

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular dan salah satu penyebab kematian akibat infeksi tertinggi di dunia. Penyakit tuberkulosis disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang dapat disebarkan penderita TB ke udara, seperti pada saat penderita batuk. Penyakit ini paling sering menyerang paru-paru yaitu tuberkulosis paru, tetapi bisa juga menyerang luar paru-paru yaitu tuberkulosis ekstrapulmonal seperti limfadenitis TB, TB tulang, meningitis TB dan lain-lain.^{1,2} Secara geografis, pada tahun 2020 penderita TB terbanyak terdapat di wilayah Asia Tenggara yaitu sebesar 43%.¹ Indonesia merupakan salah satu negara dengan beban TB tertinggi di dunia setelah India di tahun 2021 dengan jumlah kasus sebanyak 443.325 kasus.³ Sekitar 90% penyakit TB ditularkan oleh orang dewasa, terutama laki-laki.¹

Kerentanan akan terinfeksi TB dipengaruhi oleh faktor *host*, agen dan lingkungan.⁴ Vitamin D dan reseptornya yaitu reseptor vitamin D sangat berperan penting dalam sistem imunitas tubuh. Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara kekurangan vitamin D dengan perkembangan infeksi TB. Kekurangan vitamin D pada penderita TB menunjukkan bahwa vitamin D menjadi faktor risiko untuk perkembangan penyakit TB.^{4,5} Makrofag diaktifkan oleh vitamin D dan berikatan dengan reseptor vitamin D di dalam makrofag. Hal tersebut akan mengaktifkan *cathelicidin* dan *Mycobacterium tuberculosis* akan tereliminasi.^{6,7}

Faktor genetik mempengaruhi kerentanan terhadap penyakit.⁸ Kerentanan tubuh terinfeksi TB dipengaruhi oleh faktor genetik, salah satunya yaitu epigenetik.^{8,9} Epigenetik merupakan mekanisme *reversible* yang mengubah ekspresi gen tanpa mengubah urutan basa DNA, sehingga akan terjadi perubahan fenotip tanpa perubahan genotip.¹⁰ Mekanisme epigenetik terdiri tiga jenis perubahan yaitu DNA metilasi, modifikasi histon dan *non-coding*

RNA.¹¹ Metilasi DNA adalah proses penambahan gugus metil (-CH₃) pada *Cytosine* (C) yang diubah menjadi *5-methylcytosine* (5-mC) pada urutan *Cytosine-Phosphate Guanine* (CpG) dalam DNA sehingga terjadi perubahan struktur kromatin yang menyebabkan penurunan atau penekanan ekspresi gen (*gene silencing*) seperti gen reseptor vitamin D yang kemudian menghambat pengeliminasian *Mycobacterium tuberculosis* sehingga hal ini menyebabkan penurunan sistem imunitas tubuh.^{10,12,13} Hipometilasi DNA adalah hilangnya gugus metil (-CH₃) yang terdapat dalam nukleotida *5-methylcytosine* (5-mC) pada urutan *Cytosine-Phosphate Guanine* (CpG) dalam DNA.¹⁴ Hal ini berpengaruh terhadap ketidakstabilan genom dan penurunan atau penekanan ekspresi gen.¹⁵ Hipometilasi gen reseptor vitamin D pada penderita TB akan menghambat ekspresi gen reseptor vitamin D yang seharusnya berperan pada respons imunitas tubuh untuk mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis*.

Penelitian yang dilakukan Wang, dkk didapatkan hasil bahwa metilasi gen reseptor vitamin D memiliki peran sebagai faktor risiko terkena infeksi TB dan dapat menunjukkan prognosis penyakit TB.⁴ Penelitian hipometilasi lebih banyak dihubungkan dengan penyakit kanker, seperti penelitian yang dilakukan oleh Shao, dkk menunjukkan bahwa hipometilasi pada promotor PGK1 memiliki peran dalam perkembangan dan prognosis penyakit kanker.¹⁶

Penelitian tentang hipometilasi DNA pada TB yang dilakukan oleh Koh, dkk menunjukkan bahwa hipometilasi DNA CD82 pada TB mempunyai kontribusi dalam mengatur respons imunitas terhadap *Mycobacterium tuberculosis* karena menyebabkan penurunan fungsi fagolisosom.^{13,17} Namun untuk penelitian hipometilasi gen reseptor vitamin D pada TB belum diteliti lebih dalam. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa metilasi gen reseptor vitamin D adalah salah satu alasan seseorang rentan terhadap tuberkulosis.^{8,18} Metilasi DNA saat ini sangat diminati untuk diteliti karena mempengaruhi kerentanan terinfeksi TB. Namun, penelitian yang menunjukkan peran vitamin D dalam mencegah tuberkulosis masih terbatas.¹⁸

Dengan adanya jumlah kasus TB yang semakin meningkat setiap tahunnya khususnya di Indonesia, maka diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai

peran metilasi gen reseptor vitamin D terhadap kejadian TB. Penelitian tentang metilasi gen reseptor vitamin D pada TB masih sangat terbatas, khususnya di Kota Medan dengan jumlah penduduk yang cukup banyak dan sesuai dengan data dari Badan Pusat Statistik Provinsi Sumatera Utara tahun 2021 bahwa terdapat 12.105 orang penderita TB paru di Kota Medan.¹⁹ Hal inilah yang melatarbelakangi peneliti tertarik untuk mengetahui gambaran hipometilasi gen reseptor vitamin D pada penderita tuberkulosis paru di Kota Medan sebagai skrining preventif ini diperlukan untuk mencegah terinfeksi TB paru.

1.2 Rumusan Masalah

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

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui gambaran hipometilasi 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 gen reseptor vitamin D pada penderita tuberkulosis paru berdasarkan jenis kelamin di Kota Medan.
2. Untuk mengetahui gambaran gen reseptor vitamin D pada penderita tuberkulosis paru berdasarkan usia di Kota Medan.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Masyarakat

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

1.4.2 Bagi Peneliti

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

1.4.3 Bagi Institusi

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

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

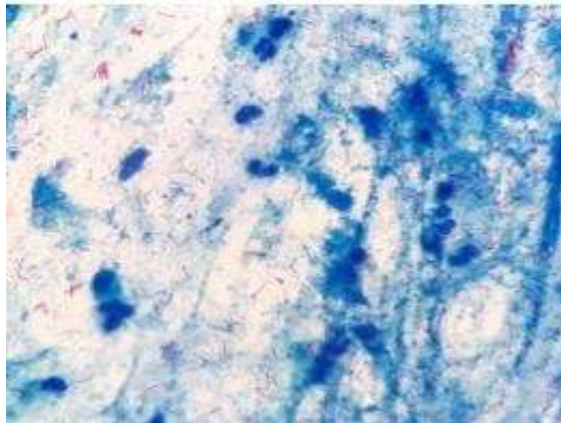
2.1 Tuberkulosis

2.1.1 Definisi Tuberkulosis

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri penyebab penyakit tuberkulosis, dikenal sebagai salah satu penyakit tertua di dunia dan penyebab kematian akibat infeksi tertinggi di dunia. Infeksi tuberkulosis dapat mempengaruhi semua organ dalam tubuh, tetapi paru-paru adalah organ yang paling umum. Tuberkulosis dapat menular melalui droplet yang keluar dari saluran pernapasan saat penderita TB batuk atau bersin.²⁰ Meskipun sudah banyak upaya untuk meningkatkan identifikasi kasus dan kepatuhan pengobatan, tuberkulosis tetap menjadi masalah kesehatan masyarakat utama di dunia.²¹

2.1.2 Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis adalah bakteri berbentuk batang dengan ukuran 0,5 μm x 3 μm , bakteri gram positif, aerob obligat, tidak memiliki endospora dan kapsul, tidak motil, bersifat tahan asam (Gambar 2.1). *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai karakteristik yang unik yaitu dinding selnya kaya lipid misalnya asam mikolat, lapisan peptidoglikan, arabinogalaktan, dan lipoarabinomanan. Asam mikolat hanya dijumpai pada dinding sel *mycobacterium* dan tidak dijumpai pada bakteri lain. Dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* inilah yang membuat bakteri lebih tahan terhadap asam sehingga dikenal juga sebagai Bakteri Tahan Asam (BTA).²⁰



Gambar 2.1 Visualisasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen pada perbesaran 1000x.²²

2.1.3 Epidemiologi Tuberkulosis

Epidemi tuberkulosis global telah dipengaruhi oleh pandemi COVID-19. Secara global, jumlah kasus yang didiagnosis dengan infeksi tuberkulosis telah menurun. Sekitar 7,1 juta orang terinfeksi TB pada tahun 2019 dan 5,8 juta kasus TB pada tahun 2020. Dari 2019 hingga 2020, kasus menurun sekitar 18%. Hal ini karena semua orang mengikuti protokol kesehatan untuk mengurangi jumlah kasus COVID-19. Baik COVID-19 maupun TB menyebar melalui tetesan dari batuk atau bersin orang yang sakit.²³

Ada beberapa negara di dunia dengan jumlah kasus TB yang tinggi di seluruh dunia, yaitu India (26%), China (8,4%), Indonesia (8,5%), Pakistan (5,7%), Filipina (6%), Bangladesh (3,6%), Nigeria (4,4%) dan Afrika Selatan (3,6%).¹

Di Indonesia, terjadi 351.936 kasus tuberkulosis pada tahun 2020. Pada tahun 2019 yaitu 568.987 kasus, hal ini menurun dari tahun sebelumnya. Tiga provinsi melaporkan kasus tertinggi, yaitu Jawa Barat, Jawa Timur, dan Jawa Tengah, karena jumlah penduduknya yang besar. Kasus tuberkulosis di ketiga provinsi tersebut mencapai (46%), hampir separuh kasus tuberkulosis di Indonesia. Pada tahun 2020, kelompok usia 45-54 tahun memiliki kasus TB terbanyak yaitu sebesar 17,3%, diikuti oleh kelompok usia 25-34 tahun sebesar 16,8%, dan usia 15-24 tahun. kelompok dengan 16,7%. Menurut data status kesehatan Indonesia tahun

2019, jumlah kasus TB pada laki-laki lebih tinggi daripada perempuan di seluruh tanah air dan di seluruh provinsi di Indonesia.²⁴

2.1.4 Faktor Risiko Tuberkulosis

Semua orang berisiko untuk terinfeksi TB, tetapi terdapat kelompok tertentu yang harus dites infeksi TB karena berisiko lebih tinggi untuk terinfeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, antara lain.²⁵

Orang yang memiliki kontak erat dengan penderita penyakit TB

Orang-orang dari negara dengan tingkat kejadian TB yang tinggi (kebanyakan negara di Amerika Latin, Karibia, Afrika, Asia, Eropa Timur, dan Rusia)

Orang yang tinggal atau bekerja di lingkungan berisiko tinggi (misalnya fasilitas pemasyarakatan, fasilitas perawatan jangka panjang atau panti jompo, dan tempat penampungan tunawisma)

Petugas kesehatan yang merawat penderita TB

Orang-orang dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah, terutama dengan orang yang memiliki kondisi seperti HIV/AIDS, DM, transplantasi organ, kanker dan sebagainya.

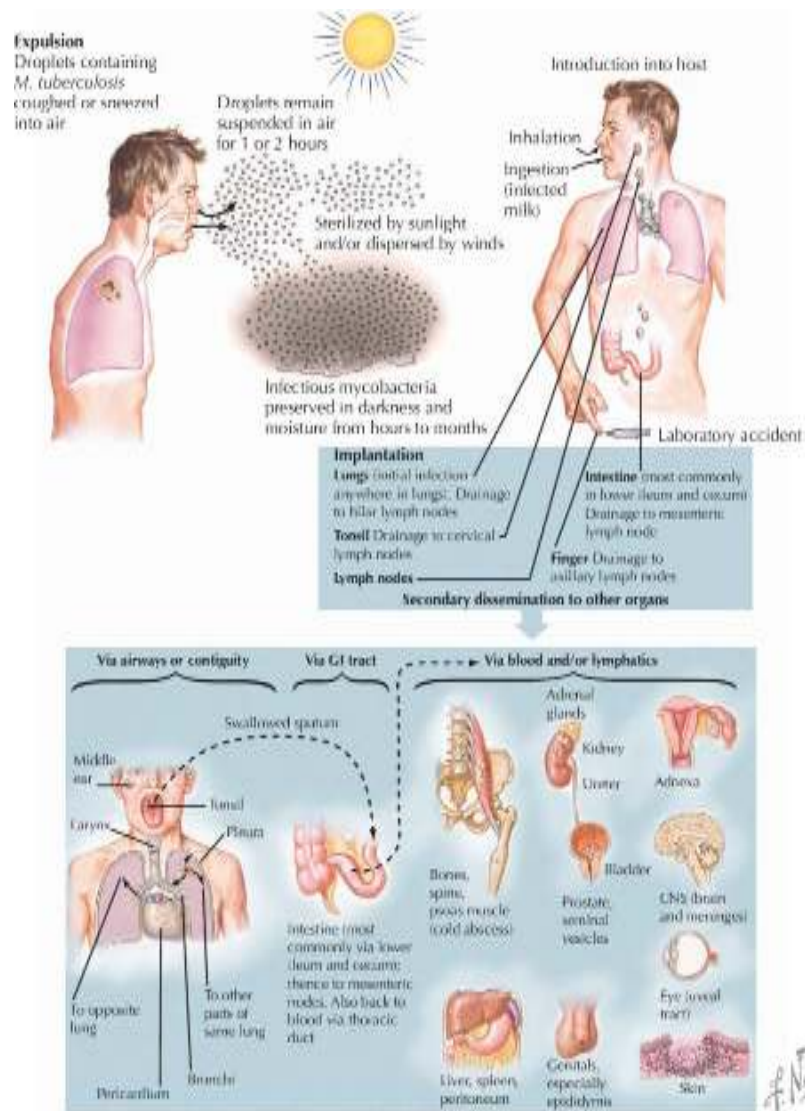
Bayi, anak-anak, dan remaja yang terpajan pada orang dewasa yang memiliki peningkatan risiko infeksi TB laten atau penyakit TB.

Beberapa faktor risiko tuberkulosis telah diidentifikasi selama beberapa dekade terakhir, berdasarkan data dari WHO, banyak kasus baru disebabkan oleh lima faktor yaitu gizi buruk, minum minuman keras, infeksi HIV, merokok (terutama laki-laki), dan diabetes.¹ Orang dengan faktor risiko disebut kelompok rentan tuberkulosis, dan prevalensi serta kejadian tuberkulosis meningkat lebih cepat daripada populasi umum. WHO merekomendasikan dan menetapkan pedoman harus mengutamakan kelompok rentan TB untuk skrining TB aktif daripada populasi umum.¹

2.1.5 Cara Penularan Tuberkulosis

Tuberkulosis disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang merupakan klasifikasi dari *Mycobacterium Tuberculosis Complex*

(MTC). *Mycobacterium tuberculosis* dapat ditularkan dari orang ke orang melalui droplet nuclei yang tersebar di udara ketika penderita TB batuk, bersin, berteriak. Ukuran partikel yang tersebar di udara adalah 1-5 μm dan mengandung basil tuberkel. Infeksi dapat terjadi setelah terhirup, ketika droplet nuclei yang mengandung tuberkulosis menyebar ke mulut dan hidung hingga mencapai saluran pernapasan bagian atas, bronkus, hingga ke alveoli (Gambar 2.2). Bakteri tipe *Bacillus* ini membutuhkan waktu 2-10 minggu untuk tumbuh. Saat bakteri tumbuh, respons imun yang diperantarai sel pun akan terjadi. Ini dapat dideteksi dengan *tuberculin skin test* (TST).²⁶



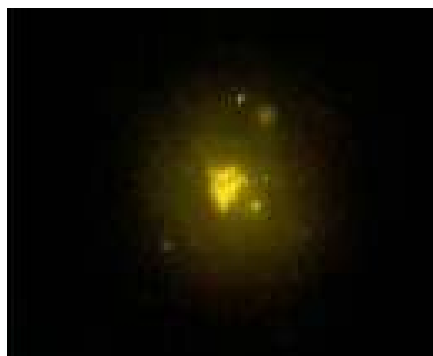
Gambar 2.2 Penularan TB.²⁰

2.1.6 Penegakan Diagnosis Tuberkulosis

Kunci untuk diagnosis dini tuberkulosis adalah indikator yang sangat mencurigakan. Diagnosis tidak sulit bagi individu dalam populasi berisiko tinggi yang ditandai dengan gambaran infiltrat dan kavitas di lobus atas pada pemeriksaan radiologi yaitu rontgen thorax.²⁰ Diagnosis tuberkulosis dapat ditegakkan melalui beberapa pemeriksaan antara lain sebagai berikut:

a. Pemeriksaan Mikroskopik Basil Tahan Asam (BTA)

Dugaan diagnosis yang masih umum, berdasarkan temuan BTA pada pemeriksaan mikroskopik berasal dari sampel diagnostik seperti dahak atau jaringan misalnya, biopsi kelenjar getah bening.²⁰ Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan sputum/dahak pagi dan sewaktu, kemudian selanjutnya akan diberi pewarnaan Ziehl-Neelsen (ZN) yang dibaca menggunakan mikroskop cahaya biasa dengan emersi perbesaran 100x. BTA pada sputum dengan pewarnaan ZN akan menunjukkan hasil positif bila sputum mengandung paling sedikit 105 BTA/ml. Metode pewarnaan Ziehl-Neelsen (ZN) masih menjadi pilihan pertama untuk deteksi awal infeksi TB (Gambar 2.1). Selain metode Ziehl-Neelsen, ada metode pewarnaan *fluorochrome* yang dibaca menggunakan mikroskop fluoresensi dengan perbesaran 400x yang dapat mendeteksi BTA dengan jumlah minimal 104 BTA/ml (Gambar 2.3).²⁷



Gambar 2.3 Hasil visualisasi mikroskopis pewarnaan BTA dengan metode pewarnaan *fluorochrome*.²⁷

b. Kultur

Medium pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yaitu *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT) merupakan media kultur cair. Kultur MGIT biasanya menjadi positif setelah beberapa waktu yaitu 10 hari hingga 2-3 minggu, dimana tabung akan dibaca setiap minggu ke-8 inkubasi sebelum hasil negatif. Sampel juga dapat diinokulasi pada media telur yaitu Lowenstein-Jensen atau pada media agar yaitu Middlebrook 7H10 atau 7H11 dan dikultur pada suhu 37°C (kurang dari 5% CO₂ untuk media Middlebrook).²⁰

c. Radiografi Thorax

Pemeriksaan TB pulmonal secara radiologis dilakukan dengan menggunakan posisi rontgen dada normal, biasanya *posterior-anterior* dan *lateral*. Teknik pemeriksaan thorax dengan menggunakan sinar X yaitu *Chest X-Ray* (CXR) merupakan pencitraan telah digunakan sebagai alat utama untuk mendeteksi TB paru. CXR memiliki sensitivitas tinggi tetapi spesifisitasnya yang buruk. Hasil pemeriksaan TB paru yaitu terlihat gambaran infiltrat dan kavitas di bagian superior apeks paru.²⁰

2.1.7 Pengobatan Tuberkulosis

Dua tujuan utama pengobatan tuberkulosis adalah (1) untuk mencegah morbiditas dan kematian dengan menyembuhkan TB, sekaligus mencegah munculnya resistensi terhadap obat dan (2) menghentikan penularan kepada orang lain.²⁰ Ada empat obat utama yang dianggap sebagai pengobatan pertama untuk pengobatan tuberkulosis yaitu isoniazid, rifampisin, pirazinamid, dan etambutol yang akan diberikan secara oral.²⁸ Sebelumnya obat streptomisin merupakan pengobatan lini pertama yang diberikan secara intramuskular, namun sekarang jarang digunakan karena tingkat kejadian resistensi yang tinggi dan menyebabkan toksisitas dibanding obat lain.²⁰

2.1.8 Pencegahan Tuberkulosis

Pengobatan untuk penyakit tuberkulosis memerlukan waktu yang cukup lama sehingga lebih baik melakukan pencegahan, terutama untuk kelompok yang rentan terinfeksi tuberkulosis. Tindakan pencegahan yang bisa dilakukan seperti meningkatkan perilaku hidup bersih dan sehat, meningkatkan daya tahan tubuh melalui pola hidup sehat, menerapkan etika batuk dan bersin, tidak membuang dahak ataupun meludah sembarangan, menyesuaikan kualitas perumahan dan lingkungan sesuai dengan standar rumah sehat, dan mengobati penyakit penyerta dari TB.^{29,30}

2.2 Tuberkulosis dan Hipometilasi Gen Reseptor Vitamin D

Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* merupakan penyebab tunggal infeksi tuberkulosis dan menjadi salah satu dari 10 penyebab kematian tertinggi di seluruh dunia. Berdasarkan data dari *World Health Organization* (WHO) tahun 2020, *Mycobacterium tuberculosis* menyerang seperempat orang dari populasi dunia.¹ Ada banyak jalur transkripsi *host* yang dikendalikan oleh perubahan epigenetik dan micro-RNA (MiRNAs).⁷

Kekurangan vitamin D dan kerentanan terhadap patogen infeksi bukanlah hal baru.³¹ Vitamin D merupakan kelompok senyawa sterol dan bersifat larut lemak. Vitamin D berperan dalam menjaga keseimbangan kalsium dan fosfor, yang dibantu oleh peran hormon paratiroid dan calcitonin. Vitamin D terdiri atas dua jenis, yaitu vitamin D2 (ergokalsiferol) dan vitamin D3 (kolekalsiferol). Vitamin D3 dapat berasal dari 7-dehydrocholesterol yang terdapat pada kulit, dan akan mengalami konversi dengan bantuan sinar ultraviolet menjadi pre-vitamin D, kemudian akan mengalami isomerisasi termal menjadi vitamin D3 (kolekalsiferol).⁶

Vitamin D yang diserap dari makanan dan kulit akan masuk ke dalam aliran darah, kemudian akan berikatan dengan protein transport yaitu vitamin *D-binding protein* (DBP) atau globulin, lalu akan ditransportasikan ke hepar. Vitamin D mengalami hidrosilasi dengan

bantuan enzim 25-D3- hidroksilase (CYP27A1 atau CYP27A2), sehingga menjadi kalsidiol (25(OH)D). Selanjutnya kalsidiol akan menuju ginjal dan mengalami konversi menjadi kalsitriol (1,25-(OH)₂-D₃) bantuan enzim 1- α -hydroxylase (CYP27B1) yang merupakan suatu enzim yang distimulasi oleh hormon paratiroid.⁶

Kerentanan pada infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dipengaruhi oleh faktor agen, lingkungan, dan genetik pejamu. Peran vitamin D dalam imunitas pejamu terhadap infeksi tuberkulosis telah lama diketahui. Hormon penting yang mengatur aktivitas berbagai sel pertahanan dan kekebalan tubuh seperti limfosit, monosit, makrofag, dan sel epitel adalah kalsitriol (1-25-dihidroksivitamin D₃).⁷ Mediator penting dari respons inflamasi terhadap *Mycobacterium tuberculosis* yaitu *Toll-like receptors* (TLRs) seperti TLR-2 yang kemudian dimana keadaan tersebut akan menjadi sinyal untuk mengaktifkan reseptor vitamin D dan meningkatkan enzim *1-Alpha-hydroxylase*.^{4,32}

Gen reseptor vitamin D merupakan salah satu komponen penting yang berperan sebagai pertahanan dari tubuh terhadap *Mycobacterium tuberculosis*.⁸ Reseptor vitamin D kemudian akan mengaktifasi kalsitriol. Vitamin D dalam bentuk aktif yaitu kalsitriol (1-25-dihidroksivitamin D₃) akan membatasi pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dengan memproduksi *cathelicidin* yang merupakan peptida antimikroba. Selama infeksi tuberkulosis, vitamin D akan menghambat proliferasi intraseluler tuberkulosis dengan mengaktifkan makrofag. Makrofag akan berikatan dengan reseptor vitamin D di makrofag, yang kemudian mengaktifkan *cathelicidin*, dan *Mycobacterium tuberculosis* dieliminasi di fagolisosom. Oleh karena itu, rendahnya kadar kalsitriol atau kelainan reseptor vitamin D dapat mengganggu fungsi makrofag dan dengan demikian meningkatkan kerentanan terhadap tuberkulosis, sehingga mutasi gen reseptor vitamin D memiliki berkontribusi dalam kerentanan terhadap tuberkulosis.^{4,6,8,33}

M. tuberculosis merupakan klasifikasi dari *Mycobacterium*

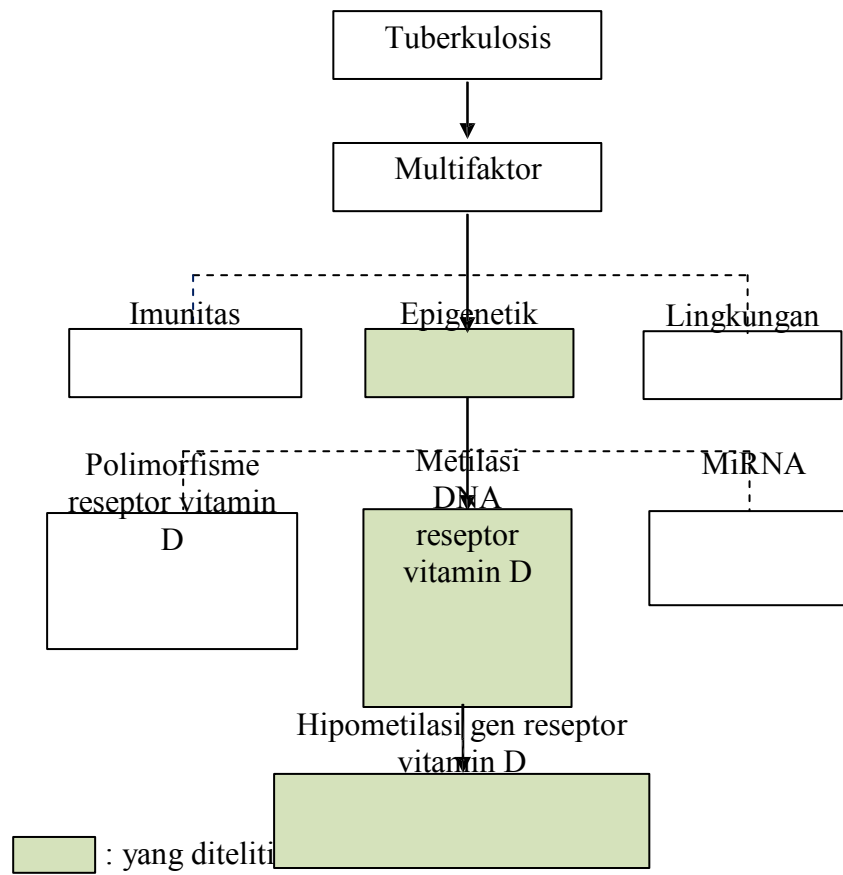
Tuberculosis Complex (MTC). Jenis lain dari MTC adalah *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, dan *M. microti*. Walaupun konsistensi urutan genom antara MTC lebih dari 99%, tetapi setiap keturunan memiliki virulensi yang berbeda. Berdasarkan studi, strain virulensi yang berbeda dapat diatur oleh proses metilasi DNA. Faktor genetik memiliki peran penting terhadap kejadian terinfeksi TB yang mempengaruhi penurunan imunitas tubuh dan dihubungkan dengan mekanisme epigenetik.^{8,11}

Epigenetik adalah mekanisme yang mengubah ekspresi gen tanpa mengubah urutan basa DNA secara *reversible*, sehingga akan terjadi perubahan fenotip tanpa perubahan genotip tetapi dapat mengubah cara tubuh dalam menafsirkan urutan DNA.¹⁰ Perubahan epigenetik yang dimediasi oleh *DNA methyltransferase* (DNMT) dan *Enhancer of zeste homologue 2* (EZH2) yang merupakan protein grup polycomb yang memiliki peranan penting dalam mekanisme epigenetik, hal ini mempengaruhi keadaan imunitas.⁹ Metilasi DNA adalah proses penambahan gugus metil (-CH₃) pada *Cytosine* (C) diubah menjadi *5-methylcytosine* (5-mC) oleh *DNA methyltransferase* (DNMT) pada urutan *Cytosine-Phosphate Guanine* (CpG) dalam DNA. Mekanisme ini mempengaruhi proses transkripsi yang berfungsi dalam pembentukan *cathelicidin*.¹⁵ Hal ini akan menghambat ekspresi gen reseptor vitamin D sehingga menghambat imunitas tubuh, hal ini akan mempengaruhi proses eliminasi dari *Mycobacterium tuberculosis*.^{10,12,13}

Hipometilasi DNA adalah hilangnya gugus metil (-CH₃) yang terdapat dalam nukleotida *5-methylcytosine* (5-mC) pada urutan *Cytosine-Phosphate Guanine* (CpG) dalam DNA. Hipometilasi menunjukkan keadaan gugus metil yang tidak termetilasi pada urutan spesifik *Cytosine-Phosphate Guanine* (CpG) biasanya termetilasi.¹⁴ Hal ini berpengaruh terhadap ketidakstabilan genom dan penurunan atau penekanan ekspresi gen.¹⁵ Hipometilasi gen reseptor vitamin D pada penderita TB akan menghambat ekspresi gen reseptor vitamin D yang seharusnya berperan

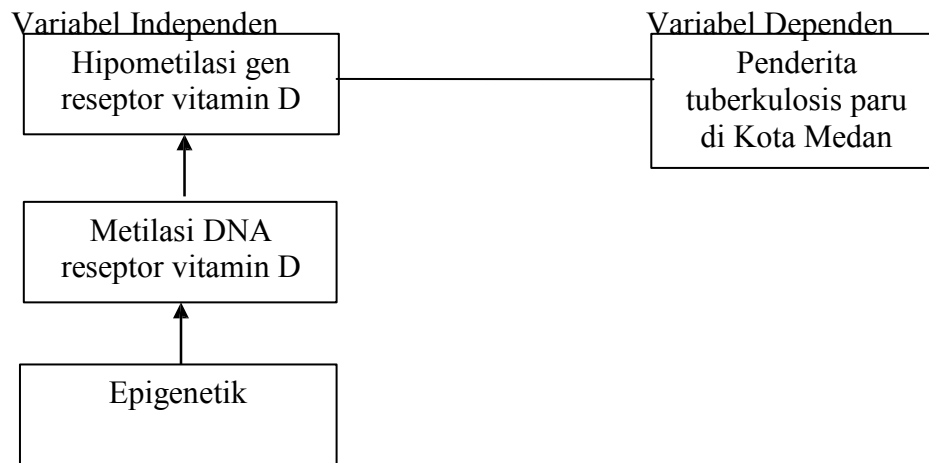
pada respons imunitas tubuh untuk mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis*. Mekanisme ini menyebabkan penurunan kekebalan imunitas tubuh sehingga rentan terinfeksi TB paru. Skrining dini terhadap penderita TB paru dan kelompok rentan terinfeksi TB paru sangat diperlukan untuk pencegahan penularan infeksi TB paru kepada orang lain.

2.3 Kerangka Teori



Gambar 2.4 Kerangka Teori

2.4 Kerangka Konsep



Gambar 2.5 Kerangka Konsep

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

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

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian 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 2021: 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 Hj. Adam Malik, Rumah Sakit Methodist dan Rumah Sakit BP4 Kota Medan.

3.4 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

3.4.1 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah DNA penderita tuberkulosis paru pada penelitian yang dilakukan oleh Maria Oktaviana Pardosi, dkk, pada tahun 2021.

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.

3.5 Estimasi Besar Sampel

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

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

$$n_1 = \frac{\quad}{\quad}$$

n = Besar sampel

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

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 :

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

3.6 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

3.6.1 Kriteria Inklusi

1. Pasien yang di diagnosis 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

3.7.1 Konversi Bismuth dan Metilasi DNA

Konversi bisulfit DNA genom dilakukan menggunakan EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research Inc., USA) sesuai dengan prosedur

pada protokolnya. Dilakukan pembuatan DNA kontrol bisulfit termetilasi (*Methylation*) dan tidak termetilasi (*Unmethylated*) 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 900 L water, 300 L M-Dilution Buffer, dan 50 L M-Dissolving Buffer ke setiap 1 *tube* reagen CT Conversion.
 - 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°C, dan 1 bulan pada suhu -20°C.
2. Mempersiapkan M-Wash Buffer : Tambahkan 24 mL 100% ethanol ke 6 mL M-Wash Buffer (D5005) atau 96 mL 100% ethanol ke 24 mL M-Wash Buffer *concentrate* (D5006).
3. Tambahkan 130 L reagen CT Conversion ke 20 L 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 600 L 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.
7. Sentrifugasi 12.000g selama 30 detik. Buang cairan.
8. Tambahkan 100 L M-Wash Buffer ke *column*, sentrifugasi 12.000g selama 30 detik kemudian buang cairan.

9. Tambahkan 200 L M-Desulphonation Buffer ke *column* dan biarkan tegak pada suhu kamar (20-30°C) selama 15-20 menit. Setelah inkubasi, sentrifugasi 12.000g selama 30 detik, kemudian buang cairan.
10. Tambahkan 200 L M-Wash Buffer ke *column*. Sentrifugasi 12.000g selama 30 detik, kemudian buang cairan. Tambahkan lagi 200 L M-Wash Buffer dan sentrifugasi 12.000g selama 30 detik, kemudian buang cairan.
11. Tempatkan *column* ke tube 1,5 mL. Tambahkan 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°C. 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 L buffer. Kemudian $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$;
 $100 \text{ M} \times V_1 = 0,3 \text{ M} \times 1000 \text{ L}$; $V_1 = 3 \text{ L} + 997 \text{ L NFW}$
 - b. MF: TTTTATTTTCGTGTTTATAGATCGT Tambahkan
 248 L buffer Kemudian $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$; $100 \text{ M} \times V_1$
 $= 0,3 \text{ M} \times 1000 \text{ L}$; $V_1 = 3 \text{ L} + 997 \text{ L NFW}$
 - c. UR : AAAATACTCCTCATTA AAAACTACACA
 Tambahkan 208 L buffer. Kemudian $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$;
 $100 \text{ M} \times V_1 = 0,3 \text{ M} \times 1000 \text{ L}$; $V_1 = 3 \text{ L} + 997 \text{ L}$
 NFW

- d. UF : TTTTATTTTTGTGTTTATAGATTGT Tambahkan 134 L buffer. Kemudian $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$; $100 \text{ M} \times V_1 = 0,3 \text{ M} \times 1000 \text{ L}$; $V_1 = 3 \text{ L} + 997 \text{ L}$
2. Siapkan PCR Master Mix dalam *Tube* Eppendorf 1,5 mL berisi total 25 L untuk setiap primer M dan U :
 - a. 12,5 L 2XPCR Buffer for KOD-Multi&Epi
 - b. 0,75 L Forward Primer
 - c. 0,75 L Reverse Primer
 - d. 0,5 L KOD Multi&Epi
 - e. 8,5 L Nuclease-Free Water
 - f. 2 L DNA
 3. Isikan PCR Master Mix dari *Tube* Eppendorf ke dalam *tube* PCR masing-masing berisi 23L.
 4. Isikan 2 L DNA yang telah didilusi ke dalam *tube* PCR.
 5. *Setting* mesin RT PCR :

10 siklus : 94⁰C selama 2 menit (aktivasi polimerase/pre-denaturasi) dan 30 siklus :

 - a. 98⁰C selama 10 detik (denaturasi),
 - b. 51⁰C selama 30 detik (*annealing*) untuk Metilasi dan Unmetilasi
 - c. 68⁰C selama 15 detik (ekstensi)
 6. Baca hasil reaksi, lanjutkan ke tahap elektroforesis gel.

3.7.3 Elektroforesis Gel

Hasil PCR divisualisasi dengan gel agarosa. Tahapan pengerjaan dengan elektroforesis gel pada 40 sampel maka :

1. Untuk membuat gel agarosa 2%, ditimbang 4,8 gr agarose dalam 240 ml TAE . Larutan dipanaskan dan diaduk di atas *magnetic hot stirrer* hingga mendidih dan berwarna jernih selama 5 menit.
2. Pemanas dimatikan dan ditambahkan larutan ethidium bromide 2 μL , dan diaduk kembali.

3. Cairan dituang ke 2 Casting Tray dengan *Gel Comb* dan dibiarkan sampai mengeras sekitar 15 menit.
4. Setelah gel mengeras, cabut *Gel Comb* dan dibiarkan sampai mengeras.
5. 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.
6. Sebanyak 5 μL larutan DNA ladder dan sebanyak 9 μL amplicon PCR yang telah dihomogenkan dengan larutan loading buffer ke dalam sumur-sumur gel pada alat elektroforesis gel.
7. Posisi sampel pada sumur sumur gel dicatat.
8. Elektroforesis dijalankan selama 70 menit dengan tegangan 80 Volt.
9. Gel dipindahkan ke dalam *Gel Documentation* mendokumentasikan hasil elektroforesis.

3.8 Identifikasi Variabel

Variabel independen : Hipometilasi gen reseptor vitamin D

Variabel dependen : Penderita tuberkulosis paru di Kota Medan

3.9 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Penderita tuberkulosis paru di Kota Medan	Tuberkulosis pulmonal yang terinfeksi oleh <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rekam medik	Pengambilan data dari RS Rumah Sakit Hj. Adam Malik,	Tuberkulosis	Nominal

	sekarang- kurangnya 3 minggu		Rumah Sakit Methodist dan Rumah Sakit BP4 Kota Medan		
Hipometilasi gen reseptor vitamin D	Tampak sedikit pita (<i>band</i>) pada gel elektroforesis	PCR	Pengambilan data sesuai dengan hasil PCR	Terjadi hipometilasi Tidak terjadi hipometilasi	Nominal

3.10 Analisa Data

Pada penelitian ini dilakukan analisa 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 hipometilasi gen reseptor vitamin D dengan tuberkulosis paru.

3.11 Alat dan Bahan

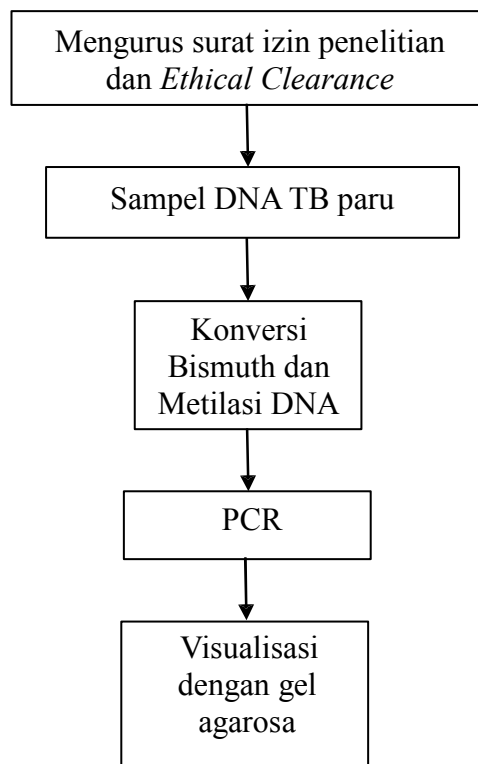
Alat dan bahan penelitian yang diperlukan selama penelitian di Lab Terpadu FK USU dapat dilihat pada tabel 3.2 di bawah ini.

Tabel 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

No	Nama	Kegunaan	Jumlah
1	<i>Cap</i>	Aseptik	1 box
2	<i>Freezing container</i>	Cryo	1
3	<i>Hand seal</i>	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

3.12 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian