BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan menjadi salah satu penyebab kematian tertinggi di dunia.^{1,2} Tuberkulosis menjadi salah satu pembunuh utama populasi manusia yang sangat berbahaya setelah HIV/AIDS.²

Penularan TB terjadi melalui droplet yang ada di udara ketika seseorang yang sakit TB batuk sehingga mengeluarkan bakteri ke udara. Penyakit ini bisa mempengaruhi paru-paru (TB paru) namun dapat juga mempengaruhi di luar paru (TB ekstraparu). Sekitar 90% orang yang mengalami penyakit ini adalah orang dewasa dan lebih banyak menyerang pria dari pada wanita. Diperkirakan seperempat populasi di dunia terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Indonesia merupakan salah satu dari dua negara dengan penderita TB tertinggi di dunia. Kasus TB meningkat sebanyak 69% di Indonesia dari tahun 2015 ke tahun 2019.

Hubungan antara faktor host, agen, dan lingkungan mempengaruhi kerentanan terinfeksi TB.⁴ Faktor genetik sangat berperan dalam respon imun yang bisa mempengaruhi perkembangan TB paru.⁵ Epigenetik merupakan variasi genetik tanpa mengubah urutan gen. Perubahan epigenetik seperti modifikasi histon, metilasi *Deoxyribo Nukleat Acid* (DNA), dan *non-coding ribonucleic acid* (RNA) memainkan peran penting dalam imunomodulasi host setelah terinfeksi tuberkulosis. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mengyuan Lyu, dkk menunjukkan bahwa metilasi DNA berperan penting dalam patogenesis dan perkembangan TB.⁶

Vitamin D berperan dalam imunitas tubuh bawaan dan adaptif. Jika tubuh kekurangan vitamin D dapat menjadi faktor risiko terinfeksi tuberkulosis karena bisa melemahkan respon imun bawaan sehingga meningkatkan kerentanan terinfeksi tuberkulosis.^{7,8} Vitamin D memberikan efek antibakteri melalui reseptor vitamin D pada sebagian besar sel imun

seperti makrofag, limfosit T dan B, dan neutrophil. Gen reseptor vitamin D (VDR) adalah faktor transkripsi yang mengatur respon imun dengan mensekresi peptida antimikroba, seperti cathelicidin. Gen ini berperan dalam eradikasi Mycobacterium tuberkulosis. 10,11 Cathelicidin sebagai peptida antimikroba pada manusia ditemukan pada leusin-leusin 37 (LL-37) yang merupakan satu-satunya peptida yang bisa menjadi pertahanan tubuh bagi manusia. Ini merupakan molekul yang efektif yang bisa terlibat dalam kekebalan tubuh bawaan dengan sifat antimikroba imunomodulator yang menghasilkan berbagai sifat. Peptida cathelicidin antimikroba adalah molekul yang berkaitan dalam pertahanan imunitas bawaan dan adaptif dan memodulasi infeksi melalui respons reseptor seperti Toll. Dengan bantuan cathelicidin mampu menghambat pertumbuhan dari mycobacterium tuberculosis. 12

Hipermetilasi DNA mengacu pada penambahan gugus metil (CH3) yang normalnya tidak termetilasi. Pada sel normal, 5' promoter CpG islands umumnya tidak termetilasi, sedangkan CpG sites pada badan gen umumnya dalam keadaan termetilasi. Akibat terhambatnya transkripsi karena metilasi pada promoter DNA menyebabkan gen tersebut tidak terekspresi. Pada pasien TB sel-sel kekebalan ditandai dengan hipermetilasi DNA penting untuk kekebalan mikobakteri yang bisa mengakibatkan penurunan respon imun spesifik mikobakteri dan nonspesifik.

Penelitian yang dilakukan Kathirvel Maruthai, dkk menunjukkan hipermetilasi VDR berhubungan dengan penurunan kadar vitamin D dan penurunan tingkat ekspresi gen reseptor vitamin D.⁸ Penelitian yang dilakukan oleh Chao Jiang, dkk menunjukan bahwa secara umum pasien TB mengalami hipermetilasi gen reseptor vitamin D dengan perbedaan signifikan antara pasien dengan diagnosis TB dan pasien yang sehat, dimana terdeteksi 7 di antara 16 urutan *Cytosine-Phosphate Guanide* (CpG) yang mengalami metilasi. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan perubahan metilasi gen reseptor vitamin D juga dapat mempengaruhi perkembangan dari tuberkulosis sehingga seseorang akan mudah terinfeksi TB. Pada

kondisi metilasi DNA dari gen reseptor vitamin D secara langsung dapat dideteksi dalam darah tepi yang menyediakan metode yang efisien dalam mendiagnosis. Penelitian ini masih perlu dipelajari lebih lanjut.¹⁵

Di Indonesia kasus TB semakin meningkat setiap tahunnya, untuk itu diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai peran metilasi gen reseptor vitamin D terhadap kejadian TB. Penelitian sebelumnya menunjukkan adanya peran hipermetilasi DNA dengan kerentanan penderita TB. Pasien dengan gejala TB memiliki hipermetilasi DNA, sedangkan pada orang yang kontak satu rumah dengan penderita TB tetapi tidak menderita TB tidak ditemukan hipermetilasi DNA. Penelitian tentang hipermetilasi gen reseptor vitamin D pada TB masih sangat terbatas, khususnya di kota Medan menurut data dari Badan Pusat Stastistik Provinsi Sumatera Utara tahun 2021 ada sekitar 12.105 orang penderita TB paru di Kota Medan dengan jumlah penduduk yang cukup banyak dan kasus TB yang cukup besar. Hal inilah yang melatarbelakangi penelitian ini menganalisa hipermetilasi gen Vitamin D Receptor VDR pada TB di kota Medan sebagai skrining preventif dini yang diperlukan untuk mencegah terinfeksi TB.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimanakah gambaran hipermetilasi gen reseptor vitamin D pada penderita Tuberkulosis Paru di Kota Medan?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui gambaran hipermetilasi 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 hipermetilasi gen reseptor vitamin D pada penderita Tuberkulosis Paru berdasarkan jenis kelamin.
- 2. Untuk mengetahui gambaran hipermetilasi gen reseptor vitamin D pada

penderita Tuberkulosis Paru berdasarkan usia.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Masyarakat

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

1.4.2 Bagi Peneliti

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

1.4.3 Bagi Institusi

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

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tuberkulosis

2.1.1 Definisi Tuberkulosis

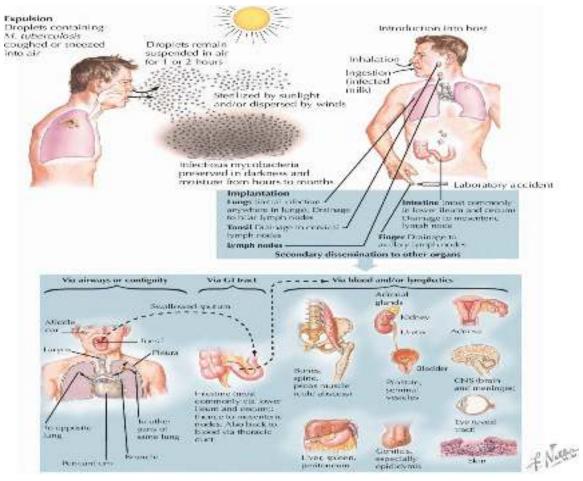
Tuberkulosis merupakan penyakit menular yang sudah lama diketahui, yang disebabkan oleh Mycobacterium tuberculosis dan merupakan salah satu infeksi yang bisa menyebabkan kematian bagi manusia di seluruh dunia. Penyakit ini paling sering menyerang paru-paru. Batuk kronis, produksi sputum, kehilangan nafsu makan, penurunan berat badan, demam, keringat malam, dan hemoptisis adalah tanda klinis khas TB paru. ⁴ Tuberkulosis yang disebabkan oleh jenis yang rentan terhadap obat dapat disembuhkan pada sebagian pasien jika diobati dengan benar. Dalam 50-65% kasus, jika tidak diobati, penyakit ini bisa berakibat fatal dalam waktu 5 tahun. Penyebaran droplet nukleus melalui udara yang dihasilkan oleh pasien TB paru menular adalah cara penularan yang paling umum. ¹⁷

Mycobacterium tuberculosis juga termaksud patogen intraseluler yang mampu menginfeksi dan bertahan pada manusia selama beberapa dekade meskipun ada sistem kekebalan yang berfungsi penuh. Bakteri ini merupakan bakteri aerob berbentuk batang tipis yang tidak membentuk spora berukuran 0,5 m x 3 m. Dinding sel mikrobakteri, lipid (seperti, asam mikolat) terkait dengan arabinogalactan dan peptidoglikan yang mendasarinya. Struktur ini membuat dinding sel sangat kurang permeabel dan mengurangi efektivitas sebagian besar antibiotik. Lipoarabinomannan, molekul lain di dinding sel mikobakteri, berpartisipasi dalam interaksi patogen-inang dan meningkatkan kelangsungan hidup Mycobacterium tuberculosis makrofag. 17

2.1.2 Cara Penularan Tuberkulosis

Tuberkulosis ditularkan dari orang yang terinfeksi ke orang yang rentan dalam bentuk partikel di udara yang disebut *droplet nukleus*. Infeksi terjadi ketika seseorang menghirup *droplet nukleus* yang mengandung

bakteri TB dan *droplet nukleus* melewati mulut atau saluran hidung, saluran pernapasan bagian atas, dan bronkus untuk mencapai alveoli. Tuberkulosis pada dasarnya adalah infeksi paru-paru, tetapi dapat menyebar ke organ dan jaringan lain. Ketika bakteri memasuki inang, hal itu menyebabkan infiltrasi sel inflamasi, terutama di paru-paru, yang dapat menyebabkan pembentukan granuloma. *Mycobacterium tuberculosis* dapat menginfeksi berbagai jenis sel, termasuk neutrofil, makrofag, dan sel endotel. Setelah diambil oleh sel, bakteri dapat hadir di berbagai kompartemen intraseluler seperti fagosom dan autofagosom, dan ketika organel ini dihancurkan, bakteri tuberkulosis juga mendapatkan akses ke sitosol. Bakteri bisa tumbuh dalam rentang waktu 2 hingga 10 minggu, dan saat itu berlangsung maka akan muncul



Gambar 2.1 Penularan Tuberkulosis¹⁷

2.1.3 Epidemiologi Tuberkulosis

Secara global diseluruh dunia pada tahun 2020 terdapat beberapa negara yang jumlah kasus TB menyumbang dua pertiga dari total jumlah kasus TB di seluruh dunia, yaitu ada Indonesia (8,5%), India (26%), China (8,4%), Pakistan (5,7%), Filipina (6, 0%), Bangladesh (3,6%), Nigeria (4,4%) dan Afrika Selatan (3,6%). Presentase kejadian TB yang masih banyak ditemukan sebagian berasal dari Asia Tenggara (44%), Afrika (25%), dan Pasifik Barat (18%), lalu diikuti dengan presentase yang lebih kecil ada Mediterania Timur (8,2%), Amerika (2,9%) dan Eropa (2,5 %).

Kasus yang terdiagnosis dengan infeksi tuberkulosis secara global jumlahnya telah menurun. Penyebaran secara global tuberkulosis sangat berdampak akibat dari pandemi COVID-19. Ada sekitar 7,1 juta orang pada tahun 2019 yang terinfeksi TB dan sekitar 5,8 juta terdapat kasus TB tahun 2020. Mulai dari tahun 2019 sampai 2020, kasus TB menurun sekitar 18%. Terjadi penurunan dari jumlah kasus COVID-19, ini bisa terjadi karena semua orang mengikuti protokol kesehatan untuk mengurangi jumlah kasus COVID-19. Tejadi penularan dari COVID-19 dan TB bisa menular melalui tetesan dari batuk atau bersin orang yang sakit.¹

Di Indonesia, kasus tuberkulosis menurun pada tahun 2020 yaitu ada sekitar 351.936 terdapat kasus tuberkulosis dan di tahun 2019 terjadi penurunan ada sekitar 568.987 kasus tuberkulosis. Terdapat kejadian kasus tertinggi di tiga provinsi di Indonesia yaitu Jawa Barat, Jawa Timur, dan Jawa Tengah akibat dari jumlah penduduknya yang besar. Didapatkan dari ketiga provinsi tersebut kasus tuberkulosis mencapai (46%), ini hampir mencapai setengah dari kasus tuberkulosis di Indonesia. Kasus tuberkulosis terbanyak pada tahun 2020 dialami oleh kelompok usia 45-54 tahun yaitu sebesar 17,3%, setelah itu diikuti oleh kelompok usia 25-34 tahun yaitu sebesar 16,8%, dan usia 15-24 tahun kelompok dengan 16,7%. Sumber data dari profil kesehatan Indonesia pada tahun 2019, jumlah kasus TB lebih

tinggi dialami oleh laki-laki dibandingkan perempuan baik secara nasional maupun di seluruh provinsi di Indonesia.²⁰

2.1.4 Faktor Risiko Tuberkulosis

Faktor-faktor yang mempengaruhi kejadian infeksi TB termasuk usia, tingkat pendapatan (sosial-ekonomi), kondisi perumahan, merokok, dan penularan dari pasien TB²¹. Infeksi sering terjadi melalui droplet nukleus ini dihasilkan oleh batuk, bersin, dll, saat terhirup melalui saluran pernapasan. Kemungkinan infeksi tergantung pada waktu, frekuensi paparan, dan status kekebalan orang tersebut. Tidak semua orang yang terinfeksi berkembang menjadi tuberkulosis. Risiko seumur hidup untuk mengembangkan penyakit ini adalah 10-15% pada orang yang terinfeksi tuberkulosis dan meningkat menjadi 10% setiap tahun pada orang dengan koinfeksi HIV. Penentu lain seperti diabetes. merokok produk tembakau, malnutrisi, dan penyalahgunaan alkohol juga meningkatkan risiko perkembangan dari infeksi ke TB.4

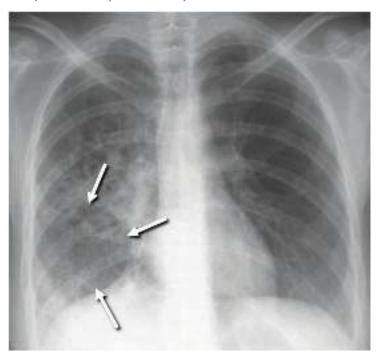
Akibatnya, beberapa faktor risiko TB telah diidentifikasi selama beberapa dekade, termasuk penyakit sistemik seperti diabetes mellitus dan penyakit ginjal kronis serta merokok, konsumsi alkohol, indeks massa tubuh, silikosis, infeksi *human immunodeficiency virus* (HIV), splenektomi dan gastrektomi. Malnutrisi, pengungsi, tunawisma dan paparan langsung terhadap TB aktif juga merupakan faktor risiko TB. Orang yang terpapar faktor ini disebut sebagai kelompok risiko TB, terdapat kejadian atau prevalensi TB secara signifikan lebih tinggi daripada populasi umum. *World Health Organization* (WHO) merekomendasikan dan menetapkan pedoman untuk kelompok risiko ini untuk memprioritaskan skrining TB aktif pada populasi umum.²²

2.1.5 Penegakan Diagnosis Tuberkulosis

Diagnosis tuberkulosis dapat ditegakkan dengan beberapa pemeriksaan antara lain sebagai berikut :

1) Rontgen dada

Pada tuberkulosis paru dengan bentuk penyakit yang paling umum, rontgen dada berguna untuk mendiagnosis TB. Kelainan pada dada bisa menjadi tanda penyakit TB paru.²³ Lokasi radiografi dada rutin biasanya posterior-anterior dan lateral, yang paling sering digunakan pada tuberkulosis paru, pleura, dan milier.²⁴ Pada TB milier, radiografi akan menunjukkan adanya plak tipis yang sering menyebar di bidang paruparu. Pada rontgen dada, bayangan yang berbeda sering terlihat, terutama pada pasien dengan TB berat, seperti infiltrat, garis-garis fibrotik, kalsifikasi, atelektasis, dan emfisema.²⁵



Gambar 2.2 Radiografi Dada dengan Rongga Lobus Bawah²³

2) Pemeriksaan mikroskopis basil tahan asam (BTA)

Pemeriksaan bakteriologis merupakan pemeriksaan mikroskopis langsung BTA dengan interpretasi hasil menurut *International Union Agains Tuberculosis and Lung Disease* (IUALTD). Jika hasil tes bakteriologis negatif, diagnosis tuberkulosis paru dapat dibuat secara klinis dengan tes dan laboratorium (setidaknya rontgen dada sesuai dan oleh dokter terlatih untuk menafsirkan lesi tuberkulosis). ²⁶ Pemeriksaan mikroskopis dahak merupakan pemeriksaan yang penting untuk

diagnosis tuberkulosis karena dapat mengidentifikasi pasien dengan tuberkulosis aktif. Tes apus BTA merupakan metode yang cepat dan murah walaupun sensitivitas relatif rendah 40-60% untuk pasien dengan lesi minimal, dan pemeriksaan mikroskopis langsung dari dahak spontan bisa mencapai 80% pada lesi kavitas yang luas pada kasus tuberkulosis yang baru dikonfirmasi.²⁷ Saat ini kultur menjadi acuan standar baku, hanya 10 hingga 100 dibutuhkan basil *Mycobacterium tuberculosis* untuk mendiagnosis TB, akan tetapi butuh waktu lama sekitar 2 sampai 8 minggu untuk mendapatkan hasil dari kultur TB. Diagnosis tuberkulosis ekstra paru dipastikan dengan deteksi *Mycobacterium tuberculosis* berdasarkan hasil pemeriksaan histologis dan manifestasi klinis tuberkulosis ekstra paru yang konsisten.²⁸

3) Amplifikasi Asam Nukleat

Pewarnaan basil tahan asam dan kultur tuberkulosis merupakan teknik diagnostik Mycobacterium tuberculosis klasik. Pewarnaan basil tahan asam membutuhkan beberapa minggu waktu inkubasi untuk kultur. Keterbatasan membuat sulit untuk memenuhi persyaratan untuk diagnosis awal. Tes amplifikasi asam nukleat, seperti reaksi rantai polimerase polymerasechain reaction (PCR), yang mulai dikembangkan sejak tahun 1983, sekarang menjadi alat yang populer untuk diagnosis yang cepat pada banyak penyakit menular, termasuk tuberkulosis.²⁹ Uji amplifikasi asam nukleat dilaboratorium negara-negara industri sering digunakan untuk deteksi kompleks Mycobacterium tuberculosis yang cepat dan spesifik dalam spesimen klinis. Dengan pengembangan platform pengujian reaksi polymerase chain reaction real time (RT-PCR), peningkatan signifikan dalam teknologi PCR telah dicapai dari waktu ke waktu. Tes RT-PCR biasanya digunakan untuk menentukan apakah sekuens DNA atau Mycobacterium tuberculosis ada dalam sampel dan untuk mendeteksi DNA yang diamplifikasi saat reaksi berlangsung secara real time. Ini digunakan untuk memantau amplifikasi molekul DNA/RNA yang telah ditargetkan selama amplifikasi PCR.³⁰

Dengan menggunakan Teknik PCR *Mycobacterium tuberculosis* dapat dideteksi untuk melihat DNA, pemeriksaannya dapat dilakukan dengan cepat dan tidak membutuhkan jumlah bakteri yang banyak.³¹

2.1.6 Pengobatan Tuberkulosis

Pengobatan dilakukan untuk mengobati pasien secara individu, meminimalkan risiko morbiditas dan mortalitas terkait pengobatan, mengurangi infeksi TB, dan secara klinis penting dalam TB, untuk mencegah munculnya resistensi obat. Prinsip dasar pengobatan anti TB adalah sebagai berikut:

- (1) Pemberian obat yang rentan terhadap organisme hidup.
- (2) Memberikan pengobatan yang paling aman dan efektif dalam waktu sesingkat mungkin.
- (3) Untuk memastikan kepatuhan terhadap pengobatan.
- (4) Kegagalan pengobatan dicurigai, tambahkan setidaknya dua obat anti tuberkulosis baru ke dalam rejimen.

Pasien dengan tuberkulosis harus dirawat oleh dokter yang berpengalaman dalam menangani infeksi ini. Keahlian klinis sangat penting untuk pasien tuberkulosis yang resistan terhadap obat. Akibat dari ketidakpatuhan terhadap pengobatan anti-tuberkulosis menjadi penyebab utama kegagalan pengobatan, penularan tuberkulosis yang berkelanjutan, dan perkembangan resistensi obat. Centers for Disease Control (CDC) merekomendasikan DOT (Terapi observasi langsung) untuk semua pasien dengan tuberkulosis yang resistan terhadap obat dan untuk pasien yang menerima pengobatan intermiten (2 atau 3 kali seminggu). Rawat inap untuk terapi awal tuberkulosis tidak diperlukan untuk kebanyakan pasien. Ini harus dipertimbangkan jika pasien tidak mampu merawat diri sendiri atau kemungkinan besar akan mengekspos individu baru yang rentan terhadap tuberkulosis.³² Pada pengobatan tuberkulosis paru biasanya diberikan isoniazid (INH), rifampisin (RMP), etambutol (EMB), dan pirazinamid (PZA) selama 2 bulan, diikuti segera oleh 2 program RMP dan lagi.33 INH 4 selama bulan

2.2 Tuberkulosis dan Hipermetilasi Gen Vitamin D Receptor (VDR)

Tuberkulosis dapat membunuh 2 juta orang setiap tahun dan diperkirakan 1,8 miliar orang. Ini termasuk penyakit laten di seluruh dunia. Ini adalah salah satu dari 10 penyakit sehubungan dengan tingginya morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia. Respon imun bawaan dan adaptif bertanggung jawab untuk melindungi terhadap patogen yang menyerang. Pada tahun 2014, WHO menetapkan tujuan "pemberantasan tuberkulosis" pada tahun 2035, menyadari bahwa keberhasilan tergantung pada pengembangan intervensi pencegahan, diagnostik dan terapeutik yang lebih baik.

Vitamin D merupakan vitamin yang larut dalam lemak yang berperan dalam homeostatis kalsium dan metabolisme tulang. Vitamin D yang larut dalam lemak, memiliki penting dalam kekebalan tubuh peran terhadap *Mycobacterium* tuberculosis . Calcitriol merupakan bentuk vitamin D yang aktif secara biologis, ini mengarah pada ekspresi peptida yang disebut cathelicidin. Cathelicidin ini adalah peptida mikrobisida yang bekerja melawan Mycobacterium tuberculosis. Suplementasi vitamin D dapat menyebabkan peningkatan ekspresi peptida cathelicidin dalam makrofag sehingga dapat meningkatkan kekebalan bawaan pada pasien dengan tuberkulosis.³⁶

Pada kulit, akibat radiasi ultraviolet menyebabkan konversi fotokimia 7- dehydrocholestrol menjadi vitamin D. Dalam makanan, vitamin D dapat ditemukan dalam minyak ikan dan kuning telur. Vitamin D2 berasal dari sayur, sedangkan Vitamin D3 berasal dari hewani. Kedua bentuk ini yang mempunyai aktivitas biologis dan diaktifkan oleh vitamin D hidroksilase dengan cara yang sama. Vitamin D, dihasilkan di kulit dan diserap di usus, bersirkulasi dengan alpha-globulin yang dihasilkan dihati, disebut vitamin D protein pengikat (VDBD). Vitamin D dari kulit dan makanan dimetabolisme

di hati menjadi 25-hidroksivitamin D (25(OH)D), yang digunakan untuk menentukan status vitamin D pasien. 25(OH)D ini diubah menjadi bentuk aktifnya, 1,25-dihidroksi vitamin D (1,25(OH)2 D) di ginjal oleh enzim 25-hidroksivitamin D-1 hidroksilase. Vitamin D memiliki peran penting dalam pertahanan kekebalan tubuh terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Vitamin D dapat menginduksi *cathelicidin* peptida antimikroba yang menghambat multiplikasi mikobakteri dalam makrofag. 36,37

Hubungan antara faktor host, agen, dan lingkungan mempengaruhi kerentanan terinfeksi TB.⁴ Reseptor vitamin D (VDR) berperan dalam fungsi imunologi vitamin D3, yang mengaktifkan makrofag, kekurangan vitamin D telah dikaitkan dengan risiko tuberkulosis. Sebagai bagian peringatan dini dalam mengenali bakteri sistem imun bawaan mendapatkan peringatan melalui reseptornya sendiri yaitu Toll-like receptors (TLRs). Umumnya TLR berperan dalam respon imun bawaan dan adaptif pada tuberculosis. Ekspresi TLR2 pada makrofag berperan penting dalam menentuk respon bawaan terhadap imun Mycobacterium tuberculosis.³⁸

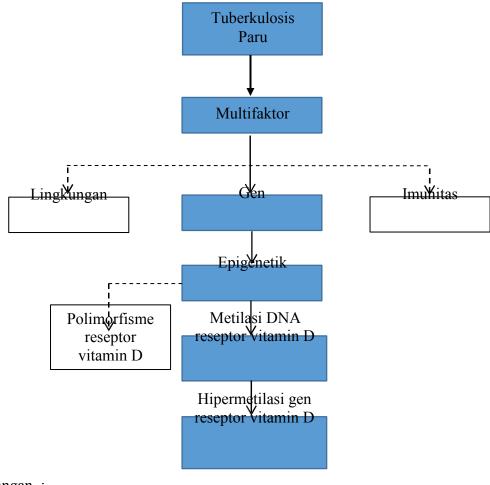
Bentuk aktif pada vitamin D yaitu kalsitrol (1-25-dihidroksivitamin D3), merupakan hormon penting yang mengatur aktivitas berbagai sel pertahanan dan kekebalan tubuh seperti limfosit, monosit, makrofag, dan sel epitel mampu membatasi pertumbuhan Mycobacterium yang tuberculosis pada makrofag melalui produksi peptida antimikroba, yaitu cathelicidin. Selama infeksi tuberkulosis, vitamin akan D berikatan dengan vitamin D receptor (VDR) di makrofag, lalu mengaktifkan sintesis cathelicidin peptida antimikroba, sehingga dapat membatasi pertumbuhan intraseluler Mycobacterium tuberculosis pada makrofag serta menghancurkan Mycobacterium tuberculosis di fagolisosom.³⁹

Hipermetilasi DNA mengacu pada penambahan gugus metil (CH3) yang normalnya tidak termetilasi. Pada sel normal, 5' promoter CpG islands umumnya tidak termetilasi, sedangkan CpG sites pada badan gen umumnya dalam keadaan termetilasi. Akibat terhambatnya transkripsi oleh karena

metilasi pada promoter DNA menyebabkan gen tersebut tidak terekspresi. ¹³ Pada Hipermetilasi gen Vitamin D receptor (VDR) pada penderita TB akibat defisiensi vitamin D dapat membuat gen Vitamin D Receptor yang seharusnya berperan pada respon imun tubuh untuk mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis* dapat menghambat ekspresi gen Vitamin D receptor (VDR) pada penderita TB. ⁸

Hipermetilasi mempengaruhi ekspresi gen paling utama di daerah yang kaya akan CpG. Akan tetapi, hipermetilasi DNA yang spesifik pada jaringan lebih sering terjadi pada transkripsi aktif di badan gen dan dalam penambahan intragenik atau intergenik di promotor. Penting untuk mengetahui perbedaan peran dari hipermetilasi DNA spesifik jaringan dan pada sel untuk bisa mengetahui fungsi biologis hipermetilasi DNA terkait penyakit.⁴⁰

2.3 Kerangka Teori

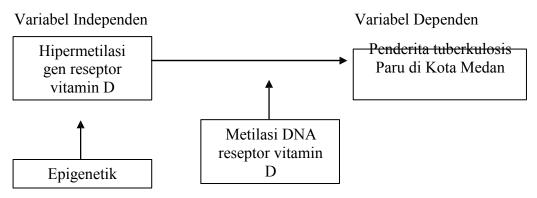


Keterangan:

: yang diteliti : tidak diteliti

Gambar 2.3. Kerangka Teori

2.4 Kerangka Konsep



Gambar 2.4. Kerangka Konsep

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan deskriptif kategori dengan rancangan penelitian cross sectional.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian direncanakan di lakukan pada Juli – Oktober 2022 dengan tahapan sebagai berikut :

- 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 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 Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah DNA penderita Tuberkulosis 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 pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Maria Oktaviana Pardosi, dkk.

3.5 Estimasi Besar Sampel

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

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

$$n_1 =$$

n = Besar Populasi

$$n_2 = n_1 + 10\%$$

 $n_2 = \text{sampai akhir}$

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

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

P = Proporsi pada Tuberkulosis (0,5)

q = 1 - p

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

Maka:

$$n = \frac{() () () ()}{()} = 40$$
 sampel tuberkulosis

3.6 Kriteria Inklusi dan Ekskusi

3.6.1 Kriteria Inklusi

- 1. Pasien yang didiagnosis tuberkulosis (TB) pulmonal
- 2. Bersedia menjadi responden

3.6.2 Kriteria Eksklusi

- 1. TB ekstrapulmonal
- 2. TB dengan gangguan imunitas (HIV, DM, Kanker, PPOK)

3.7 Cara Kerja Penelitian

3.7.1 Konversi Bismuth dan Hipermetilasi DNA

Tahapan pengerjaan konversi bisulfit DNA adalah sebagai berikut :

- 1. Mempersiapkan reagen CT Conversion:
 - a) Tambahkan 900L water, 300L M-Dilution Buffer, dam 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 alumunium 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.
- Mempersiapkan M-Wash Buffer: Tambahkan 24mL 100% ethanol ke 6mL M-Wah 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 pippeting up and down, kemudian sentrifugasi.
- 4. Tempatkan tube sampel ke thermal cycler sebagai berikut :
 - a) 98°C selama 10 menit
 - b) 64° C 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.
- 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.
- 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 -20^oC. Gunakan 1-4Lelusi 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 : AAATACTCCTCATTAAAACTACGCA : Tambahkan $170\mu L$ buffer
 - b) Kemudian n1 x v1 = n2 x v2; 100μ M x V1 = 0.3μ M x 1000μ L; V1 = 3μ L + 997μ L NFW
 - c) MF: TTTTATTTTCGTGTTTTATAGATCGT: Tambahkan 248μL buffer
 - d) Kemudian n1 x v1 = n2 x v2; 100 μ M x V1 = 0,3 μ M x 1000 μ L; V1 = 3μ L + 997 μ L NFW
 - e) UR : AAAATACTCCTCATTAAAACTACACA : Tambahkan 208μL buffer
 - f) Kemudian n1 x v1 = n2 x v2; 100 μ M x V1 = 0,3 μ M x 1000 μ L; V1 = 3μ L + 997 μ L NFW
 - g) UF: TTTTATTTTTGTGTTTATAGATTGT: Tambahkan 134µL

buffer

- 2. Kemudian n1 x v1 = n2 x v2; 100M x V1 = 10M x 100L; V1 = 1000/100L; V1 = 10μ L primer
- 3. Siapkan PCR Master Mix dalam Tube Eppendorf 1,5 mL berisi total 25 μL untuk setiap primer M dan U. Lihat pada table 3.1.

Tabel 3.1 Singleplex PCR

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

- 4. Isikan PCR Master Mix dari Tube Eppendorf ke dalam tube PCR masing-masing berisi 23μL.
- 5. Isikan 2 μ L DNA yang telah didilusi ke dalam tube PCR.
- 6. Setting mesin RT PCR:

Tabel 3.2 Kondisi Cycling

Metilasi	Unmethylated	
94°C, 2 min	94°C , 2 min	
98°C. 10 s	98°C, 10 s	40 Siklus
ŕ	51°C, 10 s	40 Sikius
51°C, 10 s	68°C 10 s	
68°C 10 s		
	94°C, 2 min 98°C, 10 s 51°C, 10 s	94°C, 2 min 94°C, 2 min 98°C, 10 s 51°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 magentic hot stirrer hingga mendidih dan berwarna jernih selama 5 menit.
- Pemanas dimatikan dan ditambahkan ethidium bromide, dan diaduk kembali.
- 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 μL larutan loading buffer. Lakukan hal yg sama sebanyak 40x. Kemudian ambil masing-masing 7 μL sampel dan campurkan pada larutan loading buffer sebagai pemberat sehingga memberi warna. Homogenkan keduanya.
- f. Sebanyak 5μL larutan DNA Ladder dan sebanyak 9 μL amplikon PCR yang telah dihomogenkan dengan larutan loading buffer ke dalam sumursumur gel pada alat elektroforesis gel.
- g. Posisi sampel pada sumur sumur gel dicatat.
- h. Elektroforesis dijalankan selama 70 menit dengan tegangan 80 Volt.
- Gel dipindahkan ke dalam Gel Documentation mendokumentasikan hasil elektroforesis.

Konversi bisulfit DNA genom dilakukan menggunakan EZ DNA Methylation-Gold Ki (ZymoResearch Inc., USA) sesuai dengan prosedur pada protokolnya.

3.8 Identifikasi Variabel

Variabel independent : Hipermetilasi gen reseptor vitamin D

Variabel dependent : Penderita tuberkulosis paru di Kota Medan

3.9 Definisi Operasional

Tabel 3.3 Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Penderita	Tuberkulosis	Rekam	Tuberkulosis	Nominal
tuberkulosis	pulmonal yang	medik		
paru di Kota	terinfeksi oleh			
Medan	Mycobacterium			
	tuberculosis			
Hipermetilasi	Tampak banyak pita	PCR	Terjadi	Nominal
gen Vitamin	(band) pada gel		hipermetilasi	
D receptor	elektroforesis			
(VDR)			Tidak terjadi	
			hipermetilasi	
			1	

3.10 Analisa Data

Pada penelitian ini dilakukan analisis data menggunakan perangkat lunak komputer, kemudian data akan dilakukan dengan analisa univariat untuk menjelaskan distribusi dari setiap variabel yang diteliti dan selanjutnya dengan pendekatan deskriptif untuk melihat gambaran hipermetilasi gen reseptor vitamin D dengan tuberkulosis paru

3.11 Alat dan Bahan

Alat dan bahan penelitian yang diperlukan selama penelitian di Lab Terpadu FK USU dapat dilihat pada tabel 3.4 di bawah ini.

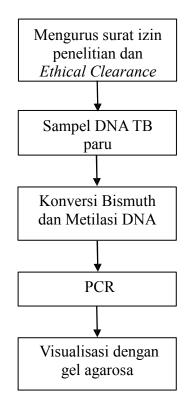
Tabel 3.4 Alat dan Bahan Penelitian

No	Nama	Kegunaan	Jumlah
1	Cap	Aseptik	1 box
2	Freezing container	Cryo	1
3	Hand seal	Aseptik	1 box
4	Masker	Aseptik	1 box

5	PBS	Isolasi DNA, washing	1 pack
6	Buffer Tris	Elektroforesis	1 pack
7	Tip 10 micro	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	2 box
8	Tip 20 micro	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 box
9	Tip 100 micro	Isolasi DNA	1 box
10	Tip 200 micro	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 box
11	Tip 1000 micro	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 box
12	Tube 5 mL	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 box
13	Tube PCR	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 box
14	Rak tube PCR1 mL	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 buah
15	Reagen Isolasi DNA	Isolasi DNA	1 pack
17	PBS	Isolasi DNA	5 Liter
18	Primer DNA	PCR	4 pack
19	Mastemix PCR kit	PCR	2 pack
20	Gel agarosa	Elektroforesis	1 pack
21	Alat Elektroforesis	Elektroforesis	2 buah
22	Dye stain	Elektroforesis	10 mL
23	Ethidium Bromide	Elektroforesis	5 mL
24	Mikropipet 10	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 buah
25	Mikropipet 20	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 buah

26	Mikropipet 100	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 buah
27	Mikropipet 1000	Isolasi DNA, PCR dan Elektroforesis	1 buah
28	Mesin PCR	PCR dan Elektroforesis	1 buah

3.12 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian