Eksplorasi Efek Etanol Terhadap Survival dan Status Imunitas *Drosophila melanogaster*

Reski Amalia Rosa[1], Nadila Pratiwi Latada[1], Asbah Asbah[1], Ahmad Mu'arif[1], Risfah Yulianty[2], Firzan Nainu[3*]

Artikel Penelitian

Abstract: *High doses of ethanol in the body can elicit damage to organs including the brain, liver and kidneys. In addition, ethanol can trigger the formation of reactive oxygen species (ROS), where excess levels of ROS in the body can promote cell death through the apoptotic pathway. Apoptotic cells that are not phagocytosed will undergo necrosis. In the process of necrosis, cells release DAMPs, endogenous pro-inflammatory molecules and induce the core immune system in Drosophila that are homologues to humans, namely Toll, IMD (Immune Deficiency), and JAK-STAT (Janus Tyrosine Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription). The aim of this research is to investigate how ethanol exposure influences gene expression in the Toll, Imd, and JAK-STAT pathways. The results showed that ethanol could affect the survival rate of male and female Drosophila melanogaster w^{1118}. Exposure to ethanol at high concentrations (85%) caused a decrease in the expression of Drs, but not the expression of the Dpt. In addition, TotA expression, but not Upd3, was amplified significantly as the ethanol concentration increased. In conclusion, Drosophila experienced a decrease in the survival rate due to ethanol exposure which might be related to the stress response and the immune system which is mediated by certain pathways.*

Keywords: *fruit fly, ethanol, immune system, Drs, Dpt, TotA, Upd3*

[1] Program Studi Sarjana, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan 90245
[2] Departemen Farmasi Sains dan Teknologi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan 90245
[3] Departemen Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan 90245

Korespondensi:

Firzan Nainu
firzannainu@unhas.ac.id

Abstrak: Etanol dengan dosis yang tinggi di dalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan pada organ termasuk otak, hati, dan ginjal. Selain itu, etanol dapat memicu terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS), dimana kadar ROS yang berlebih dalam tubuh dapat menyebabkan kematian sel melalui jalur apoptosis. Sel apoptosis yang tidak terfagositosis akan mengalami proses nekrosis. Pada proses nekrosis, sel melepaskan DAMPs, molekul endogen pro-inflamasi dan menginduksi sistem imun utama pada *Drosophila* yang homolog pada manusia, yakni Toll, IMD (*Immune Deficiency*), dan JAK-STAT (*Janus Tyrosine Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*). Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui bagaimana pengaruh paparan etanol terhadap ekspresi gen pada jalur Toll, Imd, dan JAK-STAT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, etanol dapat mempengaruhi tingkat kesintasan (keberlangsungan hidup) *Drosophila melanogaster* w^{1118} jantan dan betina. Paparan etanol pada konsentrasi tinggi (85%) menyebabkan penurunan ekspresi *Drs*, namun tidak dengan ekspresi *Dpt*. Selain itu, ekspresi *TotA* meningkat secara signifikan, namun tidak dengan ekspresi *Upd3*, seiring dengan meningkatnya konsentrasi etanol. Sebagai kesimpulan, *Drosophila* mengalami penurunan tingkat kesintasan akibat pemaparan etanol yang kemungkinan berhubungan dengan respon stres serta sistem imun yang diperantarai oleh jalur tertentu.

Kata kunci: lalat buah, etanol, sistem imun, *Drs*, *Dpt*, *TotA*, *Upd3*

Pendahuluan

Etanol (EtOH) dengan rumus molekul CH_3CH_2OH merupakan bagian dari kelompok alkohol yang memiliki gugus –OH (hidroksil) yang terikat pada satu atom karbon. Berdasarkan survei *National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions* (NESARC), ditemukan bahwa penderita *Alcohol Use Disorder* (AUD) telah mencapai 36.7% pada usia 30-44 tahun (1). Mengonsumsi alkohol secara terus-menerus akan berisiko mengalami berbagai gangguan, misalnya hati ataupun hepatitis alkohol akut. Selain itu, pada dosis yang berlebih, etanol dapat menyebabkan kerusakan pada organ tubuh seperti hati, otak, ginjal, yang bahkan disertai dengan kematian. Adapun pada dosis rendah, etanol memiliki beberapa efek, yakni munculnya rasa senang atau euforia, dehidrasi, kehilangan fungsi motorik, dan sedasi (1-4).

Etanol telah dicurigai dapat mempengaruhi aktivitas sistem imun, dimana secara spesifik dapat menyebabkan supresi sistem imun (5). Dengan demikian, seseorang yang mengkonsumsi minuman/makanan beralkohol mungkin lebih rentan untuk menderita penyakit infeksi, sebagai efek samping imunosupresi akibat penggunaan alkohol. Lebih lanjut, etanol pada kadar tinggi dalam tubuh memicu terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) (6,7). ROS berfungsi sebagai parameter untuk mengukur pembentukan hidroksil radikal, dimana ketika radikal bebas bereaksi dengan DNA, lipid, karbohidrat dan protein dapat menyebabkan kerusakan sel *(cell damage*) (8). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Jessica *et al.* (2009), terlihat bahwa paparan etanol pada hewan coba tikus dapat menginduksi stres oksidatif yang selanjutnya memicu apoptosis, sehingga menyebabkan kerusakan pada organ hati (9). Dan pada organisme model *Drosophila melanogaster*, paparan etanol dapat menginduksi apoptosis yang berujung pada penurunan survival (Unpublished results). Namun beberapa pertanyaan masih belum terjawab. Salah satunya adalah bagaimana mekanisme induksi apoptosis secara molekuler pasca paparan etanol dan apakah ini ada kaitannya dengan aktivitas sistem imun?

Apoptosis merupakan proses fisiologis dimana terjadi kematian sel sebagai respon terhadap beberapa kondisi patologis yang berbahaya, seperti inflamasi kronik, aterosklerosis, kanker, permasalahan respirasi, dan neurodegeneratif. Sel yang mengalami apoptosis direspon oleh makrofag dan sel fagosit lainnya melalui proses fagositosis sel apoptosis yang kemudian mengurangi sel-sel mati dengan meminimalkan kerusakan pada sel lainnya. Kemudian, sel yang tidak terfagositosis akan mengalami proses nekrosis. Pada proses nekrosis, sel melepaskan *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs), molekul endogen pro-inflamasi, dan menginduksi respon sistem imun (10,11). Pada kondisi ini, terlihat bahwa apoptosis dapat berkaitan dengan aktivitas sistem imun, seperti yang telah dikomunikasikan oleh peneliti sebelumnya.

Sebelum tahun 2000, penelitian dalam rangka mempelajari respon imun alamiah terhadap suatu antigen, termasuk untuk mamalia, dapat menggunakan organisme model lalat buah *D. melanogaster* (12). Organisme model ini menawarkan berbagai keuntungan seperti memiliki kemiripan genetik dengan manusia sekitar (sekitar 75%), mudah dipelihara, ekonomis dan tidak membutuhkan ruangan pemeliharaan yang besar, tidak membutuhkan kode etik dalam penggunaannya sebagai model uji penelitian, serta memberikan hasil yang dapat diterjemahkan pada hewan uji mamalia maupun secara klinik pda manusia (12-16). Bahkan, lalat ini telah digunakan dalam riset terkait patogen manusia, termasuk SARS-CoV-2 yang menyebabkan COVID-19 (17). Namun keuntungan yang paling utama adalah serangga ini memiliki tiga jalur utama sistem imun yang homolog dengan manusia yakni *Toll pathway* yang homolog dengan sistem imun *Toll-Like Receptor* (TLR) *pathway* pada manusia, IMD (*Immune Deficiency*) *Pathway* yang homolog dengan TNF (*Tumor Necrosis Factor*) *pathway* pada manusia, dan JAK-STAT (*Janus Tyrosine Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*) seperti Unpaired (*Upd*) yang homolog dengan sitokin dan interleukin pada manusia (18). Berangkat dari berbagai keuntungan tersebut, maka kami memutuskan untuk melakukan penelitian menggunakan *D. melanogaster* sebagai organisme model dalam mengeksplorasi efek pemaparan etanol terhadap sistem imun alamiah dan hubungannya dengan *survival D. melanogaster.*

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, oven (Memmert®), autoklaf (Hirayama™), micropestle (Geneaid®), mikropipet (Gilson™), vial *Drosophila* (Biologix®), *microcentrifuge* (Tomi), *Zoom Stereo Microscope* (Motic™), BSC kelas II (Faster™), *Real-Time* PCR (Rotor Gene Q®, Qiagen), pinset (Taiyo electric), timbangan analitik (Sartorius™), dan CO_2 Pad (flystuff™).

Adapun bahan-bahan yang digunakan, yaitu aquadest, etanol (Emsure®ACS, ISO, Reag.Ph EUR), gas CO2 (Samator®), kertas saring, *Wizard SV Total RNA Isolation System* (Promega®), kit *GoTaq®1-step RT-qPCR system* (Promega™), mikrotube (genfollower™), pakan *D. melanogaster*, *Treff tube* (TreffLab™) satu set

primer *rp49, Drs, Dpt, Upd3*, dan *TotA*, Stopper plugs, tips filter mikropipet (Rainin), dan tube qPCR.

Penyiapan Hewan Uji

Organisme model yang digunakan pada penelitian ini adalah lalat buah *D. melanogaster* dewasa genotip w^{1118} jantan dan betina dengan umur 4-7 hari (diberikan oleh Host and Response Laboratory of the Kanazawa University, Japan). Lalat dipelihara di dalam vial berisi pakan normal yang dibuat menggunakan komposisi tepung jagung (*corn meal*), *brewer's yeast*, glukosa, dan agar. Vial yang berisi lalat kemudian disimpan pada suhu 25°C dengan perbandingan 12:12 (12 jam terpapar cahaya lampu dan 12 jam dengan kondisi tanpa cahaya).

Pemaparan Etanol dan Pengamatan Waktu Kematian

Lalat disiapkan dan dibagi dalam lima kelompok perlakuan meliputi satu kelompok kontrol tanpa perlakuan dan empat kelompok perlakuan yang diberikan etanol dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi etanol yang digunakan yaitu 25%, 45%, 65% dan 85%, yang akan dipaparkan secara inhalasi pada *D. melanogaster*. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari minimal tiga vial yang masing-masing berisi 10 ekor lalat (jantan atau betina). Setiap vial ditutup menggunakan dua *stopper plug*. Setelah itu, sebanyak 1 mL etanol diteteskan pada *stopper plug* pertama, kemudian ditutup lagi dengan *stopper plug* kedua dengan jarak 2 cm dari mulut vial. Kemudian, dilakukan uji *survival* selama 60 menit dengan interval 6 menit (menit ke- 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60) dan diamati berapa jumlah lalat yang hidup dan mengalami sedasi dengan parameter lalat tidak bergerak atau dalam keadaan baring tanpa ada gerakan pada sayap. Data yang diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan *time point* (waktu) yang sesuai untuk proses isolasi RNA lalat.

Isolasi RNA

Untuk setiap kelompok perlakuan, lima ekor lalat jantan dewasa yang masih hidup dimasukkan ke dalam *treff tube* untuk diproses dalam eksperimen isolasi RNA. Lalat dianestesi menggunakan gas CO_2 kemudian dimasukkan ke dalam buffer untuk selanjutnya di hancurkan menggunakan *micropestle* dan diproses menggunakan kit *Wizard SV Total RNA Isolation System* (Promega®).

Analisis Ekspresi Gen

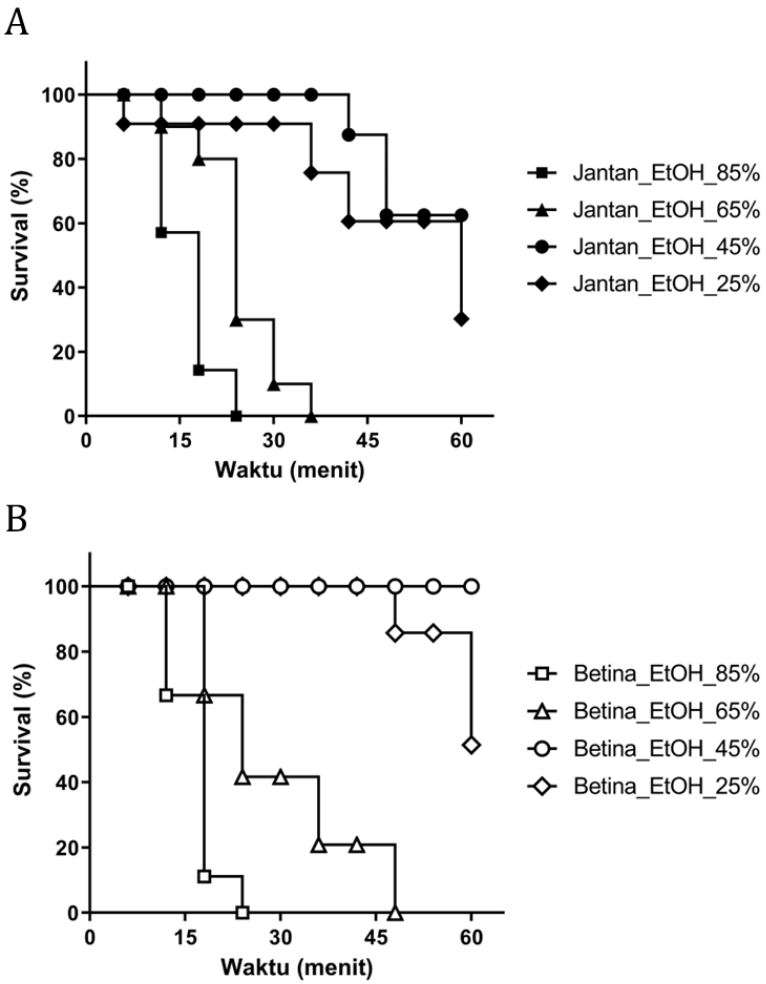
Untuk menganalisis ekspresi gen Drs (Drosomycin), Dpt (Diptericin), totA (Turandot A), dan Upd3 (unpaired 3), digunakan metode real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real time RT-PCR). Eksperimen ini dilakukan dengan menggunakan kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega®) dengan menggunakan satu set primer Drs (5' – TTG TTC GCC CTC TTC GCT GCT CT – 3' untuk forward primer dan 5' – GCA TCC TTC GCA CCA GCA CTT AC – 3' untuk reverse primer), satu set primer Dpt (5' – GTT CAC CAT TGC CGT CGC CTT AC - 3' untuk forward primer dan 5' – CCT CCT ATA CCT GTC GTG AAC CC – 3' untuk reverse primer), satu set primer totA (reverse primer 5'-GAATAGCCCATGCATAGAGGAC-3' dan forward primer 5'-CCAAAATGAATTCTTCAACTGCT-3'), dan satu set primer Upd3 (reverse primer 5'-GCCCGTTTGGTTCTGTAGAT-3' dan forward primer 5'-ACTGGGAGAACACCTGCAAT-3'). Sebagai kontrol internal, maka digunakan satu set primer housekeeping gene rp49 (rp49 forward primer: 5'–AGATCGTGAAGAAGCGCACCAAG–3' and rp49 reverse primer: 5'–CACCAGGA ACTTCTTGAATCCGG–3'). Reaksi real time RT-PCR dilakukan di dalam tube qPCR dengan volume 10 µL menggunakan mesin RotorGene Q (Qiagen) dengan running profile sebagai berikut: 37°C selama 15 menit, 95°C selama 10 menit, dan 40 rangkaian siklus PCR dimana satu siklus terdiri dari 95°C selama 10 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik. Setelah 40 siklus usai, kemudian diikuti oleh melt curve analysis dari 60°C hingga 95°C. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan metode kuantifikasi relatif (relative quantification).

Analisis Data

Data yang diperoleh dalam eksperimen *survival* diproses menggunakan pendekatan Kaplan-Meier yang dilanjutkan dengan analisis Log-Rank. Data yang diperoleh dalam eksperimen *real time* RT-PCR dianalisis menggunakan Q-Gene dan dilanjutkan dengan One-Way Anova menggunakan GraphPad Prism® 8. Semua analisis statistik dipresentasikan dalam nilai rata-rata (mean) ± standar deviasi (S.D). Nilai *p values* yang lebih kecil dari 0.05 ditandai sebagai signifikan.

Hasil dan Diskusi

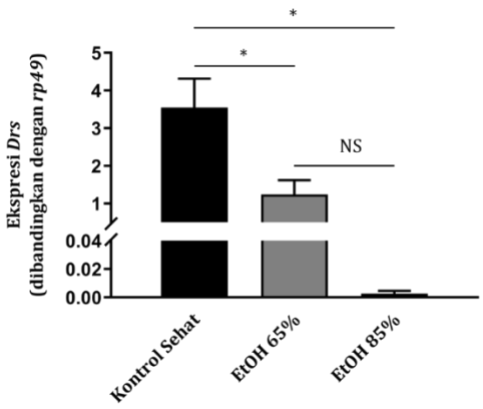
Berdasarkan hasil uji survival *D. melanogaster* genotip w^{1118} jantan dan betina yang dipaparkan etanol dengan konsentrasi 25%, 45%, 65% dan 85% **(Gambar 1)** terlihat bahwa baik lalat jantan maupun lalat betina mengalami kematian akibat pemaparan etanol pada berbagai konsentrasi dan tingkat kematian berbanding lurus dengan konsentrasi etanol yang digunakan (*concentration-dependent effect*) **(Gambar 1)**. Namun, hasil analisis lebih lanjut memperlihatkan bahwa waktu kematian lalat jantan dan betina berbeda secara signifikan.



Gambar 1. Survival *Drosophila melanogaster w*^{1118} jantan (A) dan betina (B) yang dipaparkan etanol pada berbagai varian konsentrasi. EtOH, etanol

Drosophila jantan mengalami kematian lebih cepat dibandingkan dengan *Drosophila* betina, setelah pemaparan etanol pada konsentrasi 25%, 45% dan 65% namun tidak pada konsentrasi 85%, mengindikasikan bahwa etanol menyebabkan penurunan *survival* dan tergantung pada jenis kelamin (*sex-dependent*) dan tergantung pada konsentrasi (*concentration-dependent*). Efek negatif etanol juga terlihat pada mamalia dan hal ini juga bergantung pada jenis kelamin (REF), seperti yang terlihat pada penelitian ini. Hal tersebut pun didukung oleh hasil analisis farmakokinetik bahwa peningkatan konsentrasi etanol pada betina dapat meningkatkan laju absorbsi atau menurunkan laju metabolisme etanol dan begitupun sebaliknya (19).

Selain dari segi perbedaan seksual, peningkatan waktu kematian juga tergantung pada konsentrasi etanol yang dipaparkan, semakin tinggi konsentrasi etanol maka semakin dini waktu kematian **(Gambar 1)**. Tingginya tingkat kematian yang terjadi dapat disebabkan oleh banyak hal, salah satunya adalah meningkatnya jumlah sel yang mengalami apoptosis (9). Penelitian sebelumnya telah menyebutkan bahwa etanol menyebabkan pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang kemudian menginduksi terjadinya apoptosis pada sel (7). Hal ini pun terjadi pada penelitian dengan menggunakan hewan uji tikus dimana etanol dapat mengaktivasi jalur apoptosis sekaligus meningkatkan pembentukan autofagosom yang berperan dalam proses autofagi sebagai respon terhadap stress yang terjadi pada sel (8). Sel yang mengalami apoptosis dan gagal dibersihkan melalui proses fagositosis kemudian berlanjut mengalami nekrosis dan melepaskan *DAMPs* yang dapat mengaktivasi sistem imun *Drosophila* (20,21).

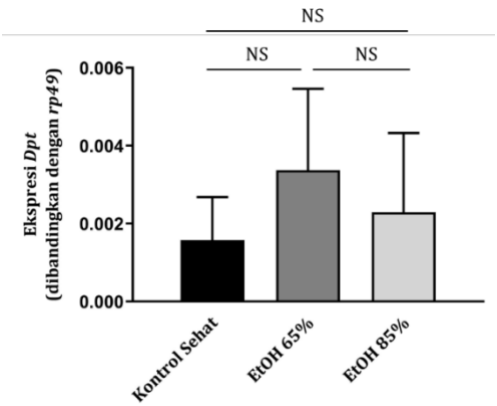


Gambar 2. Level ekspresi gen *Drosomycin* (*Drs*) pada *Drosophila melanogaster* w^{1118} dengan atau tanpa paparan etanol pada konsentrasi 65% dan 85%. EtOH, etanol; *, P < 0.05; NS, P > 0.05

Untuk menganalisis apakah pemaparan etanol dapat meningkatkan aktivasi sistem imun, maka analisis ekspresi gen sistem imun *Drosophila* pada tiga jalur utama yaitu jalur *Toll, Imd* dan *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) pun dilakukan. Pada jalur Toll, diperoleh hasil ekspresi gen *Drs* **(Gambar 2)** pada *Drosophila* yang terpapar etanol konsentrasi 85% memiliki ekspresi *Drs* yang lebih rendah dibandingkan dengan *Drosophila* yang dipaparkan etanol konsentrasi 65% dengan perbedaan yang signifikan.

Hal tersebut dapat terjadi karena, pada konsentrasi tinggi etanol dapat menekan aktivasi sistem imun (4,22). Sehingga dapat dikatakan bahwa pada kondisi stres dikarenakan paparan etanol, gen *Drs* mengalami supresi, dan dapat menurunkan survival *Drosophila* serta menyebabkan kematian. Hal tersebut berbanding terbalik dengan hipotesis peneliti, ekspresi gen *Drs* meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi etanol yang memicu aktivasi sistem imun berlebih dan menyebabkan kematian. Oleh karena itu, untuk mengkonfirmasi hal tersebut perlu dilakukan eksperimen lanjutan menggunakan mutan *Toll Pathway*.

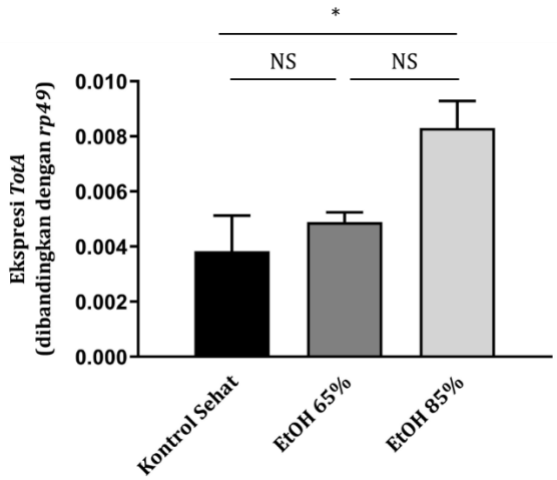
Analisis ekspresi gen jalur Imd, yakni gen *Dpt* (*Diptericin*), memberikaan hasil bahwa ekspresi gen *Dpt* pada *Drosophila* yang dipaparkan etanol 85% dan 65% tidak berbeda dengan hasil yang diperoleh pada kelompok kontrol tanpa perlakuan **(Gambar 3)**. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa ekspresi gen *Dpt* tidak mengalami perubahan akibat paparan etanol. Sebelumnya, telah dilaporkan bahwa stimulasi gen *Dpt* mampu meningkatkan kemampuan *survival Drosophila* dengan cara meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, sehingga mampu menghambat peningkatan ROS. Tetapi, secara umum alkohol diketahui sebagai suatu senyawa yang berkontribusi dalam peningkatan ROS yang berujung pada stress oksidatif (7). Berdasarkan hal tersebut peneliti berasumsi bahwa pada stres yang terjadi akibat paparan etanol dapat menyebabkan peningkatan ekspresi gen *Dpt* untuk menekan produksi ROS berlebih. Untuk mengkonfirmasi hal tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan mutan *Imd pathway*.



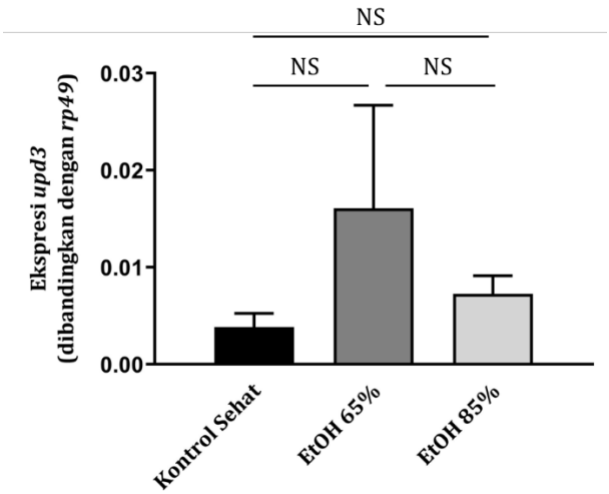
Gambar 3. Level ekspresi gen *Diptericin* (*Dpt*) pada *Drosophila melanogaster* w^{1118} dengan atau tanpa paparan etanol pada konsentrasi 65% dan 85%. EtOH, etanol; NS = non signifikan

Lebih lanjut, analisis ekspresi gen pada jalur JAK-STAT yakni gen *TotA* (*Turandot A*) **(Gambar 4)** dan gen *upd3* (*unpaired 3*) **(Gambar 5)** memperlihatkan bahwa ekspresi gen *TotA* mengalami peningkatan namun tidak dengan *upd 3* setelah pemaparan etanol pada konsentrasi 85%. Sehingga, kemungkinan aktivasi gen *TotA* tidak terjadi melalui jalur *canonical* yang diperantarai oleh *upd3*. *TotA* merupakan salah satu *family* gen Turandot dimana gen *TotA* merespon terhadap infeksi bakteri dan fungi, *cold* dan *oxidative stress*, bahan yang mengoksidasi, *aging,* radiasi, luka dan paparan UV yang mampu mengaktivasi sistem imun (23-27). Etanol merupakan salah satu senyawa yang dapat menyebabkan stres pada *Drosophila* dan dibuktikan melalui data yang diperoleh. Etanol pada konsentrasi tinggi kemungkinan menyebabkan peningkatan ROS kemudian menginduksi kematian atau apoptosis. Selanjutnya, kematian pada jalur apoptosis direspon oleh sitokin, yaitu *Upd3* (pada *Drosophila*) yang kemudian berikatan pada *Dome* dan menginduksi gen *TotA* (23).

Melalui studi ini, sejumlah pertanyaan telah terjawab. Etanol memberikan efek negatif pada kelangsungan hidup Drosophila dan hal ini tampaknya tergantung pada jenis kelamin (*sex-dependent*) *serta* konsentrasi etanol yang digunakan (*concentration-dependent*). Selain itu, lalat buah yang dipaparkan dengan etanol pada konsentrasi tinggi dan letal mengalami malfungsi dalam imunitas: supresi jalur Toll dan induksi pada jalur JAK-STAT.



Gambar 4. Level ekspresi gen *Turandot A* (*TotA*) pada *Drosophila melanogaster* w^{1118} dengan atau tanpa paparan etanol pada konsentrasi 65% dan 85%. EtOH, etanol; *, P < 0.05; NS, Non signifikan



Gambar 5. Level ekspresi gen *Unpaired* (*Upd3*) pada *Drosophila melanogaster* w^{1118} dengan atau tanpa paparan etanol pada konsentrasi 65% dan 85%. EtOH, etanol; NS = non signifikan

Namun, perlu untuk dipahami bahwa studi ini masih menyisakan beberapa pertanyaan yang belum terjawab. Bagaimana mekanisme etanol dapat menyebabkan supresi jalur Toll namun tidak memberikan pengaruh apapun pada jalur Imd? Atau, apakah ada koordinasi antara gen-gen yang berada pada jalur Toll, Imd, dan JAK-STAT dalam kaitannya dengan penurunan *survival* akibat pemaparan etanol.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa paparan etanol menurunkan *survival D. melanogaster*, mungkin terjadi akibat peningkatan stres pada sel yang ditandai dengan peningkatan level ekspresi *TotA* namun tidak dengan ekspresi *upd3*, mengindikasikan bahwa kemungkinan terdapat jalur lain yang mengaktivasi *TotA*, tidak melalui perantaraan *Upd3*. Selain itu, analisis gen sistem imun *Drosophila* menunjukkan bahwa ekpresi gen *Drs* dan *Dpt* memiliki perbedaan nyata: terjadi penurunan ekspresi gen *Drs* namun tidak disertai perubahan ekspresi gen *Dpt* pasca pemaparan etanol.

Ucapan Terima Kasih

Penulis ingin berterima kasih kepada Prof. Yoshinobu Nakanishi (Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University, Japan) atas kesediaanya memberikan lalat buah *D. melanogaster* yang digunakan dalam penelitian ini. Penulis juga ingin menghaturkan rasa terima kasih kepada Prof. Elly Wahyudin (Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin) dan dr. Isra Wahid, Ph.D (Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin) atas bantuannya dalam memfasilitasi penggunaan berbagai fasilitas peralatan penelitian.

Referensi

1. Hasin DS, Grant BF. The National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC) Waves 1 and 2: review and summary of findings. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 2015, *50*, 1609-1640, doi:10.1007/s00127-015-1088-0.
2. Boschuetz N, Cheng S, Mei L, Loy VM. Changes in Alcohol Use Patterns in the United States During COVID-19 Pandemic. *Wmj* 2020, *119*, 171-176.
3. Ratna A, Mandrekar P. Alcohol and Cancer: Mechanisms and Therapies. *Biomolecules* 2017, *7*, doi:10.3390/biom7030061.
4. Romeo J, Wärnberg J, Nova E, Díaz LE, Gómez-Martinez S, Marcos A. Moderate alcohol consumption and the immune system: a review. *Br J Nutr* 2007, *98 Suppl 1*, S111-115, doi:10.1017/s0007114507838049.
5. Szabo G, Saha B. Alcohol's Effect on Host Defense. *Alcohol Res* 2015, *37*, 159-170.
6. Mooren, FC. Janus Kinases (JAK). In *Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease*, Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012; 10.1007/978-3-540-29807-6_4306pp. 497-497.
7. Chen P, Tu X, Akdemir F, Chew SK, Rothenfluh A, Abrams JM. Effectors of alcohol-induced cell killing in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2012, *19*, 1655-1663, doi:10.1038/cdd.2012.47.
8. Li C, Li J, Xu G, Sun H. Influence of Chronic Ethanol Consumption on Apoptosis and Autophagy Following Transient Focal Cerebral Ischemia in Male Mice. *Scientific Reports* 2020, *10*, 6164, doi:10.1038/s41598-020-63213-2.
9. Cohen JI, Roychowdhury S, DiBello PM, Jacobsen DW, Nagy LE. Exogenous thioredoxin prevents ethanol-induced oxidative damage and apoptosis in mouse liver. *Hepatology* 2009, *49*, 1709-1717, doi:10.1002/hep.22837.
10. Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol* 2015, *16*, 907-917, doi:10.1038/ni.3253.
11. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2016, *1863*, 2977-2992, doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
12. Nainu, F. Review : Penggunaan *Drosophila* melanogaster Sebagai Organisme Model Dalam Penemuan Obat. *Jurnal Farmasi Galenika* 2018, *4*, 50-67, doi:10.22487/j24428744. 2018.v4.i1.9969.
13. Nainu F, Nakanishi Y, Shiratsuchi A. Fruit fly as a model organism in the study of human diseases and drug discovery. *Journal of Center for Medical Education Sapporo Medical University* 2019, 21-32.
14. Nainu F, Asri RM, Arsyad A, Manggau MA, Amir MN. *In vivo* antibacterial activity of

green algae *Ulva reticulata* against *Staphylococcus aureus* in *Drosophila* model of infection. *Pharmacognosy Journal* 2018, *10*, 993-997, doi:https://doi.org/10.5530/pj.2018.5.169.

15. Nainu F, Asri RM, Djide MN, Ahsan M, Arfiansyah R, Sartini S, Alam G. Protective effect of green algae *Ulva reticulata* against *Pseudomonas aeruginosa* in *Drosophila* infection model. *HAYATI Journal of Biosciences* 2019, *26*, 163-171, doi:https://doi.org/10.4308/hjb.26.4.%25x.
16. Nainu F, Djide MN, Subehan S, Sartini S, Roska TP, Salim E, Kuraishi T. Protective Signatures of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Calyx Fractions against *Staphylococcus aureus* in *Drosophila* Infection Model. *HAYATI Journal of Biosciences* 2020, *27*, 306-313, doi:https://doi.org/10.4308/hjb.27.4.306.
17. Nainu F, Rahmatika D, Emran TB, Harapan H. Potential application of *Drosophila melanogaster* as a model organism in COVID-19-related research. *Frontiers in Pharmacology* 2020, *11*, doi:10.3389/fphar.2020.588561.
18. Buchon N, Silverman N, Cherry S. Immunity in *Drosophila melanogaster*--from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol* 2014, *14*, 796-810, doi:10.1038/nri3763.
19. Devineni AV, Heberlein U. Acute ethanol responses in *Drosophila* are sexually dimorphic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, *109*, 21087-21092, doi:10.1073/pnas.1218850110.
20. Asri RM, Salim E, Nainu F, Hori A, Kuraishi T. Sterile induction of innate immunity in *Drosophila melanogaster*. *FBL* 2019, *24*, 1390-1400, doi:10.2741/4786.
21. Nainu F, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. Induction of Apoptosis and Subsequent Phagocytosis of Virus-Infected Cells As an Antiviral Mechanism. *Front Immunol* 2017, *8*, 1220, doi:10.3389/fimmu.2017.01220.
22. Roehrs T, Roth T. Sleep, sleepiness, and alcohol use. *Alcohol Res Health* 2001, *25*, 101-109.
23. Agaisse H, Perrimon N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev* 2004, *198*, 72-82, doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0133.x.
24. Brun S, Vidal S, Spellman P, Takahashi K, Tricoire H, Lemaitre B. The MAPKKK Mekk1 regulates the expression of Turandot stress genes in response to septic injury in *Drosophila*. *Genes Cells* 2006, *11*, 397-407, doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00953.x.
25. Ekengren S, Hultmark D. A family of Turandot-related genes in the humoral stress response of *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, *284*, 998-1003, doi:10.1006/bbrc.2001.5067.
26. Martin SJ. Cell death and inflammation: the case for IL-1 family cytokines as the canonical DAMPs of the immune system. *Febs j* 2016, *283*, 2599-2615, doi:10.1111/febs.13775.
27. Scholz H, Ramond J, Singh CM, Heberlein U. Functional Ethanol Tolerance in *Drosophila*. *Neuron* 2000, *28*, 261-271, doi:10.1016/S0896-6273(00)00101-X.