

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi merupakan penyakit menular yang dapat disebabkan oleh bakteri dan menjadi hambatan terhadap kesehatan masyarakat global (Antabe & Ziegler, 2020). Salah satu bakteri yang sering menimbulkan infeksi adalah *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dan telah mengakibatkan lebih dari 1 juta kematian pada tahun 2019 (GBD, 2022). Pengobatan utama terhadap penyakit infeksi adalah pemberian antibiotik. Namun, penggunaan antibiotik yang tidak sesuai akan menyebabkan terjadinya resistensi terhadap antibiotik seperti *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) sekaligus menjadi ancaman paling mendesak saat ini (GBD, 2024). Oleh karena itu, diperlukan suatu alternatif baru untuk mengatasi hal tersebut.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa dari bahan alam mampu menjadi kandidat pengobatan infeksi *S. aureus*, diantaranya adalah lengkuas (*Alpinia galanga*). Lengkuas mengandung senyawa non-polar dan minyak atsiri yang dapat menghambat *S. aureus* dengan mekanisme sebagai antibakteri (Samsudin et al., 2018). Selain itu, lengkuas juga memiliki efek imunomodulator sebagai bentuk pertahanan sistem imun tubuh akibat terjadinya infeksi (Chaweepack et al., 2015; Jain et al., 2012). Namun, penelitian mengenai efek imunomodulator ekstrak lengkuas secara molekuler masih belum memadai khususnya saat terjadi infeksi *S. aureus* (Jain et al., 2012; Yuandani et al., 2023). Sehingga, perlu eksplorasi lebih lanjut terkait mekanisme ekstrak lengkuas sebagai imunomodulator secara *in vivo* menggunakan hewan coba.

Penggunaan hewan mamalia pada pengujian *in vivo* umumnya telah banyak dilakukan. Akan tetapi, hal ini memiliki keterbatasan dalam biaya, waktu, dan tingginya risiko kegagalan dalam pengujian. Sehingga, beberapa penelitian mulai berfokus menggunakan hewan invertebrata sebagai alternatif (Leseigneur dan Buchrieser, 2023). Salah satu hewan invertebrata yang saat ini direkomendasikan dalam pengujian *in vivo* adalah lalat buah atau *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*). *D. melanogaster* dapat digunakan sebagai model yang tepat dalam skrining kandidat senyawa alami dan memungkinkan pemodelan berbagai penyakit manusia (Ecovoiu et al., 2022). *D. melanogaster* memiliki kemiripan genetik dengan manusia sebesar 75% dan juga mampu menguraikan mekanisme molekuler respon imun terkait efek farmakologis suatu senyawa yang sejalan dengan manusia (Pratomo et al., 2022). Hal ini menunjukkan potensi *D. melanogaster* untuk



sebagai hewan uji dalam proses identifikasi efek imunomodulator suatu

infeksi *D. melanogaster*, terdapat beberapa gen yang akan membentuk respon imun melalui *signaling pathway Nuclear* (NF- κ B) dan *Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK/STAT) (Yu et al., 2022). Mekanisme imun utama yang ditemukan

pada *D. melanogaster* melibatkan aktivasi sinyal pada jalur Toll melalui *signaling pathway* NF- κ B yang akan mengaktifkan sintesis *Antimicrobial peptides* (AMP), salah satunya adalah *Attacin A* (*Atta A*) sebagai bentuk pertahanan terhadap bakteri Gram positif. Adapun aktivasi *signaling pathway* JAK-STAT akan mengaktifkan *Turandot A* (*totA*) yang diekspresikan di *hemolymph* dan bersifat responsif terhadap sinyal stres akibat infeksi (Pratomo et al., 2022; Yu et al., 2022). Kedua *signaling pathway* pada *D. melanogaster* ini akan memberikan perlindungan terhadap bakteri yang dapat menyerang tubuh.

Oleh karena itu, melalui penelitian ini akan dikaji secara lebih lanjut mengenai efek imunomodulator ekstrak lengkuas pada *signaling pathway* NF- κ B dan JAK-STAT *D. melanogaster* yang terinfeksi *S. aureus* secara molekuler melalui ekspresi gen *Atta A* dan *totA*.

1.2 Teori

1.2.1 Imunomodulator

Imunomodulator merupakan zat alami atau sintesis yang mampu memodulasi atau memodifikasi sistem imun di dalam tubuh. Zat ini umumnya digunakan untuk mengobati suatu penyakit yang mampu menyebabkan perubahan pada sistem imun tubuh. Pemberian imunomodulator dapat mempengaruhi sistem imun dengan cara meningkatkan (imunostimulan) atau menurunkan (imunosupresan) respon imun (Sharma et al., 2024).

1.2.2 Lengkuas

Lengkuas umumnya telah banyak digunakan sebagai bumbu penyedap makanan dan juga sebagai obat tradisional oleh masyarakat (Hamad et al., 2023). Lengkuas diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap MRSA dan juga mampu bekerja sebagai imunomodulator. Beberapa aktivitas ini dapat disebabkan karena adanya kandungan senyawa non-polar dan minyak atsiri yang terkandung pada lengkuas (Chaweepack et al., 2015; Samsudin et al., 2018).

1.2.3 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster atau lalat buah merupakan organisme multiseluler non-mamalia yang telah digunakan sebagai platform pemodelan dalam memahami mekanisme dasar genetika (Nainu et al., 2022). Hal ini disebabkan karena tingkat



manusia sebesar 75%, siklus hidup yang relatif cepat, ukuran litangani, dan murah untuk dipelihara dibandingkan dengan terdapat banyak lalat mutan dan transgenik yang mampu an (Nainu, 2018; Yamaguchi, 2018).

1.2.4 *Signaling pathway Nuclear Factor-kappa B (NF-κB)*

Pada mamalia dan *D. melanogaster*, terdapat jalur sistem imun berupa *Nuclear Factor-kappa B* (NF-κB) yang terdiri dari jalur Toll dan Imd. Secara spesifik, sistem imun jalur Toll memberikan respon terhadap bakteri Gram positif dan fungi. Sedangkan, sistem imun jalur Imd memberikan respon terhadap bakteri Gram negatif. Jalur Toll akan teraktivasi akibat ligan *Spaetzle* berikatan dengan reseptor pada saat terjadi infeksi dan mengaktifkan NF-κB. Sehingga, akan diekspresikan peptida antimikroba sebagai respon sistem imun tubuh, salah satunya adalah gen *Attacin A (Atta A)* (Buchon et al., 2014; Yu et al., 2022).

1.2.5 *Signaling pathway Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT)*

JAK-STAT merupakan jalur sinyal yang memiliki peran terkait sitokin dan faktor pertumbuhan. Jalur ini mampu mengontrol respon inflamasi dan penyembuhan luka maupun aktivasi neutrofil dan makrofag. Aktivasi jalur ini dapat disebabkan akibat adanya induksi oleh sitokin (Myllymäki & Rämetsä, 2014). Salah satu gen yang diekspresikan melalui jalur ini adalah *Turandot A (totA)* yang berperan penting dalam pertahanan tubuh terhadap stres akibat infeksi bakteri, suhu tinggi, paparan bahan kimia, ataupun sinar ultraviolet (Ekengren & Hultmark, 2001).

1.3 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana efek imunomodulator ekstrak lengkuas terhadap *signaling pathway* NF-κB dan JAK-STAT pada *D. melanogaster* yang terinfeksi *S.aureus*.

1.4 Tujuan dan Manfaat

1.4.1 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek imunomodulator ekstrak lengkuas terhadap *signaling pathway* NF-κB dan JAK-STAT pada *D. melanogaster* yang terinfeksi *S. aureus*.

1.4.2 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi metode alternatif dalam pengujian efek berbagai kandidat senyawa baru dalam terapi penyakit infeksi.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia, Laboratorium Farmakologi-Toksikologi, Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin pada bulan Juni-November 2024.

2.2 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 (Memmert®), *micropestle* (Geneaid®), mikropipet (Dragonlab®), oven (Memmert®), penutup vial *Drosophila* (Biologix®), *Thermal cycler qPCR* (RotorGene Q, Qiagen®), timbangan analitik (Sartorius®), dan vial *Drosophila* (Biologix®).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah agar, *aquadest*, asam propionat, *D. melanogaster w¹¹¹⁸*, etanol 70% (Onemed®), gas CO₂ (Samator), GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega™), kertas saring Whatman, lengkuas (*Alpinia galanga*), metil paraben, mikrotube (Gene follower®), *Phosphate Buffered Saline* (PBS), RNAqueous™ *Total RNA Isolation Kit* (Invitrogen™), satu set primer *Atta A*, satu set primer *totA*, sukrosa, tepung jagung, dan *yeast*.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Preparasi sampel

Rimpang lengkuas terlebih dahulu dideterminasi untuk mengidentifikasi spesies dari tanaman. Selanjutnya, rimpang dikeringkan lalu dihaluskan hingga menjadi simplisia. Kemudian, sampel diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut n-heksana. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan hasil yang diperoleh disimpan dalam wadah berisi silika (Samsudin et al., 2018).

2.3.2 Penyiapan hewan uji (*D. melanogaster*)

Pada penelitian ini digunakan hewan coba berupa lalat buah (*D. melanogaster w¹¹¹⁸* yang merupakan kelaksi dari *Laboratory Host Defense and Responses, Kanazawa* *D. melanogaster* dipelihara dalam vial berisi pakan standar pada kelembaban relatif 60% (Nainu et al., 2020).



pakan *D. melanogaster*

an standar. Untuk membuat 100 mL pakan, dilakukan bahan-bahan kemudian dilakukan pencampuran berupa tepung

jagung kasar 7,5 g; yeast 2,5 g; agar 0,9 g; sukrosa 4,5 g; dan dicukupkan menggunakan *aquadest* hingga 100 mL. Setelah bahan-bahan tercampur merata, campuran diaduk dan dipanaskan pada hingga mengental. Setelah proses selesai, ditambahkan 400 μ L asam propionat dan 450 μ L metil paraben 15% menggunakan mikropipet lalu campuran dimasukkan ke dalam vial.

Pembuatan pakan perlakuan ekstrak lengkuas. Dalam membuat 100 mL pakan, dilakukan penimbangan bahan-bahan kemudian dilakukan pencampuran berupa tepung jagung halus 7,5 g; agar 0,45 g; sukrosa 4,5 g, dan dicukupkan menggunakan *aquadest* hingga 100 mL. Setelah bahan-bahan tercampur merata, campuran diaduk dan dipanaskan hingga mengental lalu ditambahkan 400 μ L asam propionat menggunakan mikropipet. Kemudian, ditambahkan ekstrak lengkuas konsentrasi 2,5% ke dalam masing-masing pakan standar dengan volume total 5 mL hingga memperoleh konsentrasi ekstrak lengkuas sebesar 0,05%; 0,1%; dan 0,15%. Setiap konsentrasi dibuat dalam 3 replikasi pada vial pakan.

2.3.4 Pemodelan *D. melanogaster* yang Terinfeksi *S. aureus*

Pemodelan *D. melanogaster* yang terinfeksi *S. aureus* dilakukan untuk menginduksi bakteri secara oral terhadap larva *D. melanogaster*. Larva *instar II* ditempatkan dalam tabung *microcentrifuge* yang di dalamnya terdapat 200 μ L *crushed banana* dan 200 μ L suspensi bakteri *S. aureus* dengan konsentrasi McFarland 1 kemudian dидiamkan selama 3 jam. Larva selanjutnya dibilas menggunakan PBS dan dipindahkan ke dalam vial yang telah berisi pakan perlakuan selama 3 hari lalu dilanjutkan ke tahap pengujian berikutnya (Ramond et al., 2021).

2.3.5 Penyiapan Sampel RNA

Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit (Invitrogen™). Sebanyak 10 larva *D. melanogaster* yang dimasukkan ke dalam *treff tube*. Kemudian, disiapkan reagen *lysis buffer* segar yang telah dicampurkan dengan *2-mercaptoethanol* lalu diambil setiap 300 μ L *lysis buffer* untuk setiap sampel dan ditambahkan *2-mercaptoethanol* sebanyak 1% dari total volume *lysis buffer*. Selanjutnya, 300 μ L campuran tersebut ditambahkan ke dalam masing-masing *tube* sampel dan *D. melanogaster* dihancurkan menggunakan *micropestle*. Kemudian, disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 14.000 rpm. Lisat ditransfer ke dalam *tube* baru kemudian ditambahkan 300 μ L etanol 70% dan divortex selama 10 detik. Setelah itu, sampel ditransfer ke *spin cartridge* dan disentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 14.000 rpm, proses tersebut diulang sebanyak 2 kali. Filtrat dibuang dari *spin cartridge* pada *tube* yang sama. Ditambahkan sebanyak 100 μ L *Wash Buffer I* ke dalam *spin cartridge* kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik. Filtrat dibuang dan *spin cartridge* ditransfer ke *collection tube* baru. Selanjutnya, ditambahkan *Wash Buffer II* ke dalam *spin cartridge*, kemudian disentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 14.000 rpm. Filtrat dibuang lalu *spin cartridge* ditempatkan kembali pada



collection tube yang sama, proses sebelumnya diulangi sebanyak 2 kali. Selanjutnya, *spin cartridge* kembali disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, kemudian ditambahkan 40 μ L *RNAse free water* pada bagian tengah *spin cartridge* dan diulangi kembali dengan menambahkan *RNAse free water* dalam jumlah yang sama. Campuran diinkubasi pada temperatur ruang selama 1 menit lalu ditambahkan kembali 40 μ L *RNAse free water* ke dalam *spin cartridge* dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 14.000 rpm. *Spin cartridge* dibuang dan *collection tube* yang mengandung RNA disimpan pada suhu -80°C (Hardiyanti et al., 2024).

2.3.6 Analisis Ekspresi Gen *Atta A* dan *totA*

Analisis level ekspresi gen *Atta A* dan *totA* dilakukan menggunakan *real time Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) dengan GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega™). Proses RT-qPCR dilakukan dengan menggunakan satu set primer *Atta A* dan satu set primer *totA* di dalam *tube* PCR dengan volume 10 μ L lalu dianalisis pada alat RotorGene Q (Qiagen).

Sampel dijalankan pada suhu 37°C selama 15 menit dan dilakukan sebanyak 40 siklus, dengan urutan 1 siklus sebagai berikut: Pada suhu 95°C selama 15 detik, 60°C selama 30 detik, dan dilakukan berulang hingga 40 siklus, kemudian dilanjutkan dengan *melt curve analysis* pada suhu 40°C selama 1 menit. Sebagai referensi untuk tingkat ekspresi gen inang, digunakan primer untuk protein ribosomal *rp49* yang dijalankan mengikuti prosedur RT-qPCR di atas (Hardiyanti et al., 2024; Nainu et al., 2024).

Tabel 1. Sekuens primer masing-masing gen

Nama Gen	Sekuens Primer		Kondisi
	Forward	Reverse	
<i>Atta A</i>	5' – GAT GGA CGT GCT AAT CTC TG – 3'	5' – GGC TTA GCC GAA ATG ATG AG – 3'	1. PCR cycle: 40 Siklus 2. Reverse transcription: 37°C , 15 menit
<i>totA</i>	5' – CCA AAA TGA ATT CTT CAA CTG CT – 3'	5' – GAA TAG CCC ATG CAT AGA GGA C – 3'	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'	5' – AAA CGC GGT TCT GCA TGA G – 3'	5. Annealing: 63°C , 30 detik 6. Extension: 72°C , 10 detik



a

di peroleh dari hasil analisis ekspresi gen digunakan metode *one-t* keti oleh analisis Dunnett's. Semua hasil analisis statistik diolah phPad Prism® 9 dan data yang disajikan adalah sebagai rata-rata di berbeda signifikan apabila $p < 0,05$ secara statistik.