autofagi di eukariota yang lebih tinggi memungkinkan untuk menganalisis sel mamalia yang mengekspresikan protein autofagi yang ditandai dengan penanda fluorescent (Klionsky, 2007). Saat ini ada 27 dari lebih dari 30 gen-gen *atg* (*autophagy-related*) murni yang telah diidentifikasi dalam ragi serta ditandai secara fungsional ortolog pada

eukariota yang lebih tinggi termasuk: mamalia, serangga, cacing, dan tumbuhan (Reggiori and Klionsky, 2002; Levine and Klionsky, 2004). Autofagi melibatkan pembentukan membran ganda vesikel, yang membungkus sitoplasma, protein cacat, protein berumur panjang, dan organel yang kemudian bergabung dengan lisosom untuk didegradasi. Pembentukan vesikel membran ganda adalah proses kompleks yang melibatkan 16 protein terkait autophagy (protein *atg*). Selain ini, dua sistem konjugasi mirip ubiquitin terlibat di dalam autofagi. Sistem ini menghasilkan kompleks yang dimodifikasi regulator autofagi: *atg8*-PE (*phosphatidylethanolamine*) dan *atg5-atg12-atg16*, yang dapat menentukan pembentukan dan ukuran autofagosom. Nukleasi, ekspansi, pelepasan, dan penyelesaian formasi autofagosom kemudian terjadi untuk berfusi dengan lisosom (Yorimitsu and Klionsky, 2005).



Gambar 3. Mekanisme Autofagi (Li et al., 2019)

Mekanisme molekuler dari autofagi melibatkan beberapa protein *atg* yang sebagian besar pertama kali diidentifikasi dalam ragi (Beth Levine and Guido Kroemer, 2008; Klionsky, 2005; Yorimitsu and Klionsky, 2005). Inisiasi pembentukan autofagosom membutuhkan dua kompleks, yaitu kompleks yang berisi kelas III PI3 K Vps34 (*Vacuolar Protein Sorting*), *atg6 Beclin1*, *atg14*, dan *Vps15/p150*. Kompleks lainnya meliputi serin/treonin kinase *atg1*. Aktivitas kinase *atg1* membutuhkan fungsi dua protein autofagi lainnya, yaitu, *atg13* atau *atg8* dan *atg17*. Pada mamalia tidak terdapat *atg13*, *atg1* ditemukan terkait dengan ortolog *atg8*, *LC3*, *GATE-16*, dan *GABARAP (GABA Type A Receptor-Associated Protein)*. Perpanjangan melibatkan dua jalur konjugasi protein mirip ubiquitin, *atg8/MAP-LC3/GABARAP/GATE-16* dan sistem *atg12*. Protein *atg8* yang telah terlarut mengalami pemecahan karboksil-terminal oleh protease sistein *atg4* untuk mengekspos residu glisin reaktif untuk memediasi pembentukan autofagosom. *atg4* diaktifkan oleh *atg7* (protein mirip E1) dan enzim *atg3* (protein mirip E2). Fungsi *atg3* membutuhkan kompleks protein yang melibatkan *atg5*, *atg12*, dan *atg16*. Fosfatidil etanolamina kemudian terikat secara kovalen untuk mengaktifkan *atg8* (*atg8-PE* dalam ragi dan *LC3-II* lipidated pada mamalia). Kompleks ini tetap terikat pada membran autofagosom sampai sebagian darinya dibelah oleh *atg4* untuk didaur ulang. Jika tidak diselamatkan oleh *atg4* maka akan terjadi degradasi dalam autolisosom, karena *atg8* tetap terikat secara kovalen ke membran dan oleh karena itu mungkin digunakan sebagai penanda

autofagi. Segera setelah pembentukan autofagosom selesai, kompleks *atg16-atg5-atg12* terpisah dari membran pembatasnya, dan komponennya berperan dalam proses daur ulang yang dimediasi oleh *atg2*, *atg9*, dan *atg18*. Lalu, autofagosom yang telah selesai siap untuk difusi dengan endosom atau lisosom (Badadani, 2012).

II.2.1 *atg8a* dan *atg5*

atg8/LC3/GABARAP merupakan protein yang berperan dalam langkah biogenesis autofagosom: inisiasi dan elongasi phagophore serta pematangan dan fusi autofagosom, serta vakuola/lisosom (Wesch *et al.*, 2020). Pada organisme *Drosophila melanogaster*, protein ini homolog dengan protein *atg8a* dan *atg8b*, dimana kedua protein ini berperan dalam biogenesis autofagosom. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa *atg8b* bergabung dengan autofagosom yang sedang tumbuh sebelum *atg8a*. Selanjutnya, *atg8b* terutama terlokalisasi di bagian luar autofagosom, dan *atg8a* di bagian dalam. Ini menunjukkan bahwa *atg8b* lebih penting dalam pelaksanaan autofagi dan dalam fusi lisosom autofagosom daripada *atg8a*. Namun, *atg8a* memainkan peran yang lebih penting dalam pengambilan kargo daripada *atg8b* (Meßling *et al.*, 2017).

Selain itu, *atg8* tidak dapat dipisahkan dari *atg5* dan *atg12*. Kedua dua protein mirip ubiquitin ini terlibat dalam pembentukan autofagosom. Selama pelekatan *atg12* ke *atg5*, glisin terminal karboksi dari *atg12* membentuk ikatan isopeptida dengan gugus ϵ -amino dari residu lisin. Keterkaitan ini diperlukan untuk modifikasi *atg8* (juga dikenal sebagai

LC3) ke kepala kutub fosfatidylethanolamine, komponen dari lapisan ganda fosfolipid. Kedua sistem modifikasi tersebut bergantung pada aktivitas protein *atg* lainnya, yang memiliki peran yang mirip dengan enzim E1 dan E2 dalam kaskade ubiquitination. Formasi dari *atg12* yang dimodifikasi *atg5* adalah konstitutif dan terjadi segera setelah disintesis (Codogno and Meijer, 2006).

II.2.2 Autofagi & Reactive Oxygen Species (ROS)

Stres, baik eksternal (misalnya stres suhu dan penyakit) atau internal (misalnya stres oksidatif endogen) mengurangi efisiensi produksi dari makhluk hidup. Sumber utama oksidatif stres dalam sel adalah *reactive oxygen species* (ROS) pada mitokondria. Mitokondria bertanggung jawab dalam 90% produksi energi seluler (ATP) dan juga merupakan tempat utama produksi ROS. Tingkat rendah ROS dapat memodulasi proses translasi dan transkripsi, sedangkan tingkat tinggi ROS dapat mengoksidasi protein, lipid, dan DNA. Tekanan panas telah terbukti meningkatkan produksi ROS mitokondria pada suatu studi menggunakan hewan model ayam (Mujahid *et al.*, 2007; Azad *et al.*, 2010) yang mana dapat menyebabkan autofagi mitokondria (*mitophagy*) jika produksi ROS menjadi berlebihan (Levine and Kroemer, 2008).

II.2.3 Autofagi & Reproduksi *Drosophila melanogaster*

Autofagi diketahui mengatur gametogenesis dan perkembangan embrio awal *Drosophila melanogaster*. Selama oogenesis di *Drosophila*

melanogaster, tahapan tertentu dari perkembangan ruang telur seperti germarium (sebelum pembentukan lapisan sel folikel), tahap previtellogenic, dan mendekati pematangan ditandai dengan *programmed cell death*/kematian sel terprogram (PCD). PCD hanya diamati selama tahap awal dan pertengahan oogenesis di bawah suplai nutrisi yang cukup. Namun, selama nutrisi menipis atau berjaga-jaga pada perkembangan abnormal, frekuensi PCD yang tinggi diamati. Pematangan telur membutuhkan PCD dari sel perawat selama tahap akhir oogenesis, dan hasilnya nutrisi dipompa ke sel telur yang sedang berkembang untuk mendukung perkembangan selanjutnya. Autofagi dilaporkan terlibat dalam regulasi PCD ini. *Dcp-1 (Drosophila caspase 1)* ditemukan bertugas membersihkan ruang telur yang rusak di awal dan pertengahan oogenesis secara bersamaan mengaktifkan jalur apoptosis dan autofagi. Mutasi *Dcp-1* menyebabkan penurunan aktivitas autofagi dan dekondensasi struktur inti. Sel germinal tertentu dapat menyebabkan defisiensi autofagi yang mana memperlambat fragmentasi DNA sel perawat selama kematian sel yang diinduksi kekurangan nutrisi, hal ini menunjukkan autofagi memainkan peran penting di tahap selanjutnya dari oogenesis (Hou *et al.*, 2008). Hasil ini sangat menunjukkan peran autofagi dalam menjaga interaksi antara sel germinal dan sel folikel dengan menyediakan nutrisi untuk pematangan sel telur melalui apoptosis sel perawat. Namun, mekanisme molekulernya secara spesifik masih belum diketahui (Hui *et al.*, 2016).

II.3 Lalat Buah (*Drosophila melanogaster*)

II.3.1 Klasifikasi

Klasifikasi dari Lalat Buah (*Drosophila melanogaster*) adalah sebagai berikut:

| | |
|---------|--|
| Kingdom | : Animalia |
| Filum | : Arthropoda |
| Kelas | : Insecta |
| Ordo | : Diptera |
| Famili | : Drosophilidae |
| Genus | : <i>Drosophila</i> |
| Spesies | : <i>Drosophila melanogaster</i> (ITIS Taxonomy, 1996) |



Gambar 4. *Drosophila melanogaster*.
(Depts.washington.edu)

II.3.2 Morfologi

Drosophila memiliki ukuran yang kecil, sekitar 2-4 mm, tetapi beberapa lebih besar dari lalat rumah. *Drosophila* biasanya berwarna kuning pucat sampai coklat kemerahan atau hitam dan cincin hitam melintang perut dengan mata merah. Banyak spesies memiliki pola hitam yang berbeda pada sayapnya dengan antena plumose dan arista, berbulu di kepala dan dada (Vilela, 1999). Karakteristik venasi sayap digunakan untuk mendiagnosis famili dari spesies. Siklus terbang *Drosophila* memiliki putaran sayap yang cepat dan tersentak-sentak menyelingi posisi istirahat dikenal sebagai gerakan saccades. Saat dalam gerakan saccades, sayap dapat diputar pada sudut 90° dalam waktu sekitar 50 milidetik. Selain itu, sayap *Drosophila* bisa mengepak 220 kali per detik (Fry *et al.*, 2005).

II.3.3 *Drosophila melanogaster* Sebagai Hewan Coba

Lalat buah (*Drosophila melanogaster*) digunakan sebagai organisme model untuk mempelajari berbagai disiplin ilmu dari genetika fundamental hingga perkembangan jaringan dan organ. Genom *Drosophila* memiliki 60% homolog dengan manusia dan sekitar 75% dari gen yang bertanggung jawab pada penyakit manusia memiliki homolog pada lalat (Ugur *et al.*, 2016). Kelebihan lainnya adalah memiliki siklus hidup yang singkat waktu, biaya perawatan yang murah, dan ketersediaan alat genetik yang memadai memungkinkan lalat buah memenuhi syarat untuk mempelajari jalur kompleks yang relevan dalam penelitian biomedis (Mirzoyan *et al.*, 2019).

II.4 *Real Time PCR*

Real Time PCR didasarkan pada metode revolusioner PCR, yang dikembangkan oleh Kary Mullis di 1980-an, yang memungkinkan para peneliti untuk mengamplifikasi potongan DNA tertentu lebih dari satu miliar kali. *Real Time PCR* hanya mengacu pada amplifikasi DNA yang dimonitor saat amplifikasi terjadi (Mullis, 1990; Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1992).

Manfaat dari kemampuan *real-time* ini adalah memungkinkan peneliti untuk lebih menentukan jumlah awal DNA dalam sampel sebelum amplifikasi oleh PCR. Tujuan dasar *Real Time PCR* adalah untuk secara tepat membedakan dan mengukur urutan asam nukleat spesifik dalam sampel meskipun hanya ada jumlah yang sangat kecil (Seifi *et al.*, 2012).

Ada banyak metode dalam biologi molekuler untuk mengukur jumlah urutan asam nukleat. Namun, kebanyakan dari metode ini menunjukkan satu atau lebih dari kekurangan seperti memakan waktu, tidak sensitif, nonkuantitatif, memerlukan penggunaan radioaktivitas, atau memiliki kemungkinan kontaminasi yang cukup besar (Reischl *et al.*, 2002). Keunggulan paling penting dari *Real Time PCR* adalah kemampuannya untuk mengukur asam nukleat pada rentang dinamis yang sangat luas (Seifi *et al.*, 2012).

Proses dari *Real Time PCR* melibatkan proses denaturasi, *annealing*, dan *extension*. Pertama, DNA template atau materi genetik didenaturasi, yang mana pada proses ini untai heliks DNA dilepas dan dipisahkan dengan pemanasan hingga 90-96°C. Langkah kedua adalah *annealing*, yaitu enzim Taq Polimerase membutuhkan sepotong RNA untuk memulai replikasi DNA, yang dalam sel normal disintesis oleh RNA polimerase. Dalam reaksi PCR, rantai oligo ganda pendek atau biasa disebut primer ditambahkan untuk mengikat DNA yang didenaturasi dan bertindak sebagai asal replikasi. Dua primer digunakan dalam proses PCR, masing-masing satu untuk setiap untai DNA. Setelah denaturasi, campuran reaksi didinginkan dengan cepat hingga suhu di bawah titik leleh primer (~55°C), di bawah suhu ini primer mengikat ke basis komplementer pada DNA untai tunggal yang sekarang. Pada langkah ketiga (*extension*), suhu reaksi dinaikkan ke suhu optimal untuk polimerase (68-72°C). Polimerase mensintesis DNA baru, dimulai dari

primer, polimerase membaca untai template dan menghasilkan nukleotida komplementer dengan sangat cepat. Hasilnya adalah dua rantai heliks baru di tempat yang pertama, masing-masing terdiri dari salah satu untai asli ditambah pelengkap baru (Morrison, 2002).