

RESEARCH ARTICLE

Unmethylated Vitamin D Receptor (VDR) pada Multi Drug Resistant Tuberculosis

Christine Verawaty Sibuea¹, Janry Sinaga¹, Elsa bea Nibasi Zega¹, Restin Julianti Zebua¹, Selvian Batee¹

¹ Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen

Korespondensi: Christine Verawaty Sibuea, Email: christine.sibuea@yahoo.com

Abstract

Background: Cases of Tuberculosis (TB) and multi-drug resistant Tuberculosis (MDR TB) caused by mycobacterium tuberculosis are high globally. Vitamin D has an important role against TB infection by inducing antimicrobial peptides such as cathelicidin through vitamin D receptors (VDR). Several studies suggest that there is a genetic influence for TB infection, such as polymorphism and methylation. Methylation of VDR gene is one of the causes of susceptibility to TB infection.

Objective: This study aimed to describe the unmethylated vitamin D receptor gene in patients with MDR TB and pulmonary non-MDR TB in Medan City.

Methods: This research was a descriptive studied with a cross sectional research design. Stored DNA sample isolated from blood 40 patient MDR TB blood and 40 patient non MDR TB was converted to bisulfite with EZ DNA Methylation-Gold Kit. Converted DNA was amplified by PCR and finally gel electrophoresis was performed with agarose gel to see the unmethylated.

Results: Unmethylated VDR gene was higher in MDR TB (17,5%) than in non MDR TB (null). Unmethylated VDR gene was found higher in men (15%) and in age 18-49 (10%).

Conclusion: There was no unmethylated VDR gene in non MDR TB. The unmethylated VDR gene was found in MDR TB.

Keywords: MDR TB, VDR gene, unmethylated.

Abstrak

Latar belakang: Tuberkulosis (TB) dan *multi drug resistant tuberculosis* (MDR TB) yang disebabkan oleh *mycobacterium tuberculosis* sangat tinggi kasusnya secara global. Vitamin D mempunyai peran penting melawan infeksi TB dengan menginduksi peptida antimikroba seperti cathelicidin melalui *vitamin D receptor* (VDR). Beberapa penelitian menyebutkan adanya pengaruh genetik dalam terinfeksi TB paru yaitu polimorfisme dan metilasi. Metilasi gen VDR menjadi salah satu penyebab kerentanan terinfeksi TB paru.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran *unmethylated* gen VDR pada penderita MDR TB dan non MDR TB di Kota Medan.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kategori dengan rancangan penelitian *cross sectional*. Sampel DNA tersimpan yang diisolasi dari darah 40 penderita MDR dan 40 penderita non MDR TB dikonversi menjadi bisulfit dengan EZ DNA *Methylation-Gold Kit*. DNA yang terkonversi diamplifikasi dengan PCR dilakukan elektroforesis gel dengan gel agarosa untuk melihat metilasi.

Hasil: *Unmethylated* gen VDR lebih banyak pada MDR TB (15%) daripada non MDR TB (0). *Unmethylated* gen VDR lebih banyak ditemukan pada laki-laki (15%) dan pada usia 18-49 tahun (10%).

Kesimpulan: Tidak terdapat *unmethylated* gen VDR pada non MDR TB. *Unmethylated* gen VDR ditemukan pada MDR TB.

Kata Kunci: MDR TB, gen VDR, *unmethylated*.

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit menular penyebab kematian tertinggi di dunia. TB disebabkan oleh basil *Mycobacterium tuberculosis* yang penularannya terjadi melalui penyebaran bakteri ke udara oleh penderita TB.¹ Data WHO menunjukkan 7,1 juta orang menderita TB pada tahun 2019 dan Indonesia merupakan salah satu dari dua negara dengan peningkatan penderita TB tertinggi di dunia. Jumlah kasus TB ini meningkat sebanyak 69% di Indonesia. TB dapat diobati hingga sembuh selama 6 sampai 1 tahun berdasarkan DATIN Kementerian Kesehatan RI tahun 2016. Apabila pengobatan tidak dilakukan secara teratur dan tidak tepat, akan menyebabkan resistensi terhadap obat anti tuberkulosis (OAT) atau *Multi Drug Resistant Tuberculosis* (MDR TB).²

Resistensi pada MDR TB setidaknya terhadap 2 jenis OAT yang paling ampuh yaitu rifampisin dan isoniazid.³ WHO memperkirakan ada sekitar 480.000 kasus baru MDR TB dan 190.000 kematian akibat MDR TB pada tahun 2015 dan peningkatan sekitar 186.772 kasus baru MDR TB pada tahun 2018. Estimasi kasus resistensi di Indonesia berdasarkan *TB report* WHO 2019 adalah 2,4% dari 13% kasus MDR TB yang diberi pengobatan.⁴

MDR TB dapat disebabkan oleh banyak faktor, yaitu pengobatan yang inadkuat, kegagalan pengobatan, mutasi dari bakteri tuberkulosis, serta faktor imunitas, genetik dan epigenetik host. Kadar vitamin D dan polimorfisme gen VDR telah dikaitkan dengan terjadinya MDR TB.^{5,6} Vitamin D memberikan efek antimikroba melalui vitamin D receptor (VDR) pada sebagian besar sel imun seperti makrofag, limfosit T dan B, dan neutrofil.⁶ Gen VDR berfungsi dalam mengatur respon imunologi dengan mengeluarkan peptide antimikroba, seperti cathelicidin. Gen ini berperan dalam proses untuk mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis* dengan pengaktifan makrofag oleh vitamin D, yang akan mengaktifkan cathelicidin untuk melakukan eliminasi.^{4,7}

Polimorfisme gen dan metilasi VDR dinyatakan sebagai salah satu penyebab kerentanan seseorang terhadap TB.^{3,8} Kerentanan terinfeksi TB dapat disebabkan oleh epigenetik metilasi berupa perubahan konformasi dengan penambahan gugus metil (CH₃) dari *S-adenosyl methionine* (SAM) ke residu sitosin (C) dari urutan CpG yang ada dalam genom.⁹ Metilasi mempengaruhi ekspresi gen VDR dan akhirnya akan berdampak pada proses eliminasi *Mycobacterium tuberculosis*.¹⁰

Penelitian yang dilakukan oleh Wang dkk, menyatakan bahwa *unmethylated* gen VDR tidak mengakibatkan perubahan gen VDR sehingga tidak mempengaruhi kerentanan terhadap TB.⁸ Hal yang berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Li dkk yang menyatakan bahwa motif CpG *unmethylated* gen VDR dapat bertindak sebagai substansi yang memperkuat dan memodulasi respon imun terhadap antigen dalam mengatur dan mengaktifkan respons Th1, sehingga mempengaruhi produksi sitokin pro-inflamasi dan mendukung pematangan APC pada manusia.¹¹

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

Hal inilah yang melatarbelakangi penelitian ini, sehingga dapat diketahui *unmethylated* gen VDR pada penderita MDR TB di kota Medan.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan rancangan penelitian *cross-sectional*. Sampel merupakan DNA tersimpan yang telah diisolasi dari darah 40 penderita MDR TB dan 40 penderita non MDR TB penderita MDR TB dari RS Haji Adam Malik Medan dan RS Khusus Paru Medan yang memenuhi kriteria pada penelitian sebelumnya.

Konversi Bisulfit DNA

Konversi bisulfit DNA genom dilakukan menggunakan EZ DNA *Methylation-Gold Ki* (ZymoResearch Inc., USA) sesuai dengan prosedur pada protokolnya. Dilakukan pembuatan DNA kontrol bisulfit termetilasi (M) dan *unmethylated* (U) untuk memperoleh panel standar DNA 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, 0%. 130 µL *Conversion Reagent* dimasukkan ke 20 µL sampel DNA dan dilakukan proses di *thermal cycler* 98°C selama 10 menit, 64°C selama 2,5 jam dan 40°C selama 20 jam untuk inkubasi. Setiap sampel ditambahkan 600 µL *M-Binding Buffer* dan dilakukan sentrifugasi 12.000g selama 30 detik. Supernatan dibuang dan diberikan 200 µL *M-Desulphonation Buffer* dan inkubasi selama 15-20 menit. 200 µL *M-Wash Buffer* ditambahkan ke suspensi dan dilakukan sentrifugasi 12.000g selama 30 detik. Supernatan dibuang dan 10 µL *M-Elution Buffer* ditambahkan ke suspensi dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 12.000g selama 30 detik. Hasil konversi DNA diamplifikasi dengan PCR.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA metilasi diresuspendi dengan RT Master Mix PCR dan primer. Prosedur PCR dilakukan sesuai dengan protokol pada RT Master Mix PCR. Primer yang digunakan adalah AAATACTCCTCATTA AAACTACGCA (MR); TTTTATTTTCGTGTTTATAGATCGT (MF); AAAATACTCCTCATTA AAACTACACA (UR); TTTTATTTTGTGTTTATAGATTGT (UF). Suspensi DNA metilasi dimasukkan ke dalam suspensi koktail PCR dan dilakukan amplifikasi dengan menggunakan mesin PCR. Tahapan PCR dilakukan sebanyak 25 siklus dengan denaturasi pada 95° selama 15 detik, annealing pada 56,5° selama 15 detik dan ekstensi pada 72° selama 10 detik.

Visualisasi dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Amplikon divisualisasi dengan gel agarosa. 8 µL hasil amplikon PCR dipipet ke dalam sumur sumur gel agarosa 5% dan elektroforesis dijalankan selama 60 menit dengan tegangan 80 Volt. Gel dipindahkan ke dalam *Gel Documentation* untuk mendokumentasikan hasil elektroforesis.

Hasil

Unmethylated gen VDR tampak berupa *band* pada 200bp (Gambar 1). *Unmethylated* gen VDR hanya sedikit ditemukan pada MDR TB (17,5%) dan tidak ditemukan pada non MDR TB (Tabel 1). *Unmethylated* gen VDR ditemukan lebih banyak pada laki-laki

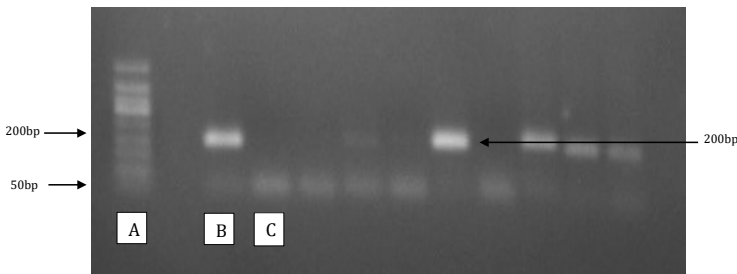
(15%) dan pada usia 18-49 tahun (10%) penderita MDR TB (Tabel 2).

Tabel 1. *Unmethylated Gen VDR* pada MDR TB

	MDR TB (n %)	Non MDR TB (n %)
<i>Unmethylated</i>	7 (17,5)	0
<i>Non unmethylated</i>	33 (82,5)	0
Total	40 (100%)	40 (100%)

Tabel 2. *Unmethylated Gen VDR* pada MDR TB Berdasarkan Jenis Kelamin dan Usia

		MDR TB (n %)		Non MDR TB (n %)	
		<i>Unmethylated</i>	<i>Non unmethylated</i>	<i>Unmethylated</i>	<i>Non Unmethylated</i>
Jenis Kelamin	Laki-laki	6 (15%)	22 (55%)	0	32 (80%)
	Perempuan	1 (2,5%)	11 (27,5%)	0	8 (20%)
Usia	<18 tahun	0	0	0	3 (7,5%)
	18-49 tahun	4 (10%)	23 (57,5%)	0	30 (75%)
	>49 tahun	3 (7,5%)	10 (25%)	0	7 (17,5%)



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Amplifikasi *Unmethylated Gen VDR*

(Lane A: DNA ladder/marker; lane B: amplicon *unmethylated*; lane C: amplicon *non unmethylated*)

Pembahasan

Unmethylated gen VDR hanya sedikit ditemukan pada MDR TB dan tidak ditemukan pada non MDR TB. Hal ini dapat menunjukkan bahwa apabila tidak terjadi metilasi maka tubuh tetap mengaktifkan sel-sel imun bawaan terutama cathelicidine untuk melawan bakteri penyebab TB paru, sehingga *unmethylated* gen VDR sedikit terjadi pada MDR TB dan tidak terjadi pada non MDR TB. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Li dkk, yang menunjukkan bahwa *unmethylated* daerah CpG dapat memperkuat system kekebalan tubuh seperti mengaktifkan respons Th1, dan mendukung produksi sitokin pro-inflamasi dan pematangan APC pada manusia.¹¹ Penelitian Wang dkk juga menyatakan bahwa *unmethylated* gen VDR akan tetap membuat imun tubuh bekerja sebagaimana mestinya, terutama dalam menghasilkan cathelicidin sebagai agen untuk mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis*.⁸ Tidak adanya penambahan gugus metil pada daerah CpG island merupakan keadaan *unmethylated*. Variasi genetik metilasi gen VDR mengakibatkan perubahan dalam imun tubuh mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis*. *Unmethylated* gen VDR memungkinkan imun tubuh tetap baik dan eliminasi *Mycobacterium tuberculosis* terjadi.

Vitamin D berperan dalam imunitas tubuh. Penelitian Huang dkk menunjukkan bahwa hipovitaminosis D meningkatkan risiko

terinfeksi TB paru berkali lipat.¹² Demikian juga dengan penelitian yang dilakukan oleh Aibana dkk yang menyatakan bahwa kekurangan vitamin D dapat meningkatkan risiko terinfeksi TB paru. Vitamin D menstabilkan epigenom monosit, makrofag, dan subtype sel dendritik sehingga dapat mencegah timbulnya penyakit, termasuk diantaranya TB dan MDR TB.¹³ *Unmethylated* gen VDR yang ditemukan pada MDR TB penelitian ini, walaupun dalam jumlah yang sedikit, mungkin disebabkan oleh kurangnya kadar vitamin D dalam tubuh penderita. Penelitian ini tidak melakukan pemeriksaan kadar vitamin D dalam darah, dan hal inilah yang menjadi keterbatasan penelitian ini.

Kesimpulan

Tidak terdapat *unmethylated* gen VDR pada non MDR TB. *Unmethylated* gen VDR hanya ditemukan pada MDR TB.

Daftar Pustaka

1. WHO Global Tuberculosis Report 2020. Available at <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>
2. Andri J, Febriawati H, Randi Y, J H, Setyawati AD. 2020. Penatalaksanaan pengobatan tuberculosis paru. *Jurnal Kesmas Asclepius*, 2(2): 73–4.
3. Saputri IN, Munthe EL. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Implementation of Control Measures in Ketapang District, West Borneo, Indonesia. 2020. *Jurnal Respirologi Indonesia*, 40(1): 6–15.
4. Ayyubi RI Al, Liza HM. 2021. Prevalensi dan faktor-faktor Yang terkait dengan perkembangan kejadian penyakit tuberculosis multidrug resistant di Kota Medan. *Jurnal Ilmiah Maksitek*, 6(2): 135–6.
5. Pratama I, Budayanti N, Darwinata A, Agus M. 2021. Karakteristik pasien tuberculosis paru dengan multidrug resisten di RSUP Sanglah, Bali tahun 2017–2018. *Jurnal Medika Udayana*, 10(4): 63–7.
6. Harishankar M, Selvaraj P, Bethunaickan R. 2018. Influence of genetic polymorphism towards pulmonary tuberculosis susceptibility. *Frontiers in Medicine*, 5(213): 1–18.
7. Magee MJ, Sun Y V, Brust JCM, Shah NS, Ning Y, Allana S, et al. 2017. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with reduced rate of sputum culture conversion in multidrug-resistant tuberculosis patients in South Africa. *PLoS One*, 12(7): 1-11.
8. Wang M, Kong W, He B, Li Z, Song H, Shi P, et al. 2018. Vitamin D and the promoter methylation of its metabolic pathway genes in association with the risk and prognosis of tuberculosis. *Clinical Epigenetics*, 10(1): 118.
9. Jiang C, Zhu J, Liu Y, Luan X, Jiang Y, Jiang G, et al. The methylation state of VDR gene in pulmonary tuberculosis patients. *J Thorac Dis [Internet]*. 2017;9(11). Available from: <https://jtd.amegroups.com/article/view/16332/13759>.
10. Fatima S, Kumari A, Agarwal M, Pahuja I, Yadav V, Dwivedi VP, et al. Epigenetic code during mycobacterial infections: therapeutic implications for tuberculosis. *FEBS J [Internet]*. 2021;1–3. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.16170>.
11. Li J, Fu L, Wang G, Subbian S, Qin C, Zhao A. 2020. Unmethylated CpG motif-containing genomic DNA fragment of *Bacillus calmette-guerin* promotes macrophage functions through TLR9-mediated activation of NF-κ B and MAPKs signaling pathways. *Innate Immun [Internet]*, 26(3): 183–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31615313/>.
12. Huang S-J, Wang X-H, Liu Z-D, Cao W-L, Han Y, Ma A-G, et al. Vitamin D deficiency and the risk of tuberculosis: a meta-analysis. *Drug Desain Dev Ther [Internet]*. 2017;11:91–102. Available from: <https://doi.org/10.2147%2FDDDT.S79870>.
13. Aibana O, Huang C-C, Aboud S, Amedo-Pena A, Becerra MC, Bellido-Blasco, et al. Vitamin D status and risk of incident tuberculosis disease: A nested case-control study, systematic review, and individual-participant data meta-analysis. *Plos Med [Internet]*. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002907>.