

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Infeksi merupakan salah satu permasalahan kesehatan utama di dunia, termasuk di Indonesia. Penyakit infeksi bahkan menjadi salah satu penyebab kematian tertinggi secara global (Rahman et al., 2023). Terdapat 3,7 juta jiwa yang menyebabkan kematian akibat infeksi (Amelia et al., 2021). Salah satu penyebab terbanyak infeksi, yaitu bakteri *Staphylococcus aureus*. Bakteri Gram positif ini merupakan patogen penting pada manusia yang dapat menimbulkan berbagai jenis penyakit, seperti infeksi kulit dan jaringan lunak (Sahlil, 2023).

Berdasarkan Permenkes RI No. 28 Tahun 2021, penanganan infeksi bakteri *S. aureus* dilakukan melalui pemberian antibiotik (Kemenkes RI, 2021). Namun seiring berjalannya waktu, kasus resistensi antibiotik semakin banyak ditemukan di Indonesia, yang ditandai dengan adanya isolat bakteri yang tidak sensitif terhadap beberapa jenis antibiotik (Mandagi et al., 2022). Menurut *World Health Organization* (WHO), resistensi antibiotik diperkirakan akan menyebabkan hingga 10 juta kematian pada tahun 2050 (Putri et al., 2023). Untuk mengatasi masalah tersebut maka diperlukan upaya pengembangan antibiotik baru, salah satunya melalui pemanfaatan senyawa asam deoksikolat yang berpotensi sebagai agen antibakteri.

Asam deoksikolat (AD) merupakan salah satu jenis garam empedu yang tidak terkonjugasi dan telah dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Berdasarkan hasil penelitian secara *in vitro*, AD mampu membunuh *S. aureus* melalui mekanisme peningkatan permeabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan terjadinya kebocoran isi sel (Sannasiddappa et al., 2017). Oleh karena itu, AD berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat senyawa antibakteri baru, khususnya dalam mengatasi permasalahan resistensi antibiotik. Namun, hingga saat ini belum banyak dilaporkan terkait pengaruh efek asam deoksikolat secara molekular terhadap infeksi *S. aureus*. Dengan demikian, diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan hewan model yang tepat untuk mengetahui efek antibakteri senyawa ini.

Salah satu hewan model yang dapat digunakan dalam pengujian *in vivo* adalah *Drosophila melanogaster* karena memiliki kemiripan genetik sekitar 75% dengan manusia. Selain itu, *D. melanogaster* relatif mudah dipelihara dengan biaya yang lebih rendah dibandingkan dengan hewan coba lain, seperti mencit dan tikus. Masa hidup *D. melanogaster* juga relatif singkat yakni sekitar 2-3 bulan sehingga mempermudah dalam memperoleh hasil penelitian dalam waktu yang lebih cepat (Nainu, 2018).

Pada model infeksi *D. melanogaster*, terdapat beberapa gen yang diekspresikan, diantaranya *drs* dan *def*. Mekanisme pertahanan imun pada *D. melanogaster* melalui pensinyalan pada jalur Toll. Jalur ini melibatkan *Pershepone*

(PSH) dan *protease serine modular* (modSP) yang berperan dalam sistem imun bawaan terhadap bakteri Gram-positif melalui ekspresi gen Drosomycin (*drs*) dan gen Defensin (*def*) (Younes, 2020; Contreras et al., 2019). Gen *drs* adalah *Antimicrobial Peptides* (AMP) yang paling banyak diekspresikan dalam respon imun *D. melanogaster* sehingga berfungsi memberikan perlindungan sistemik terhadap patogen yang menyerang rongga tubuh (Araki et al., 2019). Selain itu, gen *defensin* (*def*) juga termasuk salah satu kelompok AMP yang memiliki spektrum luas terhadap aktivitas antimikroba pada berbagai patogen termasuk bakteri gram-positif (Contreras et al, 2019).

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan pengujian aktivitas asam deoksikolat terhadap *D. melanogaster* dan pengaruhnya terhadap gen *drs* dan *def* terhadap *D. melanogaster* yang terinfeksi *S. aureus* setelah pemberian asam deoksikolat.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian asam deoksikolat pada ekspresi gen sistem imun *Drosophila melanogaster* yang terinfeksi *Staphylococcus aureus*?

I.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh pemberian asam deoksikolat pada ekspresi gen sistem imun *Drosophila melanogaster* yang terinfeksi *Staphylococcus*

BAB II

METODE PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

II.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 CO², (CO² stage), *plugs* *Drosophila* (Biologix®), *Thermal cycler* qPCR (RotorGene Q, Qiagen®), timbangan analitik, vial.

II.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini agar, *aluminium foil*, *aquadest*, asam propionat, *brewer's yeast*, *corn meal*, *D. melanogaster* (Oregon R), etanol 70% (Onemed®), gas CO², glukosa, kapas, kit PCR, *microtube* (Gene follower®), natrium agar, *treff tube* (Treff lab®), PureLink TM RNA Mini Kit (Invitrogen TM, Thermo Fisher Scientific), satu set *primer drs*, satu set *primer def*, satu set *primer rp49*, sukrosa, suspensi biakan *S. aureus* ATCC 6538P, dan tepung jagung.

II.2 Metode Penelitian

II.2.1 Preparasi Asam Deoksikolat

Asam deoksikolat diperoleh dari Sigma dilarutkan dengan menggunakan etanol 70%. Selanjutnya, dibuat dalam seri konsentrasi 1000 µM, 200 µM, dan 40 µM sebagai larutan stok yang kemudian larutan yang terbentuk akan diencerkan dalam beberapa konsentrasi, yaitu 50 µM, 10 µM, dan 2 µM (As'ad et al., 2023).

II.2.2 Penyiapan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan lalat buah (*D. melanogaster*) genotip Oregon R yang diperoleh dari Laboratory Host Defense and Respons, Kanazawa University. Lalat dikembangkan dan ditempatkan di dalam vial kultur berisi pakan yang disimpan pada suhu sekitar 25°C. Pada penelitian ini digunakan larva *D. melanogaster* (As'ad et al., 2023).

II.2.3 Pembuatan Pakan *D. melanogaster*

Bahan yang digunakan dalam pembuatan pakan standar meliputi agar, air, asam propionat, gula pasir, metil paraben, tepung jagung, dan yeast. Setiap 200 mL pakan dibuat dengan mencampurkan 5 gram ragi, 15 gram tepung jagung, 1,8 gram agar, dan 9 gram gula pasir. Campuran tersebut diaduk dan dipanaskan hingga mengental. Setelah itu, ditambahkan asam propionat 800 µl dan metil paraben 900 µl. Pakan yang telah selesai dibuat kemudian dituangkan ke masing-masing vial dan dibiarkan memadat selama 24 jam. Dalam pembuatan pakan untuk perlakuan variasi konsentrasi asam deoksikolat, terlebih dahulu asam deoksikolat dilarutkan dengan etanol 70%, kemudian dilakukan pengenceran untuk memperoleh konsentrasi 50 µM, 10 µM, dan 2 µM. Setiap konsentrasi tersebut ditambahkan ke dalam pakan standar dan dibuat dalam 5 replikasi.

II.2.4 Uji Model Infeksi *Staphylococcus aureus* pada *Drosophila melanogaster*

Larva instar II ditempatkan dalam *treff tube* berisi 1000 μL *crushed banana* dan 500 μL suspensi bakteri *S. aureus* dengan konsentrasi 5×10^8 cfu/mL, kemudian didiamkan selama 3 jam. Setelah itu, larva dibilas menggunakan larutan NaCl 0,9% dan dipindahkan ke vial yang telah berisi pakan perlakuan asam deoksikolat untuk melanjutkan ke tahap pengujian berikutnya.

II.2.5 Penyiapan Sampel RNA

Isolasi RNA dilakukan menggunakan PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Sebanyak 5 lalat dewasa *D. melanogaster* dimasukkan ke dalam *treff tube*. Disiapkan reagen *lysis buffer* yang dicampur dengan β -mercaptoethanol, setiap 300 μL *lysis buffer* ditambahkan 1% β -mercaptoethanol dari total seluruh volume *lysis buffer*. Campuran ditambahkan pada setiap sampel pada setiap *tube*. Larva dihancurkan menggunakan *micropestle* hingga homogen, lalu disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit di suhu 4°C. Supernatan (lisat) yang diperoleh dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 300 μL , kemudian divortex selama 10 detik. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam *spin cartridge* dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 20 detik. Kemudian *spin cartridge* dicuci dengan 700 μL *wash buffer* I dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 20 detik pada suhu 4°C, lalu filtrat dibuang dan dipindahkan pada *collection tube* baru. Proses pencucian dilanjutkan dengan penambahan 500 μL *wash buffer* II, disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 20 detik pada suhu 4°C dan diulang sebanyak dua kali. Setelah itu, *spin cartridge* disentrifugasi kering kembali selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu 4°C. Selanjutnya pada bagian tengah *spin cartridge* ditambahkan 40 μL RNase-free water. Kemudian diinkubasi selama 1 menit, lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Tahap ini diulang sehingga total volume elusi 80 μL . Hasil pada *collection tube* yang mengandung RNA disimpan pada suhu -80 °C.

II.2.6 Analisis Ekspresi Gen

Tahap awal analisis diawali dengan isolasi RNA dari 5 lalat dewasa *D. melanogaster* menggunakan PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™). Pada tahap ini, jaringan dilisis dalam larutan lisis yang telah ditambahkan β -mercaptoethanol. RNA kemudian dimurnikan melalui serangkaian tahap pencucian dan dielusi menggunakan RNase free water. Kualitas dan kuantitas RNA yang dihasilkan diperiksa secara spektrofotometri sebelum diproses lebih lanjut. Sebagai gen referensi, digunakan *rp49* yang telah divalidasi menunjukkan ekspresi stabil pada semua kelompok perlakuan dalam penelitian pendahuluan. RNA hasil isolasi tersebut berperan sebagai sumber RNA dalam analisis ekspresi gen *drs* dan *def* yang dilakukan dengan metode Real-Time PCR (qPCR). Reaksi qPCR ini menggunakan kit SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step RT-qPCR with ROX (Invitrogen™). Real-time PCR dijalankan menggunakan satu set primer gen *drs* dan *def* di dalam tube PCR dengan volume 10 μL .

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk RT-Qpcr

Nama Gen	Sekuens Primer		Kondisi
	Forward	Reverse	
<i>drs</i>	5'- TTG TTC GCC CTC TTC GCT GCT CT – 3'	5'- GCA TCC TTC GCA CCA GCA CTT AC – 3'	1. PCR cycle: 35 Siklus 2. Hold 1: 50°C, 10 menit 3. Hold 2: 95°C, 2 menit 4. Cycling: 95°C 10 detik, 60°C 30 detik, 72°C 30 detik, 5. Melt: 60-95°C, 30 detik
<i>def</i>	5'- GTT CTT CGT TCT CGT GG – 3'	5'- CTT TGA ACC CCT TGG C – 3'	
<i>rp49</i>	5'- CGC TTC AAG GGA CAG TAT CTG – 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 ANOVA satu arah *one way* ANOVA, lalu dilanjutkan dengan analisis Dunnett's. Semua hasil analisis statistic diolah dengan *software GraphPad Prism®*. Hasil analisis selanjutnya dibahas dan disimpulkan sesuai dengan tujuan penelitian.