

SKRIPSI

EFEK PEMBERIAN KAFEIN TERHADAP EKSPRESI GEN *sod1* DAN *sod2* PADA MODEL AUTOINFLAMASI *Drosophila melanogaster*

THE EFFECT OF CAFFEINE ON *sod1* AND *sod2* GENE EXPRESSION IN *Drosophila melanogaster* AUTOINFLAMMATORY MODEL

Disusun dan diajukan oleh

**ASBAH
N011 18 1047**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**EFEK PEMBERIAN KAFEIN TERHADAP EKSPRESI GEN *sod1* DAN
sod2 PADA MODEL AUTOINFLAMASI *Drosophila melanogaster***

**THE EFFECT OF CAFFEINE ON *sod1* AND *sod2* GENE EXPRESSION
IN *Drosophila melanogaster* AUTOINFLAMMATORY MODEL**

SKRIPSI

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

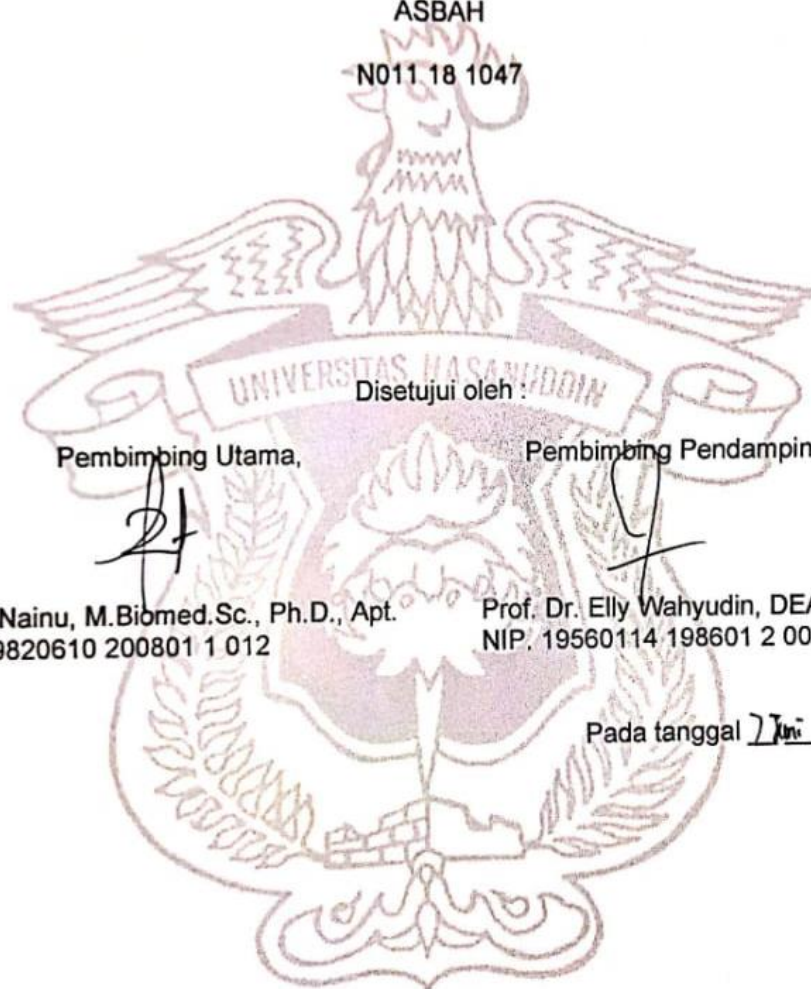
**ASBAH
N011 18 1047**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**EFEK PEMBERIAN KAFEIN TERHADAP EKSPRESI GEN *sod1* DAN
sod2 PADA MODEL AUTOINFLAMASI *Drosophila melanogaster***

ASBAH


N011 18 1047




Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


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


Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001

Pada tanggal 2 Juni 2022

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

EFEK PEMBERIAN KAFEIN TERHADAP EKSPRESI GEN *sod1* DAN *sod2* PADA MODEL AUTOINFLAMASI *Drosophila melanogaster*

THE EFFECT OF CAFFEINE ON *sod1* AND *sod2* GENE EXPRESSION IN *Drosophila melanogaster* AUTOINFLAMMATORY MODEL

Disusun dan diajukan oleh :

ASBAH
N011 18 1047

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin pada tanggal 7 Mei 2022 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

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

Pembimbing Pendamping,

Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001

Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Nurhasni Hasan, S.Si, M.Si, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Asbah
NIM : N011181047
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul "Efek Pemberian Kafein Terhadap Ekspresi Gen *sod1* dan *sod2* pada Model Autoinflamasi *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 gunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 7 Juni 2022

Yang Menyatakan



Asbah

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu wa ta'ala atas berkat, rahmat, dan petunjuk-Nya, sehingga skripsi ini dapat diselesaikan. Dalam pembuatan skripsi penulis tidak terlepas bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Untuk itu, penulis akan menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama dan dosen penasehat akademik yang telah membimbing, memberikan arahan dan motivasi, serta telah meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan masa studinya selama di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah membimbing, memberikan masukan serta saran dan telah meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt dan A. Anggriani, S.Si., M.Clin., Pharm., Apt. selaku tim penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan saran dan masukan yang membangun kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Dekan, Wakil Dekan, seluruh staf dosen dan pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas ilmu, bantuan, dan fasilitas yang diberikan kepada penulis selama menempuh studi hingga menyelesaikan skripsi ini.

5. Kedua orang tua penulis, Ibu Nurain dan Bapak La Ode Nasidi, serta saudari Asra selaku kakak penulis atas doa, perhatian, kasih sayang, dukungan baik secara moril maupun materil, dan selalu sabar dalam menghadapi penulis untuk mencapai kesuksesannya.
6. Teman-teman UFRG, terutama terutama Asfa, Mega, Sindy, Usri, Zaldy, Koko, Daff, kak Reski Amalia Rosa, dan kak Nur Rahma Rumata yang selalu memberikan ilmu, bantuan, dan selalu kompak dalam menyelesaikan penelitian ini.
7. Teman-teman Pondok Putri Amalia, Kak Khatim, Kak Dwi, Kak Lala, lin, Mega, Karin yang telah memberikan dukungan dan doa kepada penulis dalam menyusun skripsi ini.
8. Nurfadhilah Asfa dan Ummusaadah selaku teman penulis yang telah memberikan dukungan dan doa kepada penulis dalam menyusun skripsi ini.
9. Teman-teman angkatan 2018 (GEMF18ROZIL), yang telah memberikan banyak kenangan, dukungan, dan pengalaman yang tidak terlupakan selama menjadi mahasiswi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
10. Semua pihak yang telah membantu yang tidak sempat disebutkan namanya satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan masukan yang membangun dari berbagai pihak. Semoga karya ini dapat

bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya ilmu farmasi. Aamiin.

Makassar, 7 Juni 2022


Asbah

ABSTRAK

ASBAH. Efek Pemberian Kafein Terhadap Ekspresi Gen *sod1* dan *sod2* pada Model Autoinflamasi *Drosophila melanogaster*.

Autoinflamasi merupakan penyakit yang dapat disebabkan oleh ketidakseimbangan antara produksi ROS yang berlebihan dan penipisan antioksidan. Keadaan tersebut dapat diatasi dengan menggunakan antioksidan seperti kafein. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian kafein terhadap ekspresi gen *sod1* dan *sod2* pada model autoinflamasi *Drosophila melanogaster*. Pengujian dilakukan dengan melihat survival dari *D. melanogaster* jenis mutan PGRP-LB jantan serta ekspresi gen *sod1* dan *sod2* menggunakan metode RT-qPCR. Hasil uji fenotip menunjukkan bahwa pemberian kafein dengan konsentrasi 0.016 mM, 0.0032 mM dan 0.00064 mM dapat mempengaruhi masa hidup dari *Drosophila*. Pada uji analisis ekspresi gen, pemberian kafein dengan konsentrasi 0,016 mM dan 0,0032 mM dapat menginduksi ekspresi gen *sod1* secara signifikan, namun tidak pada ekspresi gen *sod2*. Kesimpulan pada penelitian ini yaitu kafein dapat memberikan efek pada survival *Drosophila* dan berpengaruh terhadap ekspresi gen antioksidan endogen *sod1* dan tidak pada ekspresi gen *sod2*.

Kata Kunci : Kafein, Autoinflamasi, *Drosophila melanogaster*, *sod1*, *sod2*.

ABSTRACT

ASBAH. The Effect of Caffeine on *sod1* and *sod2* Gene Expression in *Drosophila melanogaster* Autoinflammatory.

Autoinflammation is a disease that can be caused by an imbalance between excessive ROS production and antioxidant depletion. This situation can be overcome by using antioxidants such as caffeine. This study aims to determine the effect of caffeine on the expression of *sod1* and *sod2* genes in the *Drosophila melanogaster* autoinflammatory model. The test was carried out by looking at the survival of the *D. melanogaster* using male PGRP-LB mutant and the gene expression of the *sod1* and *sod2* using the RT-qPCR method. The results of the phenotypic test showed that treatment of caffeine with concentrations of 0.016 mM, 0.0032 mM, and 0.00064 mM could affect to life span of *Drosophila*. In gene expression analysis test that is treated caffeine with a concentration of 0.016 mM and 0.0032 mM can induce the expression of the *sod1* gene significantly, but not the expression of the *sod2* gene. This study concludes that caffeine can have an effect on *Drosophila*'s survival and affect to expression of the endogenous antioxidant gene *sod1* and not on the expression of the *sod2* gene.

Keywords: Caffeine, Autoinflammatory, *Drosophila melanogaster*, *sod1*, *sod2*.

DAFTAR ISI

UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	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. Autoinflamasi	4
II.2. Stres Oksidatif dan Antioksidan Endogen	6
II.3. Kafein	8
II.4. <i>Drosophila melanogaster</i>	9
II.5. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	13
BAB III METODE PENELITIAN	16
III.1. Alat dan Bahan	16
III.2. Metode Kerja	16

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	22
IV.1. Pengamatan Uji Survival <i>Drosophila melanogaster</i>	23
IV.2. Pemeriksaan Analisis Ekspresi Gen Antioksidan Endogen pada <i>Drosophila melanogaster</i>	24
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	27
V.1. Kesimpulan	27
V.2. Saran	27
DAFTAR PUSTAKA	28
LAMPIRAN	32

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Sekuens primer masing-masing gen	20
2. Data hasil uji survival	35
3. Hasil <i>one-way anova</i> ekspresi gen <i>sod1</i>	36
4. Hasil uji lanjutan <i>dunnett</i> ekspresi gen <i>sod1</i>	36
5. Hasil <i>one-way anova</i> ekspresi gen <i>sod2</i>	36
6. Hasil uji lanjutan <i>dunnett</i> ekspresi gen <i>sod2</i>	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Mekanisme aktivasi NF-kB oleh ROS	5
2. Stres oksidatif dan inflamasi: ketidakseimbangan antioksidan dan radikal bebas	6
3. Peran dan letak enzim superoksida dismutase	8
4. Rumus struktur kafein	9
5. Mekanisme protein PGRP-LB dalam mendegradasi peptidoglikan	11
6. Siklus hidup <i>D. melanogaster</i>	12
7. Level ekspresi gen <i>sod1</i> pada <i>D. melanogaster</i>	12
8. Level ekspresi gen <i>sod2</i> pada <i>D. melanogaster</i>	13
9. Prinsip kerja <i>reverse transcription quantitative real-time PCR</i> (RT-qPCR)	14
10. Grafik survival <i>D. melanogaster</i> dengan pemberian kafein	23
11. Grafik ekspresi gen <i>sod1</i>	24
12. Grafik ekspresi gen <i>sod2</i>	25
13. Pembuatan pakan	37
14. Pemisahan lalat jantan	37
15. Uji survival	37
16. Isolasi RNA	37
17. <i>Running real time PCR</i>	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Preparasi Sampel	32
2. Penyiapan Hewan Uji	32
3. Pembuatan Pakan	32
4. Penyiapan Pakan Pengujian	33
5. Skema Kerja Uji Survival	33
6. Penyiapan Sampel RNA	34
7. Analisis Ekspresi Gen	34
8. Hasil Uji Survival	35
9. Data Statistik	36
10. Gambar Penelitian	37

DAFTAR SINGKATAN

D. melanogaster = *Drosophila melanogaster*

IL = Interleukin

AMP = *Antimicrobial Peptide*

PGRP = *Peptidoglycan Recognition Protein*

NF- κ B = *Nuclear Factor KappaB*

ROS = *Reactive Oxygen Species*

SOD = superoksida dismutase

RT-qPCR = *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Autoinflamasi yaitu penyakit yang disebabkan oleh disfungsi utama dari sistem kekebalan tubuh bawaan. Salah satu penyebab utama autoinflamasi yaitu adanya mutasi pada regulator dari sitokin proinflamasi, utamanya (IL)-1 β sehingga memicu produksi sitokin yang berlebihan (Touitou and Koné-Paut, 2008; Kastner *et al.*, 2010). Sitokin diproduksi oleh hampir semua sel untuk mengatur dan mempengaruhi respon imun misalnya inflamasi. Inflamasi dapat terjadi akibat dari produksi sitokin proinflamasi yang berlebihan (Kany *et al.*, 2019).

Sitokin proinflamasi seperti misalnya (IL)-1 dapat menginduksi produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Khansari *et al.*, 2009). Kadar ROS yang berlebihan dapat dicegah dengan antioksidan, baik antioksidan endogen maupun antioksidan yang diperoleh secara eksternal (Liu *et al.*, 2018). Enzim antioksidan utama yang berperan langsung dalam netralisasi ROS yaitu *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), *glutathione peroxidase* (GPx) and *glutathione reductase* (GRx). SOD merupakan enzim antioksidan yang baik dalam melawan radikal bebas dengan mengkatalisis dismutase radikal anion superoksida (O₂⁻) menjadi hidrogen peroksida (H₂O₂) (Pham-Huy *et al.*, 2008; Landis and Tower, 2005). Oleh karena itu,

SOD dapat berperan dalam menangani penyakit autoinflamasi yang disebabkan oleh peningkatan kadar ROS (Yasui and Baba, 2006).

Kafein merupakan salah satu senyawa yang terdapat dalam minuman yang paling populer dan banyak dikonsumsi di dunia. Kafein dapat ditemukan di kopi, daun teh, guaranabery dan biji kakao. Selain itu, kafein juga dapat ditemukan dalam minuman energi maupun obat-obatan (Rodak *et al.*, 2021). Kafein dapat mengurangi stress oksidatif dan dapat menghentikan *cross-linking* antara DNA dan ROS (Liu *et al.*, 2019). Enzim antioksidan SOD yang terdapat pada manusia memiliki kesamaan dengan yang terdapat pada *Drosophila melanogaster* (Mutsuddi and Mukherjee, 2019).

Lalat buah *D. melanogaster* memiliki kemiripan genetik sebesar 75% dengan manusia (Mutsuddi and Mukherjee, 2019). Selain itu, keuntungan *D. melanogaster* jika digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian yaitu biaya pemeliharaan yang rendah, memiliki tingkat reproduksi yang tinggi, waktu generasi yang singkat yakni 10 hari pada suhu 25° C, memiliki jangka waktu hidup yang pendek sehingga memudahkan dalam proses penelitian dan juga dapat dibuat dalam bentuk mutan (Lee and Min, 2019; Nainu, 2018). Salah satu jenis mutan dari *D. melanogaster* yaitu mutan PGRP-LB yang mengalami hiperaktifasi jalur NF- κ B sehingga terjadi peningkatan AMPs akibat kehilangan protein PGRP LB. Protein PGRP LB berfungsi sebagai regulator negatif yang menghambat overaktivasi sistem imun

dengan cara mendegradasi peptidoglikan (Paredes *et al.*, 2011; Iatsenko *et al.*, 2016).

Terkait dengan peran antioksidan endogen dalam mencegah stress oksidatif, maka penelitian ini akan dilakukan untuk melihat efek kafein terhadap ekspresi gen antioksidan endogen *sod1* dan *sod2* pada model autoinflamasi *Drosophila melanogaster*.

I.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek pemberian kafein terhadap ekspresi gen *sod1* dan *sod2* pada model penyakit autoinflamasi *Drosophila melanogaster*?

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui efek pemberian kafein terhadap ekspresi gen *sod1* dan *sod2* pada model penyakit autoinflamasi *Drosophila melanogaster*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Autoinflamasi

II.1.1 Definisi Autoinflamasi

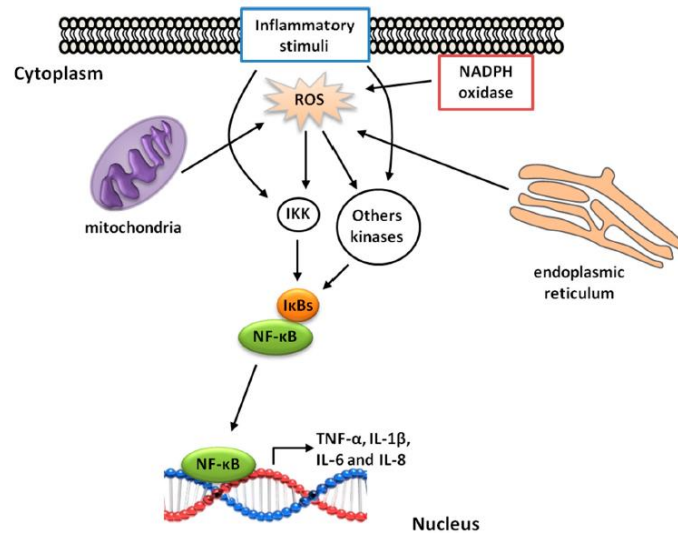
Inflamasi atau peradangan merupakan mekanisme perlindungan yang dilakukan oleh jaringan terhadap antigen endogen dan eksogen serta proses untuk penyembuhan jaringan yang rusak (Khansari *et al.*, 2009; Tartej and Kanneganti, 2020). Autoinflamasi merupakan penyakit yang terjadi akibat dari disfungsi utama dari sistem kekebalan tubuh bawaan. Sistem kekebalan tubuh bawaan merupakan garis pertahanan pertama dalam melawan mikroba dan kerusakan sel (Tartej and Kanneganti, 2020). Penyakit autoinflamasi merupakan penyakit yang ditandai dengan peradangan sistemik berulang yang biasanya disertai demam yang mungkin terkait dengan ruam kulit, serositis, limfadenopati maupun radang sendi (Matos *et al.*, 2009).

Autoinflamasi awalnya hanya mengacu pada gangguan demam turunan termasuk *familial Mediterranean fever* (FMF), *TNF receptor-associated periodic syndrome* (TRAPS), dan *hyper-IgD syndrome*. Seiring waktu, banyak penyakit lain yang tidak termasuk dalam gangguan demam ditambahkan ke kelompok penyakit autoinflamasi. Penyakit autoinflamasi dapat diklasifikasikan berdasarkan cara pewarisan yakni monogenik dan poligenik. Penyakit autoinflamasi monogenik adalah penyakit yang

disebabkan oleh cacat gen tunggal, dimana penyakit ini termasuk dalam sebagian besar penyakit autoinflamasi klasik. Sedangkan penyakit autoinflamasi poligenik memiliki pola pewarisan yang lebih kompleks seperti penyakit Behçet, penyakit Crohn, asam urat, aterosklerosis dan diabetes tipe 2 (Hoffman, 2009; Meier-Schiesser and French, 2021).

II.1.2 Mekanisme/Patofisiologi

NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang berperan penting dalam mengatur respon imun, proliferasi sel, apoptosis dan perkembangan. *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menginduksi aktivasi dari NF- κ B melalui jalur I κ B kinase (IKK) (Gloire *et al.*, 2006).



Gambar 1. Mekanisme aktivasi NF- κ B oleh ROS (Minatel *et al.*, 2016)

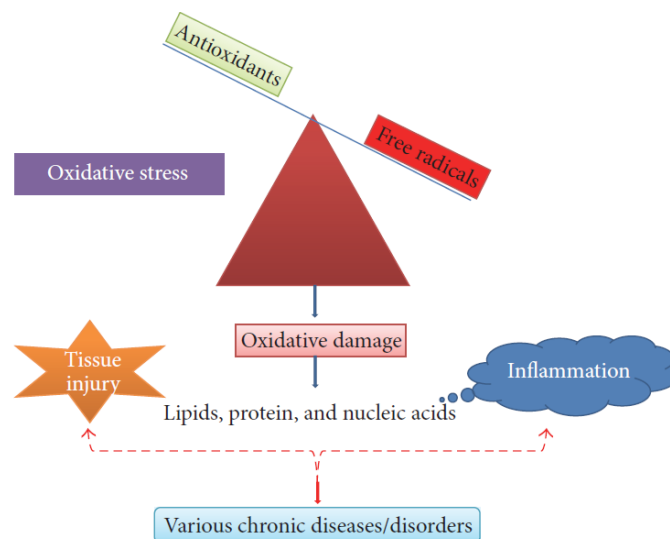
NF- κ B dapat diaktifkan oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan di mitokondria, oksidasi NADPH, dan retikulum endoplasma. NF- κ B kemudian berpindah ke nukleus dan menginduksi transkripsi gen target

seperti TNF- α , IL-1 β , IL-6 dan IL-8 yang merupakan sitokin proinflamasi (Minatel *et al.*, 2016).

II.2 Stress Oksidatif dan Antioksidan Endogen

II.2.1 Stres Oksidatif

Stres oksidatif merupakan keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan antara produksi dan eliminasi dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga terjadi peningkatan kadar ROS yang berlebihan dan tidak dapat dilawan oleh aksi antioksidan (Pisoschi and Pop, 2015; Lee and Song, 2021).



Gambar 2. Stress oksidatif dan inflamasi: ketidakseimbangan antioksidan dan radikal bebas (Arulselvan *et al.*, 2016).

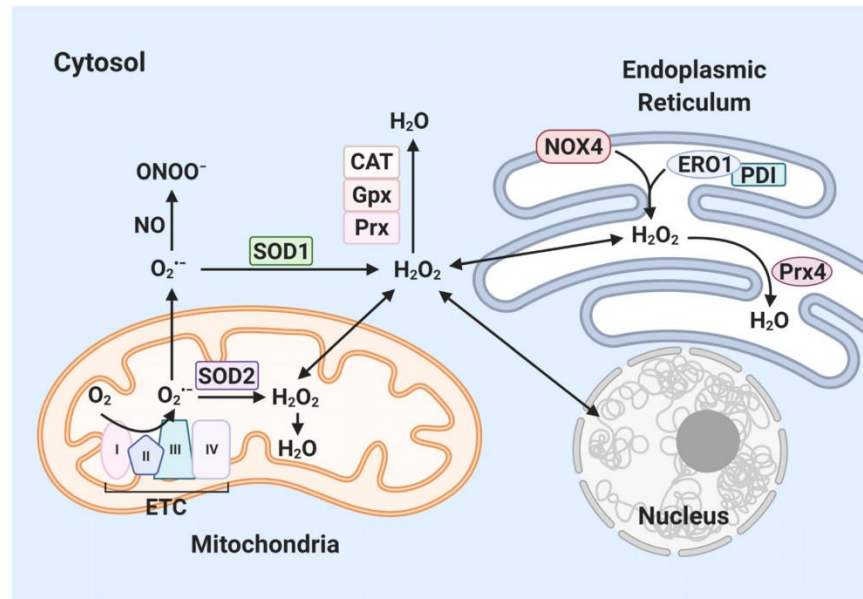
Pada kondisi tubuh yang normal dan sehat terjadi keseimbangan antara pembentukan ROS dan mekanisme pertahanan antioksidan endogen. Namun, jika keseimbangan ini terganggu maka akan menyebabkan stress oksidatif. Kondisi stress oksidatif inilah yang akan menyebabkan kerusakan pada biomolekul seperti DNA, protein, membran

lipid serta dapat menyebabkan kematian sel dan dapat menyebabkan inflamasi (Arulselvan *et al.*, 2016). Jenis ROS yang umum diketahui yaitu superoksida (O_2^-) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikal superoksida bersifat sangat reaktif namun memiliki waktu paruh yang sangat singkat. Disamping itu, H_2O_2 memiliki tingkat reaktivitas yang lebih rendah dan memungkinkan molekul untuk masuk ke inti sel. Oleh karena itu, H_2O_2 sebenarnya lebih merusak DNA dibandingkan jenis radikal bebas lainnya (Tsang *et al.*, 2014).

II.2.2 Antioksidan Endogen

Antioksidan endogen dapat berfungsi dalam melawan radikal bebas di dalam tubuh. Jika terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan endogen dan kadar radikal bebas dalam tubuh maka diperlukan antioksidan eksogen atau antioksidan yang diperoleh dari luar tubuh, seperti misalnya makanan (Simanjuntak and Zulham, 2020).

Fungsi antioksidan yaitu menetralkan kelebihan radikal bebas, melindungi sel dari efek toksik, dan berkontribusi dalam mencegah penyakit. Enzim antioksidan utama yang berperan penting dalam menetralkan ROS yaitu superoksida dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroksidase (GPx) dan glutathion reductase (GRx). SOD merupakan enzim antioksidan sebagai pertahanan utama dalam melawan radikal bebas dengan cara mengkatalisis dismutase anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) menjadi oksigen (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Pham-Huy *et al.*, 2008; Weydert and Cullen, 2010).

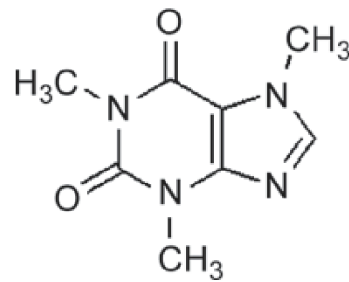


Gambar 3. Peran dan letak enzim superoksida dismutase (Lee and Song, 2021).

Dalam sel eukariotik, enzim antioksidan superoksida dismutase dibedakan menjadi 3 yaitu *sod1*, *sod2* dan *sod3*. *sod1* atau CuZnSOD terletak di sitoplasma (sitosol) serta nukleus dan sekitar 3% protein *sod1* ditemukan di ruang antarmembran mitokondria. *sod2* atau MnSOD terletak di mitokondria, sedangkan *sod3* merupakan enzim ekstraseluler yang terdapat pada beberapa jaringan (Tsang et al., 2014; Weydert and Cullen, 2010).

II.3 Kafein

Kafein atau 1,3,7-tri-methylxanthine merupakan kelompok methylxanthine yang memiliki sifat antioksidan (Alipour Jenagrad *et al.*, 2018; Yashin *et al.*, 2013; Tewabe Gebeyehu, 2015).



Gambar 4. Rumus struktur kafein (Mohammed and Al-Bayati, 2009)

Kafein merupakan salah satu minuman yang paling populer dan banyak dikonsumsi di dunia. Konsumsi kafein berdasarkan semua sumber pencarian yaitu 76 mg/orang/hari, di Amerika Serikat dan Kanada kira-kira 210-238 mg/orang/hari dan lebih dari 400 mg/orang/hari di Swedia dan Finlandia. Berdasarkan data pada tahun 2020-2021 konsumsi kopi sekitar 60 kg diseluruh dunia (Rodak *et al.*, 2021).

Kafein dapat berfungsi sebagai antioksidan yang dapat mengurangi radikal bebas dan meningkatkan kadar superoksida dismutase (SOD). Kafein juga dapat menghentikan *cross-linking* dari DNA dan mengurangi stress oksidatif (Liu *et al.*, 2019).

II.4 *Drosophila melanogaster*

II.4.1 Deskripsi *Drosophila melanogaster*

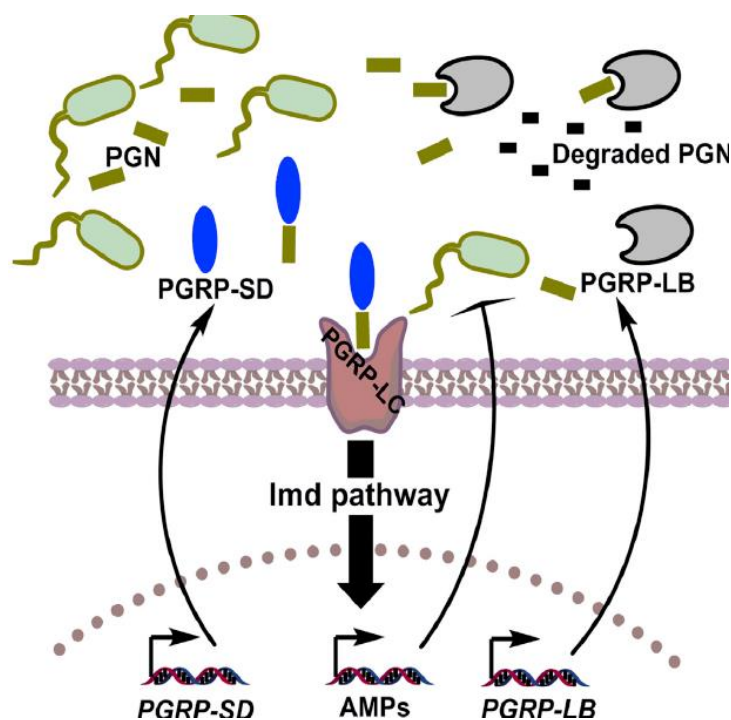
Penggunaan lalat buah (*D. melanogaster*) dalam ilmu biologi modern telah lama dilakukan, yakni sekitar 100 tahun. *Drosophila melanogaster* merupakan hewan jenis invertebrata atau hewan yang tidak bertulang belakang. Hewan ini memiliki ukuran tubuh yang kecil yaitu sekitar 3 mm dan memiliki genom yang sangat sederhana yakni hanya memiliki 4 kromosom. Namun demikian, *D. melanogaster* memiliki kurang lebih 14.000

gen yang dikodekan pada 4 kromosom tersebut dan memiliki kemiripan genetik sebesar 75% dengan manusia (Pandey and Nichols, 2011).

D. melanogaster memiliki banyak keuntungan jika digunakan dalam penelitian yaitu harganya yang relatif murah dan mudah dalam proses pemeliharaan (*maintenance*), tingkat reproduksi yang tinggi, masa hidup yang lebih singkat yakni sekitar 2-3 bulan, tidak memerlukan kode etik, dan dapat dibuat dalam bentuk mutan/transgenik (Nainu, 2018).

II.4.2 Mutan PGRP-LB *Drosophila melanogaster*

Salah satu jenis mutan dari lalat buah (*D. melanogaster*) yaitu mutan PGRP-LB atau lalat yang tidak memiliki protein PGRP-LB. PGRP atau *peptidoglycan recognition proteins* merupakan kunci dalam mengatur respon imun pada serangga (Paredes *et al.*, 2011). Protein PGRP-LB berfungsi sebagai regulator negatif pada jalur IMD/NF- κ B yang menghambat overaktivasi sistem imun dengan cara mendegradasi peptidoglikan (Iatsenko *et al.*, 2016).



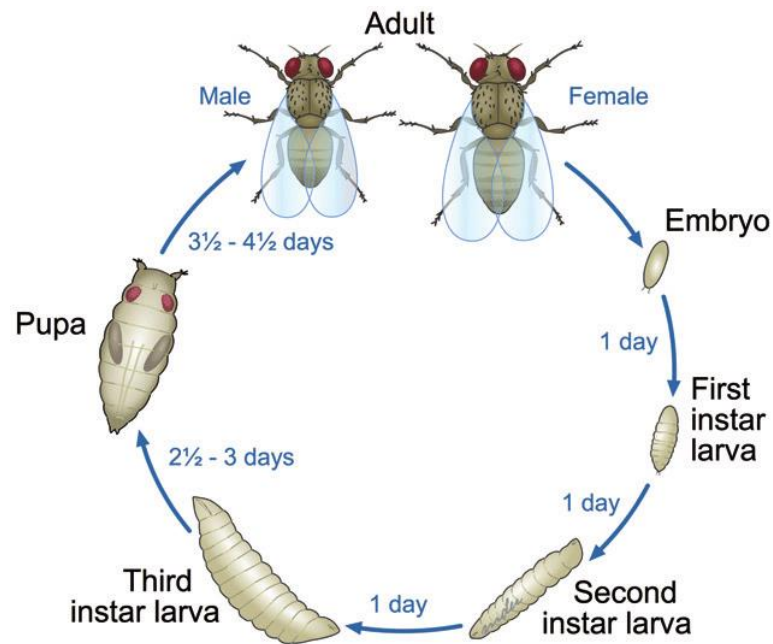
Gambar 5. mekanisme protein PGRP-LB dalam mendegradasi peptidoglikan

(Iatsenko *et al.*, 2016)

Peptidoglikan pada *D. melanogaster* dapat berasal dari flora normal usus yang telah mati. Dimana, flora normal yang telah mati tersebut dapat keluar dari usus dan masuk ke dalam saluran sitemik sehingga menginduksi sistem imun (Charroux *et al.*, 2018).

II.4.3 Siklus Hidup *D. melanogaster*

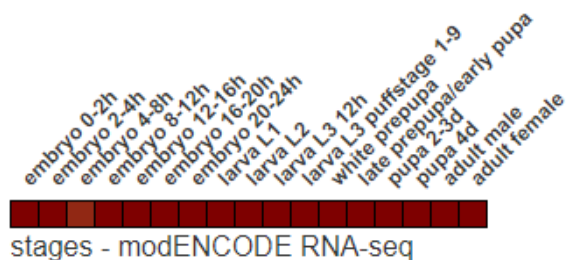
Siklus hidup *D. melanogaster* relatif cepat dan hanya membutuhkan waktu sekitar 10-12 hari pada suhu 25°C. Perkembangan *D. melanogaster* dibagi menjadi beberapa tahap yaitu embrio, larva (larva instar pertama, larva instar kedua dan larva instar ketiga), pupa, dan kemudian menjadi lalat dewasa (Ong *et al.*, 2015).



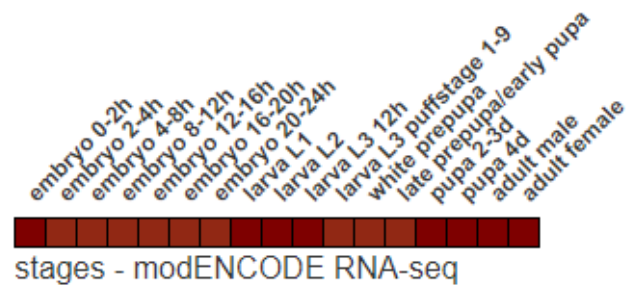
Gambar 6. Siklus hidup *D. melanogaster* (Ong *et al.*, 2015)

Proses metamorfosis dari *D. melanogaster* berlangsung dengan cepat. Selama kurun waktu 1 hari embrio akan berubah menjadi larva instar pertama. Dan kemudian berubah menjadi larva instar kedua dan larva instar ketiga berturut-turut selama 1 dan 2 hari. Selanjutnya ketika sudah menjadi larva instar ketiga, selama 2,5 hingga 3 hari kemudian akan berubah menjadi pupa yang kemudian menjadi lalat dewasa setelah 3,5 hingga 4,5 hari (Ong *et al.*, 2015).

II.4.4 Level Ekspresi Gen *sod1* dan *sod2* pada *D. melanogaster*



Gambar 7. Level ekspresi *sod1* pada *D. melanogaster* (FlyBase)

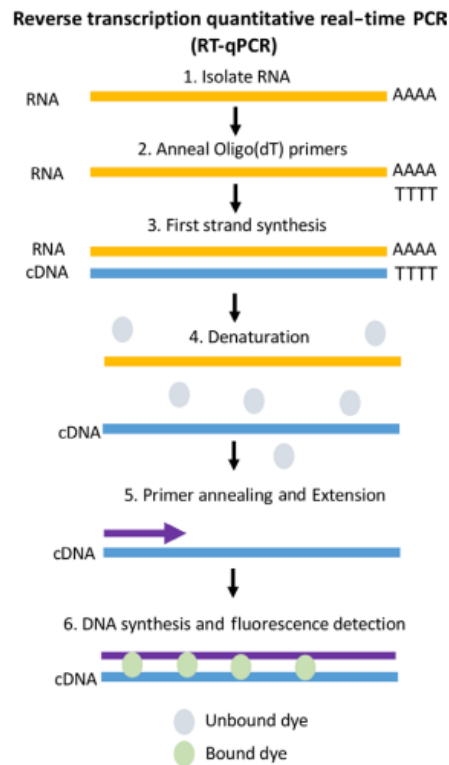


Gambar 8. Level ekspresi *sod2* *D. melanogaster* (FlyBase)

II.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) pertama kali ditemukan oleh Mullis pada tahun 1984. Prinsip PCR didasarkan pada penggunaan DNA polimerase yang merupakan enzim yang berfungsi dalam proses pengamplifikasian molekul DNA (S.A. Deepak *et al.*, 2007; Kralik and Ricchi, 2017)

Salah satu metode PCR yang digunakan saat ini yaitu *reverse transcription quantitative real-time PCR* (RT-qPCR) yang merupakan gabungan dari RT-PCR dan qPCR. Prinsip kerja dari RT-qPCR yaitu mengubah RNA menjadi cDNA oleh enzim *reverse transcriptase*. cDNA untai ganda yang dihasilkan kemudian diamplifikasi oleh DNA polimerase sehingga dihasilkan cDNA untai ganda (Adams, 2020).



**Gambar 9. Prinsip kerja *reverse transcription quantitative real-time PCR*
(RT-qPCR) (Adams, 2020)**

Proses PCR terdiri dari 3 tahap yaitu denaturasi, *annealing* dan *extension*: (Rahman *et al.*, 2013)

- Denaturasi merupakan proses untuk mengubah untai DNA ganda menjadi untai DNA tunggal dengan memecah ikatan hidrogen yang menghubungkan dua untai DNA. Proses ini terjadi pada suhu 94-96°C.
- Annealing* merupakan proses penempelan primer ke untai DNA tunggal. Suhu pada tahap ini bergantung pada jenis primer yang digunakan berkisar antara 40-60°C.

- c. *Extension* atau tahap pemanjangan rantai dimana primer dapat diperpanjang oleh DNA polymerase sepanjang untai DNA sehingga mencapai seluruh panjang dari DNA sasaran. Suhu pada tahap ini bergantung pada DNA polymerase.