

DISERTASI

**ANALISIS KADAR Fe SERUM DENGAN POLIMORFISME DAN
EKSPRESI mRNA GEN *NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED
MACROPHAGE PROTEIN 1 (NRAMP1)* PADA PENDERITA
TUBERKULOSIS (TB) DAN KONTAK SERUMAH**

***ANALYSIS OF SERUM IRON (Fe) LEVELS WITH POLYMORPHISM
AND mRNA EXPRESSION OF THE NATURAL RESISTANCE-
ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN 1 (NRAMP1) IN
TUBERCULOSIS (TB) PATIENTS AND HOUSEHOLD CONTACTS***

WIENDRA WAWORUNTU

C013191037



**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

DISERTASI

ANALISIS KADAR Fe SERUM DENGAN POLIMORFISME DAN EKSPRESI mRNA GEN NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN 1 (NRAMP1) PADA PENDERITA TUBERKULOSIS (TB) DAN KONTAK SERUMAH

ANALYSIS OF SERUM IRON (Fe) LEVELS WITH POLYMORPHISM AND mRNA EXPRESSION OF THE NATURAL RESISTANCE ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN 1 (NRAMP1) IN TUBERCULOSIS (TB) PATIENTS AND HOUSEHOLD CONTACTS

Disusun dan diajukan
Oleh

Wiendra Waworuntu
C013191037

Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal, 17 Februari 2023 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

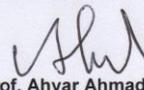
Promotor,


Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK(K)
Nip. 19670910 199603 1 001

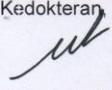
Co. Promotor


Prof. dr. Anwar Mallongi, SKM, M.Sc, Ph.D
Nip.19740816 199903 1 002

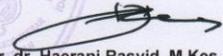
Co. Promotor


Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D
Nip.19671231 199103 1 020

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran


Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
Nip.19671103 199802 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,


Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, FINASIM Sp.GK
Nip.19680530 199603 2 001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp. (0411)586010, (0411)586297
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : WIENDRA WAWORUNTU
NIM : C013191037
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

**ANALISIS KADAR Fe SERUM DENGAN POLIMORFISME DAN EKSPRESI mRNA GEN
NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN 1 (NRAMP1) PADA
PENDERITA TUBERKULOSIS (TB) DAN KONTAK SERUMAH**

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 24 Januari 2023

Yang menyatakan,



WIENDRA WAWORUNTU

PRAKATA

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh. Alhamdulillah, segala puji serta syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi dengan judul **Analisis Kadar Fe Serum dengan Polimorfisme dan Ekspresi mRNA Gen *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1 (NRAMP1)* pada Penderita Tuberkulosis (TB) dan Kontak Serumah**. Disertasi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Doktor dari Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan disertasi ini masih terdapat kelemahan yang perlu diperkuat dan kekurangan yang perlu dilengkapi. Karena itu, dengan rendah hati penulis mengharapkan masukan, koreksi dan saran untuk memperkuat kelemahan dan melengkapi kekurangan tersebut.

Dengan tersusunnya disertasi ini, penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada **Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK** selaku Ketua Tim Promotor, yang telah bersedia memberikan ilmu, inspirasi dan motivasi serta senantiasa meluangkan waktu dan kesempatannya untuk membimbing selama masa studi terutama saat riset dan penyelesaian disertasi ini. Penulis juga menyampaikan terima kasih untuk **Prof. Anwar Mallongi, SKM, M.Sc., Ph.D** dan **Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D** selaku kopromotor, yang berkenan memberi

bimbingan, arahan dan masukan selama masa studi penulis dan penyelesaian disertasi ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada:

1. **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc.** selaku Rektor Universitas Hasanuddin Makassar;
2. **Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Sc, SpPD-KGH, SpGK, FINASIM** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar;
3. **Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes** selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin Makassar;
4. Seluruh Tim penguji: **Prof. Dr. dr. Muhammad Amin, Sp.P(K), dr. Agussalim Bukhari, M.Clin, Med, Sp.GK, Ph.D, Dr. dr. Fransisca Srioetami, Sp.PK., M.Si, Dr. dr. Nur Ahmad Tabri, SpPD, K-P, SpP(K), FINASIM, DR dr Irawati Djaharuddin Sp.P(K) dan Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS** atas waktu dan kesempatannya dalam menguji serta arahan dan masukannya agar disertasi ini menjadi lebih baik.
5. Suami tercinta, **Muh. Basyir** dan anak-anak, **Fauzi** dan **Naufal Rifqi** yang senantiasa memberikan doa, kasih sayang, dan motivasi untuk penulis.
6. Kedua orang tua penulis, yang penulis hormati dan cintai, ayahanda **H. Edict Waworuntu** (alm.) dan ibunda **Syamsiar Rajaloe** (alm.) atas segala curahan kasih dan sayang serta bimbingan dan didikannya kepada penulis selama masih hidup.
7. Staf Laboratorium HUM-RC Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, **Handayani Halik, S.Si, M.Si** dan **Yusuf, S.Si** atas bantuannya selama penulis melakukan penelitian.

8. **dr. Najdah Hidayah** beserta keluarga atas dukungannya selama penyelesaian studi.
9. Staf S3 Kedokteran Universitas Hasanuddin (**Bapak Akmal, S.Sos, MAP, Bapak Abdul Muin Amd.FT dan Bapak Rahmat**) atas bantuannya selama penulis menjalani masa studi.
10. Semua teman-teman seperjuangan selama baik di program studi S3 Ilmu Kedokteran yang selalu memberikan motivasi, dorongan, dan informasi kepada peneliti selama masa studi.
11. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian, atas perhatian, perkenan dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya disertasi ini. Penulis juga menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya untuk seluruh partisipan penelitian, yaitu kepada para pasien dan kontak serumahnya yang telah berkenan untuk berpartisipasi dalam penelitian ini.

Dengan memperhatikan dan mengikuti bimbingan, arahan dan perbaikan dari tim promotor dan penguji, penulis berharap disertasi ini dapat bermanfaat bagi semua yang pembacanya.

Makassar, 10 Maret 2023

Wiendra Waworuntu

ABSTRAK

WIENDRA WAWORUNTU. *Analisis Kadar Fe Serum dengan Polimorfisme dan Ekspresi m-RNA Gen Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1 (NRAMP-1) pada Penderita Tuberkulosis (TB) dan Kontak Serumah* (dibimbing oleh Muhammad Nasrum Massi, Ahyar Ahmad, dan Anwar Mallongi).

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh polimorfisme dan ekspresi gen NRAMP-1 serta korelasinya dengan parameter kadar Fe dalam kerentanan terjadinya penyakit TB paru. Metode Penelitian awal ini melibatkan kasus TB dan Kontak TB dengan total sampel sebanyak tujuh puluh orang. Pengambilan sampel dilakukan secara konsekutif dengan kriteria hasil BTA positif untuk kasus TB dan hasil IGRA positif untuk Kontak TB. Hasil penelitian menunjukkan kadar hemoglobin (Hb) pada kelompok kasus TB ditemukan lebih rendah (median 11,9 gr/dL) dibandingkan kelompok kontak serumah (median 13 gr/dL) dengan nilai $p=0,013$. Demikian juga kadar Fe serum ditemukan lebih rendah pada kelompok kasus TB (median 149,6 $\mu\text{mol/L}$) dibandingkan kelompok kontak serumah (median 628,53 $\mu\text{mol/L}$) dengan nilai $p<0.001$. Sementara kadar feritin pada kasus TB cenderung lebih tinggi, berbeda dengan transferin yang ditemukan cenderung lebih rendah pada kasus TB dibandingkan kontak serumah. Namun, keduanya tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Ekspresi gen NRAMP-1 lebih rendah pada kasus TB dibandingkan dengan kontak serumah ($p=0,011$). Tidak ditemukan hubungan antara polimorfisme NRAMP-1 ekson 3 -274 C/T (rs-2276631), intron 4 469+14 G/C (rs-3731865), dan ekson 15 D-543-N (rs-17235409) dengan kadar Fe serum. Namun, terdapat korelasi positif antara ekspresi gen NRAMP-1 dan kadar Fe serum ($r=0,367$, $p=0,006$). Lebih lanjut, polimorfisme NRAMP-1 D-543-N berperan dalam pengaruh tuberkulosis dengan kadar Fe dalam serum ($p=0,035$). Penelitian ini menunjukkan adanya korelasi ekspresi gen NRAMP-1 terhadap kadar Fe pada pasien TB dan kontak serumah dan menggambarkan kontribusi NRAMP-1 terhadap defisiensi besi pada pasien TB dan kontak serumahnya.

Kata kunci: kadar Fe serum, NRAMP-1, polimorfisme, ekspresi m-RNA gen, tuberkulosis



ABSTRACT

WIENDRA WAWORUNTU. *Analysis on Serum Fe Content with Polymorphism and mRNA Expression of Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1 (NRAMP1) Gene in Tuberculosis (TB) Patients and Household Contacts* (supervised by Muhammad Nasrum Massi, Ahyar Ahmad and Anwar Mallongi).

The research aims at investigating the effect of the polymorphism and gene expression of NRAMP1 and its correlation with the Fe content parameter in the pulmonary TB disease susceptibility. The initial research involved TB cases and TB contacts with the total samples of 70 people. Samples were selected using the consecutive sampling technique with the criteria of the positive AFB results for TB cases and positive IGRA results for the TB contacts. The research result indicates that the haemoglobin (Hb) content in the TB case group is found to be lower (median 11.9 g/dL) than the household contact group (median 13 g/dL) with the value of $p=0.013$. Similarly, the serum Fe content is found to be lower in the TB case group (median 149.6 $\mu\text{mol/L}$) than the household contact group (median 628.53 $\mu\text{mol/L}$) with the value of $p < 0.001$. Whereas, the ferritin content in the TB case group tends to be higher, in contrast with the transferrin content which is found to tend to be lower in the TB case group than the household contact group, however, both do not show the significant difference. The NRAMP1 gene expression is slower in the TB case group than the household contact group ($p=0.011$). There is no correlation between the NRAMP1 polymorphism exon 3 -274 C/T (rs2276631), intron 4 469+14 G/C (rs3731865), and exon 15 D543N (rs17235409) with the serum Fe content. However, there is the positive correlation between NRAMP1 gene expression and serum Fe content ($r=0.367$; $p=0.006$). Moreover, the NRAMP1 D543N polymorphism has the role to effect of the tuberculosis on the serum Fe content ($p=0.035$). The research also indicates the correlation between the NRAMP1 gene expression and serum Fe content in the TB patients and household contacts and describes the contribution of the NRAMP1 on the iron deficiency in the TB patients and household contacts.

Key words: serum Fe content, polymorphism, mRNA, expression, NRAMP1, tuberculosis



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	Error! Bookmark not defined.
PRAKATA	iv
ABSTRAK	Error! Bookmark not defined.
ABSTRACT	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar belakang	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan	7
1. Tujuan Umum	7
2. Tujuan Khusus	7
D. Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
A. Situasi TB dan Program Penanggulangan TB Nasional	9
B. Patogenesis TB	12
C. Anemia pada TB	19
D. Genetik <i>NRAMP1</i>	29
E. Kerangka Teori	35
F. Kerangka Konsep	36
G. Hipotesis	37
BAB III METODE PENELITIAN	38
A. RANCANGAN PENELITIAN	38
B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN	38

C.	POPULASI DAN SAMPEL PENELITIAN	38
1.	Populasi Sampel	38
2.	Sampel Penelitian	38
D.	KRITERIA PENELITIAN	39
1.	Kriteria Inklusi	39
2.	Kriteria Eksklusi	39
E.	Definisi Operasional dan Kriteria Objektif	40
F.	CARA PENGAMBILAN SAMPEL	41
G.	PROSEDUR KERJA	42
1.	Pemeriksaan Sputum	42
2.	Dekontaminasi Sputum	42
3.	Smear dengan Pewarnaan Ziehl-Neelsen	43
4.	Kultur Pada Medium Cair MGIT 960 (Mycobacteria Growth Indicator Tube)	43
5.	Pemeriksaan Pemeriksaan QuantiFERON-TB Gold In-Tube	43
6.	Pemeriksaan polimorfisme gen <i>NRAMP1</i>	45
7.	Ekstaksi RNA dari sampel darah	47
8.	Amplifikasi complementary DNA (cDNA) dengan Reverse Transcriptase-PCR	49
9.	Pemeriksaan ekspresi gen <i>NRAMP1</i> dengan <i>real time</i> PCR	50
10.	Pemeriksaan Kadar Transferin	50
11.	Pemeriksaan Kadar Ferritin	52
12.	Analisa Data	54
H.	IZIN PENELITIAN DAN <i>ETHICAL CLEARANCE</i>	56
BAB IV HASIL PENELITIAN		57
A.	Hasil Penelitian	57
1.	Karakteristik Partisipan	57
2.	Kadar Hemoglobin	62
3.	Kadar Fe serum, Feritin, dan Transferin pada kelompok kasus TB dan Kontak Serumah	64
4.	Polimorfisme <i>NRAMP1</i>	65
5.	Ekspresi <i>NRAMP1</i>	73
6.	Hubungan polimorfisme <i>NRAMP1</i> dengan ekspresi gen <i>NRAMP1</i> 74	
7.	Hubungan kadar Fe dengan polimorfisme <i>NRAMP1</i> pada TB dan kontak serumah	80

8. Korelasi kadar Fe serum, Feritin, dan transferin dengan ekspresi gen <i>NRAMP1</i>	84
9. Kontribusi polimorfisme <i>NRAMP1</i> dan ekspresi gen <i>NRAMP1</i> pada pengaruh kasus TB terhadap kadar Fe.	85
B. Pembahasan.....	89
1. Perbedaan kadar serum (Fe), feritin, dan transferin pada kasus TB dan kontak serumah.	91
2. Perbedaan distribusi genotipe polimorfisme <i>NRAMP1</i> pada kasus TB dan kontak serumah.	95
3. Perbedaan ekspresi gen <i>NRAMP1</i> pada kasus TB dan kontak serumah	98
4. Hubungan antara polimorfisme <i>NRAMP1</i> dengan ekspresi gen <i>NRAMP1</i> pada kasus TB dan kontak serumah.	99
5. Hubungan antara polimorfisme <i>NRAMP1</i> dengan kadar Fe serum pada kasus TB dan kontak serumah.	101
6. Korelasi antara ekspresi gen <i>NRAMP1</i> dengan kadar serum (Fe) pada kasus TB dan kontak serumah.	102
7. Kontribusi polimorfisme <i>NRAMP1</i> ekson 3 -274 terhadap kadar Fe serum	103
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	105
A. Kesimpulan	105
B. Saran.....	106
Lampiran	116

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Definisi Operasional dan Kriteria Objektif Variabel Penelitian	40
Tabel 2. Primer Pemeriksaan Polimorfisme Gen NRAMP1	47
Tabel 3. Karakteristik responden berdasarkan umur, jenis kelamin, status gizi, lama tinggal dan hubungan kekerabatan dengan pasien.....	58
Tabel 4. Karakteristik responden kasus TB berdasarkan gejala yang dialami	60
Tabel 5. Distribusi Frekuensi Kasus TB Berdasarkan Riwayat Lainnya.....	61
Tabel 6. Hasil Perikshaan IGRA pada Kontak TB dan Sputum BTA pada Kasus TB.....	61
Tabel 7. Kadar Hemoglobin (Hb) pada kelompok kasus TB dan Kontak Serumah.....	62
Tabel 8. Frekuensi responden TB dan kontak serumah yang mengalami anemia	64
Tabel 9. Frekuensi responden TB dan kontak serumah berdasarkan derajat keparahan anemia.....	64
Tabel 10. Kadar Fe serum, Feritin, dan Transferin pada Kelompok Kasus TB dan Kontak Serumah.....	65
Tabel 11. Frekuensi genotipe polimorfisme NRAMP1 pada kasus TB dan kontak.....	66
Tabel 12. Kesesuaian distribusi genotipe dengan kesetimbangan Hardy-Weinberg pada kelompok kontrol (kontak)	71
Tabel 13. Asosiasi polimorfisme NRAMP1 dengan kasus TB.....	72
Tabel 14. Analisis asosiasi haplotipe NRAMP1 dengan kasus TB.....	73
Tabel 15. Ekspresi relatif gen NRAMP1 pada kelompok Kasus TB dan Kontak Serumah.....	74
Tabel 16. Perbedaan ekspresi gen NRAMP1 (log) pada genotipe polimorfisme NRAMP1 ekson 3 -274 C/T.....	75
Tabel 17. Perbedaan ekspresi gen NRAMP1 pada genotipe polimorfisme NRAMP1 intron 4 469+14 G/C.....	77
Tabel 18. Perbedaan ekspresi gen NRAMP1 pada genotipe polimorfisme NRAMP1 Ekson 15 D543N (rs17235409)	78
Tabel 19. Hubungan polimorfisme NRAMP1 dengan ekspresi gen NRAMP1	80
Tabel 20. Perbedaan Kadar Fe serum antar genotipe polimorfisme NRAMP1	81
Tabel 21. Hubungan polimorfisme NRAMP1 dengan kadar Fe serum	82
Tabel 22. Hubungan polimorfisme NRAMP1 dengan kadar Fe serum pada kelompok kasus TB.....	83
Tabel 23. Hubungan polimorfisme NRAMP1 dengan kadar Fe serum pada kontak serumah.....	84
Tabel 24. Korelasi ekspresi gen NRAMP1 dengan kadar Fe serum, Feritin dan Transferin	85
Tabel 25. Pengaruh tuberkulosis terhadap kadar Fe dalam serum.....	85
Tabel 26. Pengaruh tuberkulosis terhadap kadar Fe dalam serum dengan polimorfisme ekson 3 -274 sebagai variabel moderasi.....	86

Tabel 27. Pengaruh tuberkulosis terhadap kadar Fe dalam serum dengan polimorfisme intron 4 sebagai variabel moderasi.	87
Tabel 28. Pengaruh tuberkulosis terhadap kadar Fe dalam serum dengan polimorfisme ekson 15 sebagai variabel moderasi.....	87
Tabel 29. Pengaruh tuberkulosis terhadap kadar Fe dalam serum dengan ekspresi gen <i>NRAMP1</i> sebagai variabel moderasi.	88
Tabel 30. Pengaruh tuberkulosis terhadap kadar feritin dan transferin	89

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Epidemiologi perjalanan penyakit TB	14
Gambar 2. Prognosis Kontak TB setelah terpapar <i>M.tb</i> dari Kasus Indeks TB	18
Gambar 3. Homeostasis Fe	21
Gambar 4. Strategi bakteri <i>M.tb</i> intraseluler untuk mendapatkan Fe	22
Gambar 5. Sitokin proinflamasi menahan zat besi melalui represi absorpsi besi oleh DMT1/NRAMP2 dan aktivasi sintesis feritin.	23
Gambar 7. Algoritma penentuan anemia defisiensi Fe (<i>iron deficiency anemia</i> , IDA) dan anemia penyakit kronik (<i>anemia chronic disease</i> , ACD)	27
Gambar 9. Kerangka Konsep Penelitian	36
Gambar 10. Alur Penelitian	55
Gambar 11. Diagram partisipan penelitian	57
Gambar 12. Kadar Hb (gr/dL) pada kelompok kasus TB dan kontak serumah.	63
Gambar 13. Kadar Fe serum, Transferin dan Feritin pada kasus TB dan kontak serumah.	65
Gambar 14. Kromatogram hasil sekuensing gen <i>NRAMP1</i> untuk identifikasi SNP Ekson 3	68
Gambar 15. Kromatogram hasil sekuensing gen <i>NRAMP1</i> untuk identifikasi Ekson 4 C125R (rs748447891). A. T/T; B. T/G	68
Gambar 16. Kromatogram hasil sekuensing gen <i>NRAMP1</i> untuk identifikasi SNP Intron 4 469+14 G/C (rs3731865). A. G/G; B. G/C	69
Gambar 17. Kromatogram hasil sekuensing gen <i>NRAMP1</i> untuk identifikasi SNP Ekson 15 D543N (rs17235409). A. G/G; B. G/A	69
Gambar 18. Kromatogram hasil sekuensing gen <i>NRAMP1</i> untuk identifikasi polimorfisme 3'UTR TGTG del. Gambar menunjukkan tidak adanya deleksi TGTG pada 3' UTR. Pada studi ini, tidak ditemukan sampel dengan TGTG del/del.	70
Gambar 19. Perbandingan ekspresi relatif gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok kasus TB dan kontak serumah. Ekspresi relatif gen <i>NRAMP1</i> lebih tinggi secara signifikan pada kelompok kontak serumah dibanding kelompok kasus TB ($p=0,011$). Tanda (*) menunjukkan nilai $p<0,05$	73
Gambar 20. Perbedaan ekspresi gen <i>NRAMP1</i> (log) antar genotipe polimorfisme <i>NRAMP1</i> ekson 3 -274 C/T.	76
Gambar 21. Perbedaan ekspresi gen <i>NRAMP1</i> antar genotipe polimorfisme <i>NRAMP1</i> Intron 4 469+14 G/C.	77
Gambar 22. Perbedaan ekspresi gen <i>NRAMP1</i> pada genotipe polimorfisme Ekson 15 D543N	79
Gambar 23. Distribusi kadar Fe serum (umol/L) antar genotipe pada polimorfisme <i>NRAMP1</i> ekson 3 -274 C/T (rs2276631), intron 4 469+14 G/C (rs3731865), dan ekson 15 D543N (rs17235409).	82

DAFTAR SINGKATAN

BTA	: basil tahan asam
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
Fe	: Ferrous ion
FKRTL	: <i>Fasilitas Kesehatan Rujukan Tindak Lanjut</i>
HIV	: <i>Human immunodeficiency virus</i>
IGRA	: <i>interferon-gamma release assay</i>
IL-10	: <i>interleukin-10</i>
IL-4	: <i>interleukin-4</i>
LTBI	: <i>Latent TB Infection</i>
<i>M.tb</i>	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR	: <i>multidrug resistant</i>
NRAMP1	: natural resistance-associated macrophage protein 1
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD-1	: <i>Programmed cell death protein 1</i>
PDL1	: <i>Programmed Death Ligand 1</i>
PPD	: <i>purified protein derivative</i>
SNP	: <i>Single nucleotide polymorphism</i>
SO	: <i>Sensitif obat</i>
TB	: Tuberculosis
TGF- β	: <i>transforming growth factor beta</i>
TST	: <i>Tuberculin skin test</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar belakang

Tuberkulosis (TB), secara global merupakan penyakit menular menahun yang menjadi salah satu dari 10 penyebab utama kematian dan nomor satu yang disebabkan pathogen tunggal. TB disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis (M.tb)*, yang menyebar ketika penderita TB mengeluarkan *M.tb* ke udara; misalnya batuk atau bersin. Sekitar seperempat populasi dunia telah terinfeksi oleh *M.tb* yang berisiko untuk berkembang menjadi penyakit TB, terjadi terutama pada daerah endemis TB (World Health Organization, 2022).

Penyebab TB sudah ditemukan sejak lebih dari satu abad lalu, namun hingga kini TB masih belum dapat tereliminasi. Masalah transmisi dan kemampuan khusus *M.tb* dalam bertahan hidup intraseluler serta menjadi bakteri “dorman” masih merupakan tantangan utama yang belum teratasi (Chee et al., 2018; Matteelli et al., 2017; Paton et al., 2019). Diagnosis TB didasarkan pada : (1) ditemukan bakteri *M.tb* secara utuh maupun bagian dari bakteri tersebut (DNA, protein dinding sel atau protein yang disekresi pada awal terjadi infeksi); dan (2) respon tubuh terhadap infeksi *M.tb*, baik respon imun tubuh maupun respon tubuh lainnya yang terjadi karena interaksi pejamu dan patogen (Ryu, 2015).

Sumber penularan dari penyakit TB adalah penderita TB yang dalam dahaknya mengandung bakteri *M.tb*. Bakteri *M.tb* yang terhirup melalui udara

akan masuk ke dalam saluran pernapasan. Seseorang yang terpapar *M.tb* tidak semuanya akan menjadi terinfeksi *M.tb*, hanya sekitar 10% yang akan menjadi terinfeksi *M.tb* dan sebagian besar (90%) tidak terinfeksi dan terjadi “*bacterial clearance*” (Kaufmann, 2020; Verrall et al., 2020; WHO, 2015). Seseorang yang terinfeksi *M.tb* tidak selalu mempunyai gejala penyakit TB dan memperlihatkan spektrum perjalanan penyakit yang sangat bervariasi. Faktor yang mempengaruhi seseorang yang terinfeksi akan berkembang menjadi sakit TB, diantaranya adalah malnutrisi, merokok, alkohol, diabetes melitus, infeksi HIV (*Human immunodeficiency virus*), dan pengobatan immunosupresi yang dapat menyebabkan perkembangan penyakit (Kaufmann, 2020; Narasimhan et al., 2013).

Program Penanggulangan TB Nasional telah melakukan pendekatan penemuan kasus TB, dan mengobati sampai sembuh. Peningkatan penemuan kasus TB dilakukan dengan mencari 10-20 orang yang tinggal disekitar rumah penderita TB (penemuan kasus kontak) (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020b).

Di negara-negara dengan insiden TB yang tinggi, anak-anak berusia ≥ 5 tahun, remaja dan orang dewasa yang kontak erat dengan penderita TB paru yang dikonfirmasi bakteriologis yang tidak memiliki TB aktif melalui evaluasi klinis atau sesuai dengan pedoman nasional dapat diberikan pengobatan pencegahan TB (World Health Organization, 2022).

Parameter untuk menentukan infeksi TB masih sangat terbatas, saat ini hanya dapat diketahui berdasarkan penilaian Tes Tuberkulin dan IGRA

(*interferon-gamma release assay*) (Zellweger et al., 2020). Seseorang yang mempunyai gejala batuk berdarah atau batuk darah selama lebih dari 2 minggu, demam yang tidak jelas penyebabnya, letih lesu dan sering berkeringat malam hari tanpa aktivitas disebut sebagai terduga TB (Patterson and Wood, 2019). Diagnosis TB ditegakkan berdasarkan hasil pemeriksaan mikroskopis BTA (basil tahan asam) atau biakan atau reaksi amplifikasi asam nukleat yang lebih dikenal sebagai PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020a). Pemeriksaan PCR saat ini telah menjadi diagnosis awal bagi penderita TB menggunakan alat Xpert *M.tb*/RIF (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020a).

Dalam upaya menunjang keberhasilan hidup *M.tb*, zat besi (Fe) merupakan mikronutrien yang sangat penting bagi *M.tb*. Mikobakteria bersaing dengan inang untuk mendapatkan Fe, baik secara langsung mengambil Fe intraseluler dari sitoplasma sel inang atau dengan mensintesis siderophore dan makromolekul (transferin, ferritin atau laktoferin) yang mempunyai afinitas tinggi untuk menangkap Fe ekstraseluler (Chiou and Connor, 2018; Gil-Santana et al., 2019; Reddy et al., 2018). Anemia pada infeksi *M.tb* disebabkan oleh masalah transportasi Fe. Sekalipun kadar Fe serum rendah pada anemia yang disebabkan peradangan maupun malnutrisi, namun kadar ferritin dan hepcidin akan tinggi pada anemia yang disebabkan infeksi *M.tb*. Fe mempunyai sifat koordinasi serbaguna dan digunakan dalam banyak proses biologis esensial. Bagian penting dari respon imun alamiah terhadap infeksi bakteri adalah keterbatasan Fe yang

dapat diakses dalam inang manusia yang diserap dengan protein melalui ikatan afinitas tinggi seperti transferin, ferritin, dan laktoferin atau dalam heme. Oleh karena itu, bagi banyak bakteri patogen, Fe adalah faktor pembatas untuk kolonisasi dan infeksi (Correnti and Strong, 2012; Doherty, 2007).

Sejumlah besar bukti menghubungkan ketersediaan Fe dengan patogenesis tuberkulosis (TB). Sebagai contoh, kelebihan Fe ditemukan meningkatkan risiko TB, kegagalan pengobatan TB, dan kematian pada pasien TB. Gangguan genetik manusia atau variasi gen seperti polimorfisme haptoglobin dan *NRAMP1* (*natural resistance-associated macrophage protein 1*) meningkatkan kadar Fe dalam makrofag yang meningkatkan risiko TB dan / atau memperburuk hasil penyakit. Disimpulkan bahwa status Fe inang adalah faktor penting yang belum dievaluasi dalam pencegahan dan terapi TB (Mitra et al., 2019). Berbagai gen berperan dalam mengatur metabolisme Fe sesuai dengan kebutuhan *M.tb*. *M.tb* memerlukan Fe dan menyimpannya, peran ferritin terhadap homeostasis Fe selama infeksi masih belum banyak diketahui (Mesquita et al., 2020; Reddy et al., 2018; Zondervan et al., 2018). Gen *NRAMP1* diketahui mengkode protein metal transporter penting yang berperan dalam masuknya Fe^{2+} , Mn^{2+} dan ion metal lainnya, yang khusus terjadi pada sel fagosit (Cellier, 2017, 2013; van Crevel et al., 2009; Sahiratmadja et al., 2007; Zhang et al., 2020).

Protein NRAMP1 mempunyai fungsi ganda, baik untuk pembawa Fe ke dalam maupun keluar sel fagosom yang dipengaruhi oleh pH dari sel tersebut (Biggs et al., 2001; Gruenheid et al., 1997; Soe-Lin et al., 2009).

Polimorfisme nukleotida tunggal (*Single nucleotide polymorphism/ SNP*) yang terdapat pada 4 regio spesifik gen *NRAMP1* telah banyak diteliti dan dikaitkan dengan heterogenitas, fungsi gen sebagai transporter Fe maupun kerentanan terhadap penyakit TB. Polimorfisme *NRAMP1* dipengaruhi etnis dalam suseptibilitas terhadap penyakit TB (Aravindan, 2019; Awuh and Flo, 2017; McHenry et al., 2020; Saelens et al., 2019; Sahiratmadja et al., 2007; Stein et al., 2017; Yuan et al., 2017).

Hasil meta analisis polimorfisme *NRAMP1* menyimpulkan adanya korelasi dengan kerentanan terhadap terjadinya penyakit TB paru (Yuan et al., 2017). Peran Fe dalam patogenesis TB besar terutama pada saat awal pertama kali terinfeksi dan pada keadaan kronis, diketahui bahwa polimorfisme gen *NRAMP1* mempunyai korelasi yang erat. Namun demikian analisis polimorfisme *NRAMP1* dan kadar Fe sebagai parameter prediksi perjalanan penyakit TB masih sangat kecil dan hingga saat ini belum ada yang melakukan penelitian pada kasus TB dan kontak serumahnya. Penilaian variasi faktor genetik yang mempengaruhi terjadinya penyakit yang dikaitkan dengan peran gen pada rancangan penelitian yang spesifik dalam penularan penyakit secara airborne diharapkan bermanfaat bagi penentu kebijakan.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang tersebut diatas, maka dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

1. Apakah terdapat perbedaan kadar Fe serum, feritin, dan transferin pada kasus TB dan kontak serumah?
2. Apakah terdapat hubungan antara genotipe polimorfisme *NRAMP1* dengan kasus TB?
3. Apakah terdapat perbedaan ekspresi gen *NRAMP1* pada kasus TB dan kontak serumah?
4. Apakah ada kontribusi dari polimorfisme *NRAMP1* dan ekspresi gen *NRAMP1* terhadap pengaruh kasus tuberkulosis dengan kadar Fe serum, feritin dan transferin.

Sebagian kecil orang yang terpapar *M.tb* akan menjadi terinfeksi TB dan hanya 10% diantaranya yang akan menjadi penderita TB paru. Polimorfisme gen *NRAMP1* berpengaruh terhadap patogenesis penyakit TB pada respon imun alamiah dan transportasi Fe. Berbagai upaya telah dikembangkan dalam diagnosis dan pengobatan TB untuk mencapai eliminasi TB, namun belum cukup data untuk menyimpulkan pengaruh faktor genetik dalam terjadinya kerentanan terhadap berkembangnya penyakit TB paru.

C. Tujuan

1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh polimorfisme dan ekspresi gen *NRAMP1* serta korelasinya dengan parameter kadar Fe dalam kerentanan terjadinya penyakit TB paru.

2. Tujuan Khusus

- a. Mengetahui perbedaan kadar Fe serum, feritin, dan transferin pada kasus TB dan kontak serumah.
- b. Mengetahui hubungan antara polimorfisme *NRAMP1* dengan kasus TB.
- c. Mengetahui perbedaan ekspresi gen *NRAMP1* pada kasus TB dan kontak serumah.
- d. Mengetahui ada tidaknya kontribusi dari polimorfisme *NRAMP1* dan ekspresi gen *NRAMP1* terhadap pengaruh kasus tuberkulosis dengan kadar Fe serum, feritin dan transferin.

D. Manfaat Penelitian

- a. Data yang diperoleh dapat menjadi dasar dari studi lebih lanjut mengenai polimorfisme menggunakan pemeriksaan qPCR dan sekuensing.
- b. Data yang diperoleh dapat menjadi saran dan masukan bagi fasilitas layanan kesehatan dalam memberikan gambaran polimorfisme dan

ekspresi gen *NRAMP1* menjadi pertimbangan untuk pengelolaan kasus TB.

- c. Kebijakan tentang penanggulangan anemia dengan pemberian zat besi mempunyai implikasi dalam perjalanan penyakit TB.
- d. Hasil penelitian ini sebagai informasi komprehensif yang dapat dimanfaatkan untuk menyusun kebijakan penting dengan mengetahui faktor yang berpengaruh terhadap transmisi dan kerentanan pejamu pada variasi genetik tertentu.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Situasi TB dan Program Penanggulangan TB Nasional

Berdasarkan laporan WHO (*World Health Organization*), Indonesia berada dalam daftar 30 negara dengan beban tuberkulosis tertinggi di dunia dan menempati peringkat tertinggi ketiga di dunia terkait angka kejadian tuberkulosis (World Health Organization, 2022). Insidensi tuberkulosis di Indonesia pada *Global TB Report 2021* di estimasikan ada 824.000 kasus TB baru di Indonesia setiap tahunnya dengan angka kematian sekitar 93.000. Masalah TB diperberat dengan adanya pandemi COVID-19 (*coronavirus disease-2019*) yang berakibat pada tidak tercapainya target-target indikator program penanggulangan TB di Indonesia, dimana pada tahun 2020 adalah 301 per 100.000 penduduk sedangkan target yang harus dicapai di tahun 2030 menurun menjadi 6 per 100.000 penduduk. Upaya penurunan angka kejadian dan angka kematian TB merupakan tantangan karena eliminasi TB harus dicapai di tahun 2030 (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020b; Kementerian Kesehatan RI, 2019; World Health Organization, 2022).

Program Penanggulangan TB Nasional telah mencakup rencana kegiatan secara rinci yang memperhatikan kesenjangan yang ada untuk mencapai target eliminasi TB tahun 2030. Kesenjangan yang telah terpetakan saat ini meliputi: orang yang terdiagnosis tuberkulosis tetapi tidak memulai pengobatan; orang dengan gejala tuberkulosis yang tidak mencari pengobatan; orang dengan tuberkulosis yang datang ke fasilitas kesehatan

tetapi tidak didiagnosis; orang yang terdiagnosis tuberkulosis dan diobati oleh pemberi layanan yang kesehatannya tetapi tidak dilaporkan pada program; orang dengan pengobatan tuberkulosis yang terlupakan tetapi tidak sembuh atau tidak menyelesaikan pengobatannya; orang yang terinfeksi tuberkulosis atau berisiko tinggi menjadi sakit Tuberkulosis (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020b).

Sasaran penanggulangan TB meliputi peningkatan penemuan kasus dengan diagnosis yang berkualitas, pengobatan sesuai standar dan pencegahan pengobatan. Penguatan/perluasan kegiatan program pengendalian TB difokuskan pada keterlibatan swasta dan organisasi masyarakat dalam program "*public private mix*". Peran komunitas dan pemerintah daerah merupakan kekuatan untuk mensukseskan target eliminasi TB. Layanan dan program pengendalian tuberkulosis telah tersedia di 11.468 layanan aktif lapor di Indonesia, yang terdiri dari 9.328 Puskesmas, 1.949 rumah sakit dan balai kesehatan paru serta 191 fasilitas pelayanan kesehatan lainnya (Lapas/Rutan, Dokter Praktik Mandiri dan Klinik Swasta). Namun demikian, kualitas layanan dan program pengendalian tuberkulosis masih perlu diperbaiki. Hasil laporan review epidemiologi tuberkulosis di Indonesia tahun 2019 menunjukkan bahwa tingkat keberhasilan pengobatan TB SO (sensitif obat) pada semua kasus baru dan kambuh pada periode 2013-2017 menurun dari 87,4% menjadi 84,7% dan masih di bawah target global 90%. Pada tahun 2017, kondisi ini sebagian besar terdampak oleh karena ketidakterersediaan hasil pengobatan pasca adanya aktivitas

penelusuran hasil akhir pengobatan di FKRTL Fasilitas Kesehatan Rujukan Tindak Lanjut(Kementerian Kesehatan RI, 2019).

Secara umum, penanggulangan tuberkulosis tahun 2020-2024 bertujuan untuk mempercepat upaya Indonesia untuk mencapai eliminasi tuberkulosis pada tahun 2030, serta mengakhiri epidemi tuberkulosis di tahun 2050. Tujuan khusus penanggulangan tuberkulosis tahun 2020-2024 yaitu:

1. Memperkuat manajemen program penanggulangan tuberkulosis yang responsif mulai dari pusat, provinsi, kabupaten, kota dan fasyankes.
2. Meningkatkan kualitas pelayanan tuberkulosis yang berpusat kepada kebutuhan masyarakat.
3. Meningkatkan akses masyarakat terhadap layanan tuberkulosis.
4. Meningkatkan kebutuhan dan kepedulian masyarakat terhadap pentingnya penanggulangan tuberkulosis.

Faktor risiko tinggi terhadap kejadian TB di Indonesia adalah merokok, kekurangan gizi, dan diabetes. Adanya risiko Diabetes mellitus juga diketahui meningkatkan kejadian TB MDR (*multidrug resistant*) (Saktiawati and Subronto, 2018). Angka kejadian HIV juga cenderung meningkat, sehingga meningkatkan kejadian TB-HIV. Skrining pada ibu diperlukan karena TB merupakan determinan kematian ibu. Populasi tertentu juga rentan untuk tertular atau menjadi sumber penularan TB misalnya anak, lanjut usia, dan tenaga kesehatan. Situasi tertentu juga mempunyai potensi transmisi tuberkulosis seperti pada tempat kerja tertentu, perkampungan

kumuh perkotaan, serta di congregated setting seperti lapas/rutan, tambang tertutup. Angka kejadian HIV juga cenderung meningkat, sehingga meningkatkan kejadian TB-HIV. Skrining pada ibu diperlukan karena TB adalah determinan kematian ibu. Populasi tertentu juga rentan untuk tertular atau menjadi sumber penularan TB misalnya anak, lanjut usia, tenaga kesehatan. Situasi tertentu juga mempunyai potensi transmisi TB seperti pada tempat kerja tertentu, perkampungan kumuh perkotaan, serta di congregated setting seperti lapas/rutan, tambang tertutup, barak pengungsi, asrama dan pondok pesantren (Rodriguez-Fernandez et al., 2016).

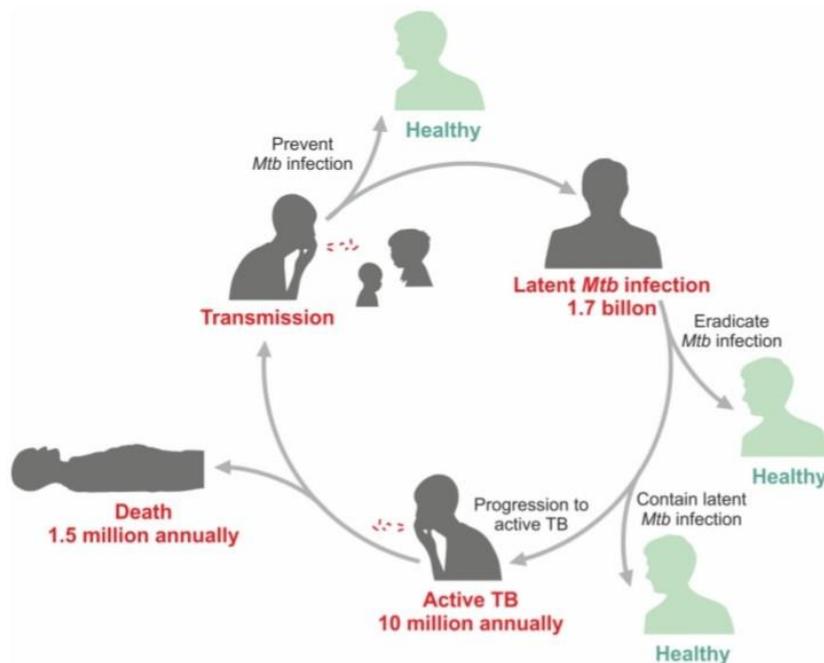
B. Patogenesis TB

Pembahasan patogenesis TB dimulai dari transmisi *M.tb*, yang masuk melalui saluran pernapasan, dan selanjutnya terjadi respon imun alamiah dan respon imun adaptif. Kedua respon imun ini selanjutnya akan membatasi penyebaran bakteri patogen *M.tb* dengan membentuk tuberkuloma dan berikutnya akan memberi kemungkinan *M.tb* untuk dapat bertahan hidup dan bermultiplikasi. Bila keadaan tidak memungkinkan untuk berkembang, *M.tb* akan bertahan dalam bentuk dorman (Ahmad, 2011; Cardona et al., 2018; Hunter, 2018).

Penelitian-penelitian dasar telah banyak dilakukan untuk memecahkan masalah berbagai pertanyaan mengapa perjalanan penyakit tidak selalu sama pada setiap individu yang terpapar *M.tb*. Faktor lingkungan juga sangat mempengaruhi, vitamin D dan zat besi juga mempengaruhi pertumbuhan bakteri (Biggs et al., 2001; Fernández-Mestre et al., 2015;

Medapati et al., 2017; Rudnick, 2019; Soe-Lin et al., 2009). Perkembangan teknologi pemeriksaan laboratorium telah mampu menilai sitokin dan kemokin yang dapat menggambarkan respon imun alamiah maupun adaptif secara lebih rinci. Akhir-akhir ini penilaian faktor genetik juga berkembang dengan pesat baik dari segi bakteri *M.tb* maupun dari sisi pasien TB (Anggraini et al., 2010; Aravindan, 2019; van Crevel et al., 2009; Fernández-Mestre et al., 2015; Larcombe et al., 2015; Liu et al., 2019; Medapati et al., 2017; Meilang et al., 2012; Pakasi et al., 2012; Rudnick, 2019; Sahiratmadja et al., 2007; Stagas et al., 2011; Yuan et al., 2017).

Perjalanan penyakit TB yang terjadi pada pasien dimulai dari proses terpapar *M.tb* melalui inhalasi hingga menjadi sakit, yang selanjutnya dapat menjadi sembuh atau dalam perjalanannya menjadi infeksi laten atau bahkan kematian, dan bahkan kematian yang divisualisasikan dalam gambar 1 (Kaufmann, 2020). Tantangan penelitian ini mengetahui lebih lanjut hal-hal yang berpusat pada granuloma yang menjadi sumber dari perjalanan penyakit TB yang mendasar. Perkembangan penyakit TB dipercayai bahwa hanya melalui tahapan terjadinya granuloma dan berkembang lebih lanjut tergantung dari kondisi lingkungan, sistem imun pasiennya dan jumlah serta polimorfisme bakteri *M.tb* (Hunter, 2018).



Gambar 1. Epidemiologi perjalanan penyakit TB
(Kaufmann, 2020)

Selama infeksi TB laten (*Latent TB Infection / LTBI*), *M.tb* terkandung dalam granuloma padat (Barry et al., 2009; Gengenbacher and Kaufmann, 2012; Simmons et al., 2018). LTBI berubah menjadi penyakit TB aktif ketika granuloma menjadi nekrotik dan kemudian bersifat caseus. Ini terjadi pada sekitar 5% orang dengan LTBI dalam 2 tahun pertama dan 5% lainnya pada waktu kemudian. Jadi, hanya sekitar 10% dari 1,7 miliar orang dengan LTBI berkembang menjadi penyakit TB aktif (Houben and Dodd, 2016). Perkembangan menuju penyakit aktif disebabkan oleh melemahnya respons imun melalui beberapa mekanisme yang belum sepenuhnya dipahami. Sangat mungkin bahwa sel-sel penekan yang berasal dari myeloid dan limfosit T regulatoris berpartisipasi dalam mengurangi perlindungan imunitas (Brighenti and Ordway, 2017; Dorhoi and Du Plessis, 2018; Sia and

Rengarajan, 2019). Sel-sel ini menghasilkan sitokin penghambat termasuk IL-4 (interleukin-4), IL-10 (interleukin-10), dan mentransformasikan TGF- β (*transforming growth factor beta*). Selain itu, kontrol pos pemeriksaan yang berlebihan melalui molekul permukaan penghambat termasuk PD-1 / PDL-1 (*Programmed cell death protein 1/Programmed death ligand 1*) dan interaksi co-reseptor CTLA-4 / B7 (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) kemungkinan terlibat (Barber et al., 2019; Wei et al., 2018).

Secara khusus, berkembangnya TB aktif dari LTBI harus dipandang sebagai kelanjutan daripada proses yang terpisah dari satu ke tahap lain (Barry et al., 2009; Dodd and Schlesinger, 2017; Lin et al., 2014). *M.tb* ditransmisikan dari pasien TB ke individu yang sehat dalam tahap metabolik aktif dan replikasi. Oleh karena itu, *host* pertama kali bertemu *M.tb* yang sangat aktif (Gengenbacher and Kaufmann, 2012). Selama LTBI, *M.tb* berubah dari tahap yang aktif secara metabolik dan replikatif menjadi tahap tidak aktif di mana aktivitasnya secara nyata mengalami penurunan regulasi. Setelah perkembangan menjadi TB aktif telah terjadi, *M.tb* menjadi aktif kembali (Dodd and Schlesinger, 2017).

Tahap awal infeksi merupakan saat tepat untuk memberantas *M.tb* sebelum masuk pada tahap LTBI. Namun demikian, ada sebagian infeksi TB secara singkat dan segera masuk pada tahap sakit TB dengan gejala klinis yang belum jelas (Dodd and Schlesinger, 2017; Drain et al., 2018; Simmons et al., 2018). Bukti terbaru menunjukkan bahwa LTBI digantikan oleh TB yang baru mulai, di mana inang tetap sehat, tetapi menjadi waspada dan *M.tb* menjadi aktif kembali secara metabolik dan replikasi (Drain et al.,

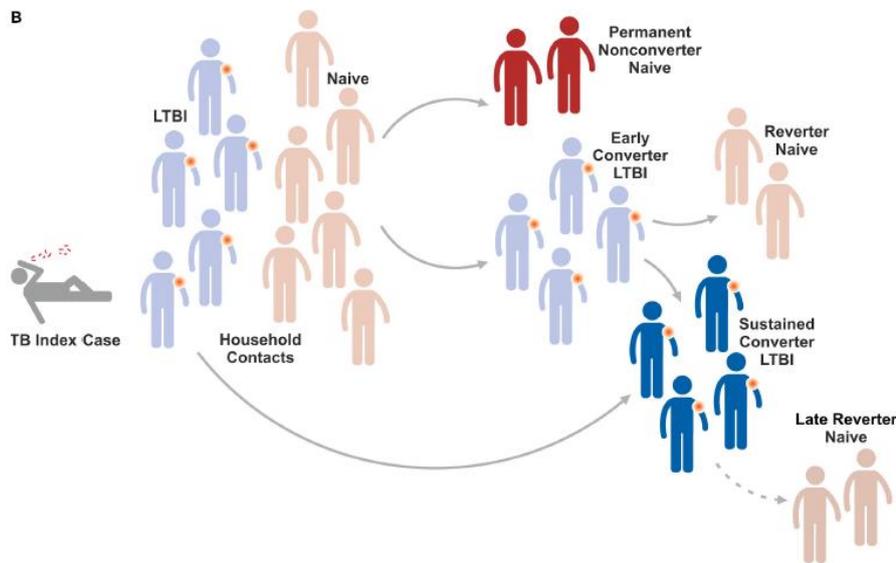
2018; Zak et al., 2016). Selanjutnya, TB subklinis berkembang di mana tanda-tanda patologi pertama terjadi meskipun secara klinis pasien tampak sehat. Tanda-tanda kewaspadaan *host* dan patologi dapat dideteksi dengan ekspresi gen sensitif dan profil metabolik (Gengenbacher and Kaufmann, 2012; Suliman et al., 2018; Weiner et al., 2018; Zak et al., 2016). Mengingat bahwa sebagian besar kasus TB subklinis berkembang menjadi penyakit TB aktif yang dapat didiagnosis secara klinis, adalah mungkin untuk memprediksi penyakit dengan profiling yang sensitif melalui transkriptomik dan metabolomik (Suliman et al., 2018; Weiner et al., 2018; Zak et al., 2016). Tahapan yang berbeda tidak terpisah dan bahwa di daerah individu mencerminkan LTBI (granuloma padat yang mengandung *M.tb* aktif), TB baru jadi (granuloma nekrotik solid di mana *M.tb* aktivitas metabolik dan replikasi kembali aktif), TB subklinis (peningkatan patologi lebih lanjut karena transisi dari beberapa granuloma padat ke yang nekrotik dan akhirnya tanda-tanda pertama kaseasi) dan TB aktif (ketiga bentuk granuloma hadir dengan dominan terhadap kaseasi dan kavitas) dapat hidup berdampingan. Dengan demikian, berbagai tahapan granuloma mulai dari bentuk padat hingga kaseasi dan kavitas berdampingan (Lin et al., 2014).

Jelas, koeksistensi patologi yang berbeda dan aktivitas *M.tb* yang berbeda membuat imunopatologi TB sangat kompleks.

Individu dengan LTBI umumnya diidentifikasi oleh tes kulit tuberkulin (*Tuberculin skin test* / TST) atau uji pelepasan intergferon gamma (*Interferon-gamma release assay* / IGRA) (Auguste et al., 2016; Doan et al., 2017; Ferreira et al., 2015; Trajman et al., 2013). Karenanya, identifikasi 1,7 miliar individu di dunia ini dengan LTBI didasarkan pada pengukuran respons sel T terhadap antigen *M.tb*. Antigen-antigen ini adalah campuran yang relatif tidak terdefinisi dari protein *M.tb* (derivatif protein murni, purified protein derivative / PPD) dalam kasus TST dan protein *M.tb* yang terdefinisi dengan baik dan / atau peptida dalam kasus IGRA (Kaufmann, 2020).

Gambar 2 menjelaskan prognosis kontak (sebagai contoh, kontak serumah) dari kasus indeks TB. Kontak serumah dari kasus indeks TB termasuk yang sudah terinfeksi TB laten (LTBI) atau tidak menunjukkan bukti kekebalan terhadap infeksi *M.tb* (naif). Setelah kontak yang berkelanjutan dengan kasus indeks TB, mayoritas individu yang naif akan dengan cepat beralih ke tahap LTBI (disebut sebagai konverter) karena mereka meningkatkan respons imun terhadap infeksi *M.tb*. Sebagian besar konverter awal ini akan tetap menjadi LTBI dan karenanya menjadi konverter berkelanjutan. Sebagian kecil konverter awal berubah (reversi) menjadi naif (reverter naif), yaitu tanpa respons imun yang terukur terhadap infeksi *M.tb*. Beberapa individu yang naif akan tetap menjadi non-konverter permanen, yaitu mereka tidak mengubah status kekebalan yang tidak ada (yang menunjukkan tidak adanya infeksi *M.tb*). Akhirnya, beberapa individu dengan LTBI akan kembali menjadi naif, yaitu mereka kehilangan respons imun yang

dapat dideteksi terhadap *M.tb* yang menunjukkan eliminasi *M.tb*. Mekanisme yang mendasari konversi/reversi ini tetap sulit dipahami (Kaufmann, 2020).



Gambar 2. Prognosis Kontak TB setelah terpapar *M.tb* dari Kasus Indeks TB
(Kaufmann, 2020)

Respon imun alamiah menjadi faktor penentu dalam menentukan nasib kontak TB di awal setelah terpapar *M.tb* dari kasus indeks. Salah satu yang berperan penting dalam respon imun alamiah ini adalah fagositosis mikobakteri dan fungsi pematangan fagosom serta autofagi. Mikobakteri memasuki sel melalui fagositosis pasif yang dipengaruhi oleh reseptornya. Di dalam fagosom makrofag biasanya bergabung dengan lisosom untuk degradasi *M.tb*. Mikobakteri patogen diketahui mengganggu pematangan fagosom dan tinggal di dalam kompartemen makrofag. Kompartemen tersebut mungkin berada di jalur daur ulang endosom. Di dalam makrofag, mikobakteri mengalami kekurangan zat besi, namun dapat menggunakan sumber Fe dari transferin. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa

menghindari fagosom *M.tb* dan permeabilisasi dari fagosom memicu autofag (Awuh and Flo, 2017).

C. Anemia pada TB

Kekurangan Fe (besi) terbukti secara eksperimental dapat merubah keseimbangan sitokin T-helper 1 (Th1) terhadap T helper-2 (Th2) yang didominasi sitokin Th2. Hal ini sesuai dengan hipotesis bahwa kekurangan Fe dapat mengganggu fungsi kekebalan dan meningkatkan kerentanan dan perkembangan penyakit TB (Surcel et al., 1994).

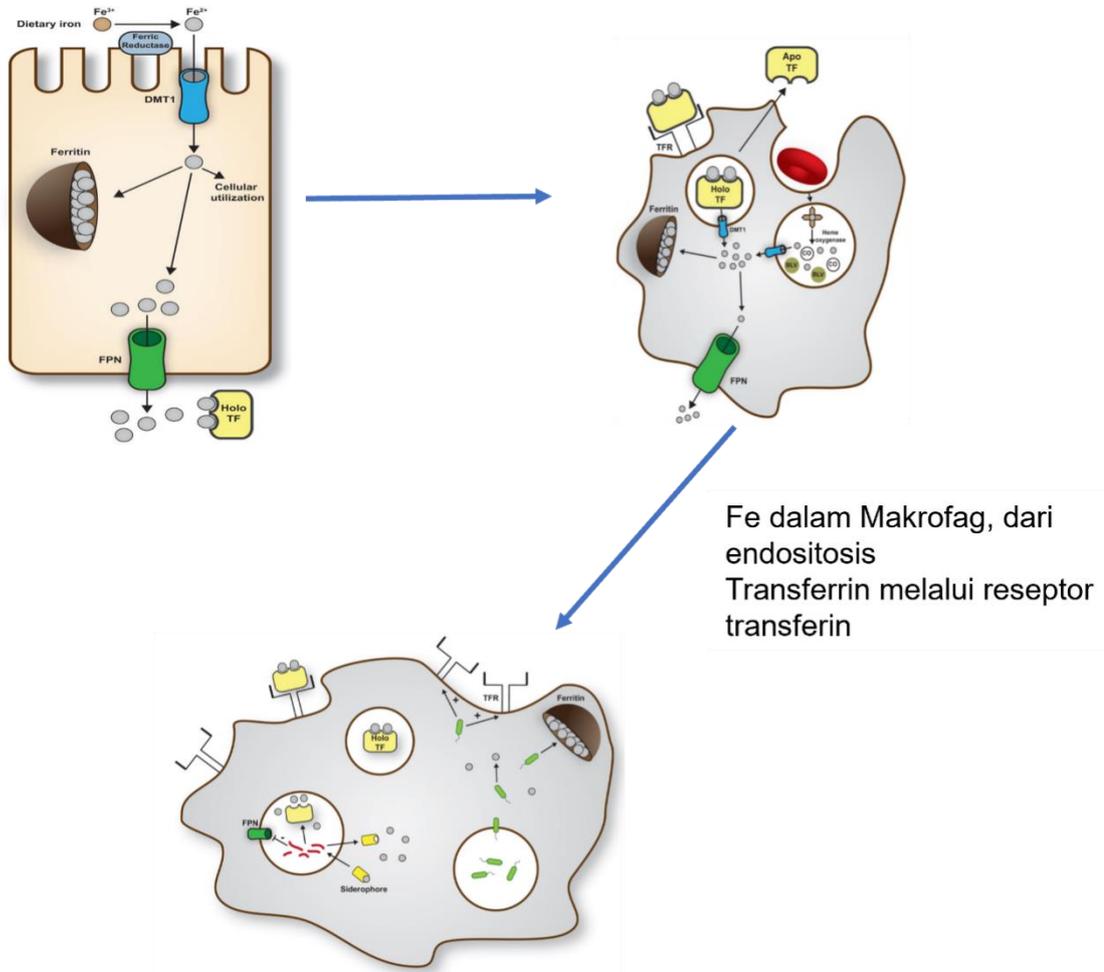
Anemia pada infeksi *M.tb* disebabkan oleh masalah transportasi Fe. Sekalipun kadar Fe serum rendah pada anemia yang disebabkan peradangan maupun malnutrisi, namun kadar ferritin dan hepcidin akan tinggi pada anemia yang disebabkan infeksi *M.tb*. Fe mempunyai sifat koordinasi serbaguna dan digunakan dalam banyak proses biologis esensial. Bagian penting dari respon imun alamiah terhadap infeksi bakteri adalah keterbatasan Fe yang dapat diakses dalam inang manusia yang diserap dalam protein pengikatan afinitas tinggi seperti transferin, ferritin, dan laktoferin atau dalam heme. Oleh karena itu, bagi banyak bakteri patogen, Fe adalah faktor pembatas untuk kolonisasi dan infeksi (Correnti and Strong, 2012; Doherty, 2007).

Kekurangan Fe juga terbukti membahayakan sel, disebabkan terjadi penurunan aktivasi limfosit dan aktivitas bakterisidal makrofag. Sebaliknya tingginya kadar Fe juga dikaitkan dengan peningkatan perkembangan

penyakit TB, disebabkan meningkatnya replikasi atau pertumbuhan mikobakteri. Penelitian di Zimbabwe menunjukkan bahwa peningkatan Fe dapat melemahkan respon imun Th1 yang merupakan manifestasi pengendalian penyakit TB (Gordeuk et al., 2009). Keduanya, kekurangan atau kelebihan Fe pada pasien TB dapat berkontribusi terhadap perkembangan penyakit dan hasil klinis yang buruk. Strategi untuk mempertahankan status besi yang normal pada pasien TB dapat membantu untuk mengurangi mortalitas dan morbiditas (Isanaka et al., 2012a).

Fe adalah mikronutrien penting yang dibutuhkan oleh hampir semua organisme, berfungsi terutama sebagai kofaktor enzim dari banyak fungsi penting metabolisme. Selain sebagai katalis banyak reaksi enzimatik, besi juga merupakan unsur esensial yang penting untuk pertumbuhan dan virulensi bakteri (Rodriguez-Fernandez et al., 2016; De Voss et al., 1999). Terlepas dari kenyataan bahwa Fe adalah unsur keempat dan logam kedua yang paling berlimpah dalam kerak bumi, Fe tidak tersedia secara bebas baik pada manusia maupun bakteri patogen. Fe merupakan logam transisi yang mempunyai beberapa tingkat bilangan oksidasi, namun dalam sel hidup bilangan oksidasi yang paling sesuai adalah Fe (II) dan Fe (III). Karena Fe berada pada dua tingkat bilangan oksidasi, maka Fe dapat berfungsi sebagai katalis redoks, yaitu menerima atau menyumbangkan elektron. Namun, potensi redoks dari Fe membuatnya menghasilkan radikal hidroksil melalui reaksi Fenton yang dapat menyebabkan efek merusak pada sel hidup menghasilkan toksisitas seluler dalam kondisi kelebihan Fe (Boelaert et al., 2007). Reaksi Fenton: $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH\cdot + OH^-$. Ketersediaan Fe

bebas dalam sel inang diatur sehingga kurang tersedia baik untuk host maupun patogen yang menyerang seperti *M.tb* (Boelaert et al., 2007).

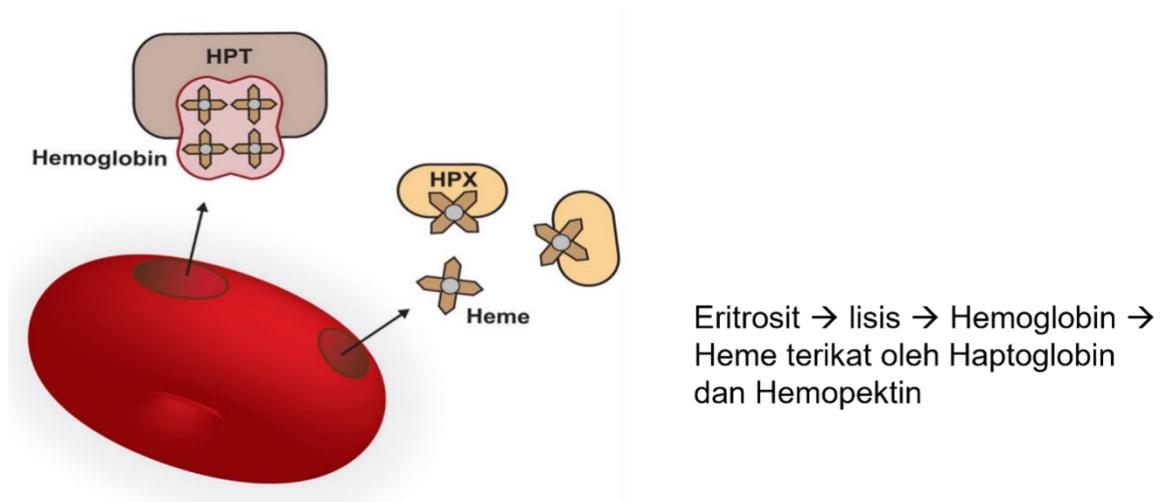


Gambar 3. Homeostasis Fe

Fe^{2+} masuk sel epitel usus oleh NRAMP2

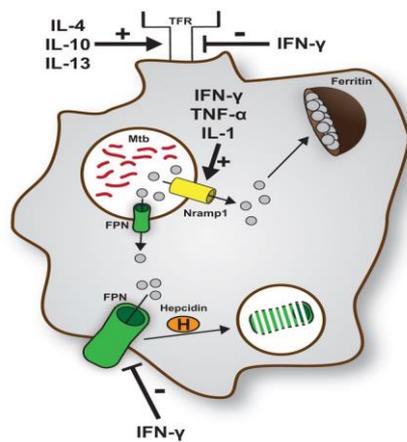
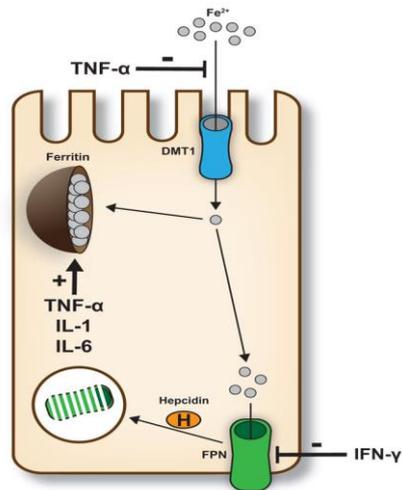
- metabolisme sel
- Simpan : Ferritin

Transport keluar sel oleh FPN (ferropontin)



Gambar 4. Strategi bakteri *M.tb* intraseluler untuk mendapatkan Fe

M.tb dalam sel berusaha mendapatkan Fe dengan berbagai cara. *M.tb* menghasilkan siderofor yang akan berdifusi keluar dari fagosom untuk menangkap besi sitoplasma. *M.tb* intraseluler memperoleh Fe dari transferin saat siklus melalui jalur endositik. *M.tb* dapat memanipulasi homeostasis besi sel inang untuk meningkatkan ketersediaan zat besi. *M.tb* menghambat ekspresi ferroportin, dengan demikian secara efektif meningkatkan kandungan Fe intrafagosomal. Beberapa patogen intraseluler mendapatkan Fe dengan cara meningkatkan ekspresi reseptor transferin (TFR).



Gambar 5. Sitokin proinflamasi menahan zat besi melalui represi absorpsi besi oleh DMT1/NRAMP2 dan aktivasi sintesis ferritin. Hepcidin akan menginduksi internalisasi dan mendegradasi ferroportin, yang selanjutnya membatasi jalan keluar besi. Fe secara aktif dikeluarkan dari fagosom melalui NRAMP1 (pengaruh dari IFN- γ , TNF- α , dan IL-1) mengakibatkan Fe berkurang.

Sitokin proinflamasi menahan zat besi melalui represi absorpsi besi oleh DMT1/NRAMP2 dan aktivasi sintesis ferritin (gambar 5). Hepcidin akan menginduksi internalisasi dan mendegradasi ferroportin, yang selanjutnya membatasi jalan keluar besi. Terbatasnya cadangan Fe yang tersedia bagi bakteri patogen, maka *M.tb* perlu untuk mengeksploitasi cadangan Fe tuan rumah yang terbatas untuk menguntungkan kelangsungan hidup mereka.

Makrofag juga perlu untuk melindungi Fe dari patogen intraseluler untuk memuaskan kebutuhan mereka sendiri sebagai Fe sangat dibutuhkan sebagai kofaktor dari banyak enzim termasuk yang menghasilkan oksigen atau nitrogen spesies reaktif sebagai pertahanan segera terhadap *M.tb* (Awuh and Flo, 2017; Boelaert et al., 2007). Melindungi Fe dari organisme menyerang adalah sangat penting bagi makrofag dan kompetisi ini antara *M.tb* dan makrofag *host* terhadap besi merupakan faktor penting yang mengatur pemusnahan bakteri patogen. *M.tb* menangkai akuisisi Fe dengan cara IFN- γ mengaktifkan makrofag untuk menurunkan regulasi reseptor permukaan sel transferin, sehingga efektif menurunkan konsentrasi besi di endosom (Bussi and Gutierrez, 2019; Pandey et al., 2018). Ferroportin secara cepat terlokalisasi dalam *phagolysosomes* yang terinfeksi *M.tb*, sehingga menghilangkan Fe dari kompartemen selular ini. Mikobakteria menghindari penahanan Fe dengan langsung modulasi ekspresi ferroportin (Bussi and Gutierrez, 2019). Fe secara aktif dikeluarkan dari fagosom melalui NRAMP1 (pengaruh dari IFN- γ , TNF- α , dan IL-1) mengakibatkan Fe berkurang.

Konsentrasi Fe pada inang terbatas. Fe disimpan dalam molekul penyimpan Fe, yaitu protein pengikat Fe seperti transferin, feritin dan laktoferin. Upaya mendapatkan atau mengakuisisi Fe, mikroorganisme mengembangkan senyawa siderofore (karboksimumikobaktin dan mikobaktin) yang merupakan senyawa chelat Fe dengan afinitas tinggi. Homeostasis Fe pada mikobakteri dimediasi oleh produksi mikobaktin, untuk mendapatkan Fe dari inang. Kelebihan Fe juga dapat menjadi racun, sintesis mikobaktin

diinduksi hanya ketika kekurangan Fe. Pada keadaan cukup Fe akan diinduksi sintesis bakterioferitin sebagai tempat penyimpanan kelebihan Fe, yang melindungi sel terhadap toksisitas (Pandey et al., 2018; Winn et al., 2020).

Peran populasi makrofag yang berbeda untuk mempertahankan metabolisme Fe, menjelaskan mekanisme seluler dan sistemik yang terlibat dalam proses pengaturan Fe. Makrofag juga merupakan target utama *M.tb*, patogen yang membutuhkan Fe untuk berkembang biak yang menegaskan kembali bahwa inang yang terinfeksi *M.tb* menggunakan pembatasan Fe sistemik dan distribusi Fe seluler sebagai mekanisme pertahanan melawan infeksi. Peneliti melihat pentingnya ketersediaan Fe untuk memperoleh respon imun terhadap *M.tb*, yang kemudian menentukan kerentanan inang (Agoro and Mura, 2019; Baker and Abramovitch, 2018; Chao et al., 2018; Pandey et al., 2018).

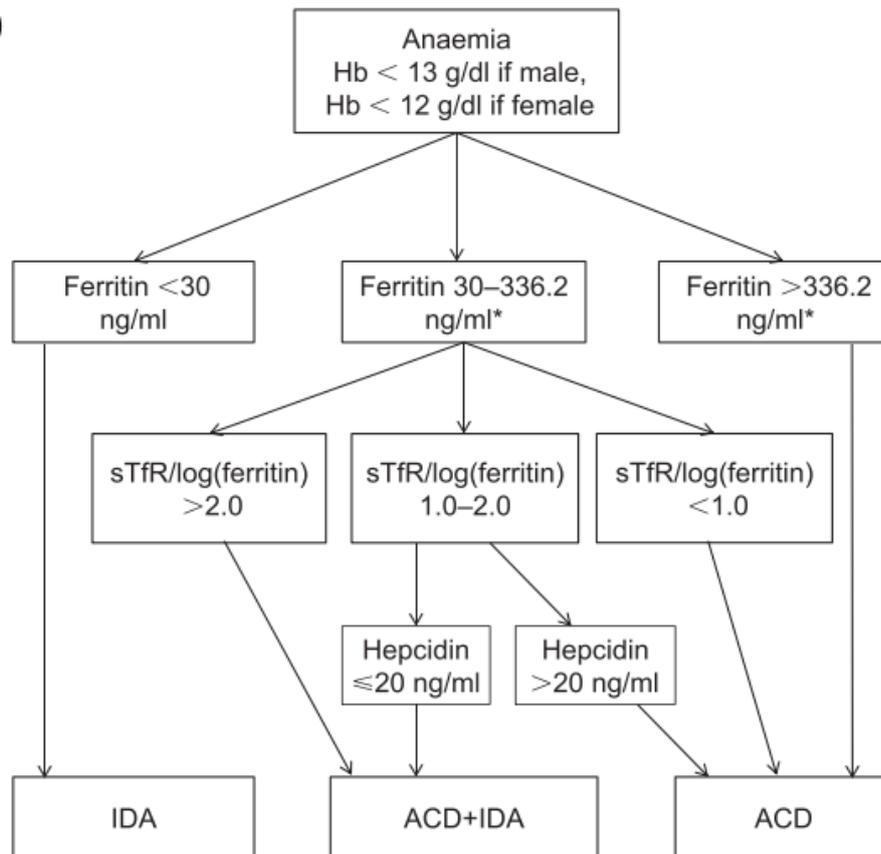
Untuk menegakkan diagnosis anemia defisiensi besi, dapat dilakukan tiga tahap. Tahap pertama menentukan ada tidaknya anemia dengan mengukur kadar hemoglobin atau hematokrit. Tahap kedua memastikan ada tidaknya defisiensi besi. Tahap tiga menentukan penyebab terjadinya defisiensi besi (Margina et al., 2014).

Pada tahap pertama dan kedua, anemia defisiensi besi dapat ditegakkan diagnosisnya dengan menggunakan kriteria: Anemia hipokromik mikrositik pada hapusan darah tepi, atau $MCV < 80$ fl dan $MCHC < 31\%$ dengan salah satu a, b,c, atau d (Margina et al., 2014).

- a. Dua dari tiga parameter: besi serum < 50 mg/dl; TIBC > 350 mg/dl; dan saturasi transferin < 15%, atau
- b. Feritin serum < 20 mg/l, atau
- c. Pengecatan sumsum tulang dengan biru prusia (Perl's stain) menunjukkan cadangan besi (butirbutir hemosiderin) negatif, atau
- d. Dengan pemberian sulfat ferosus 3 x 200 mg/hari (atau preparat besi lain yang setara) selama 4 minggu disertai kenaikan kadar hemoglobin lebih dari 2 g/dl.

Kemudian pada tahap ketiga ditentukan penyebab dasar defisiensi besi. Tahap ini adalah tahap yang paling rumit tapi sangat penting (Margina et al., 2014).

Anemia penyakit kronis sering bersamaan dengan anemia defisiensi besi dan keduanya memberikan gambaran penurunan besi serum. Oleh karena itu penentuan parameter besi yang lain diperlukan untuk membedakannya. Rendahnya besi di anemia penyakit kronis disebabkan aktifitas mobilisasi besi sistem retikuloendotelial ke plasma menurun, sedangkan penurunan saturasi transferin diakibatkan oleh degradasi transferin yang meningkat. Kadar feritin pada keadaan ini juga meningkat melalui mekanisme yang sama. Berbeda dengan anemia defisiensi, gangguan metabolisme besi disebabkan karena kurangnya asupan besi atau tidak terpenuhinya kebutuhan besi sebagai akibat meningkatnya kebutuhan besi atau perdarahan (Muhammad and Sianipar, 2005).



Gambar 6. Algoritma penentuan anemia defisiensi Fe (*iron deficiency anemia*, IDA) dan anemia penyakit kronik (*anemia chronic disease*, ACD) (Dignass et al., 2018)

Pedoman WHO menyatakan bahwa, dengan tidak adanya inflamasi, feritin serum > 200 ng/mL pada pria atau > 150 ng/mL pada wanita memberikan risiko kelebihan zat besi pada populasi umum (World Health Organization, 2011). Dalam kondisi inflamasi, di mana kadar feritin serum meningkat sebagai bagian dari respon fase akut, ambang ini tidak berlaku dan saturasi transferin (*transferin saturation*, TSAT) harus diukur untuk menghindari kesalahan diagnosis kelebihan zat besi) (Dignass et al., 2018). Peningkatan yang mencolok pada kadar feritin serum juga dapat terjadi pada

kejadian peradangan akut atau infeksi. Kadar feritin serum yang tinggi pada pasien dengan kondisi peradangan kronis yang mengalami episode akut atau yang mengalami infeksi harus diinterpretasikan dengan sangat hati-hati.

Saturasi transferin (*transferin saturation*, TSAT) adalah penanda jumlah zat besi tersedia untuk eritropoiesis atau kebutuhan seluler lainnya. Jika feritin serum 100–300 ng/mL, TSAT < 20% diperlukan untuk mengkonfirmasi adanya defisiensi besi, sebagaimana yang diajukan dalam kajian Dignass dkk. (Dignass et al., 2018).

Tes Feritin dan TSAT sudah tersedia dengan biaya yang relatif terjangkau. Namun, ada batasan tertentu untuk kedua jenis tes tersebut. Kadar feritin serum pada individu normal telah dilaporkan bervariasi sebesar 15% pada pria dan 27% pada wanita setiap hari (Borel et al., 1991), dengan variasi hingga 62% bila diukur dalam jangka panjang (Ford et al., 2009). Selain itu, tes feritin serum berbeda dalam hal antigen yang digunakan dan memiliki variasi teknis, misalnya dalam prosedur kalibrasi dan dalam pilihan standar referensi (Kamei et al., 2017), yang mengarah ke variabilitas analitis yang signifikan. Satu perbandingan skala besar di Amerika Serikat menemukan bahwa perbedaan *interassay* bisa setinggi 54% (Ford et al., 2009). Oleh karena itu, jika kadar feritin serum diukur di laboratorium yang berbeda (misalnya, sebelum dan setelah keluar dari rumah sakit), perubahan feritin serum belum tentu mencerminkan perubahan status besi. Kadar Fe dalam serum umumnya diukur pada pagi hari dengan perut kosong untuk meminimalkan variasi. Selain perubahan fisiologis, ada tingkat variabilitas *interassay* untuk pengukuran besi serum, yang menjadi dasar perhitungan

tingkat TSAT. Satu studi dari 10 uji feritin dan lima uji TSAT, yang menganalisis sampel dari 114 pasien hemodialisis, menemukan 63% variasi dalam kadar feritin serum yang dilaporkan tetapi hanya 10% variasi untuk TSAT (Kamei et al., 2017). Satu peringatan praktis yang perlu diperhatikan adalah bahwa laporan laboratorium biasanya menyertakan rentang referensi kadar feritin serum "normal". Kisaran ini dapat bervariasi, dan kisaran "normal" bergantung pada pengujian dan laboratorium. Namun, kisaran "normal" semuanya didasarkan pada pasien sehat tanpa peningkatan kadar sitokin peradangan dan tidak boleh diterapkan pada pasien dengan kondisi peradangan (Dignass et al., 2018).

D. Genetik *NRAMP1*

Keragaman genetik pasien TB menentukan kerentanan terhadap terjadinya infeksi, sakit dan prognosis TB. Banyak peneliti telah mengidentifikasi dan mengeksplorasi gen spesifik yang rentan terhadap TB, dan dibagi dalam 2 kategori yaitu gen HLA dan non-HLA. *Solute Carrier Family 11 member 1 (NRAMP1) / Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1 (NRAMP1)* merupakan protein yang dikode oleh gen penentu kerentanan terhadap TB (non-HLA) yang paling banyak dipelajari (Cai et al., 2019).

NRAMP1 mengatur aktivasi makrofag pada penyakit menular dan autoimun. NRAMP2 mengontrol anemia. Keduanya pengangkut kation divalen (Fe^{2+} , Zn^{2+} , dan Mn^{2+}); NRAMP2 sebagai pelengkap dari ion H^+ dan logam, NRAMP1 ion H^+ antiporrer kation yang setara. Ini memberikan model

untuk homeostasis ion logam dalam makrofag. NRAMP2, terlokalisasi pada endosom awal, memberikan kation divalen yang diperoleh dari ekstraseluler ke dalam sitosol. NRAMP1, terlokalisasi pada endosom akhir / lisosom, memberikan kation divalen dari sitosol ke fagolisosom. Di sini, Fe^{2+} menghasilkan antimikroba radikal hidroksil melalui reaksi Fenton. Zn^{2+} dan Mn^{2+} yang dapat mempengaruhi aktivitas metalloprotease endosom dan fusi fagolisosom. Banyak fungsi seluler yang bergantung pada ion logam sebagai kofaktor dapat menjelaskan berbagai efek pleiotropik NRAMP1, dan peran kompleksnya dalam penyakit menular dan autoimun (Biggs et al., 2001; Gruenheid et al., 1997).

Gen *NRAMP1* yang mengkode protein makrofag terkait resistensi alami (NRAMP) pertama kali diakui sebagai *Ity*, *Lsh*, atau *Bcg* dalam perannya untuk mengendalikan fase awal infeksi dengan *Salmonella typhimurium*, *Leishmania donovani* atau berbagai spesies mikobakteri termasuk *Mycobacterium bovis* dan *Mycobacterium lepraemurium*. Setelah identifikasi dengan kloning posisional, sekuensi eDNA panjang-penuh diperoleh. Pencalonannya sebagai *Ity* / *Lsh* / *Bcg* dikonfirmasi oleh analisis fungsional garis sel makrofag yang ditransfusikan secara *in vitro*, dan dengan analisis gen yang terganggu (*'knockout'*) dan tikus transgenik *in vivo*. Urutan asam amino-nya meramalkan protein 53-kDa dengan 10 atau 12 domain *spanning membrane* yang terbentang dan motif transportasi yang lestari, tetapi cara kerjanya yang tepat sebagai transporter tidak diketahui. Pada tikus, titik mutasi pada daerah pengkodean gen menghasilkan substitusi asam amino tunggal non-konservatif dari glisin (Gly) menjadi aspartat (Asp)

pada posisi 169 di membran putatif mencakup domain nomor 4. Efek dari mutasi ini adalah untuk menciptakan fungsional nol ekuivalen pada fenotip kerentanan penyakit menular terhadap tikus *knockout* gen *NRAMP1* -/- (Vidal et al., 1995).

Fungsi *NRAMP1* yaitu sebagai pompa kation divalen yang melewati membran fagosom dan memiliki fungsi regulasi dalam pertukaran membran vasikel intraseluler dari makrofag. Selain itu, *NRAMP1* juga memediasi efluks kation divalen (Mn^{2+}) secara aktif (Neyrolles et al., 2015).

NRAMP1 dalam imunitas parasit yang dimediasi fagosom keluarga pembawa solut 11 anggota A1 (*NRAMP1*) adalah antiporter kation proton / divalen yang direkrut ke membran lisosom pada fagositosis parasite.^{24,85} Transporter ini memberikan efek pleiotropik dalam pertahanan terhadap parasit dan patogen lainnya. Kurangnya kation divalen, seperti besi besi, mangan, dan seng, membatasi jumlah logam divalen yang tersedia untuk patogen, yang menghambat pertumbuhannya dan membuatnya rentan terhadap oksidan reaktif dan molekul efektor sel imun lainnya. Peningkatan ekspresi *NRAMP1* dalam limfosit bawaan disebabkan oleh peningkatan ekspresi IFN-g dalam monosit diikuti oleh produksi IL-12 dan sitokin lain, yang pada gilirannya merangsang ekspresi IFN-g215. Selain itu, peningkatan produksi nitrat oksida (NO), IL-12, dan TNF-a berkorelasi dengan peningkatan ekspresi *NRAMP1* dalam makrofag parasite engulfin.^{24,32,85} Aktivasi *NRAMP1* juga dapat memberikan resistensi terhadap patogen dalam fagosom yang dimediasi oleh aktivitas NADPH oksidase yang

tergantung besi dan pembentukan NO (Cellier, 2017; Meilang et al., 2012; Moisan et al., 2006; Yuan et al., 2017).

Pertumbuhan bakteri dalam makrofag juga dipengaruhi oleh aktivitas NRAMP1. Berdasarkan hubungan *in vivo* antara metabolisme besi dan fungsi NRAMP1 menyatakan bahwa kadar besi yang berlebihan dapat menghambat fungsi protein NRAMP1, hal ini dapat menyebabkan bakteri kekurangan kation esensial. NRAMP1 juga memiliki peran untuk menstabilkan mRNA yang berkaitan dengan aktivasi makrofag (Awuh and Flo, 2017; Biggs et al., 2001; Neyrolles et al., 2015).

Penelitian lain menyebutkan bahwa NRAMP1 diperlukan dalam maturasi fagosom dan penurunan pH. Replikasi mikrobakterium intraseluler juga dipengaruhi oleh NRAMP1 dengan cara mengubah pH fagosom yaitu proses yang diperlukan dalam aktivitas bakterisid. Dalam perannya ini NRAMP1 adalah sebagai fusogen yang mempromosikan fusi vesikel yang dapat menyebabkan maturasi dan perekrutan aktivitas H1-ATPase vacuolar. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa gugus amino terminal NRAMP1 yang berikatan dengan mikrotubulus dapat memediasi transportasi fagosom atau lisosom (Azad et al., 2012; Stein et al., 2017).

Fungsi lain yang dimiliki NRAMP1 adalah melakukan upregulasi fungsi fagosit, yaitu kegiatan transkripsi sitokin, ekspresi molekul MHC kelas II dan presentasi antigen ke limfosit T. Efek pleiotropik ini disebabkan oleh ekspresi NRAMP1 sehingga terjadi aktivitas *protein tyrosine phosphatase* (PTP). PTP yaitu enzim yang berfungsi sebagai defosforilasi protein dan transduksi sinyal yang lebih rendah. Hal ini dapat menyebabkan peningkatan

fosforilasi protein dan transduksi sinyal positif sehingga terjadi upregulasi fungsi makrofag efektor. Penurunan aktivitas PTP disebabkan karena mekanisme regulasi reversible yang melibatkan interaksi dengan substrat logam NRAMP1 (Cai et al., 2019; Mozzi et al., 2018; Yuan et al., 2017).

E. Polimorfisme *NRAMP1*

Polimorfisme genetik merupakan variasi genetik dimana >1% sering ditemukan pada kromosom populasi umum. Variasi polimorfisme terdiri dari delesi, duplikasi, triplikasi dari ratusan hingga jutaan pasang basa DNA. Perubahan basa DNA yang terjadi di gen atau intron juga dapat menyebabkan polimorfisme, dimana hal ini tidak mempengaruhi fungsi gen dan hanya dapat dideteksi oleh analisis DNA langsung. Perubahan sekuens juga dapat terjadi di sekuensi gen pengkode sehingga dihasilkan varian protein yang berbeda sehingga menyebabkan fenotip berbeda. Perubahan lain juga dapat terjadi di region peregulasi yang juga penting dalam menentukan fenotip dengan cara mempengaruhi transkripsi atau stabilitas mRNA (Ahmed et al., 2020; Baker and Abramovitch, 2018).

Polimorfisme pengulangan tunggal dan polimorfisme nukleotida tunggal pada gen *NRAMP1* berlokasi di regio promotor (5'CA)_n dan -236 C/T), dan sembilan polimorfisme bialel ditemukan pada region gen sisanya. Polimorfisme *NRAMP1* yang sudah banyak diteliti yaitu 3'UTR TGTG ins/del (delesi TGTG pada 3' *untranslated region*) D543N (substansi basa tunggal G ke A pada kodon 543, menyebabkan penggantian nukleotida tunggal G menjadi C pada intron 4), dan (GT)_n pada 5' promotor (Saktiawati and

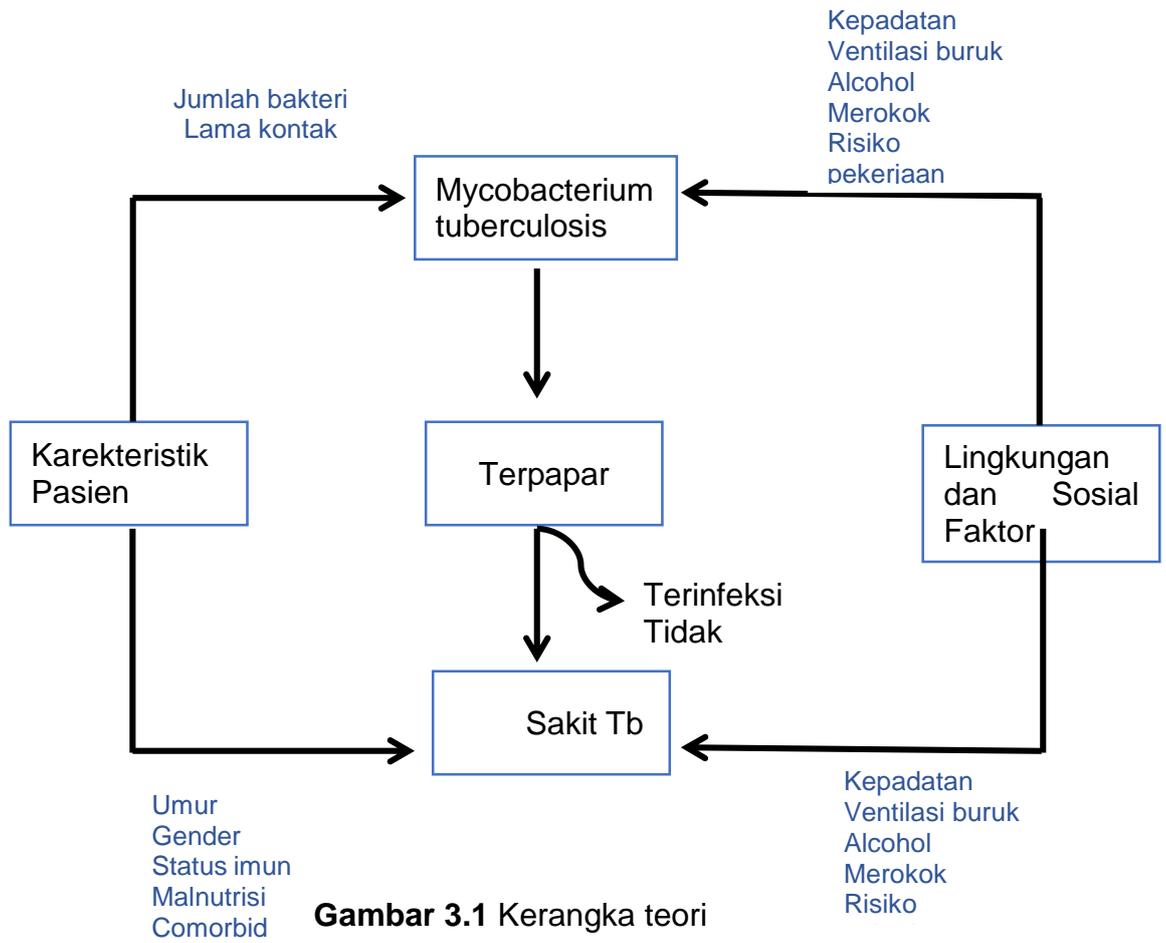
Subronto, 2018).

Polimorfisme *NRAMP1* dapat mempengaruhi pertumbuhan basil TB dan progresi dari TB. Selain itu, varian *NRAMP1* juga berpengaruh terhadap fungsi fagolisosom dan proses presentasi antigen dari makrofag paru setelah memfagosit basil. Malfungsi dari aspek ini dapat mengganggu respon imun alami dan adaptif terhadap infeksi *M.tb*. Defek imun tertentu dapat mempengaruhi replikasi basil dan progresivitas TB. Empat polimorfisme *NRAMP1* yaitu 3' UTR, D543N, INT4, dan 5'(GT)_n dan hubungannya dengan TB sudah banyak diteliti dan pelajari. Berdasarkan hasil meta-analisis di China, disebutkan hasil bahwa peran *NRAMP1* dalam pertahanan penjamu melawan TB. Polimorfisme *NRAMP1* pada lokus D543N dan INT4 diperkirakan lebih berkontribusi terhadap progresi infeksi TB daripada peningkatan kerentanan infeksi (Aravindan, 2019; Cai et al., 2019; Fox et al., 2014; Medapati et al., 2017; Pakasi et al., 2012).

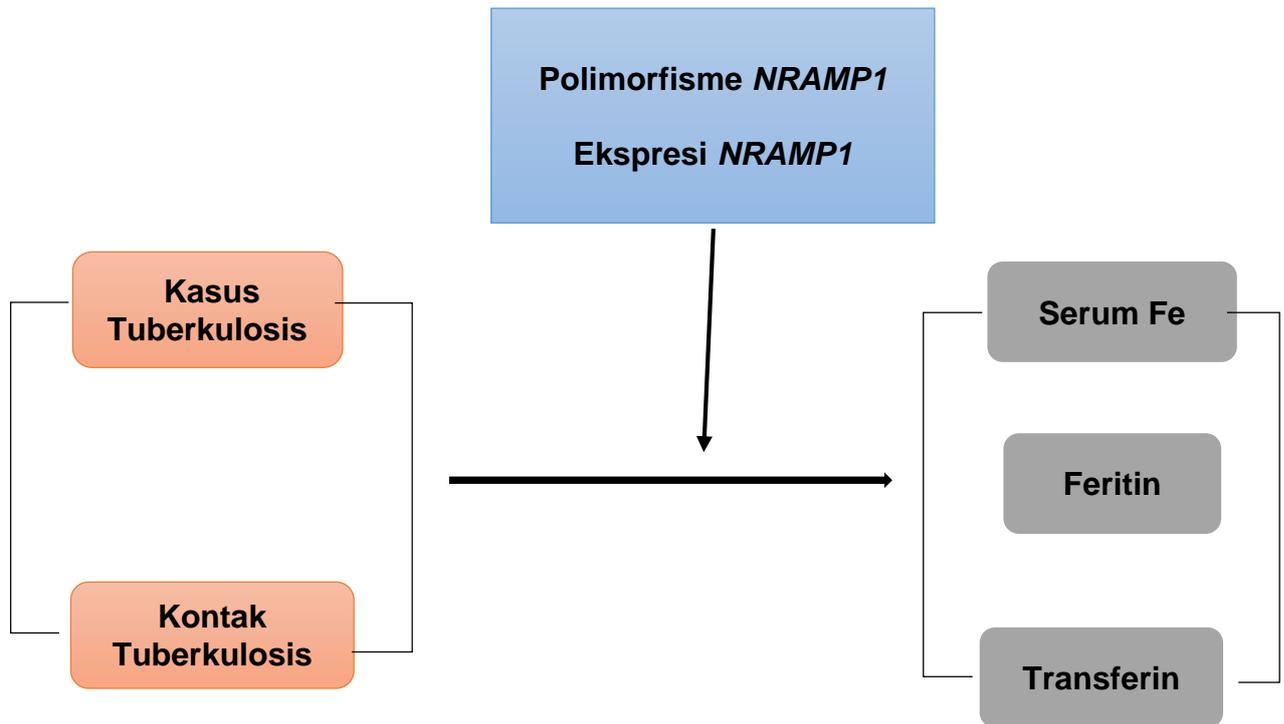
Pada individu dengan polimorfisme D543N mengalami penurunan imunohistokimia hasil ekspresi protein NRAMP1. Hal ini juga menunjukkan bahwa gen *NRAMP1* dengan D543N dapat dengan cepat mengalami kerusakan dan tidak stabil (Aravindan, 2019; Fernández-Mestre et al., 2015; Medapati et al., 2017; Pakasi et al., 2012).

Hasil penelitian dengan meta analisis pada studi kasus kontrol menunjukkan hasil bahwa varian genotip 3'UTR, D543N, INT4, dan 5'(GT)_n berhubungan signifikan dengan adanya peningkatan risiko TB (Cai et al., 2019; Li et al., 2011; Yuan et al., 2017).

E. Kerangka Teori



F. Kerangka Konsep



Gambar 7. Kerangka Konsep Penelitian

G. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini :

1. Terdapat perbedaan kadar Fe serum, ferritin, dan transferin pada kasus TB dan kontak serumah.
2. Terdapat hubungan antara genotipe polimorfisme *NRAMP1* dengan kasus TB.
3. Terdapat perbedaan ekspresi gen *NRAMP1* pada kasus TB dan kontak serumah, dimana ekspresi gen *NRAMP1* lebih rendah pada kasus TB dibanding pada kontak serumah.
4. Polimorfisme *NRAMP1* dan ekspresi gen *NRAMP1* berkontribusi terhadap besar kecilnya pengaruh tuberkulosis dengan kadar Fe serum, feritin dan transferin.