

**EFEK VITAMIN C TERHADAP FUNGSI KOGNITIF
DROSOPHILA TRANSGENIK YANG
MENGEKSPRESIKAN AMILOID-BETA ($A\beta$)**

**THE EFFECT OF VITAMIN C ON THE COGNITIVE
FUNCTION OF TRANSGENIC DROSOPHILA
EXPRESSING BETA-AMYLOID ($A\beta$)**

**GIMAS FATIR BIJAKSANA
N011201059**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**EFEK VITAMIN C TERHADAP FUNGSI KOGNITIF DROSOPHILA
TRANSGENIK YANG MENGEKSPRESIKAN AMILOID-BETA (A β)**

**THE EFFECT OF VITAMIN C ON THE COGNITIVE FUNCTION OF
TRANSGENIC DROSOPHILA EXPRESSING BETA-AMYLOID (A β)**

SKRIPSI

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

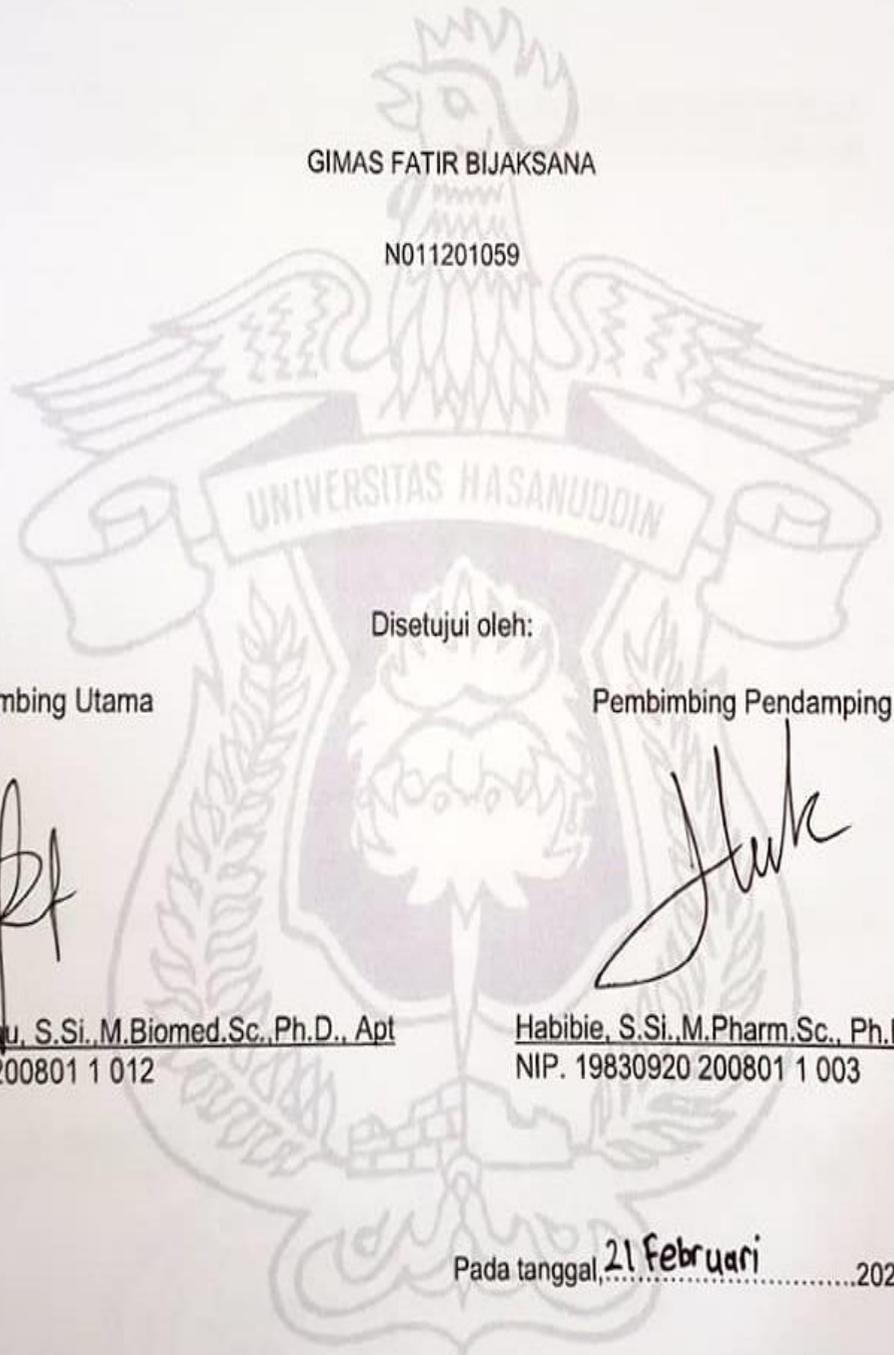
**GIMAS FATIR BIJAKSANA
N011201059**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

EFEK VITAMIN C TERHADAP FUNGSI KOGNITIF DROSOPHILA TRANSGENIK
YANG MENGEKSPRESIKAN AMILOID-BETA ($A\beta$)

GIMAS FATIR BIJAKSANA

N011201059



Disetujui oleh:

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

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

Habibie, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt
NIP. 19830920 200801 1 003

Pada tanggal, 21 Februari2024

SKRIPSI
EFEK VITAMIN C TERHADAP FUNGSI KOGNITIF DROSOPHILA
TRANSGENIK YANG MENGEKSPRESIKAN AMILOID-BETA ($A\beta$)

THE EFFECT OF VITAMIN C ON THE COGNITIVE FUNCTION OF
TRANSGENIC DROSOPHILA EXPRESSING BETA-AMYLOID ($A\beta$)

Disusun dan diajukan oleh :

GIMAS FATIR BIJAKSANA
N011201059

telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 13 Februari 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Pembimbing Utama



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

Pembimbing Pendamping



Habibie, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19830920 200801 1 003



Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

Numasni Hesar, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc. Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

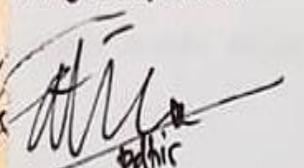
Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar adalah hasil karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan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

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

Makassar, 13 Januari 2024



Yang menyatakan


Gimas Fatir Bijaksana
N011201059

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim, segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu wa ta'ala atas berkat, rahmat, dan kehidupan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Tidak ada persembahan terbaik yang dapat penulis berikan selain ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penyelesaian skripsi ini. Maka pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan banyak terima kasih, yaitu kepada:

1. Bapak Prof. Firzan Nainu, S.Si.,M.Biomed.Sc.,Ph.D., Apt selaku pembimbing utama yang telah membimbing, memberikan arahan, saran dan motivasi, serta telah meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Bapak Habibie, S.Si.,M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt selaku pembimbing pendamping yang telah membimbing, memberikan masukan serta saran dan telah meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
3. Ibu Prof. Yulia Yusrini Djabir, S.Si.MBMSc., M.Si.,Ph.D., Apt. dan Dr. Risfah Yulianty, 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.

5. Teman-teman UFRG 2019 dan 2020 serta kakak program Magister yang selalu memberikan ilmu, bantuan, dan selalu kompak dalam menyelesaikan penelitian ini.
6. Teman-teman seperjuangan saya, Dramafess, Baruga Jameela, Micro_Lembut 2020, Sobat MKU yang telah memberikan dukungan dan doa kepada penulis dalam menyusun skripsi.
7. Teman-teman angkatan 2020 (HE20IN), yang telah memberikan banyak kenangan, dukungan, dan pengalaman yang tidak terlupakan selama menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari 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 dan dipergunakan sebaik baiknya.

Makassar, 13 Januari 2024



Ghinas Fatir Bijaksana

ABSTRAK

GIMAS FATIR BIJAKSANA. *Efek Vitamin C terhadap Fungsi Kognitif Drosophila Transgenik yang Mengekspresikan Amiloid-beta ($A\beta$)* (dibimbing oleh Firzan Nainu dan Habibie).

Latar belakang. Saat ini sekitar 50 juta individu di seluruh dunia menderita penyakit Alzheimer, terutama populasi lansia diatas 65 tahun. Penyakit ini ditandai dengan penurunan fungsi kognitif secara progresif akibat pembentukan plak oleh agregasi amiloid-beta ($A\beta$) di daerah otak. Sebagai upaya dalam penghambatan terkait penurunan fungsi kognitif pada penyakit Alzheimer digunakan antioksidan seperti vitamin C yang bertindak sebagai agen neuroprotektif yang dapat menetralkan keadaan stress oksidatif akibat keberadaan radikal bebas seperti ROS sehingga gangguan fungsi kognitif pada penderita Alzheimer dapat berkurang. **Metode.** Penelitian dilakukan pada tujuh kelompok berbeda dengan lalat transgenik, seperti w^{1118} , $UAS-A\beta42$, dan $GAL4$. Pada kelompok I merupakan kontrol *genetic background* (w^{1118}), kelompok II-IV merupakan kelompok tanpa perlakuan vitamin C dengan lalat $UAS-A\beta42$ dan $GAL4$. Terakhir, kelompok V-VII adalah kelompok dengan perlakuan vitamin C dengan lalat $GAL4/UAS-A\beta42$, dengan masing-masing konsentrasi seperti 0.5, 2.5, dan 4.5 mM. Semua lalat dalam tiap kelompok disilangkan dan larva instar 3 hasil persilangan dipindahkan kedalam pakan baru. Terakhir, dilakukan uji kelangsungan hidup, lokomotor, peningkatan kognitif (*T-Maze*), dan analisis gen. **Hasil.** Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian vitamin C pada konsentrasi 0.5, 2.5, dan 4.5 mM mampu memberikan efek perlindungan pada sel saraf dari kerusakan akibat radikal bebas seperti ROS sehingga penurunan kemampuan fungsi kognitif dapat dihambat yang ditunjukkan dengan adanya perbedaan signifikan dari pengujian kelangsungan hidup, kemampuan lokomotor, dan peningkatan kemampuan kognitif jika dibandingkan dengan kelompok tanpa pemberian vitamin C.

Kata kunci : Alzheimer, stress oksidatif, vitamin C, fungsi kognitif

ABSTRACT

GIMAS FATIR BIJAKSANA. The Effect of Vitamin C on the Cognitive Function of Transgenic *Drosophila* Expressing Beta-amyloid (A β) (supervised by Firzan Nainu and Habibie).

Background. Approximately 50 millions people worldwide suffer from Alzheimer's disease, particularly those over 65. Alzheimer's disease is characterized by progressive cognitive decline caused by amyloid beta (A β) plaques forming in brain regions. Antioxidants such as vitamin C, which act as neuroprotective agents that can neutralize the state of oxidative stress due to the presence of free radicals such as ROS, are used to inhibit the decline in cognitive function in Alzheimer's disease. **Methods.** The study was conducted in seven different groups with transgenic flies, such as *w¹¹¹⁸*, *UAS-A β 42*, and *GAL4*. Group I was the genetic background control's (*w¹¹¹⁸*), groups II-IV were groups without vitamin C treatment with *UAS-A β 42* and *GAL4* flies. Finally, groups V-VII are groups with vitamin C treatment with *GAL4/UAS-A β 42* flies, with each concentration such as 0.5, 2.5, and 4.5 mM. All flies in each group were crossed and the crossed 3rd instar larvae were transferred to a new diet. Finally, survival, locomotor, cognitive enhancement (T-Maze), and gene analysis tests were conducted. **Results.** The administration of vitamin C at concentrations 0.5, 2.5, and 4.5 mM is able to provide a protective effect on nerve cells from damage due to free radicals such as ROS so that the decline in cognitive function ability can be inhibited as indicated by a significant difference from the survival test, locomotor ability, and cognitive ability improvement when compared to the group without vitamin C administration.

Keywords: Alzheimer, Oxidative stress, Vitamin C, Cognitive Function

DAFTAR ISI

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Alzheimer	5
II.2 <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS)	7
II.3 Stres Oksidatif	8
II.4 Antioksidan	10
II.5 Lalat Buah (<i>Drosophila melanogaster</i>)	15
II.6 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	18
BAB III METODE KERJA	20
III.1 Alat dan bahan	20
III.2 Metode kerja	20

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
IV.1 Hasil Uji Kelangsungan Hidup (<i>Survival</i>)	27
IV.2 Hasil Uji Lokomotor	29
IV.3 Hasil Uji Peningkatan Kognitif (<i>T-Maze</i>)	30
IV.4 Hasil Analisis Ekspresi Gen	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	38
V.1 Kesimpulan	38
V.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	43
Lampiran 1. Preparasi Sampel	43
Lampiran 2. Skema Perlakuan Uji dan Analisis Data	44
Lampiran 3. Perhitungan variasi konsentrasi vitamin C	45
Lampiran 4. Data Statistik	47
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	53

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Sekues primer masing-masing gen	24
2. <i>Log-rank</i> uji survival	46
3. Hasil analisis uji lokomotor	47
4. Hasil analisis uji peningkatan Kognitif (<i>T-maze</i>)	48
5. Hasil Analisis Ekspresi Gen $A\beta 42$ pada Usia ke-15 vs ke-35	49
6. Hasil Analisis Ekspresi Gen $A\beta 42$ pada <i>UAS/GAL4</i> vs <i>GAL4</i> , <i>UAS-A$\beta 42$</i> , dan <i>w¹¹¹⁸</i> pada Hari Ke-35	49
7. Hasil Analisis Ekspresi Gen $A\beta 42$ pada <i>UAS/GAL4</i> setelah Perlakuan Vitamin C pada Hari Ke-35	50
8. Hasil Analisis Ekspresi Gen <i>sod1</i> dan <i>sod2</i> pada <i>GAL4/UAS</i> pada Hari Ke-35	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Struktur fisiologis otak dan neuron pada (a) otak sehat dan (b) penderita penyakit Alzheimer	4
2. Efek sinergis amiloid-beta dan tau terhadap perkembangan penyakit Alzheimer	5
3. Keadaan stress oksidatif pada penderita Alzheimer. Terdapat peningkatan stress oksidatif pada otak penderita Alzheimer yang disebabkan oleh (1) akumulasi amiloid-beta, (2) disfungsi mitokondria, dan (2) peradangan	8
4. Pertahanan antioksidan endogen lini pertama terhadap radikal bebas	10
5. Level ekspresi <i>sod1</i> pada <i>D. melanogaster</i>	11
6. Level ekspresi <i>sod2</i> pada <i>D. melanogaster</i>	12
7. Struktur Asam askorbat (Vitamin C)	15
8. Siklus hidup lalat buah (<i>Drosophila melanogaster</i>)	16
9. Skema persilangan lalat buah transgenik dengan sistem <i>GAL4/UAS</i>	26
10. Hasil uji survival dengan pemberian vitamin C (Pada K 1-3 dibandingkan dengan K4 tidak terdapat perbedaan. Kemudian, K4 dibandingkan dengan K 5-7 terdapat perbedaan signifikan (**= $p < 0.01$)	28
11. Hasil uji lokomotor hewan uji dengan pemberian vitamin C (Ket: ****= $p < 0.0001$)	29

12. Hasil uji peningkatan kognitif (<i>T-Maze</i>) pada hewan uji dengan pemberian vitamin C (Ket: ****= $p<0.0001$)	30
13. Grafik level ekspresi gen <i>Aβ42</i> pada hewan uji pada hari ke-15 dan 35 (Ket: ***= $p<0.001$)	31
14. Grafik level ekspresi gen <i>Aβ42</i> pada hewan uji dibandingkan dengan Kontrol <i>genetic background</i> (<i>w¹¹¹⁸</i>) pada hari ke- 35 (Ket: ***= $p<0.001$)	32
15. Grafik level ekspresi gen <i>Aβ42</i> pada hewan uji setelah pemberian vitamin C selama 35 hari (Ket: **= $p<0.01$)	32
16. Grafik level ekspresi gen (A) <i>sod1</i> dan (B) <i>sod2</i> pada hewan uji setelah pemberian vitamin C selama 35 hari	34
17. Pembuatan pakan lalat normal dan pakan vitamin C	52
18. Penyiapan hewan uji	52
19. Uji Lokomotor	52
20. Uji peningkatan kognitif (<i>T-maze</i>)	52
21. Isolasi RNA	52
22. Proses analisis dengan instrument RT-qPCR	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Preparasi sampel	41
2. Skema kerja dan analisis data	42
3. Perhitungan sampel	43
4. Data statistik	46
5. Dokumentasi penelitian	52

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Saat ini sekitar 50 juta individu di seluruh dunia telah mengalami penyakit Alzheimer, terutama populasi lanjut usia diatas 65 tahun (Shah dkk., 2023). Penyakit ini ditandai dengan keberadaan plak amiloid-beta ($A\beta$) di daerah otak yang dapat mengganggu keseimbangan reaksi redoks dan kemudian menyebabkan stres oksidatif oleh kehadiran radikal bebas seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang mengganggu mekanisme pertahanan antioksidan dalam sel sehingga terjadi kerusakan neuron, peradangan, dan berujung pada penurunan fungsi kognitif secara progresif (Zhang dkk., 2023).

Terapi farmakologis yang digunakan saat ini adalah golongan *Acetylcholinesterase Inhibitor* yang berperan menghambat enzim *Acetylcholinesterase* dalam memecah asetilkolin sehingga kadar asetilkolin di dalam otak tidak berkurang. Akibatnya, transmisi sinyal saraf dapat berlangsung lebih lama dan penurunan fungsi kognitif dapat dihambat. Namun, penggunaan obat golongan ini memiliki kelemahan seperti biaya yang mahal, terjadinya toleransi, dan perubahan dosis sehingga perlu adanya penyesuaian dosis dan pengganti obat alternatif lain (Ruangritchankul dkk., 2021). Menurut Young dkk. (2021), menyebutkan bahwa penggunaan obat golongan ini dapat memberikan pengaruh bagi organ lain, seperti jantung. Pengaruh tersebut dapat berujung pada komplikasi kardiovaskular seperti *bradycardia* dan *syncope*.

Sebagai upaya dalam penghambatan terkait penurunan fungsi kognitif pada penyakit Alzheimer dapat digunakan antioksidan seperti vitamin C yang bertindak sebagai agen neuroprotektif yang dapat menetralkan keadaan stress oksidatif akibat keberadaan radikal bebas seperti ROS sehingga gangguan fungsi kognitif pada penderita Alzheimer dapat berkurang (Kola dkk., 2023). Vitamin C merupakan antioksidan kuat dan telah lama digunakan. Vitamin ini berperan dalam diferensiasi, pematangan, dan kelangsungan hidup neuron (Anh dkk., 2019). Oleh karena itu, diperlukan pengujian lebih lanjut secara *in vivo* dalam studi tentang efek vitamin C sebagai agen neuroprotektif dan terapi tambahan pada penyakit Alzheimer.

Penelitian yang dilakukan oleh Ali dkk. (2020), menyebutkan penggunaan antioksidan seperti vitamin C pada tikus yang mengalami Alzheimer, dapat mengurangi toksisitas yang disebabkan oleh agregasi amiloid-beta dengan cara menetralkan kondisi stres oksidatif. Namun penggunaan tikus sebagai model penyakit Alzheimer memiliki beberapa kendala seperti usia dan ukuran tikus membuat biaya yang dikeluarkan lebih mahal dalam pemeliharaan dan persilangan. Selain itu, tikus dapat hidup selama bertahun-tahun yang artinya dapat secara signifikan memperlambat akuisisi dan analisis data, terutama dalam konteks penyakit yang berkaitan dengan usia dimana fenotip penyakit tidak muncul sampai hewan tersebut mencapai usia yang signifikan (Tello dkk., 2022). Dengan demikian, diperlukan model hewan uji lain yang dapat menggambarkan ekspresi protein amiloid-

beta ($A\beta$) sebagai upaya dalam mempelajari penyakit Alzheimer dan terapinya.

Salah satu hewan coba yang dapat digunakan dalam mempelajari tentang penyakit Alzheimer adalah Lalat buah (*Drosophila melanogaster*). Penggunaan model hewan ini telah digunakan secara luas dalam studi tentang penyakit Alzheimer menggunakan sistem *GAL4/UAS* (Caygill dan Brand, 2016). Sistem *GAL4/UAS* memberikan keuntungan untuk mengatur ekspresi gen spesifik ataupun komponen patologis pada jaringan atau sel organ tertentu terkait penyakit Alzheimer (Tello dkk., 2022). Penggunaan *Drosophila melanogaster* juga memberikan keuntungan seperti masa hidup yang singkat dan memiliki kesamaan genetik dengan manusia sekitar 75% (Nainu, 2018; Cheng dkk., 2020). Dengan demikian diperlukan pengujian lebih lanjut tentang efek vitamin C pada model *Drosophila melanogaster* yang mengekspresikan amiloid-beta terhadap ekspresi gen *sod1* dan *sod2* sebagai upaya dalam terapi pengobatan Alzheimer.

I.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian vitamin C terhadap fungsi kognitif model hewan coba yang mengekspresikan amiloid-beta melalui ekspresi gen *Amyloid-beta-42 (A β 42)*, *sod1*, dan *sod2*?

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh pemberian vitamin C terhadap fungsi kognitif model hewan coba yang mengekspresikan amiloid-beta melalui ekspresi gen *Amyloid-beta-42 (A β 42)*, *sod1*, dan *sod2*.

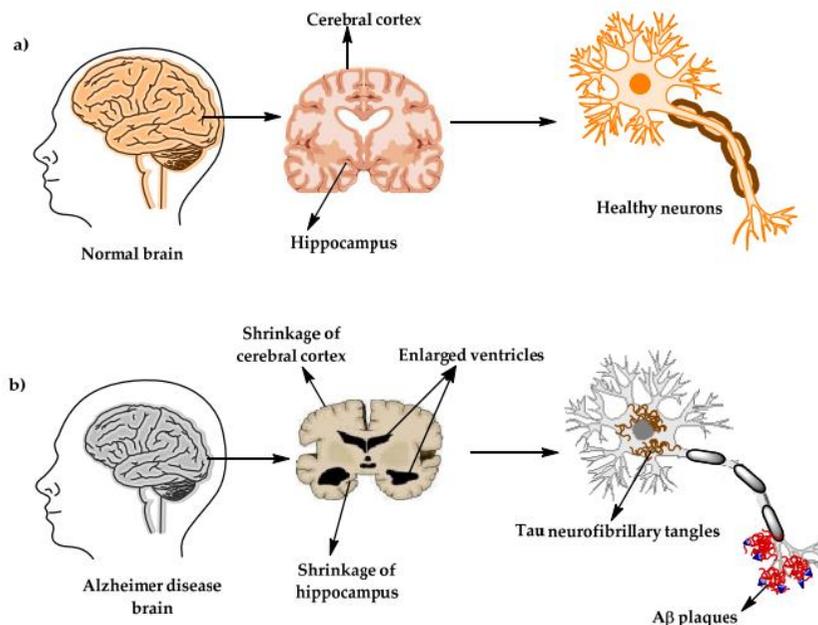
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Alzheimer

II.1.1 Deskripsi

Penyakit Alzheimer (*Alzheimer's Disease*; AD) merupakan salah satu penyakit neurodegeneratif yang banyak terjadi pada populasi dengan usia diatas 65 tahun dengan angka kejadian sebesar 50 juta orang dan diperkirakan akan meningkat sebesar 10 juta orang setiap tahunnya (Cheng dkk., 2020). Penyakit ini adalah penyebab Demensia dengan persentase sebesar 60-70% dari kasus Demensia yang terjadi.

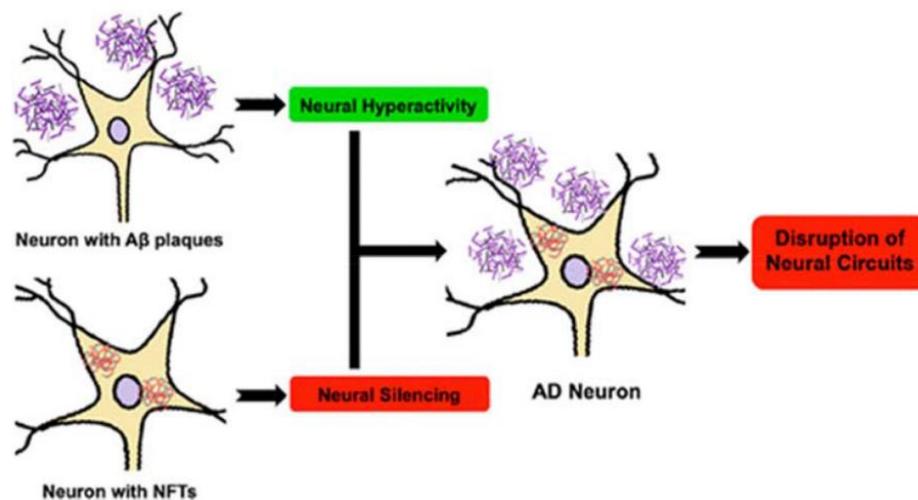


Gambar 1. Struktur fisiologis otak dan neuron pada (a) otak sehat dan (b) penderita penyakit Alzheimer (Breijyeh dan Karamen, 2020)

Penyakit Alzheimer ditandai dengan adanya kondisi gangguan pada otak yang dapat menyebabkan penurunan fungsi kognitif, kehilangan memori, dan penurunan kapasitas berpikir. Penyakit ini memiliki sifat tidak reversibel

dan berkembang secara progresif (Pritam dkk., 2022). Meskipun telah diketahui pasti bahwa penyakit Alzheimer dapat menyebabkan penurunan fungsi kognitif, penyebabnya hingga saat ini belum diketahui secara pasti karena terdapat banyak faktor yang dapat menyebabkan penyakit Alzheimer (Zhang dkk., 2023). Berdasarkan sejarahnya, salah satu penyebab penyakit Alzheimer karena adanya protein amiloid-beta ($A\beta$) yang ditemukan dalam plak hasil proses agregasi dari protein yang bersumber dari kondisi hiperproliferasi *Amyloid Precursor Protein* (APP) (Glennner dan Wong, 1984; Zhang dkk., 2023).

II.1.2 Protein Amiloid-beta ($A\beta$)



Gambar 2. Efek sinergis amiloid-beta terhadap perkembangan penyakit Alzheimer (Malafaia dkk., 2021)

Protein amiloid-beta ($A\beta$) seringkali dikaitkan dengan penyakit Alzheimer. Secara alami otak manusia akan memproduksi protein amyloid beta yang dihasilkan dari pemotongan *Amyloid Precursor Protein* (APP) yang dikode oleh gen BACE (*Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme*) dan menghasilkan salah satu fragmen protein yang disebut *Amyloid-*

beta-42 (A β 42) (Bolus dkk., 2020; Tsakiri dkk., 2021). Protein ini dalam konsentrasi rendah dapat meningkatkan plastisitas sinaptik, pembelajaran, dan memori dengan meningkatkan *Long-Term Potentiation* (LTP) (Morley dkk., 2019). Selain itu, dilaporkan bahwa protein amyloid-beta memiliki peran sebagai pelindung tubuh dari infeksi, dapat memperbaiki kebocoran sawar darah otak, mempercepat pemulihan dari cedera, dan mengatur fungsi sinaptik (Brothers dkk., 2018). Meskipun memiliki peran baik dalam konsentrasi yang rendah, protein amiloid-beta akan memberikan efek buruk ketika diproduksi abnormal karena akan membentuk agregat yang kemudian membentuk plak protein dan berinteraksi dengan ion logam seperti besi melalui reaksi fenton hingga menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menyebabkan kondisi stress oksidatif dan dapat mengganggu mekanisme pertahanan antioksidan dalam sel, kondisi tersebut dapat mengganggu fungsi sel saraf dan merusak neuron hingga menyebabkan gangguan penurunan kognitif yang terkait dengan penyakit neurodegeneratif seperti Alzheimer (Monacelli dkk., 2017; Zhang dkk., 2023).

II.2 Reactive Oxygen Species (ROS)

Reactive Oxygen Species (ROS) adalah salah satu molekul yang sangat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan oksidatif dalam komponen seluler, lemak, protein, dan DNA. Molekul ini dihasilkan dari proses metabolisme seluler normal sebagai produk sampingan dan kadarnya diatur secara ketat oleh mekanisme pertahanan antioksidan dalam sel (Valverde-

Salazar dkk., 2023). Beberapa penyakit dapat timbul akibat keberadaan ROS yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara produksi ROS dan pertahanan antioksidan dalam sel yang terganggu sehingga menyebabkan keadaan stress oksidatif yang berujung pada kerusakan dan kematian sel saraf (Kola dkk., 2023).

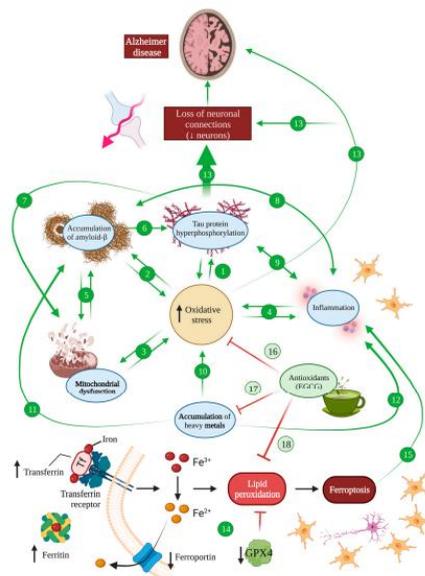
II.3 Stres Oksidatif

II.3.1 Deskripsi

Stres Oksidatif didefinisikan sebagai keadaan tidak seimbang antara produksi oksidan dan antioksidan yang dapat menyebabkan peningkatan kadar oksidan dalam sel atau lebih dikenal sebagai *Reactive Oxygen Species* (ROS). Keadaan ini dapat menjadi penanda klinis dalam beberapa penyakit, salah satunya terkait neurodegenerative yaitu penyakit Alzheimer. Salah satu penanda patologis penyakit Alzheimer adalah terbentuknya plak protein Amiloid-beta ($A\beta$). Produksi protein ini dapat dipengaruhi oleh keberadaan ROS yang dapat mengatur sekresi $A\beta$ dan sebaliknya, $A\beta$ juga dapat mendorong perkembangan ROS yang berlebihan (sebagai akibat dari ekspresi berlebihan APP) dan dapat menurunkan *Respiratory Control Ratio* (RCR) dan produksi ATP, hal ini meningkatkan produksi ROS dalam sel HEK293 (Pritam dkk., 2022; Valverde-Salazar dkk., 2023).

II.3.2 Stres Oksidatif dan Penyakit Alzheimer

Stres oksidatif berkaitan dengan keseimbangan reaksi reduksi-oksidasi (Redoks), keseimbangan redoks merupakan mekanisme homeostasis yang paling penting pada tingkat sel. Dalam konteks penyakit neurodegeneratif, diketahui bahwa otak memerlukan kebutuhan energi yang jauh di atas organ tubuh lainnya sehingga tingkat konsumsi oksigen yang diperlukan adalah sekitar 20% dari total oksigen yang berada dalam tubuh. Akibatnya, sebagai hasil dari metabolisme normal, organ otak akan cenderung menghasilkan produk sampingan berupa oksidan yang bersifat sangat reaktif atau dikenal sebagai radikal bebas seperti ROS sehingga perlu dipastikan bahwa mekanisme antioksidan dalam sel dapat mengatasi keberadaan ROS agar keseimbangan redoks dapat terjaga (Valverde-Salazar dkk., 2023).



Gambar 3. Keadaan stress oksidatif pada penderita Alzheimer. Terdapat peningkatan stress oksidatif pada otak penderita Alzheimer yang disebabkan oleh (1) akumulasi amiloid-beta, (2) disfungsi mitokondria, dan (3) peradangan (V́ctor Valverde-Salazar dkk., 2023)

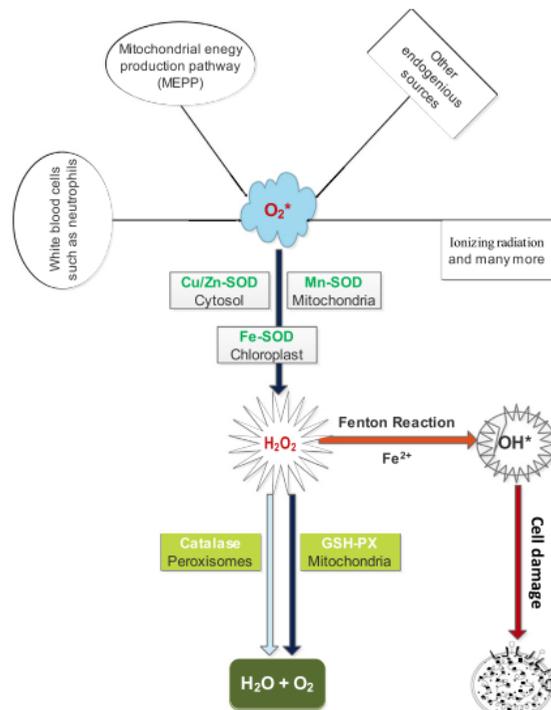
Pada kondisi patologis penyakit Alzheimer, keseimbangan redoks berubah menjadi tidak seimbang. Keadaan tersebut terjadi karena beberapa faktor, seperti oksidasi asam nukleat, lipid, dan protein dalam neuron melalui beberapa mekanisme. Misalnya, neuron yang mengandung *Polyunsaturated Fatty Acids* (PUFA's) akan bereaksi dengan ROS yang menyebabkan peroksidasi lipid berujung pada kematian sel (Valverde-Salazar dkk., 2023). Selain itu, terdapat beberapa ion logam yang berasal dari pelepasan pada sinaps glutamatergik dalam korteks dan hipokampus dapat mempengaruhi keadaan penyakit neurodegeneratif seperti Alzheimer. Keberadaan ion logam seperti tembaga dan besi dapat mengacaukan keseimbangan reaksi redoks yang dapat mengkatalis reaksi fenton sehingga menghasilkan radikal hidroksil sitotoksik dan penurunan enzim antioksidan seperti katalase atau *Superoxide Dismutase* (SOD) yang berasal dari hidrogen peroksida. Keadaan tersebut dapat meningkatkan oksidasi protein, DNA, dan menyebabkan peroksidasi lipid (Monacelli dkk., 2017; Valverde-Salazar dkk., 2023).

II.4 Antioksidan

II.4.1 *Superoxide Dismutase* (SOD)

Antioksidan adalah senyawa yang terlibat dalam penekanan efek berbahaya dari stress oksidatif. Senyawa ini secara efektif dapat menurunkan laju stres oksidasi dari konsentrasi rendah hingga tinggi. Senyawa antioksidan terbagi menjadi 2 jenis berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu antioksidan primer yang bekerja dengan cara menangkap radikal bebas serta

menghambat reaksi berantai yang dapat mengakibatkan stress oksidatif dan antioksidan sekunder yang bekerja dalam menguraikan radikal bebas menjadi bentuk stabil dengan cara regenerasi antioksidan, penonaktifan logam, dan pengurangan oksigen singlet sehingga dapat bekerja secara sinergis dengan antioksidan primer. Selain itu, berdasarkan sistemnya antioksidan terbagi menjadi dua, yaitu sistem endogen yang berarti antioksidan diperoleh secara alami dari dalam tubuh dan eksogen yang berarti antioksidan diperoleh melalui asupan dari luar tubuh. Beberapa contoh antioksidan endogen adalah *Catalase* (CAT), *Glutathione peroxidase*, *Glutathione Reductase*, dan *Superoxide dismutase* (SOD) (Pritam dkk., 2022).

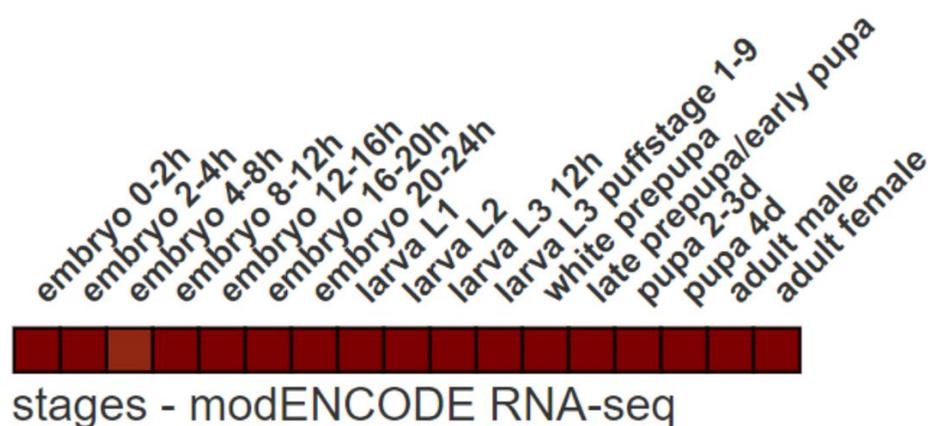


Gambar 4. Pertahanan antioksidan endogen lini pertama terhadap radikal bebas (Ighodaro dan Akinloye, 2018).

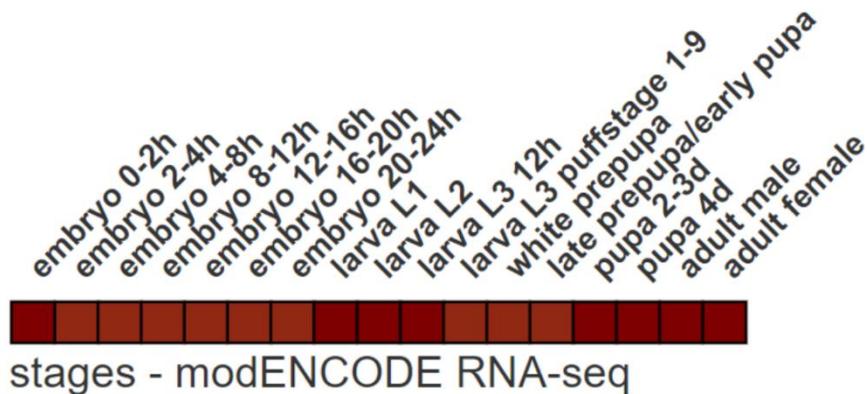
SOD merupakan antioksidan yang bekerja pada tingkat enzimatik secara primer dalam tubuh dalam melawan oksidan, misalnya radikal

superoksida (O_2^-) yang dihasilkan dari proses metabolisme kemudian diubah menjadi hidrogen peroksida dan oksigen oleh SOD. Dalam tubuh SOD terbagi menjadi 3, yaitu *sod1*, *sod2*, dan *sod3* yang memiliki peran masing-masing dalam melawan radikal bebas. *Sod1* atau (CuZn-SOD) merupakan jenis SOD utama yang terletak pada sitoplasma dan memainkan peran sekitar 90% dalam aktivitas SOD yang bekerja dengan cara meningkatkan superoksida sebagai katalis dalam mengubah oksidan menjadi hidrogen peroksida. Kemudian *sod2* (Mn-SOD) terletak pada mitokondria yang bekerja dalam menangkap dan menguraikan radikal bebas dalam sel menjadi zat yang kurang reaktif. Dan terakhir adalah *sod3* atau *Extracellular superoxide dismutase* (Fe-SOD) yang terletak pada permukaan sel dan berperan dalam melindungi sel dari stress oksidatif (Ighodaro dan Akinloye, 2018).

II.4.2 Level Ekspresi Gen *Sod1* dan *Sod2*



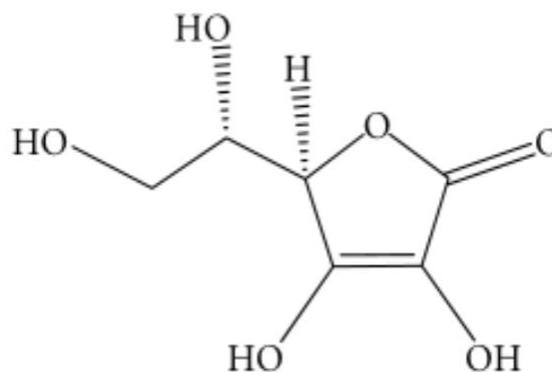
Gambar 5. Level ekspresi *sod1* pada *D. melanogaster* (*FlyBase*)



Gambar 6. Level ekspresi *sod2* pada *D. melanogaster* (*FlyBase*)

II.4.3 Vitamin C

Vitamin C atau juga dikenal asam askorbat adalah contoh senyawa antioksidan yang larut dalam air dan berperan dalam pembentukan pembuluh darah, perkembangan tulang rawan, kolagen untuk induksi, penyerapan zat besi, dan pengaturan tekanan darah (Shah dkk., 2023). Sebagai antioksidan, vitamin C bekerja dalam melindungi dan mencegah kerusakan saraf akibat radikal bebas yang dapat mempercepat fibrilasi protein amiloid-beta dan membentuk plak. Selain itu, vitamin C sebagai antioksidan juga berperan dalam khelasi besi, tembaga, dan seng yang kemudian ion logam tersebut tidak berikatan dengan plak amiloid-beta dan membentuk ROS (Monacelli dkk., 2017).



Gambar 7. Struktur Asam askorbat (Vitamin C) (Pritam dkk., 2022)

Adanya gugus hidroksil (-OH) pada struktur kimia vitamin C menunjukkan aktivitas antioksidan, artinya vitamin ini dapat berperan sebagai pendonor hidrogen yang kuat dalam menjaga keseimbangan reaksi redoks yang terjadi. Vitamin C merupakan senyawa antioksidan yang kuat, dapat menjangkau setiap sel tubuh, dan berperan dalam pembuatan pertahanan jaringan ikat (Pritam dkk., 2023). Sebagai antioksidan, vitamin C bekerja dengan beberapa cara seperti mengaktifkan sinyal Nrf2 (*Nuclear factor-erythroid 2 related factor*) yang mengarah pada induksi enzim antioksidan dan protein, vitamin C juga dapat meningkatkan ekspresi heme oksigenase-1 (HO-1) (Li dan Zhu, 2021). Tidak hanya bekerja pada jalur tersebut, vitamin C juga dilaporkan dapat menonaktifkan inhibitor *proteasome* seperti PS-341 (*Bortezomib*) sehingga *proteasome* pada lalat buah dapat terlibat dalam degradasi protein yang tidak dibutuhkan atau rusak melalui *proteolysis* (Reaksi kimia yang memutus ikatan peptida) seperti protein amiloid-beta sehingga level ekspresi protein amiloid-beta dapat menurun (Fribley dkk., 2004; Hampel dkk., 2021). Selain itu, terdapat gen RPN4 dan FOXO4 yang berperan dalam mengatur ekspresi dan mempertahankan aktivitas *proteasome* pada tingkat yang lebih tinggi, tidak hanya itu jalur JAK/STAT juga memegang peran penting dalam fosforilasi JAK pada sinyal sitokin sehingga STAT3 dapat diaktifkan dan terjadi peningkatan regulasi ekspresi PSMB5 (subunit $\beta 5$) melalui induksi *Epidermal Growth Factor* (EGF) yang dapat melakukan degradasi terhadap protein tertentu yang tidak lagi digunakan seperti amiloid-beta (Fribley dkk., 2004; Mao, 2021).

II.5 Lalat Buah (*Drosophila melanogaster*)

II.5.1 Klasifikasi

Kingdom : *Animalia*

Phylum : *Arthropoda*

Class : *Insecta*

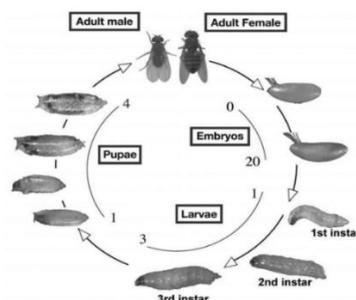
Family : *Drosophilidae*

Genus : *Drosophila*

Species : *Melanogaster* (Siddhardha dkk., 2020).

II.5.2 Deskripsi

Lalat buah dengan nama latin *Drosophila melanogaster* adalah model hewan uji yang dapat digunakan dalam pengujian secara *in vivo* terkait perkembangan biologi, genetika, dan pathogenesis. Siklus hidup yang dimiliki hewan ini tergolong singkat (40-60 hari) dan mudah dalam modifikasi gen. Lalat buah sebagai model hewan uji sering digunakan juga karena dianggap sebanding dengan model vertebrata serta memiliki gen yang homolog dan signifikan dengan organisme lain (Siddhardha dkk., 2020).



Gambar 8. Siklus hidup lalat buah (*Drosophila melanogaster*) (Fernández-Moreno dkk., 2007)

Lalat buah memiliki perbedaan berdasarkan gender yang dimiliki. Pada lalat buah betina memiliki ukuran lebih besar sekitar $\pm 2,5$ cm sedangkan lalat

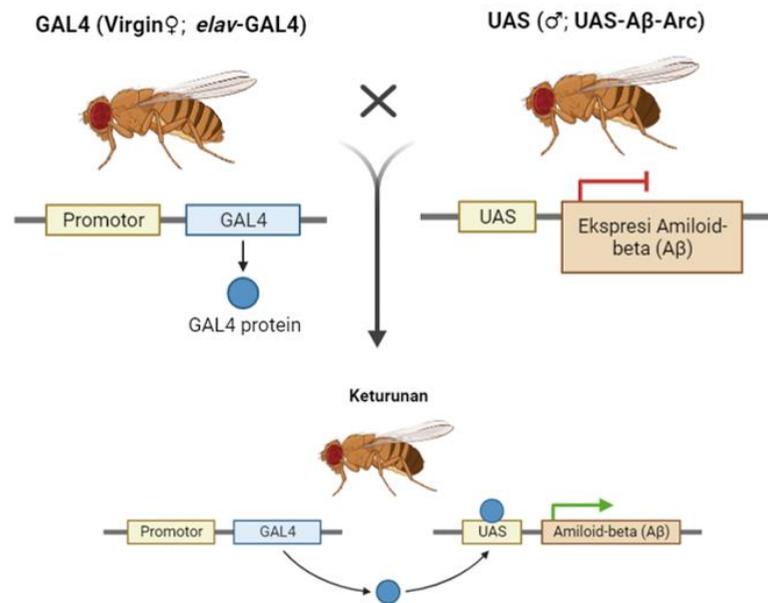
Jantan lebih pendek dengan punggung yang lebih gelap, memiliki bercak hitam di bagian perut, memiliki deretan bulu hitam pada tarsus kaki pertama (*sex-comb*), dan beberapa perbedaan fisik lainnya. Pada siklus hidupnya, lalat buah secara optimal dapat hidup pada suhu 25°C (77°F) dengan fase hidup yang dimulai dari larva, larva berkembang selama 24 hingga 48 jam, dengan molting yang terjadi sebanyak dua kali pada tahap larva instar kedua dan instar ketiga. Kemudian larva berubah menjadi pupa, setelah 4 hari akan menetas dan menjadi lalat dewasa dalam beberapa hari (Siddhardha dkk., 2020).

II.5.3 Lalat Buah Transgenik

Lalat Buah (*Drosophila melanogaster*) transgenik adalah model hewan uji yang telah mengalami proses modifikasi pada tingkat gen. Proses tersebut melibatkan DNA yang dimasukkan ke dalam genom lalat melalui proses *gen editing* (Caygill dan Brand, 2016). Salah satu contoh penerapannya adalah sistem *GAL4/UAS*, pada sistem ini khususnya dalam penelitian terkait penyakit Alzheimer nantinya menggunakan tiga jenis lalat buah transgenik. Jenis lalat tersebut, yaitu *GAL4*, *UAS-A β 42*, dan *w¹¹¹⁸*. Pertama, lalat buah dengan jenis *GAL4* merupakan hasil modifikasi lalat *w¹¹¹⁸* yang menjadi inang untuk gen *GAL4* yang memiliki fungsi sebagai pembawa garis keturunan (*Driver Line*). Kemudian, lalat yang juga digunakan adalah *UAS-A β 42* yang menjadi promotor gen tertentu atau target, *UAS (Upstream Activation)* yang digunakan dalam penelitian tentang Alzheimer merupakan promotor yang akan membawa gen A β 42. Terakhir adalah lalat buah *w¹¹¹⁸*, lalat ini berperan

sebagai kontrol *genetic background* (w^{1118}) karena perannya sebagai inang dalam pembawa gen *GAL4* (Prüßing dkk., 2013; Sekiya dan Iijima, 2021).

II.5.4 Sistem *GAL4/UAS* dan Lalat Buah Sebagai Organisme Model Penyakit Alzheimer



Gambar 9. Skema persilangan lalat buah transgenik dengan sistem *GAL4/UAS* (Dibuat dengan *Biorender.com*)

Dalam sejarahnya, sistem *GAL4* pertama kali diperkenalkan oleh Andrea Brand and Norbert Perrimon. Dalam sistem ini terdapat dua bagian penting, yaitu gen *GAL4* yang telah dimodifikasi kedalam lalat buah dan lalat buah lainnya yang telah dimodifikasi dan memiliki sistem *UAS* (*Upstream Activation Sequence*). Lalat buah *GAL4* nantinya akan bertindak sebagai pembawa garis keturunan dengan mengkode protein aktivator transkripsi, Ketika gen *GAL4* berikatan dengan serangkaian sistem *UAS* yang juga telah membawa gen target, maka Ketika keduanya disilangkan akan menghasilkan keturunan dengan ekspresi gen target (Caygill dan Brand, 2016; Tello dkk., 2022). Dengan sistem ini juga memberikan keuntungan untuk mengatur

ekspresi gen spesifik ataupun komponen yang terlibat dalam proses patologis pada jaringan atau sel-sel organ tertentu, khususnya dalam penelitian ini adalah terkait penyakit Alzheimer (Tello dkk., 2022).

II.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah salah satu metode isolasi gen yang paling umum digunakan. PCR dapat memperkuat atau memperluas untai DNA jutaan kali sehingga sangat berguna untuk analisis genetik menggunakan Taq DNA *polymerase* yang menyederhanakan prosedur PCR. Saat ini diketahui bahwa transcriptase terbalik (*Reverse Transcriptase*) digunakan untuk memperoleh informasi genetik dari DNA ke RNA (Pelt-Verkuil dkk., 2008).

Metode transcriptase terbalik telah berhasil diterapkan dan digunakan dengan menghasilkan informasi genetik dalam bentuk DNA dari RNA yang diisolasi menggunakan protokol PCR yang diadaptasi secara khusus. Bentuk PCR ini disebut *Reverse Transcription-PCR* (RT-PCR). Metode ini memungkinkan deteksi dan kuantifikasi berbagai jenis molekul RNA, termasuk *messenger* RNA (mRNA) dari sel prokariotik dan eukariotik, yang identik dengan genom berbasis RNA seperti virus corona dan picornavirus (Pelt-Verkuil dkk. 2008).

Prinsip utama PCR adalah replikasi molekul target DNA, yang difasilitasi oleh hibridisasi spesifik dua primer oligonukleotida yang berbeda. Primer yang mengikat DNA akan memperpanjang untaian DNA. Siklus

pemisahan untai DNA yang berulang meliputi *denaturation*, *annealing*, dan *elongation* yang menghasilkan amplifikasi DNA. Umumnya, jumlah minimal siklus PCR yang dilakukan adalah 20 siklus dan siklus ke 50 biasanya dianggap sebagai batas atas (Pelt-Verkuil dkk., 2008).