

STUDI IN SILICO INTERAKSI GEN *REG1B* DENGAN *GROWTH HORMON* (GH), *INSULINE LIKE GROWTH FACTOR* (IGF) DAN TIROID SEBAGAI PREDIKTOR KEJADIAN STUNTING

Yuniastuti A^{1*}, R. Susanti¹, Dewi M¹, Friska K², Cindy S², Anik M², Rizka K², Siti M²,
Ratih A.S³, Rihadatul A³, Afifah NA³

¹Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Negeri Semarang
Jl. Raya Sekaran Gunungpati Semarang 50229

²Mahasiswa Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Negeri Semarang
Jl. Raya Sekaran Gunungpati Semarang 50229

³Relawan Nutrimas, Dinas Kesehatan Kota Semarang
Jl Pandanaran No 79 Semarang 50249

*Email: ariyuniastuti@mail.unnes.ac.id

Abstrak

Saat ini penelitian bidang gizi dan kesehatan sudah mulai bergeser dari epidemiologi dan fisiologi ke biologi molekuler dan genetik. Stunting masih tetap menjadi masalah kesehatan global. Informasi mekanisme molekuler terjadinya stunting sangat penting diketahui untuk desain intervensi di masa yang akan datang. Gen *REG1* merupakan penanda adanya cedera pada usus dan dapat digunakan untuk memprediksi kegagalan pertumbuhan anak-anak di masa depan, namun mekanisme patogenesisnya belum banyak diketahui. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis hubungan gen *REG1* dengan Growth Hormon (GH), Insuline Like Growth Factor (IGF) dan Tiroid sebagai prediktor kejadian stunting. Interaksi Gen *REG1B* dengan GH, IGF dan tiroid menggunakan BIOVIA Discovery Studio 2020. Identifikasi lebih lanjut dari tiga dimensi struktur dan pengurutan struktur gen *REG1B* menggunakan Chimera 1.14 dan Notepad++. Untuk memastikan afinitas dan interaksi molekuler antara *REG1B* terhadap GH, IGF dan Tiroid. Simulasi docking protein-protein menggunakan PatchDock telah selesai. Hasil simulasi diverifikasi menggunakan BIOVIA Discovery Studio 2020. Berdasarkan hasil identifikasi struktur gen *REG1B*, ditemukan bahwa *REG1B* tidak memiliki interaksi dengan GH, IGF dan tiroid. Oleh karena itu, gen *REG1B* tidak dapat digunakan sebagai biomarker untuk prediktor kejadian stunting. Beberapa informasi yang diperoleh dari hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi dalam pengembangan kandidat untuk mencegah kejadian stunting.

Kata Kunci : gen *REG1B*, stunting, Growth Hormone, IGF

1. PENDAHULUAN

Penyakit menular adalah penyebab utama kematian pada anak-anak di bawah usia 5 tahun di seluruh dunia (Black dkk., 2020). Kekurangan gizi meningkatkan risiko infeksi seperti pneumonia dan diare, yang pada gilirannya meningkatkan risiko kekurangan gizi (Schlaudecker dkk., 2011). Infeksi kronis dan gizi yang tidak memadai pada anak usia dini penyebab stunting pada masa kanak-kanak, dan akibat negatif dari stunting dapat berlangsung hingga dewasa. Anak-anak stunting lebih mungkin tumbuh menjadi orang dewasa yang terhambat, dan juga lebih mungkin untuk ketidakmampuan belajar di masa dewasa. Kurang gizi saat dini masa kanak-kanak juga telah dikaitkan dengan hipertensi, resistensi insulin, dan dislipidemia selama masa dewasa (Stein dkk., 2006; Sawaya dkk., 2005). *Intrauterine Growth Restriction* (IUGR) pada janin atau pembatasan pertumbuhan intrauterin merupakan penyebab umum lainnya kejadian stunting pada masa kanak-kanak, dan ibu yang pendek diduga berhubungan dengan pembatasan pertumbuhan intrauterin dan peningkatan kematian perinatal (Dewey dan Begum, 2011).

Stunting adalah suatu kondisi dimana anak mengalami gangguan pertumbuhan, sehingga tinggi badan anak tidak sesuai dengan usianya, sebagai akibat dari masalah gizi kronis yaitu kekurangan asupan gizi dalam waktu yang lama. *Stunting* merupakan ancaman bagi bangsa karena kondisi gagal tumbuh pada anak balita akibat kekurangan gizi kronis terutama pada 1.000 hari pertama kehidupan ini dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan otak, sehingga berdampak negatif terhadap kecerdasan anak dan juga meningkatkan risiko anak untuk

terkena penyakit tidak menular, seperti diabetes mellitus, kanker, dan penyakit jantung koroner pada saat dewasa nantinya (Kemenkes, 2018).

World Bank pada 2017 melaporkan bahwa Indonesia adalah negara keempat di dunia dengan jumlah balita stunting tertinggi, hanya sedikit lebih rendah dibandingkan dengan India, Pakistan, dan Nigeria. Data prevalensi balita stunting yang dikumpulkan World Health Organization (WHO), Indonesia termasuk ke dalam negara ketiga dengan prevalensi tertinggi di Regional Asia Tenggara/South-East Asia Regional (SEAR)

Stunting masih menjadi masalah yang signifikan di seluruh dunia. Upaya pencegahan dan penanggulangan stunting telah banyak dilakukan, namun kasus stunting masih saja ditemukan. Lingkungan di dalam saluran pencernaan, utamanya usus merupakan faktor yang berkontribusi pada kejadian stunting. Pemahaman tentang patogenesis dan identifikasi anak-anak berisiko sangat penting untuk desain intervensi yang lebih efektif. Intervensi gizi di awal kehidupan (dalam 3 tahun pertama) dapat memiliki efek yang signifikan pada tinggi badan jangka panjang dan produktivitas ekonomi masa depan (Dewey dan Begum, 2011).

Salah satu pendekatan untuk pencegahan stunting adalah mengidentifikasi anak-anak yang berisiko tinggi mengalami stunting dan menargetkan intervensi untuk mereka. Biomarker dari sampel tinja merupakan cara noninvasif untuk menilai risiko gangguan pertumbuhan (Iqbal dkk., 2018). Regenerasi protein 1B (REG1B), terkait dengan perbaikan usus, adalah salah satu biomarker yang mungkin. Konsentrasi tinjanya telah terbukti mencerminkan peradangan usus yang merupakan kontributor utama stunting (Keel dkk., 2009; Ogawa dkk., 2013; Investigator, 2014; Kosek dan Investigator 2017; Peterson dkk., 2013). Sebuah studi kohort di Bangladesh menemukan bahwa feses Konsentrasi REG1B dikaitkan dengan kekurangan pertumbuhan di antara anak di bawah 2 tahun. Selain itu, asosiasi serupa ditemukan di antara anak-anak di Peru (Peterson dkk., 2013). Namun Liu dkk (2021) melaporkan bahwa konsentrasi REG1B tidak berhubungan dengan pertumbuhan fisik bayi dan anak-anak di pedesaan Malawi. Secara khusus, tidak ada hubungan konsentrasi REG1B dengan pencapaian ukuran tubuh dan perubahan ukuran tubuh.

Identifikasi anak dengan risiko kekurangan gizi perlu dilakukan agar intervensi dapat diintensifkan, sehingga perlu mengetahui biomarker noninvasif yang berperan dalam kejadian stunting. Oleh karena itu dilakukan penelitian untuk melihat mekanisme patogenesis stunting melalui pendekatan bioinformatika. Tujuannya adalah untuk melihat interaksi Gen *Reg1b* dengan *Growth Hormon (Gh)*, *Insuline Like Growth Factor (Igf)* dan *Tiroid* Sebagai Prediktor Kejadian Stunting.

2. METODE

Makromolekul yang digunakan dalam penelitian ini adalah REG1B yang disediakan oleh Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) dengan ID PDB 2GHV22 dan 6VW1,23 masing-masing. Persiapan ini dilakukan dengan menghilangkan molekul air dan native ligan menggunakan BIOVIA Discovery Studio 2020. Gen REG1B yang telah disiapkan kemudian tumpang tindih struktur tiga dimensi dengan representasi melalui struktur sekunder untuk dianalisis. Proses identifikasi dilakukan dengan menggunakan Chimera 1.14 25 dan BIOVIA Discovery Studio 2020. Protein-protein docking simulations were performed antara REG1B dengan GH, IGF dan tiroid. Jenis kompleks protein-protein yang berpotensi menjadi biomarker stunting antara lain adipokinesis (Ghrelin/GHRL, Leptin/LEP), Hormon pertumbuhan (FGF-21, IGF-1, IGFBP), Reseptor Hormon pertumbuhan dan adipokinesis (Ghrelin reseptor/GHSR), Sitokin (IL-6, TNF α , dan IFN γ), serta marker inflamasi sistemik (C-reactive protein/CRP) dengan pengelompokan default RMSD 4.0 dipilih. Representasi permukaan titik Connolly dari molekul menjadi komponen yang berbeda termasuk cembung, cekung, dan patch datar dihasilkan menggunakan algoritma PatchDock. Kandidat solusi teratas dioptimalkan, disempurnakan, dirombak, dan dipilih kembali antarmuka rantai samping.

Analisis String merupakan pangkalan data berbasis web (*web based*) yang mengumpulkan dan mengintegrasikan interaksi antar-protein, baik fisik (interaksi langsung) maupun fungsional (interaksi tidak langsung). Selanjutnya dilakukan analisis Cytoscape digunakan untuk menampilkan dan mengintegrasikan jaringan interaksi biomolekul menjadi suatu kerangka konseptual yang terpadu. Molekul biologi seperti protein atau senyawa digambarkan dengan *nodes*, sementara interaksi antar-molekul digambarkan sebagai garis penghubung (*edges*). Analisis

topologi untuk melihat parameter *Average shortest path length* (rata-rata jarak terpendek antara protein satu dengan protein lain), *Closeness centrality* (seberapa cepat informasi menyebar dari protein satu ke protein lainnya), *Degree* (indeks interaksi yang dimiliki suatu protein) dan *Betweenness centrality* (besar pengaruh protein satu dengan protein lainnya dalam jaringan interaksi protein). Algoritme mengubah orientasi relatif molekul dengan membatasi fleksibilitas pada rantai samping permukaan yang berinteraksi dan memungkinkan pergerakan benda-benda kecil-kaku. Hasil simulasi kemudian dianalisis visualisasi menggunakan BIOVIA Discovery Studio 2020.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Struktur reseptor makromolekul merupakan langkah pertama dalam mempelajari mekanisme kerja terjadinya stunting. Berdasarkan hasil penelitian Gen REG1B berhubungan dengan keterbatasan pertumbuhan dan menyebabkan stunting di masa depan. Dalam penelitian ini dilakukan identifikasi, evaluasi, dan eksplorasi gen REG1B untuk mengamati karakteristik struktur makromolekul mereka melalui studi in silico. Juga, pengamatan dilakukan terhadap interaksi molekuler yang terbentuk antara REG1B dengan GH, IGF dan tiroid. Gen REG1B makromolekul yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah disiapkan dengan menghilangkan molekul air dan asli ligan menggunakan BIOVIA Discovery Studio 2020. Persiapan makromolekul ini dibuat untuk memudahkan proses identifikasi pada tahap selanjutnya. Protein gen regenerasi 1b (REG1B) tinja diduga berhubungan dengan penurunan pertumbuhan masa kanak-kanak berikutnya. Gen regenerasi ini memiliki 4 subclass (I, II, III, dan IV), dan gen regenerasi 1a (REG1A) dan REG1B sangat homolog (Sanchez dkk., 2001). Diare masa kanak-kanak yang sering atau persisten mungkin menyebabkan malnutrisi.

3.1 Pengambilan Data Protein terkait *Stunting*

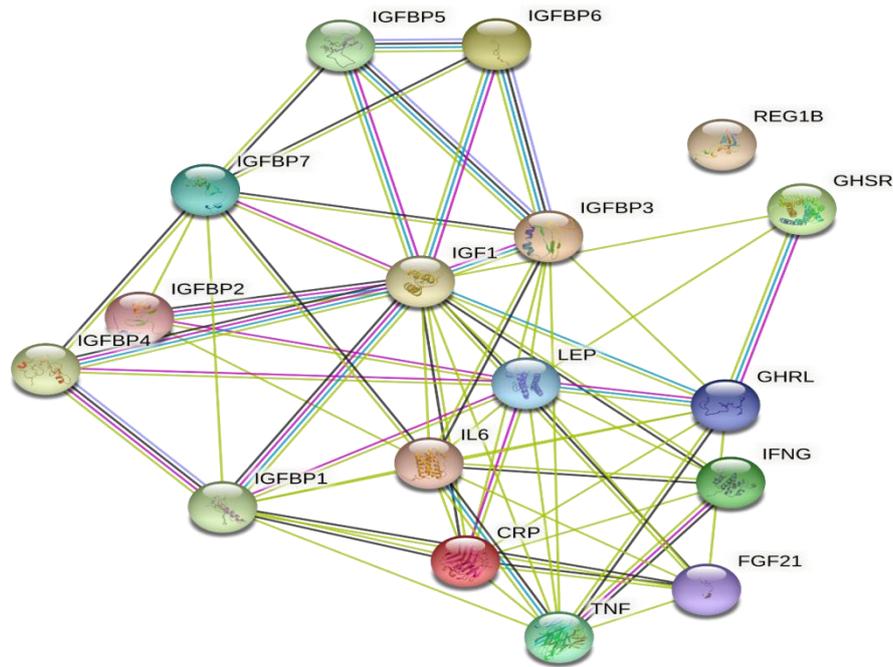
Basis data PubChem dan kurasi jurnal secara manual diperoleh sebanyak 10 protein yang berasosiasi dengan *stunting*, dan semua protein tersebut memiliki data interaksi pada basis data STRING. Hasil dari pengumpulan data protein dapat dilihat pada Tabel 1. Protein Target Biomarker *Stunting*

Tabel 1. Protein-protein yang berpotensi sebagai biomarker stunting

No	Protein	Gen
1	Leptin	LEP
2	Ghrelin (<i>Appetite-regulating hormone</i>)	GHRL
3	<i>Fibroblast growth factor 21</i>	FGF-21
4	<i>Insulin-like growth factor 1</i>	IGF1
5	<i>Insulin Like Growth Factor Binding Protein</i>	IGFBP
6	Reseptor Ghrelin	GHSR
7	Interleukin 6	IL-6
8	<i>Tumor necrosis factor-α</i>	TNF- α
9	<i>Interferon Gamma</i>	IFN- γ
10	C-reactive protein	CRP

3.2 Visualisasi, Analisis Topologi, Modular dan Fungsional Jejaring Interaksi Protein

Proses visualisasi sementara protein target dari data yang didapatkan menggunakan STRING. Garis-garis atau *edges* menggambarkan asosiasi protein-protein, sedangkan *nodes* mewakili protein yang berinteraksi. Node berwarna abu-abu mewakili node benih dan yang lainnya adalah node yang berinteraksi dengan node benih. Asosiasi interaksi protein-protein ini dimaksudkan untuk menjadi spesifik dan bermakna. Pada visualisasi pada sumber data (Gambar 1) menunjukkan bahwa semua jejaring terhubung dengan jejaring utama sehingga tidak diperlukannya proses penghapusan data duplikat dari jejaring yang tidak terhubung dengan jejaring utama yang nantinya akan mengakibatkan tereduksinya jumlah protein dan interaksi protein. Namun REG1B tidak terhubung dalam jejaring, protein REG1B terpisah dari jejaring.



Edges:

Edges represent protein-protein associations

associations are meant to be specific and meaningful, i.e. proteins jointly contribute to a shared function; this does not necessarily mean they are physically binding each other.

Known Interactions

- from curated databases
- experimentally determined

Predicted Interactions

- gene neighborhood
- gene fusions
- gene co-occurrence

Others

- textmining
- co-expression
- protein homology

Gambar 1. Visualisasi Raw Data Interaksi Protein pada STRING

Informasi PPI dari semua protein target diintegrasikan, divisualisasikan dan jaringan biologisnya dianalisis menggunakan Cytoscape. Analisis jejaring interaksi protein menggunakan analisis topologi, analisis modularitas dan analisis fungsional. Analisis topologi bertujuan untuk menentukan protein esensial dari jaringan protein berdasarkan beberapa parameter seperti *degree*, *betweenness centrality*, *closeness centrality*, dan *average shortest path length* yang memberikan analisis kuantitatif untuk mendapatkan informasi terkait jaringan protein berdasarkan interaksinya dengan protein lain. Analisis topologi tersebut dianalisis dengan aplikasi *Network Analyzer* yang diintegrasikan ke dalam Cytoscape (Khurana dkk., 2017). Hasil analisis jejaring menunjukkan bahwa tidak ada

interaksi antara gen REG1B dengan GH, IGF dan Hormon Tiroid, sehingga tidak dapat digunakan sebagai biomarker kejadian stunting.

Peterson dkk (2013) melakukan penelitian untuk menentukan hubungan konsentrasi protein regenerasi gen 1 (REG1) yang lebih tinggi dalam tinja di awal kehidupan dengan defisit pertumbuhan di kemudian hari. Protein REG1 sebelumnya diamati terlibat dalam pertumbuhan sel, perbaikan jaringan, dan regenerasi. Hipotesisnya bahwa konsentrasi protein REG1 yang lebih tinggi dalam tinja di awal kehidupan dapat memprediksi kejadian stunting di masa depan. Para penulis mengevaluasi hipotesis ini dengan menggunakan uji immunosorben terkait enzim tinja (ELISA) untuk menguji REG1B di antara kelompok kelahiran di dua negara, Bangladesh dan Peru. Dua ratus dua puluh dua anak dari Bangladesh dan 97 anak dari Peru diikuti sejak lahir hingga usia 24 bulan, dan pengukuran antropometri dilakukan setiap 3 bulan. Konsentrasi REG1B tinja secara signifikan diduga sebagai prediktor kejadian stunting mungkin berguna untuk memberikan intervensi dini untuk mencegah stunting pada anak berisiko. Keterlibatan REG1B juga konsisten dengan peran enteropati usus dalam fenomena stunting.

Hasil penelitian Yuniastuti dkk (2021) menunjukkan bahwa tidak ada hubungan antara gen REG1B dengan kejadian stunting. Hasil Penelitian ini sejalan dengan penelitian Liu et al (2021) yang menyatakan bahwa : dalam analisis cross-sectional, tidak terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara konsentrasi REG1B feses dan pencapaian skor TB/U, BB/U, BB/TB/ lingkar kepala dan lingkar lengan , pada usia berapa pun ($P > 0,05$). Lingkar kepala pada usia 6 bulan terdapat hubungan negatif yang signifikan secara statistik, meskipun lemah, dan hubungan positif pada 30 bulan ($P = 0,007$ dan $0,028$) Tidak ada hubungan yang signifikan secara statistik antara konsentrasi REG1B tinja pada usia 6 atau 18 bulan dengan TB/U, BB/U, BB/TB/ lingkar kepala dan lingkar lengan. Konsentrasi REG1B feses pada usia 6 atau 18 bulan tidak dapat memprediksi pertumbuhan anak pada 6 bulan berikutnya. Analisis pengukuran berulang menunjukkan hanya sedikit hubungan antara konsentrasi REG1B tinja dan pengukuran antropometrik mereka.

REG1B adalah salah satu dari beberapa biomarker potensial untuk peradangan dan disfungsi usus. Biomarker lain yang sering dilaporkan termasuk calprotectin, neopterin, alpha-1-antitrypsin dan myeloperoxidase (Kosek dkk., 2014). Sedangkan konsentrasi REG1B diyakini menunjukkan perbaikan dan regenerasi usus, calprotectin, neopterin dan myeloperoxidase mengukur sebagian besar peradangan usus dan alpha-1-antitrypsin mencerminkan peningkatan permeabilitas usus (Colston dkk., 2017).

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian *in silico* menunjukkan bahwa gen REG1B tidak memiliki hubungan dengan kejadian stunting. Dengan demikian, temuan penelitian dengan pendekatan bioinformatika ini menyimpulkan bahwa gen REG1B tidak dapat digunakan sebagai biomarker yang akan memprediksi pertumbuhan bayi dan prediktor kejadian stunting. Beberapa informasi dari penelitian ini dapat digunakan dalam pengembangan senyawa enhancer yang bertindak sebagai pencegahan kejadian Stunting.

DAFTAR PUSTAKA

- Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, Jha P, Campbell H, Walker CF, Cibulski R, et al. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systemic analysis. *Lancet* 375:1969–87.
- Colston JM, Penataro Yori P, Colantuoni E et al. (2017). A methodologic framework for modeling and assessing biomarkers of environmental enteropathy as predictors of growth in infants: An example from a Peruvian birth cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 106: 245–55
- Dewey KG, Begum K. (2011). Long-term consequences of stunting in early life. *Matern Child Nutr* 7(suppl 3):5–18.
- Iqbal NT, Sadiq K, Syed S et al. (2018). Promising biomarkers of environmental enteric dysfunction: A prospective cohort study in Pakistani children. *Sci. Rep.* 8: 2966.
- Investigators M-EN. (2014). The MAL-ED study: A multinational and multidisciplinary approach to understand the relationship between enteric pathogens, malnutrition, gut physiology,

- physical growth, cognitive development, and immune responses in infants and children up to 2 years of age in resource-poor environments. *Clin. Infect. Dis.* 59: S193–206.
- Keel M, Harter L, Reding T et al (2009).. Pancreatic stone protein is highly increased during posttraumatic sepsis and activates neutrophil granulocytes. *Crit. Care Med.* 37: 1642–8.
- Kosek M, Guerrant RL, Kang G et al. (2014). Assessment of environmental enteropathy in the MAL-ED cohort study: Theoretical and analytic framework. *Clin. Infect. Dis.* 59: S239–47.
- Kosek MN, Investigators M-EN. (2017). Causal pathways from enteropathogens to environmental enteropathy: Findings from the MAL-ED birth cohort study. *EBioMedicine* 18: 109–17.
- Khurana, R., Ranches, G., Schafferer, S., Lukasser, M., Rudnicki, M., Mayer, G., et al. (2017). Identification of urinary exosomal noncoding RNAs as novel biomarkers in chronic kidney disease. *RNA* 23, 142–152.
- Ogawa H, Fukushima K, Naito H et al. (2003). Increased expression of HIP/- PAP and regenerating gene III in human inflammatory bowel disease and a murine bacterial reconstitution model. *Inflamm. Bowel Dis.* 9: 162–70.
- Peterson KM, Buss J, Easley R et al. (2013). REG1B as a predictor of childhood stunting in Bangladesh and Peru. *Am. J. Clin. Nutr.* 97: 1129–33.
- Sanchez D, Figarella C, Marchand-Pinatel S, Bruneau N, Guy-Crotte O. (2001). Preferential expression of reg I beta gene in human adult pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 284:729–37.
- Sawaya AL, Sesso R, Floreˆncio TM, Fernandes MT, Martins PA. (2005). Associatio between chronic undernutrition and hypertension. *Matern Child Nutr* 1:155–63.
- Schlaudecker EP, Steinhoff MC, Moore SR. (2011). Interactions of diarrhea, pneumonia, and malnutrition in childhood: recent evidence from developing countries. *Curr Opin Infect Dis* 24:496–502.
- Stein AD, Wang M, Ramirez-Zea M, Flores R, Grajeda R, Melgar P, Ramakrishnan U, Martorell R. (2006). Exposure to a nutrition supplementation intervention in early childhood and risk factors for cardiovascular disease in adulthood: evidence from Guatemala. *Am J Epidemiol* 164:1160–70.