

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tuberculosis (Tuberkulosis) merupakan penyakit menular yang diakibatkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis*. Penyakit menular ini merupakan salah satu dari sepuluh penyebab utama kematian di dunia. Oleh sebab itu hingga saat ini Tuberkulosis masih menjadi prioritas utama di dunia dan menjadi salah satu tujuan dalam SDGs (*Sustainability Development Goals*) (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI), 2020).

World Health Organization (WHO) melaporkan dari 202 negara dan wilayah telah mencakup lebih dari 99% populasi global dan kasus Tuberkulosis. Prevalensi penderita Tuberkulosis sebanyak 10,6 juta orang pada tahun 2021 perkiraan angka kasus 134 per 100.000 kehidupan, mengalami peningkatan dibandingkan dengan 10,1 juta orang pada tahun 2020 dengan jumlah kematian 1,6 juta orang meninggal karena Tuberkulosis pada tahun 2021. Perkiraan angka kasus Tuberkulosis di tahun 2022 yaitu 133 per 100.000 kehidupan. Di ASIA prevalensi penderita Tuberkulosis tahun 2022 mencapai angka 234 per 100.000 kehidupan. WHO dalam strategi akhiri Tuberkulosis yang tujuannya adalah penurunan 80% kejadian Tuberkulosis pada tahun 2030, sesuai dengan tujuan pembangunan berkelanjutan PBB ke-3, yang mencakup mengakhiri epidemi Tuberkulosis global (WHO, 2022).

Sekitar 10 juta orang di seluruh dunia terjangkit Tuberkulosis setiap tahunnya. Menurut WHO, sekitar seperempat populasi dunia terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* secara laten. Di Indonesia kejadian Tuberkulosis selama beberapa dekade namun meningkat pada tahun 2015 menjadi 7,3 kasus baru per 100.000 orang. Pada tahun 2018, tercatat total 5.429 kasus baru setara

dengan 6,5 kasus baru per 100.000 orang. Pada tahun 2022 perkiraan kasus angka Tuberkulosis telah mencatat 385 per 100.000 kehidupan (Suárez, et al., 2019).

Data WHO menyatakan Indonesia berada dalam daftar 30 negara dengan beban Tuberkulosis tertinggi di dunia dan menempati peringkat tertinggi ketiga di dunia terkait angka kejadian Tuberkulosis. Angka prevalensi semua kasus Tuberkulosis tahun 2020 berdasarkan provinsi di Indonesia bervariasi antara 65 per 100.000 penduduk pada Provinsi Bali dan 244 per 100.000 penduduk pada Provinsi Papua. Angka notifikasi semua kasus Tuberkulosis di Provinsi Sulawesi Selatan menduduki peringkat ke sebelas dari 34 provinsi yang ada di Indonesia (Kemenkes RI, 2021).

Sekitar 90% kasus ditemukan di Asia Tenggara, Afrika, dan Pasifik Barat, dengan India, Tiongkok, Indonesia, Filipina, dan Pakistan sebagai negara yang paling parah terkena dampak, dan perempuan menyumbang sepertiga dari semua kasus, dengan prevalensi lebih tinggi pada usia reproduksi. Secara global, 216.500 kasus Tuberkulosis aktif diperkirakan terjadi pada wanita hamil pada tahun 2011, risiko meningkat 2,56 kali lipat pada wanita hamil dengan infeksi HIV, koinfeksi paling umum di antara negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah di mana sebagian besar kasus kematian ibu terjadi. Kehamilan memberikan kesempatan untuk mengintegrasikan skrining untuk Tuberkulosis, HIV, dan bahkan COVID-19 ke dalam perawatan prenatal, oleh karena itu pembaruan tentang Tuberkulosis pada kehamilan dan masa nifas diperlukan (Hui & Lao, 2022).

Kehamilan bukanlah suatu faktor predisposisi terhadap timbulnya Tuberkulosis pada seseorang ataupun faktor yang mempengaruhi perjalanan dan manifestasi klinis penyakit Tuberkulosis. Tuberkulosis pada kehamilan merupakan masalah tersendiri karena selain mengenai ibu, juga dapat menular pada janin yang dikandung dan berpengaruh buruk terhadap janin melalui berbagai macam cara

terutama pada masa perinatal. Walaupun infeksi transplasental jarang, bayi memiliki risiko terinfeksi melalui kontak ibu dengan Tuberkulosis aktif. Komplikasi perinatal seperti ukuran janin kecil untuk masa kehamilan, berat bayi lahir rendah (BBLR), perdarahan antepartum, kematian janin, dan Tuberkulosis kongenital merupakan beberapa penyulit yang dapat timbul pada seorang ibu hamil yang menderita Tuberkulosis (Yusuf et al., 2018).

Masa nifas berhubungan dengan risiko komplikasi maternal yang serius termasuk kematian, dan penularan penyakit kepada bayi mereka tanpa memandang status HIV atau riwayat pajanan, karena penyakit Tuberkulosis aktif meningkat 95% selama 180 hari pasca persalinan, yang disebabkan oleh pembalikan respons pro-inflamasi *T-helper* 1 yang ditekan setelah melahirkan yang mengakibatkan eksaserbasi penyakit. Mereka yang mengalami LTBI juga menunjukkan peningkatan aktivasi sel T *non*-spesifik, yang merupakan biomarker untuk perkembangan LTBI menjadi penyakit Tuberkulosis (Hui & Lao, 2022).

Tuberkulosis berdampak buruk pada hasil kehamilan, dipengaruhi oleh lokasi dan tingkat keparahan penyakit, respon pengobatan obat anti-Tuberkulosis, komplikasi Tuberkulosis, usia kehamilan saat diagnosis dan status HIV. Sebuah meta-analisis sebelumnya pada Tuberkulosis aktif menemukan kemungkinan peningkatan morbiditas ibu (Odds Ratio (OR) 2,8), rawat inap antenatal (OR 9,6), keguguran (OR 9,0), anemia (OR 3,9) dan kelahiran caesar (CD, OR 2,1). Tanpa pengobatan, Tuberkulosis juga menyebabkan peningkatan kelahiran prematur (PTD, OR 1,7), berat badan lahir rendah (BBLR, OR 1,7), gawat janin (OR 2,3), skor apgar rendah pada menit ke-1 (OR 5,7), asfiksia saat lahir (OR 4,6) dan kematian perinatal (OR 4,2). Selanjutnya, penelitian lain juga mendokumentasikan peningkatan hasil buruk. Sebuah studi kohort nasional AS dengan 4053 kasus Tuberkulosis pada kehamilan menunjukkan frekuensi yang lebih tinggi dari

preeklamsia berat dan eklamsia (Rasio Proporsionalitas (PR) 1,7 dan 3,9, masing-masing), perdarahan pascapersalinan (PR 1,8), plasenta previa (PR 1,9), sepsis (PR 6,2), dan 37 kali lebih tinggi kematian di rumah sakit, dibandingkan dengan mereka yang Tuberkulosis negatif tetapi tanpa disparitas ras atau etnis (Hui & Lao, 2022).

Tuberkulosis (TB) pada kehamilan menimbulkan risiko morbiditas yang substansial bagi ibu hamil dan janin jika tidak didiagnosis dan diobati tepat waktu. Keterlambatan diagnosis Tuberkulosis pada neonatus sering terjadi karena keterlambatan diagnosis Tuberkulosis pada ibu. Oleh karena itu riwayat perjalanan penyakit ibu hamil sangat penting diketahui untuk mencegah keterlambatan diagnosis. Gejala klinis Tuberkulosis pada kehamilan berupa batuk (74%), penurunan berat badan (41%), demam (30%), nafsu makan menurun (30%) dan hemoptisis (19%). Sebagian besar Tuberkulosis pada kehamilan sering kali tanpa gejala yang khas, maka sekitar 30% ibu terdiagnosis Tuberkulosis setelah bayi yang dilahirkan diketahui menderita Tuberkulosis (Yusuf et al., 2018).

Kehamilan adalah kesempatan unik untuk menyaring dan mengelola Tuberkulosis, dan merupakan langkah penting dalam pemberantasan Tuberkulosis. Diagnosis dan pengobatan dini untuk penyakit aktif dapat mengurangi morbiditas dan mortalitas ibu dan bayi baru lahir. Pemanfaatan uji molekuler cepat yang lebih luas dengan pengujian kerentanan obat telah secara signifikan mempersingkat proses diagnostik untuk penyakit Tuberkulosis aktif. Obat anti-Tuberkulosis lini pertama terbukti aman selama kehamilan. Manajemen Tuberkulosis laten (LTBI) selama kehamilan masih kontroversial, tetapi puerperium adalah periode peningkatan kerentanan terhadap perkembangan penyakit aktif.

Diperkirakan secara global 900 juta wanita hamil mengalami Tuberkulosis laten (LTBI), suatu kondisi dimana respon imun manusia terhadap infeksi

Mycobacterium tuberculosis (MTB) tetap aktif bahkan tanpa manifestasi klinis, kelainan radiologis, atau bukti mikrobiologis dari infeksi Tuberkulosis aktif (Indrati et al., 2022).

Tuberkulosis laten merupakan infeksi dengan patogen Tuberkulosis vital yang tidak bereplikasi. Orang yang terinfeksi memiliki hasil positif pada pengujian imunologi (misalnya, uji pelepasan interferon gamma), tetapi tidak menunjukkan gejala penyakit. Tes diagnostik (setidaknya radiografi dada) tidak mengungkapkan tanda-tanda Tuberkulosis aktif. Pasien-pasien ini tidak menular. Namun, dengan adanya kekebalan sel T yang melemah, Tuberkulosis laten dapat berubah menjadi penyakit aktif kapan saja. Risiko mengembangkan Tuberkulosis yang bermanifestasi secara klinis adalah sekitar 5% selama 18 bulan pertama setelah infeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* dan sekitar 5% selama sisa hidup. Diagnosis dan penatalaksanaan Tuberkulosis laten merupakan salah satu tantangan pemberantasan Tuberkulosis karena tidak ada bukti klinis dan mikrobiologis (Suárez, et al., 2019).

Tuberkulosis laten didefinisikan sebagai kondisi respon imun persisten terhadap stimulasi oleh antigen *Mycobacterium tuberculosis* aktif yang termanifestasi secara klinis. WHO mendefinisikan LTBI sebagai keadaan respons imun persisten terhadap stimulasi oleh antigen *Mycobacterium tuberculosis* tanpa bukti Tuberkulosis aktif yang termanifestasi secara klinis. Menurut perkiraan terbaru, sekitar seperempat populasi global terinfeksi LTBI. Durasi latensi bervariasi, dan individu yang sehat dapat menderita LTBI seumur hidup. Dalam sebagian kecil (5%-15%), reaktivitas terjadi sering kali dalam 2 hingga 5 tahun pertama setelah infeksi. Reaktivitas adalah proses dimana infeksi laten subklinis bertransisi menjadi penyakit Tuberkulosis aktif. Dengan demikian, individu dengan

LTBI mewakili reservoir utama untuk kasus Tuberkulosis aktif paru (Kiazyk & Ball, 2017).

Mycobacterium tuberculosis ditularkan oleh orang-orang yang terinfeksi Tuberkulosis paru yang melepaskan *Mycobacterium tuberculosis* ke udara melalui batuk, bersin atau meludah. Setelah terpapar kuman *Mycobacterium tuberculosis* ada empat keadaan yang bisa terjadi yaitu pertama tidak terjadi infeksi (ditandai dengan tes kulit tuberkulin yang negatif), kedua terjadi infeksi kemudian menjadi Tuberkulosis yang aktif (Tuberkulosis primer), ketiga menjadi Tuberkulosis laten dimana mekanisme imun mencegah progresivitas penyakit menjadi Tuberkulosis aktif dan keempat menjadi Tuberkulosis laten tetapi kemudian terjadi reaktivasi dan berkembang menjadi Tuberkulosis aktif dalam beberapa bulan sampai beberapa tahun kemudian. Tuberkulosis laten ini didefinisikan sebagai kondisi seseorang yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* tetapi saat ini orang tersebut tidak sakit, tidak mempunyai gejala atau *asymptomatic* dan gambaran foto toraks normal (Riskesdas, 2013).

Tuberkulosis aktif disebabkan oleh ketidakmampuan sistem imun inang untuk bertahan melawan patogen yang menyerang. Dalam skenario ini, penyakit ini bergejala karena infeksi baru-baru ini dan dapat menyebar ke orang lain. Sebaliknya, Tuberkulosis aktif dapat disebabkan oleh reaktivasi infeksi laten. Faktanya, lebih dari 80% kasus Tuberkulosis aktif saat ini disebabkan oleh reaktivasi Tuberkulosis laten yang tidak diobati di negara-negara dengan insiden rendah seperti Amerika Serikat. Sedangkan, Tuberkulosis laten adalah keadaan noninfeksi di mana bakteri terkendali secara imunologis. Pada LTBI, penyakit ini tidak bergejala dan tidak dapat menyebar ke orang lain. Meskipun hanya 5-10% pasien LTBI yang tidak diobati dapat mengembangkan Tuberkulosis aktif, risiko

perkembangan menjadi penyakit Tuberkulosis aktif menjadi jauh lebih besar pada individu dengan gangguan kekebalan berisiko tinggi. Oleh karena itu, diagnosis dan pengobatan LTBI sangat penting untuk mengurangi Tingkat Tuberkulosis di bawah ambang batas eliminasi (Pagaduan & Altawallbeh, 2023).

Dampak dari TB Paru adalah kehilangan nafsu makan dan mengalami penurunan berat badan yang disertai dengan demam, keringat malam hari, dan kelelahan. Dan yang lebih parah dapat menyebabkan kerusakan pada jantung, ginjal, kerusakan fungsi hati, kerusakan pada tulang dan sendi, menyerang cincin tulang belakang dan selaput sekeliling otak, serta gangguan fungsi penglihatan (Ningsih et al., 2022).

Status gizi ibu hamil memainkan peran penting dalam menentukan kesehatan ibu dan janin, terutama dalam kaitannya dengan Tuberkulosis (TB). Penurunan status gizi ibu hamil, seperti yang diukur dengan Indeks Massa Tubuh (IMT) dan Lingkar Lengan Atas (LILA), dapat melemahkan sistem kekebalan tubuh, meningkatkan kerentanannya terhadap infeksi seperti TB. Sebaliknya, TB dapat memperburuk status gizi ibu karena gangguan metabolisme yang mengurangi nafsu makan dan kemampuan tubuh untuk menyerap nutrisi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ibu hamil dengan TB aktif memiliki risiko lebih tinggi mengalami KEK (Kekurangan Energi Kronik), dengan kemungkinan mengalami 6,7 kali lebih besar dibandingkan ibu hamil tanpa TB (Mustafa et al., 2021). Selain itu, TB yang tidak diobati selama kehamilan berhubungan dengan komplikasi serius, seperti anemia, berat badan lahir rendah, dan pertumbuhan janin terhambat (PJT) (UNICEF, 2022). Oleh karena itu, penilaian status gizi dan skrining TB sangat penting dalam program pelayanan antenatal untuk meminimalisir risiko tersebut (WHO, 2024).

Kekurangan Energi Kronik (KEK) pada ibu hamil merupakan kondisi yang ditandai dengan Indeks Massa Tubuh (IMT) $<18,5$, yang sering kali berhubungan dengan status gizi buruk dan penurunan kekebalan tubuh (Putri et al., 2023). Kekurangan energi kronik (KEK) melemahkan sistem kekebalan tubuh sehingga meningkatkan kerentanan seseorang terhadap perkembangan *latent tuberculosis infection* menjadi *active tuberculosis*, memperburuk hasil klinis dan meningkatkan risiko morbiditas serta mortalitas, termasuk kemungkinan komplikasi kehamilan dan kelahiran buruk pada wanita hamil yang terinfeksi Tuberkulosis aktif (Feyisa et al., 2024). Kekurangan energi kronis pada ibu hamil memiliki dampak negatif yang signifikan pada kesehatan dan perkembangan ibu serta janin. Ibu hamil yang mengidap kekurangan energi kronis memiliki risiko lebih tinggi mengalami kelelahan yang berkelanjutan, penurunan berat badan yang tidak diinginkan, dan penurunan kekuatan fisik. Selain itu, kekurangan energi kronis juga dapat menyebabkan masalah pada sistem kekebalan tubuh ibu, meningkatkan risiko infeksi dan mempengaruhi kemampuan tubuh untuk memulihkan diri setelah melahirkan (Putri et al., 2023). Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dapat menyebabkan penurunan berat badan. Status gizi yang buruk meningkatkan risiko infeksi dan penyebaran penyakit Tuberkulosis. Selain itu, seseorang yang telah didiagnosis dengan penyakit Tuberkulosis akan secara langsung maupun tidak langsung mengubah pola kesehariannya (Made Sudana, 2017).

Diagnosis Tuberkulosis masih menjadi masalah global dengan kesalahan diagnosis yang dapat meningkatkan angka morbiditas dan mortalitas. Program Tuberkulosis nasional di Negara endemis penyakit terus berlanjut mengandalkan sebagian besar pada mikroskop smear langsung, kultur padat, radiografi dada dan *Tuberculin Skin Test* (TST) (Ndzi et al., 2019a). Diagnosis dengan kultur *Mycobacterium tuberculosis* sebagai *gold standard* untuk Tuberkulosis juga sangat

memakan waktu dan tidak terlalu cocok untuk Tuberkulosis ekstra paru. Diagnosis Tuberkulosis BTA-negatif dan ekstra-paru terus menimbulkan tantangan klinis yang substansial dengan Tuberkulosis pediatrik karena sulitnya pengambilan sampel dahak. Tes FERON-TB yang dikembangkan dapat membantu pada kasus Tuberkulosis tetapi memiliki batas yang tidak dapat membedakan antara laten dan Tuberkulosis aktif serta tidak dapat digunakan untuk mengontrol penderita Tuberkulosis yang menjalani pengobatan Obat Anti-Tuberkulosis (OAT). Oleh karena itu, diperlukan metode diagnostik yang lebih efisien dengan spesimen alternatif seperti darah, feses dan urin yang dapat diambil dari semua kelompok umur. Salah satu penanda biologis yang sedang dievaluasi untuk Tuberkulosis adalah miRNA (microRNA). MiRNA telah diperkenalkan sebagai biodiagnostik baru yang banyak terlibat dalam beberapa kasus seperti kanker, penyakit jantung, kehamilan, diabetes, psoriasis dan penyakit menular (Behrouzi et al., 2019).

MiRNA adalah kelas molekul RNA untai tunggal dengan panjang 18-25 nukleotida yang berfungsi dalam regulasi ekspresi gen dengan menghambat peran gen sasarannya pada tahap pasca transkripsi dari ekspresi gen. miRNA merupakan asam ribonukleat yang tidak mengkode protein dengan transkrip akhir yang berinteraksi dengan target gen yang mengkode mRNA. miRNA bekerjasama dengan elemen pengatur lain seperti faktor transkripsi untuk mengontrol translasi mRNA. Kebanyakan miRNA dikode pada bagian genom yang dulu dianggap sebagai daerah bukan pengkode. Gen-gen miRNA tersebar di dalam genom dan diperkirakan berjumlah 2%-5% dari gen-gen manusia. MiRNA sering diekspresikan sebagai transkrip polisistronik. Satu miRNA dapat mempunyai banyak mRNA target sehingga diperkirakan bahwa lebih dari 1/3 gen-gen manusia diatur oleh miRNA (Wuchty et al., 2012).

MiRNA memiliki potensi sebagai biomarker yang berguna untuk diagnosis penyakit, efek terapi dan prognosis. Serta menunjukkan bahwa miRNA dikaitkan dengan berbagai penyakit, termasuk kanker dan jantung, kekebalan dan penyakit menular (Zhou et al., 2016). Ketika penyakit muncul, miRNA spesifik dari organ lesi dapat dilepaskan ke dalam darah. Dalam banyak penyakit, kandungan miRNA dalam darah berbeda secara signifikan dari individu yang sehat. Sampai saat ini, miRNA sebagai penanda diagnostik molekuler telah dipelajari dan diterapkan pada kanker, diabetes, gangguan kejiwaan, penyakit jantung dan berbagai penyakit menular (Lu et al., 2019). Terdapat beberapa alasan mengapa para peneliti menggunakan miRNA sebagai agen biomarker dan terapi, diantaranya adalah bersifat stabil dalam plasma maupun cairan tubuh lainnya, sulit terdegradasi dan diekskresikan dalam bentuk eksosom atau mikrovesikel. Namun, dibandingkan dengan peran miRNA tertentu pada kanker, fungsi biologis dan utilitas diagnostik miRNA pada Tuberkulosis laten sebagian besar tetap sulit dipahami sehingga butuh penelitian lebih lanjut (L. S. H. Wu et al., 2014).

MiRNA adalah RNA *non-coding* kecil, biasanya sepanjang 18-24 nukleotida yang terlibat dalam regulasi ekspresi gen pada tingkat pasca-transkripsi dan memengaruhi banyak proses biologis termasuk respons imun. Anomali spesifik ekspresi miRNA telah dikaitkan dengan beberapa penyakit, termasuk penyakit menular, dan diselidiki sebagai penanda diagnostik potensial atau alat terapi. Beberapa penelitian menyoroti perubahan ekspresi miRNA yang bersirkulasi pada pasien dengan Tuberkulosis dan mengidentifikasi miRNA yang dapat membedakan antara pasien dengan Tuberkulosis aktif dan mereka yang dengan LTBI (Sinigaglia et al., 2020).

Beberapa penelitian melaporkan perubahan profil ekspresi miRNA yang bersirkulasi dan seluler pada pasien dengan Tuberkulosis aktif dibandingkan dengan mereka yang mengalami LTBI atau kontrol sehat. MiRNA diekspresikan untuk mengidentifikasi perannya dalam respons imun bawaan infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Percobaan *in vitro* dan *in vivo* mengkonfirmasi keterlibatan miRNA dalam modulasi ekspresi gen pada sel target utama *Mycobacterium tuberculosis*, seperti makrofag, DC, sel pembunuh alami dan sel T. *Mycobacterium tuberculosis* dapat menginduksi atau menghambat ekspresi miRNA untuk menghindari respons imun. Memicu jalur apoptosis, induksi autofagi, stimulasi sekresi IFN- γ dan faktor nekrosis tumor alfa (TNF- α) adalah beberapa mekanisme yang diadopsi oleh sel inang selama infeksi bakteri. MiRNA 29a-3p meningkat pada makrofag yang terinfeksi secara langsung menargetkan IFN- γ dan TNF- α , sehingga menekan respon imun terhadap *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler. MiR-21-5p, miR-26a-5p, miRNA 29a-3p, dan miR-142-3p ditemukan pada sel T CD4⁺ dari anak-anak dengan Tuberkulosis aktif dibandingkan dengan mereka yang dengan LTBI (Sinigaglia et al., 2020).

Pada penelitian sebelumnya terkait sirkulasi miRNA pada pasien dengan Tuberkulosis paru aktif. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 59 miRNA yang mengalami upregulation dan 33 miRNA mengalami *downregulation* dibandingkan kontrol sehat (Fu et al., 2011). Salah satunya yang mengalami *upregulation* adalah miRNA 29a-3p, hal ini terjadi karena miRNA 29a-3p menekan respon imun dengan menghambat ekspresi IFN- γ oleh sel T pada pasca transkripsi sehingga dapat meningkatkan kerentanan terhadap Tuberkulosis (Ma et al., 2011).

MiRNA 29a-3p dan miRNA 223-3p, telah terbukti memiliki peran penting dalam modulasi respons imun tubuh terhadap infeksi. Penelitian terbaru

menunjukkan bahwa ekspresi miRNA 29a-3p dan miRNA 223-3p berbeda pada individu dengan Tuberkulosis aktif dan Tuberkulosis laten. MiRNA 29a-3p diketahui menekan respon imun terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan mengatur produksi interferon gamma (IFN- γ), sedangkan miRNA 223-3p berperan dalam pengaturan peradangan dan respons imun pada sel myeloid, seperti neutrofil dan makrofag, yang merupakan garis pertahanan pertama tubuh terhadap infeksi TB (Sinigaglia et al., 2020). Perubahan kadar miRNA ini dapat menjadi indikator penting dalam membedakan TB aktif dan laten, serta memberikan wawasan mengenai pengelolaan dan diagnosis dini penyakit Tuberkulosis pada ibu hamil, terutama mereka yang menderita KEK (Sinigaglia et al., 2020).

Penelitian tentang miRNA ini dapat membuka jalan untuk pemanfaatan biomarker dalam diagnosis dan terapi Tuberkulosis, terutama pada kelompok berisiko tinggi seperti ibu hamil dengan KEK (Hui & Lao, 2022).

Pengaruh Tuberkulosis pada kehamilan tergantung dari beberapa faktor antara lain: lokasi penyakit (intra atau ekstrapulmonal), usia kehamilan, status gizi ibu, dan ada tidaknya penyakit penyerta. Beberapa studi menyatakan terdapat hubungan antara Tuberkulosis dan meningkatnya risiko berat badan lahir rendah, kelahiran preterm, kehidupan perinatal sampai pada kematian bayi (Kiazyk & Ball, 2017).

Tuberkulosis merupakan salah satu penyakit infeksi yang turut mempengaruhi kejadian Kekurangan Energi Kronik pada ibu hamil. Tuberkulosis dapat menyebabkan penurunan berat badan dan kekurangan gizi. Pasien Tuberkulosis membutuhkan lebih banyak energi untuk mempertahankan fungsi tubuh yang disebabkan oleh peningkatan laju metabolisme yang menyebabkan penurunan berat badan. Selain karena faktor tersebut, asupan makanan dapat

berdampak negatif pada pasien Tuberkulosis karena penurunan nafsu makan dan gangguan gastrointestinal, sehingga mengakibatkan kekurangan gizi. Kekurangan gizi bisa lebih jauh menyebabkan gangguan fungsi kekebalan, defisiensi gizi mengubah interaksi antara makrofag dan T-limfosit (Rumende, 2019).

Biomarker merujuk pada molekul biokimia yang menunjukkan perubahan dalam suatu sistem, organ, jaringan, sel, dan struktur atau fungsi subseluler. Biomarker dapat membantu mendiagnosis penyakit, menentukan stadium penyakit, dan mengevaluasi keamanan dan kemanjuran obat atau perawatan baru pada populasi sasaran. Biomarker tidak hanya mencakup makromolekul biologis, seperti protein dan asam nukleat, tetapi juga mencakup proteom dan metabolom. Perubahan dalam ekspresi miRNA yang diinduksi oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis* juga dapat disebabkan oleh penyakit lain dalam tubuh. Oleh karena itu, penting untuk mengidentifikasi miRNA yang membedakan TB dari penyakit lain, meningkatkan akurasi penggunaan miRNA sebagai biomarker dalam diagnosis Tuberkulosis (L. Wang et al., 2022).

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang berguna dalam upaya deteksi dini Tuberkulosis pada ibu hamil, sehingga dapat mengurangi angka kematian ibu dan bayi serta mendukung pencapaian tujuan penghapusan Tuberkulosis pada tahun 2030 sesuai dengan tujuan pembangunan berkelanjutan PBB (Kementerian Kesehatan, 2021).

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka permasalahan penelitian ini akan dikaji ialah: Bagaimanakah ekspresi miRNA 29a-3p dan miRNA 223-3p sebagai biomarker Tuberkulosis Laten dalam kehamilan dan hubungannya dengan status gizi.

1. Apakah terdapat perbedaan ekspresi miRNA-29a-3p antara ibu hamil dengan tuberkulosis laten dan ibu hamil sehat, serta bagaimana hubungannya dengan status gizi?
2. Apakah terdapat perbedaan ekspresi miRNA-223-3p antara ibu hamil dengan tuberkulosis laten dan ibu hamil sehat, serta bagaimana hubungannya dengan status gizi?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini adalah untuk menyelidiki ekspresi miRNA 29a-3p dan miRNA 223-3p pada Tuberkulosis laten dalam kehamilan dan hubungannya dengan status gizi.

2. Tujuan Khusus

- a. Membandingkan ekspresi miRNA 29a-3p pada Tuberkulosis laten dalam kehamilan dan hubungannya dengan status gizi dan kontrol sehat.
- b. Membandingkan ekspresi miRNA 223-3p pada Tuberkulosis laten dalam kehamilan dan hubungannya dengan status gizi dan kontrol sehat.
- c. Mengevaluasi potensi miRNA 29a-3p dan miRNA 223-3p sebagai biomarker Tuberkulosis laten pada ibu hamil dan hubungannya dengan status gizi dan kontrol sehat.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Manfaat dari Aspek Pengembangan Ilmu

Diharapkan dapat memberikan penambahan pengetahuan dan gambaran tentang peran miRNA 29a-3p dan miRNA 223-3p dalam Tuberkulosis laten pada kehamilan dan hubungannya dengan status gizi.

2. Manfaat dari Aspek Aplikasi Klinis

Dengan diketahuinya ekspresi miRNA pada pasien Tuberkulosis laten maka dapat diperoleh biomarker untuk diagnosis dini Tuberkulosis laten dalam kehamilan dan hubungannya dengan status gizi.

3. Manfaat Praktis

Memberikan data yang relevan untuk pengembangan strategi diagnostik Tuberkulosis laten pada ibu hamil dan hubungannya dengan status gizi.

1.5. Nilai Kebaharuan Penelitian (Novelty)

Belum ada penelitian serupa topik ini dilakukan di Indonesia. Penelitian terkait ekspresi *miRNA* pada penderita Tuberkulosis laten pada populasi ibu hamil dengan kekurangan energi kronik orang Indonesia belum pernah dilakukan. Pada penelitian ini, kami menentukan dua jenis *miRNA* yang dipilih dari beberapa *miRNA* dalam darah yaitu *miRNA 223-3p* yang mengalami downregulasi dan *miRNA 29a-3p* mengalami upregulasi (Sinigaglia et al., 2020) pada Tuberkulosis laten dalam kehamilan dengan kekurangan energi kronik serta kontrol di Kota Makassar sebagai salah satu Kota dengan jumlah penderita Tuberkulosis paru di Indonesia.

Penelitian ini nantinya dapat memberikan informasi atau data terbaru terkait biomarker untuk mendiagnosis secara dini penderita Tuberkulosis laten dalam kehamilan dengan kekurangan energi kronik, yang mendukung program

pemerintah untuk menurunkan angka kematian ibu dan eliminasi Tuberkulosis tahun 2030 di Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tuberkulosis (TB)

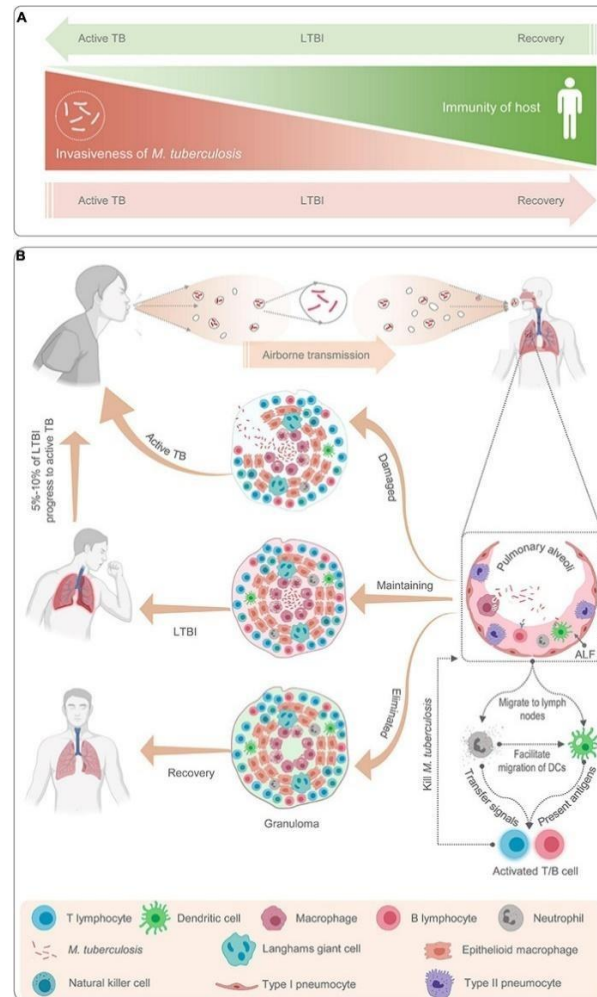
1. Definisi Tuberkulosis (TB)

Tuberkulosis adalah suatu penyakit kronik menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri ini berbentuk batang dan bersifat tahan asam sehingga sering dikenal dengan Basil Tahan Asam (BTA). Sebagian besar kuman Tuberkulosis sering ditemukan menginfeksi parenkim paru dan menyebabkan TB paru, namun bakteri ini juga memiliki kemampuan menginfeksi organ tubuh lainnya (Tuberkulosis ekstra paru) seperti pleura, kelenjar limfe, tulang, dan organ ekstra paru lainnya (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI), 2020).

2. Patogenesis Tuberkulosis (TB)

Setelah inhalasi, nukleus percik renik terbawa menuju percabangan trakea-bronkial dan dideposit di dalam bronkiolus respiratorik atau alveolus, di mana nukleus percik renik tersebut akan dicerna oleh makrofag alveolus yang kemudian akan memproduksi sebuah respon nonspesifik terhadap basilus. Infeksi bergantung pada kapasitas virulensi bakteri dan kemampuan bakterisid makrofag alveolus yang memprosesnya. Apabila basilus dapat bertahan melewati mekanisme pertahanan awal ini, basilus dapat bermultiplikasi di dalam makrofag. Tuberkulosis bakteri akan tumbuh perlahan dan membelah setiap 23-32 jam sekali di dalam makrofag. *Mycobacterium* tidak memiliki endotoksin ataupun eksotoksin, sehingga tidak terjadi reaksi imun segera pada host yang terinfeksi. Bakteri kemudian akan terus tumbuh dalam 2-12 minggu dan jumlahnya akan mencapai 10^3 - 10^4 , yang merupakan jumlah yang cukup untuk menimbulkan sebuah respon imun seluler yang dapat

dideteksi dalam reaksi pada uji tuberkulin skin test. Bakteri kemudian akan merusak makrofag dan mengeluarkan produk berupa Tuberkulosis basilus dan kemokin yang kemudian akan menstimulasi respon imun (Kemenkes RI, 2020).



Gambar 2.1. Skema Tuberkulosis laten (Gong & Wu, 2021)

Diagram skema Tuberkulosis laten dan mekanismenya. Tuberkulosis laten (LTBI) adalah keseimbangan antara imunitas *host* dan invasi *Mycobacterium tuberculosis*, kemiringan apa pun akan mengganggu keseimbangan **(A)**. *Mycobacterium tuberculosis* yang dikeluarkan dari pasien dengan TB aktif dihirup oleh orang sehat melalui transmisi udara dan dikenali dan difagositosis oleh sel penyaji antigen seperti makrofag, neutrofil, sel pembunuh alami, dan limfosit B **(B)**. Kemudian, neutrofil melepaskan sitokin untuk mengaktifkan dan merekrut limfosit T untuk berkumpul di tempat *Mycobacterium tuberculosis* menginvasi untuk membentuk granuloma **(B)**. Jika imunitas *host* kuat, *Mycobacterium tuberculosis* akan dibersihkan oleh sel imun dan *host* pulih, jika imunitas *host* lemah

Mycobacterium tuberculosis akan bereproduksi dalam jaringan granulomatosa dan menerobos retriksi granulomatosa untuk menyebabkan TB aktif, jika imunitas host dan invasi *Mycobacterium tuberculosis* seimbangan, host akan terinfeksi laten **(A,B)** (Gong & Wu, 2021).

Setelah inhalasi, pertumbuhan bakteri ekstraseluler dan intraseluler terjadi secara istimewa di bagian atas paru-paru yang berventilasi baik, terutama di makrofag alveolar. Pada 3 sampai 4 minggu pasca infeksi, individu sehat atau immunocompromised mengembangkan kekebalan sel-T, menyebabkan penurunan pertumbuhan bakteri intraseluler. Namun demikian, bakteri tersebut dapat bertahan hidup secara intraseluler-awalnya tanpa menyebabkan gejala klinis. Dalam perjalanan mekanisme pertahanan kekebalan, granuloma Tuberkulosis muncul biasanya dengan kaseasi sentral. Terutama pada anak-anak atau individu dengan immunosupresi, Tuberkulosis yang nyata secara klinis dapat berkembang segera setelah infeksi. Kasus seperti ini disebut sebagai Tuberkulosis primer progresif. Akan tetapi, sebagian besar pasien mengembangkan Tuberkulosis laten (LTBI) disertai jaringan parut atau kalsifikasi granuloma Tuberkulosis, yang tidak selalu terlihat padat pencitraan diagnostik. Pada sekitar 5% sampai 10% pasien, penurunan imunitas seluler menyebabkan reaktivasi LTBI, mengakibatkan Tuberkulosis postprimer. Reaktivasi paling sering terjadi dalam 2 tahun setelah infeksi primer. Pasien HIV memiliki risiko reaktivasi yang sangat tinggi, terutama jika jumlah sel T CD4+ mereka rendah. Oleh karena itu, risiko reaktivasi Tuberkulosis sekitar 20 kali lebih tinggi pada kasus infeksi HIV yang tidak diobati dibandingkan orang HIV-negatif. Namun, risiko reaktivasi juga meningkat dengan kondisi immunosupresif lainnya, misalnya diabetes melitus, gagal ginjal terminal, atau pengobatan dengan penghambat tumor *necrosis factor-alpha* (TNF- α) (Suárez, 2019).

3. Perbedaan Tuberkulosis Aktif dan Tuberkulosis Laten

Mycobacterium tuberculosis, ditularkan oleh orang-orang yang terinfeksi Tuberkulosis paru yang melepaskan *Mycobacterium tuberculosis* ke udara melalui batuk, bersin atau meludah. Setelah terpapar kuman *Mycobacterium tuberculosis* ada empat keadaan yang bisa terjadi yaitu pertama tidak terjadi infeksi (ditandai dengan tes kulit tuberkulin yang negatif), kedua terjadi infeksi kemudian menjadi Tuberkulosis yang aktif (Tuberkulosis primer), ketiga menjadi Tuberkulosis laten dimana mekanisme imun mencegah progresivitas penyakit menjadi Tuberkulosis aktif dan keempat menjadi Tuberkulosis laten tetapi kemudian terjadi reaktivasi dan berkembang menjadi Tuberkulosis aktif dalam beberapa bulan sampai beberapa tahun kemudian. Tuberkulosis laten ini didefinisikan sebagai kondisi seseorang yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* tetapi saat ini orang tersebut tidak sakit, tidak mempunyai gejala atau *asymptomatic* dan gambaran foto toraks normal (Riskesdas, 2013).

Tabel 2.1. Karakteristik Tuberkulosis laten dan Penyakit Tuberkulosis (Pagaduan & Altawallbeh, 2023)

	Infeksi TB Laten	Penyakit Tuberkulosis
Gejala	Tidak ada	Hemoptisis, nyeri dada, penurunan berat
Penampilan Fisik	Berpenampilan menarik, merasa sehat	Tidak sehat, merasa sakit
Tes Kulit atau Darah	Hasil positif menunjukkan infeksi TB	Hasil positif menunjukkan infeksi TB
Infeksi Bakteri Tuberkulosis	Infeksi sebelumnya tidak dapat menularkan penyakit ke orang lain	Infeksi baru-baru ini dapat menyebarkan penyakit ke orang lain
Rontgen Dada	Normal	Abnormal
Apusan atau Kultur Sputum	Negatif	Positif

4. Diagnosis Tuberkulosis Aktif dan Tuberkulosis Laten

a. Diagnosis Tuberkulosis Aktif

Tuberkulosis aktif didiagnosis dengan mengisolasi basil kompleks *Mycobacterium tuberculosis* dari sekresi tubuh. Setiap pasien yang diduga menderita Tuberkulosis aktif merupakan risiko kesehatan masyarakat untuk penularan dan harus diisolasi dengan tindakan pencegahan penularan melalui udara. Pada Tuberkulosis paru, pengujian awal meliputi rontgen dada, evaluasi dahak. Evaluasi dahak meliputi apusan Bakteri Tahan Asam (apusan BTA), kultur mikobakteri, dan pengujian amplifikasi asam nukleat (NAAT) (Jilani et al., 2023).

b. Diagnosis Tuberkulosis Laten

Deteksi LTBI harus dibedakan dari diagnosis Tuberkulosis aktif. Prosedur tidak langsung seperti uji pelepasan *interferon-gamma* (IGRA) adalah standar modern untuk diagnosis LTBI pada orang dewasa. Uji ini mendeteksi sekresi *interferon-gamma* (IFN- γ) oleh limfosit T, yang distimulasi melalui antigen yang relatif spesifik terhadap Tuberkulosis. Vaksinasi *Basil Calmette- Guérin* (BCG) sebelum biasanya tidak menyebabkan hasil positif palsu. IGRA digunakan terutama untuk menyelidiki orang-orang yang telah melakukan kontak dengan pasien indeks yang menderita Tuberkulosis paru menular (Suárez, et al., 2019).

5. Pengobatan Tuberkulosis

Tuberkulosis (TB) Paru adalah penyakit yang dapat diobati dan disembuhkan dengan pengobatan selama 6 bulan sampai 1 tahun. Apabila penderita menghentikan pengobatan maka kuman Tuberkulosis Paru akan mulai berkembang biak lagi. Hal ini berarti penderita mengulangi pengobatan intensif selama 2 bulan

pertama (WHO, 2013). Pengobatan yang tidak teratur dan kombinasi obat yang tidak lengkap, dapat menimbulkan kekebalan ganda kuman Tuberkulosis terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) atau *Multi Drug Resistance* (MDR). WHO (2013) memperkirakan di Indonesia terdapat 6.800 kasus baru Tuberkulosis dengan *Multi Drug Resistance* (TB MDR) setiap tahun (WHO, 2022).

2.2. Kehamilan dan Kesehatan Ibu

1. Pentingnya Kesehatan Ibu selama Kehamilan

Kesehatan selama kehamilan sangat penting untuk memastikan hasil yang baik bagi ibu dan bayi. Beberapa faktor kunci yang perlu diperhatikan adalah nutrisi yang baik, pengelolaan berat badan, dan gaya hidup sehat. Nutrisi yang adekuat sangat penting selama kehamilan. Wanita hamil harus mengonsumsi makanan yang kaya akan protein, vitamin, dan mineral seperti zat besi, kalsium, folat, dan asam lemak omega-3. Kekurangan nutrisi selama kehamilan dapat menyebabkan berbagai komplikasi seperti berat badan lahir rendah, prematuritas, dan masalah perkembangan pada bayi. Gaya hidup sehat termasuk menghindari rokok dan alkohol, serta berolahraga secara teratur sangat penting untuk kesehatan ibu dan bayi. Merokok selama kehamilan, misalnya telah dikaitkan dengan berbagai masalah kesehatan seperti berat badan lahir rendah dan peningkatan risiko penyakit di kemudian hari untuk anak. Secara keseluruhan, memastikan kesehatan yang baik sebelum dan selama kehamilan melalui nutrisi yang tepat, pengelolaan berat badan, gaya hidup sehat, dan perawatan prenatal yang baik sangat penting untuk memastikan hasil yang optimal bagi ibu dan bayi (Muglia et al., 2022).

2. Imunitas selama Kehamilan

Selama kehamilan, sistem kekebalan tubuh ibu mengalami perubahan signifikan untuk melindungi janin yang sedang berkembang sambil tetap menjaga kemampuan untuk melawan infeksi. Berikut beberapa penemuan penting mengenai perubahan imunologi selama kehamilan. Sistem kekebalan tubuh ibu mengalami perubahan untuk mencegah penolakan janin, yang dianggap sebagai entitas asing oleh tubuh ibu. Perubahan ini termasuk peningkatan aktivitas komponen sistem komplemen, yang membantu dalam pertahanan terhadap patogen sambil menjaga keseimbangan melalui protein pengatur seperti faktor H dan *Decay-accelerating factor* (DAF). Beberapa jenis sel imun mengalami perubahan dalam jumlah dan fungsi selama kehamilan. Misalnya, jumlah neutrofil meningkat secara bertahap dari trimester pertama, dan aktivitas sel T regulator (Treg) juga meningkat untuk membantu dalam toleransi imun terhadap janin. Kehamilan dapat meningkatkan risiko dan kegawatan infeksi tertentu. Misalnya, infeksi saluran kemih lebih umum dan pneumonia bisa lebih parah selama kehamilan karena perubahan fisiologis seperti peningkatan tekanan abdominal dan perubahan kapasitas paru-paru (Abu-Raya et al., 2020).

3. Dampak Infeksi Tuberkulosis pada Kehamilan

Saat hamil, perempuan lebih berisiko terhadap infeksi Tuberkulosis karena adanya perubahan fisiologis dan *stress* yang terjadi selama kehamilan, sehingga menyebabkan terjadinya *imunodefisiensi* seluler yang memfasilitasi terjadinya reaktivasi atau infeksi mikobakteri. Perempuan hamil terutama yang positif HIV dan mengidap Tuberkulosis laten, lebih berisiko berkembang menjadi penyakit Tuberkulosis aktif (Rumende, 2019).

Akibat pengaruh progesteron maka terjadi perubahan respons imun seluler yang ditandai dengan adanya peningkatan aktivitas fagosit dan sel dendritik

plasmatosit, dengan penurunan aktivitas sitotoksitas sel NK (*natural killer*) serta menurunnya produksi IFN- γ sehingga secara umum akan menekan respons imun alami (*innate immunity*). Pada respons selular adaptif didapatkan juga penurunan regulasi sitokin Th1 (IFN- γ dan IL-12), yang akan mencapai titik rendah pada akhir trimester kedua dan ketiga. Perubahan pada imunitas humoral meliputi peningkatan kadar komplemen dan reaktan fase akut, serta peningkatan produksi immunoglobulin (Rumende, 2019).

Meskipun demikian, Tuberkulosis berdampak buruk pada hasil kehamilan, dipengaruhi oleh Lokasi dan Tingkat keparahan penyakit, respons pengobatan obat anti-Tuberkulosis, komplikasi Tuberkulosis, usia kehamilan saat diagnosis dan status HIV. Sebuah meta-analisis sebelumnya tentang Tuberkulosis aktif menemukan peningkatan signifikan kemungkinan morbiditas ibu, rawat inap antenatal, keguguran, anemia, dan operasi Caesar. Tanpa pengobatan Tuberkulosis juga menyebabkan peningkatan kelahiran *premature*, berat badan lahir rendah (BBLR), gawat janin, skor apgar rendah pada menit pertama, asfiksia saat lahir, dan kematian perinatal. Selanjutnya, penelitian lain juga mendokumentasikan peningkatan hasil yang merugikan. Sebuah studi *kohort* nasional AS dengan 4053 kasus Tuberkulosis pada kehamilan menunjukkan frekuensi yang lebih tinggi dari preeklamsia berat dan eklamsia, perdarahan pasca persalinan, plasenta previa, sepsis dan 37 kali lebih tinggi kematian di rumah sakit, dibandingkan dengan mereka yang tidak mengidap Tuberkulosis tetapi tanpa disparitas rasa atau etnis (Hui & Lao, 2022).

Infeksi HIV, faktor risiko paling kuat untuk penyakit Tuberkulosis aktif, meningkatkan reaktivitas Tuberkulosis laten sebanyak 20 kali lipat, dan koinfeksi HIV memicu penekanan substansial respons IFN- γ spesifik Tuberkulosis terhadap *Mycobacterium* dalam cara yang bergantung pada jumlah sel T CD4 +, yang

menunjukkan bahwa risiko penyakit Tuberkulosis aktif yang lebih tinggi selama kehamilan disebabkan oleh kegagalan dalam mengendalikan infeksi Tuberkulosis. Kehamilan pada Wanita yang mengidap HIV meningkatkan penularan Tuberkulosis sebanyak 2,56 kali lipat, dan koinfeksi Tuberkulosis dan HIV meningkatkan angka kematian neonatal sebanyak 3 kali lipat Bersama dengan penularan vertikal sebesar 15% untuk Tuberkulosis dan 10% untuk HIV (Hui & Lao, 2022).

Masa nifas dikaitkan dengan risiko komplikasi serius pada ibu yang lebih tinggi termasuk kematian, dan penularan penyakit kepada bayinya tanpa memandang status HIV atau riwayat paparan, karena penyakit Tuberkulosis aktif meningkat 95% selama 180 hari pasca melahirkan, disebabkan oleh kembalinya respons pro-inflamasi *T-helper 1* yang ditekan setelah melahirkan sehingga menyebabkan eksaserbasi penyakit. Penderita LTBI juga menunjukkan peningkatan aktivasi sel T *non*-spesifik, yang merupakan biomarker perkembangan LTBI menjadi penyakit Tuberkulosis. Oleh karena itu, pengawasan pascapersalinan penting dilakukan, terutama bagi ibu yang tinggal di daerah endemis (Hui & Lao, 2022).

2.3. Status Gizi Ibu Hamil dengan Tuberkulosis

Di Indonesia, salah satu parameter untuk menentukan status gizi ibu hamil adalah indikator antropometri Lingkar Lengan Atas (LILA) pada ibu, di mana asupan energi dan protein yang tidak mencukupi pada ibu hamil dapat menyebabkan Kurang Energi Kronis (KEK). Seorang ibu hamil dikatakan status gizinya normal apabila mempunyai IMT 18,5 s/d 24,9 kg/m² selama kehamilan atau ditandai dengan hasil pengukuran LILA lebih dari atau sama dengan 23,5 cm wanita hamil

berisiko mengalami KEK jika memiliki Lingkar Lengan Atas (Lila) $<23,5\text{cm}$. (RanteAllo Bela et al., 2022).

Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2018 menunjuk kan prevalensi risiko KEK pada ibu hamil (15-49 tahun) masih cukup tinggi yaitu sebesar 17,3%. Persentase ibu hamil KEK diharapkan dapat turun sebesar 1,5% setiap tahunnya. Berdasarkan sumber data laporan rutin tahun 2020 yang terkumpul dari 34 provinsi menunjukkan dari 4.656.382 ibu hamil yang diukur lingkar lengan atasnya (LILA), diketahui sekitar 451.350 ibu hamil memiliki LILA $< 23,5\text{ cm}$ (mengalami risiko KEK). Dari perhitungan tersebut dapat disimpulkan bahwa persentase ibu hamil dengan risiko KEK tahun 2020 adalah sebesar 9,7%, sementara target tahun 2020 adalah 16%. Kondisi tersebut menggambarkan bahwa pencapaian target ibu hamil KEK tahun ini telah melampaui target Renstra Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI) tahun 2020. Prevalensi KEK di Negara-negara berkembang seperti Bangladesh, India, Indonesia, Myanmar, Nepal, Srilanka, dan Thailand adalah 15-47 % yaitu dengan BMI (RanteAllo Bela et al., 2022).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nabilla Niken et al, menunjukkan adanya “Hubungan yang signifikan antara status gizi dengan kejadian Tuberkulosis di seluruh provinsi Indonesia dengan nilai $p = 0.020$ dan OR 1,78 (95% CI: 1,1-2,9)” (Vanda Editia et al., 2023). Penelitian yang dilakukan oleh Rahmi Novita et al tahun 2018 juga menyatakan adanya “Hubungan yang signifikan antara status gizi dengan Tuberkulosis dengan $p = 0.006$ ” (Vanda Editia et al., 2023).

Kekurangan energi kronik (KEK) pada ibu hamil menurut WHO merupakan kondisi seseorang yang memiliki nilai indeks massa tubuh (IMT) kurang dari 18,5. WHO menentukan standar nilai IMT 18,5, 17,0, dan 16,0 sebagai kekurangan energi kronik ringan, sedang, dan berat. Kekurangan energi kronik merupakan keadaan di mana seseorang mengalami kekurangan gizi (kalori dan protein) yang

berlangsung lama atau menahun. Kekurangan energi kronik merupakan gambaran status gizi ibu di masa lalu yaitu kekurangan gizi kronis pada masa anak-anak baik disertai sakit yang berulang ataupun tidak. Kondisi tersebut akan menyebabkan bentuk tubuh yang pendek (*stunting*) atau kurus (*wasting*) pada saat dewasa (Mariyatun & Herdiana, 2023).

1. Dampak Status Gizi terhadap Kesehatan Ibu dan Janin

Wanita hamil dengan kekurangan energi kronik mempunyai risiko morbiditas yang lebih tinggi, khususnya pada trimester ketiga, dibandingkan dengan wanita hamil normal. Alhasil mereka lebih mungkin melahirkan bayi dengan berat badan lahir rendah (BBLR), dan efek kekurangan gizi pada proses persalinan dapat menyebabkan persalinan yang sukar dan lamban, persalinan prematur, persalinan dengan operasi caesar, kematian saat melahirkan, dan perdarahan pasca persalinan yang berlangsung lama karena mereka lemah dan rentan terhadap masalah kesehatan. Kekurangan energi kronik pada ibu hamil juga berisiko menyebabkan banyak penyakit baik pada ibu hamil dan anak yang akan dilahirkan, seperti anemia pada ibu hamil, preeklamsia, bayi lahir *stunting*, berat badan lahir rendah (BBLR) (Putri et al., 2023).

2. Hubungan Status Gizi dan Infeksi Tuberkulosis

Infeksi Tuberkulosis dapat menyebabkan penurunan berat badan, status gizi yang buruk, meningkatkan risiko infeksi dan penyebaran penyakit Tuberkulosis. Infeksi Tuberkulosis meningkatkan kebutuhan energi untuk mempertahankan fungsi normal tubuh, ini ditandai dengan peningkatan energi saat istirahat atau *resting energi expenditure* (REE). Infeksi Tuberkulosis juga mengakibatkan malabsorpsi *nutrient* serta perubahan metabolisme tubuh. Hal tersebut mengganggu sintesis protein dan lemak endogen sehingga terjadi peningkatan proteolisis dan liposis yang mengakibatkan REE meningkat. Keadaan ini disebut sebagai blockade

formasi energi (*anabolic block*) dan berhubungan dengan proses wasting sehingga terjadi malnutrisi. Malnutrisi pada infeksi Tuberkulosis memperberat perjalanan penyakit Tuberkulosis dan mempengaruhi prognosis pengobatan dan tingkat kematian (Made Sudana, 2017).

Penyakit TB pada seseorang dipengaruhi oleh beberapa faktor dan salah satunya ialah status gizi, di mana gizi merupakan salah satu faktor penting yang menentukan tingkat kesehatan dan kesejahteraan manusia di mana tingkat status gizi optimal akan tercapai apabila kebutuhan zat gizi optimal terpenuhi. Status Gizi yang buruk akan meningkatkan risiko penyakit Tuberkulosis Paru, sebaliknya Tuberkulosis Paru (TB) berkontribusi menyebabkan status Gizi buruk karena proses perjalanan penyakit yang mempengaruhi daya tahan tubuh. Pada penderita TB sering didapatkan mengalami penurunan status gizi, bahkan dapat menjadi malnutrisi bila tidak diimbangi dengan diet yang tepat (Novita Yusuf, 2018).

Tuberkulosis paru dan status gizi buruk diketahui memiliki hubungan dua arah yang kompleks. Status gizi yang buruk dapat meningkatkan kemungkinan infeksi Tuberkulosis laten menjadi Tuberkulosis aktif karena daya tahan tubuh menurun, dan adanya infeksi Tuberkulosis dapat memperburuk kondisi status gizi karena menurunnya nafsu makan dan gangguan metabolisme (Zabrina Sellyardi Putri et al., 2025).

Pasien penderita TB aktif akan cenderung mengalami penurunan berat badan dan memiliki indeks massa tubuh (IMT) yang rendah dengan nilai kurang dari 18,5 kg/m². Sebuah penelitian di India melaporkan bahwa pasien dengan TB 11 kali lebih mungkin memiliki BMI <18,5 kg/m² dibandingkan kelompok kontrol. Secara global, WHO memperkirakan bahwa sekitar seperempat dari semua kasus TB baru disebabkan oleh kekurangan gizi pada tahun 2018; sebaliknya, individu

dengan kekurangan gizi memiliki risiko tiga kali lebih tinggi terkena TB aktif (Musuenge et al., 2020).

2.4. MikroRNA (miRNA)

1. Definisi dan Fungsi miRNA

MiRNA adalah RNA *non-coding* kecil, biasanya panjangnya 18-24 nukleotida, yang terlibat dalam regulasi ekspresi gen pada tingkat pasca-transkripsi dan memengaruhi banyak proses biologis termasuk respons imun. Untuk melakukan fungsi pengaturannya, miRNA berikatan dengan sekuens komplementer di wilayah 3-*untranslated* dari target mRNA yang menyebabkan degradasi transkrip atau inhibisi translasi. Interaksi miRNA dengan daerah lain, termasuk 5' UTR, sekuens coding, dan promotor gen. Lebih jauh lagi, miRNA telah terbukti mengaktifkan ekspresi gen dalam kondisi tertentu. Studi terbaru menunjukkan bahwa miRNA diangkut antara kompartemen sub seluler yang berada untuk mengendalikan laju translasi, dan bahkan transkripsi. Genom manusia mengkodekan sekitar dua ribu miRNA yang berpotensi berfungsi dan setiap miRNA dapat menekan banyak gen, sementara satu mRNA dapat ditargetkan oleh banyak miRNA. Bila RNA pada umumnya memengaruhi metabolisme tubuh dengan cara menghasilkan protein, miRNA tidak mengkode protein apapun. Mirna berperan dalam regulasi fungsi dengan cara berikatan dan menginduksi pemotongan mRNA atau menekan proses translasinya menjadi protein. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa gangguan pada regulasi miRNA memiliki hubungan dengan berbagai penyakit pada manusia. Anomali spesifik ekspresi miRNA telah dikaitkan dengan beberapa penyakit, termasuk penyakit menular, dan diselidiki sebagai penanda diagnostik potensial atau alat terapi. Beberapa penelitian menyoroti

perubahan tingkat miRNA yang bersirkulasi pada pasien dengan Tuberkulosis dan mengidentifikasi tanda tangan miRNA yang dapat membedakan antara pasien dengan Tuberkulosis aktif dan pasien dengan LTBI. Pengembangan biomarker diagnostik dan prognostik baru akan sangat berguna untuk skrining infeksi dan penyakit *Mycobacterium tuberculosis*, yang metodenya saat ini masih belum memuaskan (Sinigaglia et al., 2020).

2. Biogenesis miRNA

MiRNA pertama kali ditemukan pada nematoda *Caenorhabditis Elegans*, tahun 1993. Diketahui juga bahwa miRNA terdapat pada seluruh eukariot, termasuk manusia. Sebagian besar miRNA pada mamalia berlokasi pada intro dan regio non-coding lainnya dari genom. Kedua regio ini dulu disebut “junk DNA” karena belum diketahui fungsinya (Patologi et al., 2016).

Penamaan miRNA diberikan dengan menuliskan awalan (prefiks) “miR” untuk miRNA matur serta “mir” untuk pri-miRNA dan pre-miRNA. Perbedaan angka yang menjadi identitasnya menunjukkan urutan penemuannya, contohnya miR-124 ditemukan lebih awal dari miR-456. MiRNA yang memiliki sekuens identik dengan beda panjang 1-2 nukleotida, diidentifikasi dengan huruf kecil di belakangnya, contohnya miR-124a dan miR-124b. Penamaan lengkap diawali nama spesies misalnya: hsa-mir-194-1 dan hsa-mir-194-2 menunjukkan suatu pre-miRNA atau pri-miRNA yang berasal dari gen yang lokasinya berbeda pada genom dan hsa menunjukkan asal spesiesnya yaitu homo sapiens (Patologi et al., 2016).

Biogenesis miRNA diawali transkripsi yang diperantarai enzim RNA *polymerase* II, sehingga dihasilkan molekul transkripsi primer (pri-miRNA) dengan panjang 1-3 kb, memiliki cap pada ujung 5', dan poli adenilasi pada ujung 3', strukturnya mirip protein-coding mRNA. Selanjutnya pri-miRNA membentuk struktur hairpin dengan ujung berbentuk loop dan bergabung dengan kompleks

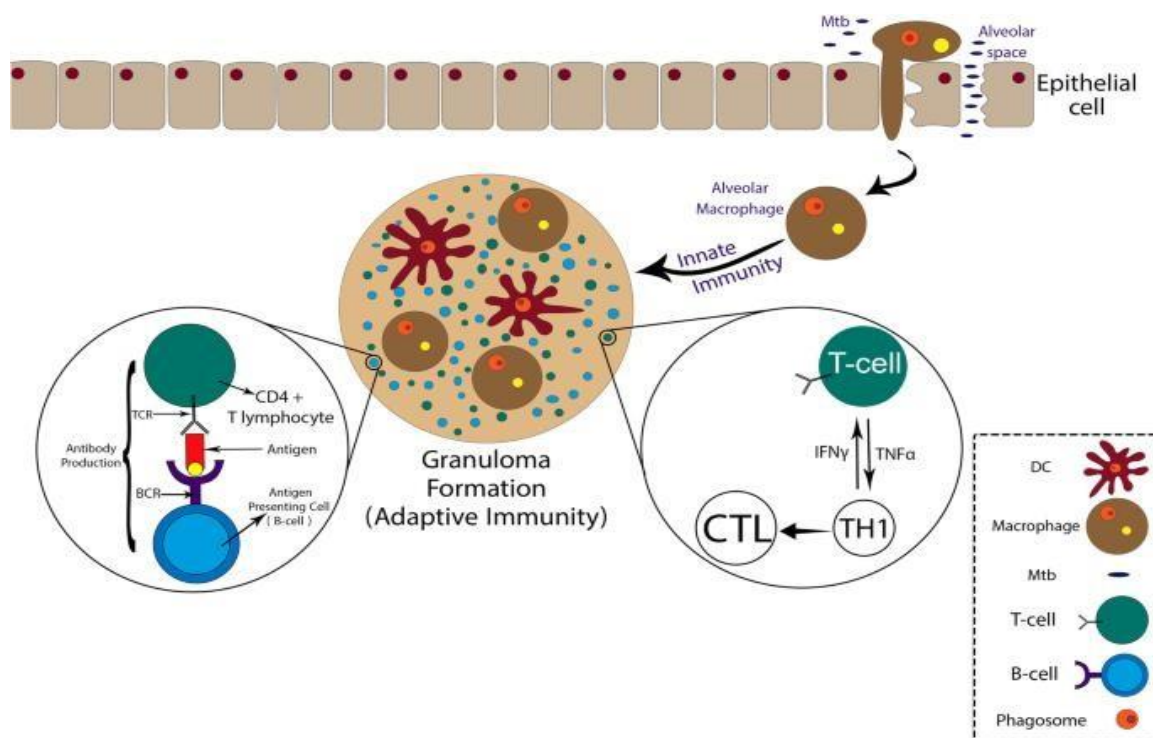
mikroprosesor (500-650 kDa) yang terdiri atas enzim Drosha (suatu RNase III endonuclease) serta protein kofaktor *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8) menghasilkan pre-miRNA dengan panjang 65 nukleotida. Pre-miRNA ditranspor dari inti ke sitoplasma oleh Exportin-5 (XPO5) suatu keluarga reseptor Ran transport. Di sitoplasma, pre-miRNA dipotong oleh enzim bernama dicer (suatu RNase III endonuclease) menjadi *double strand* RNA/ds-RNA yang disebut miRNA:miRNA* *duplex*. Pematangan miRNA terjadi melalui pemisahan ikatan duplex oleh enzim helikase, menjadi miRNA matang dan miRNA (Patologi et al., 2016).

Bentuk miRNA matang dalam bentuk rantai tunggal dengan panjang 22 nukleotida, bergabung dengan RNA-induced silencing complex (RISC) yang terdiri atas dicer, *transactivation-responsive* RNA-binding protein (TRBP), dan argonaute2 (AGO2) untuk meregulasi ekspresi gen, sedangkan miRNA akan segera didegradasi. Regulasi ekspresi gen oleh miRNA bergantung pada ikatan spesifik 6-7 nukleotida dari ujung 5'nya dengan 3' *untranslated* region (3'UTR) pada mRNA target. Jika miRNA berikatan sempurna dengan mRNA target, maka mRNA target akan didegradasi, jika ikatannya tidak sempurna menyebabkan inhibisi translasi, sehingga tidak terbentuk protein (Patologi et al., 2016).

3. Mekanisme Kerja miRNA dalam Regulasi Gen

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit paling mematikan di dunia, yang sangat sulit diberantas karena kemampuannya bertahan hidup di makrofag. Bakteri intraseluler, seperti *Mycobacterium tuberculosis* dapat bertahan hidup dan berkembang biak di sel fagosit dan secara umum dapat mengatur sistem pertahanan tubuh untuk bertahan hidup dan bereplikasi melalui berbagai jalur. Salah satu jalur tersebut adalah perubahan ekspresi miRNA untuk mengubah respon imun dan akhirnya memfasilitasi pembentukan infeksi di sel tubuh. Dalam

beberapa tahun terakhir, peran miRNA sebagai faktor pengatur dalam respon imun bawaan dan didapat terhadap infeksi Tuberkulosis telah banyak dipertimbangkan. MikroRNA telah dipelajari secara ekstensif dan memiliki kemampuan penting untuk mengatur ekspresi gen. MiRNA mempengaruhi banyak proses penting dan merupakan pengatur sistem imun (Behrouzi, 2019).



Gambar 2.2. Peran miRNA *host* pada *Mycobacterium tuberculosis* (Behrouzi, 2019)

Tabel 2.2. Peran miRNA *host* pada *Mycobacterium tuberculosis* (Behrouzi, 2019)

MiRNAs	<i>The role of miRNA</i>
MiR-29	<i>Inhibition of interferon gamma (IFN-γ)</i>
MiR-21	<i>Reduced expression of IL-1B</i> <i>IL-12P3 inhibition</i> <i>IL-10 increase inhibitory cytokine</i>
MiR-99b	<i>Target TNF-α mRNA transcript</i>
MiR-125	<i>Target TNF-α mRNA transcript</i>

	<i>Reduce inflammatory responses</i>
MiR-155	Target TNF- α Mrna transcript <i>Inhibition of interferon gamma</i>
MiR-144	<i>Inhibition of interferon gamma and TNF-α</i>
MiR-233	<i>Inhibition of interleukin 6</i>
MiR-26a	<i>Polarization induction of anti-inflammatory M2 macrophage phenotype</i>

Ringkasan peran regulasi miRNA dalam menghasilkan respons imun bawaan: secara singkat, peran masing-masing miRNA dalam gambar disebutkan dalam teks. MiR-124 memiliki efek penghambat pada Myd88, dan miR-146a memiliki efek penghambatan pada IRAK1 dan TRAF6, semuanya mengarah pada aktivasi jalur inflamasi NFkB. Di sisi lain, let7-f dengan efek penghambatan pada protein A20 dapat memiliki efek penghambatan pada jalur NFkB. Di sisi lain, let7-f dengan efek penghambatan pada protein A20 dapat memiliki efek penghambatan pada jalur NFkB. MiRNA lain, seperti miR-99b dan miR-125 secara langsung memengaruhi transkrip Mrna sitokin inflamasi, seperti TNF- α . MiRNA, seperti miR-155, dapat memiliki efek produksi sitokin pra-inflamasi melalui efek negatif pada SOCS1 dan SHIP1 (Behrouzi, 2019).

4. MikroRNA dalam Patogenesis Tuberkulosis

Beberapa penelitian melaporkan profil ekspresi miRNA yang bersirkulasi dan seluler yang berubah pada pasien dengan Tuberkulosis aktif dibandingkan mereka dengan LTBI atau kontrol yang sehat. MiRNA yang diekspresikan secara berbeda diselidiki lebih lanjut untuk mengidentifikasi peran mereka dalam respon imun bawaan selama infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Eksperimen *in vitro* dan *in vivo* mengkonfirmasi keterlibatan miRNA dalam memodulasi ekspresi gen dalam sel

target utama *Mycobacterium tuberculosis*, seperti makrofag, DC, pembunuh alami (NK) dan sel T. *Mycobacterium tuberculosis* dapat menginduksi atau menghambat ekspresi miRNA untuk menghindari respon imun. Memicu jalur apoptosis, induksi autophagy, stimulasi IFN γ dan sekresi tumor *necrosis factor alpha* (TNF γ) adalah beberapa mekanisme yang diadopsi oleh sel inang selama infeksi bakteri. Misalnya, di antara miRNA yang diregulasi pada pasien Tuberkulosis, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-99b-5p, dan miR-132-5p secara negatif mengatur jalur inflamasi *host* yang dipicu oleh pensinyalan *Toll-like receptor* (TLR) dalam sel *myeloid*, sehingga meningkatkan kelangsungan hidup *Mycobacterium tuberculosis*. MiRNA lain yang diregulasi dalam makrofag yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, seperti miR-27a-5p, miR-33, miR-125-5p dan miR-144-5p, menghambat pembentukan autofagosom dan pembunuhan *Mycobacterium tuberculosis* oleh makrofag. MiRNA 29a-3p dan miR-125-5p, keduanya diregulasi dalam makrofag yang terinfeksi, secara langsung menargetkan IFN γ dan TNF γ , sehingga menekan respon imun terhadap *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler. Apoptosis sel dan induksi inflamasi adalah mekanisme pertahanan lain terhadap patogen intraseluler, yang diatur oleh miRNA *host* yang dimodulasi *Mycobacterium tuberculosis*, seperti miR-325-3p dan miR-20b-5p (Sinigaglia et al., 2020).

2.5. MiRNA 29a-3p dan MiRNA 223-3p

1. Karakteristik dan Fungsi MiRNA 29a-3p

Produksi IFN γ oleh sel T CD4 dianggap sebagai penentu utama kekebalan Tuberkulosis, meskipun itu bukan satu satunya mekanisme efektor yang berkontribusi terhadap kekebalan protektif yang diperantarai sel T CD4. Eksperimen menunjukkan bahwa mRNA IFN γ adalah target langsung miRNA 29a-3p dan bahwa miRNA 29a-3p menekan respons imun terhadap patogen intraseluler dengan menargetkan IFN γ . Namun, data tentang hubungan antara miRNA 29a-3p dan IFN γ pada manusia berbeda. Kadar miR-21-5p, miR-26a-5p, miRNA 29a-3p, dan miR-142-3p yang lebih rendah ditemukan dalam sel T CD4 $^{+}$ dari anak-anak dengan Tuberkulosis aktif dibandingkan dengan LTBI. Di varians, analisis sel T mengekspres IFN γ spesifik *Mycobacterium tuberculosis* pada anak dengan TB versus kontrol sehat tidak menunjukkan korelasi apa pun antara miRNA 29a-3p dan ekspresi IFN γ (Sinigaglia et al., 2020).

2. Karakteristik dan Fungsi MiRNA 223-3p

Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* aktif menginduksi infiltrasi neutrofil dan makrofag di paru-paru dimana mereka berkontribusi terhadap peradangan lokal. MiRNA 223-3p, yang memainkan peran relevan dalam biologi sel *myeloid* dan diperkaya dengan neutrofil dan makrofag, banyak diekspresikan dalam parenkim darah dan paru-paru pada manusia dan murine Tuberkulosis. Dalam sel *myeloid*, miRNA 223-3p mengontrol aktivitas NF-KB dan secara negatif mengatur pelepasan sitokin pada Tuberkulosis. Target langsung miRNA 223-3p diwakili oleh ligan motif *chemokine* CXC 2 (CXCL2), ligan motif C-C 3 (CCL3), dan IL-6. Khususnya, tikus *knock-out* miRNA 223-3p gagal mengendalikan Tuberkulosis paru karena peningkatan jumlah migrasi neutrofil yang menyimpang dan memperburuk peradangan. Dengan demikian, miRNA 223-3p mampu mengendalikan peradangan

berlebihan pada Tuberkulosis dengan mengatur kemotaksis leukosit dan aktivitas NF-kB (Sinigaglia et al., 2020).

Selain penyakit yang disebutkan, miRNA 223-3p juga berpartisipasi dalam respons inflamasi penyakit radang paru-paru lainnya, termasuk Tuberkulosis paru (TB), sarkoidosis, dan fibrosis paru.

Tabel 2.3. Peran miRNA 223-3p pada penyakit radang paru lainnya (Shi, 2023)

Cell	Target	Function
Granulosit	Mef2c, NFIA, C/EBP α	Mengatur proliferasi dan diferensiasi granulosit
Makrofag	Pknox1, Rasa1, NFAT5, TRAF6, STATISTIK, NLRP3	Mengatur diferensiasi makrofag, polarisasi, dan pelepasan sitokin proinflamasi
Sel endotel	ICAM-1, NLRP3	Meredakan peradangan sel endotel
Sel epitel	NLRP3, mikrovesikel	Meredakan peradangan sel epitel
Sel dendritik	NLRP3, C/EBP β , Irak1, Rhob, Rasa1, Cfla, Kras	Mengatur fungsi sel dendritik dan memengaruhi jaringan protein terkait kekebalan

Tuberkulosis (TB), sebagai penyakit infeksi yang umum adalah penyakit kronik yang ditandai dengan peradangan terus-menerus. Tuberkulosis disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, yang bertanggung jawab atas tingginya angka kematian dan morbiditas di seluruh dunia. Dorhoi menemukan bahwa dalam darah pasien dengan Tuberkulosis paru aktif, miRNA 223-3p diekspresikan secara melimpah. Tikus resisten TB yang tidak memiliki ekspresi miRNA 223-3p

menunjukkan kerentanan tinggi terhadap infeksi paru akut. MiRNA 223-3p dapat membalikkan pengurangan mAb neutrofil dengan menargetkan kemoatraktan ligan kemokin motif CXC-2 (CXCL2), ligan kemokin motif CC kemokin 3 (CCL3), dan IL-6 untuk menghapus reseptor motif CXC kemokin 2 (CXCR2). Penelitian lebih lanjut mengungkapkan bahwa dalam plasma dari pasien dengan Tuberkulosis paru, miRNA 223-3p diturunkan secara signifikan. Varian dalam tingkat ekspresi miRNA 223-3p mungkin terkait dengan keragaman di antara strain Tuberkulosis yang menyebabkan infeksi. Karena STAT1 memiliki dampak signifikan dalam pertahanan imun terhadap infeksi Tuberkulosis, molekul miRNA 223-3p yang terkait dengan STAT1 telah diidentifikasi sebagai biomarker potensial dalam perkembangan Tuberkulosis aktif. Studi-studi di atas menunjukkan peran penting miRNA 223-3p dalam pengobatan TB (Shi et al., 2023).

2.6. Biomarker untuk Tuberkulosis Laten

1. Kebutuhan akan Biomarker yang andal

Selain itu, miRNA 233-3p yang merupakan RNA *noncoding* kecil telah terbukti mengalami peningkatan regulasi di parenkim paru dan darah pasien TB. selain itu, studi menunjukkan bahwa IL-6, ligan kemokin 3, dan ligan kemokin 2 merupakan target baru miRNA 223-3p. Studi sebelumnya lainnya mengidentifikasi miRNA 29a-3p sebagai penghambat utama IFN- γ . Seperti yang dilaporkan sebelumnya, ekspresi miRNA 29a-3p dan IFN- γ berkorelasi negatif dengan infeksi Mtb, dan miRNA 29a-3p mengalami penurunan regulasi pada sel T yang mensekresi IFN- γ dan sel NK. Selain itu, peningkatan ekspresi miRNA 29a-3p meningkatkan kerentanan terhadap infeksi mikobakterium. MiRNA 29a-3p telah

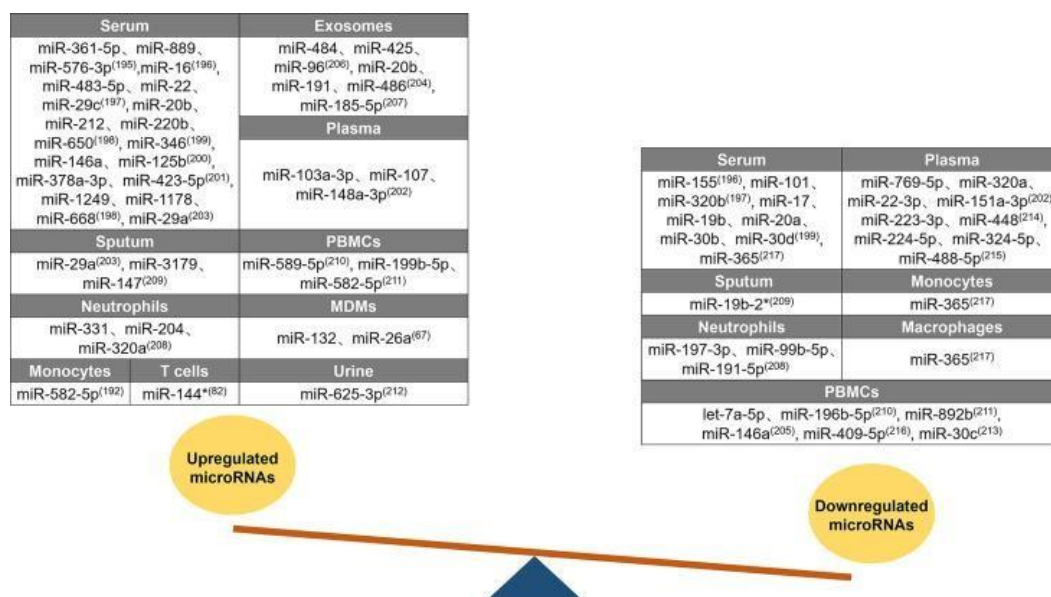
diidentifikasi sebagai regulator yang menekan respons imun terhadap patogen intraseluler (L. Wang et al., 2022).

Biomarker merujuk pada molekul biokimia yang menunjukkan perubahan dalam suatu sistem, organ, jaringan, sel, dan struktur atau fungsi subseluler. Biomarker dapat membantu diagnosis penyakit, menentukan stadium penyakit, dan mengevaluasi keamanan dan kemanjuran obat atau perawatan baru pada populasi sasaran. Biomarker tidak hanya mencakup makromolekul biologis, seperti protein dan asam nukleat, tetapi juga mencakup proteom dan metabolom. Biomarker dapat diperoleh dari darah, urin, air liur, sel kanker, dan sampel jaringan kanker. Menurut fungsinya, biomarker dapat diklasifikasikan ke dalam enam kategori: biomarker untuk diagnosis, prognosis, prediksi, kemanjuran, keamanan, dan pemantauan (L. Wang et al., 2022).

Perubahan dalam ekspresi miRNA *host* memiliki potensi diagnostik pada Tuberkulosis. Empat puluh tiga miRNA yang teregulasi ke atas dan dua puluh delapan miRNA yang teregulasi ke bawah diidentifikasi dalam jaringan yang berbeda dari pasien dengan Tuberkulosis aktif. Dua puluh miRNA yang teregulasi ke atas diidentifikasi dalam serum pasien dengan Tuberkulosis aktif, yang mana 15 (miR-361-5p, miR-889, miR-576-3p, miR-16, miR-483-5p, miR-212, miR-220b, miR-650, miR-346, miR-125b, miR-378a-3p, miR-423-5p, miR-1249, miR-1178, dan miR-668) hanya teregulasi ke atas dalam serum. Pada pasien dengan Tuberkulosis aktif, ekspresi miR-22 meningkat dalam serum, tetapi miR-22-3p menurun dalam plasma. Anggota keluarga miRNA 29a-3p, keduanya meningkat dalam serum dan sputum pasien dengan Tuberkulosis aktif. Kadar tinggi miR-20b ditemukan dalam serum dan eksosom pasien, tetapi pola ekspresi miR-20a yang berlawanan ditemukan dalam serum. Demikian pula, ekspresi miR-146a dalam berbagai sampel jaringan juga mengikuti tren yang berlawanan secara diametral,

dan meningkat dalam serum dan menurun dalam PBMC. Tiga miRNA (miR-103a-3p, miR-107, dan miR-148a-3p) meningkat hanya dalam plasma pasien dengan Tuberkulosis aktif. Tingkat eksosomal miR-484, miR-425, miR-96, miR-486, dan miR-185-5p meningkat pada pasien dengan Tuberkulosis aktif. Untuk pasien dengan Tuberkulosis aktif, kandungan miR-191 meningkat dalam eksosom dan berkurang dalam neutrofil. Dibandingkan dengan kontrol sehat yang tidak terpengaruh, tingkat miR-3179 dan miR-147 dalam sputum, tingkat miR-331 dan miR-204 dalam neutrofil, dan tingkat miR-132 dan miR-26a dalam MDM semuanya meningkat. MiR-582-5p meningkat pada monosit dan PBMC dari pasien dengan TB aktif. MiR-320 memiliki pola ekspresi yang unik pada pasien; miR-320a meningkat pada neutrofil tetapi menurun pada plasma, dan miR-320b menurun pada serum. Tingkat ekspresi miR-144 dan miR-625-3p meningkat pada sel T dan urin pasien dengan Tuberkulosis aktif, masing-masing. Tiga miRNA (miR-155, miR-101, dan miR-17) hanya menurun pada serum pasien. Keluarga miR-30 mencakup miRNA yang mengalami penurunan regulasi pada pasien dengan TB aktif. Misalnya, ekspresi miR-30b dan miR-30d dalam serum dan ekspresi miR-30c dalam PBMC menurun. Pada pasien dengan Tuberkulosis aktif, tujuh miRNA (miR-769-5p, miR-151a-3p, miR-223-3p, miR-448, miR-224-5p, miR-324-5p, dan miR-488-5p) menunjukkan penurunan kadar hanya dalam plasma, empat miRNA ((let-7a-5p, miR-196b-5p, miR-892b, dan miR-409-5p) menunjukkan penurunan kadar hanya dalam PBMC, dan dua miRNA (miR-197-3p dan miR-99b-5p) menunjukkan penurunan kadar hanya dalam neutrofil. MiR-365 mengalami penurunan kadar hanya dalam neutrofil. MiR-365 mengalami penurunan regulasi dalam serum, monosit, dan makrofag pasien dengan Tuberkulosis aktif. Di antara miRNA yang dirangkum di atas, terdapat lima miRNA (miR-22, miR-20, miR-146a, miR-191, dan miR-320) dengan pola ekspresi khas dalam sampel jaringan yang berbeda, dan miRNA ini dapat

berguna sebagai biomarker untuk membedakan pasien dengan Tuberkulosis aktif dari individu yang sehat. MiRNA dapat digunakan sebagai penanda untuk diagnosis dini Tuberkulosis (L. Wang et al., 2022).

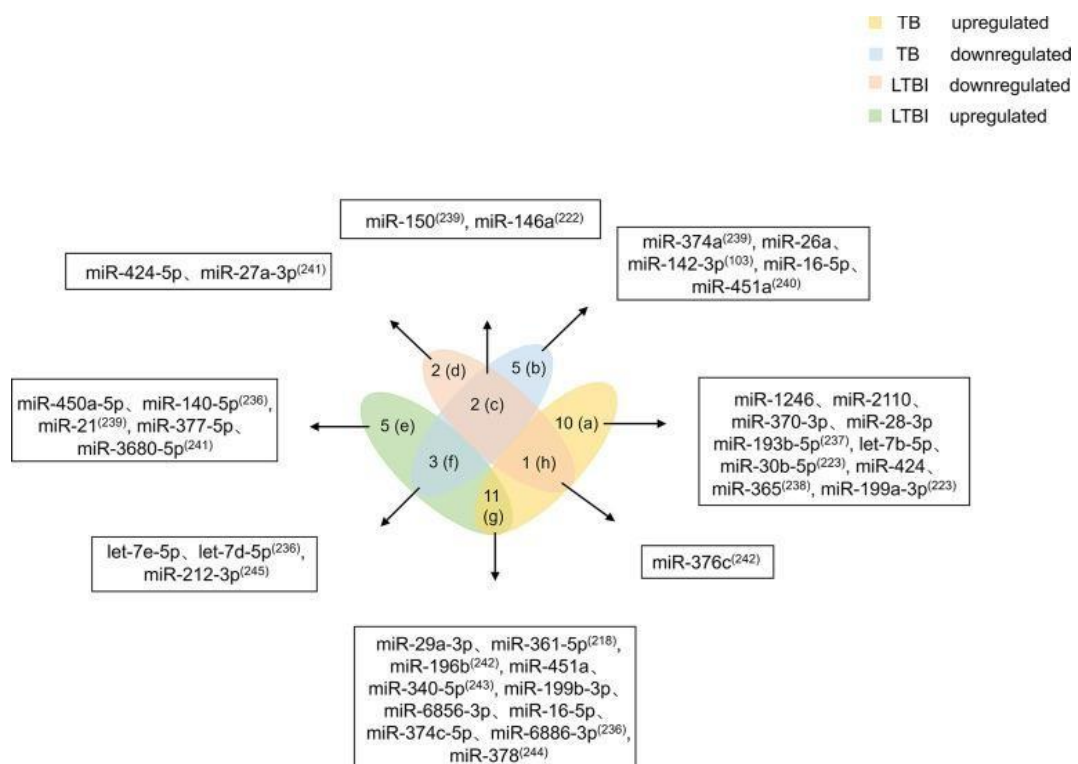


Gambar 2.3. Ekspresi diferensial miRNA setelah infeksi Mtb (Wang, 2022)

Perubahan dalam ekspresi miRNA yang diinduksi oleh infeksi Mtb juga dapat disebabkan oleh penyakit lain dalam tubuh. Oleh karena itu, penting untuk mengidentifikasi miRNA yang membedakan Tuberkulosis dari penyakit lain, meningkatkan akurasi penggunaan miRNA sebagai biomarker dalam diagnosis Tuberkulosis (L. Wang et al., 2022).

Infeksi Mtb tidak berarti orang akan jatuh sakit. LTBI mengacu pada infeksi *host* dengan Mtb tanpa gejala Tuberkulosis. Ketika *host* terinfeksi Mtb, sel imun tubuh tidak dapat membersihkan patogen tepat waktu. Namun, karena kontrol infeksi yang dimediasi imun, pasien tidak mengalami gejala klinis Tuberkulosis. Penelitian telah menunjukkan bahwa orang dengan LTBI memiliki risiko 5%-15% untuk mengembangkan Tuberkulosis aktif. Metode skrining yang ada, seperti uji

pelepasan interferon- γ dan uji kulit tuberkulin, terutama digunakan untuk mendiagnosis infeksi Mtb berdasarkan respons pasien terhadap stimulasi antigenik Mtb. Namun, tes ini tidak dapat membedakan Tuberkulosis aktif dari LTBI, dan kedua tes memiliki akurasi yang lebih rendah pada pasien dengan gangguan kekebalan. Karena tidak ada tes yang ditemukan yang secara efektif membedakan LTBI dari Tuberkulosis aktif, maka perlu untuk mengidentifikasi biomarker yang diekspresikan secara berbeda antara kedua kondisi tersebut. Ulasan ini merangkum 39 miRNA yang terkait dengan LTBI dan Tuberkulosis (L. Wang et al., 2022).



Gambar 2.4. Ekspresi diferensial miRNA pada TB dan LTBI (Wang, 2022)

Gambar diferensial miRNA pada Tuberkulosis dan LTBI. MiRNA yang diekspresikan secara diferensial dibagi menjadi delapan kategori. MiRNA pada daerah a hanya meningkat pada pasien Tuberkulosis. MiRNA pada daerah b hanya menurun pada pasien Tuberkulosis. MiRNA pada daerah c menurun pada

Tuberkulosis dan LTBI. MiRNA pada daerah d menurun pada pasien dengan LTBI. MiRNA pada daerah e meningkat pada pasien dengan LTBI. MiRNA pada daerah f meningkat pada LTBI tetapi menurun pada Tuberkulosis. miRNA pada daerah g keduanya meningkat. MiRNA pada daerah h lebih tinggi pada Tuberkulosis, tetapi menurun pada LTBI. MiRNA pada daerah (C, F-H) harus difokuskan, dan miRNA pada daerah f dan h memiliki potensi yang lebih tinggi untuk biomarker (L. Wang et al., 2022).

Berdasarkan peningkatan dan penurunan regulasi miRNA pada LTBI dan TB dibagi menjadi delapan kategori. Sepuluh miRNA (miR-1246, miR-2110, miR-370-3p, miR-28-3p, miR-193b-5p, let-7b-5p, miR-30b-5p, miR-424, miR-365, dan 199a-3p) mengalami peningkatan regulasi hanya pada pasien TB. lima miRNA (miR-374a, miR-26a, miR-142-3p, miR-16-5p, dan miR-451a) mengalami penurunan regulasi hanya pada pasien Tuberkulosis. Ekspresi miR-424-5p dan miR-27a-3p menurun pada pasien dengan LTBI. Tingkat ekspresi yang tinggi dari lima miRNA (miR-450a-5p, miR-140-5p, miR-21, miR-377-5p, dan miR-3680-5p) diamati pada pasien dengan LTBI. MiRNA yang disebutkan di atas dan hanya mengalami upregulasi atau downregulasi pada pasien LTBI dan Tuberkulosis tidak dapat digunakan sebagai biomarker saja. Perhatian yang lebih besar harus diberikan pada miRNA yang berada di persimpangan ekspresi pada pasien dengan LTBI dan Tuberkulosis. Ekspresi miR-150 dan miR-146a menurun pada pasien dengan Tuberkulosis dan LTBI. Tentu saja, ada miRNA (miRNA 29a-3p, miR-361-5p, miR-196b, miR-451a, miR-340-5p, miR-199b-3p, miR-6856-3p, miR-16-5p, miR-374c-5p, miR-6886-3p, dan miR-378) yang ekspresinya meningkat pada pasien dengan Tuberkulosis dan LTBI. Jumlah miRNA dengan ekspresi tinggi pada LTBI dan Tuberkulosis lebih tinggi, yang mungkin disebabkan oleh respons imun host terhadap infeksi patogen. Selain itu, empat miRNA diekspresikan secara diferensial

pada pasien dengan Tuberkulosis dan LTBI. Let-7e-5p, let-7d-5p, dan miR-212-3p meningkat pada pasien dengan LTBI namun menurun pada pasien dengan Tuberkulosis. MiR-376c lebih tinggi pada pasien dengan Tuberkulosis, namun menurun pada pasien dengan LTBI (L. Wang et al., 2022).

Sebagai jenis biomarker baru, miRNA memiliki prospek aplikasi yang menjanjikan. MiRNA sangat stabil sebagai molekul RNA *non-coding* rantai pendek dengan hanya 22 nukleotida, miRNA sangat stabil dalam serum, plasma, urin, dan sampel lainnya. MiRNA mempertahankan stabilitas yang baik bahkan setelah penyimpanan yang lama dan siklus beku-cair. Properti ini menguntungkan untuk penggunaan miRNA sebagai biomarker potensial untuk penyakit klinis. Berbagai macam sumber miRNA tersedia. MiRNA dapat dengan mudah diperoleh dari sel, cairan ekstraseluler, dan cairan tubuh. Perubahan dalam ekspresi miRNA dapat diukur dengan cepat atas reaksi berantai polimerasi kuantitatif. MiRNA dapat berfungsi sebagai biomarker Tuberkulosis dalam berbagai cara. Metode deteksi Tuberkulosis yang umum digunakan dapat secara efektif mengidentifikasi pasien yang terinfeksi (L. Wang et al., 2022).

2. Interferon-Gamma Release Assays (IGRA)

Tes ini menggunakan sampel darah yang diambil dari pasien untuk mengukur pelepasan IFN- γ oleh sel T secara *in vitro* setelah stimulasi oleh antigen MTC tertentu. Dua IGRA telah dikembangkan: *QuantiFERON-TB*® (Oxford Immunotec, Oxford, Inggris). Kedua tes ini menggunakan target antigenik 6 yang disekresikan lebih awal (ESAT-6) dan protein filtrat kultur 10 (CFP10), yang dikodekan oleh gen yang terletak pada segmen region of difference 1 (RD-1) genom MTC. QFT juga mencakup antigen ketiga, TB7.7 (RD-11) (Muñoz et al., 2015).

QFT adalah uji berbasis *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yang dilakukan pada darah utuh. Uji ini mengukur kadar IFN- γ dalam supernatan

suspensi sel. Hasilnya diproses dengan mudah oleh perangkat lunak dan dilaporkan dalam satuan internasional per mL (IU/mL). T-SPOT TB adalah uji immunospot terkait enzim (ELISPOT) yang dilakukan pada limfosit T yang terpisah. Hasilnya dilaporkan sebagai jumlah sel T yang memproduksi IFN- γ (Muñoz et al., 2015).

IGRA merupakan uji darah lengkap yang dikembangkan dalam beberapa dekade terakhir untuk mendeteksi IFN- γ yang diproduksi *in vivo* oleh sel T yang tersensitisasi setelah stimulasi *in vitro* dengan antigen mikobakteri. Antigen mikobakteri yang digunakan dalam uji ini adalah target antigenik sekretori awal (ESAT-6) dan protein filtrat kultur 1-kDa (CFP-10). Antigen ESAT-6 dan CFP-10 dikodekan dalam wilayah diferensiasi 1 (RD1) yang ada dalam genom *Mycobacterium tuberculosis* dan *mycobacterium bovis* dan tidak ada dalam vaksin *Bacillus Calmette- Guérin* (BCG) dan sebagian besar mikobakteri lingkungan. Oleh karena itu, hasil IGRA tidak terpengaruh oleh vaksinasi BCG maupun paparan terhadap mikobakteri lingkungan (Carranza et al., 2020).

Sampai tahun 2015, hanya dua jenis pengujian yang tersedia secara komersial: QuantiFERON (QFT) dan QuantiFERON TB Gold dalam tabung (QFT-GIT), yang mengandung peptida panjang yang berasal dari ESAT-6 dan CFP-10 (TB 7.7, atau Rv2654c yang dikodekan oleh RD11 yang terdapat dalam QFT-GIT telah dihilangkan). QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus), pengujian generasi baru, sekarang mencakup peptida panjang yang berasal dari ESAT-6 dan CFP-10 (dirancang untuk menginduksi respons sel T CD4 spesifik) dan peptida yang lebih pendek dalam tabung tambahan, untuk menginduksi produksi IFN- γ oleh limfosit CD4 dan CD8. Dimasukkannya peptida untuk stimulasi sel T CD8 telah dilaporkan meningkatkan diskriminasi LTBI dari Tuberkulosis aktif. Secara umum, pemeriksaan QFT-Plus menunjukkan hubungan yang lebih kuat dengan peningkatan paparan *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan dengan QFT-GIT

pada orang dewasa dengan LTBI dan meskipun kedua pemeriksaan berkorelasi baik untuk diagnosis LTBI, QFT-Plus menunjukkan sensitivitas yang lebih tinggi dengan spesifisitas yang sama tanpa memandang usia subjek (Carranza et al., 2020).

3. Potensi miRNA sebagai Biomarker Tuberkulosis Laten

Tes yang tersedia saat ini tidak secara efektif membedakan antara LTBI dan Tuberkulosis aktif, biomarker dengan perbedaan ekspresi yang signifikan antara kedua kondisi tersebut akan sangat berguna. Beberapa penelitian tentang profil ekspresi miRNA dalam serum atau plasma atau dalam sel darah telah dilakukan dalam kohort yang mencakup subjek dengan LTBI bersamaan dengan infeksi Tuberkulosis aktif dan kontrol yang sehat. Dalam beberapa penelitian ini, tanda tangan miRNA yang signifikan diidentifikasi yang benar-benar dapat membedakan Tuberkulosis aktif dari LTBI. Sebuah studi tentang PBMC menggunakan *microarray* khusus miRNA untuk mendapatkan daftar pendek kandidat yang divalidasi oleh qRT-PCR 14 dari 23 Sel 2020, 9, 2160. Menariknya, lima miRNA (miR-424-5p, miR-365a-3p, miR-144-3p, miR-223-3p, dan miR-451a-5p) dengan ekspresi tinggi dalam PBMC diregulasi dalam Tuberkulosis aktif. LTBI, dengan prediksi target menunjukkan kemungkinan peran dalam hematopoiesis. Pengaturan eksperimental yang sama digunakan dalam penelitian lain yang mengidentifikasi ekspresi berlebih miR-194-5p, miR-21-5p, miR-29c-3p dan penurunan regulasi miR-150-5p pada kelompok Tuberkulosis aktif dibandingkan dengan LTBI dan HC. kelompok. Dengan menggunakan *qRT-PCR*, ekspresi berlebih miRNA 29a-3p dipastikan menjadi kandidat biomarker yang berharga untuk membedakan antara Tuberkulosis aktif dan LTBI dalam kelompok subjek dari Kamerun (Sinigaglia et al., 2020).

4. Relevansi Penelitian Sebelumnya

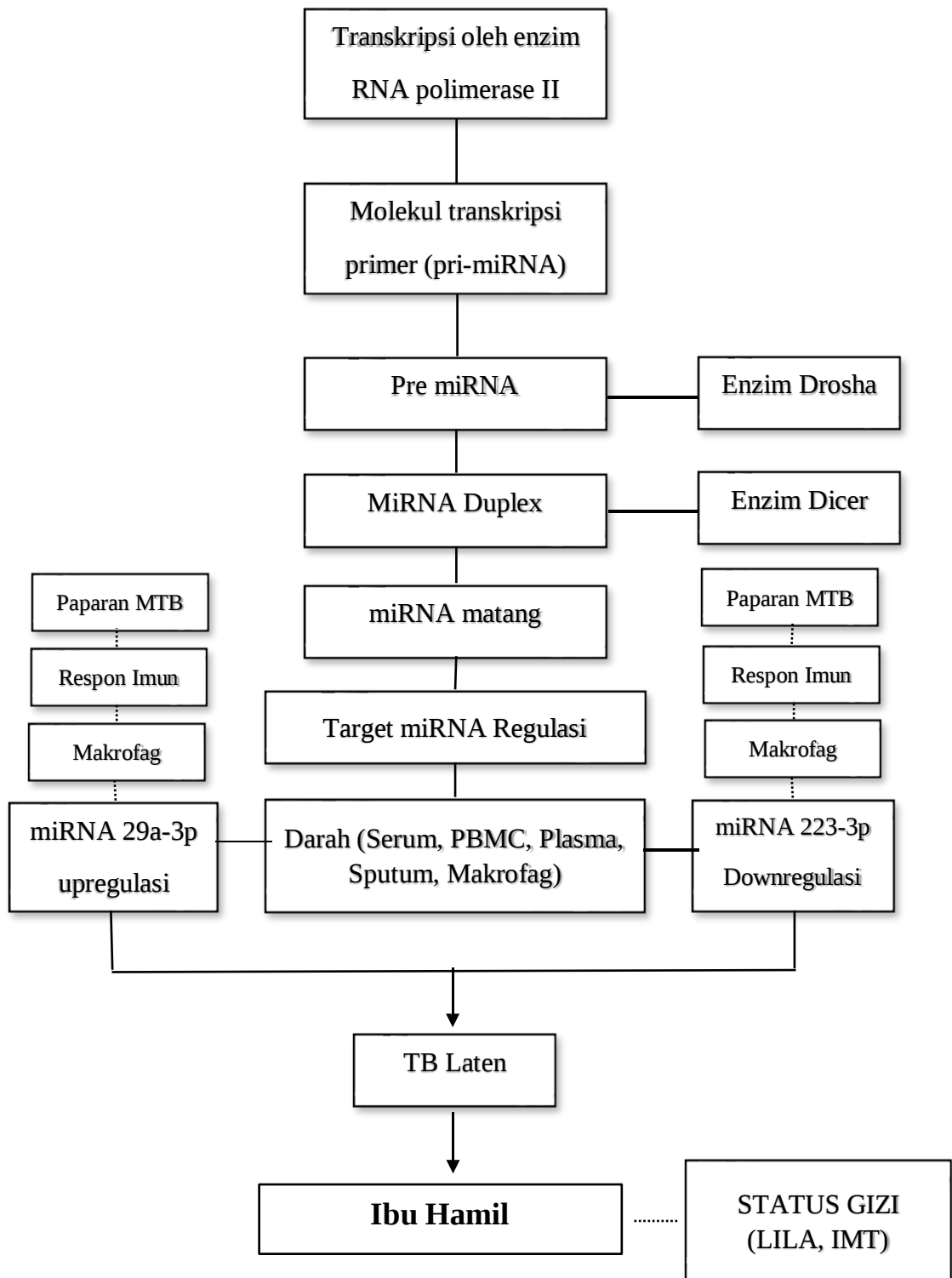
Tabel 2.4. Relevansi penelitian tentang miRNA 29a-3p dan miRNA 223-3p dalam Tuberkulosis

No	Kategori Kasus	Lokasi Penelitian	Sampel	Hasil Penelitian	Reference
1	84 ATB, 35 LTB, 43 Kontrol sehat	Cameroon	Plasma	MiRNA 29a-3p secara signifikan meningkat pada ATB dibandingkan dengan HEC sementara hsa-miRNA 29a-3p juga secara signifikan meningkat pada ATB dibandingkan dengan LTB (semua $P \leq 0,05$). miRNA 29a-3p menunjukkan kinerja pembeda yang baik (81,37%) dalam membedakan ATB dari HEC dan kinerja diagnostik yang ada dalam darah yang membedakan TB aktif dari TB laten dan kontrol sehat menunjukkan bahwa miRNA 29a-3p dapat menjadi biomarker yang berguna untuk diagnosis TB. karena miRNA ini ditemukan dalam darah (plasma) yang mudah dikumpulkan dibandingkan dengan dahak, miRNA ini dapat digunakan dalam kasus TB pediatrik dan extra paru.	(Ndzi et al., 2019b)

2	75 ATB, 55 HC	Tiongkok	Serum	Sejumlah miRNA diekspresikan secara berbeda selama infeksi Tuberkulosis paru aktif, dan miRNA 29a-3p yang beredar memiliki potensi besar untuk berfungsi sebagai penanda untuk mendeteksi infeksi Tuberkulosis paru aktif.	(Fu et al., 2011)
3	7 ATB, 7 LTBI, 7 HC	Taiwan	Serum	Antara LTBI dan TB, 172 gen dan 10 miRNA menunjukkan perbedaan ekspresi yang signifikan. LTBI memiliki tingkat ekspresi hsa-miRNA 223-3p yang lebih tinggi.	(Wu et al., 2014)
4	28 ATB, 24 HC	Tiongkok	PBMCs	MiRNA 29a-3p up regulated pada TB aktif	(ZHOU et al., 2016)
5	30 ATB, 30 HC	India	Plasma	Secara total, 30 anak dengan TB (60% laki-laki dan 40% perempuan) dan 30 (70% laki-laki dan 30% perempuan) HC direkrut untuk penelitian ini berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Usia rata-rata (IQR) kasus TB yang terdaftar adalah 8 (3,8–11), dengan 36,7% anak berusia di bawah lima tahun. Pada kelompok HC, usia rata-rata adalah 10 (7–12). Ditemukan peningkatan regulasi miR-21, miRNA 29a-	(M et al., 2020)

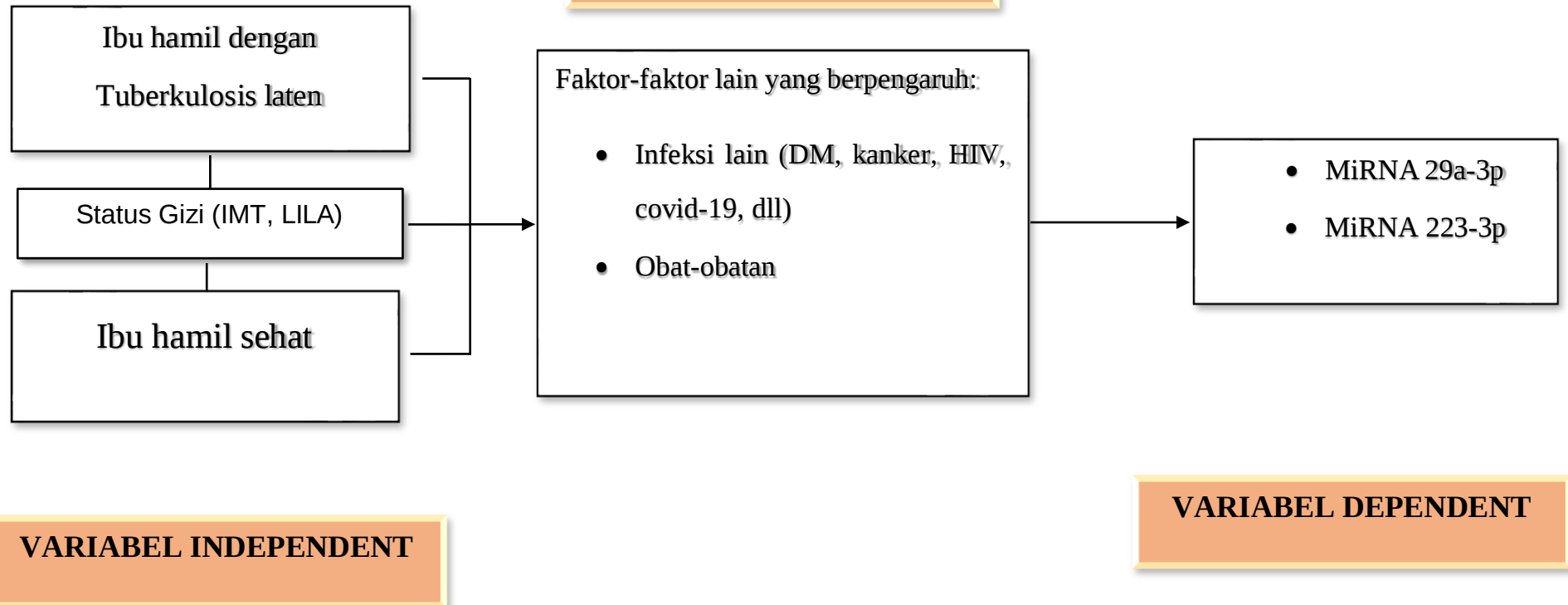
				3p, miR-31, miR-155, dan penurunan regulasi miR-146a yang signifikan pada anak-anak dengan TB aktif dibandingkan dengan HC.	
6	50 ATB, 33 LTBI, 30 HC	Makassar	Serum	Ekspresi miRNA 29a-3p meningkat pada pasien TB paru aktif dan TB paru laten. Selain itu, ekspresi miRNA 29a-3p lebih tinggi pada TB laten dibandingkan pada kelompok TB aktif dan kelompok kontrol sehat. Selain itu, miRNA 29a-3p merupakan biomarker potensial untuk mendiagnosis infeksi TB paru aktif dan laten. Namun, tidak ada korelasi signifikan antara kadar protein IFN- γ dan ekspresi miRNA 29a-3p.	(Angria, 2022)
7	37 ATB, 39 LTBI	Italia	Serum dan Sputum	MiRNA 223-3p diekspresikan secara melimpah pada Tuberkulosis aktif	(Dorhoi, 2013)

2.7. Kerangka Teori



2.8. Kerangka Konsep

VARIABEL CONFOUNDING



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan desain penelitian *cross-sectional* analitik. Sampel yang digunakan adalah ibu hamil penderita Tuberkulosis laten dan kontrol sehat yang diukur status gizinya.

3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical – Research Center) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar untuk pemeriksaan ekspresi miRNA. Pengambilan sampel dilakukan di Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat (BBKPM) Makassar, dan tujuh Puskesmas tertinggi kasus TB Paru Aktif di Kota Makassar yaitu Puskesmas Kaluku Bodoa, Puskesmas Barabaraya, Puskesmas Tamalate, Puskesmas Kassi-Kassi, Puskesmas Tamammaung, Puskesmas Malimongan Baru dan Puskesmas Jumpandang Baru.

Penelitian dilakukan selama 15 bulan periode November 2024 – Januari 2026, meliputi pengambilan sampel, pemeriksaan penunjang dan pengambilan spesimen di Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat (BBKPM) Makassar dan Pusekesmas di Kota Makassar, serta pemeriksaan IGRA dan ekspresi miRNA di Laboratorium *Hasanuddin University Medical-Research Center* (HUM- RC) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Penelitian dilaksanakan mulai bulan November 2024 sampai jumlah sampel yang memenuhi kriteria tercapai.

3.3. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah ibu hamil dengan Tuberkulosis laten dan hubungan dengan status gizi di Makassar yang melakukan pemeriksaan di Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat (BBKPM) Makassar dan Pusekesmas di Kota Makassar.

2. Sampel

Sampel merupakan subyek penelitian dari populasi yang memenuhi “kriteria inklusi dan kriteria eksklusi”. Sampel yang dibutuhkan yaitu sampel sputum dan sampel darah pada ibu hamil dengan riwayat kontak dengan penderita Tuberkulosis dengan mengukur status gizinya dan sampel untuk kontrol orang sehat.

3. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Inklusi

1) Kontak serumah (Tuberkulosis paru laten)

- a) Ibu hamil yang tinggal serumah dengan penderita Tuberkulosis aktif (keluarga dekat) minimal 2 minggu dan diukur status gizinya.
- b) Tidak menunjukkan adanya gejala Tuberkulosis aktif
- c) Uji IGRA menunjukkan hasil yang positif
- d) Bersedia menjadi subjek penelitian dan menandatangani *informed consent*

2) Kontak Sehat

- a) Tidak menunjukkan adanya gejala Tuberkulosis aktif
- b) Uji IGRA menunjukkan hasil negatif
- c) Bersedia menjadi subjek penelitian dan menandatangani informed consent

b. Eksklusi

- 1) Tidak menunjukkan adanya gejala Tuberkulosis aktif, dengan riwayat Tuberkulosis sebelumnya
- 2) Ibu hamil yang memiliki penyerta seperti diabetes melitus, kanker

4. Perkiraan Besar Sampel

Rumus Sampel Proporsi (Cross-Sectional)

Besar sampel yang diperlukan untuk pengujian dua sisi diperoleh dengan rumus (Lemeshow, 1998) sebagai berikut :

$$n = \frac{\sigma^2(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2}{(\mu_0 - \mu_a)^2}$$

$$n = \frac{9.77^2(1.96 + 1.28)^2}{(8.69 - 0.83)^2}$$

$$n = 17$$

Berdasarkan hasil penelitian Nirmawati Angria, et al (2022) maka :

- a. Tingkat kesalahan tipe I dan arah kesalahan tipe I

Kesalahan tipe I (α) yang digunakan sebesar 0,05 atau 5% dengan arah kesalahan tipe I (α) dua arah (*two sided*) sehingga nilai Z sebesar 1.96

- b. Tingkat kesalahan tipe II dan arah kesalahan tipe II

Kesalahan tipe II = $\beta = 0,10 \rightarrow$ power 90% dengan arah kesalahan tipe I (β) satu arah (*one sided*) sehingga nilai Z sebesar 1.28

- c. Nilai mean

Nilai mean miRNA 29a-3p pada pasien TB Aktif sebesar 8.69 sedangkan pada pasien sehat sebesar 0.83.

Berdasarkan jumlah sampel minimal yang diperoleh sebesar 17 sampel per kategori.

Metode pengambilan sampel

Pengambilan sampel ini dilakukan dengan *purposive sampling* atau *convenience sampling* sampai jumlah sampel terpenuhi.

3.4. Definisi Operasional Variabel

1. Ibu hamil yang diukur status gizinya adalah ibu hamil dengan kekurangan Energi Kronik LILA $\leq 23,5$ cm , Normal LILA $\geq 23,5$ cm dan IMT normal $18,5-24,9$ kg/m², underweight $< 18,5$ kg/m², overweight $25 - 29,9$ kg/m², obesitas ≥ 30 kg/m².
2. Penderita Tuberkulosis laten yaitu keadaan asimtomatik dengan karakteristik adanya respon sel T spesifik *Mycobacterium tuberculosis*, tidak ada manifestasi klinis Tuberkulosis paru atau ekstra paru, dan tidak ada bukti sembuh dari sakit Tuberkulosis. Penderita laten biasanya adalah seorang tinggal serumah dengan penderita Tuberkulosis aktif (keluarga dekat), tidak menunjukkan adanya gejala Tuberkulosis aktif, dan uji IGRA menunjukkan hasil yang positif.
3. miRNA adalah *single stranded noncoding* RNA dengan panjang 19-25 nukleotida yang berfungsi dalam regulasi ekspresi gen dengan menghambat peran (men-downregulasi) gen sasarannya pada tahap pasca transkripsi dari ekspresi gen.

3.5. Prosedur Penelitian

1. Langkah-langkah dalam pelaksanaan penelitian
 - a. Semua kasus TB yang memenuhi syarat di Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat (BBKPM) Makassar, dan tujuh Puskesmas tertinggi kasus TB Paru Aktif di Kota Makassar yaitu Puskesmas Kaluku Bodoa, Puskesmas Barabaraya, Puskesmas Tamalate, Puskesmas Kassi-Kassi, Puskesmas Tamammaung, Puskesmas Malimongan Baru dan Puskesmas Jumpandang Baru, kemudian penderita tersebut diminta kesediaannya untuk menandatangani informed consent untuk ikut serta dalam bagian studi ini dan diminta izinnya untuk berkunjung ke rumahnya di mana anggota keluarga yang tinggal bersama dengan penderita TB yang sementara hamil dengan kekurangan energi kronik akan diminta kesediaannya secara tertulis untuk berpartisipasi sebagai subjek penelitian.
 - b. Subjek penelitian di wawancarai dengan kuesioner yang telah terstandarisasi

- c. Sampel darah vena diambil sebanyak 5-10 ml untuk pemeriksaan IFN- γ dengan metode QuantiFERON-TB Gold In-Tube dan pemeriksaan ekspresi MiRNA di laboratorium.

Prosedur IGRA TB *Gold Plus* (QIAGEN)

1) Pengambilan sampel darah

Darah vena diambil langsung ke 4 tabung QFT-Plus: Nil, TB1, TB2, dan Mitogen masing-masing 1 mL (rentang tervalidasi umumnya 0,8–1,2 mL sesuai penanda pada tabung). Setelah terisi, tabung dikocok kuat 10 kali hingga seluruh permukaan bagian dalam tabung terlapisi darah untuk melarutkan antigen pada dinding tabung.

2) Inkubasi stimulasi antigen

Tabung diinkubasi pada 37°C selama 16–24 jam, dan inkubasi harus dimulai maksimal dalam 16 jam setelah pengambilan darah. Inkubator tidak memerlukan CO₂ atau humidifikasi.

3) Panen plasma

Setelah inkubasi, tabung di sentrifugasi untuk memisahkan plasma (mis. 2000–3000 RCF selama 5–15 menit), kemudian plasma dipanen tanpa mengganggu lapisan sel/gel. Plasma dapat segera diuji atau disimpan sesuai kebijakan laboratorium (misalnya pembekuan untuk penyimpanan lebih lama).

4) Pengukuran IFN- γ dengan ELISA (QFT-Plus ELISA)

Pengukuran IFN- γ dilakukan menggunakan QuantiFERON-TB *Gold Plus* ELISA sesuai petunjuk kit: sampel plasma dan standar ditambahkan ke plate, diinkubasi (termasuk tahap konjugat ~120 menit suhu ruang), kemudian plate dicuci ≥ 6 kali (contoh: 400 μ L/well), dilanjutkan penambahan substrat 100 μ L/well dan inkubasi ~30 menit suhu ruang. Reaksi dihentikan dengan *stop solution* 50 μ L/well, lalu densitas optik dibaca pada 450 nm dengan filter referensi 620–650 nm.

5) Perhitungan dan interpretasi hasil

Kadar IFN- γ (IU/mL) dihitung dari kurva standar. Nilai respons antigen ditentukan dengan mengurangkan Nil (TB1–Nil dan TB2–Nil) serta mengevaluasi kontrol Mitogen. Interpretasi (positif/negatif/indeterminate) mengikuti kriteria pabrikan pada instruksi penggunaan QFT-Plus.

1.1. Prosedur Kerja

1. Ekstraksi RNA dari sampel darah

Total RNA diekstraksi dan dimurnikan dari sampel plasma darah menggunakan QIAamp RNA *Blood Mini* Kit (Qiagen; Massachusetts, USA), sesuai dengan instruksi pabrik.

Step 1. Lisis sel :

Ditambahkan 400 μ L RB Buffer dan 4 μ L β -mercaptoethanol lalu diinkubasi selama 3 menit pada suhu ruang. Pasang filter column dengan *collection tube* 2 mL. Seluruh campuran dipindahkan ke dalam *filter column* kemudian *dicentrifuge* 1.000 xg selama 30 detik. Secara hati-hati *filter column* dipindahkan kedalam tabung *effendorf* 1.5 mL yang baru.

Step 2. RNA *Binding* :

Ditambahkan 400 μ L etanol 70% yang dipreparasi dengan ddH₂O ke dalam tabung lalu pindahkan seluruh campuran ke dalam RB column (pasang RB column dengan *collection tube* 2 mL terlebih dahulu). Sentrifuge 14-16.000 x g selama 1 menit lalu supernatant dibuang dan pasang kembali RB column.

Step 3. *Wash* :

Sebanyak 400 μ L W1 Buffer ditambahkan ke dalam RB *Column* lalu di sentrifugasi 14-16.000 x g selama 1 menit, buang dan pasang kembali RB *Column* kemudian ditambahkan 600 μ L *Wash Buffer* (Pastikan *Wash Buffer* sudah di tambah Ethanol) ke dalam RB column. Sentrifuge 14-16.000 xg selama 30 detik lalu buang dan pasang kembali RB *column*.

Sebanyak 600 μ L *Wash Buffer* ditambahkan kedalam RB *Column* kemudian *dentrifuge* 14-16.000 xg selama 30 detik. Buang dan pasang kembali RB *column* lalu *disentrifuge* kembali 14-16.000 xg selama 3 menit untuk mengeringkan *matrix column*

Step 4. RNA *Elution* :

RB *Column* di pindahkan kedalam *tube effendorf* 1.5 mL baru (steril) selanjutnya ditambahkan 50 μ L RNase *free water* (untuk meningkatkan konsentrasi RNA, inkubasi pada suhu ruang selama menit) lalu *disentrifuge* 14-16.000 xg selama 1 menit.

2. Amplifikasi *complementary* DNA (cDNA) dengan Reverse Transcriptase-PCR

Semua reaksi disiapkan di atas es untuk meminimalkan degradasi RNA. dNTP sudah termasuk di dalam kit sehingga tidak perlu penambahan dNTP tambahan. RT primer sudah terdapat dalam 5× *miRCURY RT Reaction Buffer*, sedangkan 10× *miRCURY RT Enzyme Mix* mengandung *poly(A) polymerase* dan *reverse transcriptase*.

a) Persiapan bahan

- 1) Cairkan (*thaw*) *template* RNA dan 5× *miRCURY RT Reaction Buffer* di atas es; *RNase-free water* pada suhu ruang. Ambil 10× *miRCURY RT Enzyme Mix* tepat sebelum digunakan, lalu campur dengan *flicking* dan spin singkat, kemudian simpan kembali di atas es.
- 2) (Opsional kontrol internal) Larutkan UniSp6 RNA *spike-in* dengan menambahkan 80 µL *nuclease-free water*, *vortex* dan *spin*; inkubasi 20–30 menit di atas es hingga larut sempurna, lalu *aliquot* dan simpan pada –30 s/d –15°C.
- 3) Sesuaikan konsentrasi RNA menjadi 5 ng/µL. Untuk RNA dari serum/plasma, gunakan jumlah *eluate* yang *ekuivalen* dengan RNA dari 16 µL sampel per reaksi RT 20 µL (sesuai petunjuk kit).

b) Mix RT-PCR

Siapkan master mix RT di atas es (disarankan volume 10% lebih untuk mengompensasi kehilangan pipet), distribusikan ke tiap tabung PCR (200 µL), kemudian tambahkan RNA sampel.

Komposisi reaksi RT total 10 µL (umum untuk assay/Pick-&-Mix <100 miRNA):

- 5× *miRCURY RT Reaction Buffer*: 2.0 µL
- *RNase-free water*: 4.5 µL
- 10× *miRCURY RT Enzyme Mix*: 1.0 µL
- *Synthetic RNA spike-ins* (opsional): 0.5 µL
- *Template* RNA (5 ng/µL): 2.0 µL

Total volume: 10 μ L

c) Kondisi inkubasi RT (PCR cycler)

- 42°C selama 60 menit (*reverse transcription*)
- 95°C selama 5 menit (*inaktivasi enzim RT*)
- Hold 4°C (penyimpanan sementara)

HB-2424-001-1107848 LL miRCURY ...

Setelah selesai, reaksi segera didinginkan ke 4°C. Jika tidak langsung digunakan, simpan di 4°C (jangka pendek) atau –30 s/d –15°C (jangka panjang).

d) Lanjutan ke qPCR untuk pemeriksaan *miRNA*

Tempatkan hasil RT di atas es dan lanjutkan ke real-time PCR. Rekomendasi kit untuk qPCR adalah miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit, dan pengenceran cDNA mengikuti pedoman handbook sesuai aplikasi downstream.

3. Kuantifikasi *miRNA-29a* dan *miRNA 223-3p*

Lakukan qPCR terpisah untuk masing-masing target (miR-29a dan miR-223-3p) menggunakan *assay primer mix* yang sesuai dari miRCURY LNA miRNA PCR Assay. Amplifikasi dilakukan dengan kit komersial dari Qiagen, yaitu miRCURY LNA miRNA PCR assay GeneGlobe untuk miRNA-29a-3p dan miRNA-223-3p. Primer yang digunakan untuk miRNA-29a-3p memiliki sekuens UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA. sementara primer untuk miRNA-223-3p menggunakan sekuens UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA.

4. Persiapan assay dan *template*

- a) Resuspensi primer assay (masing-masing assay miR-29a dan miR-223-3p): sentrifugasi vial, tambahkan 220 μ L *nuclease-free water*, inkubasi 20 menit suhu ruang, *vortex* dan *spin* singkat.
- b) Pengenceran cDNA: encerkan hasil RT 1:60 dengan menambahkan 590 μ L RNase-free water ke 10 μ L reaksi RT tepat sebelum qPCR (tidak disarankan menyimpan cDNA yang sudah diencerkan 1:60).

5. Campuran reaksi qPCR (total 10 µL per well)

Untuk setiap well (per target, per sampel):

- *2× miRCURY SYBR Green Master Mix*: 5 µL
- *ROX Reference Dye*: opsional (hanya untuk instrumen ABI; konsentrasi ROX disesuaikan kebutuhan alat)
- *Resuspended PCR primer mix* (assay miR-29a atau miR-223-3p): 1 µL
- *cDNA template*: 3 µL (dari cDNA 1:60)
- *RNase-free water*: 1 µL (sesuaikan bila menambahkan ROX)

Setelah dispensi, spin singkat plate/tube pada suhu ruang.

6. Kondisi siklus qPCR

- a) Aktivasi awal: 95°C 2 menit
- b) 40 siklus:
 - Denaturasi: 95°C 10 detik
 - Annealing/extension: 56°C 60 detik (akuisisi fluoresensi pada langkah ini)
- c) Melting curve: 60–95°C

Tingkat ekspresi diketahui melalui munculnya sinyal ampikon pada grafik. Sinyal yang terdeteksi pada jumlah siklus yang kecil menunjukkan tingkat ekspresi yang makin tinggi. Setelah proses amplifikasi diperoleh kurva disosiasi yang kemudian dianalisis ekspresi relatifnya dengan menggunakan metode yang membandingkan target Ct dengan nilai referensi yang dipilih, dengan perhitungan: $\Delta Ct = Ct \text{ target} - Ct \text{ kontrol}$.

Bila nilai ΔCt memiliki nilai positif maka nilai Ct target daripada nilai *housekeeping* (+ ΔCt) dan sebaliknya nilai negative bila Ct target lebih rendah daripada *housekeeping* (- ΔCt). Kemudian perbandingan level ekspresi diperoleh dengan menggunakan rumus: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.6. Analisis Data

Hasil yang diperoleh diolah menggunakan metode statistik untuk analisis data miRNA yaitu menggunakan analisis perbandingan, untuk perbandingan dua kelompok atau kategori menggunakan uji t independen jika data terdistribusi normal atau uji *Mann Whitney* jika data tidak terdistribusi normal. Sedangkan untuk perbandingan antar kelompok skala kategori menggunakan uji *Chi Square*.

Uji diagnostik dilakukan untuk menilai kemampuan ekspresi miRNA 223-3p dan miRNA 29a-3p dalam membedakan subjek dengan Tuberkulosis laten (TB laten) dan kontrol sehat. Analisis dilakukan menggunakan metode *Receiver Operating Characteristic* (ROC). Kurva ROC dibentuk dengan memplot sensitivitas terhadap 1–spesifisitas pada berbagai nilai ambang (*cut-off*) ekspresi miRNA. Nilai *Area Under the Curve* (AUC) digunakan untuk menilai kemampuan diskriminatif masing-masing biomarker. Nilai *cut-off* optimal untuk miRNA 223-3p dan miRNA 29a-3p ditentukan menggunakan indeks Youden, yaitu nilai yang memaksimalkan jumlah sensitivitas dan spesifisitas. Selanjutnya dihitung parameter diagnostik berupa sensitivitas, spesifisitas, nilai prediktif positif (PPV), dan nilai prediktif negatif (NPV) pada *cut-off* tersebut.

Uji Normalitas menggunakan Shapiro Wilk karena sampel < 50 . Nilai p kurang dari atau sama dengan 0,05 dianggap signifikan dalam semua analisis (Ndzi, 2019).

3.7. Etika Penelitian

Ethical Clearance penelitian ini diajukan ke komite Etik Penelitian Universitas Hasanuddin Makassar.

Penelitian ini menggunakan *ethical clearance* yang dikeluarkan oleh Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Sebelum dilakukan wawancara dan pengambilan darah terlebih dahulu meminta persetujuan (*informed consent*) pada ibu hamil. Bila responden setuju ikut berpartisipasi dalam penelitian, responden diminta membaca dan menandatangani *informed consent*.

Keuntungan dan kerugian mengikuti penelitian ini dijelaskan kepada ibu hamil oleh peneliti dan asisten penelitian. Semua informasi dan data dalam penelitian ini hanya dipakai untuk keperluan ilmiah dan identitas subjek penelitian dijaga kerahasiaannya. Penelitian ini mendapatkan ijin etik dengan nomor 1042/un4.6.4.5.31/PP36/2024.

3.8. Alur Penelitian

