

RESEARCH ARTICLE

Polimorfisme Gen *Vitamin D Receptor* (VDR) BsmI pada *Multi Drug Resistant Tuberculosis* (MDR TB)

Christine Verawaty Sibuea¹, Maria Oktaviana Pardosi¹, Ira Maylani Simbolon¹, Paulus Adventus Tampubolon¹

¹Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen

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

Abstract

Background: The increasing cases of Tuberculosis (TB) is a concerned health problem to the world, especially Indonesia, which Indonesia is the 2nd most TB cases in the world. The increase in TB cases is accompanied by the increase in Multi Drug Resistant Tuberculosis (MDR TB) cases. Genetic and immunity host factor, inadequate treatment and bacterial mutations affect the infection of MDR TB. Vitamin D has an important role in immune regulatory to eliminate *Mycobacterium tuberculosis*, as of it can affect the susceptibility to MDR TB.

Objective: The aim of this study was to determine the polymorphism of the Vitamin D Receptor (VDR) BsmI gene in MDR tuberculosis.

Methods: This study was a case control study involving 32 non-MDR TB patients and 32 MDR TB patients. The VDR gene was restricted by the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method using BsmI enzyme and agarose gel visualization was performed.

Results: Homozygous variant GG genotype was found higher in non-MDR Tuberculosis (43.75%) than in MDR Tuberculosis (18.8%), and heterozygotes AG genotype was not found in MDR Tuberculosis either in non MDR Tuberculosis. There was no significant relationship between the VDR BsmI gene polymorphism and MDR tuberculosis ($p>0.05$).

Conclusion: This results showed that BsmI VDR gene polymorphism does not affect the susceptibility to MDR tuberculosis.

Keywords: VDR gene, polymorphism, MDR tuberculosis, non-MDR tuberculosis, RFLP.

Abstrak

Latar belakang: Peningkatan kasus Tuberculosis (TB) merupakan masalah kesehatan yang menjadi perhatian bagi dunia khususnya Indonesia, dimana Indonesia merupakan negara dengan kasus TB terbanyak ke-2 di dunia. Kasus TB yang meningkat disertai juga dengan peningkatan kasus *Multi Drug Resistant Tuberculosis* (MDR TB). Faktor pejamu genetik dan imunitas, pengobatan yang tidak adekuat dan mutasi bakteri, memengaruhi terjadinya MDR TB. Vitamin D memiliki peran penting dalam regulasi imunitas tubuh untuk mengeliminasi *mycobacterium tuberculosis*, sehingga dapat memengaruhi kerentanan seseorang menderita MDR TB.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme gen *Vitamin D Receptor* (VDR) BsmI pada MDR Tuberculosis.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian *case control* yang melibatkan 32 penderita non MDR TB dan 32 penderita MDR TB. Gen VDR direstriksi dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) menggunakan BsmI dan dilakukan visualisasi gel agarose.

Hasil: Genotip homozigot varian GG lebih banyak ditemukan pada non MDR Tuberkulosis (43,75%) dibandingkan pada MDR Tuberkulosis (18,8%) dan genotip heterozigot AG tidak terdapat pada semua subjek. Tidak terdapat hubungan yang signifikan antara polimorfisme gen VDR BsmI dengan MDR Tuberkulosis ($p > 0,05$).

Kesimpulan: Polimorfisme gen VDR BsmI tidak memengaruhi kerentanan menderita MDR tuberkulosis.

Kata Kunci: Gen VDR, polimorfisme, MDR Tuberkulosis, Non MDR Tuberkulosis, RFLP

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu dari 10 penyebab kematian terbesar di dunia. Tuberkulosis disebabkan oleh basil *Mycobacterium tuberculosis* yang menyebar melalui percikan bakteri penderita di udara misalnya melalui batuk. Penyakit ini biasanya memengaruhi paru tetapi juga dapat memengaruhi bagian di luar paru (*extrapulmonary tuberculosis*). Data WHO pada tahun 2019 menunjukkan jumlah kasus yang meningkat dari tahun sebelumnya, yaitu terdapat 7,1 juta penderita TB dan Indonesia merupakan negara terbanyak ke-2.¹

Tuberkulosis dapat disembuhkan dengan rejimen pengobatan yang adekuat. Data WHO tahun 2020 menunjukkan bahwa 85% penderita tuberkulosis dapat berhasil diobati dengan rejimen obat 6 bulan.⁽¹⁾ Resistensi terhadap sekurang-kurangnya dua jenis anti tuberkulosis yang digunakan atau yang disebut dengan *Multi Drug Resistant Tuberculosis* (MDR TB), juga merupakan masalah kesehatan yang mengkhawatirkan.² Hampir setengah juta penduduk resisten terhadap rifampisin dan 79% merupakan MDR TB pada tahun 2019. Kasus MDR TB meningkat secara global 10% dari tahun 2018 ke tahun 2019.¹ Tahun 2018 diperkirakan ada sekitar 186.772 kasus baru MDR TB yang meningkat dari 160.684 pada tahun 2017. Estimasi kasus resistensi di Indonesia menurut TB report WHO adalah 2,4% dari 13% kasus MDR TB yang diberi pengobatan pada tahun 2019.³

MDR TB dapat disebabkan oleh beberapa faktor antara lain pengobatan yang tidak adekuat, konsumsi obat yang tidak teratur, mutasi dari bakteri tuberkulosis, faktor imunitas dan faktor genetik pejamu. Kadar vitamin D dan gen VDR telah dikaitkan dengan terjadinya MDR TB.^{4,5}

Polimorfisme gen telah disebutkan sebagai salah satu penyebab kerentanan seseorang terhadap tuberkulosis dan polimorfisme gen juga telah diteliti sebagai penyebab terjadinya MDR TB. Polimorfisme gen sebagai penyebab kerentanan terjadinya MDR TB telah menjadi fokus penelitian pada beberapa tahun terakhir ini. Polimorfisme gen IL-2, IL-3, IL-10, *Solute Carrier Family* (SLC11A1), dan *ATP-Binding Cassete B1* (ABCB1) telah diteliti perannya dalam kerentanan seseorang menderita MDR TB.^(2,5,6) Ketika terjadi infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, vitamin D mengaktifkan makrofag untuk menghambat pertumbuhan bakteri *mycobacterium tuberculosis*. Reseptor vitamin D di makrofag diaktifkan dan sintesis cathelicidin diaktifkan untuk mengeliminasi *mycobacterium tuberculosis*, sehingga disebutkan bahwa polimorfisme gen VDR dapat memengaruhi eliminasi bakteri *mycobacterium tuberculosis*. Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) VDR BsmI yang dianggap berperan penting dalam eliminasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.⁶ Penelitian tentang polimorfisme gen VDR pada MDR TB masih sangat terbatas, khususnya di kota

Medan dengan jumlah penduduk yang cukup banyak. Kasus TB dan MDR TB juga cukup besar. Hal inilah yang melatarbelakangi penelitian ini, untuk menganalisis polimorfisme gen VDR BsmI dengan MDR TB di kota Medan.

Metode

Penelitian ini merupakan studi *case control* yang melibatkan 32 penderita non MDR TB dan 32 penderita MDR TB pada RS Haji Adam Malik Medan dan RS Khusus Paru Medan yang memenuhi kriteria penelitian. DNA diisolasi dari sampel darah penderita setelah memperoleh *informed consent* dari subjek penelitian.

Isolasi DNA dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung antikoagulan dan dilakukan isolasi DNA sesuai dengan protokol Wizard® *Genomic DNA Purification Kit*. Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode PCR menggunakan *Sensifast no rox*. Primer VDR yang digunakan adalah GAGAAGCTGGGAGTGTGTCT (R) dan CAGAGGAAGCGGGAGATGAT (F). Tahapan PCR dilakukan sebanyak 25 siklus dengan denaturasi pada 95°C selama 15 detik, *annealing* pada 56,5 °C selama 15 detik dan ekstensi pada 72°C selama 10 detik.

Restriction Length Polymorphism (RFLP)

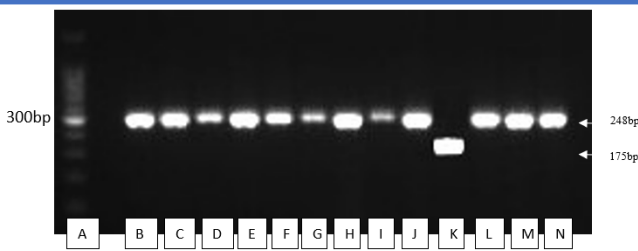
Restriksi gen dilakukan dengan menggunakan *Fastdigest* BsmI Mva1269I sesuai dengan protokolnya. 10 mikro Hasil reaksi PCR dicampur dengan 1 mikro Mva1269I dan diinkubasi pada 37° selama 2 jam. Hasil digesti divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Visualisasi dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Gel agarosa 5% dibuat dengan mencampurkan 6,75 gr agarosa dalam 135 mL TAE 1x. Larutan dipanaskan dan diaduk di atas *magnetic hot stirrer* hingga mendidih dan berwarna jernih serta ditambahkan ethidium bromide. Cairan dituang ke *Casting Tray* dengan *Gel Comb* dan dibiarkan sampai mengeras. Sebanyak 8 µL hasil amplikon PCR dan hasil RFLP dipipet ke dalam sumur sumur gel dan elektroforesis dijalankan selama 60 menit dengan tegangan 80 Volt. Gel dipindahkan ke dalam *Gel Documentation* untuk mendokumentasikan hasil elektroforesis.

Hasil dan Pembahasan

Hasil amplifikasi PCR adalah 500 bp amplikon, dan hasil restriksi dengan enzim BsmI Mva1269I homozigot AA *wildtype* 248 bp, homozigot GG *variant* 175 bp dan 73 bp dan heterozigot AG 248 bp, 175 bp dan 73 bp. Hasil elektroforesis *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) gen VDR BsmI dapat dilihat pada gambar 1 berikut ini.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Produk RFLP VDR gen BsmI (Lane A: DNA ladder/marker, lane B-J,N homozigot AA *wildtype*, lane K homozigot GG *variant*)

Allel GG pada penderita MDR TB lebih banyak ditemukan pada laki-laki (6,3%) dibandingkan perempuan (3,1%), demikian juga pada non MDR TB (10,9% vs 3,1%) serta tidak terdapat allel heterozigot AG pada laki-laki maupun perempuan (Tabel 1). Hal ini dapat disebabkan oleh adanya pola hidup yang memengaruhi genotip, di mana laki-laki memiliki beban kerja yang lebih berat, kurang istirahat, gaya hidup yang tidak sehat seperti minum

alkohol dan merokok dan lebih sering beraktivitas di luar rumah sehingga sering terpapar polusi udara⁷. Kebiasaan merokok dan minum alkohol yang lebih banyak dilakukan laki-laki juga dapat menyebabkan turunnya antibodi tubuh sehingga memengaruhi terhadap peningkatan risiko terkena MDR TB.

Allel GG paling banyak terdapat pada kelompok usia 18-49 tahun baik pada MDR TB maupun pada non MDR TB (9,4%) dan tidak terdapat allel AG pada semua kelompok jenis kelamin dan kelompok usia (Tabel 1). Hal ini juga dapat disebabkan oleh adanya pengaruh pola hidup, karena usia produktif merupakan usia dengan aktivitas yang lebih tinggi sehingga lebih rentan mengalami MDR Tuberkulosis dibandingkan dengan kelompok usia lain.^(8,9) Usia tersebut merupakan usia dengan mobilitas tinggi dimana lebih banyak berinteraksi dengan orang lain sehingga penularan lebih mudah terjadi.⁽¹⁾

Tabel 1. Polimorfisme BsmI pada MDR Tuberkulosis dan Non MDR Tuberkulosis Berdasarkan Jenis Kelamin dan Usia

	Polimorfisme gen VDR BsmI					
	AA		GG		AG	
	MDR TB	Non MDR TB	MDR TB	Non MDR TB	MDR TB	Non MDR TB
Laki-laki	20 (31,3%)	15 (23,4%)	4 (6,3%)	7 (10,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Perempuan	6 (9,4%)	8 (12,5%)	2 (3,1%)	2 (3,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
< 18 tahun	0 (0,0%)	2 (3,1%)	0 (0,0%)	1 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
18 – 49 tahun	14 (21,9%)	18 (28,1%)	6 (9,4%)	6 (9,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
> 50 tahun	12 (18,8%)	3 (4,7%)	0 (0,0%)	2 (3,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

Allel GG lebih banyak ditemukan pada non MDR TB (43,75%) dan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara polimorfisme gen VDR BsmI dengan MDR TB ($p > 0,05$) (Tabel 2). Vitamin D mengaktifkan makrofag untuk menghambat pertumbuhan bakteri ketika terjadi infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Ikatan yang terjadi antara reseptor vitamin D dan makrofag mengaktifkan sintesis cathelicidin sehingga terjadi proses eliminasi *Mycobacterium tuberculosis*.² Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa polimorfisme gen VDR BsmI tidak memengaruhi kerentanan seseorang menderita penyakit MDR TB. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat banyak faktor yang memengaruhi kerentanan seseorang terinfeksi MDR TB. Kurangnya asupan vitamin D juga dapat memengaruhi imunitas seseorang termasuk dalam proses eliminasi *mycobacterium tuberculosis*. Apabila kadar vitamin D dalam darah kurang, maka akan memengaruhi banyaknya reseptor vitamin D yang ditempati vitamin D, dan kurangnya ikatan yang terbentuk akan memengaruhi cathelicidin dan eliminasi *Mycobacterium tuberculosis* oleh makrofag.⁶ Hal ini merupakan keterbatasan penelitian ini dikarenakan tidak dilakukan pengukuran kadar vitamin D dalam darah penderita MDR TB maupun pada non MDR TB.

Faktor sensitivitas terhadap obat anti tuberkulosis dan resistensi bakteri akibat mutasi juga dapat memengaruhi seseorang menderita MDR TB. Resistensi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* terhadap obat anti tuberkulosis lini pertama, akan menyebabkan kegagalan dalam eliminasi *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabel 2. Hubungan Polimorfisme gen VDR BsmI dengan MDR TB

	MDR TB	Non MDR TB	Nilai p
AA	26 (81,2%)	18 (56,3%)	0,058
GG	6 (18,8%)	14 (43,7%)	
AG	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Total	32 (100%)	32 (100%)	

Adanya polimorfisme gen lainnya mungkin dapat mempengaruhi kerentanan seseorang menderita TB. Penelitian- penelitian polimorfisme gen IL-2, IL-3, IL-10, *Solute Carrier Family* (SLC11A1), dan *ATP-Binding Cassete B1* (ABCB1) juga telah

diteliti perannya dalam kerentanan seseorang menjadi MDR TB^{2,5,6}. *Linkage disequilibrium* (LD) polimorfisme gen VDR BsmI dengan polimorfisme haplotipe lain juga dapat mempengaruhi kerentanan seseorang menderita penyakit, dan hal ini juga dapat mempengaruhi kerentanan menderita MDR TB.⁷

Kesimpulan

Polimorfisme gen VDR BsmI tidak mempengaruhi kerentanan menderita MDR TB dan dibutuhkan analisa polimorfisme gen lainnya untuk mengetahui faktor penyebab kerentanan MDR TB.

Daftar Pustaka

1. Miotto P, Zhang Y, Cirillo DM, Yam WC. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Oct 11];23(12):1098–113. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30189463/>
2. Tilahun M, Shimelis E, Wogayehu T, Assefa G, Wondimagegn G, Mekonnen A, et al. Molecular detection of multidrug resistance pattern and associated gene mutations in *M. tuberculosis* isolates from newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients in Addis Ababa, Ethiopia. *PLoS One* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Oct 11];15(8 August):1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32750053/>
3. Ayyubi RI Al, Liza HM. Prevalensi dan faktor-faktor Yang terkait dengan perkembangan kejadian penyakit tuberculosis multidrug resistant di Kota Medan. *Jurnal Ilmiah Maksitek*. 2021; 6(2): 135–6
4. Saputri IN, Munthe EL. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Implementation of Control Measures in Ketapang District, West Borneo, Indonesia. *J Respirologi Indones* [Internet]. 2020 Jan 29 [cited 2021 Oct 11];40(1):6–15. Available from: <http://jurnalrespirologi.org/index.php/jri/article/view/91>
5. Lu Z, Jiang W, Zhang J, Lynn HS, Chen Y, Zhang S, et al. Drug resistance and epidemiology characteristics of multidrug-resistant tuberculosis patients in 17 provinces of China. *PLoS One* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Oct 11];14(11):2–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31751390/>
6. Pratama I, Budayanti N, Darwinata A, Agus M. Karakteristik pasien tuberculosis paru dengan multidrug resisten di RSUP Sanglah, Bali tahun 2017–2018. *J Med Udayana* [Internet]. 2021 [cited 2021 Oct 11];10(4):63–7. Available from: <https://ojs.unud.ac.id/index.php/eum/article/download/75023/40172>
7. Liu G, Xia R, Wang Q, Wang Z, Ying B, Yan H. Significance of LncRNA CASC8 genetic polymorphisms on the tuberculosis susceptibility in Chinese population. *J Clin Lab Anal*. 2020;34:e23234