

**EKSPLORASI EFEK ETANOL TERHADAP SISTEM
IMUN JALUR SINYAL TOLL DAN IMD PADA HEWAN
UJI *Drosophila melanogaster***

**EXPLORATION OF ETHANOL EFFECTS ON THE
TOLL AND IMD IMMUNE SYSTEM OF MODEL
ORGANISM *Drosophila melanogaster***

**NADILA PRATIWI LATADA
N111 16 053**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**EKSPLORASI EFEK ETANOL TERHADAP SISTEM IMUN JALUR SINYAL
TOLL DAN IMD PADA HEWAN UJI *Drosophila melanogaster***

**EXPLORATION OF ETHANOL EFFECTS ON THE TOLL AND IMD
IMMUNE SYSTEM OF MODEL ORGANISM *Drosophila melanogaster***

SKRIPSI

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

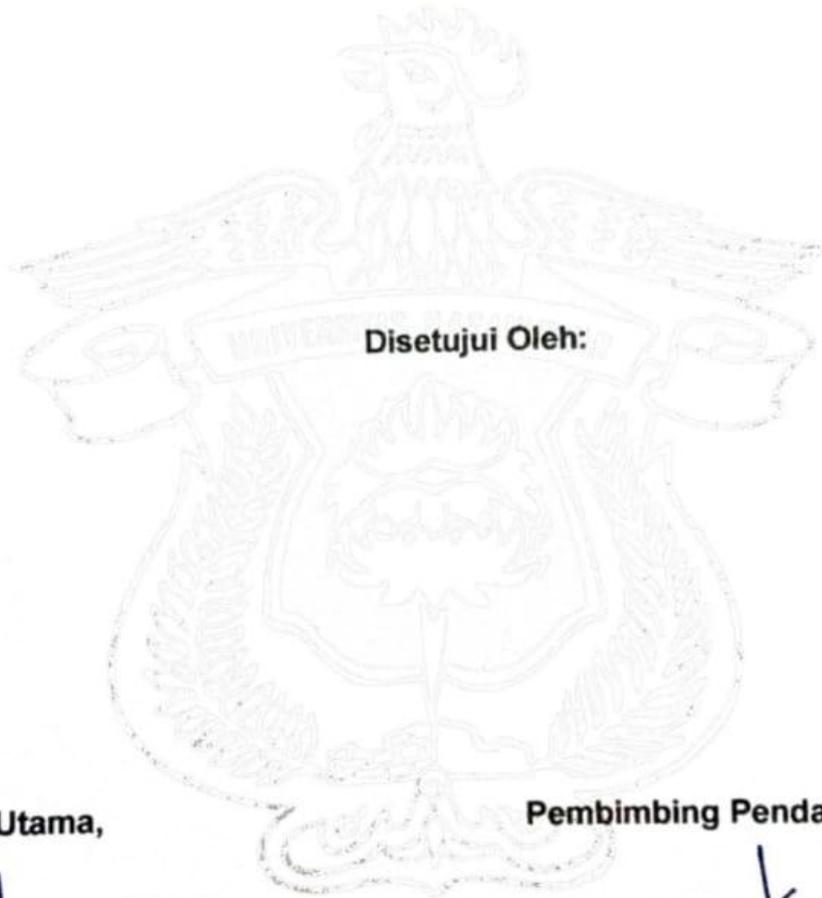
**NADILA PRATIWI LATADA
N111 16 053**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**EKSPLORASI EFEK ETANOL TERHADAP SISTEM IMUN JALUR
SINYAL TOLL DAN IMD PADA HEWAN UJI *Drosophila melanogaster***

NADILA PRATIWI LATADA

N111 16 053



Disetujui Oleh:

Pembimbing Utama,



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

Pembimbing Pendamping,



**Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19780716 200312 2 001**

Pada tanggal, 30 November 2020

**EKSPLORASI EFEK ETANOL TERHADAP SISTEM IMUN JALUR
SINYAL TOLL DAN IMD PADA HEWAN UJI *Drosophila melanogaster***

**EXPLORATION OF ETHANOL EFFECTS ON THE TOLL AND IMD
IMMUNE SYSTEM OF MODEL ORGANISM *Drosophila melanogaster***

Disusun dan diajukan oleh:

**NADILA PRATIWI LATADA
N111 16 053**

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 27 November 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua : Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.
2. Sekretaris : Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt.
3. Anggota : Muh. Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.
4. Anggota : Aminullah, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt

.....
.....
.....
.....
.....



**Mengetahui,
Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin**

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

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Nadila Pratiwi Latada

NIM : N111 16 053

Judul : Eksplorasi Efek Etanol Terhadap Sistem Imun Jalur Sinyal Toll dan Imd Pada Hewan Uji *Drosophila Melanogaster*

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

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

Makassar, 27 November 2020

menyatakan



Nadila Pratiwi Latada
N111 16 053

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah puji syukur kepada Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* atas segala rahmat, karunia, hidayah, dan taufik-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “Eksplorasi Efek Etanol Terhadap Sistem Imun Jalur Sinyal Toll dan Imd pada Hewan Uji *Drosophila melanogaster*” sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi program S1 pada program studi S1 Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini ada banyak pihak yang terlibat memberikan doa, dukungan, bantuan dan nasehat yang tiada hentinya. Pada kesempatan ini, izinkan penulis mengucapkan dengan tulus rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dosen Pembimbing penulis, Bapak Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt. sebagai Pembimbing Utama dan Ibu Dr. Risfah Yulianty , S.Si., M.Si., Apt sebagai Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran dan ilmunya kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
2. Tim Penguji, Bapak Muh. Aswad S.Si., M.Si., Ph.D., Apt, dan bapak Aminullah, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt yang telah memberikan kritik dan saran dalam penyusunan skripsi ini.
3. Dekan dan Wakil Dekan Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan kontribusi dalam pengembangan mutu dan kualitas dari

Fakultas Farmasi sehingga kami dapat menikmati hasil dari apa yang telah dikerjakan.

4. Kedua orangtua, Ayahanda Faisal dan Ibunda Rida yang senantiasa memberikan dukungan dan memotivasi, baik itu materi maupun doa yang tak henti-hentinya dihaturkan kepada penulis. Sehingga penulis dapat menyelesaikan tiap tahapan dengan mudah. Terima kasih juga karena telah hadir dalam setiap kondisi baik suka maupun duka. Terima kasih telah memberikan cinta dan kasih sayang yang tulus serta menjadi pendengar setia penulis dalam mencurahkan isi hati terkait masalah yang dihadapi selama menyusun skripsi ini.
5. Penasehat Akademik yang terhormat Bapak Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt. yang senantiasa sabar dalam memberikan bimbingan, ilmu serta nasehat dari awal perkuliahan hingga penyelesaian tugas akhir.
6. Bapak/Ibu Dosen Fakultas Farmasi yang telah memberikan ilmu, nasehat, dan pengalaman selama penulis menjalani perkuliahan, juga kepada pegawai staf yang telah membantu penulis.
7. Teman-teman angkatan 2016 "NEOSTIGMINE" yang telah bersama-sama dengan penulis berjuang untuk meraih mimpi di Fakultas Farmasi.
8. Teman kelompok penelitian UFRG, Reski Amalia Rosa, Julia Citra Prastika, Sri Wahyuni M, Adila, A. Nurul Annisa, Masita Rahmasari, Fadil Adam Dzaki, Christian Pakadang, dan Putu Grista yang selalu

menyediakan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk sama-sama berjuang dalam proses penelitian. Serta Tri Puspita Roska yang senantiasa memberikan dukungan semangat dalam proses penyelesaian skripsi ini.

9. Teman-teman SG Istiqomah khususnya Bulkis, Vidya Amaliatul Jannah Yusuf, Reski Amalia Rosa, Sri Wahyuni M, Julia Citra Prastika, dan Magfirah *Syukran jazakillahu khairan* yang selalu mengingatkan penulis untuk istiqomah hingga akhir. Serta adik-adik di kepengurusan LD Salsabil FF-UH.

Kepada pihak yang tidak sempat disebutkan namanya, semoga Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* senantiasa memberikan Rahmat Nya kepada kita semua. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga perlu saran dan kritik dari semua pihak. Kiranya skripsi ini dapat memberi manfaat untuk kita semua.

Makassar, 27 November 2020.

Nadila Pratiwi Latada

ABSTRAK

Nadila Pratiwi Latada. “Eksplorasi efek etanol terhadap sistem imun jalur sinyal Toll dan Imd pada Hewan Uji *Drosophila melanogaster*” (dibimbing oleh Firzan Nainu dan Risfah Yulianty).

Etanol merupakan salah satu senyawa yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis. Ketika proses apoptosis terjadi, maka secara alamiah tubuh akan mengaktifkan proses fagositosis untuk mencegah sel apoptosis berkembang menjadi sel nekrotik yang berbahaya. Keberadaan sel nekrotik dianggap dapat memicu aktivasi sistem imun. Aktivasi sistem imun yang berlebih dapat membahayakan bahkan dapat menyebabkan kematian. Bagian sistem imun alamiah *Drosophila* yang telah dikenal secara umum adalah Toll dan Imd. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek etanol terhadap tingkat kesintasan *D. melanogaster* dan pengaruh etanol terhadap jalur sistem imun Toll dan Imd dengan mengukur level ekspresi gen peptida antimikroba, *Drosomycin* untuk jalur Toll dan *Diptericin* untuk jalur Imd. Eksperimen dilakukan menggunakan *D. melanogaster* jenis *w¹¹¹⁸* jantan dan betina. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan etanol dapat mempengaruhi kelangsungan hidup *Drosophila*. Konsentrasi etanol yang tinggi menyebabkan kemampuan bertahan hidup *Drosophila* menjadi berkurang. Paparan etanol juga berdampak terhadap penurunan level ekspresi *Drosomycin* namun tidak memperlihatkan perubahan nyata pada ekspresi *Diptericin*. Sebagai kesimpulan, penelitian ini memperlihatkan efek negatif etanol terhadap tingkat kesintasan *D. melanogaster* dan hal tersebut mungkin dipengaruhi oleh perubahan level ekspresi gen terkait sistem imun pada jalur sinyal Toll.

Kata kunci: Etanol, lalat buah, kesintasan, *Drosomycin*, *Diptericin*.

ABSTRACT

Nadila Pratiwi Latada. “Exploration of Ethanol Effects on the Toll and Imd Immune System of Model Organism *Drosophila melanogaster*” (supervised by Firzan Nainu dan Risfah Yulianty).

Ethanol is one of compounds that can induce apoptosis. Naturally, upon apoptosis induction, host will activate the phagocytosis process to prevent the aberrant development of apoptotic cells into dangerous necrotic cells. Necrotic cells are considered capable to trigger the activation of immune system. Overactivation of immune system is dangerous and can even lead a death. Parts of *Drosophila* innate immune system that have been known are the Toll and Imd pathways. The purpose of this study was to investigate the effect of ethanol exposure on the survivorship of affected *D. melanogaster* and the effect of ethanol on the Toll and Imd immune system by assessing the levels of antimicrobial peptide gene expression, *Drosomycin* for the Toll pathway and *Diptericin* for the Imd pathway. All experiments were conducted using males and females of *D. melanogaster w¹¹¹⁸*. The results of this study indicated that ethanol exposure can affect the survival of *Drosophila*. Ethanol exposure at high concentration was responsible in the decline of fly survival rate. Ethanol exposure also negatively affected the expression level of *Drosomycin*, but did not cause a significant change in the *Diptericin* expression. In conclusion, this study demonstrated the negative effect of ethanol on the fly survival and this might be related to changes in the expression of related genes in the Toll pathway.

Keywords: Ethanol, fruit fly, survival, *Drosomycin*, *Diptericin*.

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB III METODE PENELITIAN	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	31
V.1 Kesimpulan	31
V.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	36

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Konsentrasi RNA hasil isolasi	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Jalur apoptosis intrinsik pada mamalia, <i>Drosophila</i> dan nematoda	8
2. Jalur apoptosis ekstrinsik	9
3. Proses fagositosis oleh sel fagosit	10
4. Sel apoptosis dan nekrosis	11
5. Morfologi <i>Drosophila melanogaster</i>	13
6. Siklus hidup <i>Drosophila melanogaster</i>	14
7. Sistem imun <i>D. melanogaster</i> jalur Toll dan jalur Imd	15
8. Proses PCR	18
9. Uji survival w^{1118} setelah terpapar etanol	25
10. Profil ekspresi gen <i>Drosomycin</i>	27
11. Perbandingan level ekspresi gen <i>Drosomycin</i> antara kontrol sehat w^{1118} dengan w^{1118} yang dipaparkan etanol konsentrasi 65% dan 85%	27
12. Profil ekspresi gen <i>Diptericin</i>	28
13. Perbandingan level ekspresi gen <i>Drosomycin</i> antara kontrol sehat w^{1118} dengan w^{1118} yang dipaparkan etanol konsentrasi 65% dan 85%	29
14. Desain lokasi primer	38
15. Dokumentasi penelitian	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja	36
2. Komposisi pakan <i>fly food</i>	37
3. Desain lokasi primer	38
4. Data hasil konsentrasi RNA	39
5. Dokumentasi penelitian	40

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Alkohol merupakan senyawa dengan rumus kimia $C_nH_{2(n+1)}OH$. Pengonsumsian alkohol sering dikaitkan dengan patogenesis suatu penyakit, diantaranya penyakit hati, kardiovaskular, neurodegeneratif, hingga penyakit terkait sistem imun. Alkohol dalam metabolismenya, menghasilkan produk sampingan yang dapat meningkatkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang akan mengganggu keseimbangan dalam sel dan menyebabkan stres oksidatif dan berujung pada kematian sel (Ikonomidou *et. al.*, 2000; Zakhari, 2006).

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa paparan alkohol secara akut maupun kronik dapat menyebabkan sel mengalami apoptosis dan pada akhirnya menyebabkan kerusakan organ. Rodriguez *et al.*, (2015) melaporkan bahwa, paparan alkohol dosis rendah pada tikus secara terus menerus dapat menyebabkan sel jantung (kardiomiosit) mengalami apoptosis yang berujung pada kerusakan organ jantung. Pada dasarnya, sel yang mengalami apoptosis akan difagositosis oleh sel makrofag beserta sel fagosit lainnya. Namun pada kondisi dimana respon fagositosis rendah (misalnya pada kondisi imunodefisiensi) dan kematian sel secara masif, sel apoptosis yang lolos dari proses fagositosis akan masuk ke dalam tahap kematian sel secara nekrosis (Rogers *et al.*, 2017).

Sel nekrosis memiliki efek negatif terhadap homeostasis karena dapat membahayakan sel sehat di sekelilingnya. Sel nekrosis akan melepaskan beberapa komponen internal yang disebut *damage associated molecular patterns* (DAMPs). Komponen tersebut dapat mengaktifkan sistem imun alamiah (*innate immune system*) sehingga pada akhirnya dapat memicu pembentukan sitokin pro-inflamasi (Schaefer, 2014). Inflamasi dan aktivasi sistem imun yang berlebihan dapat menginduksi kematian sel masif yang dapat berakhir pada kerusakan organ dan kematian (Chen *et al.*, 2017). Dengan demikian, paparan etanol mungkin dapat dikaitkan dengan aktivasi sistem imun alamiah oleh DAMPs.

Pada penelitian modern saat ini, lalat buah menjadi salah satu hewan uji yang telah dikembangkan untuk mempelajari model penyakit secara molekular dan membuka peluang untuk penemuan terapi yang serupa dengan manusia. Hal ini ditunjang oleh kemiripan (sekitar 75%) susunan genetik lalat buah dengan manusia (Pandey and Nichols, 2011). Berdasarkan penelitian Edwin (2018) pemberian etanol secara inhalasi pada lalat buah dapat menginduksi terjadinya apoptosis dan hal tersebut berujung pada kematian. Sel apoptosis yang tidak diproses oleh sel fagosit dapat berakhir menjadi sel nekrosis sehingga berpeluang besar menginduksi sistem imun inang (Nainu *et al.*, 2017). Induksi sistem imun akibat pengeluaran DAMPs dapat menurunkan tingkat kesintasan dan hal tersebut telah dibuktikan menggunakan *Drosophila* (Asri *et al.*, 2019).

Namun sampai saat ini, belum tersedia informasi mengenai potensi etanol dalam menginduksi sistem imun sebagai respon dari munculnya DAMPs dari sel nekrosis.

Sistem imun *Drosophila* secara umum terdiri dari tiga, yaitu sistem imun *Toll Pathway*, *Immune deficiency (Imd)*, dan JAK-STAT. Ketiga jalur tersebut memiliki peran yang sangat besar terhadap pertahanan tubuh *Drosophila*. Beberapa sistem imun *Drosophila* ini homolog dengan sistem imun yang terdapat pada manusia seperti *Toll pathway* (Toll-1) pada *Drosophila* homolog dengan sistem imun *Toll-Like Receptor (TLR) pathway* pada manusia. Selain itu, sistem imun jalur Imd *Drosophila* homolog dengan sistem imun TNF (*Tumor Necrosis Factor*) pada manusia (Buchon *et al.*, 2014). Berdasarkan hal tersebut, peneliti ingin mengeksplorasi pengaruh etanol terhadap sistem imun dan kemungkinan mekanisme terjadinya kematian akibat paparan etanol dihubungkan dengan kondisi sistem imun menggunakan parameter ekspresi gen sistem imun jalur Toll dan Imd pada *Drosophila melanogaster*.

I.2. Rumusan Masalah

Apakah paparan alkohol terhadap *Drosophila* memiliki pengaruh terhadap sistem imun pada jalur Toll dan Imd?

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui efek paparan alkohol terhadap sistem imun jalur Toll dan Imd pada *Drosophila melanogaster* berdasarkan parameter

ekspresi gen *Drs* (*Drosomycin*) pada jalur Toll dan *Dpt* (*Diptericin*) pada jalur Imd.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Etanol

Etanol adalah golongan senyawa alkohol dengan rumus kimia C_2H_5OH . Etanol secara umum banyak digunakan dalam bidang kesehatan, penelitian dan dikonsumsi oleh manusia sebagai campuran dalam minuman. Etanol merupakan molekul polar kecil yang larut air sehingga mudah diabsorpsi masuk menuju sirkulasi darah (Boyle *et al.*, 2013, Dasgupta, 2015). Proses absorpsi etanol secara umum dipengaruhi oleh kondisi makanan yang dicerna dalam lambung dan usus halus. Jika lambung dan usus halus dalam kondisi kosong, etanol akan lebih cepat diabsorpsi masuk kedalam sirkulasi darah (Educ Alcohol, 2012).

Secara umum, proses metabolisme senyawa etanol melibatkan jalur oksidatif dan non-oksidatif. Metabolisme etanol jalur oksidatif utamanya terjadi di sel hepatosit melalui tiga sistem yang berbeda. Proses ini melibatkan enzim ADH (Alkohol dehidrogenase) yang banyak terdapat pada sitosol, enzim CYP2E1 pada retikulum endoplasma, dan enzim katalase pada peroksisom. Ketiga enzim tersebut berfungsi merubah senyawa alkohol menjadi senyawa asetaldehid yang bersifat reaktif dan berbahaya bagi tubuh. Asetaldehid dalam mitokondria kemudian diubah oleh enzim ALDH (Asetaldehid dehidrogenase) menjadi asam asetat yang tidak berbahaya bagi tubuh (Zakhari, 2006).

Konsumsi etanol dalam jumlah sedang, memiliki banyak manfaat di bidang kesehatan namun manfaat tersebut akan hilang seiring dengan konsumsi yang berlebihan. Beberapa penelitian telah membuktikan penggunaan etanol dapat menyebabkan kerusakan sel tingkat molekuler. Pada penelitian Rodriguez *et al.*, (2015), membuktikan induksi etanol pada tikus dapat menyebabkan sel jantung pada tikus tersebut mengalami apoptosis. Selain itu, pada penelitian Chen *et al.*, (2012), membuktikan induksi etanol pada *Drosophila* dapat menyebabkan sel mengalami apoptosis. Beberapa penelitian lain juga menyebutkan bahwa induksi etanol dapat menyebabkan kerusakan jaringan-jaringan penting pada tubuh seperti jaringan hati, mukosa lambung, kelenjar saliva, kelenjar limfa, dan otak (Chen *et al.*, 2012).

Konsumsi etanol berlebihan secara terus menerus menyebabkan gangguan penyalahgunaan alkohol atau AUD (*Alcoholic Use Disorder*) (Dasgupta, 2015). Menurut data WHO, 2018 tercatat sekitar 3 juta jiwa meninggal akibat gangguan penyalahgunaan etanol. Perilaku mengkonsumsi etanol secara berlebihan juga dapat menyebabkan ketergantungan, merusak organ otak, hati, dan ginjal, serta menyebabkan beberapa penyakit seperti demensia, penyakit hati, hipertensi, penyakit imunitas, kardiomiopati, meningkatkan resiko kanker dan penyakit neurodegeneratif (Ikonomidou *et al.*, 2000).

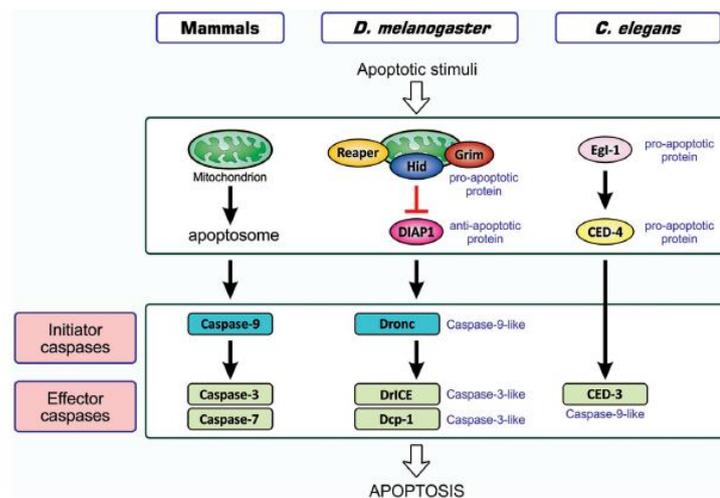
II.2 Apoptosis

Salah satu bentuk kematian sel yang telah dikenal secara luas adalah apoptosis. Apoptosis merupakan proses alamiah tubuh untuk mempertahankan homeostasisnya. Apoptosis ini juga dikenal sebagai proses kematian sel yang terprogram, dimana sel-sel tubuh yang rusak akan diubah menjadi fragmen yang mudah dikonsumsi atau dihilangkan oleh sel-sel fagosit tanpa mengganggu fungsi sel normal yang lainnya (Gregory, 2016).

Secara umum, apoptosis sel diperantarai oleh aktivitas enzim caspase (*cysteine aspartyl-specific protease*) dan melibatkan jalur intrinsik (jalur mitokondria) dan ekstrinsik (jalur reseptor kematian) yang diaktivasi oleh sinyal intraseluler dan sinyal ekstraseluler. Aktivasi proses apoptosis oleh sinyal intraseluler disebabkan oleh adanya kerusakan DNA, kekurangan hormon pertumbuhan, dan kekurangan sitokin, sedangkan sinyal ekstraseluler yang paling umum adalah adanya respon sistem imun terhadap sel yang rusak atau terinfeksi berupa sinyal penginduksi kematian dari sel T sitotoksik (Pfeffer and Singh, 2018).

Pada jalur apoptosis secara intrinsik, mitokondria akan melepaskan sitokrom c sebagai respon terhadap pemicu apoptosis. Selanjutnya, sitokrom c berikatan dengan protein adaptor Apaf-1 membentuk apoptosom. Selanjutnya, Caspase-9 (protein yang menginisiasi caspase) akan berinteraksi dengan apoptosom dan menjadi teraktifasi. Caspase-9 yang teraktifasi selanjutnya membelah dan mengaktifkan efektor caspase

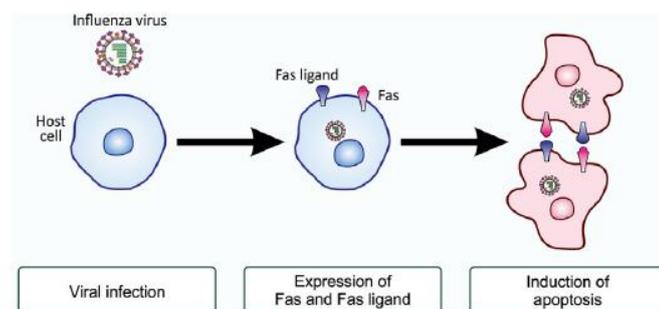
seperti caspase-3 dan caspase-7 yang akan mengarah kepada apoptosis. Aktivitas dari caspase-9, -3, -7 dapat mengalami penghambatan oleh adanya *Inhibitor Apoptosis Protein* (IAP). Penghambatan ini dapat dihilangkan dengan adanya protein pro-apoptosis (antagonis IAP) yang juga dilepaskan dari mitokondria (Branner and Mak, 2009).



Gambar 1. Jalur apoptosis intrinsik pada mamalia, drosophila dan nematoda (Nainu et al., 2017)

Sebaliknya, jalur apoptosis secara ekstrinsik dipicu oleh adanya aktivasi permukaan reseptor sel kematian. Terdapat sebuah ligan yang dapat mengaktivasi reseptor kematian ini, yang disebut dengan TNF (*Tumor Necrosis Factor*) yang merupakan kelompok sitokin. Ketika ligan TNF berikatan dengan reseptornya yaitu TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) maka akan menyebabkan pelepasan berbagai kompleks protein yang memicu kematian sel. Komponen protein utama yang secara umum berperan dalam proses ini yaitu caspase-8, yang menginisiasi enzim caspase. Setelah caspase-8 teraktivasi, selanjutnya akan membelah dan mengaktifkan efektor caspase, seperti caspase-3, dan -7 yang memicu

apoptosis atau mengaktifkan jalur intrinsik untuk lebih meningkatkan respon apoptosis. Caspase-8 juga menonaktifkan interaksi antara dua reseptor serin/threonin protein kinase (RIPKs), RIPK1, dan RIPK3, yang dapat memicu nekroptosis (nekrosis yang terprogram) jenis lain dari apoptosis. Sehingga, ketika caspase-8 terhambat atau berkurang, maka TNF dan TNFR dapat menyebabkan nekroptosis melalui aktifitas RIPK1 dan RIPK3 (Danial and Korsmeyer, 2004; Aggarwal *et al.*, 2012; Brenner *et al.*, 2015; Kantari and Walczak, 2011; Vandenabele *et al.*, 2010).



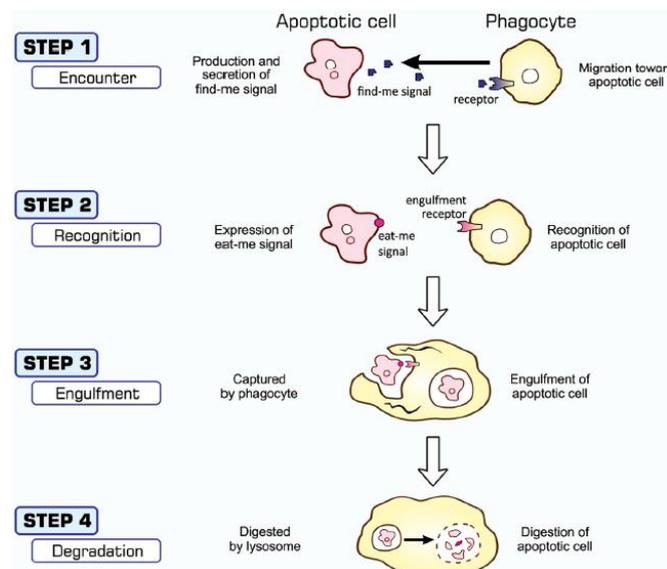
Gambar 2. Jalur apoptosis ekstrinsik (Nainu *et al.*, 2017)

Sel yang mengalami apoptosis selanjutnya akan melepaskan sinyal pada permukaannya, sehingga dapat dikenali oleh sel-sel fagosit untuk kemudian dapat difagositosis. Sinyal yang dilepaskan oleh sel apoptosis ini diantaranya *find me signal*, *eat me signal*, dan *don't eat me signal*. (Nainu *et al.*, 2017).

II.3 Fagositosis

Proses fagositosis merupakan suatu proses dimana sel yang mengalami kerusakan akan dihilangkan oleh sel-sel fagosit sehingga tidak mengganggu sel-sel normal disekitarnya. Proses ini penting bagi tubuh

untuk menjaga homeostasis jaringan. Sel fagosit tidak hanya dapat menelan atau mencerna mikroba patogen, tetapi juga dapat mencerna sel-sel apoptosis. Sel fagosit yang berperan dalam menghilangkan mikroorganisme dan mempresentasikannya kedalam sistem imun adaptif meliputi monosit, makrofag, neutrofil, sel dendritik, osteoklas, dan eosinofil. Selain itu, sel fagosit berupa fibroblas, sel epitel, dan sel endotel juga melakukan fagositosis yang berperan penting dalam mencerna sel-sel apoptosis (Gordon, 2016).

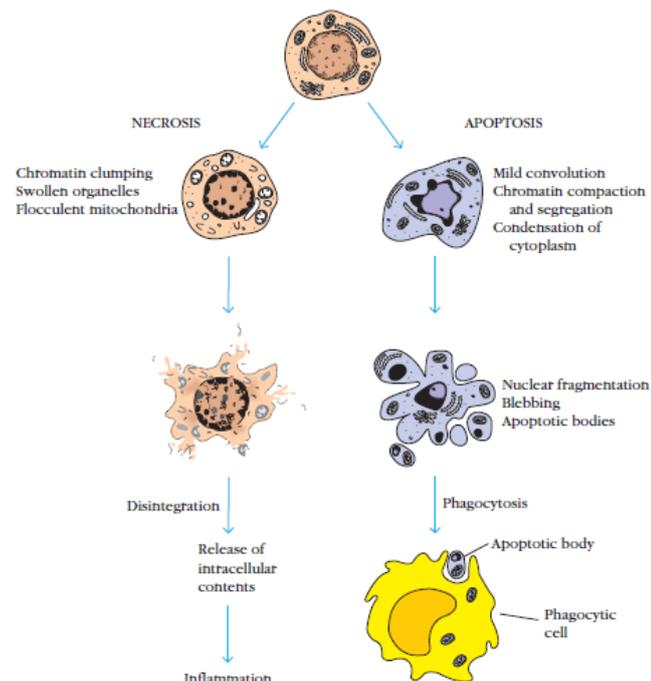


Gambar 3. Proses fagositosis oleh sel fagosit (Nainu et al., 2017)

Proses Fagositosis ini diawali dengan sel apoptosis melepaskan suatu senyawa yang disebut dengan *find me signal* untuk menstimulasi sel fagosit mendekati sel apoptosis. Selanjutnya sel fagosit akan mengenali sel apoptosis dari signal yang diekspresikan oleh sel apoptosis yaitu *eat me signal* dengan bantuan reseptor yang ada pada permukaan sel fagosit. Ketika signal tersebut dilepaskan dan bertemu dengan

reseptor yang sesuai, maka akan membentuk pseudopodia, yaitu sebuah membran plasma yang mengelilingi sel untuk mencerna sel tersebut. Sel apoptosis kemudian bergabung membentuk membran vesikel yang disebut dengan fagosom. Fagosom selanjutnya menyatu dengan lisosom membentuk fagolisosom. Selanjutnya komponen sel yang mengalami apoptosis tersebut akan dicerna dengan bantuan aktivitas enzim lisosom (Nainu *et al.*, 2017).

II.4 Nekrosis



Gambar 4. Sel apoptosis dan nekrosis (Owen *et al.*, 2013)

Berbeda dengan apoptosis, nekrosis dikenal sebagai proses kematian sel yang terjadi akibat adanya kerusakan pada sel tersebut. Kerusakan pada sel bisa diakibatkan oleh adanya infeksi patogen sehingga dapat mengaktifkan kerja sistem imun. Pada proses nekrosis, sel yang rusak akan pecah dan mengeluarkan organelnya, sehingga memicu

terjadinya respon inflamasi. Sel nekrosis ini berbahaya karena dapat mempengaruhi sel sehat disekelilingnya (Owen *et al.*, 2013)

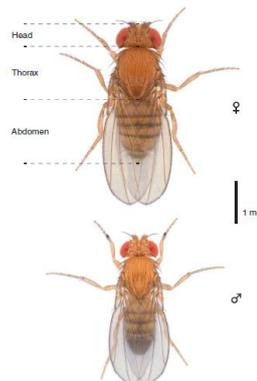
Selain karena adanya kerusakan sel, nekrosis juga dapat terjadi akibat adanya sel apoptosis yang tidak mengalami proses fagositosis. Integritas dari membran sel yang mengalami apoptosis akan berkurang, sehingga, jika tidak segera difagositosis, sel ini akan mengalami tahap apoptosis sekunder atau yang disebut apoptosis-nekrosis (Fink and Cookson, 2005).

II.5 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, yang juga biasa dikenal dengan nama lalat buah atau lalat cuka (*vinegar fly*), merupakan spesies serangga yang mulai diperkenalkan oleh Thomas Hunt Morgan pada awal tahun 1900-an sebagai organisme uji dalam penelitian di bidang genetika (Markow, 2015). Penggunaannya sebagai hewan uji alternatif dalam penelitian modern saat ini menjadi pusat perhatian. Ada banyak contoh penelitian menggunakan *D. melanogaster* sebagai model dalam mempelajari fenomena biologis yang juga terdapat pada manusia hingga patogenesis penyakit-penyakit pada manusia, diantaranya mempelajari peran apoptosis dan fagositosis serta kaitanya dengan sistem imun, mempelajari patogenesis dari penyakit-penyakit infeksi, neurodegeneratif, kanker, kardiovaskular, dan sindrom metabolik (Nainu *et al.*, 2015; Nainu *et al.*, 2017).

Walaupun memiliki ukuran tubuh yang kecil dan fenotip yang tidak serupa dengan manusia, serangga ini memiliki susunan genetika yang homolog dengan manusia sekitar 75%. Selain itu serangga ini juga menawarkan beberapa kelebihan jika dibandingkan dengan organisme model yang lain, yaitu pemeliharaan yang mudah dan ekonomis, memiliki siklus hidup sangat singkat yang memungkinkan untuk beregenerasi secara cepat dalam jumlah yang besar, sehingga dapat mengefisienkan waktu dalam meneliti (Pandey and Nichols 2011; Hales *et al.*, 2015; Nainu, 2018).

II.5.1 Klasifikasi *Drosophila*



Gambar 5. Morfologi *Drosophila melanogaster* (Chyb and Gompel, 2013)

Berikut klasifikasi *Drosophila melanogaster* berdasarkan *Japan*

Drosophila Database:

Kingdom: Animalia

Filum: Arthropoda

Class: Insecta

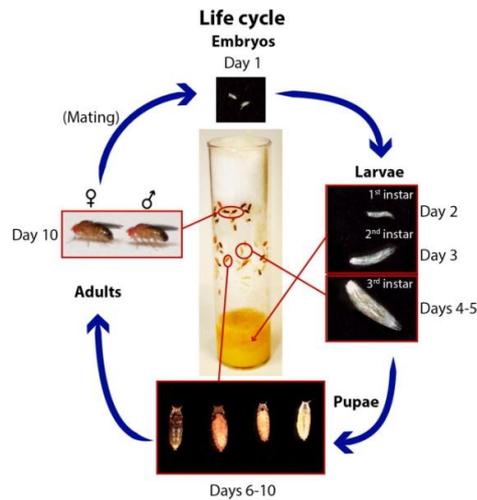
Ordo: Diptera

Family: Drosophilidae

Genus: *Drosophila*

Spesies: *Drosophila melanogaster*

II.5.2 Siklus hidup *Drosophila*



Gambar 6. Siklus hidup *Drosophila melanogaster* (Hales et al., 2015)

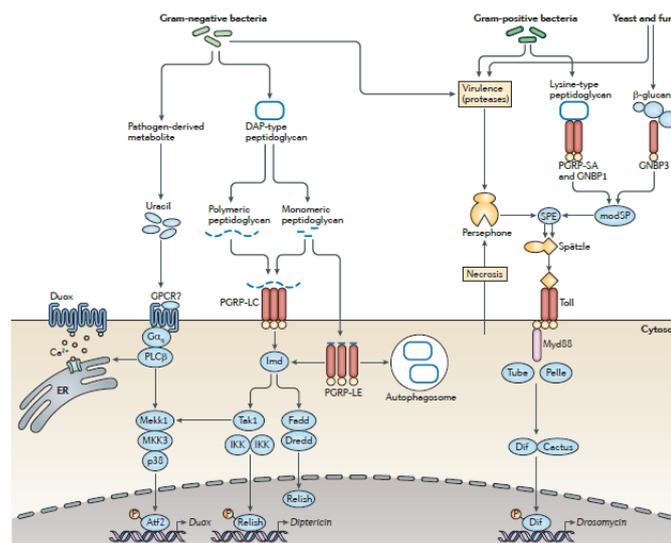
Proses perkembangbiakan *Drosophila melanogaster* rata-rata membutuhkan waktu sekitar 9-10 hari pada suhu 25°C. Setelah terjadi pembuahan, terbentuklah embrio yang selanjutnya menetas dari telur dan berkembang menjadi larva dalam 3 tahapan, yang disebut larva instar pertama, kedua, dan ketiga, dimana masing-masing membutuhkan waktu 1 hari dalam perkembangannya. Selanjutnya dibutuhkan waktu 2 – 3 hari untuk larva instar ketiga bermetamorfosis menjadi pupa/kepompong, dan adanya sisi gelap di dalam kepompong menunjukkan bahwa proses pematangan struktur tubuh lalat hampir lengkap. Setelah 4-5 hari, lalat dewasa keluar dari kepompong dan dalam waktu 8-12 jam siklus hidup *D. melanogaster* akan terulang kembali (Hales et al., 2015).

II.5.3 Sistem Imun Drosophila

Secara umum, *Drosophila melanogaster* memiliki tiga sistem utama, yaitu sistem imun jalur Toll, jalur Imd (*Immune deficiency*), dan jalur JAK-STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*). Ketiga jalur sistem imun ini diaktivasi oleh jenis patogen yang berbeda, dan menghasilkan peptida anti-mikroba (*Antimicrobial peptide*) yang berbeda pula (Buchon *et al.*, 2014).

II.5.3.1 Sistem Imun Jalur Toll dan Imd

Sistem imun jalur Toll dan Imd pada *Drosophila* merupakan dua sistem imun yang secara umum merespon terhadap bakteri dan fungi. Secara spesifik, sistem imun jalur Toll merespon terhadap patogen berupa bakteri Gram positif, dan yeast/fungi. Sedangkan sistem imun jalur Imd merespon terhadap bakteri Gram negatif (Buchon *et al.*, 2014).



Gambar 7. Sistem imun *D. melanogaster* jalur Toll dan jalur Imd (Sumber: Buchon *et al.*, 2014)

Sistem imun jalur Toll atau yang dikenal sebagai *Toll-1* pada *Drosophila* homolog dengan *myeloid differentiation primary response protein 88* (Myd-88) *Toll-like receptor* (TLR) yang ada pada mamalia. Jalur Toll ini terdapat pada jaringan lemak, dimana jalur sistem imun ini bekerja sama dengan sistem imun jalur Imd, yang berada pada permukaan sel epitel dalam memproduksi AMP (*Antimicrobial peptide*). Jalur sistem imun Toll akan teraktivasi oleh adanya reseptor yang mengenali peptidoglikan yang dimiliki oleh bakteri Gram positif dan beberapa bakteri Gram negatif, β -Glukan yang ada pada *yeast* atau fungi, serta adanya sinyal seperti kematian sel yang tidak normal, kemudian akan mengekspresikan AMP *Drosomycin*. Sistem imun jalur Imd akan teraktivasi oleh adanya reseptor yang mengenali peptidoglikan yang dimiliki oleh bakteri Gram negatif kemudian akan mengekspresikan AMP *Diptericin*. (Buchon *et al.*, 2014).

II.6 Ekstraksi Asam Nukleat

Asam nukleat kini banyak digunakan dalam penelitian ilmiah melalui pendekatan biologi molekular. Asam nukleat merupakan makromolekul yang tersimpan di dalam sel, tersusun dari unsur karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen, dan fosfor. Asam nukleat terbagi menjadi dua jenis, yaitu DNA dan RNA. Untuk memperoleh asam nukleat, perlu adanya proses ekstraksi dengan menggunakan larutan penyangga (*buffer*) khusus. Larutan yang digunakan diharapkan mampu menjaga kondisi asam nukleat secara kualitatif maupun kuantitatif. Secara kualitatif, artinya larutan *buffer* harus dapat mengeluarkan asam nukleat tertentu tanpa

adanya kontaminasi dari molekul-molekul lainnya, sedangkan secara kuantitatif, larutan *buffer* harus dapat mempertahankan jumlah asam nukleat yang diperoleh (tidak mudah terdegradasi/rusak) agar dapat digunakan dalam tahapan selanjutnya (Santoso dan Santri 2016: Marwayana, 2015).

II.6.1 DNA (*Deoxyribosa Nucleic Acid*)

DNA merupakan salah satu bentuk polimer asam nukleat yang membawa informasi genetik makhluk hidup. DNA berbentuk untai ganda (*double helix*) yang tersusun atas dua rantai polinukleotida yang berpilin. Kedua rantai ini memiliki orientasi yang berlawanan satu sama lain. Rantai yang satu memiliki orientasi dari 5'→3', sedangkan rantai yang lain berorientasi dari 3'→5'. Rantai nukleotida DNA terdiri atas gula pentosa (bentuk deoksiribosa), gugus posfat, dan basa nitrogen yang terdiri atas basa purin (*adenine* (A) dan *guanine* (G)) dan pirimidin (*thymine* (T), *cytosine* (C)). Diantara kedua rantai tersebut terdapat ikatan hidrogen yang mengikat antara rantai satu dengan yang lain. Ikatan antara basa *adenine* (A) dan *thymine* (T) terdiri dari dua ikatan hidrogen. Sedangkan antara basa *guanine* (G) dan *cytosine* (C) terdapat tiga ikatan hidrogen (Yuwono, 2005).

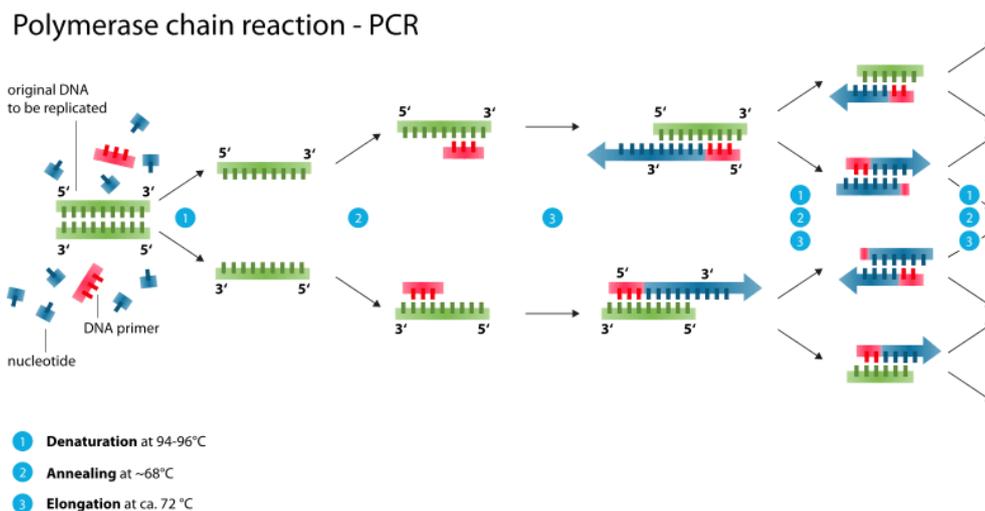
II.6.2 RNA (*Ribonucleic Acid*)

RNA merupakan bentuk nukleotida rantai tunggal hasil transkripsi DNA yang berfungsi untuk menghasilkan protein spesifik yang berperan dalam metabolisme tubuh. Struktur RNA terdiri dari gula pentosa (bentuk

ribosa), gugus posfat, dan basa nitrogen yang terdiri atas basa purin (*adenine* (A) dan *guanine* (G)) dan pirimidin (*uracil* (U), *cytosine* (C)). Terdapat beberapa jenis RNA yang memiliki bentuk dan fungsi yang berbeda, diantaranya: *messenger* RNA (mRNA), *transfer* RNA (tRNA), dan *ribosomal* RNA (rRNA), namun, ketiga jenis RNA ini diperlukan dalam proses sintesis protein (Santoso dan Santri, 2016).

II.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Saat ini, PCR telah digunakan secara meluas dalam bidang forensik, diagnosis genetika dan mikrobiologi, serta manipulasi dan rekayasa genetika. Teknik ini banyak digunakan dalam diagnosa klinik maupun penelitian modern, karena cukup spesifik, efisien dan memiliki derajat keberhasilan yang cukup tinggi. Reaksi PCR melibatkan beberapa tahap dalam suatu mesin yang dapat mengatur perubahan suhu secara cepat (*thermal cycler*) (Soewoto dkk, 2001).



Gambar 8. Proses PCR (Sumber: <https://microbiologyinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-types-applications-and-animation/>)

Tahap pertama adalah denaturasi DNA yaitu dengan cara meningkatkan temperatur hingga kurang lebih 94°C selama 1 menit sehingga terjadi pemisahan dari untai ganda DNA. Tahap kedua adalah tahap *annealing*/ hibridisasi yaitu penempelan oligonukleotida primer. Pada tahap ini suhu reaksi diturunkan menjadi 50°C hingga 62°C selama 1 menit agar oligonukleotida dapat menempel pada DNA. Tahap ketiga adalah tahap pemanjangan rantai, yaitu dengan cara memanaskan kembali komponen-komponen reaksi pada suhu 72°C selama 1 menit sehingga primer dapat diperpanjang oleh enzim DNA polymerase hingga mencapai seluruh panjang dari DNA sasaran. Ketiga tahap ini diulang sebanyak 25 hingga 35 kali (Soewoto dkk, 2001).

Setiap DNA dupleks pada siklus pertama akan membentuk dua untai DNA sehingga seluruhnya terdapat 4 untai DNA. Selanjutnya selama siklus kedua, keempat untai ini akan berfungsi sebagai cetakan dan akan dihasilkan 8 untai DNA. Pada akhir dari siklus kedua akan terbentuk polinukleotida yang panjangnya hanya terbatas dari satu primer ke primer lainnya. Fragmen DNA ini disebut *Amplikon*. Siklus selanjutnya akan menghasilkan penggandaan dari jumlah amplikon (Soewoto dkk, 2001).

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Autoklaf (Hirayama[®]), oven (Memmert[®]), alat-alat gelas, botol kultur *Drosophila melanogaster*, zoom stereo microscope (Motic[®]), papan CO₂ (CO₂ stage), BSC II (Biosafety Cabinet Class II), Thermal cycler qPCR (RotoGene Q, Qiagen[®]), pinset (Taiyo electric), timbangan analitik (Sartorius), micropestle (Geneaid[®]), vial *Drosophila* (Biologix[®]).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸* (Laboratory Host Defense and Responses, Kanazawa University), pakan *Drosophila*, etanol (Merck[®]), aquadest, pipet mikro (Pipetman[®]), microtube (Gene follower[®]), kapas, kit SV Total RNA Isolation System (Promega[®]), kit GoTaq[®] 1-Step RT-qPCR System (Promega[®]), Treff tube (Treff lab), Stopper plugs, tips filter mikropipet (Rainin[®]), tube PCR, satu set primer *rp49*, *Drs* dan *Dpt*.

III.2 Metode Kerja

III.2.1 Penyiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸* sebanyak 150 ekor dewasa, jantan dan betina berumur 4-7 hari yang disimpan dalam botol berisi pakan *Drosophila melanogaster*. Penyimpanan dijaga pada suhu 25°C.