

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit dari 10 besar penyebab kematian di dunia sehingga harus diwaspadai dan diberi perhatian khusus. Penyakit ini tergolong menular dan bersifat infeksius. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan penyebab dari tuberkulosis yang menyebar melalui udara misalnya dari droplet batuk penderita tuberkulosis. Penyakit ini paling sering mengenai organ pernafasan bagian bawah dan dapat mengenai organ lain (TB ekstra paru).¹

Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2021 dilaporkan adanya 10,6 juta orang menderita TB. Indonesia berada di urutan kedua peningkatan kasus TB tertinggi di dunia setelah India. Terdapat 443.325 kasus TB pada tahun 2021 di Indonesia dan menyumbang 9,2% total keseluruhan terinfeksi TB paru diseluruh dunia.² Angka kematian yang disebabkan oleh TB dengan HIV negatif terdapat sekitar 1,3 juta pada tahun 2017 dan terdapat sekitar 300.000 kematian yang disebabkan oleh TB dengan HIV positif.³ Pada tahun 2021 angka kematian yang disebabkan oleh TB paru sebanyak 15.186 kematian.² Melihat data kasus TB yang semakin meningkat dan besarnya kasus kematian disebabkan oleh TB maka diperlukan langkah preventif TB ditengah-tengah masyarakat khususnya di Indonesia.

Seseorang dapat lebih rentan terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* tergantung dari faktor lingkungan, agen, dan host.⁴ Tuberkulosis sering dikaitkan dengan vitamin D dalam meningkatkan imunitas tubuh melawan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.⁵ Vitamin D dilaporkan mempunyai peran penting terhadap imunitas host melawan infeksi TB. Bahkan jika terjadi hipovitaminosis D menghasilkan kekebalan terhadap *Mycobacterium tuberculosis* yang lebih rendah.⁴ Vitamin D jika berikatan dengan reseptor vitamin D di dalam sel

menginduksi pelepasan peptide antimikroba seperti cathelicidin untuk mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis*. Gen reseptor vitamin D merupakan faktor transkripsi yang berfungsi dalam mengatur respon imunologi tersebut.^{4,6,7}

Kerentanan terinfeksi TB dapat disebabkan karena epigenetik, yaitu adanya variasi genetik tanpa perubahan urutan DNA.^{8,9,10} Perubahan epigenetik ini dapat dimediasi oleh DNA methyltransferase (DNMT).⁹ Mekanisme ini mempengaruhi perubahan konformasi dengan penambahan gugus metil (CH₃) dari S-adenosyl methionine (SAM) ke residu sitosin (C) dari urutan CpG yang ada dalam genom.¹⁰ Metilasi DNA terjadi pada sel imun menyebabkan adanya perubahan struktur kromatin yang menghambat sistem kekebalan.¹¹ Metilasi DNA mengatur ekspresi gen reseptor vitamin D, yang akan mempengaruhi proses eliminasi *Mycobacterium tuberculosis*.⁸

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa metilasi gen reseptor vitamin D merupakan salah satu penyebab kerentanan seseorang terhadap TB. Namun, penelitian tentang metilasi gen reseptor vitamin D masih sangat terbatas. Semakin banyaknya peningkatan kasus TB setiap tahunnya khususnya di Indonesia, maka diperlukannya penelitian lebih lanjut mengenai peran metilasi gen reseptor vitamin D pada tingkat kejadian TB.¹²

Penelitian yang dilakukan oleh Ming Wang, dkk, mendapatkan bahwa *unmethylated* gen reseptor vitamin D tidak mengakibatkan perubahan gen reseptor vitamin D sehingga tidak mempengaruhi kerentanan terhadap TB.⁴ Hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Junli Li, dkk, yang menyatakan bahwa motif CpG yang tidak dimetilasi dapat bertindak sebagai substansi yang memperkuat dan memodulasi respon imun terhadap antigen dalam mengatur dan mengaktifkan respons Th1, terkait dengan produksi sitokin pro-inflamasi, dan mendukung pematangan APC pada manusia.¹³

Penelitian tentang *unmethylated* gen reseptor vitamin D pada TB masih sangat terbatas, khususnya di kota Medan dengan jumlah penduduk yang cukup banyak dan kasus TB yang cukup besar. Skrining *unmethylated* gen reseptor

vitamin D terhadap kerentanan menderita TB merupakan urgensi dalam memberikan rekomendasi langkah preventif dalam penanganan penularan TB. Hal inilah yang melatarbelakangi penelitian ini mengetahui gambaran *unmethylated* gen reseptor vitamin D pada TB di kota Medan.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimanakah gambaran *unmethylated* gen reseptor vitamin D pada penderita tuberkulosis paru di Kota Medan?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui gambaran *unmethylated* gen reseptor vitamin D pada penderita tuberkulosis paru di Kota Medan.

1.3.2 Tujuan Khusus

Yang menjadi tujuan khusus dalam penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui gambaran *unmethylated* gen reseptor vitamin D pada TB paru berdasarkan jenis kelamin.
2. Untuk mengetahui gambaran *unmethylated* gen reseptor vitamin D pada TB paru berdasarkan usia.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

Manfaat penelitian ini bagi peneliti adalah untuk menambah ilmu pengetahuan tentang epigenetik metilasi reseptor vitamin D.

1.4.2 Bagi Institusi

Manfaat penelitian ini bagi institusi adalah untuk menambah ilmu pengetahuan tentang epigenetik metilasi reseptor vitamin D.

1.4.3 Bagi Masyarakat

Manfaat penelitian ini bagi masyarakat adalah sebagai skrining preventif kerentanan terinfeksi TB paru.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tuberkulosis

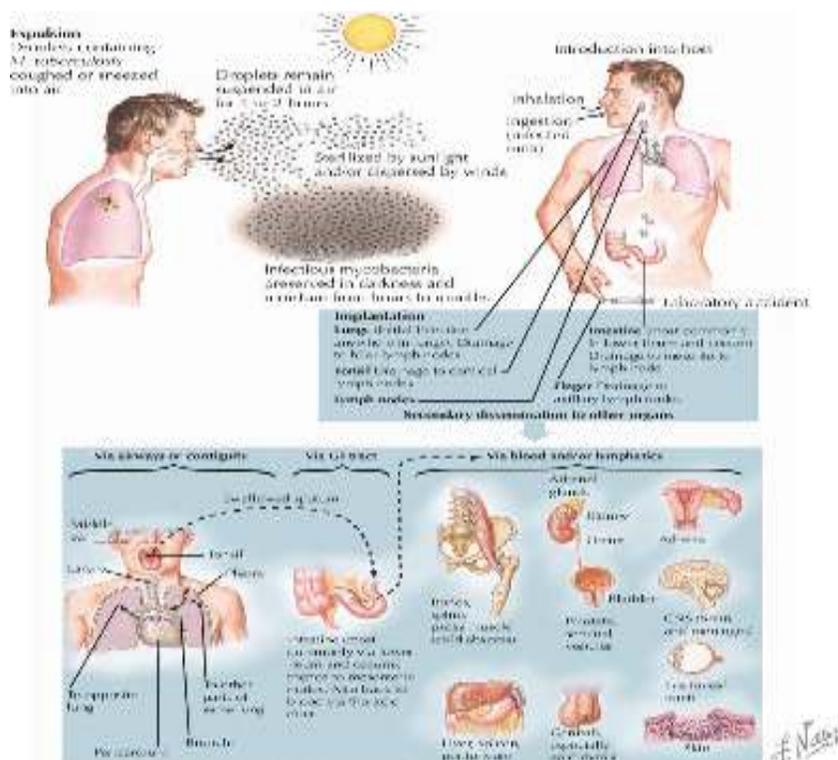
2.1.1. Definisi Tuberkulosis

Tuberkulosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh basil *Mycobacterium tuberculosis* dan salah satu penyakit tertua di dunia yang menginfeksi manusia. penyebab utama kematian menular di seluruh dunia. Tuberkulosis termasuk dalam *communicable disease* (CD) dan merupakan salah satu dari 10 penyebab kematian terbesar di dunia. Penyakit ini paling sering menyerang paru-paru. Namun, dapat juga mempengaruhi bagian di luar paru (*extrapulmonary tuberculosis*). Penularan tuberkulosis dapat melalui droplet penderita TB paru menular saat bersin atau batuk.¹⁴

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri tahan asam yang tahan terhadap gangguan kimia dan fisis. *Mycobacterium tuberculosis* sebagai bakteri tahan terhadap asam dikarenakan dinding kuman ini terdiri atas asam lemak (lipid), peptidoglikan dan arabinomannan. Saat bakteri ini berada dalam sifat dorman, bakteri ini dapat tahan terhadap udara kering maupun dingin. Bakteri dapat kembali aktif dari sifat dorman dan penyakit tuberkulosis akan menjadi aktif kembali.¹⁵ Waktu yang diperlukan sejak masuknya kuman hingga timbulnya manifestasi dari infeksi TB yang disebut dengan masa inkubasi memerlukan waktu sekitar 6-8 minggu.¹⁶ Gejala yang khas terjadi pada TB paru antara lain keringat malam, kelelahan yang berat, penurunan berat badan, batuk produktif dan hemoptisis. Pada orang dewasa yang tidak mengalami imunokompromais penyakit ini berkembang secara lambat, lain halnya pada anak-anak dan orang dengan gangguan kekebalan mungkin akan mengalami TB fulminan dan onset mendadak.¹⁷

2.1.2. Cara Penularan Tuberkulosis

Tuberkulosis yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat ditularkan dari individu ke individu lainnya melalui *droplet nuclei* yang menyebar di udara saat seorang penderita TB batuk, bersin, berteriak, atau bernyanyi. *Droplet nuclei* yang menyebar di udara mempunyai diameter partikel yang berukuran 1-5 mikron dan mengandung *Mycobacterium tuberculosis*. Penularan yang dapat menyebabkan tuberkulosis dapat terjadi apabila setelah menghirup *droplet nuclei* yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis*, kemudian didistribusikan melalui mulut atau hidung hingga mencapai saluran pernapasan bagian atas menuju ke bronkus dan sampai ke alveolus paru-paru. Pertumbuhan bakteri yang berbentuk basil ini selama 2 sampai 10 minggu. Saat pertumbuhan bakteri sedang berlangsung maka akan muncul respon imun seluler yang dapat terdeteksi pada pemeriksaan tes kulit tuberkulin.¹⁸



Gambar 2.1 Penularan Tuberkulosis¹⁴

2.1.3. Epidemiologi Tuberkulosis

Prevalensi tuberkulosis di seluruh dunia berdampak oleh adanya pandemi COVID-19. Didapatkan adanya penurunan kasus global yang telah didiagnosis terinfeksi TB. Pada tahun 2019 sekitar 7,1 juta orang terinfeksi TB dan pada tahun 2020 terdapat 5,8 juta kasus TB. Penurunan kasus dari tahun 2019 ke tahun 2020 sekitar 18%. Hal ini dikarenakan setiap orang menjalankan protokol kesehatan dalam penurunan kasus terinfeksi COVID-19. Penularan COVID-19 dan TB sama-sama melalui droplet dari batuk atau bersin penderita.²

Secara global pada tahun 2021 terdapat beberapa negara yang mengambil dua per tiga dari total penderita TB secara global yaitu India (28%), Indonesia (9,2%), Cina (7,4%), Filipina (7,0%), Pakistan (5,8%), Nigeria (4,4%), Bangladesh (3,6%) dan Republik Demokratik Kongo (2,9%). Kejadian tuberkulosis yang sebagian besar mempunyai presentasi kasus terbanyak berasal dari Asia Tenggara (45%), Afrika (23%) dan Pasifik Barat (18%), dengan proporsi yang lebih kecil di Mediterania Timur (8,1%), Amerika (2,9%) dan Eropa (2,2%).^{1,2}

Khususnya di Indonesia terdapat 351.936 kasus tuberkulosis yang terjadi pada tahun 2020 dimana mengalami penurunan dari tahun sebelumnya yaitu 568.987 kasus di tahun 2019. Dilaporkan tiga provinsi yang memiliki kasus tertinggi karena memiliki jumlah penduduk yang sangat banyak yaitu Jawa Barat, Jawa Timur, dan Jawa Tengah. Dari ketiga provinsi ini didapatkan kasus tuberkulosis mencapai (46%) dimana hampir mencapai setengah dari kasus tuberkulosis di Indonesia. Pada tahun 2020 kasus TB terbanyak ditemukan pada kelompok umur 45 – 54 tahun yaitu sebesar 17,3%, dan diikuti kelompok umur 25 – 34 tahun sebesar 16,8% serta 15 – 24 tahun 16,7%. Menurut data profil kesehatan Indonesia tahun 2019 jumlah kasus tuberkulosis yang terjadi pada laki-laki lebih tinggi dari pada perempuan secara nasional dan di semua provinsi di Indonesia.¹⁹

2.1.4. Faktor Risiko Tuberkulosis

Faktor risiko terjadinya penularan TB lebih tinggi jika berkontak erat dengan penderita penyakit TB dan yang bertempat tinggal di negara dengan tingkat kejadian TB yang tinggi seperti negara Amerika Latin, Karibia, Afrika, Asia, Eropa Timur, dan Rusia. lingkungan hidup yang sangat padat seperti pemukiman di wilayah perkotaan sehingga mempermudah proses penularan dan sangat berperan dalam meningkatkan terjadinya kasus TB. Faktor penularan yang tinggi termasuk petugas kesehatan yang merawat penderita TB dan yang mempunyai sistem kekebalan tubuh yang lemah terutama memiliki penyakit HIV/AIDS, kanker, dll.^{20,21} Terpaparnya kuman *Mycobacterium tuberculosis* menjadi terinfeksi TB dapat terjadi tergantung pada frekuensi paparan, kedekatan, dan durasi kontak dengan penderita TB, banyaknya jumlah patogen yang ditularkan, serta kerentanan seseorang yang terpapar.¹⁷

Berdasarkan data WHO pada tahun 2019 meningkatnya kasus baru kejadian TB disebabkan oleh lima faktor yaitu kurang gizi, penggunaan alkohol, infeksi HIV, merokok (terutama pada pria) dan diabetes mellitus. Masing-masing jumlah banyaknya kasus yang disebabkan oleh lima faktor risiko tersebut adalah 2,2 juta, 0,76 juta, 0,72 juta, 0,70 juta dan 0,35 juta.¹ Sekelompok orang yang disebut sebagai kelompok rentan terinfeksi TB adalah orang-orang yang memiliki faktor resiko. Setiap orang yang rentan terinfeksi TB tersebut mempunyai prevalensi untuk terinfeksi TB lebih cepat meningkat daripada populasi umum. Rekomendasi dan penetapan pedoman dari WHO yaitu kelompok rentan TB diutamakan dilakukannya skrining TB aktif daripada populasi umum.²²

2.1.5. Penegakan Diagnosis Tuberkulosis

Diagnosis dini infeksi TB paru aktif adalah prioritas untuk pengendalian TB, baik untuk mengobati individu maupun untuk intervensi kesehatan masyarakat dalam mengurangi penyebaran lebih lanjut dari penyakit infeksius ini di masyarakat. Penegakan diagnosis tuberkulosis awalnya dapat dideteksi dini

berdasarkan kecurigaan pada gejala klinis. Gejala klinis yang umumnya ditemukan berupa gejala demam, penurunan berat badan, keringat malam, batuk kronis yang berlangsung selama dua minggu atau lebih, dan batuk berdarah. Setelah ditemukannya gejala klinis yang mengarah pada infeksi tuberkulosis, maka diperlukannya pemeriksaan lebih lanjut untuk menegakkan diagnosa secara akurat.²³

Beberapa pemeriksaan yang dapat menegakkan diagnosis terinfeksi tuberkulosis yaitu:

1. Radiografi toraks

Posisi radiografi toraks yang sering digunakan adalah posisi *Posteroanterior* dan *lateral*. Posisi ini biasanya sering digunakan pada penegakan diagnosis TB pulmonal, pleural dan milier.²⁴ Gambaran radiologi pada TB milier ditemukan adanya bercak-bercak halus yang tersebar di seluruh lapangan paru. Hasil radiografi toraks dari penderita TB mempunyai bayangan yang bermacam-macam terlebih khusus pada TB yang sudah lanjut. Gambaran foto rontgen yang dijumpai biasanya terdapat seperti infiltrate, garis-garis fibrotik, kalsifikasi, serta atelektasis dan emfisema.¹⁴

2. Pemeriksaan mikroskopis sputum basil tahan asam (BTA)

Pada dasarnya diagnosis sementara dilakukan dengan ditemukannya basil tahan asam (BTA) pada pemeriksaan mikroskopis dari dahak pagi dan sewaktu atau jaringan (contohnya, biopsi kelenjar getah bening). Pemeriksaan mikroskopis BTA mempunyai sensitivitas yang relatif rendah berkisar 40-60% pada penderita TB yang baru dikonfirmasi tetapi pemeriksaan ini sangat cepat dan murah.¹⁶ Acuan standar baku pada kultur yang menemukan BTA untuk saat ini hanya dibutuhkan 10-100 basil *Mycobacterium tuberculosis* untuk mendiagnosis tuberkulosis. Metode kultur ini membutuhkan waktu yang cukup lama untuk mendapatkan hasil sekitar 2-8 minggu. Pada diagnosis TB ekstra paru salah satunya TB kelenjar dimulai dari gejala klinis yang konsisten pada TB ekstra paru (TB kelenjar) dan

dipastikan dengan terdeteksinya kuman *Mycobacterium tuberculosis* pada hasil pemeriksaan histologi.²⁵

3. Amplifikasi Asam Nukleat

Salah satu tes amplifikasi asam nukleat yang terbaik dan terbanyak dilakukan adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang saat ini sangat umum digunakan untuk menegakkan diagnosa dengan cepat untuk beberapa penyakit menular, salah satunya adalah tuberkulosis. Penelitian terbaik saat ini menilai bahwa diagnosis dengan teknik deteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada dahak dengan PCR memiliki sensitivitas 87,7% dan spesifisitas 97%.²⁶ Pemeriksaan dengan menggunakan teknik PCR akan mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan melihat *Deoxyribo Nukleat Acid* (DNA). Pemeriksaan dengan teknik PCR ini dilakukan dengan cepat dan tidak memerlukan jumlah bakteri yang banyak.²⁷ Hasil yang didapatkan dari pemeriksaan teknik PCR dipengaruhi oleh target dari *Polymerase Chain Reaction* (PCR) salinan tunggal atau ganda, reagen, jenis dan jumlah sampel pada penelitian dan metode isolasi DNA.²⁶

2.1.6. Pengobatan Tuberkulosis

Setelah penegakan diagnosis TB, maka diperlukan tahap lanjutan yaitu terapi tuberkulosis. Pengobatan tuberkulosis merupakan upaya yang efisien mencegah perkembangan dan penularan dari *Mycobacterium tuberculosis*. Tujuan pengobatan tuberkulosis yaitu mencegah perkembangan penyakit, resisten obat, kematian, kekambuhan dan mengurangi penularan TB kepada orang lain. Tujuan lainnya yaitu menyembuhkan, mempertahankan kualitas hidup dan produktivitas pasien. Pada dasarnya pengobatan TB harus dilakukan secara adekuat dan memenuhi prinsip pengobatan TB. Prinsip pengobatan TB yaitu (1) untuk mencegah terjadinya resistensi, maka diberi pengobatan dalam bentuk panduan obat anti tuberkulosis (OAT) yang tepat mengandung minimal 4 macam obat; (2) dosis OAT tepat; (3) memastikan kepatuhan meminum obat yang diawasi

langsung oleh PMO (pengawas menelan obat); (4) untuk mencegah kekambuhan, pengobatan diberikan sesuai tahap yaitu tahap awal (selama 2 bulan awal) dan selanjutnya tahap lanjutan (selama 4 bulan).²⁸

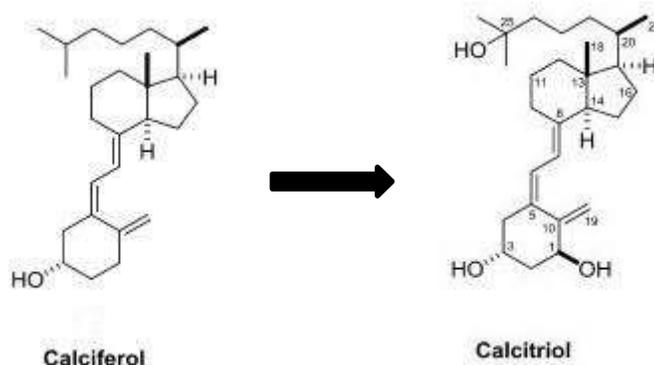
Penelitian mengenai terapi antibiotik untuk tuberkulosis semakin berkembang. Terdapat lima jenis obat lini pertama untuk obat anti tuberkulosis. Obat tersebut terbagi dalam dua kelompok yaitu (1) kelompok obat yang bersifat bakterisida adalah streptomisin, isoniazid, rifampisin dan pirazinamid; dan (2) obat yang bersifat bakteriostatik adalah etambutol. Obat anti tuberkulosis diberikan secara oral kecuali streptomisin yang diberikan secara intramuskular yang umumnya diberikan pada pasien dengan pengobatan ulang.²⁹

2.2. Gen Reseptor Vitamin D

Awal mula vitamin D menjadi salah satu hal yang penting bagi kesehatan ketika didapatkan kekurangan vitamin D menyebabkan terjadinya rachitis pada anak-anak dan osteomalacia pada orang dewasa. Penemuan ini didapatkan oleh Windaus dan mendapat penghargaan Nobel pada tahun 1938. Hal ini menjadi awal terobosan dalam berbagai penelitian mengenai vitamin D.^{6,30}

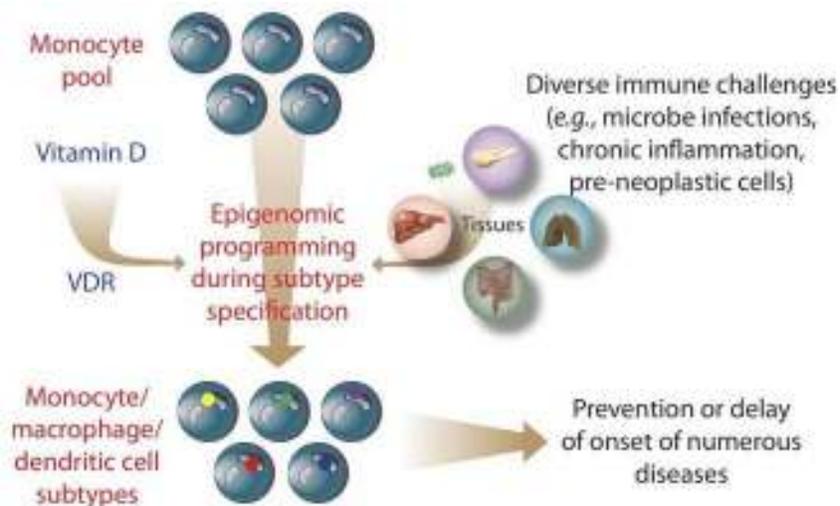
Vitamin D didapat ketika kulit terpapar sinar ultraviolet (UV) B-dependen dengan panjang gelombang 290-315 nm, makanan, dan suplemen. Calciferol (vitamin D) mempunyai dua bentuk utama yaitu vitamin D₂ (ergocalciferol) dan vitamin D₃ (cholecalciferol). Vitamin D₂ didapat dari berbagai sayur-sayuran seperti ragi dan jamur. Sedangkan cholecalciferol didapat dari kulit yang telah terpapar sinar UV B-dependen.⁶ Calcitriol adalah bentuk vitamin aktif, sehingga diperlukan aktivasi dari 25- dan 1 α -hydroxylation. Selanjutnya vitamin D akan disintesis di hati dan dimetabolismekan menjadi 25 hidroksi-vitamin D₃ [25(OH)D₃] dengan bantuan enzim CYP2D11, CYP2D25, CYP3A4, CYP2R1, dan CYP27A1.^{6,30} 25(OH)D₃ yang telah terbentuk akan menuju ke ginjal untuk dimetabolismekan menjadi bentuk biologis yang paling aktif yaitu 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25 (OH)₂D₃] (calcitriol) dengan bantuan enzim

CYP27B1. Calcitriol yang akan mengikat faktor transkripsi reseptor vitamin D.^{7,30}



Gambar 2.2 Struktur kimia calciferol menjadi calcitriol⁷

Vitamin D yang telah aktif secara biologis akan mengatur kerja dari imunitas bawaan seperti makrofag/monosit melalui reseptor vitamin D yang telah terbentuk. Telah ditemukan efek epigenome dari vitamin D melalui reseptor vitamin D dalam memodulasi pemrograman epigenetik. Vitamin D menstabilkan epigenom monosit, makrofag, dan subtype sel dendritik untuk mencegah atau menunda timbulnya penyakit umum terkait usia, termasuk pada penyakit TB.³¹



Gambar 2.3 Proses penstabilan epigenome monosit, makrofag, dan subtype sel dendritik melalui vitamin D dalam mencegah timbulnya penyakit³¹

2.3. Tuberkulosis dan *Unmethylated* Gen reseptor vitamin D

Tuberkulosis merupakan penyakit penyebab utama kematian akibat patogen bakteri tunggal dan salah satu 10 penyebab utama kematian di dunia. Berdasarkan epidemiologi dari infeksi tuberkulosis diperkirakan seperempat orang di dunia terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Kemampuan host untuk menekan infeksi Mtb tergantung pada regulasi berbagai proses seluler, salah satunya yaitu aktivasi makrofag untuk membunuh Mtb intraseluler dan sel yang diberi sinyal untuk mengkoordinasikan respons imun bawaan dan adaptif. Pengendalian jalur transkripsi inang utama oleh microRNA (miRNA) dan perubahan epigenetik (terutama metilasi daerah promotor). Jika seseorang terinfeksi Mtb telah terbukti mengubah pola metilasi DNA pada sel host yang terinfeksi dan disregulasi ekspresi miRNA.³²

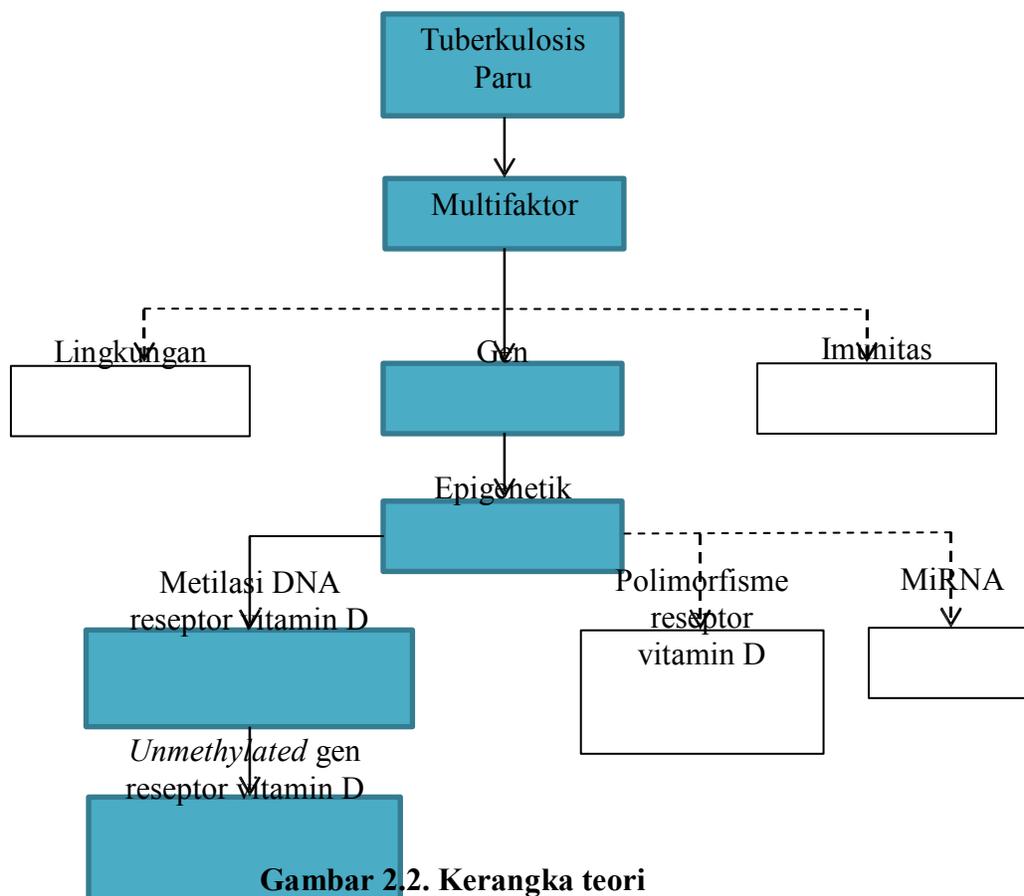
Pada penelitian sebelumnya, vitamin D berperan pada tingkat kejadian TB, dimana kadar vitamin D yang rendah rentan terinfeksi TB. Vitamin D dapat ditemukan dalam makanan dan saat terpapar sinar Ultraviolet B (UV-B) pada kulit, maka vitamin D akan disintesis di dalam hati. Setelah disintesis di dalam hati, vitamin D akan dimetabolismekan menjadi 25 hidroksi-vitamin D [25(OH)D] yang merupakan ukuran status vitamin D yang didapatkan. Dari hati akan menuju ke ginjal dan mengalami proses metabolisme lagi menjadi 1,25-dihidroksivitamin atau disebut juga dengan *Calcitriol*. Calcitriol adalah hormon yang dapat memodulasi aktivasi imunitas tubuh yang bekerja pada reseptor vitamin D untuk mengubah pengenalan sinyal genom. Vitamin D yang telah aktif secara biologis akan mengatur aktivasi kekebalan imunitas tubuh yaitu monosit/makrofag melalui reseptor vitamin D. Telah dibuktikan bahwa reseptor vitamin D dapat menghambat atau mengganggu pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dalam makrofag.³⁰

Vitamin D yang telah aktif akan mengatur aktivasi makrofag yang merupakan sel utama yang berperan dalam pengeliminasian *Mycobacterium tuberculosis*

(Mtb). Jalur yang menginisiasi pengaktifan makrofag dalam infeksi TB diatur oleh berbagai faktor yaitu perubahan epigenetik dan microRNA (miRNA)²⁹. Mekanisme epigenetik merupakan mekanisme yang berfungsi sebagai pengatur gen tanpa perubahan dalam urutan DNA. Penelitian terbaru mendapatkan bahwa evaluasi mekanisme dari epigenetik merupakan hal yang penting untuk mencapai strategi pengendalian yang efisien dalam infeksi TB.³³ Modifikasi epigenetik dapat terjadi melalui proses modifikasi histon, metilasi DNA, dan regulasi microRNA (miRNA).³⁴

Perkembangan terinfeksi TB yang mulanya hanya terpapar disebabkan karena adanya penurunan kekebalan tubuh. Hal ini juga dipengaruhi oleh faktor genetik. Faktor genetik ini mempengaruhi penurunan imunitas tubuh yang dihubungkan dengan perubahan ekspresi gen tanpa perubahan urutan DNA.^{9,10} Perubahan epigenetik menyebabkan keadaan keadaannya imun-non responsif yang dimediasi oleh DNA methyltransferase (DNMT) dan penambahan kompleks polikomberepresif (EZH2) zeste 2.⁹ Setelah perubahan epigenetik terjadi maka akan mempengaruhi metilasi DNA yang merupakan proses kimia spesifik dengan penambahan gugus metil (CH₃) dari S-adenosyl methionine (SAM) ke residu sitosin (C) dari urutan CpG yang ada dalam genom.¹⁰ Metilasi DNA pada sel imun akan mengubah struktur kromatin dan menghambat imunitas tubuh.¹¹ Ekspresi gen reseptor vitamin D diatur oleh metilasi DNA yang mempengaruhi proses eliminasi Mtb.⁸ Tidak terjadinya metilasi (*unmethylated*) gen reseptor vitamin D pada TB mungkin tidak akan mengubah struktur kromatin dan tidak menghambat sistem kekebalan tubuh.¹¹ Hal ini menyebabkan tidak adanya perubahan ekspresi gen reseptor vitamin D yang dihasilkan sehingga tidak akan mempengaruhi perkembangan TB.⁴

2.6. Kerangka Teori

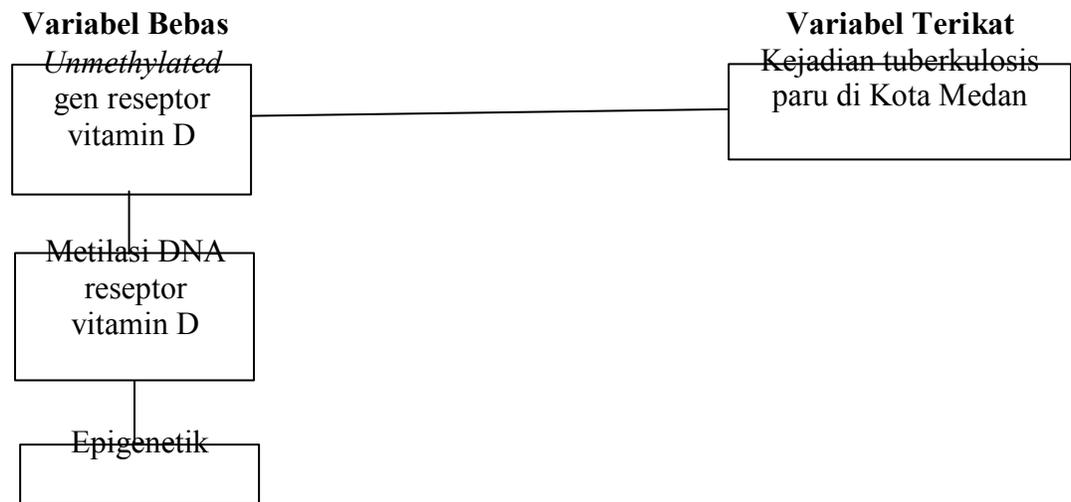


Keterangan:

 : diteliti

 : tidak diteliti

2.5. Kerangka Konsep



Gambar 2.3. Kerangka konsep

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan deskriptif kategori dengan rancangan penelitian *cross sectional*.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian direncanakan akan dilakukan pada Juli – Oktober 2022 dengan tahapan sebagai berikut :

1. Tahap I Juli – September 2022 : konversi bisulfit dan metilasi DNA di Lab Terpadu FK USU.
2. Tahap II Oktober 2022 : PCR dan gel elektroforesis di Lab Terpadu FK USU.

3.3. Populasi Penelitian

3.3.1. Populasi Target

Populasi pada penelitian ini adalah penderita tuberkulosis paru di Kota Medan.

3.3.2. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah penderita tuberkulosis paru di Rumah Sakit H. Adam Malik, Rumah Sakit Methodist, dan Rumah Sakit BP 4 Kota Medan.

3.4. Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

3.4.1. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah DNA penderita tuberkulosis paru pada

penelitian yang dilakukan oleh Maria Oktaviana Pardosi, dkk, pada tahun 2022.

3.4.2. Cara Pemilihan Sampel

Untuk menentukan sampel pada penelitian ini dilakukan dengan teknik *purposive sampling* yaitu DNA penderita tuberkulosis paru pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Maria Oktaviana Pardosi, dkk. Sampel yang digunakan bukan merupakan TB dengan HIV dan TB kelenjar.

3.5. Estimasi Besar Sampel

Untuk menentukan besar sampel maka digunakan rumus besar sampel kategorik deskriptif dengan rumus :

$$n = \frac{(\quad)}{\quad}$$

$$n_1 = \frac{\quad}{\quad} \quad n_1 = \text{Population correction}$$

$$n = \text{Besar Populasi}$$

$$n_2 = n_1 + 10\% \quad n_2 = \text{sampai akhir}$$

$Z\alpha =$ Alpha = kesalahan tipe satu ditetapkan 0,1, hipotesis satu arah, sehingga

$Z\alpha = 1,28$ (Nilai distribusi normal baku tabel Z)

P = Proporsi pada Tuberkulosis (0,5)

$$Q = 1 - P$$

d = Kesalahan penelitian yang masih diterima (0,1)

Maka :

$$n = \frac{(\quad)(\quad)(\quad)}{(\quad)} = 40 \text{ sampel DNA tuberkulosis paru}$$

3.6. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

3.6.1. Kriteria Inklusi

1. Pasien yang didiagnosis tuberkulosis (TB) pulmonal

3.6.2. Kriteria Eksklusi

1. TB ekstrapulmonal
2. TB dengan gangguan imunitas (HIV, TB kelenjar, DM, kanker, dan PPOK)

3.7. Cara Kerja Penelitian

3.7.1. Konversi Bismuth dan Metilasi DNA

Konversi bisulfit DNA genom dilakukan menggunakan EZ DNA Methylation-Gold Ki (ZymoResearch Inc., USA) sesuai dengan prosedur pada protokolnya. Dilakukan pembuatan DNA kontrol bisulfit termetilasi (M) dan tidak termetilasi (U) untuk memperoleh panel standar DNA 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, 0%.

Tahapan pengerjaan konversi bisulfit DNA adalah sebagai berikut :

1. Mempersiapkan reagen CT Conversion :
 - a) Tambahkan 900L water, 300L M-Dilution Buffer, dan 50L M-Dissolving Buffer ke setiap 1 tube CT Conversion Reagent
 - b) Mix pada suhu ruangan dengan sering memvortex atau shaking selama 10 menit
 - c) Tutup dengan aluminium foil dan sebaiknya langsung digunakan. Bila tidak langsung digunakan, dapat disimpan 1 malam pada suhu ruangan, 1 minggu pada suhu 4 derajat dan 1 bulan pada suhu minus 20 derajat.
2. Mempersiapkan M-Wash Buffer : Tambahkan 24mL 100% ethanol ke 6mL M-Wash Buffer (D5005) atau 96mL 100% ethanol ke 24mL M-Wash Buffer concentrate (D5006).
3. Tambahkan 130L CT Conversion Reagent ke 20L sampel DNA di tube PCR. Campur dengan *pipetting up and down*, kemudian sentrifugasi.

4. Tempatkan tube sampel ke thermal *cycler* sebagai berikut :
 - a) 98⁰C selama 10 menit
 - b) 64⁰C selama 2,5 jam
 - c) 4⁰C selama 20 jam untuk penyimpanan
5. Tambahkan 600L M-Binding Buffer ke Zymo-Spin IC Column dan tempatkan column ke Collection Tube.
6. Isikan sampel **No. 3** ke Zymo-Spin IC Column yang mengandung M-Binding Buffer. Tutup dan campur dengan membolakbalikkan beberapa kali.
7. Sentrifugasi 12.000g selama 30 detik. Buang cairan.
8. Tambahkan 100L ke column, sentrifugasi 12.000g selama 30 detik. Buang cairan.
9. Tambahkan 200L M-Desulphonation Buffer ke column dan biarkan tegak pada suhu kamar selama 15-20 menit. Setelah inkubasi, sentrifugasi 12.000g selama 30 detik. Buang cairan.
10. Tambahkan 200L M-Wash Buffer ke column. Sentrifugasi 12.000g selama 30 detik. Tambahkan lagi 200L M-Wash Buffer dan sentrifugasi 12.000g selama 30 detik. Buang cairan.
11. Tempatkan column ke tube 1,5mL. Tabahkan 10 L M-Elution Buffer ke column matrix. Sentrifugasi 12.000g selama 30 detik untuk elusi DNA.
12. DNA siap digunakan atau dapat disimpan di bawah -20⁰C. Gunakan 1-4L elusi DNA untuk setiap PCR.

3.7.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA metilasi diresuspensi dengan RT Master Mix PCR dan Primer. Tahapan persiapan dilakukan sesuai dengan prosedur pada Master Mix PCR. Suspensi DNA dimasukkan ke dalam mesin PCR untuk amplifikasi. Amplikon divisualisasi dengan gel agarosa.

Tahapan pengerjaannya yaitu :

1. Mempersiapkan dilusi primer :
 - a) MR : AAATACTCCTCATTA AAAACTACGCA : Tambahkan 170 μ L buffer
 - b) Kemudian $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$; $100\mu\text{M} \times V_1 = 0,3\mu\text{M} \times 1000\mu\text{L}$; $V_1 = 3\mu\text{L} + 997\mu\text{L}$ NFW
 - c) MF : TTTTATTTTCGTGTTTATAGATCGT : Tambahkan 248 μ L buffer
 - d) Kemudian $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$; $100\mu\text{M} \times V_1 = 0,3\mu\text{M} \times 1000\mu\text{L}$; $V_1 = 3\mu\text{L} + 997\mu\text{L}$ NFW
 - e) UR : AAAATACTCCTCATTA AAAACTACACA : Tambahkan 208 μ L buffer
 - f) Kemudian $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$; $100\mu\text{M} \times V_1 = 0,3\mu\text{M} \times 1000\mu\text{L}$; $V_1 = 3\mu\text{L} + 997\mu\text{L}$ NFW
 - g) UF : TTTTATTTTGTGTTTATAGATTGT : Tambahkan 134 μ L buffer
2. Kemudian $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$; $100\text{M} \times V_1 = 10\text{M} \times 100\text{L}$; $V_1 = 1000/100\text{L}$; $V_1 = 10\mu\text{L}$ primer
3. Siapkan PCR Master Mix dalam Tube Eppendorf 1,5 mL berisi total 25 μ L untuk setiap primer M dan U. Lihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Singleplex PCR

Komponen	Volume
PCR-grade water X μ L	8,5 μ L
2 \times PCR buffer for KOD -Multi Epi ^{-TM*}	12,5 μ L
10 pmol/ μ L Primer #1 1.5 μ L 0.3 μ M	0,75 μ L
10 pmol/ μ L Primer #2 1.5 μ L 0.3 μ M	0,75 μ L
Template DNA	2 μ L
KOD -Multi & Epi ^{-TM}	0,5 μ L
Volume Reaksi Total	25 μL

4. Isikan PCR Master Mix dari Tube Eppendorf ke dalam tube PCR masing-masing berisi 23 μ L.

5. Isikan 2 μ L DNA yang telah didilusi ke dalam tube PCR.
6. Setting mesin RT PCR :

Tabel 3.2 Kondisi Cycling

PCR	Metilasi	<i>Unmethylated</i>
<i>Pre-denaturation</i>	94°C, 2 min	94°C , 2 min
<i>Denaturation:</i>	98°C, 10 s	98°C, 10 s
<i>Annealing:</i>	51°C, 10 s	51°C, 10 s
<i>Extension:</i>	68°C 10 s	68°C 10 s

3.7.3. Elektroforesis Gel

Hasil PCR divisualisasi dengan gel agarosa. Tahapan pengerjaan dengan elektroforesis gel:

- a. Untuk membuat gel agarosa 2%, ditimbang 4,8 gr agarosa dalam 240 ml TAE 1x. Larutan dipanaskan dan diaduk di atas *magnetic hot stirrer* hingga mendidih dan berwarna jernih selama 5 menit.
- b. Pemanas dimatikan dan ditambahkan ethidium bromide, dan diaduk kembali.
- c. Cairan dituang ke Casting Tray dengan Gel Comb dan dibiarkan sampai mengeras.
- d. Setelah gel mengeras, cabut Gel Comb dan dibiarkan sampai mengeras.
- e. Ambil wadah yang tipis dan datar, kemudian dengan menggunakan mikropipet ambil 2 μ L larutan loading buffer. Lakukan hal yg sama sebanyak 40x. Kemudian ambil masing-masing 7 μ L sampel dan campurkan pada larutan loading buffer sebagai pemberat sehingga memberi warna. Homogenkan keduanya.
- f. Sebanyak 5 μ L larutan DNA Ladder dan sebanyak 9 μ L amplicon PCR yang telah dihomogenkan dengan larutan loading buffer ke dalam sumur-sumur gel pada alat elektroforesis gel.
- g. Posisi sampel pada sumur sumur gel dicatat.
- h. Elektroforesis dijalankan selama 70 menit dengan tegangan 80 Volt.

- i. Gel dipindahkan ke dalam Gel Documentation mendokumentasikan hasil elektroforesis.

3.8. Identifikasi Variabel

Variabel dependen : Tuberkulosis paru

Variabel independen : *unmethylated* gen reseptor vitamin D

3.9. Definisi Operasional

Tabel 3.3 Definisi Operasional Penelitian

Variabel	Definisi operasional	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Tuberkulosis Pulmonal	Tuberkulosis paru yang terinfeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sekurang-kurangnya 3 minggu	Rekam medik	Tuberkulosis paru	Nominal
<i>Unmethylated</i> gen reseptor vitamin D	Tampak adanya pita (band) pada gel elektroforesis yang ditunjukkan dengan amplikon 200bp	PCR	<i>Unmethylated</i> <i>Methylated</i>	Nominal

3.10. Analisis Data

Pada penelitian ini dilakukan analisis data menggunakan perangkat lunak komputer, selanjutnya dijelaskan dengan pendekatan deskriptif untuk melihat gambaran *unmethylated* gen reseptor vitamin D pada TB paru.

3.11. Alat dan Bahan

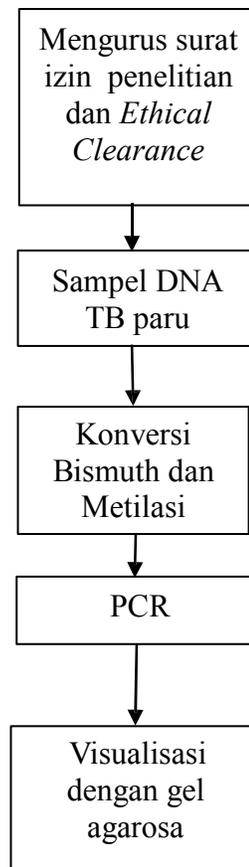
Alat dan bahan penelitian yang diperlukan selama penelitian di Laboratorium Terpadu FK USU dapat dilihat pada tabel 3.1 di bawah ini.

Tabel 3.4 Alat dan Bahan Penelitian

No	Nama	Kegunaan	Jumlah
1	<i>Cap</i>	Aseptik	1 boks
2	<i>Freezing container</i>	Cryo	1
3	<i>Hand seal</i>	Aseptik	1 boks
4	Masker	Aseptik	1 boks
5	PBS	Isolasi DNA, washing	1 pack
6	Buffer Tris	Elektroforesis	1 pack
7	Tip 10 micro	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	2 boks
8	Tip 20 micro	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 boks
9	Tip 100 micro	Isolasi DNA	1 boks
10	Tip 200 micro	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 boks
11	Tip 1000 micro	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 boks
12	Tube 5 mL	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 boks
13	Tube PCR	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 boks
14	Rak tube PCR 1 mL	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 buah
15	Reagen Isolasi DNA	Isolasi DNA	1 pack

No	Nama	Kegunaan	Jumlah
16	PBS	Isolasi DNA	5 Liter
17	Primer DNA	PCR	4 pack
18	Mastemix PCR kit	PCR	2 pack
19	Gel agarosa	Elektroforesis	1 pack
20	Alat Elektroforesis	Elektroforesis	2 buah
21	Dye stain	Elektroforesis	10mL
22	Ethidium Bromide	Elektroforesis	5mL
23	Mikropipet 10	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 buah
24	Mikropipet 20	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 buah
25	Mikropipet 100	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 buah
26	Mikropipet 1000	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 buah
27	Mesin PCR	PCR dan Elektroforesis	1 buah

3.12. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian