

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Stunting atau kekurangan gizi kronis merupakan masalah utama di negara berkembang. Menurut WHO (2020), prevalensi anak yang mengalami *stunting* secara global yakni sekitar 21,9% dari 149,2 juta jiwa dan sebagian besar berasal dari Asia (World Health Organization, 2020). *Stunting* memiliki dampak jangka pendek seperti terganggunya perkembangan fisik dan mental, kecerdasan menurun, hingga permasalahan metabolisme pada anak. Sedangkan, dampak jangka panjangnya berupa menurunnya kemampuan kognitif dan daya tahan tubuh, sehingga berisiko terserang penyakit (Fitri dkk., 2022). *Stunting* pada anak secara langsung dipengaruhi oleh asupan makanan yang kurang, sehingga kondisi anak yang *Undernutrition* cenderung rentan mengalami *stunting* (Sutiari dkk., 2022).

Undernutrition pada anak akan meningkatkan risiko infeksi, mortalitas dan morbiditas bersamaan dengan penurunan perkembangan mental anak. Hubungan antara *undernutrition* beserta penyakit infeksi sangat erat, sebab anak dengan kondisi *undernutrition* yang menderita penyakit infeksi cenderung kehilangan nafsu makan sehingga berdampak pada ketidakseimbangan kebutuhan nutrisi (Betan dkk., 2018). Ketika kebutuhan nutrisi pada anak tidak mencukupi, maka pasokan makronutrien dan mikronutrien ke sel-sel sistem imun akan berkurang secara signifikan, sehingga imunitas akan terganggu dan respon sistem imun menjadi tidak efektif terhadap bakteri patogen (Munteanu & Schwartz, 2022). Saat tubuh terserang oleh bakteri patogen maka respon sistem imun pertama yang diaktifkan yaitu sistem imun humoral (*innate immunity*) dengan mekanisme mencegah penyebaran mikroorganisme dalam tubuh dengan pemusnahan bakteri intraseluler oleh polimorfonuklear dan makrofag (Munasir, 2016).

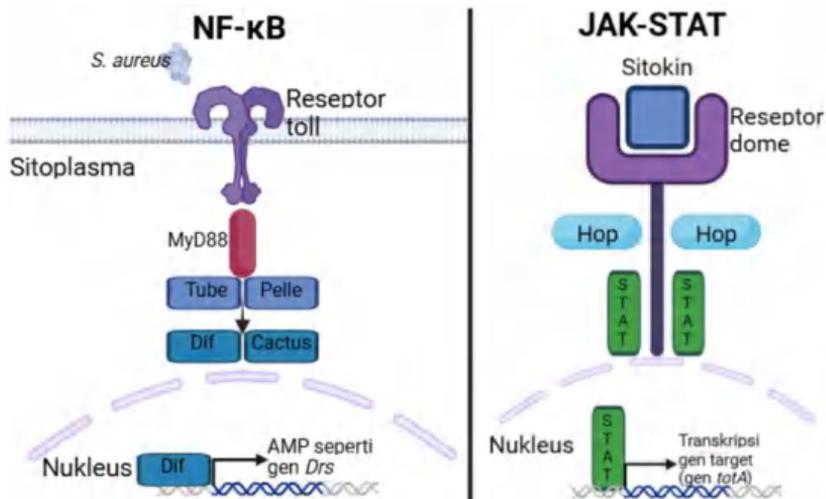
Penyakit infeksi pada anak-anak *undernutrition* dapat disebabkan oleh bakteri gram positif dengan spesies *Staphylococcus* yaitu *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Abrha (2011), sebanyak 28% bakteremia pada anak-anak dengan kondisi *undernutrition* disebabkan oleh bakteri *S. aureus* (Abrha dkk., 2011). Salah satu faktor yang menyebabkan bakteremia oleh *S. aureus* yaitu ketika seseorang memiliki sistem imun yang menurun, kemudian terserang bakteri di selaput lendir ataupun luka terbuka, maka bakteri *S. aureus* dapat masuk ke dalam aliran darah (Yousefa dkk., 2022). Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui korelasi secara molekuler antara penyakit infeksi.



penggunaan hewan coba dalam pengkajian model penyakit telah erapa penelitian. Pemodelan *stunting undernutrition* dengan n dikaji sebelumnya menggunakan hewan mamalia, namun terbatas dalam waktu dan biaya (Leseigneur & Buchrieser, belum ada penelitian yang melaporkan efek *stunting* dengan reus terhadap respon imun humoral pada manusia. Oleh karena

itu, salah satu alternatif hewan coba yang dapat digunakan untuk melakukan uji ini yaitu *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) karena memiliki keuntungan yaitu masa hidup yang singkat, kesamaan genetik dengan manusia sekitar 75% dan pemeliharaan yang mudah (Nainu dkk., 2018).

Pada *D. melanogaster* juga terdapat sejumlah gen yang berperan penting dalam sistem imun yaitu *Drosomycin* (*Drs*) dan *Turandot A* (*totA*). Kedua gen ini berperan sebagai aktivitas pertahanan imun humoral (Buchon dkk., 2014). Gen *Drs* merupakan peptida antimikroba yang banyak diekspresikan dalam respon imun *D. melanogaster* dan salah satu jalur untuk mengaktifkan respon imun humoral tersebut yaitu sinyal NF- κ B (Younes, 2020). Adapun ekspresi gen *totA* merupakan bagian dari gen *Turandot* yang memberi sinyal faktor humoral akibat induksi stres yang diaktifkan sebagai respons terhadap infeksi bakteri. Jalur untuk mengaktifkan ekspresi gen *totA* yaitu sinyal JAK-STAT pada *D. melanogaster* (Ekengren & Hultmark, 2001).



Gambar 1. Skema sinyal NF- κ B dan JAK-STAT

Ketersediaan pemodelan ini dapat membantu penelitian ini untuk melihat efek *stunting* terhadap ekspresi gen NF- κ B dan JAK-STAT pada *D. melanogaster* yang terinfeksi *S. aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek model *stunting like-phenotype* terhadap ekspresi gen imunitas humoral (NF- κ B dan JAK-STAT) pada *D. melanogaster* yang terinfeksi *S. aureus*?



tian

efek model *stunting like-phenotype* terhadap ekspresi gen NF- κ B dan JAK-STAT) pada *D. melanogaster* yang terinfeksi *S.*

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, autoklaf (Hirayama[®]), BSC II (*Biosafety Cabinet Class II*), cawan petri, *hot plate* IKA C-MAG HS 7, inkubator (Mettler[®]), *micropestle* (Geneaid[®]), *micropipet* (Dragonlab[®]), *microtube* (Gene follower[®]), *microplate* (Gene follower[®]), *multi channel micropipet* (Dragonlab[®]), spoit 10 mL (OneMed[®]), *Thermal cycler* qPCR (Rotor Gene Q, Qiagen[®]), timbangan analitik (Sartorius[®]), *treff tube* (TreffLab[®]), vial *Drosophila* (Biologix[®]) dan zoom stereo mikroskop (Motic[®]).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu agar, air, asam propionat, agarosa, *D. melanogaster w¹¹¹⁸*, gas CO₂, glukosa, *GoTaq[®]1-Step RT-qPCR System* (Promega[®]), metil paraben, tepung jagung, etanol 70% (Onemed[®]), *phosphate buffer saline* (Onemed[®]), *PureLink RNA Mini Kit* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), sukrosa, suspensi bakteri *S. aureus* yang setara dengan McFarland 2.0, satu set primer *Drs*, satu set primer *totA* dan *yeast*.

2.2 Metode Kerja

2.2.1 Penyiapan hewan uji

Penelitian ini menggunakan 10 lalat dewasa *D. melanogaster wildtype w¹¹¹⁸* jantan dan betina sebagai organisme model yang dikawinkan serta dipelihara pada suhu 25°C (Luheshi dkk., 2007).

2.2.2 Penyiapan pakan *D. melanogaster*

Penyiapan pakan dibuat dua jenis pakan yaitu pakan normal dan pakan kurang nutrisi (pengurangan nutrisi sebanyak 50%) yang masing-masing dibuat sebanyak 100 mL, kemudian dipanaskan di atas *hot plate* hingga tekstur pakan mengental. Dinginkan dan tambahkan 400 µL asam propionat dan 450 µL metil paraben (Vijendravarma dkk., 2012).

Tabel 1. Komposisi pakan

Pakan normal (nutrisi 100%)		Pakan kurang nutrisi (nutrisi 50%)	
Bahan	Jumlah	Bahan	Jumlah
Glukosa	6 g	Glukosa	3 g
Sukrosa	3 g	Sukrosa	1,5 g
	1,25 g	Yeast	0,62 g
	5 g	Tepung jagung	2,5 g
	1,35 g	Agar	1,35 g
	400 µL	Asam propionat	400 µL
	450 µL	Metil paraben 15%	450 µL
	<i>ad</i> 100 mL	Air	<i>ad</i> 100 mL



2.2.3 Uji model infeksi *S. aureus* pada *D. melanogaster*

Larva dipuasakan selama 2 jam, kemudian dibuat sumuran berisi 100 μ L agarosa 1,25% dan *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Setelah itu, dimasukkan suspensi bakteri *S. aureus* yang setara dengan McFarland 2.0 dalam PBS yang ditambahkan 10% sukrosa ke dalam sumuran dan lakukan pemindahan larva ke dalam masing-masing sumuran, lalu tutup dengan stiker penyegel yang dilubangi sebagai ventilasi. Selanjutnya, diinkubasi selama 1x24 jam, lalu dimasukkan kembali ke pakan dan diamati kelangsungan hidupnya (Raval dkk., 2023).

2.2.4 Uji *crawling* pada *D. melanogaster*

Pengujian *crawling* dilakukan pada masing-masing kelompok perlakuan menggunakan larva instar 3 dengan mengamati pergerakannya di dalam cawan petri yang berisi agar 2%. Kemudian, dilakukan perhitungan jarak tempuh larva melalui kertas grafik dalam satuan mm/menit (Sabar dkk., 2016; Meghashree & Nagaraj, 2020).

Berdasarkan penelitian Fiore (1998) hewan model seperti tikus *Undernutrition* yang telah terinfeksi selama 20-25 hari mengalami penurunan aktivitas lokomotor (Fiore dkk., 1998). Oleh karena itu, pengujian ini dapat dilakukan untuk mengetahui perbandingan pada masing-masing kelompok *D. melanogaster*.

2.2.5 Penyiapan sampel RNA

Penyiapan sampel RNA dilakukan dengan mengisolasi RNA menggunakan *PureLink RNA Mini Kit* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Sebanyak 5 larva yang masih hidup dimasukkan ke dalam *treff tube*. Reagen *lysis buffer* yang telah dicampur dengan 2-mercaptoetanol yang disiapkan, di mana 300 μ L *lysis buffer* diambil untuk setiap sampel, kemudian ditambahkan 1% 2-mercaptoetanol dari *total* volume *lysis buffer*. Setelah itu, 300 μ L campuran tersebut dimasukkan ke dalam setiap tabung sampel, dan sampel dihancurkan menggunakan *micropestle*. Selanjutnya tabung disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Lisat dipindahkan ke tabung baru, lalu ditambahkan 300 μ L etanol 70% dan divortex selama 10 detik. Setelah itu, sampel dipindahkan ke *spin cartridge* dan disentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 14.000 rpm. Selanjutnya, filtrat dibuang dan *spin cartridge* dimasukkan kembali ke tabung yang sama. Sebanyak 700 μ L *wash buffer* I ditambahkan ke *spin cartridge*, lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik pada suhu ruang. Filtrat dibuang, dan *spin cartridge* dipindahkan ke



Sebanyak 500 μ L *wash buffer* II ditambahkan ke *spin cartridge*, lama 15 detik pada kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang, elah itu, *spin cartridge* kembali disentrifugasi selama 1 menit 00 rpm pada suhu ruang. Sebanyak 40 μ L *RNAse free water* ah *spin cartridge*, kemudian diulangi dengan jumlah yang sama. asi pada suhu ruang selama 1 menit. Setelah itu, 40 μ L *RNAse* an lagi ke *spin cartridge* dan disentrifugasi selama 2 menit pada

kecepatan 14.000 rpm. *Spin cartridge* dibuang, dan tabung penampung berisi RNA disimpan pada suhu -80°C (Luheshi dkk., 2007).

2.2.6 Analisis ekspresi gen

Analisis ekspresi gen dilakukan dengan menggunakan *real-time* PCR dengan kit *GoTaq[®]1-Step RT-qPCR System* (Promega[®]). Proses *real-time* PCR dilakukan dengan primer untuk gen *Drs* dan *totA* dalam tabung PCR dan volumenya 20 μL . Sebagai referensi untuk tingkat ekspresi gen inang, digunakan primer protein ribosomal *rp49* yang dilakukan sesuai prosedur RT-qPCR yang sama (Luheshi dkk., 2007).

Tabel 2. Sekuens primer gen

Gen	Sekuens Primer		Kondisi
	Forward	Reverse	
<i>Drs</i>	5'- CGT GAG AAC CTT TTC CAA TAT GAT G – 3'	5'- TCC CAG GAC CAC CAG CAT– 3'	1. Siklus PCR: 40 siklus 2. Hold: 37°C , 15 menit 3. Hold2: 95°C , 10 menit
<i>totA</i>	5'-CCC TGA GGA ACG GGA GAG TA-3'	5'-CTT TCC AAC GAT CCT CGC CT -3'	4. Denaturasi: 95°C , 10 detik 5. Annealing: 60°C , 30 detik
<i>rp49</i>	5' – GAC GCT TCA AGG GAC AGT ATC TG – 3'	5'– AAA CGC GGT TCT GCA TGA G – 3'	6. Extension: 72°C , 30 detik

2.2.7 Analisis data

Hasil data yang dari uji *crawling* dianalisis menggunakan software *GraphPad Prism 9*. Sementara itu, data hasil uji ekspresi gen dari RT-qPCR berupa nilai Ct diolah menggunakan software Qgene dan dianalisis secara statistik dengan metode *One Way ANOVA* dan *t-test* menggunakan software *GraphPad Prism 9*.

