

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tetes lemak merupakan salah satu organela sel di dalam sitoplasma. Fungsi organela ini sebelumnya hanya dikenal untuk tempat penyimpanan lipid dalam sel. Namun penelitian terkini menunjukkan bahwa tetes lemak berhubungan dengan berbagai penyakit.¹ Peningkatan akumulasi tetes lemak, baik berupa penambahan jumlah maupun ukuran, ditemukan pada berbagai penyakit inflamasi dan infeksi.² Peningkatan tersebut misalnya didapatkan pada makrofag dalam lesi aterosklerotik,^{3, 4} pada leukosit dalam sendi pasien dengan artritis inflamasi,⁵ dalam cairan efusi pleura atau granuloma kulit pada pasien dengan infeksi *mycobacterial*^{6, 7} dan ditemukan juga pada sel kanker usus besar.⁸ Beberapa jenis patogen seperti virus Hepatitis C, virus *Dengue* dan bakteri *Chlamydia trachomatis* juga diduga memanfaatkan organel tetes lemak untuk perkembangbiakannya dan pertahanan diri dari imunitas sel *host*.^{1, 9, 10}

Selama proses fagositosis dari patogen invasif baik berupa bakteri, parasit maupun virus, proses pembentukan serta maturasi fagosom ditemukan terjadi bersamaan dengan sintesis organel tetes-tetes lemak dalam sitoplasma.¹¹ Peneliti lain menemukan hubungan fisik antara tetes lemak dan fagosom pada sel darah putih neutrofil yang diduga bertujuan untuk mensuplai asam arakidonat untuk pembentukan membran fagosom selama infeksi patogen.¹² Di sisi lain, pembentukan fagosom di dalam sel merupakan pertanda berlangsungnya suatu

proses eliminasi patogen invasif seperti yang disebut dengan autofagi. Hal ini menunjukkan bahwa infeksi patogen memicu aktifnya jalur autofagi sebagai bentuk dari mekanisme perlawanan sel.

Autofagi sebenarnya juga merupakan proses normal yang terjadi pada seluruh organisme eukaryotik dan diregulasi terutama pada respon selular terhadap stres akibat kekurangan nutrisi. Pada kondisi tersebut, organela-organela tertentu di dalam sel didegradasi melalui proses autofagi dimana hasilnya didaur ulang sebagai sumber nutrisi bagi keberlangsungan hidup sel.¹³⁻¹⁵ Dalam proses autofagi, pembentukan dan maturasi dari membran autofagosom merupakan tahapan yang paling krusial. Namun hingga saat ini, sumber asal dari membran autofagosom dan bagaimana proses terbentuknya masih belum diketahui dengan jelas baik pada sel khamir maupun pada sel eukaryotik lain.^{13, 16, 17} Sumber lipid pembentuk membran – membran autofagi juga belum sepenuhnya berhasil diungkap. Sebagai salah satu respon normal sel terhadap stres, sumber lipid untuk pembentukan membran autofagi selayaknya dipasok dari suatu organel yang mampu menyediakan lipid dalam jumlah yang cukup tetapi tidak sampai mengganggu fungsi sel tersebut.¹⁷ Penelitian autofagi pada *Saccharomyces cerevisiae* menunjukkan bahwa ada beberapa organela sel yang mungkin menjadi sumber dari membran autofagosom, yaitu mitokondria, badan golgi dan retikulum endoplasma (RE).¹³ Beberapa penelitian menunjukkan bahwa RE adalah prekursor membran autofagosom yang paling menjanjikan. Di sisi lain, lapisan membran RE diduga merupakan pembentuk utama dari lapisan membran tetes lemak. Tetes lemak terbentuk dari sintesis gliserolipid seperti triasilgliserol (TAG)

dan sterol ester (SE) dari asam lemak - asam lemak bebas oleh enzim-enzim asiltransferase tertentu. Setelah sintesis, gliserolipid tersebut terakumulasi diantara kedua helai membran fosfolipid RE lalu terbentuklah tetes lemak dengan proses *budding*.^{1, 18} Beberapa peneliti menemukan adanya kontak fisik secara langsung antara RE dan tetes lemak yang menguatkan dugaan bahwa biogenesis tetes lemak berlangsung di RE.^{19, 20} Hubungan yang erat antara RE dan tetes lemak mengarahkan peneliti bahwa ada kemungkinan tetes lemak pada tahap tertentu memiliki peran pada pembentukan autofagosom.

Penelitian dengan model sel khamir *S. cerevisiae* yang merupakan suatu mikroorganisme eukaryotik uniseluler adalah model pilihan untuk melakukan berbagai studi mengenai metabolisme, homeostasis atau fungsi fisiologis dari suatu lipid. Hal ini dikarenakan enzim-enzim penting yang terlibat pada metabolisme triasilgliserol, secara struktural dan fungsional sangat terkonservasi di antara spesies khamir dan mamalia.^{21, 22}

Pada khamir *S. cerevisiae*, gliserolipid yang terkandung dalam tetes lemak disintesis oleh empat enzim asiltransferase, yaitu Dga1p dan Lro1p untuk sintesis TAG, serta Are1p dan Are2p untuk sintesis SE.^{20, 23} Dua gen esensial pada sintesis TAG adalah gen *DGAI* dan *LROI*. Gen *DGAI* mengkode protein Dga1p yang merupakan enzim asiltransferase yang berperan pada tahap akhir sintesis TAG, yaitu enzim diasilgliserol dan gen *LROI* mengkode enzim lro1p, suatu fosfolipid asiltransferase yang mengkatalisis esterifikasi diasilgliserol dalam sintesis TAG. Sedangkan 2 gen yang berperan pada sintesis sterol ester adalah gen *ARE1* dan *ARE2* yang masing-masing mengkode enzim Are1p dan Are2p.

Pada penelitian sebelumnya di laboratorium tempat saya melakukan penelitian master, ditemukan bahwa strain mutan RS4 Δ yang tidak dapat mensintesis tetes lemak sangat sensitif terhadap paparan asam lemak eksogen dan mati akibat ditemukannya kerusakan mitokondria. Sel normal seharusnya mampu mengatasi kerusakan mitokondria tersebut dengan aktivasi autofagi, namun tampaknya tidak demikian bagi mutan RS4 Δ . Strain mutan tersebut terdesisi pada empat gen yang bertanggung jawab dalam sintesis TAG dan SE, yakni *DGA1*, *LRO1*, *ARE1* dan *ARE2*. Hal ini menunjukkan adanya kemungkinan bahwa organel tetes lemak pada tahap tertentu memiliki peran penting untuk menjamin terjadinya proses autofagi, khususnya sebagai sumber lipid pembentuk membran autofagosom. Pada studi ini kami ingin mengetahui apakah keempat gen tersebut memiliki peran yang sama dan seimbang dalam proses autofagi.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimanakah peran gen-gen esensial dalam sintesis tetes lemak (*DGA1*, *LRO1*, *ARE1* dan *ARE2*) pada proses autofagi dengan menggunakan model khamir *S. cerevisiae*.

1.3 Tujuan Penelitian

Melakukan analisis sintesis tetes lemak pada gen *DGA1*, *LRO1*, *ARE1* dan *ARE2* dengan model khamir *S. cerevisiae* pada proses autofagi

Tujuan khusus

- Mengetahui adanya hubungan antara organel tetes lemak dan kemampuan autofagi sel eukaryotik *S. cerevisiae* selama respon stres seluler.
- Mengobservasi peran masing-masing gen *DGA1*, *LRO1*, *ARE1* dan *ARE2* pada kondisi stres selular terkait kemampuan sel eukaryotik *S. cerevisiae* dalam menginduksi terjadinya autofagi.
- Menentukan gen yang paling berperan untuk menjalankan proses autofagi pada sel eukaryotik *S. cerevisiae*

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Menambah informasi mengenai fungsi fisiologis organel tetes lemak pada organisme eukaryotik.
2. Menambah informasi mengenai peran organel tetes lemak pada proses autofagi selama respon stres sel.
3. Menambah informasi mengenai peran gen-gen esensial dalam sintesis tetes lemak pada proses autofagi
4. Menjadi informasi awal dari pengetahuan mengenai aspek genetik dari metabolisme lipid dan penyakit-penyakit atau aspek klinis yang berkaitan.
5. Sebagai sarana bagi perkembangan penelitian selanjutnya mengenai fungsi organel tetes lemak pada organisme eukaryotik yang lebih kompleks.

1.5 Originalitas Penelitian

Studi ini merupakan studi yang pertama kali mempelajari tentang peran gen-gen esensial dalam sintesis tetes lemak terhadap proses autofagi. Tabel 1 merepresentasikan daftar penelitian sebelumnya mengenai studi tentang organel tetes lemak dan kaitannya terhadap proses autofagi pada organisme eukaryotik.

Tabel 1. Daftar studi pendahulu mengenai peran sintesis tetes lemak dan sumber lipid pada pembentukan membran autofagi

No	Penulis	Judul Publikasi	Metode	Hasil
1.	van Zutphen T., <i>et al.</i> (2014. Mol. Biol. Cell. 25(2);290-301)	<i>Lipid droplets autophagy in the yeast Saccharomyces cerevisiae</i>	Sel <i>S. cerevisiae</i> ditransformasi dengan Faa4-GFP, Erg6-GFP dan Sec63-GFP untuk melihat aktivitas degradasi tetes lemak pada kondisi <i>nutritional starvation</i> yang memicu terjadinya autofagi. Penelitian juga ditujukan untuk mencari protein dan mekanisme yang berperan pada proses autofagi tetes lemak (<i>LD-autophagy</i>). Metode yang digunakan adalah metode biokimia dengan western blot dan observasi mikroskopik fluoresen.	LD-autophagy diaktifkan pada kondisi <i>nutritional starvation</i> . Autofagi meningkatkan <i>uptake</i> tetes lemak dalam vakuola. Mekanisme degradasi tetes lemak berbeda dengan proses makroautofagi pada umumnya. Tetes lemak terdegradasi dalam vakuola pada saat pembentukan membran autofagosom.
2.	Hailey DW., <i>et al.</i> (2010. Cell. 141; 656-667)	<i>Mitochondrial supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation</i>	<i>Normal Rat kidney cell line</i> ditransformasi dengan marker membran autofagosom Atg5 dan LC3. Observasi juga dilakukan untuk melihat lokalisasi protein outer mitochondrial membrane protein Fis1 dan lipid NBD-PS dari mitokondria ke membran autofagosom.	Marker membran autofagosom ditemukan pada mitokondria serta terdapat lokalisasi dari protein dan lipid mitokondrial pada membran autofagosom selama induksi autofagi pada kondisi <i>nutritional starvation</i> tetapi tidak ditemukan pada proses autofagi akibat <i>ER-stress response</i>