

SKRIPSI

**UJI EFEK ASPIRIN TERHADAP EKSPRESI GEN *srl*
DAN *pepck* PADA *Drosophila melanogaster***

**EFFECT OF ASPIRIN ON THE EXPRESSION OF *srl*
AND *pepck* GENES IN *Drosophila melanogaster***

**DHANDY KASHAR PRATAMA
N011 17 1025**



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

**UJI EFEK ASPIRIN TERHADAP EKSPRESI GEN *Srl* DAN *Pepck* PADA
*Drosophila melanogaster***

**EFFECT OF ASPIRIN ON THE EXPRESSION OF *srl* AND *pepck*
GENES IN *Drosophila melanogaster***

SKRIPSI

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

DHANDY KASHAR PRATAMA

N011 17 1025

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

UJI EFEK ASPIRIN TERHADAP EKSPRESI GEN *srl* DAN *pepck* PADA
Drosophila melanogaster

DHANDY KASHAR PRATAMA

N011 17 1025

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,



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

Pembimbing Pendamping



Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt.
NIP. 195601141986012001

Pada tanggal 2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**UJI EFEK ASPIRIN TERHADAP EKSPRESI GEN *srl* DAN *pepck* PADA
*Drosophila melanogaster***

Disusun dan diajukan oleh


**DHANDY KASHAR PRATAMA
N011 17 1025**


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

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping


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


Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt.
NIP. 195601141986012001

Plt. Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt.
NIP. 19670319 199203 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Dhandy Kashar Pratama
NIM : N011171025
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul “Uji Efek Aspirin Terhadap Ekspresi Gen *srl* Dan *pepck* 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, 2021

Yang Menyatakan





Dhandy Kashar Pratama
N011171025

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur senantiasa penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya yang telah memberikan kesehatan dan kesempatan kepada penulis, sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.

Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan berbagai pihak, untuk itu penulis menyampaikan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama yang dengan ikhlas membimbing, memberi arahan serta memotivasi kepada penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt., selaku pembimbing pendamping atas segala bimbingan dan arahan serta masukan dan saran kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
3. Ibu Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt., dan Bapak Aminullah S.Si, M.Pharm.Sc., Apt., selaku tim penguji yang telah banyak memberikan saran agar hasil penelitian yang didapatkan lebih baik.

4. Dekan, para Wakil Dekan, serta seluruh staf dosen dan pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang selalu membantu dalam memberikan fasilitas, ilmu, pelayanan administrasi serta pendidikan kepada penulis hingga dapat menunjang dalam penyelesaian skripsi ini.
5. Laboran laboratorium Biofarmasi dan laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Ibu Syamsiah, ST dan Ibu Dewi Primayanti Laela S.Si., yang telah membantu dalam memberikan fasilitas serta berbagai kebutuhan selama penelitian.
6. Orang tua tercinta, Ayahanda Kaswatang, Ibunda Hariani, Adik Elza Kashar Dwiutami dan keluarga yang telah membantu memberikan semangat, kasih sayang, dukungan moral dan spiritual serta senantiasa mendoakan yang terbaik demi kelancaran dan kesuksesan penulis dalam menyelesaikan studi.
7. Saudari Hamita Esa Putri yang telah menemani, mendukung dan memberikan semangat selama proses perkuliahan, penelitian, dan penyusunan skripsi.
8. Teman-teman tim penelitian Unhas *Fly Research Group* (UFRG) yang telah mendukung dan membantu penulis dalam belajar dan penyusunan skripsi.
9. Teman-teman terdekat, Muhammad Azhar Khusnul Inayah, Nurhalisa Amalia Achmad, dan Chindy Claudia Asmara atas segala

perhatian, motivasi, dukungan, semangat dan bantuan selama proses belajar dan penyusunan skripsi.

10. Teman-teman angkatan 2017 Farmasi (Clostridium), atas segala kebersamaan, dukungan dan semangat selama proses belajar di Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.
11. Segenap pengurus BEM KEMAFAR-UH Periode 2020 atas segala kebersamaan dan pengalaman berorganisasi yang secara tidak langsung memberikan bantuan moral kepada penulis.
12. Semua pihak yang telah membantu namun tidak sempat disebutkan namanya satu persatu.

Semoga Allah SWT senantiasa membalas semua kebaikan yang telah diberikan. Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan tanggapan dan saran yang membangun dari berbagai pihak. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua dan menjadi bahan masukan bagi pengembangan dunia pendidikan dan ilmu pengetahuan kedepannya. Aamiin.

Makassar, 2021

Dhandy Kashar Pratama

ABSTRAK

Dhandy Kashar Pratama. Uji Efek Aspirin Terhadap Ekspresi Gen *srl* dan *pepck* pada *Drosophila melanogaster* (dibimbing oleh Firzan Nainu dan Elly Wahyudin)

Aspirin telah dilaporkan dapat menekan proses penuaan dan meningkatkan *lifespan*. Proses penuaan dapat dipengaruhi oleh aktivitas beberapa gen, di antaranya adalah gen yang mengkode spargel (*srl*) dan phosphoenolpyruvate carboxykinase (*pepck*). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian aspirin terhadap ekspresi gen *srl* dan *pepck* pada *Drosophila melanogaster*. Pada penelitian ini dilakukan analisis ekspresi gen *srl* dan *pepck* menggunakan metode *Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) dan analisis reproduksi dengan lima kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok sehat tanpa aspirin, kelompok kontrol pelarut, dan kelompok yang diberikan aspirin pada konsentrasi 5 μM , 50 μM , dan 500 μM . Hasil analisis RT-qPCR menunjukkan bahwa aspirin pada konsentrasi 500 μM dapat meningkatkan ekspresi gen *pepck* dan pada berbagai varian konsentrasi mampu meningkatkan ekspresi gen *srl*. Pada level fenotip, aspirin tidak mempengaruhi kapasitas reproduksi *Drosophila melanogaster*, sebagai salah satu parameter fenotip yang berkaitan dengan status penuaan. Sebagai kesimpulan, pemberian aspirin pada *Drosophila melanogaster* dapat meningkatkan ekspresi gen *srl* dan *pepck* dan hasil ini mungkin berkaitan dengan mekanisme aspirin dalam meningkatkan *lifespan* *Drosophila melanogaster*.

Kata kunci : Aspirin, gen *srl*, gen *pepck*, penuaan, *Drosophila melanogaster*

ABSTRACT

Dhandy Kashar Pratama. Effect of aspirin on the expression of *srl* and *pepck* genes in *Drosophila melanogaster* (supervised by Firzan Nainu and Elly Wahyudin)

Aspirin has been reported to suppress the aging process and to increase the lifespan. The aging process can be influenced by the activity of several genes, including genes encoding spargel (*srl*) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (*pepck*). This study was conducted to determine the effect of aspirin on the expression of *srl* and *pepck* genes in *Drosophila melanogaster*. In this study, *srl* and *pepck* gene expression analysis was carried out using the Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) method and reproduction analysis with five treatment groups consisting of a healthy group without aspirin, a solvent control group, and a group given aspirin at a concentration of 5 μ M, 50 μ M, and 500 μ M. The results of the RT-qPCR analysis showed that aspirin at a concentration of 500 μ M increased the expression of the *pepck* gene and at various concentrations was able to increase the expression of the *srl* gene. At the phenotypic level, aspirin did not affect the reproductive capacity of *Drosophila melanogaster*, as one of the phenotypic parameters related to aging status. In conclusion, aspirin treatment to *Drosophila melanogaster* can increase the expression of *srl* and *pepck* genes and these results may be related to the mechanism of aspirin in increasing the lifespan of *Drosophila melanogaster*.

Keywords: Aspirin, *srl* gene, *pepck* gene, aging, *Drosophila melanogaster*

DAFTAR ISI

	Halaman
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	5
I.3 Tujuan Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1 Deskripsi Umum Penuaan	6
II.2 Lalat Buah (<i>Drosophila melanogaster</i>)	11
II.3 Aspirin	13
II.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)	15

BAB III METODE PENELITIAN	19
III.1 Alat dan Bahan	19
III.2 Penyiapan Sampel	19
III.3 Penyiapan Pakan	20
III.4 Penyiapan Hewan Uji	20
III.5 Penyiapan Sampel RNA	21
III.6 Pengujian dengan PCR	22
III.7 Uji Reproduksi	23
III.8 Analisis Data	23
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	24
IV.1 Uji Ekspresi Gen	24
IV.2 Uji Reproduksi	27
BAB V PENUTUP	32
V.1 KESIMPULAN	32
V.2 SARAN	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	36

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sekuens primer gen	23
2. Pengamatan jumlah pupa	42
3. Pengamatan jumlah anak lalat	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. <i>Drosophila melanogaster</i>	2
Gambar 2. Data ekspresi gen <i>srl</i>	7
Gambar 3. Jalur pensinyalan spargel	8
Gambar 4. Data ekspresi gen <i>pepck</i>	9
Gambar 5. Jalur Pensinyalan <i>pepck</i>	10
Gambar 6. <i>Drosophila melanogaster</i>	11
Gambar 7. Siklus hidup <i>Drosophila melanogaster</i>	12
Gambar 8. Struktur kimia aspirin	14
Gambar 9. Kurva amplifikasi	16
Gambar 10. Siklus PCR	17
Gambar 11. Ekspresi gen <i>pepck</i> pada <i>Drosophila melanogaster</i>	24
Gambar 12. Ekspresi gen <i>srl</i> pada <i>Drosophila melanogaster</i>	26
Gambar 13. Jumlah Pupa	28
Gambar 14. Jumlah anak <i>Drosophila melanogaster</i>	30
Gambar 15. Pembuatan larutan aspirin	40
Gambar 16. Pembuatan Pakan <i>Drosophila melanogaster</i>	40
Gambar 17. Sampel lalat yang akan dilanjutkan ke tahap isolasi RNA	40
Gambar 18. Tahap isolasi RNA	41
Gambar 19. Rangkaian alat untuk PCR	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja	36
2. Perhitungan	38
3. Gambar Penelitian	40
4. Data Primer	42
5. Analisis Statistik	43

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Penuaan merupakan faktor resiko utama penyebab penyakit. Seiring bertambahnya usia, kinerja dari organ tubuh semakin berkurang sehingga lebih rentan terkena penyakit, baik penyakit infeksi maupun penyakit degeneratif. Salah satu tanda terjadinya penuaan ialah adanya perubahan intraseluler, seperti deregulasi jalur pensinyalan nutrisi hingga perubahan profil komunikasi antarsel (McIntyre dkk., 2020). Penuaan secara luas didefinisikan sebagai penurunan fungsi biologis yang mencakup seluruh Interaksi molekuler, fungsi seluler, struktur dan fungsi jaringan. Akibat adanya penurunan tersebut akan meningkatkan mortalitas serta peningkatan resiko penyakit yang berkaitan dengan usia seperti kanker, diabetes, obesitas, dan penyakit kardiovaskular (He and Jasper, 2014).

Terdapat beberapa jenis obat yang telah diteliti dapat memberikan efek anti penuaan (*anti aging*). Salah satunya ialah aspirin (asam asetil salisilat) yang telah dibuktikan dapat meningkatkan masa hidup dari *Drosophila*. Aspirin merupakan golongan obat antiinflamasi non-steroid (AINS) yang telah dibuktikan dapat meningkatkan masa hidup dari organisme model seperti lalat, ragi, nematode, dan tikus (Danilov dkk., 2015). AINS juga efektif dalam mengobati gangguan neurodegeneratif seperti penyakit Alzheimer dan penyakit Huntington. Selain itu, AINS juga

memberikan efek antikanker, menekan pertumbuhan tumor, serta stimulasi apoptosis (Danilov dkk., 2015). Penggunaan aspirin telah dilaporkan dapat meningkatkan masa hidup manusia, utamanya pada lansia. Aspirin juga telah terbukti dapat mengatur ekspresi gen antioksidan (superoksida dismutase, katalase, dan glutathione-S-transferase), yang mengakibatkan penurunan tingkat ROS endogen dan perpanjangan umur dari *Caenorhabditis elegans*. Penggunaan aspirin jangka panjang pada manusia dapat mengurangi resiko kematian dari berbagai penyakit terkait usia, termasuk aterosklerosis, diabetes, dan berbagai jenis kanker (Kumar and Lombard, 2016).

Berbagai penelitian mengenai penuaan telah banyak dilakukan untuk mengetahui penyebab terjadinya penurunan fungsi biologis serta cara mengatasinya. Secara umum, penelitian tentang penuaan dilakukan menggunakan organisme model seperti tikus, primata, kelinci, dan kucing (Mitchell dkk., 2015). Selain hewan-hewan tersebut, penelitian mengenai mekanisme penuaan secara genetik dan implikasinya terhadap makhluk hidup juga aktif dilakukan menggunakan *Drosophila melanogaster* sebagai



Gambar 1. *Drosophila melanogaster*

organisme model *in vivo* (Sun dkk., 2013). Keuntungan penggunaan *Drosophila melanogaster* sebagai organisme model pada penelitian yang berkaitan dengan penuaan antara lain, umur *Drosophila melanogaster* yang relatif pendek (2-3 bulan) sehingga memudahkan dalam pelaksanaan penelitian, persyaratan perawatan yang mudah, serta kemudahannya digunakan dalam eksperimen yang membutuhkan manipulasi genetik. Selain itu, lebih dari 50% gen drosophila memiliki homolog pada manusia, dan lebih dari 75% gen penyakit pada manusia yang telah diketahui memiliki homolog dengan gen pada *Drosophila* (Sun dkk., 2013).

Terdapat beberapa gen yang berperan dalam terjadinya proses penuaan pada *Drosophila*, dua diantaranya ialah gen yang mengkode spargel (*srl*) dan phosphoenolpyruvate carboxykinase (*pepck*). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi gen *srl* dapat meningkatkan masa hidup pada *Drosophila*. Gen *srl* pada *Drosophila* merupakan homolog PPAR- γ coactivator 1- α (PGC-1 α) pada manusia (Wagner dkk., 2015). PGC-1 α dan homolognya telah diketahui sebagai pengatur utama biogenesis mitokondria pada hewan (George and Jacobs, 2019). Pada *Drosophila*, peningkatan ekspresi gen *srl* akan meningkatkan aktivitas mitokondria baik selama perkembangan maupun pada tahap dewasa (Rera dkk., 2011). Selain itu, peningkatan regulasi gen *srl* akan menghambat aktivasi proliferasi *intestinal stem cells* (ISCs) dan mengurangi akumulasi sel yang misdiferensiasi di epitel usus (Rera dkk.,

2011). Peningkatan ekspresi gen *srl* secara khusus memediasi perpanjangan umur jaringan di saluran pencernaan. Perubahan ekspresi *srl* di jantung telah terbukti meningkatkan kapasitas jantung, serta penurunan *srl* di otot jantung akan menurunkan kemampuan pergerakan lokomotor dan daya tahan *Drosophila* (Merzetti and Staveley, 2015).

Gen *pepck* merupakan gen yang mengkode enzim *Phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) yang berperan dalam proses glukoneogenesis sehingga menjadi faktor utama dalam regulasi homeostasis glukosa. (Onken dkk., 2020). Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekspresi berlebih *pepck* pada mamalia menyebabkan peningkatan keluaran glukosa dan menyebabkan gejala diabetes tipe 2, hal tersebut dikarenakan peningkatan laju glukoneogenesis pada hati dan ginjal. Ekspresi *pepck* yang berlebih pada jaringan adiposa menyebabkan akumulasi trigliserida, sehingga dapat menyebabkan obesitas (Croniger dkk., 2002). Pada penelitian yang lain, pemberian nektarin 4% dapat memperpanjang masa hidup *Drosophila melanogaster*, meningkatkan kemampuan reproduksi, dan terjadi penurunan ekspresi beberapa gen metabolik, termasuk gen utama dalam glukoneogenesis yakni gen *pepck*, dan gen respon stress oksidatif, termasuk peroxiredoxins (Boyd dkk., 2011).

Regulasi gen *srl* (homolog pada manusia, PGC-1 α) dan *pepck* memiliki peranan penting terkait dengan perpanjangan umur, baik pada *Drosophila* maupun pada manusia. Hingga saat ini, belum ada penelitian

yang menunjukkan efek *anti aging* aspirin pada *Drosophila* melalui mekanisme kerja gen *srl* maupun *pepck*. Sehingga penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui efek aspirin terhadap ekspresi kedua gen tersebut.

I.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian aspirin terhadap ekspresi gen *srl* dan *pepck* pada *Drosophila melanogaster*?

I.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari pemberian aspirin terhadap ekspresi gen *srl* dan *pepck* pada *Drosophila melanogaster*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Deskripsi Umum Penuaan

Studi mengenai penuaan telah mengalami perkembangan dari waktu ke waktu. Hal tersebut dikarenakan beberapa alasan: (1) usia harapan hidup rata-rata manusia di seluruh dunia mengalami peningkatan, (2) persentase usia lanjut meningkat di banyak negara berkembang, (3) serta proporsi pengeluaran biaya untuk kesehatan bagi usia lanjut terus meningkat di Amerika Serikat (Winarno dkk., 2015). Penuaan secara luas didefinisikan sebagai penurunan fungsi biologis yang mencakup seluruh Interaksi molekuler, fungsi seluler, struktur dan fungsi jaringan. Akibat adanya penurunan tersebut akan meningkatkan mortalitas serta peningkatan resiko penyakit yang berkaitan dengan usia seperti kanker, diabetes, obesitas, dan penyakit kardiovaskular (He and Jasper, 2014).

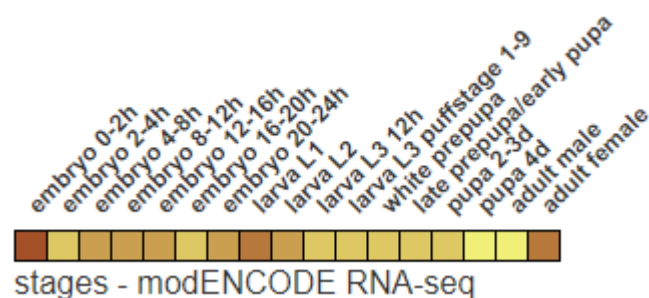
Penuaan ditandai dengan adanya perubahan degeneratif secara progresif, yang berpuncak pada gangguan fungsi jaringan dan peningkatan resiko kematian. Penuaan merupakan faktor resiko utama penyebab penyakit berbahaya pada manusia seperti kanker, diabetes tipe 2, serta penyakit kardiovaskular dan penyakit neurodegeneratif (Kumar and Lombard, 2016).

Gen merupakan bagian dari kromosom yang menjadi lokasi dari sifat-sifat keturunan pada makhluk hidup. Terdapat beberapa gen yang telah

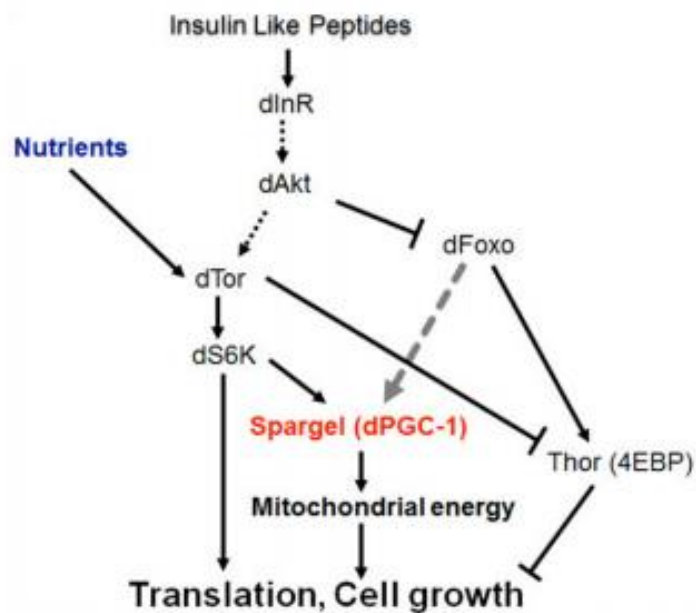
diketahui berperan dalam proses terjadinya penuaan, antara lain sebagai berikut:

II.1.1 Gen *srl*

Gen *srl* merupakan gen pada *Drosophila* yang mengkodekan protein spargel atau drosophila PPAR γ -Coactivator-1 (dPGC-1). Spargel/dPGC-1 ketika ekspresi berlebih akan menyebabkan peningkatan penggunaan oksigen oleh mitokondria serta meningkatkan produksi ATP, dan meningkatkan aktifitas enzim dan produksi protein pada matriks mitokondria. Gen *srl* pada *Drosophila* memiliki homolog dengan gen pada manusia, yaitu gen *PPARGC1A* yang juga mengkodekan protein PGC-1 (Mukherjee and Duttaroy, 2013). Ekspresi berlebih dari PGC-1 dapat meningkatkan masa hidup baik pada drosophila maupun pada manusia, melalui peningkatan biogenesis mitokondria serta menjaga kapasitas energi dari mitokondria. PGC-1 mempromosikan biogenesis mitokondria melalui aktivasi berbagai faktor transkripsi utama, termasuk *nuclear respiratory factor* -1 dan -2 (NRF-1 dan NRF-2) yang dapat menginduksi ekspresi gen yang mengkode protein mitokondria (Rera dkk., 2011).



Gambar 2. Data ekspresi gen *srl*



Gambar 3. Jalur pensinyalan spargel (Mukherjee : 2013)

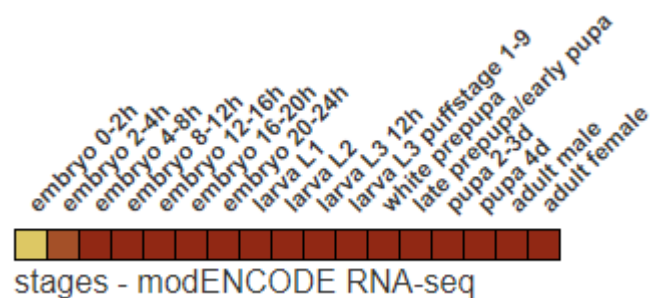
Spargel bekerja pada bagian hilir pensinyalan insulin dan *Target of Rapamycin* (TOR). Pada pensinyalan sintesis protein spargel/dPGC-1 diawali dengan aktivasi *insulin like receptor* (InR) oleh *insulin like peptide* (IIP). Aktivasi dari InR akan mengaktifkan Akt melalui fosforilasi *serine* dan *threonine*. Dengan teraktifkannya Akt maka akan memfosforilasi beberapa substrat untuk mengaktifkan anabolisme seluler, diantaranya memfosforilasi protein pengaktif *GTPase activating protein* (GAP) Tsc2 untuk mengaktifkan pensinyalan TOR *Complex 1* (TORC1) dan sintesis protein (Das dkk., 2014). Setelah TOR aktif maka pertama akan berikatan dengan protein ribosom S6 kinase (S6K) dan eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*) *binding protein* (4EBP). Ikatan antara TOR dengan S6K secara dapat memicu terjadinya proses translasi dan pertumbuhan sel. Selain itu, juga dapat mengaktifkan spargel/dPGC-1 yang akan meningkatkan

biogenesis mitokondria dan berujung pada aktifnya proses translasi dan pertumbuhan sel (Magnuson dkk 2012).

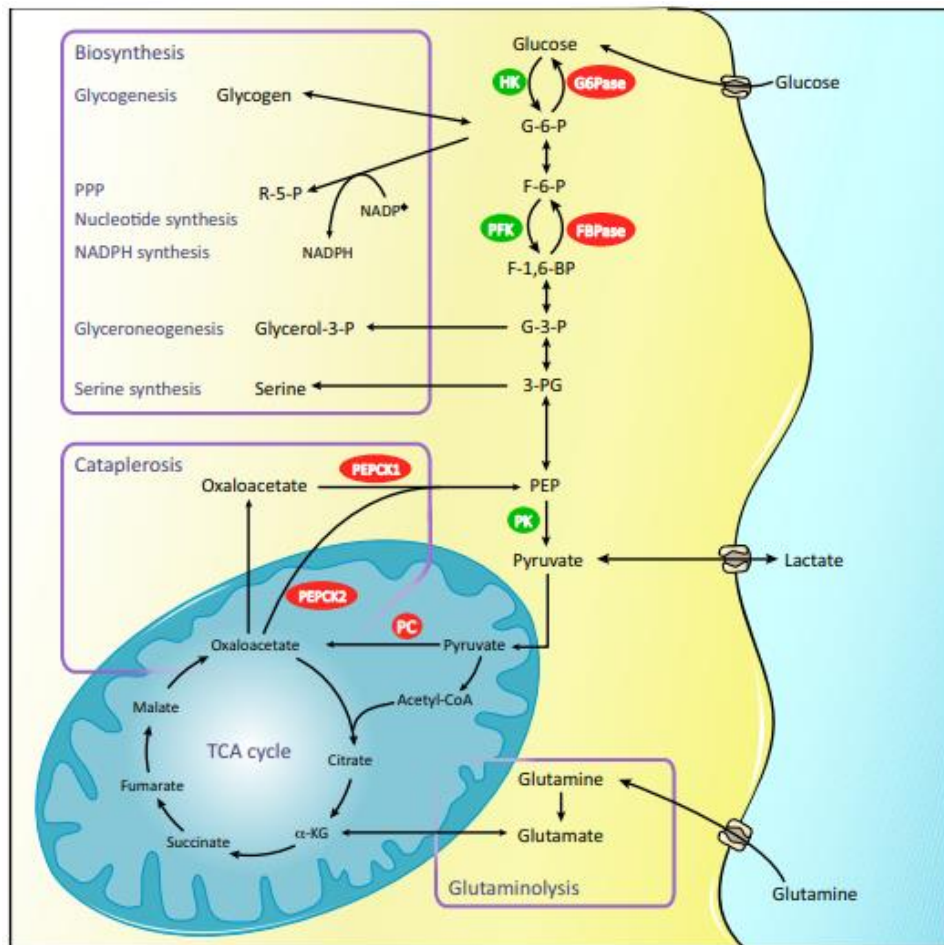
Selain mengaktifkan TOR, Akt juga menghambat faktor transkripsi *Forkhead Box O* (FoxO) sehingga mengurangi ekspresi gen katabolik. Dengan begitu dapat meningkatkan level ekspresi spargel/dPGC-1 yang akan meningkatkan biogenesis mitokondria (Das dkk., 2014).

II.1.2 Gen *pepck*

Gen *pepck* merupakan gen yang mengkode enzim *Phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) yang berperan dalam proses glukoneogenesis sehingga menjadi faktor utama dalam regulasi homeostasis glukosa. (Onken dkk., 2020). Kadar PEPCK akan meningkat ketika kadar enzim glukagon meningkat, penggunaan obat golongan glukokortikoid, peningkatan kadar hormon tiroid, dan asam retinoat. Sedangkan kadar enzim PEPCK ditekan oleh keberadaan insulin. Semua efek tersebut pada gen *pepck* diatur pada tingkat transkripsi, dikarenakan waktu paruh PEPCK dan mRNA sangat pendek sehingga aktivitas enzimatik PEPCK mencerminkan aktivitas transkripsi (Asano dkk., 2020)



Gambar 4. Data ekspresi gen *pepck*



Gambar 5. Jalur Penguinyalan *pepck* (wang : 2018)

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) merupakan hasil dari karboksilasi piruvat yang dikatalis oleh *pyruvate carboxylase* (PC) lalu dekarboksilat yang kemudian memfosforilasi oksaloasetat dan membentuk *Phosphoenolpyruvate* (PEP) pada langkah kedua tahap glukoneogenesis. Dengan mengubah oksaloasetat menjadi PEP, PEPCK memungkinkan penggunaan non-karbohidrat sebagai sumber energi ketika terjadi kelaparan. PEPCK pada mamalia terbagi 2, yaitu PEPCK1 (PEPCK-C dikodekan oleh gen PCK1) yang terdistribusi dalam sitosol dan PEPCK2 (PEPCK-M dikodekan oleh gen PCK2) yang terdistribusi dalam mitokondria (Wang and Dong, 2019).

II.2 Lalat Buah (*Drosophila melanogaster*)

Klasifikasi dari *Drosophila melanogaster* sebagai berikut:

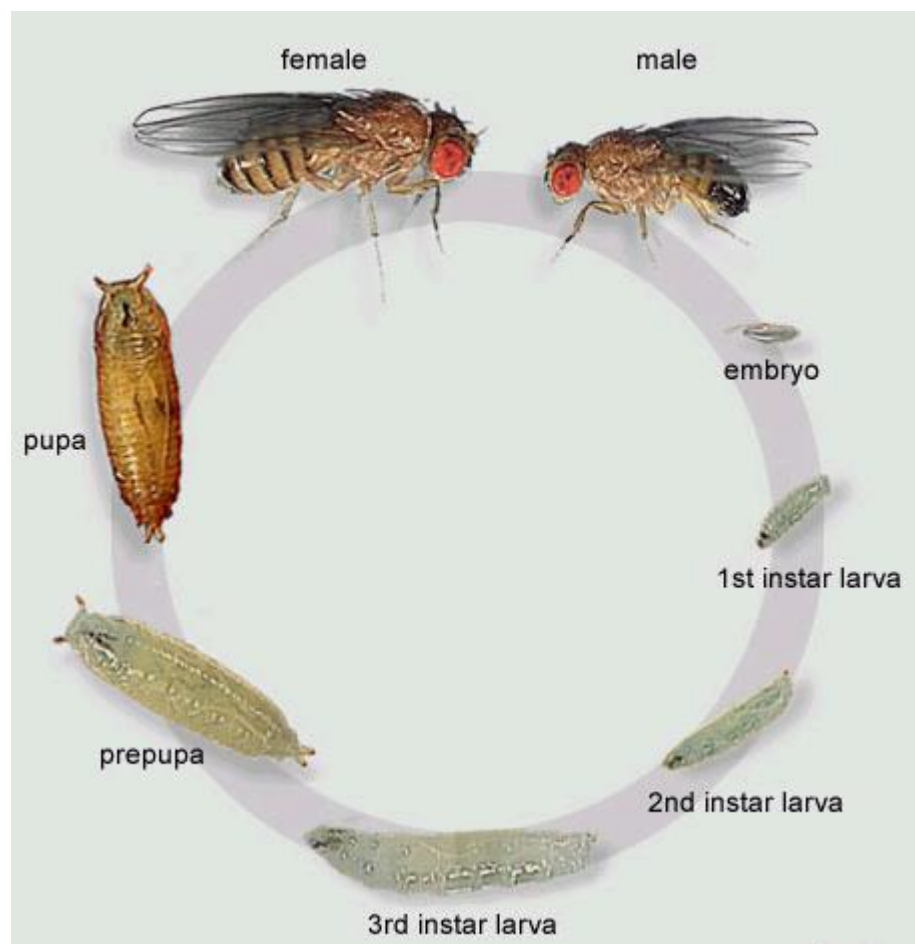
Kingdom : Animalia
Phylum : Arthropoda
Class : Insecta
Ordo : Diptera
Family : Drosophilidae
Genus : *Drosophila*
Species : *Drosophila melanogaster*



Gambar 6. *Drosophila melanogaster* (fly.base)

Drosophila melanogaster merupakan salah satu serangga dalam ordo Diptera yang berperan penting dalam perkembangan ilmu genetika serta dijadikan sebagai organisme model dalam berbagai penelitian karena memiliki ukuran yang kecil, siklus hidup yang relatif pendek, laju reproduksi yang cepat, jumlah keturunan yang dihasilkan sangat banyak, serta biaya perawatan yang murah (Hotimah dkk., 2017). *Drosophila melanogaster* memiliki jumlah kromosom yang sedikit, namun diperkirakan kemiripan genetik dengan manusia sekitar 75%. Hal inilah yang

mendasari potensi penggunaan *Drosophila melanogaster* sebagai organisme model dalam berbagai riset tentang mekanisme penyakit dan penemuan obat (Nainu, 2018).



Gambar 7. Siklus hidup *Drosophila melanogaster* (Nainu, 2018)

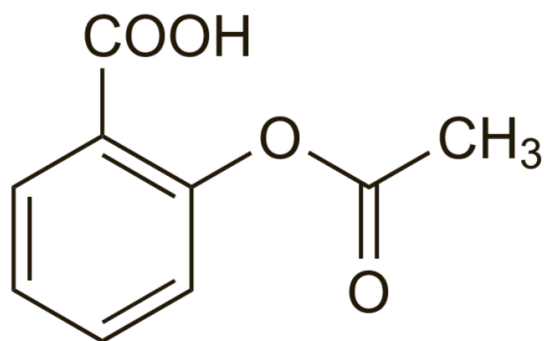
Dengan masa hidup yang relatif singkat, yakni sekitar 2-3 bulan serta tingkat kemiripan gen yang tinggi dengan manusia menjadikan *Drosophila melanogaster* cocok untuk dijadikan sebagai organisme model dalam berbagai penelitian, termasuk penelitian mengenai penuaan (Nainu, 2018). *Drosophila melanogaster* merupakan salah satu jenis serangga yang mengalami metamorfosis sempurna. Diawali sperma lalat jantan

dewasa membuahi sel telur lalat betina dewasa. Proses perkawinan tersebut baru akan terjadi setelah lalat berumur sekitar 8 jam. Setelah dibuahi, lalat betina hanya butuh waktu kurang dari 24 jam untuk mengeluarkan puluhan telur. Seekor *Drosophila melanogaster* betina mampu menghasilkan telur sebanyak 50-75 butir dalam sehari. Dalam waktu kurang dari 24 jam telur akan menetas dan menghasilkan larva instar pertama. Segera setelah menetas, larva instar pertama akan langsung makan sebanyak-banyaknya tumbuh dan berkembang menjadi larva instar kedua. Berat larva akan bertambah sekitar 200 kali lipat dan menjadi larva instar ketiga. Menjalang akhir larva instar ketiga, larva akan berhenti makan dan mencari tempat kering yang cocok untuk puparisasi dan akan membentuk pupa. Lalat dewasa akan keluar dari cangkang pupa dan kemudian disebut lalat dewasa. Seluruh proses sejak berupa telur hingga menjadi lalat dewasa berlangsung selama kurun waktu sekitar 10 hari. Panjang lalat dewasa yang muncul sekitar 3 mm dengan ukuran betina yang sedikit lebih besar daripada jantan. Betina memiliki berat sekitar 1,4 mg, sedangkan jantan memiliki berat sekitar 0,8 mg, hal ini disebabkan oleh adanya ovarium pada perut betina. Lalat betina dewasa kemudian siap untuk dibuahi kembali setelah berumur sekitar 8 jam, dan mulai bertelur segra setelah kawin (Dahmann, 2008)

II.3 Aspirin

Aspirin (asam asetil salisilat) merupakan salah satu obat golongan anti inflamasi non steroid tidak selektif. Aspirin menghambat COX (enzim

siklooksigenase) platelet secara permanen sehingga aspirin memiliki efek antiplatelet yang dapat bertahan hingga 8-10 hari. Aspirin berbentuk serbuk kristal berwarna putih, tidak berbau dan stabil di udara kering. Aspirin sedikit larut dalam air, sangat mudah larut dalam alkohol dan kloroform (Sweetman, 2009).



Gambar 8. Struktur kimia aspirin (Martindale)

Aspirin memiliki pKa 3,5 oleh karena itu, aspirin cepat diserap dari lambung dan usus kecil bagian atas dengan menghasilkan kadar plasma puncak dalam 1-2 jam. Aspirin dengan cepat dihidrolisis menjadi asam asetat dan salisilat oleh esterase jaringan dan darah (waktu paruh serum sekitar 15 menit). Salisilat terikat secara nonlinear dengan albumin. Alkalinisasi urin meningkatkan laju ekskresi salisilat bebas dan konjugat yang larut dalam air (Katzung and Trevor, 2015).

Umumnya, aspirin menurunkan kejadian iskemik transien, angina tidak stabil, thrombosis arteri coroner dan lain-lain. Penggunaan jangka panjang aspirin dengan dosis rendah dapat menimbulkan kanker usus besar yang lebih rendah yang mungkin berkaitan dengan efek penghambatannya. Selain efek samping tersebut, efek samping utamanya

adalah gangguan lambung, dan tukak lambung dan duodenum. Efek antiplatelet dari aspirin mengkontraindikasikan penggunaannya dengan Riwayat penyakit hemofilia (Katzung and Trevor, 2015).

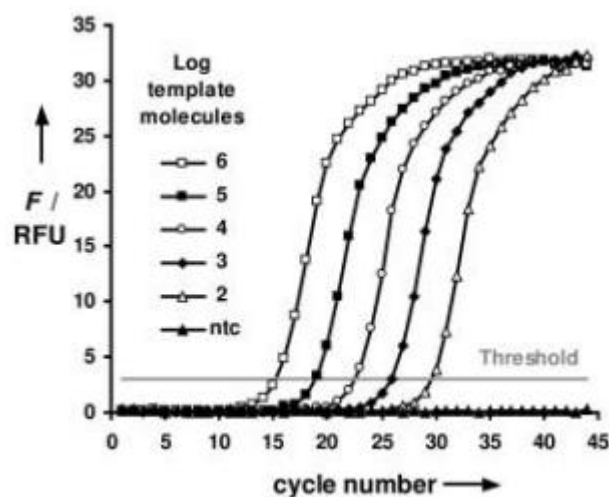
Aspirin telah diteliti dan dilaporkan dapat meningkatkan masa hidup dari organisme model seperti lalat, ragi, nematode, dan tikus (Danilov dkk., 2015). Selain itu, penggunaan aspirin juga telah dilaporkan dapat meningkatkan masa hidup manusia, utamanya pada lansia. Aspirin juga telah terbukti dapat mengatur ekspresi gen antioksidan (superoksida dismutase, katalase, dan glutathione-S-transferase), yang mengakibatkan penurunan tingkat ROS endogen dan perpanjangan umur dari *Caenorhabditis elegans*. Penggunaan aspirin jangka panjang pada manusia dapat mengurangi resiko kematian dari berbagai penyakit terkait usia, termasuk aterosklerosis, diabetes, dan berbagai jenis kanker (Kumar and Lombard, 2016).

II.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction atau disingkat PCR merupakan salah satu teknik ditingkat molekuler yang dapat mengamplifikasi molekul DNA (*Deoxyribosa Nucleic Acid*) dalam waktu yang relative singkat. Teknik ini dikembangkan oleh seorang ilmuwan bernama Kary Mullis bersama dengan rekan-rekannya pada pertengahan tahun 80 (Kubista dkk., 2006). Seiring dengan perkembangan teknologi, teknik inipun terbagi menjadi dua yaitu PCR konvensional dan PCR *real time*.

Reverse Transcription PCR (RT-PCR) merupakan salah satu metode PCR normal yang diawali dengan transkripsi oleh *reverse transcriptase* (mengubah RNA jadi cDNA) yang banyak digunakan untuk pemetaan ekspresi, menentukan kapan dan dimana suatu gen tertentu diekspresikan (Rahman dkk., 2013).

PCR *real time* merupakan teknik yang mutakhir untuk mengukur asam nukleat untuk mendeteksi mutasi serta analisis genotipe yang mulai dikembangkan sejak tahun 1990-an. Keunikan dari PCR *real time* adalah proses amplifikasi dapat dipantau secara *real time* (waktu yang sebenarnya) dengan menggunakan teknik fluoresensi sehingga dapat diperoleh akurasi data yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan PCR konvensional, karena seluruh profil amplifikasi diketahui pada PCR *real time* (Wilhelm and Pingoud, 2003).

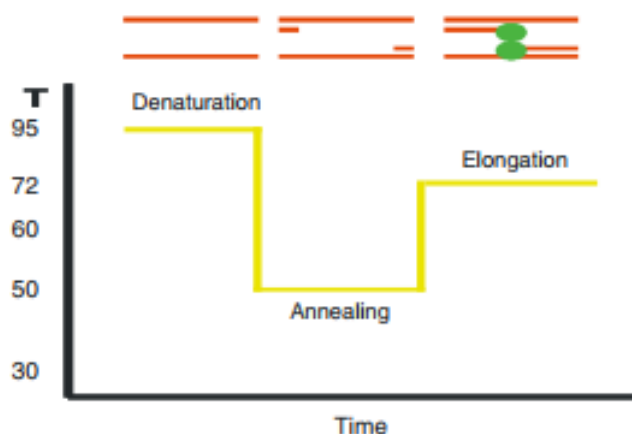


Gambar 9. Kurva amplifikasi. (Wilhelm, 2003)

Proses PCR membutuhkan beberapa komponen dasar, antara lain sebagai berikut :

1. Template DNA atau cDNA (complementary DNA) yang berisi arah fragmen DNA yang akan diamplifikasi
2. Dua primer yang menentukan awal dan akhir daerah yang akan diamplifikasi.
3. *Taq polymerase* (*Thermos aquaticus* polymerase) yang menyalin daerah amplifikasi.
4. Nukleotida, digunakan oleh DNA polymerase untuk membentuk DNA baru
5. Buffer, untuk mempertahankan pH yang sesuai untuk DNA polymerase.

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) denaturasi template DNA; (2) penempelan primer pada template (annealing); (3) pemanjangan primer (extension), dan masing-masing terjadi 20 hingga 30 siklus (Rahman dkk., 2013)



Gambar 10. Siklus PCR (kubista, 2006)

A. Denaturation

Proses denaturasi DNA merupakan proses pemecahan ikatan hydrogen yang menghubungkan dua untai DNA sehingga untai ganda DNA berubah menjadi untai tunggal yang terjadi pada suhu sekitar 94°C-96°C. Proses ini berlangsung selama 5 menit. Pada tahap ini juga terjadi proses pengaktifan *Taq polymerase* (Rahman dkk., 2013).

B. Annealing

Setelah untai DNA dipisahkan, suhu akan diturunkan sehingga primer dapat menempel pada untai tunggal DNA. Proses ini disebut *annealing*. Suhu pada tahap ini tergantung pada primer yang digunakan dan biasanya 50°C-60°C selama 1-2 menit. Pengaturan suhu yang salah pada tahap ini dapat mengakibatkan primer tidak mengikat pada DNA template atau mengikat secara acak (Rahman dkk., 2013).

C. Extension / Elongation

Kemudian DNA polymerase akan menyambungkan antara primer dengan DNA template dan bekerja sepanjang untai DNA. Proses ini disebut ekstensi atau elongasi. Suhu ekstensi tergantung pada DNA polymerase, karena yang digunakan berupa *Taq polymerase* maka suhunya berkisar 75°C (Rahman dkk., 2013).