

**UJI EFEK KURKUMIN TERHADAP EKSPRESI GEN
tom40 DAN *indy* PADA MODEL AUTOINFLAMASI
*Drosophila melanogaster***

**EFFECT OF CURCUMIN ON THE EXPRESSION OF
tom40 AND *indy* GENES IN THE
AUTOINFLAMMATORY MODEL *Drosophila
melanogaster***

Disusun dan diajukan oleh

NURFADHILAH ASFA

N011 18 1037



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

2022

**UJI EFEK KURKUMIN TERHADAP EKSPRESI GEN *tom40* DAN *indy*
PADA MODEL AUTOINFLAMASI *Drosophila melanogaster***

**EFFECT OF CURCUMIN ON THE EXPRESSION OF *tom40* AND *indy*
GENES IN THE AUTOINFLAMMATORY MODEL *Drosophila*
*melanogaster***

SKRIPSI

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

NURFADHILAH ASFA

N011 18 1037

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

2022

UJI EFEK KURKUMIN TERHADAP EKSPRESI GEN *tom40* DAN *indy* PADA
MODEL AUTOINFLAMASI *Drosophila melanogaster*

NURFADHILAH ASFA

N011 18 1037

Disetujui oleh :

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

Pada tanggal 31/01/2022

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**UJI EFEK KURKUMIN TERHADAP EKSPRESI GEN *tom40* DAN *indy*
PADA MODEL AUTOINFLAMASI *Drosophila melanogaster***

Disusun dan diajukan oleh :

**NURFADHILAH ASFA
N011 18 1037**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 31/01/2022
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. Risfan Yulianty, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19780716 200312 2 001

Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



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

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar adalah hasil karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh batal demi hukum.

Makassar, 31/01/2022

Yang Menyatakan

Nurfadhilah Asfa
N011171037



UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, tidak ada kata yang lebih patut diucapkan oleh seorang hamba yang beriman selain ucapan puji syukur ke hadirat Allah SWT, Tuhan Yang Maha Mengetahui, pemilik segala ilmu, karena atas petunjuk-Nya maka skripsi ini dapat diselesaikan.

Sungguh banyak kendala yang penulis hadapi dalam rangka penyusunan skripsi ini, namun berkat dukungan dan bantuan berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala tersebut. Oleh karena itu, penulis dengan tulus menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Bapak Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama yang telah bersedia memberikan bimbingan, ilmu, arahan, dukungan serta bersedia meluangkan waktunya dalam penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Dr. Risfah Yulianty, M.Si., Apt. selaku pembimbing kedua yang telah bersedia memberikan bimbingan, ilmu, arahan, dukungan, serta bersedia meluangkan waktunya dalam penyusunan skripsi ini.
3. Ibu Yulia Yusrini Djabir, S.Si.,MBMSc.,M.Si.,Ph.D.,Apt dan Ibu Prof. Dr. Sartini., M.Si., Apt. selaku tim penguji yang telah bersedia meluangkan waktunya serta memberikan saran dan masukan dalam penyusunan skripsi ini.
4. Dekan dan para Wakil Dekan, seluruh staf dosen serta staf akademik Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas segala ilmu, bantuan,

serta fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi, melakukan penelitian hingga menyelesaikan skripsi ini.

5. Ibu Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt. selaku Dosen Penasehat Akademik atas segala arahan, saran dan nasehat yang telah diberikan kepada penulis selama perkuliahan.
6. Keluarga besar K.A.L. Biofarmasi FF-UH (Dosen, Laboran, dan seluruh asisten) atas segala ilmu serta pengalaman berharga yang penulis dapatkan selama menjadi bagian di dalamnya.
7. UFRG (*Unhas Fly Research Group*) khususnya teman-teman UFRG 2018 atas segala ilmu dan bantuan yang diberikan selama penulis melakukan penelitian.
8. Sahabat penulis, Nabila Hakim, Ummussaadah, Azizah Amir dan A. Nabila Ulfa yang selalu memberikan masukan dan semangat kepada penulis.
9. Teman-teman penulis Sulistiawati, Nur Farhanah, Nurul Khafifah, Chitra Ramadhan, Nurhaeni, Nur Anisa, Ahmad Shayful W., M. Khadafi Anugrah, Asriyani, Alhidayah, Ulfah Mahfufah, Rabihul Fauziah dan Asmaria yang telah bersedia menjadi anggota tim bagi penulis selama mengikuti kegiatan dikampus.
10. Keluarga Mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin (KEMAFAR-UH), terkhusus teman-teman angkatan 2018 (GEMF18BROZIL) atas segala dukungan, dan pengalaman berharga yang penulis dapatkan selama menjadi bagian di dalamnya.

Akhirnya, semua ini tiada artinya tanpa dukungan moril dari kedua orang tua tercinta Ayahanda Asis Mude dan Ibunda Fatimang, dan saudara penulis Nurul Ishlah Asfa dan Muh. Rifqi Asis, serta seluruh keluarga, atas segala dukungan, doa, serta semangat yang diberikan selama penulis menempuh studi.

Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Sehingga, segala saran dan masukan akan sangat berharga bagi penulis. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Aamiin.

Makassar, 31/01/2022



Nurfadhilah Asfa

ABSTRAK

NURFADHILAH ASFA. Uji Efek Kurkumin Terhadap Ekspresi Gen *tom40* dan *indy* pada Model Autoinflamasi *Drosophila melanogaster* (dibimbing oleh Firzan Nainu dan Risfah Yulianty).

Kurkumin menjadi bahan obat yang sering digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti inflamasi. Penyakit autoinflamasi berimplikasi pada banyak kondisi patologis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kurkumin terhadap gen diduga berkaitan dengan penyakit autoinflamasi, yakni *tom40* dan *indy*. Dalam penelitian ini digunakan 5 kelompok uji, diantaranya kontrol sehat, kontrol pelarut, dan kurkumin dengan konsentrasi 10 μM , 50 μM dan 250 μM . Pengujian yang dilakukan yaitu uji survival dan uji ekspresi gen dengan metode RT-qPCR. Hasil uji survival menunjukkan kurkumin memberikan efek peningkatan masa hidup yang signifikan pada setiap kelompok perlakuan. Uji ekspresi gen *tom40* menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan pemberian kurkumin 250 μM ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol, sedangkan pada ekspresi gen *indy* menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok perlakuan kurkumin 10 μM , 50 μM dan 250 μM . Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa pemberian kurkumin dapat meningkatkan masa hidup dan mencegah penyakit autoinflamasi pada mutan PGRP-LB melalui penurunan ekspresi gen *indy* dan peningkatan ekspresi gen *tom40*.

Kata Kunci: Autoinflamasi, *Drosophila melanogaster*, *indy*, Kurkumin, *tom40*.

ABSTRACT

NURFADHILAH ASFA. Effect of Curcumin on the Expression of *tom40* and *indy* Genes in The Autoinflammatory Model *Drosophila melanogaster* (Supervised by Firzan Nainu and Risfah Yulianty).

Curcumin is a drug that is often used to treat various diseases such as inflammation. Autoinflammatory disease is implicated in many pathological conditions. This study aims to determine the effect of curcumin on genes thought to be associated with autoinflammatory disease, namely *tom40* and *indy*. In this study, we used 5 test groups including untreated control, negative control, and series of curcumin concentrations: 10 μM , 50 μM and 250 μM . The tests carried out survival and gene expression tests using the RT-qPCR method. The results of the survival test showed that curcumin had a significant life-extension effect in each treatment group. The *tom40* gene expression test showed a significant difference with the administration of 250 μM curcumin ($p < 0.05$) compared to the control group, while the *indy* gene expression showed a significant difference in the 10 μM , 50 μM and 250 μM curcumin treatment groups. Based on the results obtained, it can be concluded that administration of curcumin can increase life span and prevent autoinflammatory disease in PGRP-LB mutants through *indy* and *tom40* related mechanisms.

Keyword: Autoinflammatory, *Drosophila melanogaster*, *indy*, Curcumin, *tom40*.

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Kurkumin	5
II.1.1 Deskripsi	5
II.1.2 Indikasi	6
II.2 Autoinflamasi	8
II.2.1 Pengertian	8
II.2.2 Etiologi	9
II.2.3 Patogenesis	11
II.2.4 Kaitannya dengan masa hidup	12
II.3 <i>Drosophila melanogaster</i>	13

II.3.1 Klasifikasi	13
II.3.2 Deskripsi	14
II.4 Gen	14
II.4.1 <i>tom40</i>	15
II.4.2 <i>indy</i>	17
II.4.3 Data Ekspresi Gen pada <i>Drosophila melanogaster</i>	20
BAB III. METODE PENELITIAN	21
III.1 Alat dan Bahan	21
III.2 Cara Kerja	21
III.2.1 Penyiapan Hewan Uji	21
III.2.2 Penyiapan Pakan	22
III.2.3 Penyiapan Sampel	22
III.2.4 Uji Survival	22
III.2.5 Penyiapan Sampel RNA	23
III.2.6 Pengujian Dengan PCR	24
III.2.7 Analisis Data	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
IV.1 Hasil Uji Survival	26
IV.2 Hasil Analisis Ekspresi Gen	27
IV.2.1 Ekspresi Gen <i>tom40</i> dan <i>indy</i> pada Oregon R vs PGRP-LB	27
IV.2.2 Ekspresi Gen <i>tom40</i> dengan perlakuan kurkumin	30
IV.2.3 Ekspresi Gen <i>indy</i> dengan perlakuan kurkumin	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	33

V.1 Kesimpulan	33
V.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Sekuens primer gen	25
2. Data uji survival	44
3. Data statistik log-rank uji survival	45
4. Analisis ekspresi gen <i>tom40</i> Oregon R vs mutan PGRP-LB	46
5. Analisis ekspresi gen <i>indy</i> Oregon R vs mutan PGRP-LB	46
6. Analisis ekspresi gen <i>tom40</i> dengan pemberian kurkumin	46
7. Analisis ekspresi gen <i>indy</i> dengan pemberian kurkumin	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Struktur kurkumin	5
2. Mekanisme kerja kurkumin	7
3. Patogenesis penyakit autoinflamasi	12
4. Kaitan antara penuaan dan autoinflamasi	13
5. Mekanisme kerja protein <i>indy</i>	19
6. Ekspresi gen <i>tom40</i>	20
7. Ekspresi gen <i>indy</i>	20
8. Hasil uji survival	26
9. Grafik ekspresi gen <i>tom40</i> pada Oregon R vs Mutan PGRP-LB	28
10. Grafik ekspresi gen <i>indy</i> pada Oregon R vs Mutan PGRP-LB	29
11. Grafik ekspresi gen <i>tom40</i> dengan perlakuan kurkumin	30
12. Grafik ekspresi gen <i>indy</i> dengan perlakuan kurkumin	32
13. Pembuatan pakan	49
14. Pemisahan lalat jantan dan betina	49
15. Uji survival	49
16. Sampel isolasi RNA	49
17. Isolasi RNA	50
18. Running PCR	50

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Penyakit autoinflamasi ditandai dengan adanya aktivasi yang berlebihan dari sistem imun alamiah, utamanya terjadi abnormalitas fungsi sel seperti monosit, makrofag, neutrofil dan sel NK (Koga and Kawakami, 2018). Saat ini, IL-1 β diketahui memegang peran penting dalam terjadinya autoinflamasi. Jenis interleukin ini juga memicu peningkatan sitokin pro-inflamasi lain utamanya IL-6 dan TNF- α (Havnaer and Han, 2019). Terapi IL-1 inhibitor digunakan untuk menurunkan jumlah IL-1 β dalam menangani penyakit autoinflamasi.

Autoinflamasi dapat berimplikasi pada beberapa penyakit lain seperti penyakit neurodegeneratif, sindrom metabolik, serta penuaan (Cicarelli et al., 2013). Telah diketahui kerusakan fungsi mitokondria berkaitan dengan beberapa kondisi inflamasi akut dan kronik. Produksi ROS yang berlebihan pada saat terjadi kerusakan mitokondria memicu oksidasi membran lipid, protein serta mutase DNA mitokondria (mtDNA) yang selanjutnya menimbulkan kerusakan sel. Hal ini akan memicu produksi sitokin pro-inflamasi yang merupakan indikasi penyakit autoinflamasi (López-Armada et al., 2013; Riley and Tait, 2020).

Peningkatan kadar ROS dapat diatasi dengan proses autofagi sebagai jalur kompensasinya (Cedikova et al., 2016). Protein yang berperan dalam

proses autofagi mitokondria serta homeostatis mitokondria adalah TOM40 (*translocase outer membrane 40*) (Gottschalk *et al.*, 2016). Suatu penelitian menunjukkan bahwa penurunan ekspresi gen *tom40* menyebabkan disfungsi mitokondria (Xiao *et al.*, 2019). TOM40 berperan dalam proses autofagi dengan berinteraksi dengan *mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites* (MERCs) (Valverde *et al.*, 2019)

Faktor transkripsi NF- κ B yang berperan dalam inflamasi juga berkaitan dengan restriksi kalori. Restriksi kalori diperkirakan menekan aktivasi NF- κ B dan respon imun (Taniguchi and Karin, 2018). Gen yang berperan dalam proses restriksi kalori adalah gen *I'm not dead yet* (*indy*) yang homolog gen SLC13A2 pada manusia. Mutasi gen *indy* secara signifikan dapat meningkatkan *lifespan* dari lalat buah *Drosophila melanogaster* melalui proses restriksi kalori (Omelyanchuk *et al.*, 2015). Penurunan ekspresi *indy* dapat menurunkan jumlah ATP/ADP yang dapat memicu biogenesis mitokondria dan mencegah timbulnya peningkatan respon inflamasi (Rogers and Rogina, 2015; Huang *et al.*, 2019; Olivo-marston *et al.*, 2014).

Penyakit autoinflamasi dapat diamati pada hewan coba *D. melanogaster* mutan PGRP-LB. Jenis mutan ini memiliki masa hidup yang lebih singkat dikarenakan hilangnya protein PGRP-LB yang berfungsi sebagai regulator negatif dari jalur *Imd* pada *D. melanogaster* (Orlans *et al.*, 2021). Dengan tidak adanya protein tersebut, maka terjadi kondisi autoinflamasi yang hampir serupa pada manusia. Oleh karena itu, lalat

mutan PGRP-LB dapat menjadi model hewan coba untuk menggambarkan kondisi autoinflamasi pada manusia (Kounatidis *et al.*, 2017)

Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan senyawa kurkumin untuk mengetahui efek senyawa tersebut terhadap gen yang berpotensi berkaitan dengan penyakit autoinflamasi yakni gen *tom40* dan *indy*. Senyawa kurkumin telah diketahui memiliki banyak manfaat. Efek terapeutik kurkumin dapat dikaitkan dengan sifatnya sebagai antioksidan kuat (mencegah ROS dan menetralkan nitrit oksida (NO)), dapat mencegah dan mengatasi penyakit neurodegeneratif karena efek antioksidannya (Chongtham and Agrawal, 2016). Penelitian sebelumnya mendapatkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan *lifespan* lalat buah pada konsentrasi 0,01% b/b (Evangelakou *et al.*, 2019).

Berdasarkan pada publikasi sebelumnya terkait manfaat kurkumin dalam menangkal ROS serta peran gen *tom40* dan *indy* dalam menangani penyakit autoinflamasi, maka penelitian mengenai efek kurkumin terhadap gen tersebut perlu untuk dilakukan. Penelitian ini akan menggunakan *Drosophila melanogaster* sebagai hewan coba untuk mengetahui efek kurkumin terhadap ekspresi gen *tom40* dan *indy*. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini akan memberikan gambaran dasar mengenai peran kedua gen tersebut terkait mekanisme kerja kurkumin dalam proses autoinflamasi.

I.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek kurkumin terhadap ekspresi gen *tom40* dan *indy* pada model autoinflamasi *Drosophila melanogaster* ?

I.3 Tujuan

Untuk mengetahui efek kurkumin terhadap ekspresi gen *tom40* dan *indy* pada model autoinflamasi *Drosophila melanogaster*

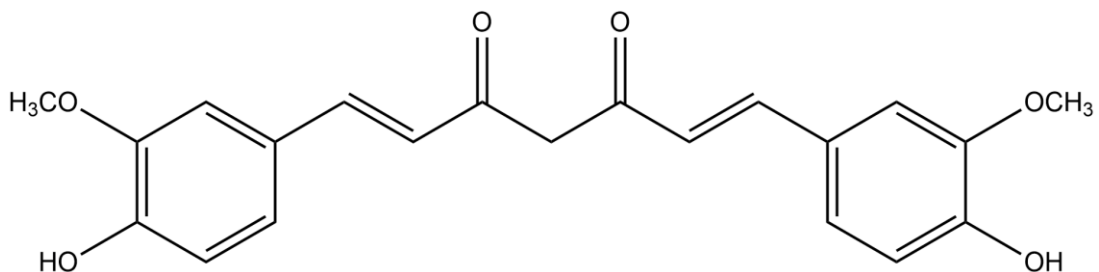
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Kurkumin

II.1.1 Deskripsi

Kurkumin adalah bagian golongan senyawa kurkuminoid yang menghasilkan pigmen warna kuning pada rimpang temulawak dan kunyit. Senyawa kurkumin termasuk senyawa fenolik yang larut pada pelarut organik seperti etanol dan asam asetat glasial serta kurang larut dalam air. Senyawa ini stabil pada suasana asam namun tidak stabil pada kondisi basa dan cahaya (Sharifi-Rad et al., 2020). Tiga komponen dari kurkuminoid semuanya berada dalam bentuk turunan disinnamoilmetan yaitu kurkumin {diferuloilmetan-1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-hepta-1,6-diene-3,5-dione}, demektoksikurkumin {p-hidroksi-n-namoil feruloil metan-1-(4-hidroksifenil)-7(4-hidroksi-3-metoksifenil-hepta-1,6-diene-3,5-dione)} dan bisdemektoksikurkumin-{p,p-dihidroksidisinnamoilferuloilmetan-1,7-bis-(4 hidroksifenil)-hepta-1,6-diene-3,5-dione} (Li, 2011).



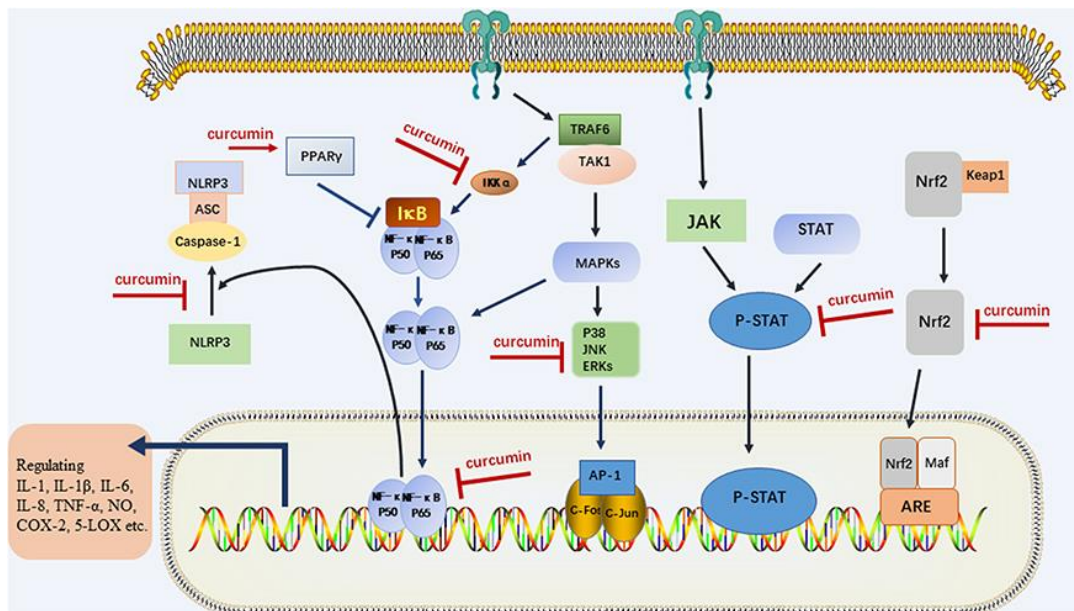
Gambar 1. Struktur Kurkumin

II.1.2 Indikasi

Kurkumin banyak digunakan secara tradisional untuk pengobatan penyakit kulit, penyakit yang berhubungan dengan pernafasan, saluran pencernaan, infeksi saluran kencing, bengkak, rematik, hepatitis, sakit mata, dan pengobatan wanita setelah melahirkan (Sharifi-Rad et al., 2020). Kadar kurkumin pada *Curcuma longa* adalah 3-5%. Dari hasil uji toksisitas, diketahui kurkumin aman dikonsumsi oleh manusia. Dosis kurkumin yang aman untuk dikonsumsi adalah 100 mg/hari sedangkan untuk tikus sekitar 5 g/hari (Abrahams et al., 2019)

Kurkumin telah ditemukan dapat memperbaiki gejala Alzheimer dalam beberapa model *Drosophila* AD. Kurkumin dengan 0,01% b/b menghasilkan peningkatan kesehatan dan masa hidup lalat buah, sementara itu kurkumin juga mengurangi neurotoksisitas dengan memicu konversi fibril amiloid dan pengurangan spesies oligomer beta amyloid yang diketahui berperan dalam pathogenesis (Evangelakou et al., 2019).

Polifenol termasuk kurkumin dapat menghambat produksi ROS XO (xanthine oksidase), MAO, dan NADPH oksidase (NOX). Kurkumin dapat berperan sebagai donor atom hidrogen yang kuat, dan gugus hidroksil fenolik, -diketo, dan metilen yang diperlukan untuk aktivitas antioksidan. Kurkumin lipofilik dapat mencegah hidrogen peroksida, radikal hidroksil, dan peroksinitrit serta mencegah peroksidasi lipid *in vivo* dan *in vitro* (Wang et al., 2020). Kurkumin juga mencegah apoptosis mitokondria yang diinduksi oleh iskemia/reperfusi pada tikus (Hussain et al., 2018)



Gambar 2. Mekanisme kerja kurkumin pada beberapa reseptor (Hussain *et al.*, 2018)

Beberapa senyawa polifenol seperti kurkumin secara langsung mengaktifkan reseptor koaktivator 1 α (PGC-1 α) yang diaktifkan melalui jalur protein kinase (AMPK)-situin-1 (Sirt1) yang diaktifkan-AMP. Polifenol juga meningkatkan ekspresi PGC-1 α melalui jalur sinyal mitokondria faktor transkripsi A (TFAM)/CREB dan jalur protein kinase/Nrf/ARE. Selain itu, polifenol mengaktifkan protein kinase dan faktor transkripsi lainnya serta meningkatkan ekspresi gen yang mengatur fungsi mitokondria dan homeostasis (Hussain *et al.*, 2018).

Kurkumin menurunkan regulasi jalur sinyal PI3K/Akt/mTOR dan mTOR/p70S6K sehingga mengaktifkan autofagi dan menunjukkan perlindungan saraf pada tikus transgenik ganda APP/presenilin dan pada

model seluler A53T Syn dari PD. Kurkumin memulihkan pengurangan penanda autofagi LC3/II oleh paraquat dan sel SH-SY5Y yang dilindungi (Naoi *et al.* 2019)

Aktifitas antiinflamasi kurkumin juga telah dibuktikan pada beberapa penelitian. Telah diketahui bahwa kurkumin menekan beberapa jalur inflamasi yang menyebabkan penghambatan aktivasi, maturasi dan produksi sitokin pada sel imun bawaan serta sel T. Kurkumin berperan sebagai molekul yang menargetkan beberapa persinyalan seperti NF- κ B, JAK/STAT, MAPK dan Wnt/ β catenin sehingga berpotensi sebagai agen terapi untuk inflamasi dan beberapa penyakit lain (Kahkhaie *et al.*, 2019)

Tetrahydrocurcumin, metabolit aktif dari kurkumin, dilaporkan memperpanjang umur tikus C67BL/6JHsd. Sejak itu, beberapa peneliti telah menunjukkan efek umur panjang kurkumin pada *Drosophila*. Suplementasi makanan dengan kurkumin memperpanjang *lifespan* lalat dengan perubahan ekspresi gen yang terkait dengan penuaan (Sharifi-Rad *et al.*, 2020). Selain itu, suplementasi diet larva dengan kurkumin memperpanjang umur lalat, dan efek perpanjangan umur suplementasi kurkumin dilaporkan untuk tahap kehidupan tertentu di *Drosophila* (Lee dan Min, 2019)

II.2 Autoinflamasi

II.2.1 Pengertian

Penyakit autoinflamasi adalah sekelompok gangguan yang disebabkan oleh disregulasi sistem imun bawaan. Penyakit ini hampir mirip dengan penyakit autoimun karena memiliki kesamaan disebabkan oleh

respons imun yang abnormal. Dalam kebanyakan kasus, penyakit autoinflamasi dipengaruhi oleh faktor genetik dengan adanya mutasi pada gen (Touitou dan Aksentijevich, 2019).

Penyakit autoinflamasi menunjukkan gambaran klinis utama berupa episode berulang beberapa lesi inflamasi yang dapat mempengaruhi kulit, persendian, tulang, mata, saluran pencernaan, dan sistem saraf, dalam hubungannya dengan tanda-tanda peradangan sistemik (Aksentijevich *et al.*, 2009). Penyakit autoinflamasi tidak hanya digambarkan sebagai sindrom demam episodik tetapi juga dengan periode peradangan akut yang melibatkan sistem imun bawaan (Caso *et al.*, 2018). Penyakit autoinflamasi dicirikan oleh episode inflamasi di situs rawan penyakit, tidak adanya sel T autoreaktif dan peningkatan tingkat autoantibodi (Ben-Chetrit E, *et al*, 2018)

II.2.2 Etiologi

Studi sebelumnya menjelaskan autofagi, epigenetik, disregulasi mikrobioma, dan autoantibodi kemungkinan berkontribusi sebagai patogenesis penyakit autoinflamasi. Sistem kekebalan bawaan bertindak sebagai garis pertahanan pertama dengan mengaktifkan PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) dan DAMP (*Damage Associated Molecular Pattern*). Autofagi adalah sistem degradasi intraseluler yang memberikan stresor seluler seperti protein yang mengalami *false folding*, organel yang rusak, atau mikroorganisme intraseluler ke dalam lisosom. Hal ini adalah hal yang penting dalam mekanisme sistem imun bawaan untuk mengatur peradangan, yang dapat ditunjukkan bahwa setelah stimulasi oleh

penginduksi, proses autofagi akan mencegah akumulasi mitokondria yang rusak dan menurunkan jumlah ROS. Baik ROS dan DNA mitokondria mengaktifkan NLRP3 inflammasome sehingga menyebabkan peradangan yang berlebihan. Pirin, yang juga dikenal sebagai TRIM20 berfungsi memicu persinyalan komponen autofagi. Diketahui bahwa mutasi pada gen MEFV mengubah kapasitas untuk autofagi langsung dari komponen inflammasome, yang mengarah ke peningkatan produksi IL-1 β (Krainer *et al.*, 2020)

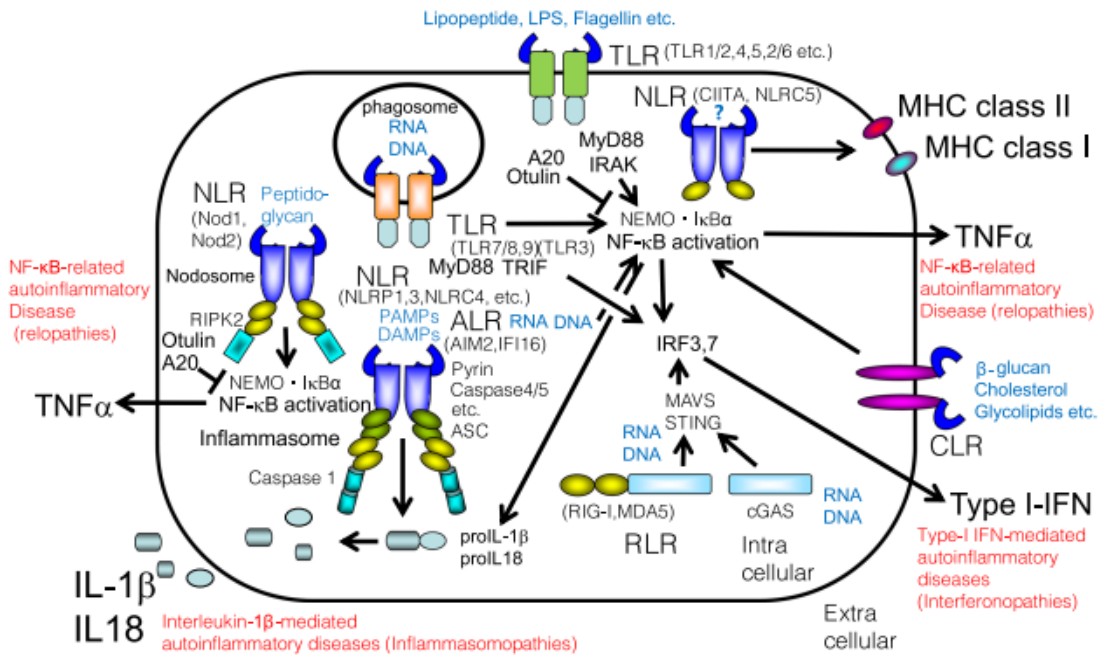
Hubungan penting lainnya antara kekebalan adaptif dan bawaan adalah IL-1 β . IL-1 β adalah salah satu molekul efektor utama yang memicu proses autoinflamasi dan juga bekerja pada sel efektor dari sistem imun adaptif, sel B dan T (Doria *et al.*, 2012). Saat ini dikenal istilah defisiensi antagonis reseptor interleukin-1 (DIRA) untuk menunjukkan penyakit autoinflamasi resesif autosomal yang disebabkan oleh mutasi gen sehingga mempengaruhi IL1RN. Tidak adanya antagonis reseptor interleukin-1 memungkinkan kerja interleukin-1 tanpa perlawanan, mengakibatkan peradangan sistemik yang dapat mengancam jiwa (Aksentijevich *et al.*, 2009; Krainer *et al.*, 2020).

Selanjutnya, mutasi pada banyak gen-gen ini dapat mengakibatkan overaktivitas bawaan sistem imun (autoinflammasi) dan sistem imun adaptif sistem (autoimun) dan disertai dengan ketidakefektifan respon imun (immunodefisiensi). Hal ini membuktikan fungsi spesifik sel dari enzim ini dalam regulasi jalur pensinyalan metabolisme dan kekebalan (Beck and Aksentijevich, 2019)

II.2.3 Patogenesis

Mekanisme patogenetik penting pada penyakit autoinflamasi adalah disregulasi langsung dan tidak langsung dari inflammasome, yang merupakan sitoplasma multiprotein kompleks yang relevan dengan imunitas bawaan dan respon inflamasi. Komponen utama inflammasom adalah famili pengikat nukleotida domain oligomerisasi (NOD)-like receptor (NLR). Ketika diaktifkan oleh pemicu pelepasan sitokin pro-inflamasi seperti rangsangan yang ditransmisikan oleh patogen atau sel yang rusak, NLR akan mendeteksi patogen atau kerusakan sel dan memulai pelepasan inflammasome. Selanjutnya, menginduksi aktivasi proteolitik dari caspases dan mengubah pro-interleukin (IL)-1 menjadi aktif (IL)-1, dimana hal ini menjadi penanda molekul inflamasi dan imunitas bawaan (El-Shebiny *et al.*, 2021)

Disregulasi pensinyalan NF- κ B berkaitan dengan sistem ubiquitinasi. Selain aktivasi konstitutif NF- κ B, kehilangan fungsi pada sistem regulasi NF- κ B yang dimediasi ubiquitin menyebabkan penyakit autoinflamasi (Moghaddas and Masters, 2015). Defisiensi IL-1RA menghasilkan pensinyalan IL-1 α , IL-1 β dan NF- κ B yang tidak terkontrol (Jesus and Goldbach-Mansky, 2014)



Gambar 3. Patogenesis penyakit autoinflamasi (Masumoto *et al.*, 2021)

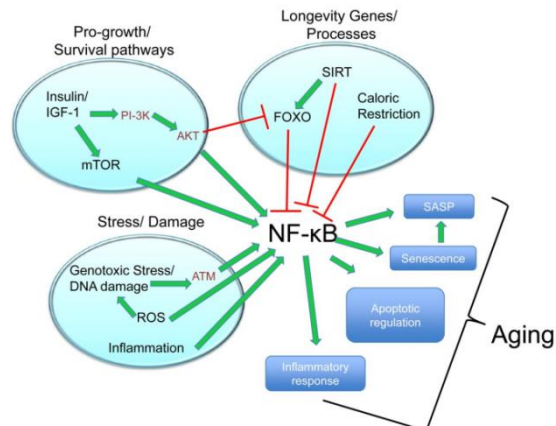
Gangguan keseimbangan di dalam jalur pensinyalan ini berkontribusi pada patogenesis dari penyakit autoinflamasi (Masumoto *et al.*, 2021). OTULIN adalah deubiquitinase yang sangat terkonservasi untuk menghidrolisis Rantai Ub terkait-met1 (linier) dari substrat terkonjugasi. OTULIN berfungsi sebagai regulator negatif dari jalur NF-κB kanonik dengan mendeubiquitinasi rakitan rantai ubiquitinasi linier kompleks (LUBAC) sehingga penurunan ekspresi protein ini diduga menjadi penyebab timbulnya kondisi autoinflamasi (Heger *et al.*, 2018)

II.2.4 Autoinflamasi dan kaitannya dengan masa hidup

Jalur pensinyalan NF-κB adalah salah satu dari beberapa jalur respons pensinyalan yang terlibat dalam penuaan, yang meliputi IGF-1, mTOR, SIRT1 dan p53. Sebuah studi lintas spesies, menggunakan pemetaan motif pada promotor gen yang diregulasi dengan perpanjangan

masa hidup yang berkaitan dengan penuaan, mengemukakan bahwa NF- κ B adalah faktor transkripsi yang paling terkait dengan penuaan. Selain itu, ekspresi berlebih dari salah satu dari dua subunit NF- κ B, c-rel dan RelA/p65, menginduksi penuaan dalam sel yang dikultur (Tilstra *et al.*, 2011)

Fenotipe sekretorik terkait penuaan spesifik telah dibuktikan dalam sel yang telah tua, yang terdiri dari peningkatan ekspresi IL-6, IL-8, IL-7, MCP-2, MIP-3, ICAM, II-1 α , dan II - β . Sebagian besar sitokin dan kemokin ini diatur secara transkripsi oleh NF- κ B. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa NF- κ B berperan menentukan masa hidup dari suatu organisme (Balistreri *et al.*, 2013).



Gambar 4. Kaitan antara penuaan dan autoinflamasi (Balistreri *et al.*, 2013)

II.3 *Drosophila melanogaster*

II.3.1 Klasifikasi

Kingdom	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta

Ordo	: Diptera
Family	: Drosophilidae
Genus	: <i>Drosophila</i>
Spesies	: <i>Drosophila melanogaster</i> (Verma and Singh, 2020)

II.3.2 Deskripsi

Tubuh *Drosophila* mirip dengan serangga lain, tersegmentasi. Beberapa segmen membentuk kepala, 3 segmen membentuk dada dan 8 segmen membentuk abdomen. Bagian kepala terdiri dari antena sedangkan kaki dan sayap muncul dari segmen toraks (Verma and Singh, 2020).

D. melanogaster memiliki cincin hitam melintang pada abdomen. Untuk membedakan jenis kelamin lalat, dapat dilihat adanya bercak hitam pada bagian abdomen lalat jantan yang tidak ada pada lalat betina. Lalat jantan juga memiliki *sex combs* (sisir kelamin), dan deretan bulu gelap di tarsus kaki pertama. Lalat jantan juga memiliki sekelompok rambut runcing yang disebut *claspers* yang mengelilingi anus dan alat kelamin. *Claspers* digunakan lalat jantan untuk menempel pada lalat betina saat kawin (Verma and Singh, 2020).

II.4 Gen

Gen adalah unit fungsional informasi genetik yang dikodekan dalam bentuk kode genetik yang diuraikan untuk mengekspresikan/menghasilkan produk berupa RNA atau protein. Seperti yang kita ketahui bahwa ekspresi gen adalah aliran informasi genetik dari DNA ke RNA ke protein. Yang dimulai dari pengambilan informasi dari DNA untuk mensintesis RNA dan

akhirnya protein. Ekspresi gen ini dalam bentuk yang paling sederhana diringkas dalam biologi molekuler sebagai dogma sentral yang merupakan aliran informasi dari DNA ke RNA ke protein dan juga terbalik dari RNA ke DNA (Kumar, 2014).

II.4.1 *tom40*

Kompleks TOM (*translocase of the outer membrane*) dibentuk oleh tujuh subunit dan bertugas mengimpor prekursor protein mitokondria ke dalam mitokondria (Colin *et al.*, 2009). Selama autofagi, phagophores tumbuh menjadi vesikel membran ganda yang disebut autophagosomes, tetapi mekanisme yang mendasarinya masih belum jelas. Atg2A berperan penting dalam ekspansi fagofor. Interaksi Atg2A-TOM40 bertanggung jawab untuk lokalisasi MAM dari Atg2A dan membutuhkan protein reseptor TOM70 (Tang *et al.*, 2019). Selain itu, penghambatan interaksi Atg2A-TOM40 atau Atg2A-Atg9A merusak ekspansi fagofor dan mengakumulasi vesikel Atg9A di sekitar struktur autophagi. Studi sebelumnya mengemukakan bahwa kompleks TOM70-TOM40 merekrut Atg2A ke MAM untuk transportasi lipid vesikular dan/atau non-vesikular ke fagofor yang berkembang untuk menumbuhkan ukuran autofagosom untuk fluks autofagik yang efisien (Tang *et al.*, 2019).

Disfungsi *tom40* telah dicatat pada penyakit Parkinson dan mungkin juga berhubungan dengan penyakit Huntington. Protein TOMM40 adalah saluran utama yang harus dilalui oleh protein dan peptida untuk mendukung fungsi

dinamis mitokondria, mengidentifikasi faktor patogen daripada yang mungkin dihasilkan melalui perubahan ekspresi mRNA (Roses *et al.* 2016)

Studi lain mengemukakan interaksi α -synuclein dengan TOM40 dan SAM50 sedangkan Bender *et al.* (2013) melaporkan penurunan kadar protein TOM40 pada sampel otak tengah manusia post-mortem dan pada model tikus transgenik α -synuclein. Selain itu, ekspresi berlebih *tom40* dalam model tikus transgenik α -synuclein mengakibatkan penurunan level α -synuclein (Franco-Iborra *et al.*, 2018)

Kompleks TOM awalnya mengangkut prekursor TOM40 melintasi membran luar. Kompleks SAM memasukkan prekursor TOM40 dari sisi IMS ke dalam OM dan mempromosikan perakitannya dengan protein TOM kecil (Grevel *et al.*, 2019). Kompleks TOM adalah portal masuk utama untuk sebagian besar protein mitokondria yang disintesis secara sitoplasmik dan TOM40 adalah subunit kunci dari kompleks tersebut, pori yang harus dilalui oleh sebagian besar protein impor. Kompleks TOM lengkap berisi tujuh subunit: TOM40, TOM22, dua reseptor proprotein, TOM20, dan TOM70, dan tiga protein yang lebih kecil, TOM5, TOM6 dan TOM7. TOM40 memegang peran penting dalam biogenesis mitokondria.

Pada *knock down C. elegans* TOMM40 juga menekan sekresi DAF-28/insulin. Hasil ini menunjukkan bahwa pengurangan kadar TOM40 menyebabkan disfungsi mitokondria, serta mengganggu proses yang sangat bergantung pada mitokondria yang sehat (Gottschalk, *et al.*, 2017)

II.4.2 *indy*

Regulasi proses metabolisme oleh gen *indy* (*I'm Not Dead Yet*) (SLC13A5/NaCT) diketahui melalui penelitian menggunakan *D.melanogaster* dan *C.elegans*. Menekan ekspresi *indy* pada kedua spesies ini memperpanjang masa hidup dengan mekanisme yang menyerupai pembatasan kalori, tanpa mengurangi asupan makanan. Dalam *D. melanogaster*, mutasi gen *indy* mengurangi kandungan lemak tubuh, protein seperti insulin dan produksi ROS. Studi selanjutnya menunjukkan bahwa *indy* mengkodekan transporter sitrat yang terletak di membran plasma sel (Willmes *et al.*, 2018)

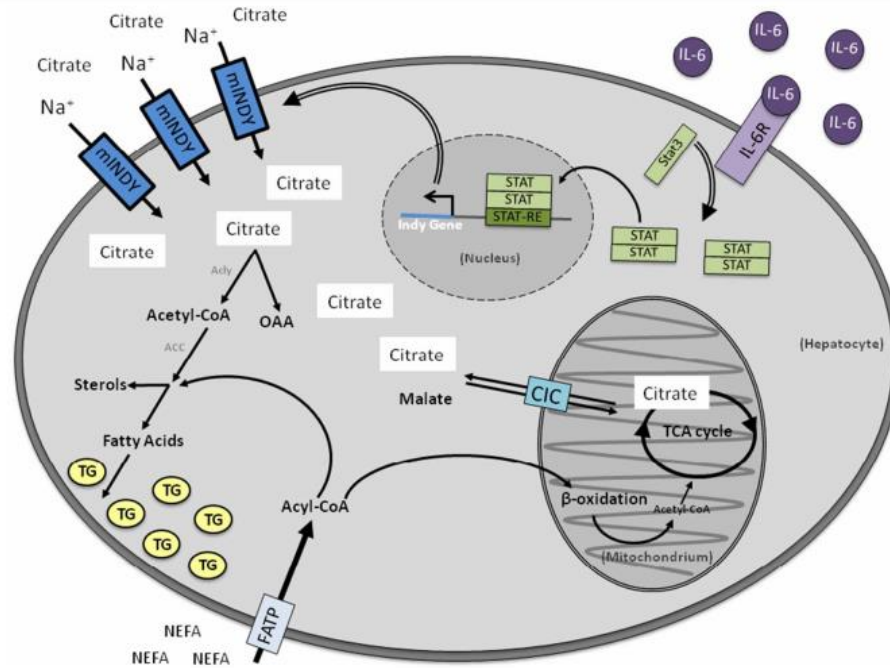
Lalat yang mengalami penurunan ekspresi gen *indy* tidak menunjukkan penurunan laju metabolisme dan tidak ada penurunan kecepatan terbang maksimal, geotaksis negatif, atau tingkat aktivitas selama 24 jam. Penurunan ekspresi *indy* dapat memperpanjang rentang hidup dengan mempengaruhi metabolisme perantara dan menciptakan keadaan metabolisme seperti pada restriksi kalori (Wang *et al.*, 2009)

Gen *indy* mengkodekan transporter trikarboksilat yang terlibat dalam reabsorpsi zat antara siklus Krebs, seperti sitrat, piruvat, dan α -ketoglutarat yang berfungsi transporter intermediet siklus Krebs. Studi pada oosit katak dan sel mamalia menunjukkan bahwa INDY memediasi fluks dikarboksilat dan sitrat dengan afinitas tinggi independen Na^+ , K^+ , dan Cl^- melintasi membran plasma (Inoue *et al.*, 2002; Knauf *et al.*, 2002). Studi lebih lanjut

telah menunjukkan bahwa INDY berfungsi sebagai penukar anion intermediet siklus Krebs dikarboksilat dan trikarboksilat (Knauf *et al.*, 2006)

Gen *indy* pada lalat paling banyak diekspresikan di usus, tubuh lemak, dan oenosit, semua tempat di mana metabolisme perantara berlangsung, menunjukkan perannya dalam metabolisme (von Loeffelholz *et al.*, 2017). Berdasarkan ekspresi *indy* dan peran dalam pengangkutan intermediet siklus Krebs, telah dihipotesiskan bahwa penurunan aktivitas *indy* menciptakan keadaan yang mirip dengan pembatasan kalori. Studi pada lalat dan tikus mendukung hipotesis ini terutama dengan menunjukkan kesamaan antara fisiologi lalat mutan *indy* dan tikus knockout *mindy* pada makanan berkalori tinggi dan lalat kontrol dan tikus pada restriksi kalori (Rogina and Helfand, 2013)

Menekan gen *indy* memberikan efek perpanjangan umur dengan cara restriksi kalori. Ekspresi mRNA *indy* pada usus *Drosophila* berubah sebagai respons terhadap penuaan dan nutrisi. Reduksi genetik ekspresi *indy* meningkatkan ekspresi regulator mitokondria spargel/dPGC-1 α , yang disertai dengan peningkatan biogenesis mitokondria dan pengurangan spesies oksigen reaktif (ROS). Studi genetik mengkonfirmasi bahwa dPGC-1 α memediasi efek regulasi INDY yang menunjukkan kemungkinan protein INDY merupakan regulator fisiologis yang memodulasi metabolisme intermediet sebagai respons terhadap perubahan ketersediaan nutrisi dan kebutuhan organisme dengan memodulasi dPGC-1 α (Rogers and Rogina, 2014)

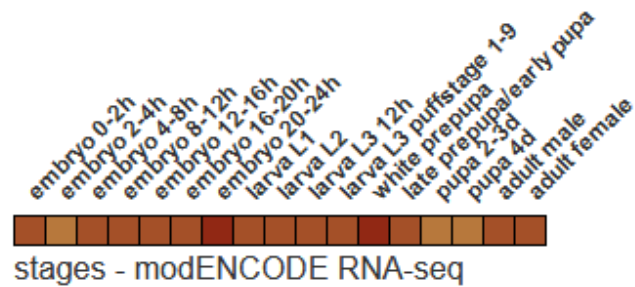


Gambar 5. Mekanisme kerja protein INDY dalam proses restriksi kalori (Rogers and Rogina, 2015)

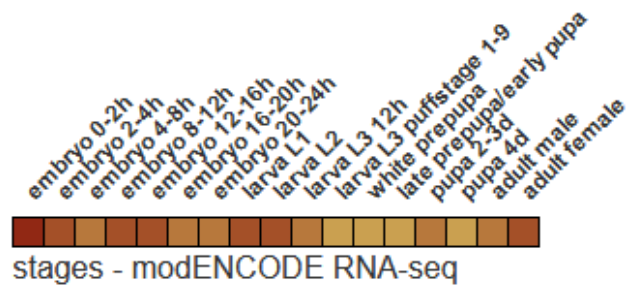
INDY berfungsi sebagai pengangkut sitrat selama metabolisme intermediet, sehingga aktivitas transpornya secara langsung mempengaruhi jalur *downstream* yang terkait dengan metabolisme sitrat. Ketika kadar sitrat tinggi, jalur glikolisis dan oksidasi asam lemak diatur ke bawah dan jalur sintesis asam lemak aktif. Sitrat sitoplasma dipecah menjadi oksaloasetat dan asetil-KoA oleh ATP-sitrat liase. Asetil-KoA dapat digunakan untuk biosintesis asam lemak, trigliserida, lipoprotein densitas rendah dan kolesterol. Selain itu, oksaloasetat sitoplasma dapat diubah menjadi malat dan diangkut oleh transporter malat ke mitokondria dan digunakan untuk produksi energi dalam siklus Krebs. Tingkat sitrat sitoplasma juga diatur oleh pembawa sitrat mitokondria (CIC, SLC25A1), yang mengangkut sitrat dari

mitokondria sehingga berkontribusi pada regulasi sitrat sitoplasma (Willmes *et al.*, 2018)

II.4.3 Data ekspresi gen pada *Drosophila melanogaster*



Gambar 6. Ekspresi gen *tom40*



Gambar 7. Ekspresi gen *indy*