

LAPORAN
PENELITIAN UNGGULAN FAKULTAS (PUF)

**Perbandingan ekspresi microRNA (miRNA) 155 pada saliva Penderita infeksi
kecacingan dan individu sehat**

TIM PENELITI

dr. Yuliana, M.Biomed.	(0328078103)	Ketua
Dr. dr. Rina Kurniasri Kusumaratna, M.Kes.	(0319046301)	Anggota
dr. Machrumnizar, M.Biomed.	(0314118004)	Anggota
dr. Suriyani, M.Biomed.	(0323097904)	Anggota
Neysa Nurwafa Zahrah	030.19.101	Anggota



KEDOKTERAN
Fakultas Kedokteran
UNIVERSITAS TRISAKTI
2023/2024



UNIVERSITAS TRISAKTI

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Jl. Kyai Tapa No. 1 Grogol, Jakarta Barat 11440, Indonesia

Telp. 021-5663232 (hunting), ext. 8141, 8161, Fax. 021-5684021

<http://lppm.trisakti.ac.id/>

lppm@trisakti.ac.id

LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN PENELITIAN TAHUN AKADEMIK 2023/2024 0837/PUF/FK/2023-2024

1. **Judul Penelitian** : Perbandingan ekspresi microRNA (miRNA) 155 pada saliva Penderita infeksi kecacingan dan individu sehat
2. **Skema Penelitian** : Penelitian Unggulan Fakultas (PUF)
3. **Ketua Tim Pengusul**
 - a. Nama : dr. Yuliana, M.Biomed.
 - b. NIDN : 0328078103
 - c. Jabatan/Golongan : Asisten Ahli/III-B
 - d. Program Studi : KEDOKTERAN
 - e. Perguruan Tinggi : Universitas Trisakti
 - f. Bidang Keahlian : Parasitologi
Jl Tuparev no 168 Karawang
Kelurahan Nagasari
 - g. Alamat Kantor/Telp/Fak/surel : Kecamatan Karawang Barat
-
dr.yuliana@trisakti.ac.id
4. **Anggota Tim Pengusul**
 - a. Jumlah anggota : Dosen 3 orang
 - b. Nama Anggota 1/bidang keahlian : Dr. dr. Rina Kurniasri Kusumaratna, M.Kes./PUBLIC HEALTH, COMMUNITY NUTRITION, MANAGEMENT KEBIJAKAN
 - c. Nama Anggota 2/bidang keahlian : dr. Machrumnizar, M.Biomed./Parasitologi
 - d. Nama Anggota 3/bidang keahlian : dr. Suriyani, M.Biomed./Parasitologi
 - e. Jumlah mahasiswa yang terlibat : 1 orang
 - f. Jumlah alumni yang terlibat : 0 orang
 - g. Jumlah laboran/admin : 1 orang
5. **Waktu Penelitian**
 - Bulan/Tahun Mulai : September 2023
 - Bulan/Tahun Selesai : Juni 2024
6. **Luaran yang dihasilkan**
 - Hak Kekayaan Intelektual
 - Artikel Ilmiah
 - Bahan Ajar
7. **Biaya Total** : Rp140.000.000,-
(Seratus Empat Puluh Juta)

Dekan



Dr. dr. Yenny, Sp.F.K.
NIDN: 0317127401

Jakarta, 14 Desember 2024

Ketua Tim Pengusul



dr. Yuliana, M.Biomed.
NIDN: 0328078103

Direktur



Prof. Dr. Ir. Astri Rinanti, M.T., IPM., ASEAN Eng.
NIDN: 0308097001

IDENTITAS PENELITIAN

Skema Penelitian	: Penelitian Unggulan Fakultas (PUF)
Judul Penelitian	: Perbandingan ekspresi microRNA (miRNA) 155 pada saliva Penderita infeksi kecacingan dan individu sehat
Fokus Penelitian	: Green Healthy Life
Rumpun Penelitian	: Perilaku Kesehatan
Mata Kuliah yang terkait	: IPT
Topik Pengabdian kepada Masyarakat yang terkait	: Bahaya Infeksi Kecacingan

Tim Peneliti

Peneliti	NIK/ NIM	Posisi	Status	Program Studi	Fakultas
dr. Yuliana, M.Biomed.	3483	Ketua	Dosen Universitas Trisakti	KEDOKT ERAN	FK
Dr. dr. Rina Kurniasri Kusumaratna, M.Kes.	2264	Anggota	Dosen Universitas Trisakti	PROFESI DOKTER	FK
dr. Machrumnizar, M.Biomed.	3378	Anggota	Dosen Universitas Trisakti	KEDOKT ERAN	FK
dr. Suriyani, M.Biomed.	3106	Anggota	Dosen Universitas Trisakti	KEDOKT ERAN	FK
Neysa Nurwafa Zahrah	030.19.10 1	Anggota	Mahasiswa Universitas Trisakti	KEDOKT ERAN	FK
Arief Rahman Hakim	2046	Anggota	Laboran/Ad min Universitas Trisakti	KEDOKT ERAN	FK
Robert	0	Anggota	Non Dosen Luar Universitas Trisakti - Dalam Negeri		

Lokasi dan atau Tempat Penelitian	:
Masa Penelitian	
Mulai	: September 2023
Berakhir	: Juni 2024
Dana diusulkan	: Rp140.000.000,-
Sumber Pendanaan	: 5.2.03.08.01
Target Kesiapterapan Teknologi	: TKT 1
Produk Inovasi	:
Luaran	: Hak Kekayaan Intelektual Artikel Ilmiah

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Lembar Pengesahan	ii
Identitas Penelitian	iii
DAFTAR ISI.....	1
DAFTAR TABEL.....	2
DAFTAR GAMBAR	3
RINGKASAN PENELITIAN.....	4
BAB 1. PENDAHULUAN	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	9
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN 1. ROAD MAP PENELITIAN	28
LAMPIRAN 2. LUARAN PENELITIAN.....	34

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1. Sekuens primer miRNA-155.....	13
Tabel 2. Distribusi karakteristik reponden.....	17
Tabel 3. Distribusi kuesioner pengetahuan, sanitasi, dan higienitas.....	18
Tabel 4. Distribusi sampel berdasarkan jenis <i>soil transmitted helminths</i> (STHs) yang menginfeksi.....	20
Tabel 5. Konsentrasi miRNA-155 pada sampel.....	21
Tabel 6. Efisiensi miRNA-155 pada sampel.....	21

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Urutan benih (<i>seed</i>) dari prekursor miRNA-155 pada berbagai spesies.....	15
Gambar 2. Prediksi gen target miRNA-155.....	15
Gambar 3. Prediksi jaringan interaksi gen target menunjukan 10 gen kunci teratas dengan skor relatif tinggi dipilih dari jaringan interaksi protein-protein.....	16
Gambar 4. Visualisasi gel elektroforosis pemeriksaan kualitas/ <i>integrity</i> dari miRNA sampel saliva.....	21
Gambar 5. Level ekspresi miRNA-155 pada sampel saliva kelompok kontrol dan penderita Kecacingan.....	22

RINGKASAN PENELITIAN

Infeksi kecacingan yang disebabkan oleh parasit cacing dapat mengganggu pertumbuhan mental dan fisik anak. Skrining yang tepat diperlukan untuk memberikan pengobatan yang sesuai. MicroRNA (miRNA), adalah RNA non-coding pendek (18-30 nukleotida) dan memainkan peran penting dalam gen pada tingkat pasca-transkripsi. Banyak studi yang menyatakan bahwa terjadi perubahan dalam ekspresi miRNA manusia pada infeksi kecacingan dan hal ini berpengaruh pada patogenesis penyakitnya. Perubahan ekspresi miRNAs pada manusia bisa berupa peningkatan ataupun penurunan ekspresi miRNAs. Perubahan ekspresi ini bisa diukur dan dapat dijadikan sebagai biomarker dalam infeksi kecacingan.

Permasalahan penelitian ini adalah bagaimana ekspresi miRNA-155 pada saliva subjek kecacingan jika dibandingkan dengan individu sehat.

Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi kemungkinan miRNA-155 sebagai biomarker non-invasif untuk mendiagnosis kecacingan. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemahaman yang lebih baik mengenai ekspresi miRNA-155 dalam cairan tubuh berupa saliva, baik pada individu sehat maupun individu yang menderita kecacingan.

Metode penelitian yang digunakan adalah dengan melakukan ekstraksi miRNA dan analisis ekspresi miRNA dari saliva yang dilakukan di laboratorium biologi molekuler FK Universitas Trisakti. Analisis uji *T-test* atau *Mann-Whitney* digunakan untuk melihat perbedaan masing-masing variabel berdasarkan ekspresi dari miRNA-155 dari sampel saliva.

Topik penelitian ini terkait dengan *roadmap* penelitian ketua peneliti yaitu menuju kedokteran presisi yang melibatkan variasi genetik untuk memprediksi suatu penyakit.

Berdasarkan jenis cacing yang ditemukan, terdapat dua *species* cacing yang menginfeksi anak-anak, yakni *Ascaris lumbricoides* sebanyak 74.2% dan *Trichuris trichiura* sebanyak 5.6%. Terdapat setidaknya 16.7% populasi mengalami *mix infection*. Sedangkan, berdasarkan hasil analisis bioinformatik pada miRNA-155 menunjukkan bahwa terdapat peran gen target miRNA-155 dalam berbagai proses biologis dan kemungkinan berpartisipasi dalam patogenesis helminthiasis dengan mengatur gen yang terkait kekebalan. Hal tersebut kemungkinan besar digunakan sebagai penanda biologis yang potensial untuk penelitian tentang *helminthiasis* di masa yang akan datang. Hasil analisis ekspresi menunjukkan konsentrasi miRNA saliva anak kecacingan ialah 12.1 – 32.4 ng/μl, dan konsentrasi miRNA-155 pada saliva kontrol ialah 1.5 – 10.1 ng/μl. Ekspresi miRNA yang telah dilakukan menunjukkan nilai Ct dengan rentang 20.1-39.09 (sampel), dan 16.59-29.28 (kontrol), dengan nilai efisiensi kurva lebih dari 0.8.

Berdasarkan analisis hasil, dapat disimpulkan bahwa miRNA-155 dalam saliva dapat terdeteksi dan diukur dengan baik pada anak penderita kecacingan. Terdapat variasi konsentrasi yang signifikan di antara kedua grup sampel. Rentang Ct value (nilai Ct) dan efisiensi kurva yang memenuhi kriteria menunjukkan bahwa metode deteksi kuantifikasi miRNA-155 ini dapat diandalkan untuk mengevaluasi ekspresi miRNA pada anak-anak penderita kecacingan, yang berpotensi digunakan sebagai biomarker untuk pemantauan terapi. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengeksplorasi potensi miRNA-155 sebagai Biomarker Prognostik Kecacingan.

Luaran yang dihasilkan adalah sertifikat Hak Cipta Poster dan manuskrip dengan status submit pada jurnal *Public Health of Indonesia Journal*.

Kata Kunci :

Infeksi kecacingan, diagnosis, miRNA, biomarker

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Infeksi kecacingan adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit cacing, yang ditransmisikan melalui telur cacing yang ada di tinja penderita dan mengkontaminasi tanah di lingkungan dengan sanitasi yang kurang (1). Diestimasi ada sekitar 1,5 milyar orang atau sekitar 24% dari populasi dunia yang terinfeksi penyakit ini (2,3). Di Indonesia ada 73.108.392 anak usia pra sekolah dan sekolah yang membutuhkan pengobatan preventif infeksi kecacingan pada tahun 2021 (4). Pengobatan preventif, berupa pemberian obat antelmintik skala besar untuk populasi yang berisiko, dapat menurunkan jumlah cacing yang menginfeksi. Intervensi ini dapat menurunkan morbiditas pasien yang terinfeksi kecacingan berat (1). Sehingga sangat penting untuk dapat mendeteksi infeksi kecacingan secara dini.

MicroRNAs (miRNAs), yang ditemukan pertama kali pada cacing nematoda *Caenorhabditis elegans* pada tahun 1993, adalah RNA non-coding pendek (18-30 nukleotida) dan memainkan peran penting dalam gen pada tingkat pasca-transkripsi dengan menurunkan target mRNA dan/atau menghambat terjemahan mereka. Sejak itu, ribuan miRNA telah ditemukan dari organisme sederhana seperti parasit protozoa uniseluler hingga yang kompleks dan lebih tinggi. Hampir sepertiga dari total gen manusia ternyata diatur oleh miRNA. Satu miRNAs dapat mengatur lebih dari 1 gen dan 1 gen dapat diatur oleh lebih dari 1 miRNAs (5).

Dalam organisme multiseluler, komunikasi sel ke sel sangat penting untuk perkembangan dan fungsi organisme secara keseluruhan. Studi intensif selama beberapa tahun terakhir menunjukkan transfer horizontal dari microRNA yang disekresikan (miRNA) antar sel menunjukkan peran baru yang berpotensi untuk molekul-molekul ini dalam komunikasi antar sel. Menggunakan metode microvesicle-dependent, atau RNA-binding terkait protein, sistem perlintasan aktif, miRNA yang disekresikan dari sel organisme lain dapat dikirimkan ke sel penerima dan miRNAs organisme asing tersebut mampu berfungsi persis sesuai dengan miRNA penerima (6).

MicroRNA yang disekresikan ini dibungkus dalam eksosom sehingga terlindung dari degradasi dan kerusakan, serta mampu bersirkulasi dalam tubuh organisme. MicroRNAs yang disekresikan dapat diambil dari sampel berupa sputum, saliva, urin, ASI, air mata, darah dan jenis cairan dalam tubuh lainnya (7). Banyak studi yang menyatakan bahwa terjadi perubahan dalam ekspresi miRNA manusia pada infeksi kecacingan dan hal ini berpengaruh pada patogenesis penyakitnya. Perubahan ekspresi miRNAs pada manusia bisa berupa peningkatan ekspresi miRNAs ataupun penurunan ekspresi. Perubahan ekspresi ini bisa diukur dan dapat dijadikan sebagai biomarker dalam infeksi kecacingan. Saat ini baku emas diagnosis infeksi kecacingan dilakukan melalui pemeriksaan mikroskopis tinja pasien. Tetapi terkadang sampel tinja sulit didapatkan dan keterampilan pemeriksa yang kurang sehingga perlu dipikirkan cara pemeriksaan lain yang bisa menjadi alternatif pemeriksaan untuk mendeteksi infeksi kecacingan.

1.2. Perumusan Masalah

Bagaimana ekspresi miRNA-155 pada saliva penderita kecacingan dibandingkan dengan ekspresi miRNA-155 pada individu sehat?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi penggunaan miRNA-155 sebagai biomarker non-invasif dalam mendiagnosis kecacingan.

1.3.2. Tujuan Khusus

- 1) Identifikasi miRNA-155 pada saliva pada penderita infeksi kecacingan

2) Perbandingan ekspresi miRNA-155 pada saliva penderita infeksi kecacingan dan individu sehat

1.4. Batasan Penelitian

Penelitian ini hanya mengambil sampel pada penderita infeksi kecacingan yang telah didiagnosis dengan metode pemeriksaan mikroskopis tinja dan individu sehat sebagai kontrol.

1.5. Kaitan Penelitian dengan Road Map Penelitian Pribadi dan Road Map Penelitian Fakultas

Penelitian ini meneliti profil microRNA pada penderita infeksi cacingan. Kajian biomolekular ini merupakan bagian dari peta jalan penelitian pribadi, yang bertujuan untuk mendukung pengembangan kedokteran presisi dalam pencegahan penyakit. Selain itu, penelitian ini sejalan dengan peta jalan (*roadmap*) penelitian fakultas, yang berfokus pada biomedis dan perilaku kesehatan, khususnya pada sub-topik pengembangan instrumen diagnostik melalui pemanfaatan penanda diagnostik molekular.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Infeksi kecacingan

Infeksi kecacingan adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit cacing, yang ditransmisikan melalui telur cacing yang ada di tinja penderita dan mengkontaminasi tanah di lingkungan dengan sanitasi yang kurang.(1) Diestimasi ada sekitar 1,5 milyar orang atau sekitar 24% dari populasi dunia yang terinfeksi penyakit ini.(2,3) Di Indonesia ada 73.108.392 anak usia pra sekolah dan sekolah yang membutuhkan pengobatan preventif infeksi kecacingan pada tahun 2021.(4)

Spesies yang paling banyak menginfeksi manusia adalah cacing gelang (*Ascaris lumbricoides*), cacing cambuk (*Trichuris trichiura*) dan cacing tambang (*Necator americanus* dan *Ancylostoma duodenale*).(3) Infeksi kecacingan termasuk ke dalam daftar 17 penyakit tropis terabaikan yang dikeluarkan oleh WHO, karena dampak morbiditasnya yang cukup signifikan.(8) Infeksi ini dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan mental dan fisik juga anemia terutama pada anak usia sekolah.(9)

Pengobatan preventif, berupa pemberian obat antelmintik skala besar untuk populasi yang berisiko, dapat menurunkan jumlah cacing yang menginfeksi. Intervensi ini dapat menurunkan morbiditas pasien yang terinfeksi kecacingan berat (1). Sehingga sangat penting untuk dapat mendeteksi infeksi kecacingan secara dini. Saat ini baku emas diagnosis infeksi kecacingan dilakukan melalui pemeriksaan mikroskopis tinja pasien. Tetapi pemeriksaan mikroskopis ini memiliki keterbatasan karena adanya variasi jumlah telur yang dikeluarkan oleh cacing dari hari ke hari dan bergantung pada keahlian pemeriksa untuk mengidentifikasi telur. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Tarafder dkk, pemeriksaan mikroskopis dengan teknik Kato-Katz menunjukkan akurasi yang baik dengan sampel yang berumur 1 hari. Tetapi menunjukkan sensitivitas yang kurang baik untuk pemeriksaan terhadap cacing tambang karena perkembangan telur cacing tambang yang cepat.(10) Selain itu sampel tinja juga seringkali sulit didapatkan. Sehingga dibutuhkan alternatif pemeriksaan untuk mendeteksi infeksi kecacingan.

MicroRNA

MicroRNA (miRNA) ditemukan lebih dari 20 tahun yang lalu, akan tetapi RNA tipe ini masih bertahan sebagai topik yang menarik untuk dipelajari karena kita hanya mengetahui sebagian kecil dari RNA ini. RNA dibagi menjadi 2 bagian besar, yaitu RNA pengkode dan RNA bukan pengkode (11). Messenger RNA merupakan satu-satunya family dari coding RNAs, sedangkan non-coding RNAs family, sehingga disebut RNA regulator, terdiri dari beberapa jenis, seperti tRNA, rRNA, miRNA, snRNA, snoRNA, siRNA, piRNA, 7SL dan lncRNA lainnya (12). MiRNA adalah keluarga RNA pengatur dengan panjang 18-30 nukleotida yang mengontrol ekspresi gen pasca-transkripsi dalam urutan tertentu dengan cara memasang basa, biasanya di daerah 3'-tidak diterjemahkan (3'-UTRs) dari utusan target RNA (mRNA) dan pengurangan ekspresi protein dari gen tersebut dapat dicapai. MiRNA ini memainkan peran penting dalam aspek luas dari proses seluler seperti proses pensinyalan sel, perkembangan sel dan apoptosis, metabolisme seluler dan banyak lagi. Setiap gangguan pada fungsi miRNA akan menyebabkan kelebihan atau penurunan ekspresi mRNA yang menyebabkan penyakit, seperti kanker dan penyakit lainnya (13).

MiRNA pertama ditemukan pada tahun 1993 pada nematoda hidup bebas, *Caenorhabditis elegans*, sedangkan yang kedua ditemukan 7 tahun setelah penemuan pertama, juga pada spesies yang sama (14). Temuan miRNA mengarah pada pemahaman bahwa RNA kecil ini hanya milik organisme yang lebih rendah. Segera setelah penemuan miRNA kedua, let-7, para ilmuwan mulai menyadari pentingnya miRNA sebagai molekul pengatur karena miRNA dilestarikan di seluruh spesies. Sampai saat ini, para ilmuwan menyadari bahwa miRNA terdiri dari sekelompok besar molekul pengatur yang tidak diketahui dan mulai mengungkap rahasia miRNA sedikit demi sedikit.

Dalam organisme multiseluler, komunikasi sel ke sel sangat penting untuk perkembangan dan fungsi organisme secara keseluruhan. Studi intensif selama tiga tahun terakhir menunjukkan transfer horizontal microRNA yang disekresikan (*secreted-miRNAs*) antar sel menunjukkan peran baru yang potensial untuk molekul-molekul ini dalam komunikasi antar sel. MicroRNA yang disekresikan mewakili mekanisme yang baru yang ditemukan di mana sel donor dapat memengaruhi ekspresi gen sel penerima (15).

MiRNAs yang disekresikan biasanya dikemas dalam eksosom sehingga terhindar dari degradasi untuk kemudian dikirim ke sel penerima dan bertindak sebagai molekul fungsional fisiologis untuk mengerahkan pembungkaman gen (*gene-silencing*) melalui mekanisme yang sama seperti miRNA endogen (miRNAs yang tidak disekresikan). MiRNA yang disekresikan mempunyai salinan asam nukleat yang berbeda dengan miRNA endogen dan ini merupakan bukti yang tidak terbantahkan bahwa miRNA yang disekresikan mempunyai fungsi komunikasi sel (16).

MiRNA-155 pada Infeksi kecacingan

Kebalikan dari infeksi yang disebabkan oleh bakteri, virus, protozoa, dan pathogen jamur, infeksi kronis cacing usus diasosiasikan dengan respons imun Th2 yang dikarakteristik oleh eosinofilia, peningkatan kadar IgE dan produksi dari sitokin tipe 2 seperti IL-4, IL-5, dan IL-13. Seiring dengan berjalannya waktu, infeksi kronis cacing menyebabkan terjadinya proses imunoregulator melalui pengaturan sel T (Treg), makrofag yang juga teraktivasi dan sitokin inhibitor IL-10 dan TGF β . Efek imun ini pada pejamu sangat kompleks.(17,18)

MiRNAs (miRNAs), dikodekan dalam genom dan dibelah oleh dua enzim ribonuclease-III, Dicer dan Drosha (19), mengatur terjemahan mRNA dengan menghambat dan menurunkan mRNA. miRNA secara kritis membentuk perkembangan dan fungsi sel imun dengan penghapusan Dicer yang ditargetkan dalam sel T yang menghasilkan sel T CD8 dan CD4 perifer yang berkurang. Diantara ~2.000 miRNA mamalia teridentifikasi (miRbase v20), beberapa miRNA terkait sel-T telah diidentifikasi mengatur perkembangan, diferensiasi (20), dan efektor fungsi. Misalnya, pengaturan miR-29 dan miR-21 Imunitas yang dimediasi Th1, sedangkan miR-326, pengaruh miR-10a, miR-155, dan miR-132/212. Diferensiasi sel Th17 dan fungsi efektor. Sel Treg, yang memberikan rem kritis pada respons efektor, juga diatur oleh miRNAs, dengan miR-182, miR-10a, miR-155, dan miR-146a diperlukan untuk pengembangan Treg yang mahir dan kapasitas supresif. Korelasi dari ekspresi miR-181a, miR-146a, dan miR-146b yang meningkat pada sel CD4⁺ limpa di distal selama eksperimental ovalbumin (OVA)- peradangan saluran napas yang diinduksi telah dilaporkan tetapi telah belum diuji. Sampai saat ini, hanya miR-155 yang terlibat Diferensiasi Th2 in vitro, meninggalkan celah yang signifikan pada kami mengenai pemahaman tentang miRNA yang terlibat dalam diferensiasi sel Th2 dan fungsi efektor in vivo.(19-21)

Peran spesifik beberapa miRNA dalam infeksi masih belum ditemukan, sehingga sangat penting untuk melakukan banyak penelitian terhadap miRNA tersebut. Yang saat ini sudah ditemukan adalah miRNA dapat dijadikan sebagai sasaran baru untuk pemantauan respon obat atau biomarker untuk infeksi parasit.(22)

Penelitian ini merupakan *preliminary study*, yang diharapkan bisa memberikan hasil yang di kemudian hari dapat digunakan untuk penelitian yang akan dilaksanakan berikutnya.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik 2, Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti dan dilaksanakan pada bulan Januari 2024 – Juni 2024. Sampel saliva diambil dari anak kecacingan umur 6-12 tahun menurut data dari Puskesmas Telaga Dewa, Puskesmas Jembatan Kecil, Puskesmas Pasar Ikan, dan Puskesmas Kuala Lempuing, Bengkulu.

3.2. Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif-analitik dan menggunakan desain *cross-sectional*. Sampel penelitian berupa saliva dan tinja pasien infeksi kecacingan dan individu normal sebagai kontrol yang diambil secara simple random sampling sebanyak 64 orang.

Kriteria inklusi :

1. Anak usia sekolah 6-12 tahun
2. Pasien dengan infeksi kecacingan STHs (dibuktikan dengan pemeriksaan tinja)

Kriteria eksklusi

1. Pasien dengan infeksi kecacingan di luar STH
2. Pasien dengan infeksi kecacingan yang berulang

Analisis *in-silico*

MiRBase digunakan untuk mencari urutan prekursor miRNA-155 pada manusia dan spesies lainnya. Hasil urutan *precursor* kemudian dimasukkan kedalam aplikasi berbasis data, yaitu TargetScan dan miRDB untuk memprediksi gen target dari miR-155. Analisis pengayaan dari gen yang diprediksi dilakukan menggunakan FunRich versi 3.1.3 dan 20 gen teratas yang signifikan diperkaya dalam setiap analisis.

Pengambilan sampel tinja dari Pasien untuk konfirmasi kriteria inklusi

- Tinja diambil sekitar 1 sendok teh lalu dilarutkan dengan 10 ml air biasa.
- Setelah itu ditetaskan di kaca objek dan ditutup dengan kaca penutup.
- Spesimen kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 10x dan 40x.

Pengambilan sampel saliva dari Pasien infeksi kecacingan

- Penderita infeksi kecacingan yang telah terkonfirmasi diminta untuk menyerahkan sampel saliva.
- Saliva sebanyak 2-5 mL diludahkan dan ditampung ke tube kosong.
- Kemudian segera ditambahkan RNA/DNA *Shield* sebanyak 1: 3 (1 bagian sampel + 3 bagian RNA/DNA *Shield*) dan dibawa ke Lab Molekuler Fakultas Kedokteran, Universitas Trisakti dalam kotak pendingin.
- Kemudian sampel disimpan di -80°C.

Ekstraksi miRNA dari sampel saliva

MicroRNA diekstraksi dari sampel saliva menggunakan kit yang tersedia sesuai dengan intruksi dari kit (miRNeasy Micro Kit (50), Qiagen Cat#217084). Terdapat 2 tahapan dalam proses ekstraksi miRNA, yaitu pembuatan sputasol yang dicampurkan ke dalam saliva dan proses ekstraksi miRNA.

1. Pembuatan Sputasol

Formula	per vial
Dithiothreitol	0.1g
Sodium chloride	0.78g
Potassium chloride	0.02g
Disodium hydrogen phosphate	0.112g
Potassium dihydrogen phosphate	0.02g
Water	7.5ml
pH 7.4 ± 0.2 @ 25°C	

2. Proses Ekstraksi miRNA

- Tambahkan 200 μl sputasol ke dalam 200 μl saliva dan divortex selama 10-15 detik
- Ambil 200 μl homogenate (saliva yang telah ditambahkan sputasol) dan tambahkan 1000 μl QIAzol Lysis Reagent dan divortex selama 10-15 detik.
- Letakkan tabung yang berisi homogenat pada suhu ruangan ($15-25^{\circ}\text{C}$) selama 5 menit
- Tambahkan 200 μl kloroform ke tabung yang berisi homogenat dan tutup dengan rapat. Vortex tabung dengan kuat selama 15 detik. Letakkan tabung yang berisi homogenat pada suhu ruangan ($15-25^{\circ}\text{C}$) selama 5 menit
- Sentrifugasi selama 15 menit pada 12.000g pada suhu 4°C . Setelah sentrifugasi, panaskan sentrifuge hingga suhu ruangan ($15-25^{\circ}\text{C}$) untuk langkah sentrifugasi berikutnya.
- Pindahkan fase *aqueous* (bagian paling atas) ke *collection tube* baru. Hindari memindahkan bahan interfase. Tambahkan 900 μl etanol 100% dan campur secara menyeluruh dengan pipet naik turun beberapa kali. Jangan sentrifugasi. Lanjutkan tanpa penundaan ke langkah berikutnya.
- Pipet hingga 700 μl sampel, termasuk endapan yang mungkin terbentuk, ke dalam kolom putar RNeasy Mini dalam *collection tube* 2 ml. Tutup penutupnya dengan lembut dan sentrifugasi pada $\geq 8000 \times g$ selama 15 detik pada suhu ruangan ($15-25^{\circ}\text{C}$). Buang cairan yang mengalir keluar. Lakukan sampai seluruh homogenate habis.
- Tambahkan 700 μl Buffer RWT ke *RNeasy Mini spin column*. Tutup penutupnya dengan lembut dan sentrifugasi selama 15 detik pada $\geq 8000g$ untuk mencuci kolom. Buang cairan yang mengalir keluar.
- Tambahkan 500 μl Buffer RPE ke *RNeasy Mini spin column*. Tutup penutupnya dengan lembut dan sentrifugasi selama 15 detik pada $\geq 8000g$ untuk mencuci kolom. Buang cairan yang mengalir keluar. Ulangi tahap ini sekali lagi

- Tempatkan *RNeasy Mini spin column* ke dalam tabung koleksi 2 ml yang baru, dan buang tabung koleksi lama beserta cairan yang mengalir keluar. Sentrifugasi dalam mikrosentrifuge dengan kecepatan penuh selama 2 menit.
- Pindahkan *RNeasy Mini spin column* ke tabung koleksi 1,5 ml yang baru. Pipet 30–50 μ l *RNase free-water* langsung ke membran *RNeasy Mini spin column*. Tutup penutupnya dengan lembut dan sentrifugasi selama 1 menit pada $\geq 8000g$ (≥ 10.000 rpm) untuk mengelusi RNA.
- Kualitas RNA dinilai dengan menggunakan Nano Drop Spectrophotometer. RNA dari setiap pasien dan kontrol dikumpulkan dan disajikan sebagai dua kelompok (kecacingan dan kontrol). Hasil ekstraksi disimpan di kulkas -80° C sampai dipergunakan kemudian.

Elektroforesis untuk menilai hasil ekstraksi miRNA

- Timbang agarosa dan larutkan dalam 1X TAE buffer. Untuk konsentrasi 2%, gunakan 2 gram agarosa dalam 100 mL buffer.
- Panaskan campuran agarosa dan buffer (menggunakan microwave) hingga agarosa benar-benar larut, 30 detik.
- Dinginkan agarosa hingga sekitar $50-60^{\circ}\text{C}$, kemudian tambahkan pewarna Florogreen DNA stain untuk visualisasi.
- Tuangkan agarosa ke dalam cetakan (gel tray) dan sisipkan sisir untuk membentuk sumur (wells) di gel.
- Biarkan hingga gel mengeras (sekitar 20-30 menit).
- Setelah gel mengeras, angkat sisir dengan hati-hati dan pindahkan gel ke dalam gel electrophoresis tank yang berisi 1X TAE buffer.
- Campurkan sampel miRNA dengan DNA loading dye (bisa juga digunakan untuk RNA). Campurkan 2 μ L miRNA dengan 2 μ L loading dye.
- DNA ladder juga perlu dipersiapkan untuk membandingkan ukuran miRNA.
- Pipetkan campuran miRNA dan loading dye ke dalam sumur gel dengan hati-hati, serta pipetkan DNA ladder di sumur terpisah sebagai penanda ukuran.
- Jalankan elektroforesis pada tegangan rendah (sekitar 70-100 volt) untuk mencegah RNA terlalu cepat melewati gel.
- Waktu elektroforesis bervariasi tergantung ukuran sampel, pada penelitian ini kami menggunakan tegangan sebesar 50 volt selama 60 menit.
- Setelah elektroforesis selesai, keluarkan gel dari tank dan tempatkan di UVITEC atau gel imaging system untuk visualisasi miRNA.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Genomic DNA Removal

- Siapkan sampel di dalam kotak es. Lalu vortex solusi dan disentrifugasi sebelum digunakan.
- Siapkan campuran berikut dalam RNase-free centrifuge tube:
 - 5 $\times$ gDNA Wiper Mix 2 μ l

- Total RNA 8 μ l
- Pipet perlahan ke atas dan ke bawah beberapa kali untuk mencampur secara menyeluruh dan inkubasi pada suhu 42°C selama 2 menit.

Sintesis cDNA dari miRNA

Sintesis cDNA dari miRNA menggunakan kit miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by *stem-loop*)

- Siapkan campuran berikut dalam RNase-free *centrifuge tube*:
 - RNase-free ddH₂O 5 μ l
 - Campuran dari tahap sebelumnya 10 μ l
 - *Stem-loop primer* (2 μ M) 1 μ l
 - 10 $\times$ RT Mix 2 μ l
 - HiScript II Enzyme Mix 2 μ l
- Pipet perlahan ke atas dan ke bawah beberapa kali untuk mencampur secara menyeluruh
- Lakukan reaksi sintesis cDNA untai pertama dengan kondisi berikut:
 - Atur *thermal cycler* 25°C selama 5 menit untuk *primer annealing*.
 - Dilanjutkan dengan 42°C selama 15 menit untuk *reverse transcription*.
 - Dilanjutkan dengan 85°C selama 5 menit untuk inaktivasi dan 4°C untuk pendinginan.

Ekspresi miRNA-155 dengan qPCR

Ekspresi miRNA-155 dengan qPCR dengan memakai miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix

- Siapkan campuran berikut dalam qPCR *tube* (volume total akhir adalah 20 μ l):
 - 2 $\times$ miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ l
 - Specific Primer (10 μ M) 0.4 μ l
 - mQ Primer R (10 μ M) 0.4 μ l
 - Template DNA/cDNA 2 μ l
 - ddH₂O 7.2 μ l
- Sekuens dari Specific Primer dan mQ Primer R tercantum dalam tabel 1
- Step *cycling* pada qPCR dilakukan sesuai dengan protokol dari kit. Lakukan *3-step* sikling pada PCR dengan siklus pertama untuk proses aktivasi polimerasi dalam waktu 5 menit di suhu 95°C, lalu proses sikling di suhu 95°C selama 10 detik dan 60°C selama 30 detik selama 40 kali, dilanjutkan dengan tahapan terakhir berupa *melting curve* pada 95°C selama 15 detik, 60°C selama 30 detik, dan 95°C selama 15 detik.
- Setiap pengujian adalah dilakukan dalam rangkap dua, dan ekspresi lipat berubah dari setiap miRNA dihitung sesuai dengan metode $2^{-\Delta\Delta C}$ dan dinormalisasi ke *housekeeping* U6 ekspresi.

Tabel 1. Sekuens primer miRNA-155.

Primer	Sequence
U6	<i>Stemloop</i> 5'- AACGCTTCACGAATTTGCGT -3'
	<i>Forward</i> 5'- CTCGCTTCGGCAGCACA -3'
	<i>Reverse (mQ)</i> 5'- AACGCTTCACGAATTTGCCGT -3'
miRNA-155	<i>Stemloop</i> 5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCCC-3'
	<i>Forward</i> 5'- ACGCTCAGTTAATGCTAATCGTGATA-3'
	<i>Reverse (mQ)</i> 5'- AACGCTTCACGAATTTGCCGT -3'

3.3. Metode Analisis

Analisis ekspresi miRNA

Dalam penelitian ini, data miRNA yang telah diubah ke cDNA diperoleh pada quantitative-PCR kemudian dimasukkan ke dalam rumus berikut:

$$2^{-ave\Delta Ct}$$

Dimana:

Average ΔCt = rata-rata dari hasil pengurangan *cycle threshold* gen U6 dan miRNA-155 target yang akan dianalisis. Rumus di atas digunakan sebagai titik perbandingan antara ekspresi miRNA-155 target dan miRNA U6 (*housekeeping gene*). Hasilnya dinyatakan sebagai data numerik yang menggambarkan ekspresi gen target.

Analisa variabel

Analisis data didahului dengan uji normalitas dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Analisa perbedaan ekspresi miRNA-155 pada sampel, jika data terdistribusi secara normal maka digunakan uji Student T-Test dan jika data terdistribusi secara tidak normal maka digunakan uji pengganti Mann-Whitney. Analisis data dalam penelitian menggunakan bantuan dari program SPSS versi 25.0

Etika Penelitian

Protokol untuk pengambilan sampel pada penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Riset Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti, *Ethical Clearance* Nomor 056/KER/FK/II/2024. Selain itu, dalam penelitian ini, data subjek penelitian dijamin kerahasiaannya. Sebelumnya, subjek penelitian sudah diminta persetujuan terlebih dahulu (*informed consent*) untuk ikut serta dalam penelitian secara sukarela.

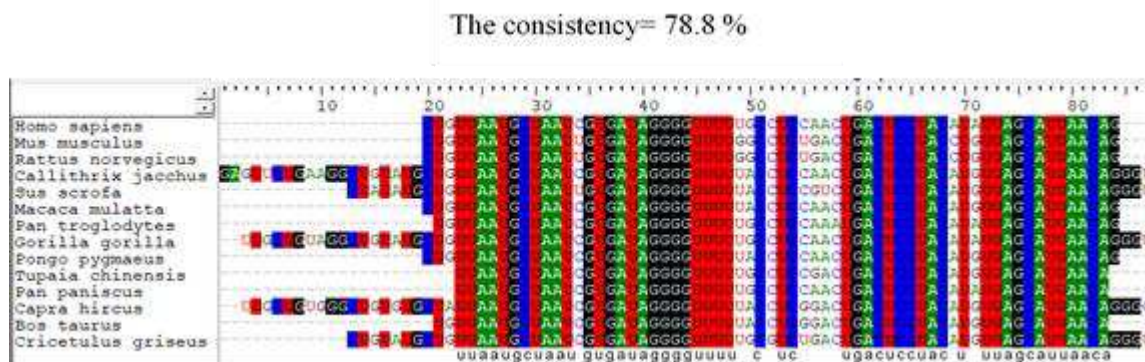
3.4. Indikator Capaian Penelitian

ASPEK		CHECKLIST
SKALA UNGGULAN	Skala Internasional	
	Skala Nasional	
	Skala Lokal	✓
TOPIK/TEMA RISET	Top Down	
	Semi Top Down	
	Bottom Up	✓
SKEMA PENDANAAN	Block Grant	✓
	Kompetitif	
PELAKSANA RISET	Pusat Penelitian	
	Individu	
	Riset Group	✓
SUMBER DANA	Dana Desentralisasi	
	DP2M (30%)	
	Mandiri PT	✓
	Kerjasama Luar negeri	
	Sumber Lain-lain	
KEY PERFORMANCE INDICATOR	Jurnal	
	HKI	
	Teknologi Tepat Guna	
	S3	
	Seminar	
	Publikasi Internasional	✓
	Buku Ajar	
	Lain_lain (BUNGA RAMPAT)	
MANAGEMENT PENGELOLAAN	LEMLIT	
	Fakultas	✓
	Pusat Penelitian/Studi/Pengkajian	
BUKU PANDUAN	Buku Panduan Penelitian Usakti	✓
	Buku Panduan Skim DP2M	
ALOKASI DANA DESENTRALISASI	0-50%	
	50-75%	
	75-100%	

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

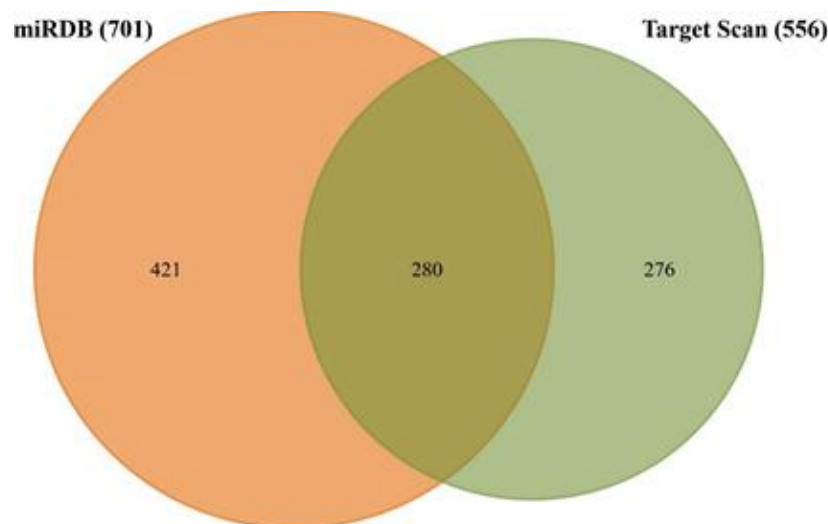
4.1 *In silico* study dari microRNA-155 pada infeksi kecacingan

In silico study merupakan studi dengan menggunakan pendekatan simulasi komputer. Studi *in silico* urutan prekursor miRNA (miRNA) pada manusia dan organisme lain diidentifikasi menggunakan MiRBase. MiRBase digunakan untuk mencari urutan prekursor miRNA pada manusia dan spesies lainnya. Hasil penjajaran multi-urutan menunjukkan bahwa urutan wilayah benih miRNA-155 UAAUGCUAAU, GUGAUAGGGGUUUU, C, UC, UGACUCCUAC, U, dan UUAGCAUUAACA sangat konservatif pada vertebrata, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Urutan benih (*seed*) dari prekursor miRNA-155 pada berbagai spesies.

Selain itu, prediksi Gen Target miRNA-155 juga dilakukan dengan menggunakan beberapa algoritma untuk memprediksi target miRNA secara silang dapat secara signifikan meningkatkan akurasi prediksi.

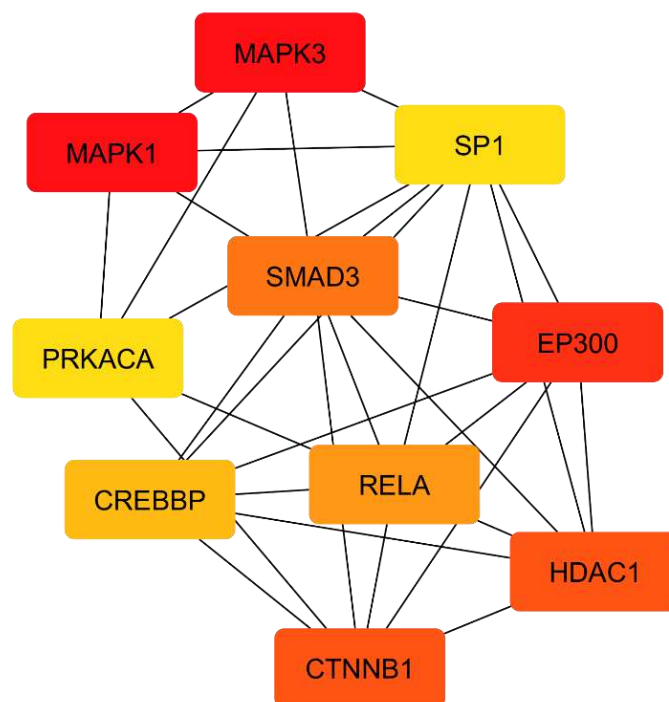


Gambar 2. Prediksi gen target miRNA-155.

Dalam prediksi gen target miRNA-155, basis data TargetScan dan miRDB digunakan, masing-masing menggunakan algoritma yang berbeda. Parameter diatur ke pengaturan *default*, menghasilkan identifikasi 556 dan 701 gen target dari masing-masing basis data. Selanjutnya, dengan menggabungkan gen target yang diprediksi dari kedua basis data, total 280 gen target diperoleh untuk analisis pengayaan fungsional selanjutnya (Gambar 2).

Prediksi Jaringan Interaksi Gen Target

Sebanyak 280 gen yang diprediksi dimasukkan ke dalam situs String untuk membangun jaringan Interaksi Protein-Protein (PPI). Analisis menunjukkan bahwa gen seperti MAPK1, MAPK3, dan EP300 mungkin terkait dengan kejadian helminthiasis (Gambar 3).



Gambar 3. Prediksi jaringan interaksi gen target menunjukkan 10 gen kunci teratas dengan skor relatif tinggi dipilih dari jaringan interaksi protein-protein.

4.2 Distribusi karakteristik responden

Penelitian ini diikuti sebanyak 64 subyek, yakni 31 anak yang terinfeksi kecacingan dan 33 individu sebagai kontrol sehat. Tabel 2 menunjukkan distribusi karakteristik responden dan rerata usia responden berkisar 6-12 tahun. Sebagian besar responden yang berpartisipasi dalam penelitian ini

berusia 6 tahun yakni sebanyak 51.6% (subyek) dan 42.2% (kontrol). Responden diberi pertanyaan mengenai pengetahuan, sanitasi, dan higienitas yang berkaitan dengan infeksi kecacingan (Tabel 3). Hasil kuesioner menunjukkan bahwa sebagian besar responden subjek berpendapat tanda dominan kecacingan adalah anak merasa lemas (48,4%), dan sebagian besar mengetahui bahwa penularan kecacingan terjadi melalui kontak tangan atau kaki (51,6%). Hasil data sanitasi cukup baik, menunjukkan sebagian besar masyarakat sudah memiliki kakus/jamban sendiri (71.0% subyek, 84.8% kontrol). Selain itu, data higienitas responden subyek didominasi dengan mencuci tangan sesudah dan sebelum makan (71%). Hasil analisis menunjukkan bahwa pengetahuan, sanitasi, dan higienitas yang baik berbanding terbalik dengan rendahnya status infeksi anak-anak yang terindikasi kecacingan.

Tabel 2. Distribusi karakteristik reponden.

Karakteristik	Subjek N (%)	Kontrol N (%)
Usia		
6 tahun	16 (51.6)	14 (42.2)
7 tahun	7 (22.6)	7 (21.21)
8 tahun	3 (9.7)	5 (15.15)
9 tahun	2 (6.5)	2 (6.06)
10 tahun	1 (3.2)	3 (9.09)
11 tahun	1 (3.2)	2 (6.06)
12 tahun	1 (3.2)	0 (0.00)
Total	31 (100)	33 (100)
Jenis kelamin		
Laki-laki	11 (35.5)	17 (51.52)
Perempuan	20 (64.5)	16 (48.48)
Total	31 (100)	33 (100)

Berdasarkan perhitungan egg per gram (EPG), rerata jumlah telur cacing yang didapatkan adalah 12,800 epg. Jumlah ini termasuk ke dalam infeksi kecacingan sedang. Pada penelitian ini juga dilihat distribusi infeksi STHs yang dikelompokkan berdasarkan umur dan jenis kelamin seperti terlihat pada Tabel 2. Hasil menunjukkan bahwa terdapat 29 murid (12,9%) kelas 1-6 SD yang mengalami kecacingan, dengan rata-rata usia berkisar antara 6-10 tahun. Sisanya, hanya terdapat 2 (0,9%) orang anak (>10 tahun) yang terinfeksi. Berdasarkan jenis kelamin, pada penelitian ini terlihat bahwa anak laki-laki lebih rentan terpapar infeksi STHs, yakni sebanyak 20 orang. Sedangkan, anak perempuan hanya 11 yang terinfeksi kecacingan.

Tabel 3. Distribusi kuesioner pengetahuan, sanitasi, dan higienitas.

Variabel	Subjek N (%)	Kontrol N (%)
A. Pengetahuan		
Tanda-tanda cacingan		
Lemas	15 (48.4)	9 (27.3)
Kurus	4 (12.9)	8 (24.2)
Perut buncit	1 (3.2)	1 (3.0)
Nafsu makan berkurang	5 (16.1)	10 (30.3)
Pucat	3 (9.7)	3 (9.1)
Sakit perut	2 (6.5)	0 (0.0)
Keluar cacing dari dubur	1 (3.2)	2 (6.1)
Total	31 (100)	33 (100)
Penularan cacingan		
Melalui makanan atau minuman	13 (41.9)	15 (45.5)
Melalui tangan atau kaki	16 (51.6)	18 (54.5)
Tidak tahu	2 (6.5)	0 (0.0)
Total	31 (100)	33 (100)
Pencegahan cacingan		
Menjaga kebersihan makanan atau minuman	12 (38.7)	3 (9.1)
Cuci tangan sebelum dan sesudah makan	10 (32.3)	4 (12.1)
Membersihkan kuku	4 (12.9)	6 (18.2)
Minum obat cacing	2 (6.5)	12 (36.4)
Cuci tangan setelah BAB	3 (9.7)	8 (24.2)
Total	31 (100)	33 (100)
B. Sanitasi		
Tempat BAB		
Kakus/jamban sendiri	22 (71.0)	28 (84.8)
Kakus/jamban umum	4 (12.9)	5 (15.2)
Sungai	2 (6.5)	0 (0.0)
Kebun	3 (9.7)	0 (0.0)
Total	31 (100)	33 (100)
Tempat sampah		
Buang sampah ditempatnya	24 (77.4)	32 (96.9)
Buang sampai disungai	7 (22.6)	1 (3.1)
Total	31 (100)	33 (100)
C. Higienitas		
Cuci tangan		
Waktu sebelum dan sesudah makan	22 (71.0)	29 (87.9)
Cuci tangan dan kaki setelah bermain	9 (29.0)	4 (12.1)
Total	31 (100)	33 (100)

Faktor-faktor yang mempengaruhi tingkat keparahan infeksi cacing pada anak sekolah umumnya disebabkan oleh pengabaian orang tua, yang ditandai dengan kebiasaan makan yang tidak optimal, status sosial ekonomi yang rendah, dan kurangnya kesadaran masyarakat mengenai pentingnya menjaga sanitasi dan kebersihan dalam kehidupan sehari-hari. Hal ini menekankan bahwa individu yang kurang menjaga praktik sanitasi dan kebersihan yang memadai rentan terhadap berbagai macam penyakit, termasuk helminthiasis (8-9). Yang sangat penting adalah penerapan praktik kebersihan pribadi yang ketat, terutama di kalangan anak-anak usia sekolah dasar yang sangat rentan terhadap infeksi cacing. Perilaku seperti buang air besar sembarangan dan tidak menggunakan alas kaki saat bermain dapat meningkatkan penularan infeksi melalui aktivitas di luar ruangan. Jika terus dibiarkan, ketiadaan praktik kebersihan pribadi ini dapat meningkatkan kemungkinan telur cacing masuk ke dalam tubuh dan menyebabkan helminthiasis.

Berdasarkan temuan dari penelitian yang dilakukan, disimpulkan bahwa kelompok usia yang paling rentan terhadap infeksi cacing terdiri atas anak-anak sekolah dasar, terutama yang berusia 6 sampai dengan 10 tahun. Terdapat hubungan antara tingkat pengetahuan, praktik sanitasi, dan perilaku kebersihan pribadi dengan prevalensi infeksi cacing dalam kelompok usia ini (9). Usia ini memang rentan terinfeksi STHs karena adanya kontak erat dengan tanah. Hasil studi kali ini didukung dengan hasil penelitian yang sama dengan penelitian sebelumnya (23-25). Anak-anak pada rentang umur ini sangat senang bermain di halaman tanpa alas kaki, atau bahkan makan tanpa membersihkan tangan yang masih ada sisa-sisa tanah. Cacing jenis STHs ini menular melalui kontak langsung dengan tanah yang terkontaminasi oleh telur-telur cacing yang berasal dari tinja manusia yang terinfeksi kecacingan (24-25). Jika telur ini masuk ke dalam tubuh anak, mereka akan berkembang menjadi cacing dewasa. Berdasarkan laporan dari *World Health Organization* (2022) menyebutkan bahwa kelompok yang berisiko terhadap STHs adalah anak usia prasekolah, anak usia sekolah, dan wanita usia reproduktif, yang sangat membutuhkan mikronutrien (26-27). Infeksi kecacingan pada anak usia pra sekolah ini memerlukan perhatian yang serius mengingat akan dampak berbahaya di masa depan. Organisasi Kesehatan dunia menyatakan bahwa infeksi kecacingan termasuk ke dalam daftar 17 penyakit tropis terabaikan yang menjadi perhatian WHO, karena dampak morbiditasnya yang cukup signifikan (27-28). Infeksi ini dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan mental dan fisik juga anemia terutama pada anak usia sekolah (29-30).

Tabel 4. Distribusi sampel berdasarkan jenis *soil transmitted helminths* (STHs) yang menginfeksi.

Jenis Cacing	Frekuensi	(%)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	23	74.2
<i>Trichuris trichiura</i>	2	6.5
Mix infection (<i>T. trichiura</i> dan <i>A. lumbricoides</i>)	6	19.4
Cacing tambang, dll	0	0.0
Total	31	100.0

Berdasarkan jenis cacing yang ditemukan, terdapat dua *species* cacing yang biasa menginfeksi anak-anak tersebut, yakni *Ascaris lumbricoides* sebanyak 23 murid (74.2%) dan *Trichuris trichiura* sebanyak 2 orang (5.6%). Terdapat setidaknya 6 orang murid (16.7%) yang mengalami *mix infection* oleh kedua jenis cacing. Jenis cacing tambang dan lainnya tidak ditemukan pada responden terkait (Tabel 6). Hasil tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa jenis cacing *A. lumbricoides* dan *T. trichiura* merupakan *species* dominan yang menginfeksi anak-anak pra-sekolah di Indonesia. Hasil penelitian-penelitian sebelumnya dengan subjek yang sama akan tetapi daerah yang berbeda juga mendukung penelitian ini. Tapiheru dan Nurfadly (2021) menyebutkan bahwa di kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara, terdapat 2 *species* cacing yang paling umum menginfeksi anak-anak SD yakni *A. lumbricoides* dan *T. trichiura*, untuk infeksi cacing tambang atau *Hookworm* tidak ditemukan. Begitupun dengan daerah lainnya seperti Kecamatan Simanindo dan Ronggur Nihuta di Pulau Samosir, Indonesia (25), Percut Sei Tuan, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara (23-24), an daerah daerah lainnya.

4.3 Data ekspresi microRNA-155 (miRNA-155) pada penderita Kecacingan

Ekstraksi miRNA dari sampel saliva dilakukan dengan menggunakan kit komersial dari Qiagen dan Vazyme. *Pre-treatment* dengan pemberian sputasol dilakukan sebelum ekstraksi. Sputasol/Sputasolysin ini berisikan dithiothreitol (0.1% atau 0.54%) yang merupakan agen pencair (*liquifying agent*).

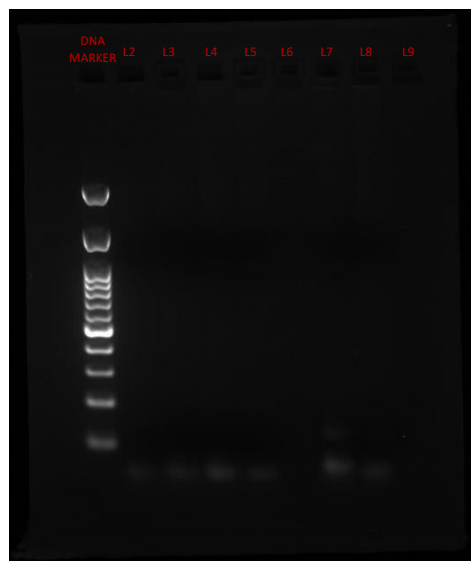
Konsentrasi dan efisiensi yang didapatkan dari hasil ekstraksi miRNA-155 pada sampel saliva penderita kecacingan (tabel 5 dan tabel 6).

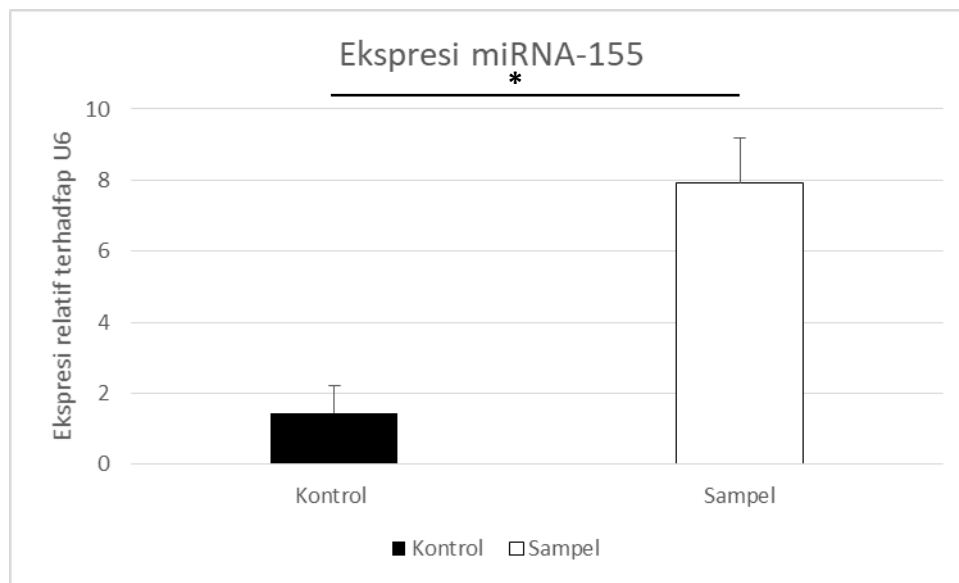
Tabel 5. Konsentrasi miRNA-155 pada sampel saliva.

Sampel	Konsentrasi miRNA-155	A260/A280
Saliva penderita kecacingan	12.1 – 32.4 ng/ μ l	1.8 -2
Saliva kontrol	1.5 – 10.1 ng/ μ l	1.8 -2

Tabel 6 Efisiensi miRNA-155 pada sampel.

Sampel	Nilai R	Nilai Efisiensi
Saliva penderita kecacingan	0.901	1
Saliva kontrol	0.872	0.89

**Gambar 4.** Visualisasi gel elektroforosis pemeriksaan kualitas/*integrity* dari miRNA sampel saliva.



* $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test)

Gambar 5. Level ekspresi miRNA-155 pada sampel saliva kelompok kontrol dan penderita kecacingan.

Pada penelitian ini, didapatkan hasil bahwa terdapat peningkatan level ekspresi miRNA-155 pada sampel saliva anak penderita kecacingan jika dibandingkan dengan saliva kontrol (Gambar 5). Hasil tersebut didukung oleh hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Okoye et al., 2014 pada hewan coba, yang menunjukkan terjadi peningkatan miRNA-155 dalam jaringan usus tikus yang diinfeksi dengan *Heligmosomoides polygyrus* (31).

Dalam studi ini, gen target miRNA-155 diprediksi menggunakan alat bioinformatika, dan dianalisis menggunakan analisis pengayaan Reactome dan Interaksi Protein-Protein (PPI). Prediksi 280 gen target untuk miRNA-155 terlibat dalam proses sinyal dan juga hadir di hampir semua komponen sel. Menariknya, dalam komponen seluler, gen target miRNA-155 terlibat dalam kompleks reseptor interleukin-6 (IL-6). Dalam jalur gen target, gen target terlibat dalam sinyal IL-4 dan IL-13. IL-4 adalah sitokin tanda dari Th-2 yang berperan penting dalam mengaktifkan sel B dan sel T, mempromosikan proliferasi mereka, dan memfasilitasi transformasi sel B menjadi sel plasma, sehingga penting dalam kekebalan tubuh terhadap infeksi kecacingan. Semua interleukin ini penting untuk kekebalan terhadap infeksi Kecacingan. IL-4 dan IL-13 mengaktifkan makrofag secara alternatif, yang berkontribusi secara signifikan pada berbagai aspek, termasuk pengebakan cacing, aktivasi sel imun, dan penyembuhan luka. (32-34). Sedangkan, IL-6 bersamaan dengan sitokin lainnya, seperti TNF α , IL-6, dapat mempengaruhi imunitas melalui sekresi oleh sel B (35).

Analisis jaringan interaksi protein-protein (PPI) dari gen target miRNA-155 menunjukkan bahwa gen seperti MAPK1, MAPK3, dan EP300 mungkin terkait dengan kejadian helminthiasis. SMAD3 adalah gen pengkode protein, keluarga SMAD, kelompok protein transduser sinyal intraseluler. Protein SMAD3 berfungsi dalam jalur sinyal *transforming growth factor-beta*, seperti

yang terlihat terlibat dalam infeksi *Fasciola hepatica* (35) dan *Fasciola gigantica* (36). MAPK1 (Mitogen-Activated Protein Kinase 1) adalah gen pengkode protein. Homolog pentingnya adalah MAPK3. MAPK1 adalah protein yang terlibat dalam sebagian besar aktivitas seluler seperti proliferasi, diferensiasi, regulasi transkripsi, dan perkembangan.

Selain itu, gen target menunjukkan pengayaan dalam jalur terkait deaktivasi kompleks transaktivasi beta-catenin, regulasi transkripsi oleh VENTX, sinyal Interleukin-4 dan Interleukin-13, sinyal oleh fusi BRAF dan RAF1, sinyal Interleukin-6, dan lainnya. Berdasarkan analisis di atas, maka dapat disimpulkan bahwa gen seperti MAPK1, MAPK3, EP300, dan lainnya diusulkan memiliki potensi hubungan dengan inisiasi helminthiasis.

Semua gen kunci di atas mungkin diatur oleh miRNA-155 dan perlu penyelidikan lebih lanjut tentang peran mereka dalam patogenesis helminthiasis untuk penemuan biomarker yang ideal. Dapat disimpulkan bahwa pemahaman tentang analisis bioinformatika dari gen target mendukung peran miRNA-155 dalam patogenesis kecacingan dan kemungkinan miRNA-155 sebagai kandidat biomarker untuk mempercepat eliminasi helminthiasis sebagai salah satu target eliminasi penyakit tropis terabaikan (*neglected tropical diseases*, NTDs), sebagaimana dinyatakan dalam SDG 3.3.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil penelitian mengenai derajat infeksi kecacingan pada anak sekolah menunjukkan bahwa infeksi kecacingan masih perlu mendapatkan penanganan yang serius dari pemerintah. Terdapat peningkatan bermakna dari level ekspresi miRNA-155 pada sampel saliva anak-anak penderita kecacingan jika dibandingkan dengan kontrol. Analisis pengayaan jalur biologis Reactome yang dilakukan pada 280 gen target mengungkapkan bahwa gen target miRNA-155 menunjukkan potensi pengayaan dalam berbagai jalur biologis, deaktivasi kompleks transaktivasi beta-catenin, regulasi transkripsi oleh VENTX, sinyal Interleukin-4 dan Interleukin-13, sinyal oleh fusi BRAF dan RAF1, sinyal Interleukin-6, dan lainnya. Hal tersebut kemungkinan besar digunakan sebagai penanda biologis yang potensial untuk penelitian tentang helminthiasis di masa yang akan datang.

Saran

Perlu dilakukannya penelitian lanjutan yang lebih mendalam mengenai ekspresi miRNA-155 dalam *bio-fluid* yang lain dan juga peran miRNA-155 yang terkait dengan patofisiologi helmintiasis.

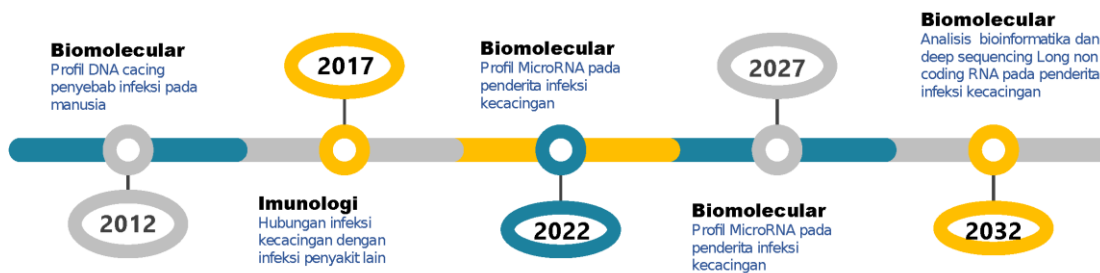
DAFTAR PUSTAKA

1. Jourdan PM, Lamberton PHL, Fenwick A, Addiss DG. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet* (London, England). 2018 Jan 20 [PubMed PMID : 28882382]
2. WHO. Soil-transmitted helminth infections [internet]. 2023 [cited 2023 Feb 28]. Available from : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>
3. Alemu Y, Degefa T, Bajiro M, Teshome G. Prevalence and intensity of soil-transmitted helminths infection among individuals in model and non-model households, South west Ethiopia: a comparative cross-sectional community based study. *Plos one* [internet]. 2022 Oct.
4. WHO. Soil-transmitted helminthiasis [internet]. 2021 [cited 2023 Feb 28]. Available from : https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sth/sth.html
5. Dexheimer PJ, Cochella L. MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8.
6. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9.
7. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How Huang K, Jen Lee M, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*. 2010;56(11):1733-41.
8. World Health Organization. Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Third WHO Report on Neglected Diseases. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2015. pp. 1–191.
9. World Health Organization. Eliminating Soil-Transmitted Helminthiasis as a Public Health Problem in Children, Progress Report 2001-2010 and Strategic Plan 2011-2020. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2012. pp. 1–78.
10. Tarafder MR, Carabin H, Joseph L, Balolong E, Jr, Olveda R, McGarvey ST. Estimating the sensitivity and specificity of Kato-Katz stool examination technique for detection of hookworms, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections in humans in the absence of a 'gold standard'. *Int J Parasitol*. 2010;40:399–404.
11. Dogini DB, Pascoal VDAB, Avansini SH, Vieira AS, Pereira TC, Lopes-Cendes I. The new world of RNAs. *Genetics and Molecular Biology*. 2014;37:285-93.
12. Hubé F, Francastel C. Coding and Non-coding RNAs, the Frontier Has Never Been So Blurred. *Front Genet*. 2018;9:140-.
13. Palazzo AF, Lee ES. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet*. 2015;6(2).
14. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol*. 2014;51(4):759-74.
15. Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular miRNAs: from biomarkers to mediators of physiology and disease. *Cell metabolism*. 2019;30(4):656-73.
16. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(1):17-24.
17. Babu S, Nutman TB. Helminth-tuberculosis co-infection: an immunologic perspective. *Trends Immunol* 2016 Sept; 37(9): 597-607.
18. Yuliana Y. Hubungan antara infeksi cacing usus dan tuberkulosis. *Jurnal Kedokteran Meditek*, 24(67).
19. Okoye IS, Czesio S, Ktistaki E, Roderick K, Coomes SM, Pelly VS, et al. transcriptomics identified a critical role for Th2 cell-intrinsic miR-155 in mediating allergy and antihelminth immunity. *PNAS plus* 111(30).

20. Bronevetsky Y, Ansel KM (2013) Regulation of miRNA biogenesis and turnover in the immune system. *Immunol Rev* 253(1):304–316.
21. Baumjohann D, Ansel KM (2013) MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nat Rev Immunol* 13(9):666–678.
22. Arora N, Tripathi S, Singh AK, Mondal P, Mishra A, Prasad A (2017). micromanagement of immune system: role of miRNA in helminthic infection. *Front Microbiol* 8:586.
23. Tapiheru Muhammad Jabbar Rahman, Nurfadly. Prevalensi infeksi soil transmitted helminth pada murid Sekolah Dasar negeri 105296 Kecamatan Percut Sei Tuan, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara. *JIMKI J Ilm Mhs Kedokt Indones*. 2021;8(3):1–7.
24. Andini L, Nurfadly N. Correlation between Soil Transmitted Helminth Infection with Nutritional Status in Elementary School at Deli Serdang Regency North Sumatera. *Muhammadiyah Med J*. 2021;2(1):7.
25. Ipa M, Isnani T, Girsang VI, Amila, Harianja ES, Purba Y, et al. Soil-transmitted helminth infections and anemia in children attending government run schools on Samosir Island, Indonesia. *Parasite Epidemiol Control* [Internet]. 2024;25(January):1–8.
26. Nikmatullah NA, Wijastuti, Masyhuda I, Permanasari ED, Rahmadilla C. The Correlation Between Nutritional Status and The Incidence of Hypertension in Productive Age. *J Heal Nutr Res*. 2023;2(3):140–5.
27. WHO. Weekly epidemiological record: Schistosomiasis and soil- transmitted helminthiasis: progress report, 2021. *Wkly Epidemiol Rec*. 2022;97(48):621–32.
28. Alemu Y, Degefa T, Bajiro M, Teshome G. Prevalence and intensity of soil-transmitted helminths infection among individuals in model and non-model households, South West Ethiopia: A comparative cross-sectional community based study. *PLoS One* [Internet]. 2022;17(10):1–14.
29. WHO. Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Third WHO Report on Neglected Diseases. Geneva: World Health Organization; 2015. 1–211 p.
30. WHO. Soil-transmitted helminthiasis : eliminating as public health problem soil-transmitted helminthiasis in children : progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2012. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/44804>.
31. Okoye IS, Czieso S, Ktistaki E, Roderick K, Coomes SM, Pelly VS, et al. Transcriptomics identified a critical role for Th2 cell-intrinsic miR-155 in mediating allergy and antihelminth immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(30):E3081-E90.
32. Anthony, R. M., Urban, J. F., Jr., Alem, F., Hamed, H. A., Rozo, C. T., Boucher, J. L., Van Rooijen, N. & Gause, W. C. 2006. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med*, 12, 955-60.
33. Esser-Von Bieren, J., Volpe, B., Kulagin, M., Sutherland, D. B., Guet, R., Seitz, A., Marsland, B. J., Verbeek, J. S. & Harris, N. L. 2015. Antibody- Mediated Trapping of Helminth Larvae Requires CD11b and Fcγ Receptor 1. *J Immunol*, 194, 1154-63.
34. Herbert, D. R., Hoelscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, R., Hall, P., Mossmann, H., Claussen, B. & Forster, I. 2004. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*, 20, 623-35.
35. Shen, P. & Fillatreau, S. 2015. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol*, 15, 441-51.
36. Japa O, Hodgkinson JE, Emes RD, Flynn RJ. TGF-β superfamily members from the helminth *Fasciola hepatica* show intrinsic effects on viability and development. *Veterinary Research*. 2015;46(1):29.

37. Wu D, Kong X, Zhang W, Di W. Reconstruction of the TGF- β signaling pathway of *Fasciola gigantica*. *Parasitology Research*. 2023;123(1):51.

LAMPIRAN 1. ROAD MAP PENELITIAN



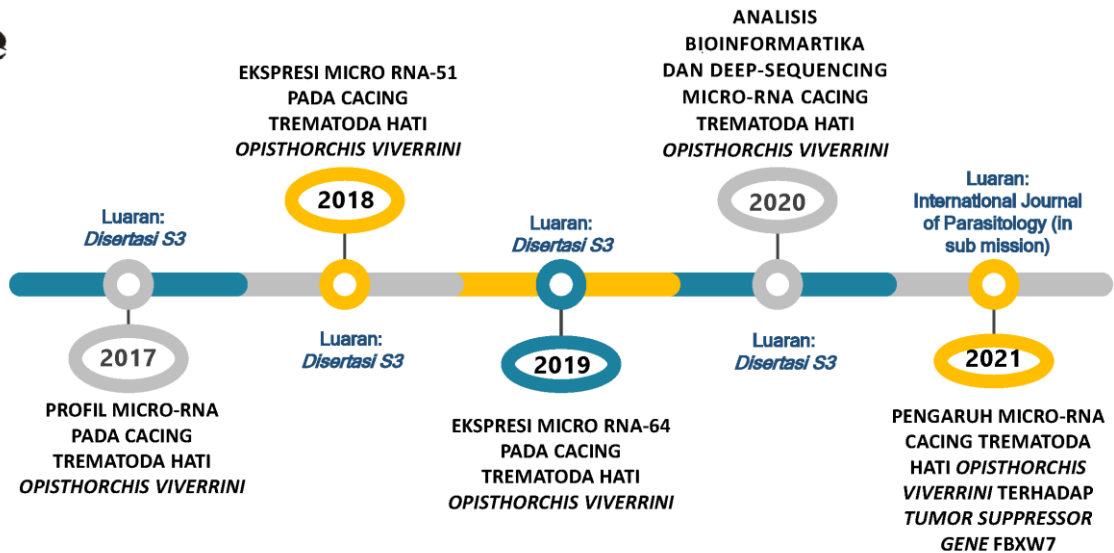
ROAD MAP PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

<Yuliana, dr., M.Biomed>, <NIK 3483/USAKTI>, <NIDN 0328078103>

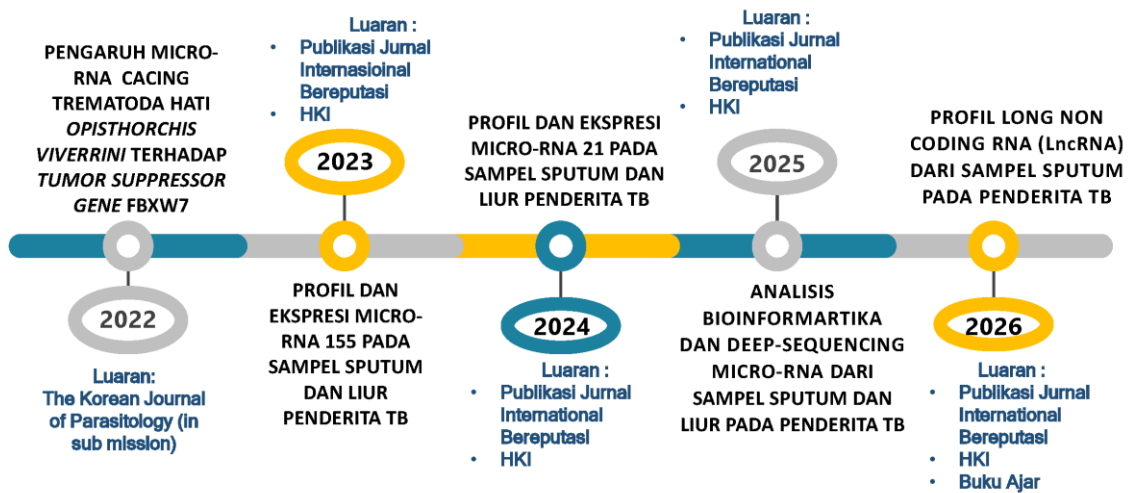


ROAD MAP PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

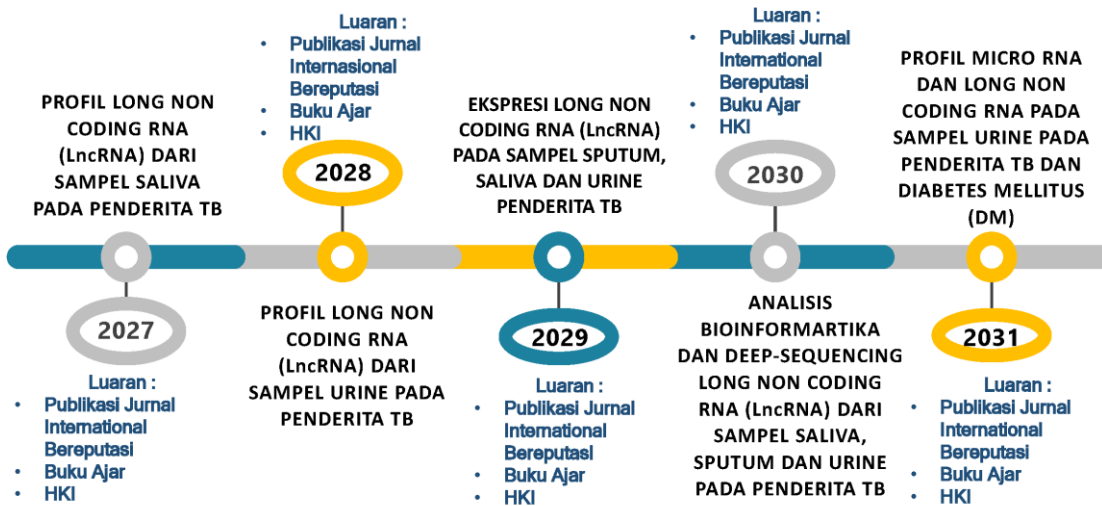
<Suriyani, dr., M.Biomed>, <NIK 3106/USAKTI>, <NIDN 0323097904>



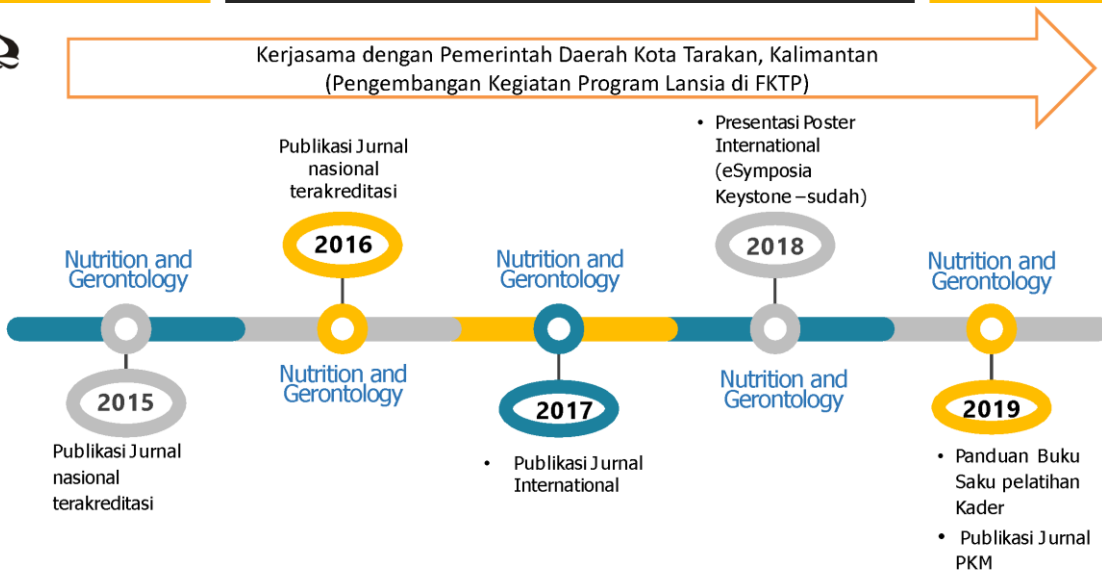
ROAD MAP PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
<Suriyani, dr., M.Biomed>, <NIK 3106/USAKTI>, <NIDN 0323097904>



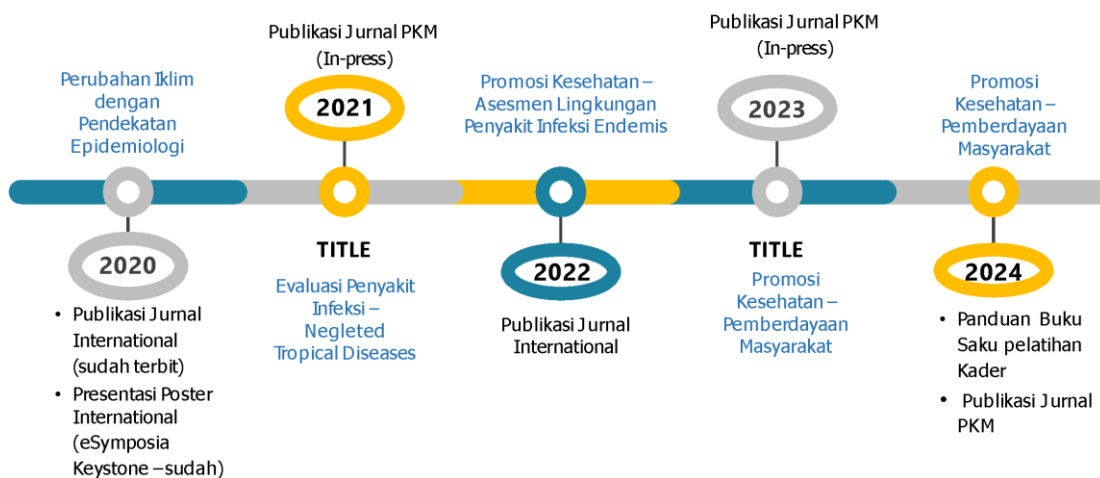
ROAD MAP PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
<Suriyani, dr., M.Biomed>, <NIK 3106/USAKTI>, <NIDN 0323097904>



ROAD MAP PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
<Suriyani, dr., M.Biomed>, <NIK 3106/USAKTI>, <NIDN 0323097904>



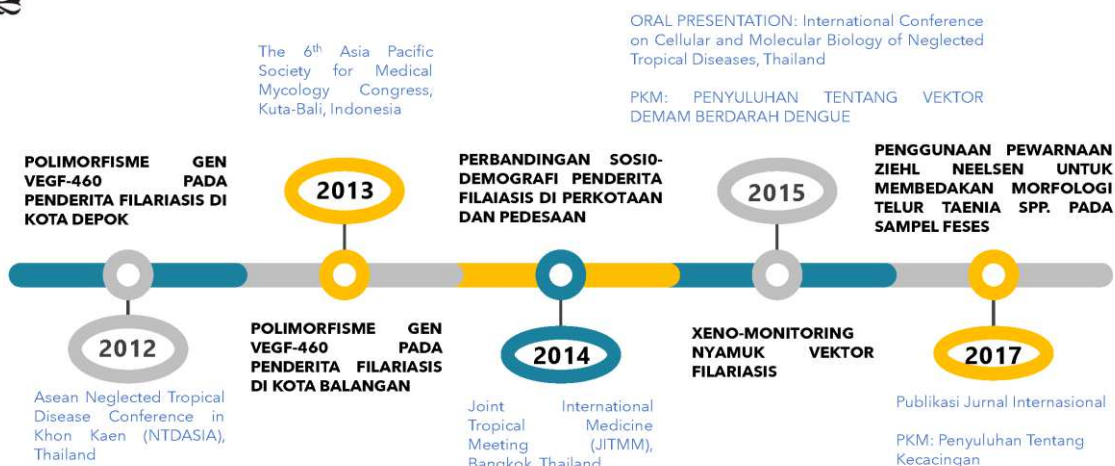
ROAD MAP PENELITIAN <Dr. dr. Rina Kurniasri Kusumaratna, M. Kes>



ROAD MAP PENELITIAN <Dr. dr. Rina Kurniasri Kusumaratna, M. Kes>



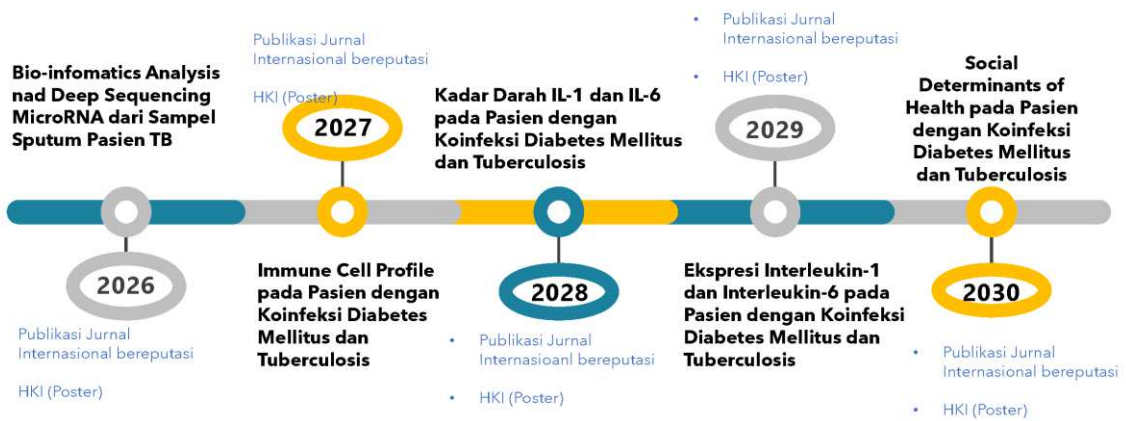
ROAD MAP PENELITIAN <Dr. dr. Rina Kurniasri Kusumaratna, M. Kes>



ROAD MAP PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT < dr. Machrumnizar, M. Biomed >



ROAD MAP PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT < dr. Machrumnizar, M. Biomed >



ROAD MAP PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT < dr. Machrumnizar, M. Biomed >

LAMPIRAN 2. LUARAN PENELITIAN

LUARAN 1 :

Kategori Luaran : Hak Kekayaan Intelektual

Status : Selesai

Jenis HKI : Hak Cipta

Nama HKI : Pencegahan Infeksi Kecacingan

LUARAN 2 :

Kategori Luaran : Publikasi di Jurnal

Status : *Submitted*

Jenis Publikasi Jurnal : Internasional Bereputasi

Nama Jurnal : *Public Health of Indonesia Journal*

ISSN : 24771570, 25281542

ESSN : [2477-1570](https://doi.org/10.2477/1570)

Lembaga Pengindek : Scopus dan Sinta

Url Jurnal : <https://stikbar.org/ycabpublisher/index.php/PHI/focus-scope>

Judul Artikel : *Expression Profile of MicroRNA-155 (miRNA-155) in Saliva of Helminth-Infected Children and Healthy Individuals: A Potential Biomarker for Helminth Infection Diagnosis*

LUARAN 1

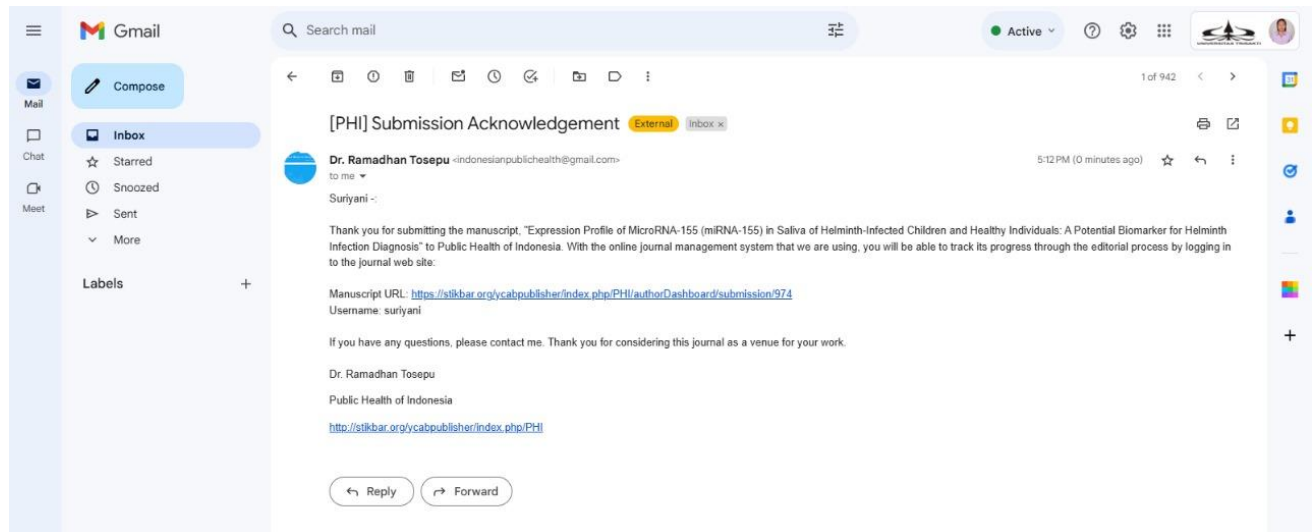
 REPUBLIK INDONESIA KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA	
SURAT PENCATATAN CIPTAAN	
Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:	
Nomor dan tanggal permohonan	: EC00202432909, 25 April 2024
Pencipta	
Nama	: dr. Yuliana, M.Biomed, dr. Suriyani, M.Biomed. dkk
Alamat	: Jl Tuparev No 168, Karawang Barat, Karawang, Jawa Barat, 41312
Kewarganegaraan	: Indonesia
Pemegang Hak Cipta	
Nama	: Universitas Trisakti
Alamat	: Sentra HKI Universitas Trisakti, Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat Gedung M Lantai 11, Jl. Kyai Tapa No. 1, Grogol Petamburan, Jakarta Pusat, Dki Jakarta 11440
Kewarganegaraan	: Indonesia
Jenis Ciptaan	: Karya Tulis Lainnya
Judul Ciptaan	: Pencegahan Infeksi Kecacingan
Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia	: 22 April 2024, di Jakarta
Jangka waktu perlindungan	: Berlaku selama 50 (lima puluh) tahun sejak Ciptaan tersebut pertama kali dilakukan Pengumuman.
Nomor pencatatan	: 000608265
adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon. Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.	
	a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL u.b Direktur Hak Cipta dan Desain Industri
 IGNATIUS MT SILALAH NIP. 196812301996031001	
Disclaimer: Dalam hal pemohon memberikan keterangan tidak sesuai dengan surat pernyataan, Menteri berwenang untuk mencabut surat pencatatan permohonan.	

LAMPIRAN PENCIPTA

No	Nama	Alamat
1	dr. Yuliana, M.Biomed	Jl Tuparev No 168 Nagasari Karawang Barat , Karawang Barat, Karawang
2	dr. Machrumnizar, M.Biomed.	Jl. Leuwinanggung No. 48 RT.001/RW.006, Leuwinanggung, Tapos, Tapos, Depok
3	dr. Suriyani, M.Biomed.	Jl. Kartini V Dalam No 5B Sawah Besar, Sawah Besar, Jakarta Pusat



LUARAN 2



Judul Artikel

Expression Profile of MicroRNA-155 (miRNA-155) in Saliva of Helminth-Infected Children and Healthy Individuals: A Potential Biomarker for Helminth Infection Diagnosis

Data Penulis (Tim Peneliti)

No	Nama	Status
1	dr. Yuliana, M.Biomed.	First Author
2	dr. Suriyani, M.Biomed.	Corresponding Author
3	dr. Machrumnizar, M.Biomed.	Other Author
4	Dr. dr. Rina Kurniasri Kusumaratna, M.Kes.	Other Author

Data Penulis (Di Luar Tim Peneliti)

No	Nama	Status
1	Jipri Suyanto	Corresponding Author