

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

*Stunting* merupakan gangguan pertumbuhan serta perkembangan otak pada balita (anak di bawah lima tahun) dengan prevalensi mencapai 22,3% pada tahun 2022 secara global. Kondisi ini dapat disebabkan oleh asupan nutrisi yang kurang secara kronis (*chronic undernutrition*). Kemudian di Indonesia, *stunting* pada balita mencapai angka 21,6% di tahun 2022. Penilaian terhadap *stunting* dapat dihitung dengan membandingkan usia serta tinggi badan anak, jika nilai yang didapat kurang dari -2 standar deviasi maka anak dikategorikan mengalami *stunting* (Jamison *et al.*, 2006; Paudpedia, 2022; Paudpedia, 2022).

Kondisi *undernutrition* yang berlangsung lama dapat melemahkan sistem kekebalan tubuh, sehingga menyebabkan seseorang mudah terkena infeksi (Morales *et al.*, 2024). Penyebab serta frekuensi seseorang mengalami infeksi dipengaruhi sebagian besar oleh status nutrisi. Spesies paling umum penyebab infeksi pada anak-anak dengan *undernutrition* adalah *Staphylococcus aureus* (Sturgeon *et al.*, 2023).

Infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* dapat menyebabkan peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Mekanisme peningkatan ROS oleh *S. aureus* dapat terjadi akibat produksi enzim *duox* (*dual oxidase*) oleh *host* sebagai respon terhadap patogen yang menyerang, yang pada akhirnya memicu terjadinya induksi ROS. Selain itu mitokondria dan sel fagosit juga akan menghasilkan ROS untuk melawan infeksi yang terjadi (Ramond, 2021). Akumulasi ROS yang berlebihan dapat memicu terjadinya stres oksidatif. ROS yang berlebihan akan memicu ekspresi enzim SOD (*Superoxide dismutase*) sebagai antioksidan yang dapat mengurangi ROS (Otaki *et al.*, 2016). Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa anak dengan *stunting* memiliki level stres oksidatif yang lebih tinggi dibandingkan dengan anak yang sehat (Maharani *et al.*, 2021). Pengujian yang dilakukan untuk melihat ekspresi gen antioksidan ini dapat dilakukan dengan bantuan hewan model yakni lalat buah (*Drosophila melanogaster*). *D. melanogaster* memiliki gen antioksidan yang homolog dengan manusia yakni *sod1* dan *sod2* (Vitushynska *et al.*, 2015).

Merujuk pada penjelasan di atas, penderita *stunting* akan lebih mudah terkena infeksi *S. aureus* yang juga dapat meningkatkan risiko terjadinya stres oksidatif. Hal ini akan ditegaskan dengan membandingkan produksi gen *sod1* dan



antioksidan pada *D. melanogaster stunting-like phenotype* tidak si *S. aureus*. *D. melanogaster* digunakan sebagai hewan model i sebagai inang untuk beberapa bakteri patogen pada manusia n juga tingkat kemiripan genetik yang tinggi dengan manusia n yang murah (Nainu *et al.*, 2018).

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana ekspresi gen antioksidan (*sod1* dan *sod2*) pada *D. melanogaster stunting-like phenotype* yang terinfeksi *S. aureus*?

## 1.3 Tujuan

Untuk mengetahui pengaruh infeksi *S. aureus* terhadap ekspresi gen antioksidan (*sod1* dan *sod2*) pada *D. melanogaster stunting-like phenotype*.



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### 2.1 Alat dan Bahan

##### 2.1.1 Alat

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

##### 2.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah agar, *aluminium foil*, asam propionat, *aquadest*, *brewer's yeast*, *D. melanogaster* (*w<sup>1118</sup>*), etanol 70% (onemed®), gas CO<sub>2</sub>, glukosa, kapas, *microtube* (Gene follower®), natrium agar, *treff tube* (Treff lab®), PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™, *Thermo Fisher Scientific*), set *primer sod1*, set *primer sod2*, set *primer rp49*, sukrosa, suspensi biakan *S. aureus* setara 2 McFarland, dan tepung jagung.

#### 2.2 Metode Kerja

##### 2.2.1 Penyiapan hewan coba *D. melanogaster*

Pada penelitian digunakan *D. melanogaster* dewasa *wildtype w<sup>1118</sup>* yang dipelihara pada suhu 25°C dan siklus gelap terang selama 12 jam dengan usia *D. melanogaster* yang digunakan berusia 4-7 hari. Jumlah lalat *D. melanogaster* yang digunakan pada setiap kelompok perlakuan adalah 10 jantan dan 10 betina.

##### 2.2.2 Pembuatan pakan *D. melanogaster*

Pada penelitian dibuat pakan dengan kondisi kekurangan nutrisi yakni kandungan gula, *yeast*, dan tepung jagung pada makanan hanya sebanyak 50%. Pakan dibuat dengan mencampur agar, gula pasir, *yeast*, gram tepung jagung kemudian dicukupkan dengan air hingga 100 mL. Campuran dipanaskan pada suhu 100°C sampai mengental lalu didinginkan. Setelah mengental campuran ditunggu mendingin dan dicampur dengan asam propionat serta metil paraben (Putri *et al.*, 2024).



**Tabel 1.** Rincian komposisi pakan *D. melanogaster*

Komposisi	Perlakuan	
	Normal	Stunting
Tepung jagung	5 g	2,5 g
Yeast	1,25 g	0,625 g
Glukosa	6 g	3 g
Sukrosa	3 g	1,5 g
Agar	1,5 g	1,5 g
Asam propionat	400 µL	400 µL
Metil paraben	450 µL	450 µL
Air	ad 100 mL	ad 100mL

### 2.2.3 Pengukuran bobot dan panjang badan *D. melanogaster*

Pengukuran bobot dilakukan dengan mengurangkan bobot cawan petri berisi larva dan bobot cawan petri kosong dengan bantuan timbangan analitik. Selanjutnya, perhitungan panjang badan dilakukan dengan menghitung panjang anterior-posterior dan dorsal-ventral pada tubuh larva dengan bantuan jangka sorong digital (Taylor *et al.*, 2019).

### 2.2.4 Uji model infeksi *S. aureus* pada *D. melanogaster*

Pada penelitian digunakan 96 *well-plate* yang telah diisi dengan 100 µl agarosa 1,25% dalam NaCl 0,9% pada setiap sumuran. Sebelumnya, larva dipuasakan selama 2 jam. Dibuat suspensi *S. aureus* setara 2 McFarland dan ditambahkan 30% sukrosa pada suspensi. Dimasukkan satu larva pada setiap sumuran dan ditambahkan 100 µl suspensi biakan. *Well-plate* ditutup menggunakan lapisan plastik tipis dan dibuat lubang sebagai ventilasi kemudian diinkubasi selama 24 jam (Raval *et al.*, 2023).

Terdapat 6 kelompok pada penelitian ini yakni tanpa perlakuan (normal), infeksi, *Stunting* Tanpa Infeksi ke pakan Normal (STIN), *Stunting* Tanpa Infeksi ke pakan *Stunting* (STIS), *Stunting* Infeksi ke pakan Normal (SIN), dan *Stunting* Infeksi ke pakan *Stunting* (STIS). Kelompok normal dan infeksi akan dimasukkan ke dalam *well-plate* (untuk kelompok normal hanya diberikan larutan sukrosa tanpa biakan *S. aureus*) dan setelah diinkubasi dikembangkan kembali ke pakan normal. Kelompok STIN, STIS, SIN, dan SIS diambil dari kelompok larva yang sebelumnya telah di model *Stunting-like phenotype*, kelompok STIN dan STIS akan dikembangkan di ( ) dan *Stunting* (STIS) setelah dilakukan pemodelan infeksi (ditambahkan biakan) sedangkan kelompok SIN dan SIS akan pakan normal (SIN) dan *Stunting* (SIS) setelah di model infeksi. pada Lampiran 1.



### 2.2.5 Uji kelangsungan hidup *D. melanogaster*

Pada penelitian akan dibandingkan kelangsungan hidup pada seluruh perlakuan yakni *D. melanogaster* tanpa perlakuan, *stunting like-phenotype* terinfeksi dengan pakan yang tetap kekurangan nutrisi dan pakan normal, serta *stunting like-phenotype* tidak terinfeksi dengan pakan yang tetap kekurangan nutrisi dan pakan normal. Uji ini dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang menjadi lalat dewasa (Rockwell *et al.*, 2019).

### 2.2.6 Penyiapan sampel RNA dan analisis ekspresi gen

Penyiapan sampel RNA dimulai pada tahapan isolasi RNA yang dilakukan menggunakan PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Sepuluh larva *D. melanogaster* disiapkan dan dimasukkan ke dalam *treff tube*. Disiapkan reagen *lysis buffer* segar yang dicampur dengan *2-mercaptoethanol*, setiap 300 µL *lysis buffer* ditambahkan *2-mercaptoethanol* 1% dari total seluruh volume *lysis buffer*. Campuran ditambahkan pada setiap sampel pada setiap *tube*. Kemudian lalat di dalam *treff tube* dihancurkan menggunakan *micropestle* dan disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Lisat kemudian dipindahkan ke dalam *tube* baru dan ditambahkan 300 µL etanol 70% dan di-*vortex* selama 10 detik. Kemudian sampel dipindahkan ke *spin cartridge* dan disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik. Selanjutnya filtrat dibuang kemudian *spin cartridge* dimasukkan pada *tube* yang sama. 700 µL *wash buffer* I ditambahkan pada *spin cartridge* kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm di suhu ruang selama 15 detik. Filtrat dibuang pada *collection tube* yang sama. Setelahnya ditambahkan pada *spin cartridge* 300 µL etanol 96% dan disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit di suhu ruang. Filtrat dibuang pada *collection tube* yang sama dan proses ini diulang sebanyak 2 kali. Kemudian *spin cartridge* disentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang. Selanjutnya pada bagian tengah *spin cartridge* ditambahkan 40 µL *RNAse Free Water* dan diulangi dengan jumlah yang sama. Kemudian diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang dan selanjutnya ditambahkan 40 µL *RNAse free water* pada *spin cartridge* dan disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Setelah itu *collection tube* yang mengandung RNA di simpan pada suhu -80°C dan *spin cartridge* dibuang.

Setelah isolasi RNA dilakukan, selanjutnya adalah mengukur level ekspresi gen *sod1* dan *sod2*. Tahapan ini dilakukan dengan menggunakan *real-time* PCR menggunakan *1-Step RT-qPCR System* (Promega®). *Real-time* PCR menggunakan 2 set primer yakni *sod1* dan *sod2*, dengan urutan primer : 5'- AGGTCAACATCACCGACTCC -3' dan *reverse primer*: 5'- CTCTCGTG -3') dan *sod2* (*forward primer*: 5'- ACAC -3' dan *reverse primer*: 5'- TTCCACTGCGACTCGATG -3'). Reaksi dilakukan dengan 10 µL dalam beberapa siklus. Satu siklus selama 10 detik pada suhu 95°C dan 30 detik pada suhu 72°C. Referensi tingkat



ekspresi gen inang yang digunakan adalah satu pasang primer protein ribosomal *rp49* (*forward primer*: 5' GAC GCT TCA AGG GAC AGT ATC TG – 3', *reverse primer*: 5' AAA CGC GGT TCT GCA TGA G – 3') yang dijalankan sama dengan prosedur RT-qPCR di atas.

**Tabel 2.** 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' (20 mer)	5' – GTT GAC TTG CTC AGC TCG TG – 3' (20 mer)	1. PCR cycle: 40 Siklus 2. Reverse transcription: 37°C, 15 menit
<i>sod2</i>	5'- TGG CCA CAT CAA CCA CAC – 3' (18 mer)	5'- TTC CAC TGC GAC TCG ATG – 3' (18 mer)	3. Hot start: 95°C, 10 menit 4. Denaturasi: 95°C, 10 detik
<i>rp49</i>	5'- GAC GCT TCA AGG GAC AGT ATC TG – 3' (23 mer)	5' – AAA CGC GGT TCT GCA TGA G – 3' (19 mer)	5. Annealing: 60°C, 30 detik 6. Extension: 72°C, 10 detik

### 2.2.7 Analisis Data

Hasil data pengukuran tinggi dan lebar tubuh larva dianalisis secara statistik dengan metode *t-test* menggunakan *software GraphPad Prism 9*. Hasil data *survival* dianalisis secara statistik dengan metode *One-Way Anova* dengan *Dunnet's Post Hoc test* menggunakan *software Graphpad Prism 9*. Hasil data uji ekspresi gen dari RT-qPCR diolah menggunakan *software Qgene* dianalisis secara statistik dengan *One-Way Anova* dengan *Dunnet's Post Hoc test*.



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)