

SKRIPSI

PENGARUH ETANOL TERHADAP EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN *sod1* DAN *sod2* PADA *Drosophila melanogaster*

THE EFFECT OF ETHANOL ON *sod1* AND *sod2* ANTIOXIDANT GENE EXPRESSION IN *Drosophila melanogaster*

Disusun dan diajukan oleh

**KHANSA
N011 17 1506**



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

**PENGARUH ETANOL TERHADAP EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN
sod1 DAN *sod2* PADA *Drosophila melanogaster***

**THE EFFECT OF ETHANOL ON *sod1* AND *sod2* ANTIOXIDANT GENE
EXPRESSION IN *Drosophila melanogaster***

SKRIPSI

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

**KHANSA
N011 17 1506**

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

PENGARUH ETANOL TERHADAP EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN *sod1*
DAN *sod2* PADA *Drosophila melanogaster*

KHANSA

N011 17 1506

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt. NIP. 19820610 200801 1 012
Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt. NIP.19780716 200312 2 001

Pada tanggal 20 05 2021

LEMBAR PENGESAHAN

PENGARUH ETANOL TERHADAP EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN *sod1* DAN *sod2* PADA *Drosophila melanogaster*

Disusun dan diajukan oleh :

KHANSA
N011 17 1506

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

Menyetujui,

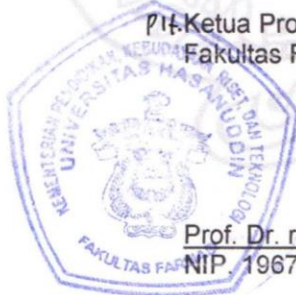
Pembimbing Utama,

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

Pembimbing Pendamping,

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

P11-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 : Khansa
NIM : N011171506
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul "Pengaruh Etanol Terhadap Ekspresi Gen Antioksidan *sod1* dan *sod2* pada *Drosophila melanogaster*" adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 20 05 2021

Yang Menyatakan



Khansa

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 penasehat akademik yang telah membimbing, memberikan arahan, dorongan, motivasi, dan telah meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan masa studinya selama di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Ibu Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah membimbing, memberikan saran, arahan, dorongan, dan telah meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
3. Ibu Yulia Yusrini Djabir, S.Si., MBM.Sc., M.Si., Ph.D., Apt. dan Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. selaku tim penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan 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 penelitian ini.

5. Kedua orang tua penulis, Ibu Etyk Turniyatun dan Bapak Andi Maulana Santo, atas doa, perhatian, kasih sayang, dukungan baik secara moril maupun materil, dan selalu sabar dalam menghadapi penulis untuk mencapai kesuksesannya.
6. Seluruh Asisten Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas segala ilmu, bantuan, dan dukungan yang diberikan kepada penulis.
7. Teman-teman UFRG, terutama L.M. Alif Fauzan Tamar, Nur Islamiah Syahrir, kak Nadila Pratiwi, kak Reski Amalia Rosa, dan kak Sri Wahyuni yang selalu memberikan ilmu, bantuan, dan selalu kompak dalam menyelesaikan penelitian ini.
8. Hasriandi selaku teman dekat penulis, yang selalu memberikan dukungan, doa, bantuan, dan selalu mendengarkan keluh kesah dari penulis selama menyelesaikan studinya.
9. Teman-teman BANANA squad, Arini Putri Erdiana, Indhira Azhari Gazali, Windy Winalda Oktaviani, Kadek Saka Dwipayanti, Nur Islamiah Syahrir, Rahmatillah Tamrin, dan Muh. Rezky Pratama yang telah memberikan dukungan dan doa kepada penulis dalam menyusun skripsi ini.
10. Zilfrida Aura Bening Azizy, Nur Zadila, dan L.M. Alif Fauzan Tamar selaku teman penulis yang telah memberikan dukungan dan doa kepada penulis dalam menyusun skripsi ini.
11. Teman-teman angkatan 2017 (CLOSTR17IUM), yang telah

memberikan banyak kenangan, dukungan, dan pengalaman yang tidak terlupakan selama menjadi mahasiswi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

12. UKM Critis Kemafar-UH dan UKM Redaksi Lege Artis FF-UH yang telah memberikan pengalaman dalam berorganisasi kepada penulis.
13. Teman-teman SMA Athirah, Nudia Tuljannah, Ainun Annisa, dan Rafli Marsa Fauzan yang telah memberikan dukungan dan doa kepada penulis dalam menyusun skripsi ini.
14. 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, 2021



Khansa

ABSTRAK

KHANSA. Pengaruh Etanol Terhadap Ekspresi Gen Antioksidan *sod1* dan *sod2* pada *Drosophila melanogaster* (dibimbing oleh Firzan Nainu dan Risfah Yulianty).

Etanol telah diketahui dapat memicu terjadinya apoptosis baik pada manusia maupun hewan model *Drosophila melanogaster*. Tubuh memerlukan antioksidan endogen, salah satunya superoksida dismutase (SOD), untuk mempertahankan sel dari kerusakan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek paparan etanol terhadap ekspresi gen *sod1* dan *sod2* pada *Drosophila melanogaster*. Pengamatan dilakukan pada model hewan uji *D. melanogaster* genotip *w¹¹¹⁸* jantan yang diberikan paparan etanol pada konsentrasi 5, 25, 45, 65, dan 85% selama enam menit. Analisis ekspresi gen *sod1* dan *sod2* dilakukan menggunakan metode reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR). Hasil analisis ekspresi gen menunjukkan bahwa etanol dapat menurunkan survival *D. melanogaster* namun tidak menginduksi perubahan level ekspresi gen antioksidan endogen (*sod1* dan *sod2*) pada berbagai konsentrasi uji. Kesimpulan pada penelitian ini yaitu paparan etanol dapat menyebabkan kematian pada *D. melanogaster* namun kelihatannya aktivitas antioksidan endogen yang dimediasi oleh superoksida dismutase tidak memiliki pengaruh signifikan dalam menangkal proses tersebut.

Kata Kunci : Alkohol, Apoptosis, *Drosophila melanogaster*, *sod1*, *sod2*.

ABSTRACT

KHANSA. The Effect of Ethanol on *sod1* and *sod2* Antioxidant Gene Expression in *Drosophila melanogaster* (Supervised by Firzan Nainu and Risfah Yulianty).

Ethanol has been known to trigger apoptosis in both humans and animal model *Drosophila melanogaster*. Body requires endogenous antioxidants, one of them is superoxide dismutase (SOD), in order to protect cells from damage. The objective of this study is to determine the effect of ethanol exposure on the expression of *sod1* and *sod2* genes in *Drosophila melanogaster*. Experiments were carried out using male *w¹¹¹⁸* *D. melanogaster* that was exposed by ethanol at concentrations of 5, 25, 45, 65, and 85% for six minutes prior to further examination. Analysis of *sod1* and *sod2* gene expression was demonstrated using the reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) method. The results of gene expression analysis indicate that ethanol could reduce the survival of *D. melanogaster* but did not induce changes in the level of endogenous antioxidant gene expression (*sod1* and *sod2*) at various test concentrations. In conclusion, ethanol exposure can reduce the survival of *D. melanogaster* and apparently the endogenous antioxidant activity mediated by superoxide dismutases did not have significant effect preventing this process.

Keywords: Alcohol, Apoptosis, *Drosophila melanogaster*, *sod1*, *sod2*.

1

DAFTAR ISI

	halaman
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	3
I.3. Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1. Alkohol	4
II.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	5
II.3. Stres Oksidatif	8
II.4. Apoptosis	9
II.5. Antioksidan Endogen	11
II.6. Ekstraksi Asam Nukleat	13
II.7. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	16

BAB III METODE PENELITIAN	20
III.1. Alat dan Bahan	20
III.2. Metode Kerja	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
IV.1. Pengamatan Waktu Mortalitas <i>Drosophila melanogaster</i>	26
IV.2. Level Ekspresi Gen Antioksidan Endogen pada <i>Drosophila melanogaster</i>	27
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	32
V.1. Kesimpulan	32
V.2. Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	37

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Sekuens primer masing-masing gen	24
2. Hasil <i>one-way anova</i> ekspresi gen <i>sod1</i>	40
3. Hasil uji lanjutan <i>tukey</i> ekspresi gen <i>sod1</i>	40
4. Hasil <i>one-way anova</i> ekspresi gen <i>sod2</i>	41
5. Hasil uji lanjutan <i>tukey</i> ekspresi gen <i>sod2</i>	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. <i>Drosophila melanogaster</i> dewasa jantan dan betina	6
2. Siklus hidup <i>Drosophila melanogaster</i>	7
3. Morfologi apoptosis dan nekrosis	10
4. Enzim antioksidan endogen	12
5. Alat <i>real time</i> PCR	16
6. Siklus PCR	17
7. Data uji mortalitas <i>w¹¹¹⁸</i> setelah paparan etanol	26
8. Profil ekspresi gen <i>sod1</i>	28
9. Level ekspresi gen <i>sod1 w¹¹¹⁸</i> yang terpapar etanol	28
10. Profil ekspresi gen <i>sod2</i>	29
11. Level ekspresi gen <i>sod2 w¹¹¹⁸</i> yang terpapar etanol	29
12. Uji mortalitas	42
13. PCR	42
14. Pembuatan pakan	42
15. BSC II	42
16. Termomixer	42
17. Mikroskop zoom stereo	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja Uji Mortalitas	37
2. Skema Kerja Isolasi RNA dan Uji PCR	38
3. Komposisi Pakan <i>Drosophila melanogaster</i>	39
4. Analisis Data	40
5. Gambar Penelitian	42

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Minuman beralkohol pada umumnya mengandung etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) yang termasuk ke dalam senyawa kimia yang mengandung gugus hidroksil $-\text{OH}$ yang terikat pada atom karbon. Etanol diperoleh dari proses fermentasi yang berasal dari bahan biologis seperti gula (Onyekwelu, 2019). Ketika minuman beralkohol dikonsumsi secara berlebihan dapat menimbulkan berbagai macam masalah kesehatan seperti pendarahan pada saluran cerna, sirosis, trauma, bahkan dapat menyebabkan kanker. Selain itu, alkohol juga telah terbukti dapat menyebabkan terjadinya apoptosis pada sel makrofag, neutrofil, dan limfosit. Ketika sel mengalami apoptosis karena pengaruh alkohol, maka alkohol dapat dengan mudah memodulasi fungsi kekebalan tubuh secara langsung (Kapasi *et al.*, 2003).

Ketika terjadi paparan etanol akut, maka akan terjadi peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang akan menyebabkan gangguan keseimbangan (homeostasis) dalam sel. Selanjutnya, hal tersebut akan memicu timbulnya stres oksidatif yang akan menyebabkan terjadinya kerusakan sel dan berujung pada terjadinya *alcoholic liver disease* (ALD) (Wu and Cederbaum, 2014). Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa pemberian etanol pada hewan uji tikus dapat

mengakibatkan terjadinya apoptosis pada sel hepatosit (Cohen *et al.*, 2009). Pada penelitian lain juga, membuktikan bahwa paparan etanol secara inhalasi pada *Drosophila melanogaster* memicu terjadinya apoptosis yang kemudian mempengaruhi fungsi gerak dan masa hidup *Drosophila melanogaster* (Edwin, 2018).

Adanya peningkatan ROS di dalam sel dapat berujung pada apoptosis, sehingga tubuh membutuhkan respon untuk mempertahankan sel, salah satunya dengan memanfaatkan antioksidan endogen (Aguilar *et al.*, 2016). Antioksidan dapat menetralkan radikal bebas dan dapat mencegah produksi ROS secara berlebihan. Enzim antioksidan yang menjadi lini pertama dalam pertahanan melawan stres oksidatif yaitu superoksida dismutase (SODs), glutathione peroksidase (GPXs), dan enzim katalase (CAT). Ketiga enzim tersebut dapat mengangkut radikal bebas utama yang menguraikan radikal superoksida dan H₂O₂ (Kulbacka *et al.*, 2012).

Superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim antioksidan yang paling utama sebagai sistem pertahanan melawan ROS dan radikal anion superoksida. Enzim SOD ini dapat mengkatalisis terjadinya pemecahan superoksida menjadi hidrogen peroksida dan air, sehingga enzim SOD menjadi antioksidan utama dalam mengatur kadar ROS (Landis and Tower, 2005). Hingga saat ini, terdapat 3 jenis superoksida dismutase berdasarkan aspek biokimia dan molekuler pada mamalia, diantaranya yaitu *sod1*, *sod2*, dan SOD3 (Zelko *et al.*, 2002). Enzim antioksidan SOD, baik pada manusia

maupun hewan uji lainnya seperti lalat buah (*Drosophila melanogaster*) memiliki struktur dan fungsi yang sama. Secara *in vitro*, *D. melanogaster* memiliki enzim SOD yang dapat meningkatkan diferensiasi sel hati dan dapat menurunkan terjadinya proliferasi sel (James *et al.*, 2009).

Drosophila saat ini telah banyak digunakan dalam berbagai penelitian karena memiliki kemiripan susunan genetik dengan manusia sekitar 75% (Allocca *et al.*, 2018). Selain itu, *Drosophila* memiliki keuntungan lain seperti proses pemeliharaan lalat yang cukup mudah, harganya yang murah, dan hanya membutuhkan waktu sekitar 10 hari untuk dapat berkembang menjadi lalat dewasa (Prokop, 2015).

Sehubungan dengan peran antioksidan endogen dalam mencegah stres oksidatif, penelitian ini akan dilakukan untuk melihat efek etanol terhadap ekspresi gen antioksidan endogen *sod1* dan *sod2* pada organisme model *Drosophila* yang secara tidak langsung dapat digunakan sebagai parameter status oksidan dalam sel. Hasil yang diperoleh diharapkan dapat memberikan gambaran mengenai peran antioksidan endogen dalam survival hewan coba setelah paparan etanol.

I.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek paparan etanol terhadap ekspresi gen *sod1* dan *sod2* pada *Drosophila melanogaster*?

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui efek paparan etanol terhadap ekspresi gen *sod1* dan *sod2* pada *Drosophila melanogaster*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Etanol

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) merupakan senyawa kimia yang memiliki gugus fungsi hidroksil $-\text{OH}$ yang terikat pada atom karbon (Onyekwelu, 2019). Menurut Farmakope Indonesia, etanol dalam bentuk murni merupakan cairan yang mudah menguap, memiliki bau yang khas, jernih, tidak berwarna, mudah bercampur dengan air, praktis bercampur dengan semua jenis pelarut organik, dan memiliki berat molekul sekitar 46,07 (KEMENKES RI, 2014). Di dalam bidang industri, etanol banyak digunakan sebagai pelarut karena sifat dari etanol yang tidak beracun sehingga aman untuk digunakan (Anggraini *et al.*, 2017).

Secara umum, alkohol dapat dimetabolisme dengan mudah menjadi asetaldehida oleh alkohol dehidrogenasi (ADH). Etanol juga dapat dimetabolisme di organ hati melalui dua jalur tambahan, dengan melibatkan sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) dan enzim katalase. Metabolisme alkohol ini menghasilkan radikal oksigen reaktif yang dapat merusak mitokondria, terjadinya modifikasi DNA dan peroksida lipid, serta produksi sitokin yang meningkat (Hernandez *et al.*, 2012).

Ketika minuman beralkohol dikonsumsi secara kronis dapat menimbulkan berbagai macam permasalahan kesehatan, diantaranya terjadi penumpukan asam lemak pada sel hepatosit yang dapat

menurunkan fungsi hati serta mengubah berbagai jalur metabolisme di hati yang mengarah pada produksi radikal bebas yang menjadi faktor utama dalam kerusakan jaringan (Hernandez *et al.*, 2012).

Berdasarkan *Global status report on alcohol and health*, pada tahun 2016, efek yang merugikan dari penggunaan alkohol dapat mengakibatkan sekitar 3 juta kematian (5,3% dari semua kematian) di seluruh dunia dan sekitar 132,6 juta yang mengalami kecacatan (5,1% dari semua kecacatan). Diperkirakan sekitar 2,3 juta kematian dan 106,5 juta yang mengalami kecacatan pada pria. Sedangkan, pada wanita sekitar 0,7 juta kematian dan 26,1 juta yang mengalami kecacatan yang disebabkan karena mengonsumsi alkohol. Kasus penyebab kematian akibat mengonsumsi alkohol ini cenderung lebih tinggi jika dibandingkan dengan kasus kematian yang disebabkan oleh penyakit tuberkulosis, HIV/AIDS, dan diabetes (WHO, 2018).

II.2 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster atau lalat cuka (*vinegar fly*) merupakan jenis hewan yang tidak memiliki tulang belakang (*invertebrate*) dan memiliki ukuran tubuh sekitar 3 mm. Hingga saat ini, *Drosophila melanogaster* banyak digunakan dalam beberapa penelitian sebagai hewan uji untuk mengetahui patogenesis penyakit dan penemuan obat baru karena hewan ini memiliki kemiripan susunan genetik dengan manusia sekitar 75% (Nainu, 2018). Selain itu, *D. melanogaster* sebagai hewan uji memiliki keuntungan lain seperti proses pemeliharaan yang cukup mudah, harganya

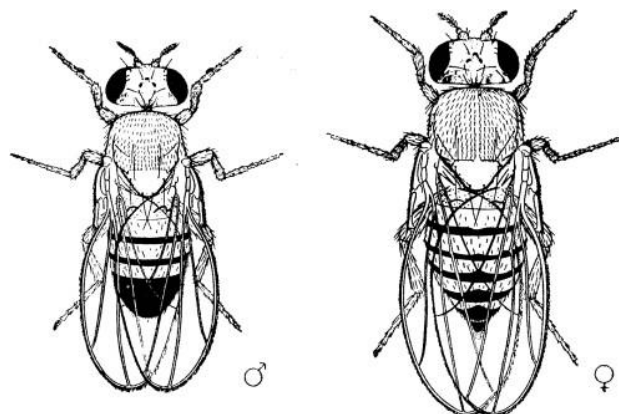
yang murah, dan hanya membutuhkan waktu sekitar 10 hari untuk dapat berkembang menjadi lalat dewasa (Prokop, 2015).

II.2.1 Klasifikasi *Drosophila melanogaster*

Adapun klasifikasi dari *Drosophila melanogaster* sebagai berikut (Gullan and Cranston, 2014):

Kingdom : Animalia
Filum : Arthropoda
kelas : Insecta
Ordo : Diptera
Famili : Drosophiladae
Genus : *Drosophila*
Spesies : *Drosophila melanogaster*

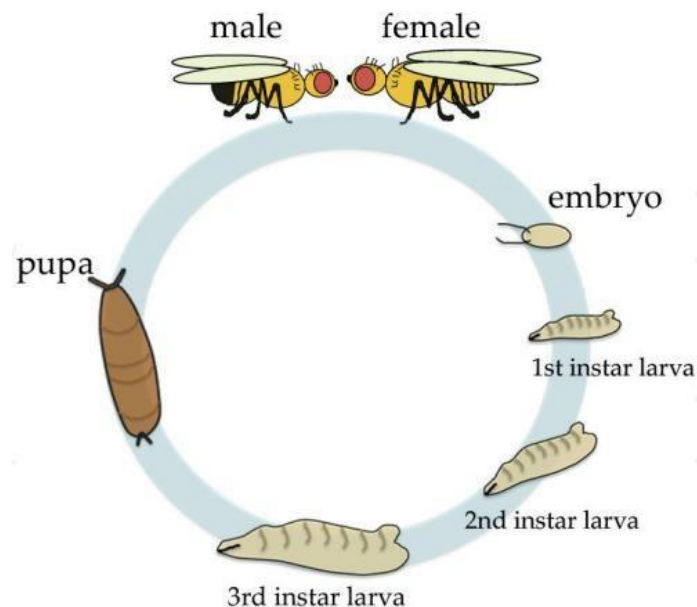
II.2.2 Morfologi *Drosophila melanogaster*



Gambar 1. *Drosophila melanogaster* dewasa jantan dan betina (Demerec and Kaufman, 1996)

Morfologi *Drosophila melanogaster* tipe normal memiliki mata yang berwarna merah, ukuran sayap yang cukup panjang dan berwarna transparan, bagian tubuh yang berwarna kuning kecokelatan dengan cincin berwarna hitam pada bagian belakang tubuh, dan memiliki ukuran tubuh sekitar 3 sampai 5 mm (Hotimah *et al.*, 2017). *Drosophila* juga dapat dibedakan berdasarkan jenis kelamin. Pada *D. melanogaster* jantan memiliki bagian ujung perut berbentuk agak bulat dan memiliki 5 segmen pada bagian perut. Sedangkan, pada *D. melanogaster* betina memiliki bagian ujung perut yang memanjang dan memiliki 7 segmen pada bagian perut (Demerec and Kaufman, 1996).

II.2.3 Siklus Hidup *Drosophila melanogaster*



Gambar 2. Siklus hidup *Drosophila melanogaster* (Allocca *et al.*, 2018)

Drosophila melanogaster mempunyai siklus hidup yang cepat apabila dibandingkan dengan hewan uji lainnya. Siklus hidup dari *D. melanogaster* ini dapat membutuhkan waktu selama 10 hari pada suhu 25 °C dan selama 15 hari pada suhu 20 °C. *Drosophila* yang disimpan pada suhu di bawah 25 °C akan mengganggu viabilitasnya dan ketika disimpan pada suhu di atas 30 °C dapat mengakibatkan terjadinya kematian pada *Drosophila melanogaster* (Demerec and Kaufman, 1996). Siklus hidup dari *D. melanogaster* terdiri atas 4 tahap, yaitu telur, larva, pupa, dan lalat dewasa. Tahap pertama diawali dengan perkembangan embrio yang kemudian mengalami pembuahan dan pembentukan zigot pada membran telur. Sel telur tersebut akan berkembang menjadi larva kemudian akan tumbuh menjadi pupa. Pupa ini akan berkembang biak menjadi imago atau lalat dewasa yang merupakan tahap akhir dari siklus hidup *D. melanogaster* (Parvathi *et al.*, 2009).

II.3 Stres Oksidatif

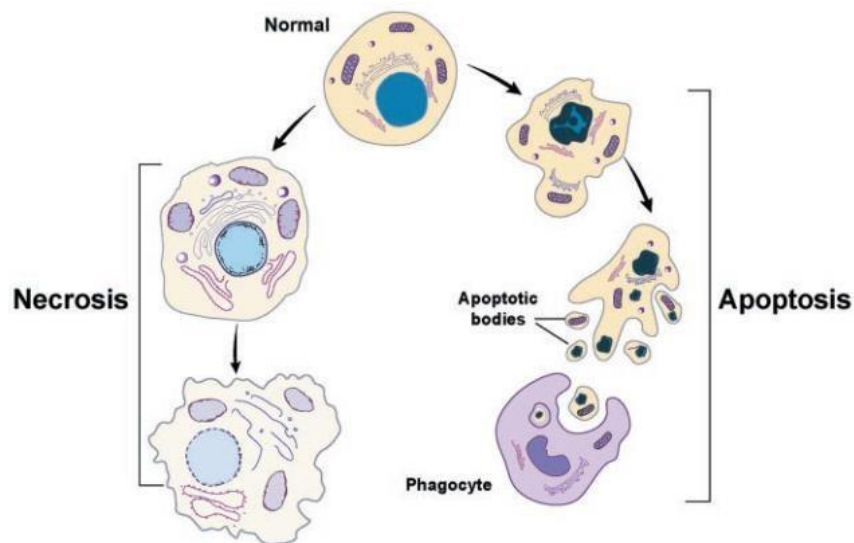
Stres oksidatif merupakan suatu keadaan yang terjadi karena timbulnya ketidakseimbangan antara radikal bebas dan sistem pertahanan enzim antioksidan di dalam tubuh. Reactive oxygen species (ROS) atau radikal bebas dapat diproduksi oleh metabolisme sel normal dan dapat bereaksi dengan biomolekul seperti DNA, lipid, dan protein yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel dan bertanggung jawab pada perubahan degeneratif (Manisha *et al.*, 2017). Radikal bebas termasuk molekul yang sangat tidak stabil dan sangat reaktif yang berusaha

mencapai keadaan menjadi lebih stabil yang bereaksi dengan atom atau molekul lain di dalam sel (Wu and Cederbaum, 2014).

Salah satu penentu penting pada stres oksidatif di dalam tubuh adalah rasio antara glutathion teroksidasi dan tereduksi (2GSH / GSSG). Ketika stress oksidatif terjadi, sel-sel akan melawan efek oksidan dan mengembalikan keseimbangan redoks dengan mengaktifkan atau memberhentikan gen yang mengkode enzim pertahanan, protein struktural, dan faktor transkripsi. Peningkatan produksi ROS yang lebih tinggi dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya perubahan pada struktur DNA, mengakibatkan perubahan protein dan lipid, mengaktifasi beberapa faktor transkripsi yang diinduksi stres, serta memproduksi sitokin proinflamasi dan antiinflamasi (Birben *et al.*, 2012).

II.4 Apoptosis

Apoptosis merupakan proses kematian sel terprogram yang terjadi secara normal pada proses perkembangan dan penuaan pada jaringan tubuh, dan sebagai mekanisme homeostatis untuk mempertahankan jumlah sel di dalam tubuh. Apoptosis juga dapat menjadi pertahanan tubuh ketika sel mengalami kerusakan akibat adanya paparan suatu penyakit (Elmore, 2007).



Gambar 3. Morfologi apoptosis dan nekrosis (Saikumar *et al.*, 1999)

Kematian sel pada apoptosis berbeda dengan kematian sel yang disebabkan oleh nekrosis. Nekrosis terjadi akibat adanya respons dari luar tubuh seperti terjadinya cedera oleh toksin, iskemia, atau terjadi rangsangan fisik. Ciri utama yang menandakan nekrosis dapat ditandai dengan terjadinya gangguan pada membran, pembengkakan sel, dan kromatin inti yang mengalami lisis. Sedangkan, apoptosis memiliki ciri utama yaitu terjadinya *blebbing*, sel apoptosis mengkerut, dan kromatin mengalami kondensasi dan fragmentasi. Sel tersebut akan mengalami pemecahan menjadi badan apoptotik yang menjadi target dari sel fagositosis (Saikumar *et al.*, 1999).

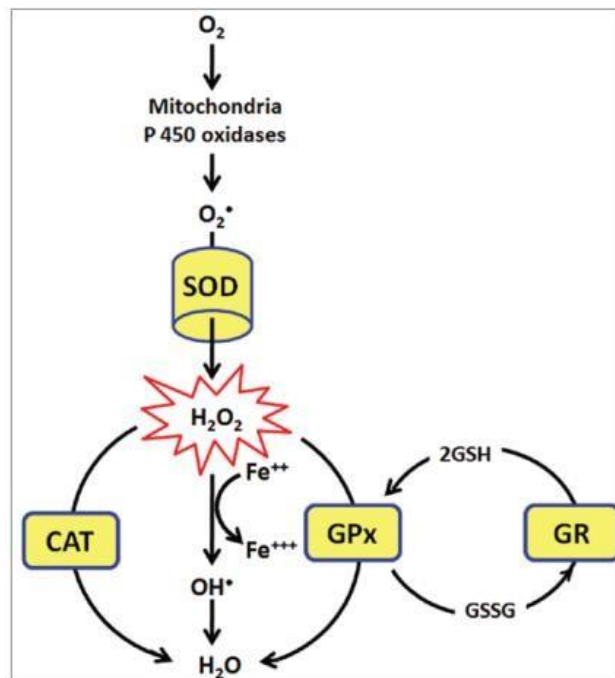
Apoptosis diregulasi melalui jalur biokimia yang mengatur keseimbangan antara sinyal yang menyebabkan kematian dan kesintasan, serta mengaktifkan gabungan enzim *caspase*. Dinamakan enzim *caspase* karena merupakan *cysteine protease* yang menghancurkan protein setelah

residu aspartat. Untuk mengaktivasi enzim *caspase*, terdapat 2 jalur, yaitu: jalur mitokondrial (intrinsik) dan jalur *death receptor* (ekstrinsik). Kedua jalur tersebut memiliki perbedaan pada tahap induksi dan regulasi, dan keduanya akan berakhir pada proses pengaktivasian *caspase*. Pada jalur mitokondrial, keluarga protein efektor Bcl-2 akan mengalami pengurangan sinyal dan terjadi kerusakan pada DNA maupun protein yang kemudian akan mengaktivasi sensor BH3 untuk mempertahankan permeabilitas mitokondrial. Pada kondisi defisiensi protein Bcl-2 dan protein lain yang mempertahankan permeabilitas mitokondrial, dapat menyebabkan terjadinya kebocoran pada mitokondria sehingga substansi sitokrom c akan memasuki sitosol dan mengaktivasi *caspase*. Aktivasi *capase* dapat menginduksi perubahan yang berakhir pada kematian dan memicu terjadinya fragmentasi sel. Sedangkan pada *death receptor*, sinyal dari reseptor membran plasma akan memicu terbentuknya protein adaptor yang membentuk *death-inducing signaling complex*. Adanya sinyal tersebut akan mengaktifkan *caspase*, dengan hasil yang sama (Kumar *et al.*, 2019).

II.5 Antioksidan Endogen

Antioksidan endogen dimanfaatkan sebagai perlawanan tubuh terhadap stress oksidatif bila jumlahnya tidak berlebihan didalam tubuh. Apabila didalam tubuh radikal bebas melewati kapasitas antioksidan endogen, tubuh akan membutuhkan tambahan antioksidan eksogen. Sifat dari antioksidan ini sangat mudah dioksidasi, sehingga radikal bebas dapat mengoksidasi antioksidan dan sel dapat dipertahankan dari kerusakan

akibat oksidasi oleh radikal bebas. Terdapat tiga jenis enzim antioksidan endogen yang dapat mencegah terjadinya stres oksidatif yaitu, superoksida dismutase (SODs), glutathione peroksidase (GPXs), dan enzim katalase (CAT) (Asri Werdhasari, 2014).



Gambar 4. Enzim antioksidan endogen (Pandey and Rizvi, 2010)

Superoxide dismutases (SODs) merupakan enzim antioksidan utama yang berfungsi mengkatalisis pembebasan anion superoksida secara efektif. Terdapat tiga jenis superoksida dismutase berdasarkan aspek biokimia dan molekuler pada mamalia, yaitu *sod1*, *sod2*, dan *SOD3*. Enzim *SOD* yang pertama kali dikarakterisasi adalah *sod1* atau CuZn-SOD yang dapat ditemukan pada sitoplasma intraseluler dan termasuk homodimer yang mengandung tembaga dan seng. Pada *sod2* atau Mn-SOD, enzim ini mengandung mangan yang terletak di dalam mitokondria dan merupakan tetramer yang disintesis. Sedangkan *SOD3* atau EC-SOD, termasuk tetramer yang mengandung tembaga dan seng. Enzim ini

disintesis mengandung peptida sinyal yang mengarahkan ke arah ekstraseluler (Zelko *et al.*, 2002).

Secara *in vitro*, kelompok enzim SOD mengkatalisis O_2^- menjadi H_2O_2 . H_2O_2 kemudian dimetabolisme oleh katalase dan peroksidase menjadi oksigen dan air, sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan dari radikal hidroksil (Zhang *et al.*, 2014; Blackney *et al.*, 2014). Enzim antioksidan SOD, baik pada manusia maupun hewan uji lainnya seperti lalat buah (*Drosophila melanogaster*) memiliki struktur dan fungsi yang sama. Orr *et al.*, 2003 melaporkan bahwa, overekspresi dari enzim antioksidan seperti CuZn-SOD (*sod1*), Mn-SOD (*sod2*), dan katalase dapat memperpanjang umur *Drosophila melanogaster*. Hal ini telah ditunjukkan pada penelitian terkait dengan menggunakan pengenalan DNA *P-element-mediated*, *Drosophila* transgenik yang mengekspresikan *sod1* dan katalase secara berlebih telah diamati memiliki umur yang lebih panjang dan kerusakan oksidatif yang berkurang. Peningkatan ekspresi *sod2* juga dapat memperpanjang umur *Drosophila* (Wang *et al.*, 2018).

II.6 Ekstraksi Asam Nukleat

Isolasi asam nukleat dilakukan untuk memisahkan DNA atau RNA dari bahan lain seperti lemak, karbohidrat, dan protein. Proses amplifikasi dengan metode PCR pada DNA atau RNA dapat diisolasi dari berbagai sumber baik prokariotik maupun eukariotik. Dalam melakukan isolasi DNA, terdapat 3 prinsip secara umum yakni, penghancuran atau lisis, pemisahan DNA atau ekstraksi dari bahan padat, dan pemurnian DNA. Secara umum,

tahapan isolasi DNA dilakukan mulai dari pengambilan sampel, pelisisan dinding atau membran sel, ekstraksi DNA, presipitasi DNA, pemurnian DNA, dan pengawetan DNA. Pada tahapan isolasi DNA, hasil dari isolasi DNA harus terbebas dari kontaminan seperti RNA dan protein yang dapat menyebabkan kegagalan pada keberlangsungan proses PCR. Kontaminan yang diperoleh dapat dipisahkan dengan dilakukannya sentrifugasi. Proses sentrifugasi dengan kecepatan tinggi dapat dengan mudah mengendapkan DNA dan menempel pada dasar *microtube* (Nurhayati and Darmawati, 2017).

Dibandingkan dengan DNA, RNA memiliki sifat yang tidak stabil dan mudah rusak ketika diekstraksi dari jaringan atau sel. Sifat ketidakstabilan pada RNA ini disebabkan karena adanya RNase di dalam darah, semua jaringan, serta terdapat pada sebagian besar bakteri dan jamur di lingkungan. Sehingga, dalam melakukan isolasi RNA dibutuhkan perhatian khusus karena RNA rentan terhadap terjadinya degradasi (Tan and Yiap, 2009).

II.6.1 *Deoxyribosa Nucleic Acid (DNA)*

Nukleotida merupakan unit monomer dari asam nukleat. Setiap nukleotida terdiri dari basa nitrogen heterosiklik, gula pentosa, dan gugus fosfat. Basa nitrogen dapat dibedakan menjadi dua, yaitu purin dan pirimidin. Pada DNA, basa purin terdiri dari adenin (A) dan guanin (G) serta basa pirimidin terdiri dari sitosin (C) dan timin (T). Sedangkan, basa pirimidin RNA terdiri dari sitosin (C) dan urasil (U). Untuk gula pentosa pada

DNA adalah deoksiribosa dan gula pentosa RNA adalah ribosa (*Marks et al., 2020*).

DNA merupakan molekul yang terdiri dari dua untai polinukleotida antiparalel, yang terbentuk dari basa nitrogen yang terdiri dari adenin berpasangan dengan timin dan guanin berpasangan dengan sitosin. Kedua untai DNA akan berjalan berlawanan arah. Satu untai akan melalui arah 5' ke 3', sedangkan untai lainnya akan berjalan melalui arah sebaliknya. Kedua untai DNA ini akan mengikat dan mengelilingi satu sama lain, sehingga membentuk DNA *double helix* (*Marks et al., 2020*).

II.6.2 Ribosa Nucleic Acid (RNA)

Terdapat dua proses dalam menentukan ekspresi gen di dalam sel, yaitu proses transkripsi dan translasi. DNA akan mengalami proses transkripsi yang menghasilkan asam ribonukleat (RNA). Dihasilkan tiga jenis RNA universal dari transkripsi DNA, yaitu mRNA (*Messenger RNA*), rRNA (*Ribosomal RNA*), dan tRNA (*Transfer RNA*). Ketiga jenis RNA ini berpartisipasi dalam proses translasi (sintesis protein). Molekul mRNA akan memberikan informasi genetik dari inti ke sitoplasma, tempat berlangsungnya proses transkripsi pada ribosom, struktur yang mengandung kompleks protein-RNA ribosomal (rRNA). tRNA membawa asam amino ke ribosom yang menyatukan asam amino dalam ikatan peptida untuk membentuk protein. Selama proses translasi, urutan dari basa pada mRNA dibaca tiga-tiga (setiap set terdapat tiga basa yang memiliki sebuah kodon). Pada mRNA urutan kodon akan menentukan

urutan asam amino pada protein. Adanya protein akan menentukan struktur sel dan dapat berfungsi sebagai enzim dalam menentukan reaksi yang berlangsung di dalam sel (Marks *et al.*, 2020).

II.7 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) ditemukan pertama kali oleh Mullis pada tahun 1985. PCR didasarkan pada prinsip penggunaan DNA polymerase yang dilakukan secara *in vitro* dari sekuens DNA tertentu (Nurhayati and Darmawati, 2017). Dengan menggunakan teknik PCR, salinan fragmen DNA dari ekstrak DNA akan teramplifikasi dalam jumlah banyak (Karim, 2016). Selama beberapa tahun terakhir, PCR telah mengembangkan beberapa metode salah satunya adalah metode *Real Time PCR*. Metode ini menjadi metode pengujian yang sering digunakan berdasarkan fluoresensi untuk mendeteksi DNA, RNA dan cDNA. Pada umumnya, prinsip kerja dari *Real Time PCR* adalah mendeteksi dan mengkuantifikasi sinyal fluoresen (Hewajuli and Dharmayanti, 2014).

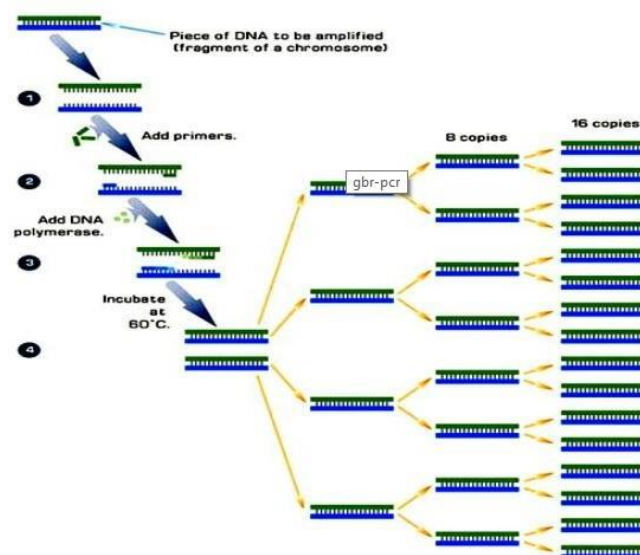


Gambar 5. Alat RT qPCR (Fluor and Red, 2010)

Real Time PCR memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan PCR konvensional. Pada PCR konvensional, untuk

mengamati keberadaan DNA dilakukan penambahan agar elektroforesis pada tahap akhir PCR. Keberadaan DNA dapat diukur dengan menggunakan mesin digital densitometri. Sedangkan pada *Real Time PCR*, keberadaan DNA diamati pada setiap siklus proses amplifikasi PCR terutama pada fase eksponensial. Untuk mendeteksi amplifikasi DNA pada *Real Time PCR* dapat menggunakan *probe* DNA fluoresen (penanda). Penggunaan *probe* yang spesifik dapat meningkatkan spesifisitas pada pengujian *Real Time PCR*. Selain itu, *Real Time PCR* penggunaannya lebih dinamis, dapat melakukan proses pengujian yang lebih banyak, dan risiko terjadinya kontaminasi silang lebih sedikit (Hewajuli and Dharmayanti, 2014).

II.7.1 Prinsip Kerja *Polymerase Chain Reaction (PCR)*



Gambar 6. Siklus PCR (1) Denaturasi pada suhu 90-95 °C; (2) Annealing pada suhu 37-65 °C; (3) Elongasi pada suhu 72 °C; (4) Siklus pertama selesai (Yusuf, 2010)

Adapun prinsip kerja dari PCR terdapat tiga tahapan dalam satu siklus, yaitu (Yusuf, 2010):

a. Denaturasi

Proses denaturasi DNA merupakan pemisahan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Pada siklus pertama, denaturasi dilakukan selama 3 menit untuk membuktikan DNA target telah terdenaturasi membentuk DNA untai tunggal. Apabila selama proses denaturasi mengalami ketidaklengkapan, maka DNA akan berubah menjadi untai ganda kembali secara cepat yang dapat menyebabkan proses PCR mengalami kegagalan. Proses denaturasi dengan interval waktu yang lama, dapat menyebabkan berkurangnya aktivitas dari enzim taq polymerase. Aktifitas pada enzim tersebut memiliki waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit pada suhu masing-masing 92,5 °C, 95 °C, dan 97,5 °C.

b. Annealing

Perancangan suatu primer sebaiknya memiliki ukuran 18-25 basa yang terdapat sekitar 50-60% nukleotida G-C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA pada masing-masing primer sebaiknya tidak saling berkomplemen. Hal tersebut dapat menyebabkan adanya pembentukan struktur sekunder pada primer dan dapat mengurangi kemampuan alat PCR.

Pada PCR, proses annealing dapat dilakukan selama 30-45 detik. Untuk primer yang berukuran panjang, suhu yang digunakan semakin

tinggi. Kisaran suhu penempelan yang digunakan berkisar 36-72 °C. Akan tetapi, suhu yang biasa digunakan berkisar 50-60 °C.

c. Extension

Pada proses *extension* atau perpanjangan primer, enzim *taq polymerase* akan memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Enzim ini akan menyusun nukleotida pada suhu 72 °C dengan menghasilkan sekitar 35-100 nukleotida/detik, yang bergantung pada pH, buffer, konsentrasi garam, dan molekul DNA target. Pada kisaran suhu tersebut, enzim *taq polymerase* dapat menyusun sekitar 2000 nukleotida setiap menitnya. Pada akhir siklus PCR, tahap ini akan diperpanjang sampai 5 menit agar seluruh produk PCR dapat membentuk DNA untai ganda.