

Deteksi Metilasi Gen IGF2/H19 Pada DNA Sel Darah Tepi Anak *Stunting* Usia 3-5 tahun

Detection of methylated gene IGF2/H19 in peripheral blood of stunted children age 3-5 years old

Ahmad Rusdan Handoyo Utomo¹, Dian Widiyanti²,
Intan Razari³, Harliansyah⁴, Syukrini Bahri⁵

^{1,3,4} Sekolah Pascasarjana Program Studi Biomedis,
Universitas YARSI, Indonesia;

^{2,5} Fakultas Kedokteran, Universitas YARSI, Indonesia

*Email Korespondensi: ahmad.rusdan@yarsi.ac.id

Kata kunci: *Stunting*, metilasi DNA, gen IGF2

Keywords: *Stunting*, DNA methylation, IGF2 gene

Poltekkes Kemenkes Kendari, Indonesia

ISSN : 2085-0840

ISSN-e : 2622-5905

Periodicity: Bianual vol. 16 no. 1 2024

jurnaldanhakcipta@poltekkes-kdi.ac.id

Received : 08 September 2023

Accepted : 30 April 2024

Funding sources: Direktorat Jenderal DIKTIRISTEK

DOI : 10.36990/hijp.v16i1.1123

URL : <https://myjurnal.poltekkes->

[kdi.ac.id/index.php/hijp/article/view/1123](https://myjurnal.poltekkes-kdi.ac.id/index.php/hijp/article/view/1123)

Contract number: 0536/E5/PG.02.00/2023

Ringkasan: **Latar Belakang:** *Stunting* dengan prevalensi 24% pada anak Indonesia berkaitan dengan kekurangan donor metil yang mengatur ekspresi gen pertumbuhan melalui metilasi DNA gen IGF2. **Tujuan:** Mengevaluasi perbedaan metilasi DNA gen IGF2 pada anak *stunting* sebagai penanda biologis. **Metode:** Studi *case-control retrospektif* melibatkan 46 anak usia 3-5 tahun (23 *stunting*, 23 normal) di Pandeglang, Banten. DNA darah tepi dianalisis menggunakan *Methylation Specific PCR* dengan kit CpG WIZ H19-IGF2. Analisis statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. **Hasil:** Metilasi DNA gen IGF2 lebih tinggi pada anak *stunting* (median 22% vs 17,83%, $p>0,05$) namun tidak bermakna statistik. Metilasi bermakna lebih tinggi pada anak laki-laki (median 28,68% vs 14,80%, $p=0,04$). **Simpulan:** Metilasi DNA gen IGF2 berpotensi menjadi penanda biologis *stunting*, terutama pada anak laki-laki. **Saran:** Diperlukan penelitian lanjutan dengan sampel lebih besar untuk mengeksplorasi mekanisme molekuler *stunting*.

Abstrack : Background: *Stunting* with a prevalence of 24% in Indonesian children is related to a deficiency of methyl donors that regulate the expression of growth genes through DNA methylation of the IGF2 gene. **Objective:** To evaluate differences in DNA methylation of the IGF2 gene in stunted children as a biological marker. **Methods:** A retrospective case-control study involved 46 children aged 3-5 years (23 stunted, 23 normal) in Pandeglang, Banten. Edge blood DNA was analyzed using *Methylation Specific PCR* with a WIZ H19-IGF2 CpG kit. Statistical analysis using the *Kruskal-Wallis* test. **Results:** DNA methylation of IGF2 gene was higher in stunted children (median 22% vs 17.83%, $p>0.05$) but not statistically significant. Methylation was significantly higher in boys (median 28.68% vs 14.80%, $p=0.04$). **Conclusion:** DNA methylation of the IGF2 gene has the potential to be a biological marker of *stunting*, especially in boys. **Suggestion:** Further

research with larger samples is needed to explore the molecular mechanisms of stunting.

PENDAHULUAN

Stunting atau tinggi badan anak tidak sesuai umur masih merupakan tantangan kesehatan di Indonesia. Di Indonesia prevalensi stunting mencapai 24% pada anak usia dibawah 2 tahun (Laksono et al., 2022). Kondisi ini umumnya disebabkan oleh kekurangan gizi kronis, infeksi berulang, dan stimulasi psikososial yang tidak memadai selama seribu hari pertama kehidupan, sehingga berdampak pada fungsi kognitif, performa pendidikan, dan produktivitas di masa dewasa (Siregar & Gurning, 2023). Untuk mempelajari mekanisme biologi molekuler perlu dikembangkan metode deteksi metilasi yang mudah dilakukan di negara berkembang dimana stunting masih merupakan masalah nasional. Keberadaan stunting adalah indikasi asupan gizi yang kurang secara kronis yang berdampak kepada keterlambatan pertumbuhan, kecerdasan, dan kerentanan mengalami penyakit seperti infeksi dan obesitas. Meskipun kekurangan gizi pada 1000 hari pertama adalah salah satu faktor yang sudah diketahui luas, mekanisme terjadinya stunting akibat malnutrisi kronis masih belum banyak diketahui (de Onis & Branca, 2016).

Dalam proses pertumbuhan janin dalam kandungan, ekspresi gen yang bertanggungjawab terhadap pertumbuhan sangat tergantung dari jumlah asupan nutrisi mikro seperti kandungan donor metil. Donor metil yang ditemukan dalam asam folat misalnya diperlukan dalam upaya janin melakukan regulasi ekspresi gen yang dikenal dengan proses epigenetic (Ramos-Lopez et al., 2019). Donor metil akan di inkorporasi ke dalam susunan DNA janin dan akan mempengaruhi regulasi atau tingkat ekspresi gen pertumbuhan. Ekspresi gen IGF2 atau *Insulin Growth Factor 2* ditengari berperan dalam pertumbuhan. Metilasi pada situs DNA yang menyandi IGF2 pada lokus DMR (differential methylated region) bisa mengatur tingkat ekspresi gen IGFR2 (Bouwland-Both et al., 2013). Beberapa studi menunjukkan bahwa tingkat asupan bisa mempengaruhi metilasi pada IGF2 seperti studi kelaparan di Belanda (Tobi et al., 2012; Vaiserman & Lushchak, 2021), dan Cina (Shen et al., 2019).

Hingga kini belum diketahui hubungan kausalitas antara metilasi DNA dengan stunting. Apabila hubungan antara metilasi dengan stunting bisa dievaluasi secara mudah maka upaya pencegahan stunting bisa lebih presisi karena metilasi DNA erat hubungannya dengan asupan yang bisa diperbaiki dengan intervensi nutrisi. Tujuan penelitian ini, Untuk mengevaluasi hubungan antara metilasi DNA pada gen IGF2 yang berfungsi dalam pertumbuhan, kami melakukan studi pendahuluan dengan mendeteksi tingkat metilasi pada DNA darah dari kelompok anak normal dan anak stunting dibandingkan dengan menggunakan metode MSP (*Methylation Specific PCR*) (Tedjokusumo et al., 2021). Hingga kini belum ada studi metilasi DNA IGF2 di Indonesia dalam konteks stunting.

METODE

Jenis Penelitian

Desain penelitian ini adalah *preliminary study case-control retrospective* dari kohort penelitian sebelumnya di desa lokus stunting Pandeglang Banten (Suroño et al., 2021) dan telah mendapatkan persetujuan dari kaji etik Universitas YARSI No. 004/KEP-UY/BIA/I/2020.

Lokasi dan Waktu Penelitian

Proses ekstraksi DNA, analisa metilasi DNA dilakukan di Universitas YARSI di tahun 2023.

Pengumpulan Data

DNA dari darah anak normal (N=23) dan stunting (N=23) diekstraksi dan diperlakukan konversi bisulfit sebelum dilakukan MSP (*methylation specific PCR*). Setelah konversi bisulfit, DNA diamplifikasi dengan primer paternal dan primer maternal sesuai instruksi dari kit CpG WIZ H19-IGF2 amplification kit (Merck Milipore, USA) dengan *thermal cycler MyGo*. Data persentase metilasi dihitung dengan rumus kuantifikasi citra produk PCR primer paternal dibagi dengan total kuantifikasi citra produk PCR primer paternal dan produk PCR primer maternal sebagaimana yang dilakukan sebelumnya (Tedjokusumo et al., 2021).

Pengolahan dan Analisis Data

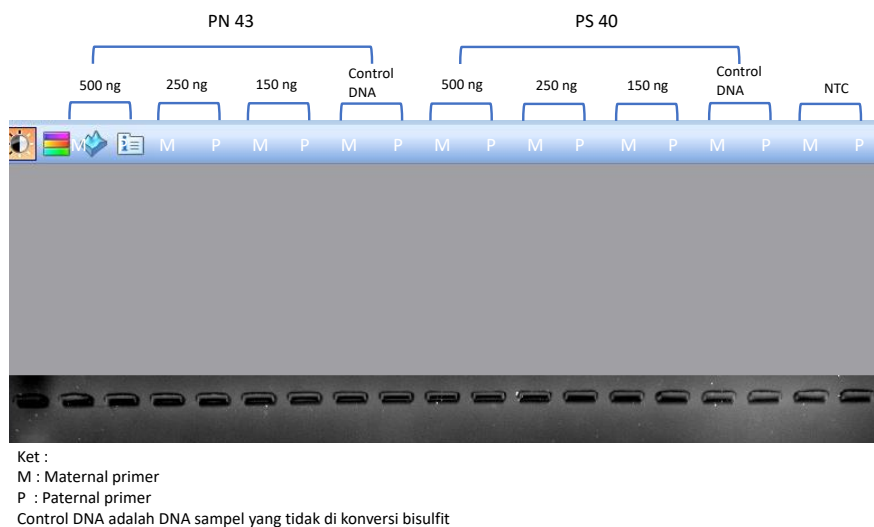
Sebelum diolah lebih lanjut, data persentase metilasi IGF2 dicek normalitasnya. Karena distribusi data persentase metilasi tidak normal, maka perbandingan persentase metilasi IGF2 antar variabel menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Nilai P kurang dari 0,05 berarti bermakna secara statistik.

HASIL

Tabel 1. Demografi anak yang diperiksa

Variabel	Normal (N=23)	Stunting (N=23)
Jenis Kelamin		
Laki-laki	15	15
Perempuan	8	8
Rentang usia bulan	36-67	35-60

Terlihat di Tabel 1, tidak ada perbedaan bermakna jumlah atau proporsi jenis kelamin dan rentang usia antara kelompok anak normal dan anak stunting. Amplifikasi PCR menggunakan primer paternal (P untuk deteksi sekuen yang termetilasi) dan primer maternal (M untuk deteksi sekuen yang tidak termetilasi) berhasil dilakukan seperti yang terlihat di Grafik 1. Citra dari produk PCR primer paternal dan primer maternal dikuantifikasi untuk mendapatkan persentase metilasi yang terangkum di Tabel 2.



Grafik 1. Produk PCR pada metilasi alel paternal (P) dan maternal (M) Gen IGF2 pada kelompok anak normal (PN) dan anak *stunting* (PS)

Tabel 2. Persentase Metilasi DNA Gen IGF2 pada kelompok anak stunting dan normal

Variabel	Rerata	SD	Median	IQR25%	IQR75%	Nilai P
Status						
Normal	21,50%	4,60%	17,83%	6,80%	24,30%	>0,05
<i>Stunting</i>	26,16%	5,80%	22,00%	11,70%	39,50%	
Jenis Kelamin						
Laki-laki	28,68%	5,15%	22,94%	13,50%	34,50%	0,04
Perempuan	14,80%	3,79%	12,84%	1,90%	22%	

* *Uji Kruskal-Wallis persentase metilasi DNA antara kelompok anak normal dan kelompok stunting, Nilai P Sig (2-tailed) = $\leq 0,05$; IQR interquartile range*

Berdasarkan Tabel 2, nilai median metilasi DNA pada gen IGF2 ditemukan sebesar 22% di DNA darah anak stunting sedangkan pada anak normal median metilasinya 17,83%, nilai ($p > 0,05$) dimana perbedaan tidak bermakna secara statistik. Menariknya, metilasi DNA IGF2 ditemukan lebih tinggi pada anak laki-laki dibanding perempuan yang bermakna secara statistik (median 28,68% vs 14,80%, nilai $p 0,04$).

PEMBAHASAN

Data pemeriksaan metilasi gen IGF2 menunjukkan persentase metilasi yang lebih tinggi pada kelompok anak stunting daripada anak normal meskipun tidak bermakna secara statistik. Pengaturan ekspresi gen IGF2 melalui proses metilasi cukup kompleks karena lokasi sekuen DNA yang termetilasi berada di belakang gen IGF2 yaitu di lokasi sekuen dari gen H19. Di masa awal pertumbuhan embrio, sekuen gen H19 di alel IGF2 maternal tidak mengalami metilasi sehingga lokasi tersebut bisa diikat oleh protein insulator CTCF (Yang et al., 2003). Pengikatan sekuen yang tidak termetilasi oleh CTCF menghambat proses ekspresi gen IGF2. Akibatnya gen IGF2 tidak diekspresikan oleh alel maternal. Namun, ekspresi gen IGF2 berasal dari alel paternal yang termetilasi. Metilasi pada alel paternal membuat protein CTCF tidak bisa mengikat sekuen pengaturan sehingga IGF2 bisa diekspresikan oleh alel paternal.

Dampak peningkatan metilasi pada IGF2 ini terhadap pertumbuhan masih kurang jelas terutama kaitannya dengan stunting. Ibu hamil yang mengalami kelaparan baik akibat perang seperti di Belanda maupun gejolak sosial seperti Cina memberikan hasil yang bertolak belakang. Metilasi DNA gen IGF2 cenderung menurun pada mereka yang mengalami kelaparan di Belanda, namun meningkat di Cina (Shen et al., 2019). Sementara itu studi metilasi DNA pada gen IGF2 yang berkaitan dengan pertumbuhan masih jarang dilakukan (Bouwland-Both et al., 2013), apalagi asosiasinya dengan stunting belum dilakukan. Data metilasi pada anak stunting yang ditemukan di studi ini perlu dielaborasi lebih lanjut.

Persentase metilasi DNA gen IGF2 juga ditemukan lebih tinggi pada anak laki-laki dibandingkan perempuan. Meskipun belum diketahui secara pasti dampak peningkatan metilasi IGF2 pada anak laki-laki, publikasi sebelumnya menunjukkan bahwa anak laki-laki memiliki tingkat metilasi secara umum lebih tinggi daripada perempuan (Taylor et al., 2020) dan juga lebih berisiko untuk mengalami stunting (Iqbal et al., 2019).

KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa metilasi DNA gen IGF2 cenderung lebih tinggi pada anak stunting dibandingkan anak normal, meskipun perbedaan tidak bermakna secara statistik. Temuan bermakna menunjukkan metilasi DNA gen IGF2 lebih tinggi pada anak laki-laki dibanding perempuan, yang konsisten dengan tingginya risiko stunting pada anak laki-laki. Hasil ini mengindikasikan bahwa metilasi DNA gen IGF2 berpotensi menjadi penanda biologis yang menjanjikan untuk deteksi dini dan pemahaman mekanisme molekuler stunting.

Perlu studi lanjutan untuk menguji asosiasi antara asupan tipe nutrisi dengan tingkat metilasi gen IGF2 atau gen yang lain yang bisa diteliti dengan metode nextgeneration sequencing (NGS). Penelitian di Gambia menggunakan sel plasenta menemukan beberapa gen yang termetilasi dan berasosiasi dengan perubahan berat badan maupun panjang badan (Quilter et al., 2021). Hanya saja penelitian tersebut belum menjelaskan adanya asosiasi yang jelas antara perbedaan tingkat metilasi beberapa gen tersebut dengan stunting. Alternatifnya, pemeriksaan methylation dengan metode methylation microarray Infinium juga bisa dilakukan sebagaimana laporan sebelumnya untuk menemukan metilasi yang berasosiasi dengan fungsi kognitif akibat malnutrisi.

REKOMENDASI

Penelitian selanjutnya hendaknya menggunakan sampel yang lebih besar dengan statistical power yang memadai untuk mendeteksi perbedaan bermakna metilasi DNA antara anak stunting dan normal. Diperlukan pengembangan studi longitudinal untuk mengevaluasi hubungan kausal antara asupan nutrisi spesifik, tingkat metilasi gen IGF2, dan kejadian stunting. Selain itu, perlu dilakukan eksplorasi lebih mendalam terhadap perbedaan metilasi berdasarkan jenis kelamin untuk memahami mekanisme kerentanan anak laki-laki terhadap stunting.

PERNYATAAN

Ucapan Terimakasih

Terima kasih kepada para relawan orang tua dari anak-anak yang berkenan untuk diperiksa penanda biologis dalam penelitian stunting, dan juga kepada para kader di posyandu, serta kepada staf dinas Kesehatan Pandeglang atas dukungan terhadap penelitian ini.

Pendanaan

Hibah Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, Dan Teknologi Dosen Pemula Dikti Nomor 0536/E5/PG.02.00/2023

Kontribusi Setiap Penulis

Ahmad Rusdan Handoyo Utomo melakukan perancangan penelitian, Analisa hasil, penulisan manuskrip; Dian Widiyanti melakukan pengurusan kaji etik, perekrutan subyek dan mendapatkan persetujuan dari orang tua setelah penjelasan (*informed consent*); Intan Razari melakukan pemeriksaan metilasi PCR; Harliansyah melakukan kajian literatur terkait stunting dan hormone IGF2; Syukrini

Bahri melakukan pengambilan darah dan transportasi dari Pandeglang ke laboratorium Universitas YARSI

Pernyataan Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bouwland-Both, M. I., Van Mil, N. H., Stolk, L., Eilers, P. H. C., Verbiest, M. M. P. J., Heijmans, B. T., Tiemeier, H., Hofman, A., Steegers, E. A. P., Jaddoe, V. W. V., & Steegers-Theunissen, R. P. M. (2013). DNA methylation of IGF2DMR and H19 is associated with fetal and infant growth: The generation R study. *PLoS ONE*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081731>
- de Onis, M., & Branca, F. (2016). Childhood stunting: A global perspective. In *Maternal and Child Nutrition* (Vol. 12, pp. 12–26). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/mcn.12231>
- Iqbal, M. S., Rahman, S., Haque, M. A., Bhuyan, M. J., Faruque, A. S. G., & Ahmed, T. (2019). Lower intakes of protein, carbohydrate, and energy are associated with increased global DNA methylation in 2- to 3-year-old urban slum children in Bangladesh. *Maternal and Child Nutrition*, *15*(3). <https://doi.org/10.1111/mcn.12815>
- Laksono, A. D., Wulandari, R. D., Amaliah, N., & Wisnuwardani, R. W. (2022). Stunting among children under two years in Indonesia: Does maternal education matter? *PLoS ONE*, *17*(7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271509>
- Peter, C. J., Fischer, L. K., Kundakovic, M., Garg, P., Jakovcevski, M., Dincer, A., Amaral, A. C., Ginns, E. I., Galdzicka, M., Bryce, C. P., Ratner, C., Waber, D. P., Mokler, D., Medford, G., Champagne, F. A., Rosene, D. L., McGaughy, J. A., Sharp, A. J., Galler, J. R., & Akbarian, S. (2016). DNA Methylation Signatures of Early Childhood Malnutrition Associated With Impairments in Attention and Cognition. *Biological Psychiatry*, *80*(10), 765–774. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.03.2100>
- Quilter, C. R., Harvey, K. M., Bauer, J., Skinner, B. M., Gomez, M., Shrivastava, M., Doel, A. M., Drammeh, S., Dunger, D. B., Moore, S. E., Ong, K. K., Prentice, A. M., Bernstein, R. M., Sargent, C. A., & Affara, N. A. (2021). Identification of methylation changes associated with positive and negative growth deviance in Gambian infants using a targeted methyl sequencing approach of genomic DNA. *FASEB BioAdvances*, *3*(4), 205–230. <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00101>
- Ramos-Lopez, O., Riezu-Boj, J. I., Milagro, F. I., & Martinez, J. A. (2019). Epigenetics of undernutrition. In *Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics* (Vol. 1, pp. 457–481). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55530-0_24
- Shen, L., Li, C., Wang, Z., Zhang, R., Shen, Y., Miles, T., Wei, J., & Zou, Z. (2019). Early-life exposure to severe famine is associated with higher methylation level in the IGF2 gene and higher total cholesterol in late adulthood: The Genomic Research of the Chinese Famine (GRECF) study. *Clinical Epigenetics*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0676-3>
- Surono, I. S., Widiyanti, D., Kusumo, P. D., & Venema, K. (2021). Gut microbiota profile of Indonesian stunted children and children with normal nutritional status. *PLoS ONE*, *16*(1 January). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245399>

- Siregar, M. U., & Gurning, F. P. (2023). Hubungan antara Pengetahuan dan Sikap Ibu dengan Kejadian Stunting di Desa Nagasaribu. *Health Information : Jurnal Penelitian*, 15(1), e998. Retrieved from <https://myjurnal.poltekkes-kdi.ac.id/index.php/hijp/article/view/998>
- Taylor, R. M., Smith, R., Collins, C. E., Mossman, D., Wong-Brown, M. W., Chan, E. C., Evans, T. J., Attia, J. R., Buckley, N., Drysdale, K., Smith, T., Butler, T., & Hure, A. J. (2020). Global DNA methylation and cognitive and behavioral outcomes at 4 years of age: A cross-sectional study. *Brain and Behavior*, 10(4). <https://doi.org/10.1002/brb3.1579>
- Tedjokusumo, V. L. I., Chandra, S. P., Surjadjaja, E., Artadana, I. B. M., & Putra, S. E. D. (2021). Methylation analysis of Igf2 / H19 Imprinting Control Region (ICR) in Type II Diabetes Mellitus induced mice using Methylation-Specific PCR. *Journal of Physics: Conference Series*, 1882(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1882/1/012098>
- Tobi, E. W., Slagboom, P. E., van Dongen, J., Kremer, D., Stein, A. D., Putter, H., Heijmans, B. T., & Lumey, L. H. (2012). Prenatal famine and genetic variation are independently and additively associated with dna methylation at regulatory loci within IGF2/H19. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037933>
- Vaiserman, A., & Lushchak, O. (2021). Prenatal famine exposure and adult health outcomes: an epigenetic link. In *Environmental Epigenetics* (Vol. 7, Issue 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/eep/dvab013>
- Yang, Y., Hu, J. F., Ulaner, G. A., Li, T., Yao, X., Vu, T. H., & Hoffman, A. R. (2003). Epigenetic Regulation of Igf2/H19 Imprinting at CTCF Insulator Binding Sites. *Journal of Cellular Biochemistry*, 90(5), 1038–1055. <https://doi.org/10.1002/jcb.10684>