

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi di dunia karena infeksi. Tuberkulosis disebabkan oleh basil *Mycobacterium tuberculosis* yang penularannya terjadi melalui bakteri yang disebarkan oleh penderita TB ke udara misalnya saat penderita batuk. Penyakit ini paling sering mengenai paru (TB paru) namun dapat juga mengenai diluar paru (TB ekstraparu).¹

Berdasarkan data WHO telah dilaporkan 7,1 juta orang menderita TB pada tahun 2019 dimana jumlah ini menurun secara perlahan dalam beberapa tahun terakhir. India dan Indonesia merupakan dua negara dengan peningkatan penderita TB tertinggi di dunia, di Indonesia peningkatan terjadi dari 331.701 kasus pada tahun 2015 menjadi 562.049 kasus pada tahun 2019. Dimana jumlah kasus penyakit ini meningkat sebanyak 69% di Indonesia.¹ Menurut info DATIN Kementerian Kesehatan RI tahun 2016 pada tuberkulosis (TB) dapat dilakukan pengobatan hingga sembuh selama 6 sampai 1 tahun. Apabila pengobatan tidak dilakukan secara teratur dan kombinasi yang tidak lengkap maka akan menyebabkan resistensi terhadap obat anti tuberkulosis (OAT) atau *Multi Drug Resistance* (MDR).²

TB MDR merupakan penderita tuberkulosis yang disebabkan oleh resistensi terhadap obat anti tuberkulosis (OAT) yang paling ampuh yaitu rifampisin dan isoniazid dengan atau tanpa resisten terhadap OAT lainnya.³ Pada tahun 2015 WHO memperkirakan sekitar 480.000 kasus baru TB MDR ditemukan dan 190.000 kematian. Tahun 2018 diperkirakan ada sekitar 186.772 kasus baru TB MDR yang meningkat dari 160.684 pada tahun 2017. Berdasarkan TB report WHO 2019 estimasi kasus resistensi di Indonesia adalah 2,4% dari 13% kasus TB MDR yang diberi pengobatan.⁴

TB MDR dapat terjadi karena dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain pengobatan yang tidak adekuat disebabkan karena tingkat resistensi dengan obat

tersebut sudah tinggi atau pemberian jenis obat yang tidak tepat, pemberian pengobatan tunggal saat pengobatan TB, konsumsi obat yang tidak teratur, dan pemakaian obat kombinasi yang tidak dicampur dengan baik.⁵ Selain itu masih ada faktor lain yaitu faktor imunitas dan faktor genetik pejamu yang beberapa tahun terakhir menjadi fokus penelitian sebagai penyebab terjadinya TB MDR. Kadar vitamin D dan polimorfisme gen VDR telah dikaitkan dengan terjadinya TB MDR.⁴

Vitamin D memberikan efek antimikroba melalui *vitamin D receptor* pada sebagian besar sel imun seperti makrofag, limfosit T dan B, dan neutrophil.⁶ Gen VDR merupakan faktor transkripsi yang berfungsi dalam mengatur respon imunologi dengan mengeluarkan peptide antimikroba, seperti *cathelicidin*. Gen ini berperan dalam proses untuk mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis* dengan cara makrofag diaktifkan oleh vitamin D untuk menghambat pertumbuhan intraselular dari *Mycobacterium tuberculosis* kemudian berikatan pada *vitamin D receptor* (VDR) dalam makrofag dan mengaktifkan *cathelicidin* untuk melakukan eliminasi.^{4,7} Hubungan vitamin D dengan infeksi terutama tuberkulosis sudah lama diteliti secara mendalam yaitu sejak 20 tahun yang lalu.⁸ Tuberkulosis lebih banyak diatasi dengan tindakan pencegahan daripada pengobatan. Pencegahan dinilai lebih baik karena bakteri yang menginfeksi TB sangat rentan mengalami resistensi saat menjalani pengobatan. Pada pasien TB juga telah diteliti adanya masalah genetik. Gen *vitamin D receptor* (VDR) seperti BsmI, FokI, ApaI, TaqI memiliki hubungan dengan kerentanan pada penyakit TB.⁹

Polimorfisme pada gen VDR dapat mempengaruhi proses eliminasi pada tuberkulosis. Ada empat jenis polimorfisme nukleotida tunggal dari gen VDR yaitu ApaI, BsmI, FokI dan TaqI dimana keempatnya telah dikaitkan dengan terjadinya tuberkulosis paru.¹⁰ Polimorfisme nukleotida tunggal dari gen VDR pada populasi etnis tertentu dapat meningkatkan risiko terjadinya penyakit tuberkulosis.¹¹

Polimorfisme FokI merupakan salah satu polimorfisme yang sangat fungsional dan penting dari gen VDR. Polimorfisme FokI dapat mempengaruhi fungsi dari VDR yang dapat mengakibatkan terganggunya efektivitas pengikatan

vitamin D yang nantinya dapat mempengaruhi produksi *cathelicidin*. Polimorfisme ini merupakan salah satu faktor yang dapat meningkatkan kerentanan terhadap infeksi tuberkulosis.¹² Penelitian yang dilakukan Bintang dkk menunjukkan hasil bahwa tidak ada peran polimorfisme gen VDR FokI dengan kejadian MDR TB, sedangkan penelitian yang dilakukan Thaha Ida Leida dkk menunjukkan hasil yang mengatakan bahwa polimorfisme gen VDR FokI merupakan faktor risiko terjadinya MDR TB.^{10,13} Penelitian yang dilakukan untuk melihat hubungan antara polimorfisme gen VDR dengan TB MDR di Indonesia masih terbatas khususnya di kota Medan, oleh karena itu tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengamati polimorfisme gen VDR FokI pada TB MDR di kota Medan.

1.2 Rumusan masalah

Apakah ada hubungan antara polimorfisme gen VDR FokI dengan MDR di kota Medan?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara polimorfisme gen VDR FokI dengan MDR di kota Medan.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus pada penelitian ini terdiri dari :

1. Untuk mengetahui gambaran TB *Multi Drug Resistance* (MDR) dan Non MDR berdasarkan jenis kelamin.
2. Untuk melihat gambaran TB *Multi Drug Resistance* (MDR) dan Non MDR berdasarkan usia.
3. Untuk mengetahui polimorfisme *Vitamin D Receptor* (VDR) FokI berdasarkan jenis kelamin.
4. Untuk mengetahui polimorfisme *Vitamin D Receptor* (VDR) FokI berdasarkan usia.

5. Untuk mengetahui hubungan polimorfisme *Vitamin D Receptor (VDR)* FokI dengan TB *Multi Drug Resistance (MDR)*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Masyarakat

Manfaat penelitian ini bagi masyarakat adalah untuk deteksi dini dan pencegahan terjadinya TB *Multi Drug Resistance (MDR)*.

1.4.2 Bagi Peneliti

Manfaat penelitian ini bagi Peneliti adalah untuk menambah ilmu pengetahuan tentang polimorfisme VDR.

1.4.3 Bagi Institusi

Manfaat penelitian ini bagi institusi adalah untuk menambah ilmu pengetahuan tentang polimorfisme VDR.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tuberkulosis

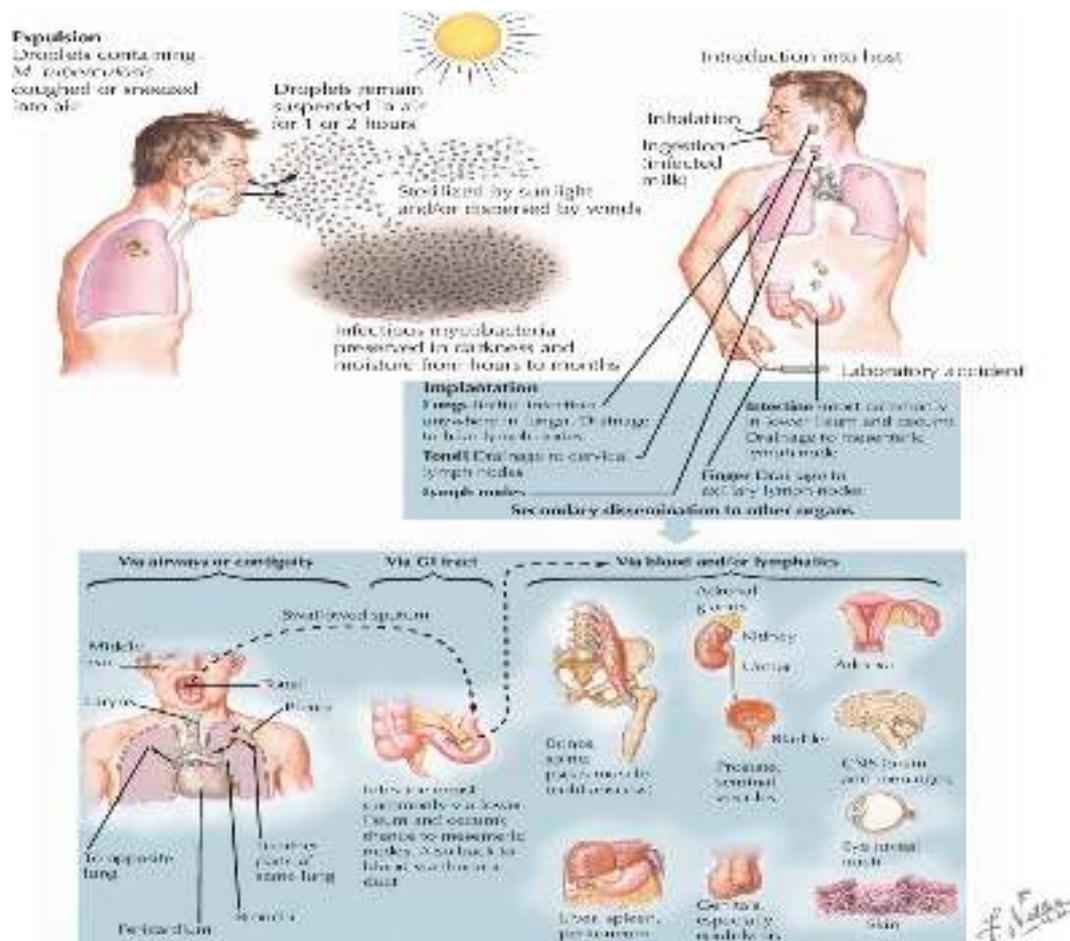
2.1.1 Definisi Tuberkulosis

Tuberkulosis adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, dimana diketahui bahwa tuberkulosis ini adalah salah satu penyakit yang sudah lama dan merupakan penyebab kematian tertinggi karena infeksi di dunia. Tuberkulosis dapat mempengaruhi seluruh organ tubuh manusia namun yang paling sering adalah paru-paru. Tuberkulosis dapat ditularkan melalui droplet yang keluar dari saluran napas penderita tuberkulosis saat batuk atau bersin.¹⁴

Dinding kuman *Mycobacterium tuberculosis* terdiri atas asam lemak (lipid), peptidoglikan dan arabinomannan. Dinding kuman yang bagian lipid inilah yang membuat bakteri lebih tahan terhadap asam sehingga disebut bakteri tahan asam dan lebih tahan juga terhadap gangguan kimia dan fisis. Bakteri ini juga dapat tahan terhadap udara kering maupun dingin. Ini dikarenakan bakteri berada dalam sifat dorman. Dari sifat dorman ini maka bakteri dapat aktif kembali dan penyakit tuberkulosis akan menjadi aktif kembali.¹⁵ Terjadinya pembentukan dan manifestasi dari infeksi TB memerlukan masa inkubasi sekitar 6 - 8 minggu.¹⁶ Gejala yang khas terjadi pada TB paru antara lain keringat malam, kelelahan yang berat, 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 TB

Tuberkulosis dapat ditularkan dari individu ke individu lainnya melalui *droplet nuclei* yang menyebar di udara saat seorang penderita TB bersin atau batuk, berbicara dan bernyanyi, dengan diameter partikel berukuran 1-5 μm yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis*. Infeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* dapat terjadi apabila setelah menghirup *droplet nuclei* yang bersifat infeksius, basil tersebut akan hidup dan bertahan dari pertahanan tubuh pejamu. Pertumbuhan bakteri terjadi selama 2 sampai 10 minggu, pada saat itu terjadi 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 diperkirakan sekitar 10 juta orang menderita tuberkulosis pada tahun 2019, dimana terjadi peningkatan dari tahun sebelumnya. Kejadian tuberkulosis sebagian besar berasal dari Asia Tenggara (44%), Afrika (25%), Pasifik Barat (18%) kemudian diikuti dengan presentase yang lebih kecil yaitu Mediterania Timur (8,2%), Amerika (2,9%) dan Eropa (2,5%). Dari seluruh dunia ada delapan Negara yang memiliki penderita tuberkulosis terbanyak dengan mengambil dua per tiga dari total penderita TB secara global yaitu Indonesia (8,5%), India (26%) Cina (8,4%), Pakistan (5,7%), Filipina (6,0%), Bangladesh (3,6%), Nigeria (4,4%), dan Afrika Selatan (3,6%).¹

Di Indonesia ditemukan sebanyak 543.874 kasus tuberkulosis yang terjadi pada tahun 2019 dimana mengalami penurunan dari tahun sebelumnya yaitu 566.623 kasus di tahun 2018. Beberapa provinsi telah dilaporkan memiliki kasus tertinggi karena memiliki penduduk sangat banyak seperti Jawa Barat, Jawa Timur dan Jawa Tengah. Pada ketiga provinsi tersebut kasus tuberkulosis mencapai (45%) dimana hamper mencapai setengah dari kasus tuberkulosis di Indonesia. Menurut data profil kesehatan Indonesia tahun 2019 jumlah kasus tuberkulosis yang terjadi pada laki-laki 1,4 lebih tinggi dari pada perempuan di semua provinsi di Indonesia.¹⁹

2.1.4 Faktor Risiko Tuberkulosis

Faktor terjadinya penularan TB kemungkinan besar dapat dikarenakan lingkungan hidup yang sangat padat seperti pemukiman di wilayah perkotaan sehingga mempermudah proses penularan dan sangat berperan dalam meningkatkan terjadinya kasus TB. Penularan TB biasanya terjadi melalui inhalasi sehingga TB paru menjadi manifestasi klinis yang paling sering dijumpai.¹⁵ Seseorang yang menderita TB adalah salah satu sumber infeksi yang paling penting karena dapat menularkan melalui udara, penderita TB dapat menyebarkan dengan mengeluarkan percikan air liur melalui batuk dan bersin yang dapat terhirup oleh individu lain melalui jalur pernapasan. Infeksi dapat

terjadi tergantung pada frekuensi paparan, kedekatan, dan durasi kontak dengan penderita TB, banyaknya jumlah patogen yang ditularkan, serta kerentanan seseorang yang terpapar.¹⁷

Penilaian terhadap faktor risiko yang berpotensi sangat penting untuk pengembangan pengendalian TB. Beberapa dekade ini telah diketahui beberapa faktor risiko TB termasuk di dalamnya yaitu penyakit sistemik diabetes mellitus dan penyakit ginjal kronis, serta merokok, penggunaan alkohol, indeks masa tubuh, silikosis, infeksi HIV, splenektomi dan gastrektomi. Kurang gizi, pengungsi, tunawisma dan kontak dengan penderita TB juga merupakan faktor risiko. Berdasarkan data WHO banyak kasus baru yang disebabkan oleh lima faktor, diantaranya kurang gizi, penggunaan alkohol, infeksi HIV, merokok (terutama pada pria) dan diabetes. Pada tahun 2019 banyaknya jumlah kasus yang disebabkan oleh lima faktor risiko tersebut masing-masing adalah 2,2 juta, 0,76 juta, 0,72 juta, 0,70 juta dan 0,35 juta.¹ Orang-orang yang memiliki faktor risiko disebut kelompok rentan TB dimana prevalensi dan terjadinya kasus TB meningkat lebih cepat daripada populasi umum. WHO merekomendasikan dan menetapkan pedoman bahwa kelompok rentan TB lebih diutamakan untuk dilakukan skrining TB aktif daripada populasi umum.²⁰

2.1.5 Penegakan Diagnosa Tuberkulosis

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

1) Radiografi toraks

Posisi radiografi toraks rutin pada umumnya adalah *Posteroanterior* dan *lateral*, dimana pemeriksaan ini paling sering digunakan pada TB pulmonal, pleural dan milier.²¹ Pada TB milier gambaran radiologi akan terlihat adanya bercak-bercak halus yang biasanya tersebar di seluruh lapangan paru. Pada suatu foto rontgen toraks sering terlihat bermacam-macam bayangan terutama pada penderita TB yang sudah lanjut seperti infiltrate, garis-garis fibrotik, kalsifikasi, serta atelektasis dan emfisema.¹⁶

2) Pemeriksaan mikroskopis basil tahan asam (BTA)

Pada dasarnya diagnosis sementara dilakukan dengan ditemukannya basil tahan asam (BTA) pada pemeriksaan mikroskopis dari dahak atau jaringan (contohnya, biopsi kelenjar getah bening). Pemeriksaan mikroskopis BTA sangat cepat dan murah namun sensitivitas relatif rendah (40-60%) pada kasus tuberkulosis paru yang baru dikonfirmasi.²² Kultur juga merupakan acuan standar baku untuk saat ini hanya dibutuhkan 10-100 basil *Mycobacterium tuberculosis* untuk mendiagnosis tuberkulosis namun kultur membutuhkan waktu yang cukup lama untuk mendapatkan hasil sekitar 2-8 minggu. Pada diagnosis TB ekstraparu dipastikan dengan terdeteksinya kuman *Mycobacterium tuberculosis* pada hasil pemeriksaan histologi, dan melalui gejala klinis yang konsisten pada TB ekstraparu.²³

3) Amplifikasi Asam Nukleat

Pada tahun 1983 telah dikembangkan tes amplifikasi asam nukleat seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang saat ini sangat umum digunakan untuk menegakkan diagnosa dengan cepat untuk beberapa penyakit menular, salah satunya adalah tuberkulosis.²⁴ Perubahan hasil nilai antar penelitian tidak bergantung oleh jenis PCR (konvensional, nested dan *real time*) saja, tetapi juga dipengaruhi target *Polymerase Chain Reaction* (PCR) salinan tunggal atau ganda, reagen, jenis dan jumlah sampel fipada penelitian dan metode isolasi DNA. Penelitian terbaik saat ini menilai bahwa diagnosis menggunakan jenis PCR *real time* untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis* memiliki sensitivitas 87,7% dan spesifisitas 97%.²⁵ *Mycobacterium tuberculosis* dideteksi untuk melihat *Deoxyribo Nukleat Acid* (DNA)) *Mycobacterium tuberculosis* dengan menggunakan teknik PCR, pemeriksaannya dilakukan dengan cepat dan tidak memerlukan jumlah bakteri yang banyak.²⁶

2.1.6 Pengobatan Tuberkulosis

Pengobatan tuberkulosis bertujuan untuk mengeliminasi basil tuberkel dari tubuh orang yang terinfeksi dan mencegah terjadinya resistensi obat yang signifikan secara klinis. Prinsip pengobatan pada tuberkulosis adalah (1) untuk mengelola beberapa obat terhadap organisme yang rentan; (2) untuk menambah sekitar 2 jenis agen antituberkulosis baru ke regimen ketika dicurigai adanya kegagalan pengobatan; (3) untuk memberikan terapi dalam waktu singkat dan yang paling aman; dan (4) untuk memastikan kepatuhan terhadap pengobatan.²⁷

Terapi antibiotik untuk tuberkulosis telah diteliti dan dikembangkan selama 40 tahun terakhir ini ada lima jenis obat lini pertama. Obat yang bersifat bakterisida yaitu streptomisin, isoniazid, rifampisin dan pirazinamid dan yang bersifat bakteriostatik adalah etambutol. Obat lini pertama semuanya dapat diberikan secara oral kecuali streptomisin harus diberikan secara intramuskular dan umumnya digunakan untuk pengobatan ulang.²⁸

2.2 Multi Drug Resistance (MDR) Tuberkulosis

2.2.1 Definisi TB MDR

TB MDR adalah saat bakteri *Mycobacterium tuberculosis* telah resisten terhadap paling sedikit dua jenis OAT yaitu isoniazid dan rifampisin dengan atau tanpa resisten OAT lainnya.²⁹ MDR terjadi karena pengobatan yang tidak adekuat yang akan membunuh sebagian besar bakteri, namun akan menyebabkan pertumbuhan beberapa bakteri yang resisten didalam populasi bakteri yang tumbuh. Pengobatan yang tidak adekuat terus dilanjutkan maka akan menyebabkan organisme yang bermutasi akan menjadi resisten terhadap obat secara berurutan dan akan terus berkembang sehingga resisten terhadap banyak obat anti TB.³⁰ Bakteri Penularan dari orang yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten OAT termasuk dalam salah satu penyebab terjadinya TB MDR. Ada lima faktor yang dapat mempengaruhi terjadinya TB MDR yaitu faktor mikrobiologik, faktor program, faktor kuman, faktor HIV/AIDS, dan faktor klinik.³¹

Resistensi obat terhadap terhadap strain *Mycobacterium tuberculosis* paling banyak disebabkan oleh mutasi kromosom. Mekanisme utama yang menyebabkan terjadinya resistensi obat diantaranya adalah ekspresi target obat yang berlebihan, gangguan aktivitas prodrug, dan aktivitas pompa efluks.³² *Mycobacterium tuberculosis* adalah bakteri yang pertumbuhannya lambat, sehingga hasil dari uji kerentanan obat membutuhkan waktu yang lama, uji kerentanan obat pada media solid memakan waktu selama 4-6 minggu sedangkan pada media cair 1-2 minggu. Kurangnya alat diagnostik yang cepat dapat dikatakan sebagai faktor resiko prevalensi MDR karena penggunaan obat yang tidak tepat sehingga mendorong untuk terjadinya resistensi terhadap obat.³³

2.2.2 Penegakan diagnosa TB MDR

Berdasarkan penelitian dan pendapat para ahli WHO mendukung penggunaan alat molekuler untuk deteksi dini orang yang beresiko mengalami TB MDR. Tes cepat dapat dilakukan dan mendapatkan hasil dalam beberapa hari sehingga dapat melakukan pengobatan dini dan tepat untuk mengurangi angka mortalitas dan morbiditas serta menghentikan penularan.³⁴ Diantaranya ada yang dinamakan *line probe assay* (LPA) yang merupakan uji cepat molekuler untuk mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* dan resistensi nya terhadap OAT.³⁵ TB MDR apabila terjadi maka pengobatan akan membutuhkan waktu yang lebih lama. Masa pengobatan akan dilakukan selama 24 bulan yang terdiri dari 8 bulan fase intensif dan 16 bulan fase lanjutan.³⁰

2.2.3 Pengobatan TB MDR

Pasien Tuberkulosis MDR (*Multi Drug Resistant*) harus dilakukan pengawasan dan penatalaksanaan yang baik dan benar. Tuberkulosis yang resisten hanya pada isoniazid dapat dilakukan secara tuntas menggunakan pengobatan dengan rifampisin, pirazinamid, dan etambutol maupun streptomisin selama 6 bulan atau dapat juga dengan pemberian rifampisin dan etambutol selama 12 bulan.²⁷

TB MDR dimana basil sudah resisten terhadap rifampisin dan isoniazid sangat sulit diobati karena kedua obat yang bersifat bakterisida yang tersedia sangat kuat dan karena resistensi terhadap OAT lainnya jarang terjadi. Pengobatan pada TB MDR yang saat ini direkomendasikan WHO yaitu regimen standar yang lebih pendek dengan durasi 9-12 bulan dan regimen panjang dengan durasi 18 – 24 bulan dengan kombinasi obat yang baik dan sesuai standar aturan. Pengobatan TB MDR dengan regimen pendek terdiri dari 7 jenis obat diberikan selama 9-12 bulan. Regimen pengobatan dilakukan dengan pemberian kanamisin, moksifloksasin, klofazimin, prothionamide, pirazinamid, isoniazid dosis tinggi (10mg/kg sampai 15mg/kg) dan etambutol selama 4-6 bulan kemudian diikuti dengan pemberian moksifloksasin, klofazimin, pirazinamid dan etambutol selama 5 bulan. Regimen ini menjadi pilihan utama dalam pengobatan TB MDR diseluruh dunia dan sebaiknya dilakukan sesuai kriteria indikasi.¹⁴

2.3 MDR dan Polimorfisme gen VDR FokI

Resistensi obat pada penderita TB terutama berkaitan dengan mekanisme mutasi kromosom, khususnya polimorfisme nukleotida tunggal . Faktor penyebab resistensi obat yang mempengaruhi tingkat terjadinya mutasi dibagi dalam dua kelompok yaitu mekanisme seluler dan faktor eksternal. Penyebab mekanisme seluler misalnya ketidakefisienan pemulihan dari sesuatu yang tidak cocok, mikrosatelit dan DNA polimerase yang rentan terhadap kesalahan dan faktor stres eksternal termasuk seperti tidak tersedianya fasilitas diagnostik yang cepat, peresapan OAT yang tidak tepat, lingkungan pejamu dan paparan rokok atau polusi. Ketidakpatuhan pasien dalam mengkonsumsi obat dan biaya yang diperlukan untuk pengobatan mungkin merupakan dua faktor yang menyebabkan terjadinya resistensi obat.³⁶

Selama paparan sinar Ultra Violet B (UV-B) pada kulit maka vitamin D akan dibentuk di dalam hati, vitamin D juga dapat ditemukan dalam makanan. Di dalam hati vitamin D akan mudah dimetabolisme untuk menghasilkan 25 hidroksi-vitamin D [25(OH)D] yang merupakan ukuran status vitamin D yang didapatkan, kemudian 25 hidroksi-vitamin akan berjalan dari hati ke ginjal dan

mengalami perubahan menjadi 1,25-dihidroksivitamin.^{37,38} Bentuk vitamin D yang aktif secara biologis dapat mempengaruhi fungsi kekebalan tubuh yang mengatur aktivitas sistem kekebalan pertahanan karena sangat berperan penting dalam aktivasi monosit/makrofag melalui *vitamin D reseptor* (VDR) dan telah dibuktikan bahwa vitamin D adalah salah satu mediator yang dapat mengganggu pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dalam makrofag.^{38,39} *Calcitrol* dikenal juga dengan 1,25-dihidroksivitamin D (1,25[OH]D) merupakan hormon penting untuk memodulasi aktivasi sel pertahanan dan kekebalan tubuh yang bekerja pada *vitamin D reseptor* (VDR) untuk mengubah pengenalan sinyal genom.⁴⁰

Peranan vitamin D dalam sistem imun berawal dari stimulasi bakteri tuberkulosis yang dipengaruhi oleh reseptor nya yaitu *toll like receptor 2/1* (TLR 2/1) dimana keadaan tersebut akan menjadi sinyal untuk mengaktifkan *vitamin D reseptor* (VDR) dan enzim 1-Ohase. 25-hidroksivitamin D (25[OH]2D) akan disintesis menjadi (1,25[OH]2D) oleh enzim 1-Ohase. *Cathelicidin* akan mengalami peningkatan saat (1,25[OH]2D) masuk ke dalam inti sel, dimana *Cathelicidin* merupakan peptide yang memiliki fungsi sebagai antibiotik endogen.⁴¹ *Cathelicidin* akan menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dalam intraseluler makrofag, dan kemudian akan dieliminasi di fagolisosom sehingga polimorfisme gen VDR mungkin berkontribusi dalam kerentanan terhadap tuberkulosis.³⁶

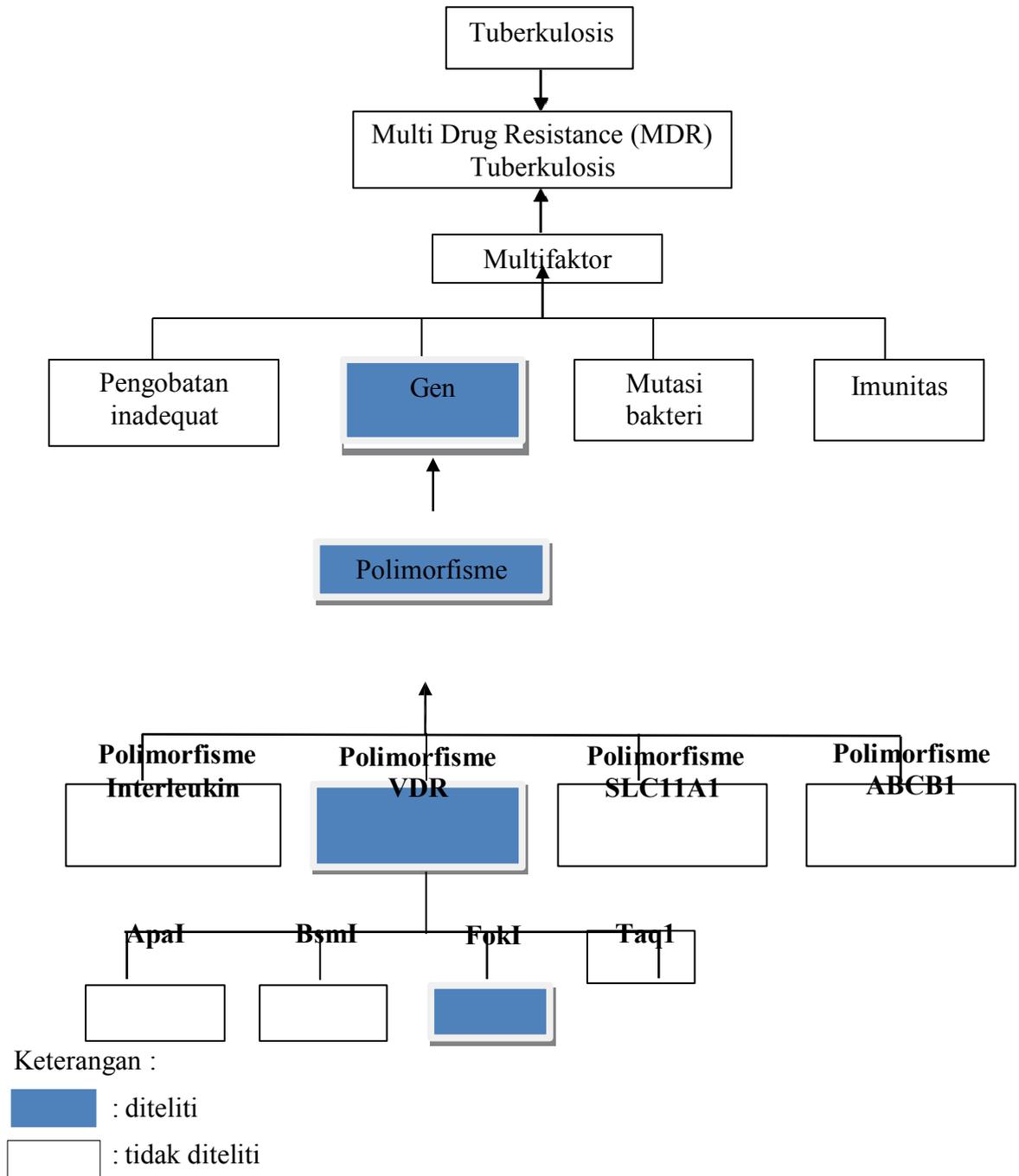
Menurut penelitian beberapa polimorfisme pada gen manusia yang dapat mempengaruhi terjadinya TB diantaranya adalah polimorfisme pada gen SLC11A1, ABCB1 dan VDR. Gen VDR yang terletak pada 12q13.11 memiliki berbagai polimerfisme nukleotida tunggal, beberapa diantaranya adalah ApaI, BsmI, FokI dan TaqI. Polimorfisme tersebut dapat mengganggu aktivitas dari VDR dan dan efek selanjutnya terjadi pada vitamin D. Beberapa penelitian membuat ulasan tentang polimorfisme gen VDR dan efeknya dengan kerentanan dan resistensi terhadap TB pada populasi dan etnis berbeda-beda, namun efek yang pasti masih belum diketahui dan tidak konsisten.⁴²

Gen VDR terletak di bagian lengan panjang kromosom 12, wilayah pengkodean, dan wilayah 3 *Untranslated region* (UTR). Yang paling banyak

dipelajari baru-baru ini adalah FokI, yang mana dapat mengatur aktivitas transkripsi gen. Polimorfisme FokI ditambah dengan rendahnya kadar serum vitamin D3 dapat mengganggu fungsi VDR yang nantinya akan berhubungan dengan kerentanan terhadap TB. Sampai saat ini, ada dua analisa yang membahas tentang polimorfisme dan kerentanan terhadap TB dari berbagai etnis yang berbeda-beda, namun mereka gagal menemukan hubungan yang dari polimorfisme FokI terhadap populasi secara keseluruhan.⁴³

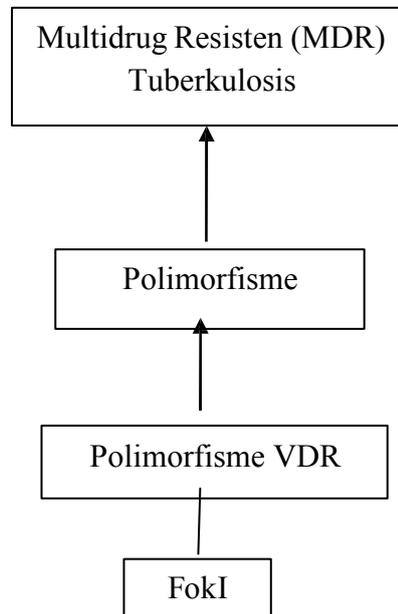
Polimorfisme nukleotida tunggal rs2228570 gen VDR fokI yang telah diteliti secara luas dan fungsional menunjukkan berbagai variasi. Polimorfisme ini terjadi karena disebabkan oleh perubahan dari asam aminon timin menjadi sitosin (T/C). Bagian dominan (FF) homozigot memiliki aktivitas transkripsi yang lebih tinggi dengan tiga asam amino yang lebih rendah sejak translasi dimulai pada kodon kedua, sedangkan homozigot resesif (ff) mempunyai 427 asam amino yang bentuknya lebih panjang. Ada atau tidaknya situs restriksi ditandai sebagai F atau f masing-masing.⁴⁴

2.4 Kerangka Teori



Gambar 2.2. Kerangka teori

2.5 Kerangka Konsep



Gambar 2.3. Kerangka konsep

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan analitik observasional dengan menggunakan rancangan penelitian *cross sectional*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Oktober – Desember 2021

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan secara bertahap di :

1. Tahap I : Pengambilan sampel darah di Rumah Sakit Hj.Adam Malik Medan dan Rumah Sakit BP 4 dan isolasi DNA di Lab Terpadu FK USU.
2. Tahap II : Amplifikasi DNA dengan PCR di Lab Terpadu FK USU.
3. Tahap III : Restriksi enzim dengan metode RFLP dan visualisasi dengan gel agarosa di Lab Terpadu FK USU.

3.3 Populasi

3.3.1 Populasi Target

Populasi target pada penelitian ini adalah penderita TB MDR dan non MDR di Kota Medan.

3.3.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah penderita TB MDR dan non MDR di Rumah Sakit Hj.Adam Malik , Rumah Sakit Methodist dan Rumah Sakit BP 4 Kota Medan.

3.4 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

3.4.1 Sampel

Sampel yang diambil untuk penelitian ini adalah sampel darah dari penderita TB MDR dan non MDR di Kota Medan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

3.4.2 Cara Pemilihan Sampel

Untuk menentukan sampel pada penelitian ini dilakukan dengan teknik *Purposive sampling* yaitu penderita TB MDR dan non MDR di kota Medan.

3.5 Estimasi Besar Sampel

Untuk menentukan besar sampel pada penelitian ini maka digunakan rumus besar sampel kategorik tidak berpasangan dua kelompok, dengan rumus :

$$n_1 = n_2 = \left(\frac{\sqrt{Z_{\alpha}^2 \cdot P_1 \cdot Q_1 + Z_{\beta}^2 \cdot P_2 \cdot Q_2}}{P_1 - P_2} \right)^2$$

$$n_1 = n_2 = \left(\frac{1,96 \sqrt{2 \times 0,23 \times 0,77} + 0,84 \sqrt{0,4 \times 0,67 + 0,07 \times 0,93}}{0,33} \right)^2$$

$$n_1 = n_2 = 25 \text{ sampel}$$

Jumlah sampel berdasarkan rumus kategorik tidak berpasangan adalah 25 TB MDR dan 25 TB Non MDR. Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah 32 sampel TB MDR dan 32 TB Non MDR.

n_1 = jumlah subjek MDR Tuberkulosis

n_2 = jumlah subjek non MDR Tuberkulosis

$Z = \alpha$ = kesalahan tipe satu ditetapkan 5%, hipotesis dua arah, sehingga $Z_{\alpha} = 1,96$ (Nilai distribusi normal baku table Z)

$Z = \beta$ = kesalahan tipe dua ditetapkan 20%, sehingga $Z_{\beta} = 0,84$ (Nilai distribusi normal baku table Z)

P_1 = proporsi pada MDR Tuberkulosis (0,40)

P_2 = proporsi pada MDR Tuberkulosis (0,07)

3.6 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

3.6.1 Kriteria Inklusi

1. Pasien yang didiagnosis TB MDR (yang resisten sekurang-kurangnya 2 jenis OAT)
2. Pasien yang didiagnosis tuberkulosis (TB) pulmonal dan mendapat terapi OAT selama minimal 6 bulan
3. Bersedia menjadi responden

3.6.2 Kriteria Eksklusi

1. TB ekstrapulmonal
2. TB dengan gangguan imunitas (TB dengan HIV)

3.7 Prosedur Kerja

3.7.1 Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan tahapan pertama dalam melakukan penelitian ini, kita dapat melakukan isolasi DNA dari semua bahan biologis yang mengandung sel yang mempunyai inti. Seperti pada darah (leukosit), air liur, lender, semen, rambut, tulang, jaringan dan lain-lain. Namun yang paling sering dilakukan isolasi DNA adalah pada darah dan rambut karena keduanya lebih mudah didapat. Tujuan dilakukannya isolasi DNA adalah untuk memperoleh DNA yang mempunyai molekul tinggi tanpa protein dan enzim lainnya yang dapat merusak DNA. Untuk melihat apakah isolasi DNA berhasil dan dilakukan dengan baik, maka dari prosedur isolasi yang dilakukan akan menghasilkan DNA yang murni dan utuh.

Isolasi DNA menggunakan protokol *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* akan melewati empat proses meliputi *lysis sel*, *binding DNA*, *washing DNA* dan *elution DNA*. Langkah pertama untuk melakukan pemurnian DNA adalah melisiskan sel dan inti. Pada isolasi DNA yang dipakai adalah sel darah putih, pada tahap ini sel darah merah akan dilisiskan di dalam larutan lisis sel, diikuti dengan lisis sel darah putih dan intinya di dalam larutan lisis inti. Jika dibutuhkan

pada tahap ini bisa dilakukan pencernaan RNase. Protein plasma dan inti kemudian dipisahkan dari DNA genom menggunakan langkah presipitasi garam. Dimana protein akan mengendap tetapi meninggalkan DNA genomik dengan berat molekul tinggi. Langkah terakhir DNA genom akan dipekatkan dan garamnya akan dihilangkan dengan presipitasi isopropanol.

Pengujian pemurnian DNA genomik dilakukan dengan menggunakan darah utuh segar dimana darah akan dikumpulkan dalam tabung antikoagulan EDTA, heparin dan sitrat, lalu memeriksa dan memastikan tidak ada efek buruk pada pengerjaan DNA selanjutnya, termasuk PCR. Sampel darah yang sudah dimasukkan pada tabung antikoagulan dapat disimpan pada suhu 2•8°C selama 2 bulan, namun DNA akan berkurang seiring bertambahnya waktu penyimpanan.

Alat dan bahan :

Sampel darah (300 µl)

Micropipet

Microtip

Tube Eppendorf 1,5 mL

Alat sentrifugasi

Cell Lysis Solution

Nuclei Lysis Solution

RNase solution

Protein Precipitatio Solution

DNA Rehydration Solution

Water bath (pemanas air) 37°C

Isopropanol, suhu ruangan

70% ethanol, suhu ruangan

Water bath 65°C (opsional; untuk rehidrasi cepat DNA)

Cara kerja :

- Untuk volume sampel darah 300 μ l : tambahkan 900 μ l *Cell Lysis Solution* ke dalam *Tube Eppendorf* steril 1,5 mL.
- Darah yang berada pada *Tube Eppendorf* di goyangkan secara perlahan agar darah tercampur rata. Kemudian pindahkan darah ke dalam *Tube Eppendorf* yang berisi *Cell Lysis Solution*. Kemudian bolak-balikan *Tube Eppendorf* 5•6 kali agar tercampur rata.
- Melakukan inkubasi pada campuran tersebut selama 10 menit pada suhu kamar (bolak-balik sebanyak 2•3 kali selama inkubasi) untuk melisiskan sel darah merah. Kemudian sentrifugasi pada 13.000•16.000 x g selama 20 detik pada suhu kamar dilakukan untuk sampel darah 300 μ l.
- Supernatan dikeluarkan/ dilepaskan tanpa mengganggu pellet putih yang terlihat, 10•20 μ l cairan residual harus ditinggalkan dalam tabung 1,5 ml.
- Vortex *Tube Eppendorf* dengan kuat dan cepat hingga sel darah putih teresuspensi (10•20 detik).
- *Nuclei Lysis Solution* ditambahkan ke dalam tabung yang berisi sel-sel yang teresuspensi sebanyak 300 μ l. Aduk larutan sebanyak 5•6 kali untuk melisiskan sel darah putih. Larutan harus menjadi sangat kental. Jika terlihat gumpalan sel setelah dicampurkan, larutan harus diinkubasi pada suhu 37°C sampai gumpalan tersebut hilang. Jika setelah 1 jam masih terlihat gumpalan tambahkan *Nuclei Lysis Solution* sebanyak 100 μ l lalu lakukan ulang inkubasi.
- Pilihan : Ditambahkan *RNase solution* sebanyak 1,5 μ l, dan campur sampel dengan membolak-balik tabung 2•5 kali. Inkubasi campuran tersebut selama 15 menit dengan suhu 37°C, lalu dinginkan sampai pada suhu kamar.
- Ditambahkan *Protein Precipitatio Solution* sebanyak 100 μ l, kemudian vortex dengan cepat dan kuat selama 10•20 detik. Setelah di vortex mungkin akan tampak gumpalan protein kecil.
- Dilakukan Sentrifugasi pada 13.000•16.000 x g selama 3 menit pada suhu kamar.

- Supernatan dipindahkan ke *Tube Eppendorf* steril 1,5 mL yang berisi isopropanol dengan suhu kamar.
- Larutan akan dicampurkan secara perlahan hingga tampak untaian DNA seperti benang putih yang membentuk massa.
- Dilakukan sentrifugasi 13.000•16.000 x g selama 1 menit pada suhu kamar.
- Supernatan dituangkan dan ditambahkan ethanol 70% ke dengan suhu kamar ke dalam DNA. bolak•balikkan tabung beberapa kali dengan hati•hati untuk membersihkan pelet DNA dan sisi•sisi *Tube Eppendorf*, berikutnya dilakukan sentrifugasi seperti pada nomor 12.
- Ambil ethanol secara perlahan menggunakan mikrotip. Pada langkah ini pelet DNA sangat longgar sehingga harus berhati•hati untuk menghindari terambilnya pelet DNA. Keringkan pellet dengan cara membalikkan tabung ke atas kertas penyerap selama 10•15 menit.
- *DNA Rehydration Solution* ditambahkan sebanyak 100 µl ke dalam tabung dan DNA di rehidrasi dengan cara inkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam. Larutan dicampurkan secara berkala dengan mengetuk tabung secara lembut. Atau dengan cara lain, DNA di rehidrasi dengan cara inkubasi semalaman pada suhu kamar atau pada 4°C.
- Simpan DNA pada suhu 2•8 derajat.

3.7.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR akan dilakukan menggunakan *Sensifast no rox*.

Alat dan bahan :

- *Fast optical 96-well reaction plate*
- *Optical Adhesive Film*
- 5 buah *Tube Eppendorf* 1,5 mL
- Tip 10 L
- *Master Mix PCR* (yang berisikan Enzim *Taq polymerase*, dNTP= dATP, dGTP, dCTP, dan dDTP, Ion magnesium, Larutan buffer dan *Dye* (pewarna).

- *Forward Primer*
- *Reverse Primer*
- *Template* (DNA, RNA atau cDNA)
- *Nuclease-Free Water*

Cara kerja :

- Primer harus memiliki suhu leleh (Melting temperature) sekitar 60°C.
- Melakukan pengenceran pada *template* DNA sehingga konsentrasi yang digunakan adalah 100µl.
- Dilakukan dilusi pada *Forward Primer* dan *Reverse Primer*
- Campuran komposisi : Menyiapkan mastermix real time RT•PCR dengan cara mencampur bahan•bahan berikut ; 10 µl master mix ditambahkan dengan 0,8 µl µM *Forward Primer*, 0,8 µl µM *Reverse Primer*, *clease-Free Water*, dan 8,4 µl *template* sehingga seluruh nya mencapai 20 µl. Master mix diacmpurkan terlebih dahulu setelah itu masukkan *template* DNA.
- Selanjutnya dilakukan perancangan pada mesin PCR untuk dilakukan denaturasi, denaturasi dilakukan pada 95° dengan annealing dan pemanjangan (elongasi). Hal ini dilakukan tergantung pada jenis master mix dan hasil optimasi primer yang dipakai.

3.7.3 Restriction Fragment Lenght Polymorphism (RFLP)

- Dilakukan penggabungan pada komponen reaksi berikut ini pada suhu ruangan secara berurutan, dimulai dari : 17µl *Nuclease free water*, 2µl *10X Fastdigest green buffer*, 10µl (0,2 µg) DNA, 1µl *Fastdigest enzyme*.
- Aduk secara perlahan dan putar ke bawah.
- Inkubasi pada suhu 37°C di dalam mesin incubator atau *water thermostat* selama 5 menit. Pilihan : lakukan penonaktifkan enzim dengan pemanas pada suhu 65°C selama 5 menit.
- Jika *green buffer* tadi sudah termasuk dalam reaksi, masukkan sebagian besar (aliquot) dari reaksi campuran langsung pada gel.

3.7.4 Visualisasi dengan Elektroforesa Gel Agarosa

Dilakukan visualisasi dengan elektroforesa gel agarosa.

- a. Untuk membuat gel agarosa 5%, ditimbang 6,75 gr agarose dalam 135 ml TAE 1x. Larutan dipanaskan dan diaduk di atas magnetic hot stirrer hingga mendidih dan berwarna jernih.
- 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. Sebanyak 5 μ L DNA Ladder, 8 μ L amplikon PCR dan hasil RFLP dipipet ke dalam sumur sumur gel.
- f. Posisi sampel pada sumur sumur gel dicatat.
- g. Elektroforesis dijalankan selama 60 menit dengan tegangan 80 Volt.
- a. Gel dipindahkan ke dalam *Gel Documentation* mendokumentasikan hasil elektroforesis.

3.8 Variabel Penelitian

Variabel dependen : MDR Tuberkulosis

Variabel independen : Polimorfisme VDR

3.9 Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Tuberkulosis Multi Drug Resistent (TB MDR)	Tuberkulosis yang resisten sekurang-kurangnya dua jenis obat anti tuberkulosis (OAT)	Rekam medik	TB MDR TB non MDR	Nominal
Polimorfisme gen <i>Vitamin D receptor</i> (VDR)	Perubahan yang terjadi pada urutan atau untaian DNA sehingga dapat mengubah fungsi dari gen <i>vitamin D receptor</i> (VDR).	PCR	Terjadi polimorfisme Tidak terjadi polimorfisme	Nominal
TB non MDR	seseorang yang didiagnosis TB dari pemeriksaan radiografi toraks dan pemeriksaan BTA dengan pengobatan minimal 6 bulan.	Rekam medik	Ya Tidak	Nominal

3.10 Analisa Data

Pada penelitian ini dilakukan analisa data menggunakan perangkat lunak yaitu *statistical product and service solutions* (SPSS), kemudian data akan dilakukan dengan analisa univariat untuk menjelaskan distribusi dari setiap variabel yang diteliti dan selanjutnya dengan analisa bivariat untuk melihat hubungan antara polimorfisme gen *vitamin D receptor* (VDR) dengan TB MDR.

3.11 Alat dan Bahan

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

Tabel 3.1 Alat dan Bahan Penelitian

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

DNA			
16	Enzim Restriksi	RFLP	1 pack
17	PBS	Isolasi DNA	5 Liter
18	Primer DNA	PCR	4 pack
19	Mastemix PCR kit	PCR	2 pack
20	Gel agarosa	RFLP	1 pack
21	Alat Elektroforesis	RFLP	2 buah
22	Dye stain	RFLP	10 mL
23	Ethidium Bromide	RFLP	5 mL
24	Mikropipet 10	Isolasi DNA,PCR dan RFLP	1 buah
25	Mikropipet 20	Isolasi DNA,PCR dan RFLP	1 buah
26	Mikropipet 100	Isolasi DNA,PCR dan RFLP	1 buah
27	Mikropipet 1000	Isolasi DNA,PCR dan RFLP	1 buah
28	Mesin PCR	PCR dan RFLP	1 buah

3.12 Alur Penelitian

