

## BAB I PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) merupakan bakteri patogen pada manusia yang menyebabkan berbagai jenis gejala klinis. Saat ini, pengobatan utama infeksi *S. aureus* dengan penggunaan antibiotik. Namun seiring dengan berjalannya waktu, *S. aureus* menjadi semakin kebal yang diakibatkan evolusi bakteri dan penyalahgunaan antibiotik. Sehingga, hal ini menyebabkan peningkatan infeksi *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) di seluruh dunia yang berdampak pada pengobatan infeksi MRSA menjadi lebih sulit (Guo *et al.*, 2020). Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh WHO pada tahun 2017, MRSA terdaftar sebagai prioritas tinggi yang membutuhkan antibiotik baru. Infeksi MRSA juga memiliki risiko kematian 64% lebih tinggi dibandingkan infeksi bakteri yang sensitif terhadap antibiotik (Almutairi *et al.*, 2024).

Infeksi yang disebabkan *S. aureus* dapat meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Ramond *et al.*, 2021). Ketika terjadi produksi ROS berlebihan, akan terjadi stres oksidatif yang dapat memicu kerusakan sel. Produksi ROS berlebihan akibat infeksi dapat dinetralkan oleh antioksidan endogen seperti *Superoxide Dismutase* (SOD) (Salim, 2017; Maurya & Namdeo., 2021). SOD bertindak sebagai enzim antioksidan yang membersihkan radikal oksigen dengan menghilangkan radikal superoksida ( $O_2^-$ ) berlebih dengan mengubahnya menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan oksigen molekuler ( $O_2$ ) (Wang *et al.*, 2018). Dengan demikian, masalah terkait infeksi dapat diteliti lebih mendalam melalui pemanfaatan efek antioksidan endogen, khususnya yang berasal dari bahan alam.

Salah satu tanaman yang memiliki efek antioksidan adalah lengkuas (*Alpinia galanga* Linn.). Berdasarkan pemeriksaan fitokimia pada lengkuas, menunjukkan adanya golongan senyawa terpenoid, fenolik, flavonoid dan minyak atsiri sekitar 0,4%, yaitu  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene,  $\alpha$ -terpineol, eugenol, dan 1,8-cineol, serta konstituen lain seperti quercetin, kaempferol, isorhamnetin, kaempferide, 3-methyl ether, galangin, 1-acetoxychavicol acetate, 1-acetoxyeugenol acetate, dan galanolactone (Jain *et al.*, 2012). Selain itu, rimpang lengkuas juga telah terbukti memiliki aktivitas antimikroba yang kuat terhadap bakteri gram positif khususnya *S. aureus*, termasuk MRSA (Karunathne *et al.*, 2020). Pelarut saat ekstraksi dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri. Lengkuas yang diekstraksi menggunakan pelarut non polar seperti n-heksan memiliki aktivitas antimikroba yang baik. Ekstraksi dapat menarik senyawa seperti,  $\alpha$ -humulane,  $\beta$ -guaiene,  $\alpha$ -pinene oxide, bulnesol,  $\alpha$ -bisabolol, dan  $\beta$ -farnesol (Samsudin *et al.* 2020). Dalam penggunaannya, ekstrak lengkuas telah banyak antibakteri, namun masih belum banyak dilaporkan pengaruh ROS dan antioksidan endogen secara molekuler terhadap *S. aureus* pada hewan coba.



Dalam pengujian *in vivo*, penggunaan mamalia telah banyak dilakukan karena potensinya yang dapat mereplikasi perkembangan penyakit, diagnosis, dan pengobatan yang serupa dengan manusia (Mukherjee *et al.*, 2022). Akan tetapi, penggunaan mamalia kurang efektif karena digunakan dalam skala besar, tingginya biaya pemeliharaan, persyaratan teknis dan memerlukan kode etik (Van den Breghe, 2022). Untuk mengatasi keterbatasan tersebut, perlu digunakan alternatif hewan coba dengan biaya yang rendah dan hasil yang tinggi, yaitu penggunaan hewan invertebrata *Drosophila melanogaster*.

*Drosophila melanogaster* telah digunakan sebagai organisme multiseluler sebagai *platform* pemodelan dalam memahami mekanisme dasar genetika (Nainu *et al.*, 2022). *D. melanogaster* memiliki kemiripan genetik 75% yang homolog dengan manusia, memiliki umur yang relatif singkat, biaya pemeliharaan yang rendah, tidak diperlukan kode etik, dan mudah dilakukan modifikasi genetik (Munnik *et al.*, 2022; Mirzoyan *et al.*, 2019). *D. melanogaster* memiliki gen SOD yang homolog dengan manusia (Otaki *et al.*, 2016), sehingga memungkinkan dalam penggunaannya untuk mengetahui pengaruh antioksidan endogen SOD terhadap infeksi.

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan pengujian efek ekstrak lengkuas terhadap *D. melanogaster* dan pengaruhnya terhadap gen *sod1* dan *sod2* terhadap *D. melanogaster* yang terinfeksi *S. aureus* setelah pemberian ekstrak lengkuas.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana ekstrak lengkuas mempengaruhi ekspresi gen *sod1* dan *sod2* setelah *D. melanogaster* terinfeksi *S. aureus*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui pengaruh ekstrak lengkuas terhadap ekspresi gen *sod1* dan *sod2* pada *D. melanogaster* yang terinfeksi *S. aureus*.



## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### II.1 Alat dan Bahan

##### II.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, autoklaf, blender, BSC II (*Biosafety Cabinet Class II*), *micropestle* (Geneaid®), *microtube*, oven (Memmert®), papan CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> stage), *rotary evaporator*, Thermal cycler qPCR (*RotorGene Q*, Qiagen®), toples, *zoom stereo microscope* (Motic®), *vial* dan *plugs Drosophila* (Biologix®).

##### II.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan didalam penelitian ini antara lain asam propionat, *aquadest*, *brewer's yeast*, *corn meal*, etanol 70% (onemed®), gas CO<sub>2</sub>, lengkuas (*Alpinia galanga* Linn.), *microtube* (Gene follower®), metil paraben, *nutrient agar*, *peptone water*, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), sukrosa, *treff tube* (Treff lab®), PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™), satu set primer *sod1*, satu set primer *sod2*, satu set primer *rp49*, dan GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega®).

#### II.2 Metode Penelitian

##### II.2.1 Preparasi ekstrak lengkuas

Rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* Linn.) dimasukkan ke dalam oven untuk proses pengeringan dengan suhu 55°C selama 2 hari. Lengkuas yang telah dikeringkan, kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut n-heksana. Pelarut dari filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C untuk memperoleh ekstrak kental (Samsudin *et al.*, 2018 & Sukarsih *et al.*, 2021).

##### II.2.2 Penyiapan hewan coba *Drosophila melanogaster*

Hewan uji digunakan berupa lalat buah (*Drosophila melanogaster*) genotip *w<sup>1118</sup>*. Lalat dipelihara di dalam vial yang berisi pakan pada suhu sekitar 25°C (Luheshi *et al.*, 2007).

##### II.2.3 Pembuatan pakan *Drosophila melanogaster*

###### II.2.3.1 Pembuatan pakan standar

Setiap 200 mL pakan dibuat dengan mencampurkan 5 gram ragi, 15 gram tepung jagung, 1,8 gram agar, dan 9 gram gula pasir, kemudian ditambahkan air hingga mencapai volume 200 mL. Campuran tersebut diaduk dan dipanaskan hingga itu, ditambahkan 800 µl asam propionat dan 900 µl metil akhir kemudian dimasukkan ke dalam vial dan dibiarkan jam.



### II.2.3.1 Pembuatan pakan perlakuan ekstrak

Pada pembuatan pakan untuk perlakuan variasi konsentrasi ekstrak lengkuas, terlebih dahulu ekstrak dilarutkan dengan DMSO 0.3%, kemudian dilakukan pengenceran dari larutan stok 2.5% untuk memperoleh konsentrasi ekstrak 0.05%, 0.1%, dan 0.15%, setiap stok konsentrasi ekstrak ditambahkan kedalam pakan standar dan dibuat dalam 3 replikasi.

### II.2.4 Uji model infeksi *Staphylococcus aureus* pada *Drosophila melanogaster*

Larva instar II ditempatkan dalam tabung *microcentrifuge* berisi 1200  $\mu\text{L}$  *crushed banana* dan 300  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri MRSA dengan konsentrasi setara *Mcfarland* 1, kemudian didiamkan selama 3 jam. Setelah itu, larva dibilas menggunakan PBS dan dipindahkan ke vial yang telah berisi pakan perlakuan ekstrak untuk melanjutkan ke tahap pengujian berikutnya (Sukarsih *et al.*, 2021).

### II.2.5 Penyiapan sampel RNA

RNA diisolasi menggunakan PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™). Sebanyak 10 larva *D. melanogaster* yang masih hidup dimasukkan ke dalam *treff tube*. Reagen *lysis buffer* segar yang telah dicampur dengan *2-mercaptoethanol* disiapkan, di mana setiap sampel memerlukan 300  $\mu\text{L}$  *lysis buffer*, dan ditambahkan *2-mercaptoethanol* sebanyak 1% dari total volume *lysis buffer*. Sebanyak 300  $\mu\text{L}$  campuran ini ditambahkan ke masing-masing tabung sampel, dan sampel larva dihancurkan menggunakan *micro pestle*. Sampel kemudian disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 14.000 rpm. Lisat dipindahkan ke tabung baru, ditambahkan 300  $\mu\text{L}$  etanol 70%, dan di vortex selama 10 detik. Sampel dipindahkan ke *spin cartridge* dan disentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 14.000 rpm. Setelah itu, filtrat dibuang, dan *spin cartridge* dimasukkan kembali ke dalam tabung yang sama. Tambahkan 700  $\mu\text{L}$  *Wash Buffer I* ke dalam *spin cartridge*, lalu sentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik pada suhu ruang. Filtrat dibuang dan *spin cartridge* dipindahkan ke tabung koleksi baru. Tambahkan 500  $\mu\text{L}$  *wash buffer II* ke *spin cartridge*, kemudian sentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang. Filtrat dibuang, dan proses ini diulangi dua kali.

Selanjutnya, *spin cartridge* disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Tambahkan 40  $\mu\text{L}$  air bebas *RNAse* ke bagian tengah *spin cartridge*, kemudian ulangi dengan jumlah air yang sama. Inkubasi selama 1 menit pada suhu ruang. Tambahkan kembali 40  $\mu\text{L}$  air bebas *RNAse* ke dalam *spin cartridge* dan sentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 14.000 rpm. *Spin cartridge* dibuang, dan tabung koleksi yang mengandung RNA disimpan pada *et al.*, 2007).



### presensi gen

*sod1* dan *sod2* dianalisis menggunakan metode *reverse* *transcriptase* PCR (RT-qPCR) dengan volume reaksi masing-masing 10  $\mu\text{L}$  Taq® 1-Step RT-qPCR System (Promega®). Set primer yang digunakan untuk *sod1* (forward: 5'- AGG TCA ACA TCA CCG ACT CC -3',

reverse: 5'- GTT GAC TTG CTC AGC TCG TG -3') dan primer *sod2* (forward: 5'- TGG CCA CAT CAA CCA CAC -3', reverse: 5'- TTC CAC TGC GAC TCG ATG -3') dalam reaksi berukuran 20 µl. Siklus PCR terdiri dari satu putaran pada suhu 95°C (10 detik), 63°C (30 detik), dan 72°C (30 detik) (Rumata *et al.*, 2023).

Amplifikasi produk yang diharapkan divalidasi menggunakan profil *melt curve* pasca-amplifikasi. Sebagai kontrol referensi internal dalam uji RT-qPCR, digunakan tingkat RNA ribosom dari *rp49*. Gen *rp49* mengkodekan protein ribosom yang merupakan bagian dari subunit besar ribosom dan berperan dalam sintesis protein. Thermal cycler Rotor-Gene Q (Qiagen, Jerman) digunakan dengan profil suhu 37°C selama 15 menit, 95°C selama 10 menit, diikuti dengan 40 siklus pada 95°C selama 10 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik, diikuti dengan analisis *melt curve* dari 60°C hingga 95°C. Data dianalisis menggunakan metode kuantifikasi relatif (Rumata *et al.*, 2023).

**Tabel 1. Sekuens primer masing-masing gen**

Nama Gen	Sekuens Primer		Kondisi
	Forward	Reverse	
<i>sod1</i>	5'- AGG TCA ACA TCA CC G ACT CC - 3'	5'- GTT GAC TTG CTC AGC TCG TG - 3'	1. PCR cycle: 40 Siklus 2. Reverse transcription: 37°C, 15 menit 3. Hot start: 95°C, 10 menit 4. Denaturasi: 95°C, 10 detik 5. Annealing: 60°C, 30 detik 6. Extension: 72°C, 10 detik
<i>sod2</i>	5'- TGG CCA CAT CAA CCA CAC - 3'	5'- TTC CAC TGC GAC TCG ATG - 3'	
<i>rp49</i>	5'- GAC GCT TCA AGG GAC AGT ATC TG - 3'	5' - AAA CGC GGT TCT GCA TGA G - 3'	

### II.2.7 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil analisis ekspresi gen digunakan metode *one way* ANOVA. Semua hasil analisis statistik diolah dengan *software* GraphPad Prism® 9. Data yang disajikan adalah sebagai rata-rata ± SD dan nilai p (<0.05) yang dianggap signifikan secara statistik.

