



Deteksi Gen NF-KB Dan TLR4 Pada Tikus Diet Tinggi Lemak Pra dan Pasca Pemberian *Free Cell* dari Bakteri Symbion Kulit Pisang

Sanatang¹, Wa Ode Yuliasri², Dyah Qadratillah¹

^{1,2} Prodi D-IV Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Mandala Waluya

³ Prodi Farmasi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Mandala Waluya

ABSTRAK

Diet tinggi lemak menyebabkan risiko obesitas. Obesitas ini dapat menyebabkan inflamasi tingkat rendah akibat aktivasi Nuclear Factor Kappa Beta (NF- κ B) melalui Toll Like Receptor (TLR-4). Pada penelitian ini peran free cell dari bakteri symbion kulit pisang diharapkan mampu menurunkan ekspresi gen NF- κ B dan TLR-4 pada tikus diet tinggi lemak. Tujuan dari penelitian ini untuk mendeteksi gen NF- κ B dan TLR4 pada tikus diet tinggi lemak pra dan pasca pemberian free cell dari bakteri symbion kulit pisang. Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan desain pre post control. Sampel pada penelitian ini menggunakan isolat bakteri kulit pisang yang berasal dari penelitian sebelumnya dengan kode KPM2. Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini dikelompokkan menjadi 4 kelompok perlakuan, kelompok normal diberi pakan normal; kelompok kontrol negatif diberi Na-CMC; kelompok kontrol positif diberi orlistat; kelompok uji diberi free cell dari isolat bakteri KPM2. Hasil penelitian dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menunjukkan bahwa diet tinggi lemak dapat mengaktifkan NF- κ B dan TLR-4 pada kelompok negatif dan positif yang diberi pakan lemak tinggi yang ditandai dengan teramplifikasinya pita pada gen target. Sedangkan pada kelompok uji tidak terlihat pita gen target yang teramplifikasi akibat adanya variasi biologis pada setiap hewan uji. Kesimpulan pada penelitian ini yaitu gagal mendeteksi gen NF- κ B dan TLR-4 yang ditandai dengan tidak teramplifikasinya pita gen NF- κ B dan TLR-4 pada tikus diet tinggi lemak pra dan pasca pemberian free cell dari bakteri symbion kulit pisang. Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini agar dapat melakukan penelitian lebih lanjut mengenal jenis-jenis sitokin pro-inflamasi yang spesifik terhadap obesitas.

Kata Kunci: *Obesitas, Inflamasi, PCR, NF- κ B, TLR4*

Detection of NF-KB and TLR4 Genes in High-fat Diet Rats before and after administration of Free Cells from Banana Peel Symbiont Bacteria

ABSTRACT

A high-fat diet leads to the risk of obesity. This obesity can cause low-grade inflammation due to activation of Nuclear Factor Kappa Beta (NF- κ B) via Toll Like Receptor (TLR-4). In this study, the role of free cells from banana peel symbiont bacteria is expected to reduce the expression of NF- κ B and TLR-4 genes in high-fat diet mice. The purpose of this study was to detect NF- κ B and TLR4 genes in pre- and post-cell-free fat diet mice from banana peel symbiont bacteria. This type of research is experimental with pre-post control design. The sample in this study used banana peel bacterial isolate from a previous study with the code KPM2. The test animals used in this study were grouped into 4 treatment groups, the normal group was given normal feed; the negative control group was given Na-CMC; the positive control group was given orlistat; The test group was given free cells from KPM2 bacterial isolates. The results of research using the PCR (*Polymerase Chain Reaction*) method showed that a high-fat diet can activate NF- κ B and TLR-4 in negative and positive groups given high-fat feed characterized by amplification of bands in target genes. Meanwhile, in the test group, there was no amplified target gene band due to biological variations in each test animal. The conclusion of this study was that it failed to detect the NF- κ B and TLR-4 genes characterized by the non-amplification of NF- κ B and TLR-4 gene bands in pre- and post-free fat diet mice from banana peel symbiont bacteria. Suggestions can be given from this study in order to conduct further research on types of pro-inflammatory cytokines specific to obesity.

Keywords: *Obesity, Inflammation, PCR, NF- κ B, TLR-4*

Penulis Korespondensi :
Sanatang
Universitas Mandala Waluya
chemist_ana82@yahoo.com
Hp : 081230373273

Info Artikel :
Submitted : 26 Juni 2023
Revised : 27 Juni 2023
Accepted : 27 Juni 2023
Published : 30 Juni 2023

PENDAHULUAN

Di Indonesia, menurut Data Riset Kesehatan Dasar (Riskesmas) tahun 2018, prevalensi obesitas pada penduduk umur >18 tahun menurut jenis kelamin pada tahun 2013-2018 mengalami peningkatan tiap tahunnya. Obesitas dikaitkan dengan keadaan inflamasi kronis tingkat rendah. Kondisi ini ditandai dengan produksi sitokin yang abnormal dan peningkatan protein fase akut dan aktivasi jalur sinyal inflamasi.

Beberapa penelitian menunjukkan adanya peningkatan penanda inflamasi pada tubuh penderita obesitas. Menurut penelitian Sanchez (2011) menunjukkan bahwa obesitas merupakan inflamasi sistemik dan kronik, terutama pada *White Adipose Tissue* yang ditandai oleh peningkatan kadar sitokin proinflamasi dalam sirkulasi seperti *Interleukin-6* dan *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α). Selain itu menurut Wardhana (2011) pada jaringan adiposa orang obesitas terjadi aktivasi *multiple signaling pathways* terhadap adiposit yang hipertrofi, disertai adanya infiltrasi makrofag. Sel-sel ini yang memicu terjadinya reaksi inflamasi pada jaringan adiposa tersebut. Jaringan adiposa adalah jaringan penyokong yang berfungsi sebagai tempat penyimpanan utama lemak dalam bentuk trigliserida (Kim dan Moussa, 2000).

Inflamasi adalah suatu respon terhadap cedera jaringan ataupun infeksi (Ikawati, 2011). Inflamasi terjadi sebagai akibat berbagai rangsangan yang disebabkan oleh aktivasi mediator dan sistem tubuh seperti sitokin, faktor komplemen dan faktor vasoaktif diantaranya histamin dan serotonin (Nurlaila Z, 2002). Inflamasi pada obesitas terjadi akibat peningkatan sitokin.

Sitokin dalam hal ini seperti *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dan *Interleukin 1 beta* (IL- β), kedua jenis sitokin tersebut berperan sebagai penginduksi kuat protein NF- κ B (Liu dkk., 2017). Selain peningkatan NF- κ B, terjadi juga peningkatan TLR4 hal ini dijelaskan oleh Jialal dkk. (2014) yang menyatakan bahwa terjadi peningkatan peradangan seiring dengan meningkatnya TLR4 pada obesitas.

Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) adalah pengatur respon inflamasi. NF- κ B berada dalam sel sitoplasma yang terikat dalam bentuk inaktif yang berfungsi mengatur inflamasi, respon imun, penyembuhan luka, serta kematian dan fungsi sel (Supriono dkk., 2018). NF- κ B merupakan molekul kunci dalam inflamasi, karena mengatur program transkripsi proinflamasi yang berperan sebagai pengatur dan pelaksana respon inflamasi (Khiong dkk., 2010).

Toll Like Receptor 4 (TLR4) adalah reseptor utama yang memediasi efek proinflamasi LPS (*Lipopolisakarida*). *Lipopolisakarida* merupakan komponen struktural penting dari dinding sel bakteri gram negatif yang bertindak sebagai tigerring yang menghubungkan inflamasi sistemik untuk diet tinggi lemak (Susmiati, 2019).

Salah satu bahan alam yang berpotensi digunakan sebagai obat herbal yaitu kulit pisang. Pemanfaatan buah pisang menyisakan limbah kulit pisang yang pada umumnya hanya dibuang sebagai limbah organik saja yang apabila tidak dimanfaatkan akan menjadi permasalahan lingkungan (Nifinluri dkk., 2019). Menurut beberapa penelitian kulit pisang dapat dimanfaatkan sebagai obat. Penelitian yang dilakukan oleh Nifinluri dkk. (2019) menyatakan bahwa ekstrak etanol kulit pisang kepok dapat

menurunkan aktivitas inflamasi pada telapak kaki tikus putih yang diinduksi formalin. Kulit pisang juga secara umum mengandung karbohidrat sebesar 18,5% yang merupakan sumber gula. Tingginya kadar karbohidrat memungkinkan ditemukannya bakteri yang berpotensi untuk mendegradasi karbohidrat. Penelitian Ulinuha (2018) berhasil mengisolasi bakteri pada kulit pisang kepok yaitu bakteri asam laktat.

Bakteri yang simbiosis dengan kulit pisang akan menghasilkan sejenis metabolit yang digunakan untuk membantu dalam proses metabolisme dan melindungi diri dari gangguan luar (Dewati, 2008). Bakteri tersebut adalah bakteri endofit, bakteri endofit merupakan bakteri yang bersimbiosis dengan tanaman inangnya, bakteri ini hidup berkoloni di dalam jaringan tanaman seperti akar, batang, daun, buah, bunga, kulit dan biji. Bakteri endofit dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder yang serupa dengan inangnya, hal ini diduga akibat adanya koevolusi dan transfer genetik dari tanaman inang ke bakteri (Tan dan Zou, 2001). Menurut penelitian Pratama dkk. (2015) menyatakan bahwa hasil penapisan fitokimia dari bakteri endofit mengandung senyawa flavonoid, saponin, dan terpenoid/steroid.

Metabolit sekunder yang berasal dari bakteri endofit biasa juga disebut dengan *Free cell*. Metabolit sekunder adalah senyawa metabolit yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme (Santoso, 2003). Menurut penelitian Dewi dkk. (2018) menyatakan bahwa kandungan senyawa metabolit sekunder pada kulit pisang seperti saponin, flavonoid, dan tanin mampu memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan glukosa darah pada mencit.

Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti tertarik melakukan percobaan untuk melihat pengaruh pemberian *freecell* dari bakteri simbiosis kulit pisang pada tikus diet tinggi lemak dengan mendeteksi adanya gen NF-kB dan TLR4 pada tikus. Metode yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* yang merupakan metode standar dalam pengujian amplifikasi DNA. Alasan digunakannya metode PCR dalam penelitian ini karena memiliki peran sangat penting dalam proses replikasi DNA secara *in vivo* yang bersifat semi konservatif (Nurjanah, 2013).

METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen dengan *Pre Post Test With Control Group Design* yaitu membandingkan hasil observasi pada kelompok eksperimen dan control. Populasi pada penelitian ini adalah isolat bakteri kulit pisang yang diperoleh dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sanatang dan Lio (2021) dari hasil penelitian didapatkan 6 isolat bakteri simbiosis kulit pisang dengan kode yaitu isolat KPM1, KPM2, KPK1, KPK2, KPR1 dan KPR2. Hasil pengujian dari 6 isolat dengan menggunakan *Blood Agar* diperoleh isolat dengan kode KPM2 yang menghasilkan hemolisis gamma, yang berarti isolat tersebut tidak dapat menghemolisis darah dan tidak patogen. Sehingga isolat KPM2 yang akan diuji pada mencit yang obesitas. Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan cara mendeskripsikan atau menggambarkan data yang terkumpul sebagaimana adanya tanpa bermaksud membuat kesimpulan yang berlaku umum atau generalisasi.

HASIL PENELITIAN

1. Hasil Pengukuran Berat Badan Tikus

Hasil pengukuran berat badan tikus sebelum dan sesudah pemberian *free cell* dari isolat bakteri KPM2 pada tabel berikut :

Tabel 1. Hasil Pengukuran Berat Badan Tikus

Kelompok	Hewan Perawatan	Berat Badan Tikus		Dosis Pemberian
		Sebelum Perlakuan (g)	Setelah Perlakuan (g)	
Kontrol Normal	1	228	232	-
	2	224	260	
	3	232	241	
Kontrol Negatif (Na-CMC)	1	252	248	0,5%
	2	251	252	
	3	245	243	
Kontrol Positif (Orlistat)	1	316	272	2,16 mg/3ml
	2	270	228	
	3	271	229	
Kontrol Uji (<i>Free cell</i>)	1	267	227	20 mg/ 2 ml
	2	269	237	
	3	257	223	

2. Hasil Pengukuran Konsentrasi DNA

Hasil pengukuran konsentrasi DNA sampel darah tikus diet tinggi lemak sebelum dan sesudah pemberian *free cell* dari isolat bakteri KPM2 pada tabel berikut :

Tabel 3. Hasil Pengukuran Konsentrasi DNA

Kode Sampel	$\lambda 260$	$\lambda 280$	Ratio	DNA
S1	0,078	0,071	1,572	355
S2	0,100	0,090	1,680	450
S3	3,940	3,897	1,012	19.485
S4	4,002	3,879	1,035	19.395
S5	3,960	3,844	1,033	19.220
S6	4,000	3,882	1,034	19.410
S7	3,942	3,783	1,047	18.915
S8	0,083	0,74	1,612	3.700

keterangan :

$\lambda 260$: DNA dan RNA

$\lambda 280$: Protein

3. Hasil Amplikasi PCR

Berdasarkan penelitian telah yang dilakukan, diperoleh hasil visualisasi DNA terhadap gen NF-kB dan TLR4 pada Tikus diet tinggi lemak pra dan pasca pemberian *free cell* dari isolat bakteri KPM2 pada gambar berikut :



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen NFkB dan TLR4 dengan metode PCR. Keterangan :M= Marker (DNA 100 bp ladder); S1-S4= Sebelum pemberian *free cell* dari isolat bakteri KPM2; S5 S6= Sesudah pemberian *free cell* dari isolat bakteri KPM2

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini darah dari tikus disentrifuge untuk mendapatkan serum dan dilanjutkan ke tahap isolasi DNA. Setelah itu, hasil dari isolasi DNA diukur menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang (λ) sebesar 260 nm dan 280 nm. Berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi DNA dari 8 sampel yang dapat dilihat pada tabel 6, didapatkan 3 sampel yang hampir mendekati DNA murni yaitu pada sampel 1,2 dan 8 dengan rasio masing-masing 1,572, 1,680, dan 1,612. Sedangkan pada sampel 3,4,5,6 dan 7 memiliki ratio di bawah 1,5. Hal ini menunjukkan bahwa stok DNA masih banyak mengandung kontaminan protein. Sulandari dan Zein (2003) menyatakan bahwa kemurnian DNA ditentukan oleh tingkat kontaminasi protein

di dalam larutan. Molekul DNA dikatakan murni jika ratio A260 dan A280 berkisar 1,8-2,0. Jika nilai ratio lebih kecil dari 1,8 maka masih ada kontaminasi protein atau fenol di dalam larutan. Kerusakan stok DNA dapat dipengaruhi oleh kurang baiknya penyimpanan sampel. Temperatur penyimpanan DNA yang dianjurkan adalah pada -20°C hingga -4°C . DNA dapat mengalami kerusakan struktur jika berada pada temperatur yang tinggi karena DNA terdiri dari dua jalinan yang dihubungkan dengan ikatan hidrogen, dan ikatan itu sangat rentan untuk rusak pada suhu tinggi.

Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis pada gambar 6 didapatkan pita berukuran 132 bp dan 295 bp pada sampel 2 (kelompok negatif) dan sampel 3 (kelompok positif) sebelum pemberian free cell dari isolat bakteri KPM2.

Pita DNA dengan fragment 132 bp diduga merupakan gen NFkB, hal ini sesuai dengan pernyataan Kermanian dkk. (2012) yaitu pita DNA NF-kB pada tikus terdeteksi pada fragment 132 bp dengan urutan basa 5' GCA AAC CTG GGA ATA CTT CAT GTG ACT AAG-3' dan 5'-ATA GGC AAG GTC AGA ATG CAC CAG AAG TCC-3'. NF-kB merupakan molekul kunci dalam inflamasi, karena mengatur program transkripsi proinflamasi yang berperan sebagai pengatur dan pelaksana respon inflamasi (Khiong dkk., 2010). NF-kB sangat terlibat dalam semua aspek proses inflamasi yang bertanggung jawab untuk pengembangan penyakit metabolik terkait obesitas. Gen NF-kB akan mengalami aktivasi apabila terjadi inflamasi pada tubuh seseorang, khususnya pada orang yang mengalami obesitas, hal ini didukung oleh pernyataan Wardhana (2011) yang menyatakan bahwa pada jaringan

adiposa orang obesitas terjadi aktivasi *multiple signaling pathways* terhadap adiposit yang hipertrofi, disertai adanya infiltrasi makrofag. Sel-sel ini yang memicu terjadinya reaksi inflamasi pada jaringan adiposa tersebut. Oleh karena itu, gen NF-kB banyak terdapat pada orang yang obesitas hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Purwandhono dkk. (2012) yang menyatakan bahwa pada obesitas terjadi perubahan adipositokin berupa peningkatan leptin. Peningkatan leptin mengakibatkan terjadinya inflamasi dengan aktifnya NF-kB.

Menurut Cattrysse dan Loo (2017) Ada 2 jalur aktivasi NF-kB, jalur kanonik dan jalur non kanonik. Peradangan yang berkaitan dengan obesitas berkisar pada jalur kanonik. Pada jalur kanonik NF-kB diaktifkan oleh beragam rangsangan eksternal dan internal. NF-kB yang belum aktif diasingkan di sitoplasma oleh protein penghambat yaitu I κ B, khususnya I κ B α . Aktivasi IKK kemudian akan memfosforilasi I κ B α untuk melepaskan NF-kB yang awalnya diasingkan oleh I κ B α . I κ B α yang terfosforilasi akan mengalami degradasi proteasome untuk mensintesis protein baru. NF-kB yang telah bebas dapat masuk ke dalam nukleus dan akan menginduksi ekspresi transkripsi berbagai gen sitokin pro-inflamasi. Adiposit yang meningkat akan melepaskan sitokin pro-inflamasi yang relatif tinggi di jaringan adiposa. Penumpukan Sel imun akan lebih meningkatkan NF-kB dengan memicu pelepasan sitokin pro-inflamasi. Produksi sitokin yang terus menerus ini akan menghasilkan siklus peradangan. Ketika tubuh terus-menerus harus merekrut lebih banyak sel kekebalan untuk melawan stress metabolik yang disebabkan oleh obesitas,

hasilnya akan menjadi peradangan tingkat rendah.

Pada penelitian ini dengan menggunakan tikus sebagai hewan uji yang diberi pakan lemak tinggi, diharapkan tikus tersebut mengalami obesitas. Dari 8 sampel yang dideteksi gen NF-kB terlihat 2 sampel yang positif terbentuk pita gen NF-kB, yaitu pada sampel 2 (kelompok negatif) dan sampel 3 (kelompok positif) sebelum pemberian isolat bakteri KPM2.

Pada Sampel 1 (kelompok normal) tidak terbentuk pita gen NF-kB, hal ini sesuai dengan perlakuan yang diberikan kepada tikus dengan hanya memberikan pakan normal. Pada sampel 4 (kelompok uji) tidak terbentuk pita gen NF-kB, hal ini tidak sesuai dengan perlakuan yang diberikan kepada tikus, yaitu dengan memberikan pakan lemak tinggi diharapkan terdapat pita gen NF-kB pada sampel 4 (kelompok uji). Faktor yang mempengaruhi tidak terbentuknya pita pada sampel 4 yaitu kondisi metabolisme tikus yang tidak bisa mengaktivasi NF-kB karena terdapatnya variasi biologis yang berbeda pada masing-masing hewan uji meskipun telah diberi perlakuan yang sama dengan kelompok negatif dan kelompok positif. Menurut Zulfahmidah dkk. (2021) terdapat enzim yang dikenal sebagai regulator utama sel dan metabolisme diseluruh tubuh, enzim tersebut adalah AMPK (*Adenosin Monophosphate Kinase*). AMPK berperan dalam regulasi nafsu makan, berat badan, dan metabolisme, sehingga wajar bila AMPK memiliki peran penting dalam perkembangan obesitas. AMPK dapat menghambat pensinyalan NF-kB dan TLR4. Kapasitas AMPK untuk menekan respon inflamasi dapat memiliki dampak yang signifikan pada kesehatan dan rentang

umur.

Pada sampel 5 (kelompok normal), sampel 6 (kelompok negatif), sampel 7 (kelompok positif) dan sampel 8 (kelompok uji) sesudah pemberian free cell dari isolat KPM2, tidak terbentuk pita gen NF-kB di keempat sampel tersebut. Pada penelitian ini diharapkan terbentuk pita gen NF-kB di sampel 2 (kelompok negatif), hal ini karena tikus pada sampel 2 (kelompok negatif) hanya diberikan Na-CMC yang seharusnya tidak memiliki pengaruh terhadap tikus. Hal ini diduga terjadi karena terdapatnya variasi biologis yang berbeda pada masing-masing hewan uji. Berdasarkan hasil penelitian ini, sampel 3 (kelompok positif) sebelum pemberian free cell dari isolat bakteri KPM2 dan sampel 7 (kelompok positif) sesudah pemberian free cell dari isolat bakteri KPM2 memperlihatkan pengaruh yang berarti hal ini sejalan dengan penelitian yang dilaporkan oleh Jin, dkk (2021) yang menyatakan bahwa orlistat mampu menghambat aktivasi NF-kB pada obesitas. Hal ini berbanding terbalik dengan hasil dari sampel 4 (kelompok uji) sebelum pemberian free cell dari isolat bakteri KPM2 dan 8 (kelompok uji) sesudah pemberian *free cell* dari isolat bakteri KPM2 yang tidak memperlihatkan pengaruh berarti karena tidak terbentuknya pita NF-kB pada sampel 4 (kelompok uji) sebelum pemberian free cell dari isolat bakteri KPM2.

Pita DNA dengan fragment 295 bp diduga adalah gen TLR4, hal ini dikarenakan fragmen pita ini sesuai dengan pernyataan Dermitzaki dkk. (2014) yang menyatakan bahwa TLR4 mempunyai fragment sebesar 295 bp pada tikus dengan urutan basa 5'-ACC AAT GCA TGG ATC AGA A-3' dan 5'-GTC TCC AGA GCC ACC AGA TT-3'. TLR4

merupakan gen imunitas bawaan yang berfungsi untuk memicu kaskade pensinyalan di dalam sel untuk menghasilkan respon inflamasi bawaan serta berkontribusi pada perkembangan kekebalan adaptif. Pada obesitas TLR4 berperan dalam inflamasi jaringan adiposa yang diinduksi obesitas serta metabolisme sistemik glukosa dan lipid *in vivo*. TLR4 diekspresikan oleh makrofag lebih banyak daripada adiposit. Respon inflamasi kronis yang diinduksi oleh interaksi antara adiposit dan makrofag lebih banyak dimediasi melalui jalur TLR4 makrofag (Wardhana, 2011). Menurut Susmiati (2019) TLR4 adalah bagian dari keluarga TLRs yang menginduksi respon proinflamasi terhadap patogen yang menyerang. TLR4 diaktifkan oleh lipopolisakarida, lipopolisakarida (LPS) merupakan komponen struktural penting dari dinding sel bakteri gram negatif yang bertindak sebagai trigger yang menghubungkan inflamasi sistemik untuk diet tinggi lemak. Hal ini dapat memungkinkan LPS untuk mengaktifkan TLR4 dan kemudian menginduksi NF- κ B.

Pada penelitian ini dengan menggunakan tikus sebagai hewan uji yang diberi pakan lemak tinggi, diharapkan tikus tersebut mengalami obesitas. Dari 8 sampel yang dideteksi gen TLR4 terlihat 2 sampel yang positif terbentuk pita gen TLR4, yaitu pada sampel 2 (kelompok negatif) dan sampel 3 (kelompok positif) sebelum pemberian isolat bakteri KPM2. Terbentuknya pita gen TLR4 sejalan dengan penelitian Prillya dkk. (2021) yaitu diet tinggi lemak pada tikus dapat meningkatkan ekspresi TLR4 yang dideteksi menggunakan metode PCR. Pada Sampel 1 (kelompok normal) tidak terbentuk pita gen TLR4, hal ini

sesuai dengan perlakuan yang diberikan kepada tikus dengan hanya memberikan pakan normal. Pada sampel 4 (kelompok uji) tidak terbentuk pita gen TLR4, hal ini tidak sesuai dengan perlakuan yang diberikan kepada tikus, yaitu dengan memberikan pakan lemak tinggi diharapkan terdapat pita gen TLR4 pada sampel 4 (kelompok uji). Faktor yang mempengaruhi tidak terbentuknya pita pada sampel 4 yaitu kondisi metabolisme tikus yang tidak bisa mengaktifasi TLR4 karena terdapatnya variasi biologis yang berbeda pada masing-masing hewan uji meskipun telah diberi perlakuan yang sama dengan kelompok negatif dan kelompok positif. Menurut Zulfahmidah dkk. (2021) terdapat enzim yang dikenal sebagai regulator utama sel dan metabolisme diseluruh tubuh, enzim tersebut adalah AMPK. AMPK (*Adenosin Monophosphate Kinase*) berperan dalam regulasi nafsu makan, berat badan, dan metabolisme, sehingga wajar bila AMPK memiliki peran penting dalam perkembangan obesitas. AMPK dapat menghambat pensinyalan NF- κ B dan TLR4. Kapasitas AMPK untuk menekan respon inflamasi dapat memiliki dampak yang signifikan pada kesehatan dan rentang umur.

Pada sampel 5 (kelompok normal), sampel 6 (kelompok negatif), sampel 7 (kelompok positif) dan sampel 8 (kelompok uji) sesudah pemberian free cell dari isolat KPM2, tidak terbentuk pita gen TLR4 di keempat sampel tersebut. Pada penelitian ini diharapkan terbentuk pita gen TLR4 di sampel 2 (kelompok negatif), hal ini karena tikus pada sampel 2 (kelompok negatif) hanya diberikan Na-CMC yang seharusnya tidak memiliki pengaruh terhadap tikus. Hal

ini diduga terjadi karena terdapatnya variasi biologis yang berbeda pada masing-masing hewan uji. Berdasarkan hasil penelitian ini, sampel 3 (kelompok positif) sebelum pemberian free cell dari isolat bakteri KPM2 dan sampel 7 (kelompok positif) sesudah pemberian free cell dari isolat bakteri KPM2 memperlihatkan pengaruh yang berarti hal ini sejalan dengan dengan penelitian yang dilaporkan oleh Jin, dkk (2021) yang menyatakan bahwa orlistat mampu menghambat aktivasi TLR4 pada obesitas. Hal ini berbanding terbalik dengan hasil dari sampel 4 (kelompok uji) sebelum pemberian *free cell* dari isolat bakteri KPM2 dan 8 (kelompok uji) sesudah pemberian free cell dari isolat bakteri KPM2 yang tidak memperlihatkan pengaruh berarti karena tidak terbentuknya pita TLR4 pada sampel 4 (kelompok uji) sebelum pemberian free cell dari isolat bakteri KPM2.

Selain pita DNA spesifik yang terbentuk, terdapat juga pita DNA non spesifik yang terbentuk. Terbentuknya pita DNA non spesifik dipengaruhi oleh suhu annealing, karena suhu annealing berperan pada proses penempelan primer pada template DNA. Suhu annealing yang terlalu tinggi menyebabkan primer tidak dapat menempel dengan baik pada template hal ini ditandai dengan semakin tipis band yang terbentuk, sedangkan suhu annealing yang rendah menyebabkan primer akan menempel pada situs penempelan yang tidak spesifik yang kemudian akan menyebabkan teraplikasinya fragmen lokus yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, pada hasil penelitian ini banyak ditemukan pita DNA non spesifik (Pertiwi dkk. 2015).

Selama pelaksanaan penelitian, terdapat beberapa kendala yang dialami,

diantaranya adalah pada tahap pemeliharaan beberapa tikus mengalami stress dikarenakan kondisi lingkungan yang panas, kurang bersih dan bising. Hal ini mempengaruhi nafsu makan dan juga kondisi metabolisme pada tikus. Selain itu, kendala yang terjadi pada saat visualisasi DNA menggunakan elektroforesis, hasil yang ditunjukkan terdapat adanya pita non spesifik, hal ini terjadi akibat pengaruh suhu annealing, karena suhu annealing berperan pada proses penempelan primer pada template DNA.

KESIMPULAN

Tidak terdapat gen NF- κ B dan TLR4 pada tikus diet tinggi lemak sebelum pemberian *free cell* dari bakteri simbion kulit pisang, ditandai dengan tidak terbentuknya pita pada gen target.

Tidak terdapat gen NF- κ B dan TLR4 pada tikus diet tinggi lemak sesudah pemberian *free cell* dari bakteri simbion kulit pisang ditandai dengan tidak terbentuknya pita pada gen target.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kepada :

1. Rektor Universitas Mandala Waluya
2. Kepala Laboratorium Farmakologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Mandala Waluya
3. Kepala Laboratorium Diagnostik Molekuler Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Mandala Waluya

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistik Sulawesi Tenggara. 2022 (Diakses Tanggal 5 Januari 2023)
Dewi, Kadek Evi D.P., Jamaluddin, A.W., dan Rell,

- Fedri. 2018. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Kulit Pisang Mas (*Musa acuminata* (AA Group)) Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Mencit (*Mus musculus*) Yang Diinduksi Aloksan. *As-Syifa* 10(2): 190-204
- Ikawati,S. 2011. Farmakoterapi Penyakit Sistem Saraf Pusat. Yogyakarta
- Jin, Boram., Kim, Hyun jung., Sim, Seo-Ah., Lee, Minho., and An, Hyojin. 2021. *Anti-Obesity Drug Orlistat Alleviates Western-Diet-Driven-Colitis-Associated Colon Cancer Via Inhibition Of STAT3 And NF-kB Mediated Signaling* 10(2060): 15-16
- Khiong, K., Adhika, O.A., dan Chakravitha, M. 2010. *Inflammation, Imunity, And Cancer: The Role Of Transcription Factors NFkB and STAT3*. *Majalah Kedokteran Indonesia* 60(8): 369-373.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Shin, S.C. 2017. *NFkB Signaling In Inflammation. Citation : Signal Transduction And Targeted Therapy* : 1-9
- Nurlaila, Z. 2002. Radiofarmaka Untuk Deteksi Inflamasi Dan Infeksi. *Jurnal Sains Dan Teknologi Nuklir Indonesia* 111(1): 15-30.
- Pertiwi, Ni Putu Dian., Mahardika, I.G.N.K, Watiniasih, Ni Luh. 2015. Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Pada Ikan Karang Anggota Famili Pseudochromidae (DOTTYBACK) Untuk Identifikasi Spesies Secara Molekuler. *Jurnal Biologi* 19(12): 1-5
- Sanchez, A.F., Santilan, E.M., Bautista, M., Soto, J.E., Gonzales, A.M., Chirino, C.E., et all. 2011. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *IJMS* 12(2): 17-32.
- Santoso, U., dan Nursandi, F. 2003. Metabolisme Sekunder Melalui Kultur Jaringan Tanaman. Edisi 1. UMM. Malang.
- Supriono, Pratomo, B., dan Praja, D.I. 2018. Pengaruh Kurkumin Terhadap Kadar NFKB Dan Derajat Fibrosis Hati Pada Tikus Fibrosis Hati. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia* 5(4): 174-182.
- Susmiati, 2019. Peran Mikroba Usus Dalam Perkembangan Obesitas. *Majalah Kedokteran Andalas* 42(1): 41-49
- Tan, R.X., and Zhou, W.X. 2001. Endophyte : A Rich Source Of Fungtional Metabolite. 1(18): 448-459.
- Ulinuha, Aulia. 2018. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Dari Kulit Pisang Kepok (*Musa balbisiana*) Sebagai Antibakteri Escherichia Coli Dan Staphylococcus Aureus. Skripsi. Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang
- Zulfahmidah., Fajriansyah., Makmum, Armanto., Rasfahyana. 2021. Hubungan Obesitas Dan Stress Oksidatif. *UMI Medical Journal* 6(1):64-65
- Jurnal Ilmiah Kesehatan Mandala Waluya (JIKMW) is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

