

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis paru adalah penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, terutama menyerang paru-paru namun dapat menyebar ke organ lain melalui aliran darah, ditularkan melalui inhalasi aerosol, dan secara epidemiologis memiliki risiko tinggi pada populasi padat dan kontak erat, dengan keterlibatan *miRNA-146a-5p* yang menekan respons imun inang dan memungkinkan bakteri bertahan di dalam sel imun. (Chakrabarty et al., 2019; Li et al., 2016; Buha et al., 2022)

M. tuberculosis terutama ditularkan melalui inhalasi aerosol, yang dihasilkan saat batuk, bersin, berbicara pada penderita yang terinfeksi. Droplet nuclei, dapat tetap tersuspensi di udara selama beberapa jam dan mudah terhirup dan menginfeksi (Sastry and Bhat, 2021; CDC, 2023). Terdapat dua kondisi yang berhubungan dengan TB: infeksi TB laten (LTBI) dan penyakit TB. Jika tidak diobati dengan baik, penyakit TB bisa berakibat fatal. Sekitar 5–10% orang yang terinfeksi TB pada akhirnya akan menunjukkan gejala dan terjangkit penyakit TB (WHO, 2023; CDC 2023).

Pada tahun 2023, diperkirakan 10,8 juta orang terjangkit tuberkulosis (TB) di seluruh dunia. TB terdapat di semua negara dan kelompok umur (WHO, 2024). Hampir seperempat penduduk dunia terinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*, dan merupakan salah satu dari 20 penyebab utama kematian di seluruh dunia, terutama di empat negara, yaitu India, Indonesia, Myanmar, dan Filipina. Jumlah kematian akibat TB (HIV negatif) secara global pada tahun 2023 sebesar 1,1 juta. Indonesia merupakan negara peringkat ke-2 penderita TB tertinggi di dunia setelah India dengan proporsi kasus baru sebesar 14%. Adapun estimasi angka insiden TB di Indonesia pada tahun 2023 sebesar 394 per 100.000 penduduk. (Kemenkes RI, 2023).

Orang dengan infeksi TB laten tidak merasakan gejala sakit dan tidak menularkan. Berbeda dengan infeksi TB, ketika seseorang terkena penyakit TB, ia akan merasakan gejalanya. Meski begitu, pengobatan terhadap infeksi TB laten juga tetap perlu untuk mencegah berkembang jadi penyakit TB. Hanya sebagian kecil orang yang tertular TB yang akan terkena penyakit dan gejala TB (CDC,

2023; WHO, 2023). Selain virulensi bakteri, latar belakang genetik dan kekebalan tubuh memainkan peran utama dalam menentukan manifestasi klinis dan hasil akhir penyakit. Oleh karena itu, berbagai metode digunakan untuk diagnosis TB seperti radiologi, *smear* sputum, identifikasi kultur, histopatologi, tes kulit tuberkulin (TST), tes serologis, seluruh metode ini memiliki keterbatasan. Saat ini perlu pengembangan uji diagnostik menggunakan biomarker inang yang dapat digunakan untuk penilaian status penyakit dan pemantauan hasil pengobatan (Wallis et al. 2010).

Tantangan utama pengembangan biomarker ideal adalah memastikannya sebagai molekul yang stabil, banyak terdapat dalam cairan tubuh, dengan mudah diperoleh kembali, menawarkan sensitivitas dan spesifisitas tinggi dengan potensi translasi sebagai uji titik perawatan. Terkini, peran microRNAs (miRNAs) dalam sistem kekebalan tubuh telah diperbincangkan (Treiber et al, 2019). Ditemukan bahwa miRNA bertindak sebagai pengatur reaksi awal terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada imunitas bawaan, juga dalam proses adaptasi sel imun inang selama perjalanan infeksi laten TB (Li et al, 2016; Alipoor et al, 2020; Buha et al, 2022). Banyak bukti menunjukkan miRNA terlibat dalam pengembangan dan diferensiasi sel imun dan fungsi imunologisnya dalam sistem imun bawaan dan didapat (Mehta dan baltimore, 2016). Tingkat sirkulasi miRNA dianggap sebagai biomarker potensial untuk diagnosis atau prognosis TB (Sampath et al, 2021).

miRNA adalah kelas RNA endogen, kecil, non-coding yang terdiri dari sekitar 20~25 nukleotida, dan merupakan modulator ekspresi gen yang kuat dengan mengikat ujung 3' yang belum diterjemahkan (UTR) dari sekuens target mRNA dan mengatur ekspresi pasca-transkripsi (Treiber et al., 2019). Wang et al mengidentifikasi 17 miRNA yang diekspresikan secara berbeda pada TB aktif dan LTBI (Wang et al, 2011). *miRNA-146a-5p* diketahui terdapat dalam sputum, darah, serum, plasma, dan cairan tubuh lainnya, yang memungkinkan pemanfaatannya sebagai biomarker diagnostik dan prognostik noninvasif untuk sejumlah besar penyakit baik itu penyakit kanker, penyakit autoimun dan penyakit menular, termasuk penyakit TB (Sinigaglia et al, 2020 ; Condrat et al, 2020). Meski demikian, studi lain justru melaporkan bahwa pada fase akut kasus TB aktif, *miRNA-146a-5p* mengalami penurunan regulasi, yang mendukung anggapan bahwa *miRNA-146a-5p* terlibat dalam penurunan regulasi respon imun yang berlebihan dan membatasi tingkat ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-

1 β dan IL-6 pada kasus TB (Kathirvel et al, 2020). Hasil yang belum konklusif ini mendorong peneliti untuk melakukan penelitian yang membandingkan ekspresi *miRNA-146a-5p* pada penderita TB aktif dan kontak serumah. Terlebih lagi, penelitian serupa belum pernah dilakukan di Indonesia, sementara Indonesia merupakan salah satu negara dengan penderita TB terbanyak kedua di dunia (Noviyani et al, 2021). Maka pada studi ini, peneliti ingin mengetahui akurasi molekul spesifik *miRNA-146a-5p* sebagai biomarker baru dalam mendiagnosis kasus TB dengan melakukan penelitian “Perbandingan Ekspresi *miRNA-146a-5p* Pada Penderita TB Dengan Tuberkulosis Laten Yang Kontak Serumah.

1.2 Rumusan Masalah

Metode diagnosis tuberkulosis yang ada saat ini masih memiliki keterbatasan, baik dari segi sensitivitas maupun spesifisitas. Sebagian besar individu yang terinfeksi tidak langsung menunjukkan gejala aktif, melainkan mengalami infeksi laten, yang menunjukkan pentingnya peran sistem imun dalam menahan perkembangan penyakit. Seiring dengan kemajuan ilmu biomedis, *microRNA* (miRNA) mulai diteliti sebagai kandidat biomarker baru dalam diagnosis tuberkulosis. Salah satu yang menonjol adalah *miRNA-146a-5p*, yang diketahui diekspresikan secara khusus dalam sel-sel imun dan berperan dalam regulasi respons imun bawaan. Molekul ini juga dilaporkan berkontribusi dalam mekanisme kelangsungan hidup *Mycobacterium tuberculosis* di dalam sel inang ; maka pada studi ini.

” Berdasarkan hal tersebut di atas, maka rumusan penelitian ini adalah :
”Apakah terdapat perbedaan ekspresi *miRNA-146a-5p* penderita tuberkulosis (TB) paru aktif, dengan tuberkulosis laten yang kontak serumah?”

1.3 Pertanyaan Penelitian

- 1.3.1. Bagaimanakah ekspresi *miRNA-146a-5p* pada penderita tuberkulosis (TB) paru aktif?
- 1.3.2. Bagaimanakah ekspresi *miRNA-146a-5p* pada tuberkulosis laten yang kontak serumah penderita TB paru aktif?
- 1.3.3. Bagaimanakah perbandingan ekspresi *miRNA-146a-5p* antara penderita tuberkulosis (TB) paru aktif dengan tuberkulosis laten yang kontak serumah?

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Untuk mempelajari tentang perbandingan ekspresi *miRNA-146a-5p* antara penderita tuberkulosis (TB) paru aktif dengan tuberkulosis laten yang kontak serumah.

1.4.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mempelajari tentang ekspresi *miRNA-146a-5p* pada penderita tuberkulosis (TB) paru aktif.
2. Untuk mempelajari tentang ekspresi *miRNA-146a-5p* pada tuberkulosis laten yang kontak serumah penderita TB.
3. Untuk mempelajari tentang perbedaan ekspresi *miRNA-146a-5p* antara penderita tuberkulosis (TB) paru aktif dengan tuberkulosis laten yang kontak serumah penderita TB paru aktif.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Akademik

Hasil Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan acuan untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan penelitian selanjutnya terkait biomarker terbaru yang diekspresikan pada penderita TB. Hasil Penelitian ini diharapkan dapat memberikan data epidemiologi molekuler terkait biomarker yang diekspresikan oleh penderita TB.

1.5.2. Manfaat untuk Pelayanan Kesehatan

Hasil Penelitian ini dapat memberikan informasi terkait bakal modalitas diagnostik TB terbaru dengan pendekatan biomarker *miRNA*.

1.5.3 Manfaat untuk Peneliti

Penelitian ini meningkatkan wawasan ilmiah, keterampilan teknik laboratorium dan pengalaman meneliti serta menulis bagi peneliti. Hasil penelitian ini bisa dijadikan rujukan untuk penelitian selanjutnya oleh peneliti lain.

1.6 Ruang Lingkup

Ruang lingkup penelitian ini adalah membandingkan ekspresi *miRNA-146a-5p* pada penderita yang terdiagnosis TB dan TB laten orang yang kontak serumah

dengan penderita TB di Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical-Research Center) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

1.7 Keterbaruan Penelitian

Penelitian mengenai topik serupa belum pernah dilakukan di Indonesia. Belum ada penelitian mengenai ekspresi *miRNA-146a-5p* pada penderita tuberkulosis di Indonesia yang pernah dilakukan sebelumnya. Selain menilai ekspresinya pada penderita TB, peneliti juga menilai ekspresinya pada tuberkulosis laten yang kontak serumah dengan penderita TB, sehingga dapat dibandingkan perbedaan ekspresi *miRNA-146a-5p* pada penderita TB dan tuberkulosis laten yang kontak serumah.

1.8 Definisi Operasional

1.8.1 Spesimen Plasma Darah

Definisi Konseptual:

Sampel Plasma darah pada penelitian ini adalah plasma darah tersimpan sebagai bekuan di Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical-Research Center) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar yang dikumpulkan pada periode April 2020 – Desember 2021 yang berasal dari darah penderita tuberkulosis (TB) dan individu kontak serumah penderita TB.

Kriteria Objektif plasma darah:

1. Plasma darah penderita TB pada penelitian ini adalah plasma darah tersimpan sebagai bekuan di Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical-Research Center) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar yang dikumpulkan pada periode April 2020 – Desember 2021 yang berasal dari darah penderita tuberkulosis (TB).
2. Plasma darah tuberkulosis laten yang kontak serumah penderita TB adalah plasma darah tersimpan sebagai bekuan di Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical-Research Center) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar yang dikumpulkan pada periode April 2020 – Desember 2021 yang berasal dari darah tuberkulosis laten yang kontak serumah penderita tuberkulosis (TB).

Ekspresi miRNA-146a-5p

Ekspresi *miRNA-146a-5p* adalah sekuens spesifik *miRNA-146a-5p* yang terdapat pada cDNA yang mengalami amplifikasi pada fragmen yang dibatasi sepasang Primer spesifik *miRNA-146a-5p* yaitu Primer Forward: 5'-CAGTGCGTGTCGTGGAGT-3', dan primer Reverse: 5'-GGGTGAGAACTGAATTCCA-3' dengan panjang: 158 bp. Amplifikasi dilakukan dengan kit microRNA RT PCR universal (mengikuti rekomendasi pabrik). Hasil amplifikasi dideteksi secara real-time dan dilaporkan sebagai *cycle threshold*. Kriteria Objektif ekspresi *miRNA-146a-5p* adalah Down regulasi <1 dan Up regulasi >1

BAB II

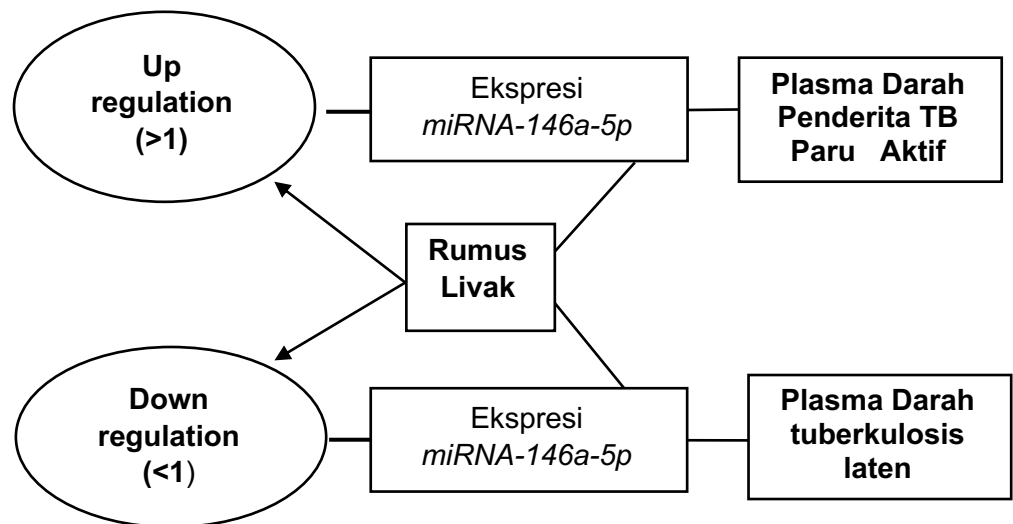
METODE PENELITIAN

2.1 Metode Penelitian

2.1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang menggunakan desain deskriptif analitik dengan pendekatan *cross sectional* yang bertujuan untuk mempelajari tentang perbandingan ekspresi *miRNA-146a-5p* antara penderita tuberkulosis aktif dan tuberkulosis laten yang kontak serumah.

2.1.2 Desain Penelitian



Gambar 2.1. Desain Penelitian

2.2 Waktu dan Tempat Penelitian

2.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 3 bulan (dari awal bulan Juni 2024 sampai dengan akhir Agustus 2024) dimulai setelah mendapat rekomendasi etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, dan izin penelitian dari Direktur RS Universitas Hasanuddin Makassar.

2.2.2 Tempat Penelitian

Pemilihan plasma darah tersimpan pada suhu -80°C dilakukan di Laboratorium *Hasanuddin University Medical-Research Center* (HUM-RC) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

Prosedur pemeriksaan ekspresi *miRNA-146a-5p* pada plasma darah penderita TB dan tuberkulosis laten yang kontak serumah penderita TB dilaksanakan di Laboratorium *Hasanuddin University Medical-Research Center* (HUM-RC) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

2.3 Populasi dan Subyek Penelitian

2.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah semua plasma darah tersimpan pada suhu -80°C sebagai bekuan di Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical-Research Center) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar yang dikumpulkan pada periode April 2020 – Desember 2021 yang berasal dari darah penderita tuberkulosis TB dan tuberkulosis laten yang kontak serumah, yang diperoleh dari Laboratorium Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat (BBKPM) Makassar.

2.3.2 Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah semua plasma darah tersimpan pada suhu -80°C sebagai bekuan di Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical-Research Center) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar yang dikumpulkan pada periode April 2020 – Desember 2021 yang berasal dari darah penderita tuberkulosis TB dan tuberkulosis laten yang kontak serumah, yang diperoleh dari Laboratorium Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat (BBKPM) Makassar, yang memenuhi kriteria subyek penelitian.

2.4 Kriteria Subyek Penelitian

2.4.1 Kriteria Inklusi Subyek Penelitian

1. Plasma darah tersimpan pada suhu -80°C sebagai bekuan di Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical-Research Center) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar, yang diperoleh dari Laboratorium Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat (BBKPM) Makassar .
2. Plasma darah tersimpan berasal dari darah penderita TB dan tuberkulosis laten yang kontak serumah
3. Plasma darah tersimpan dikumpulkan dalam kurun waktu April 2020 – Desember 2021.
4. Pemakaian plasma darah tersimpan dalam penelitian, mendapat izin dari kepala Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical-Research Center) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar .

2.4.2 Kriteria Eksklusi Subyek Penelitian

1. Plasma darah tersimpan dengan volume plasma darah <1 cc.
2. Plasma darah yang tersimpan tidak dapat teridentifikasi karena tanpa label.
3. Plasma darah tersimpan rusak.
4. Plasma darah dengan tabung yang retak atau rusak.

2.5 Jumlah Subyek Penelitian

$$n1 = n2 = \left(\frac{Z\alpha\sqrt{2PQ} + Z\beta\sqrt{P1Q1 + P2Q2}}{P1 - P2} \right)^2$$

$$n1 = n2 = \left(\frac{1.96\sqrt{2 \times 0.6 \times 0.4} + 0.84\sqrt{0.8 \times 0.2 + 0.4 \times 0.6}}{(0.8 - 0.4)} \right)^2$$

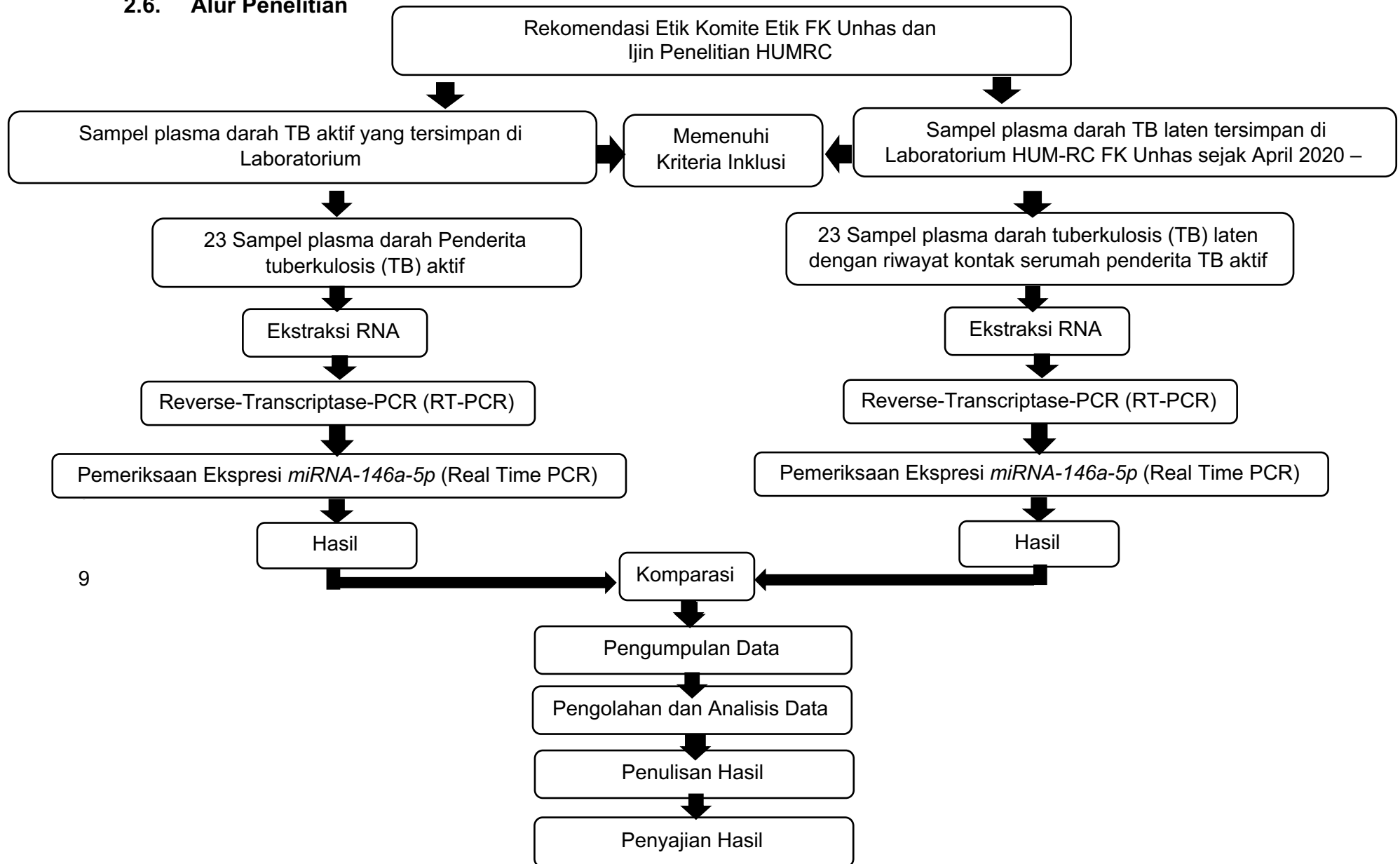
$$n1 = n2 = \left(\frac{1.36 + 0.53}{0.4} \right)^2$$

$$n1 = n2 = 22.37$$

$$n1 = n2 = 23$$

$n1$ = jumlah subjek kelompok 1
 $n2$ = Jumlah subjek kelompok 2
 α = Kesalahan tipe satu. Nilainya ditetapkan peneliti
 $Z\alpha$ = Nilai standar dari alpha. Nilainya diperoleh dari table Z kurva normal
 β = Kesalahan tipe dua. Nilainya ditetapkan peneliti
 $Z\beta$ = Nilai standar beta. Nilainya diperoleh dari kepustakaan, studi pendahuluan, atau asumsi.
 $Q1 = 1 - P1$
 $P2$ = Proporsi dari kelompok 1. Nilainya diperoleh dari kepustakaan, studi pendahuluan atau asumsi
 $Q2 = 1 - P2$
 $P1$ = Proporsi dari kelompok 1. Nilainya diperoleh dari kepustakaan, studi pendahuluan, atau asumsi.
 $P1 - P2$ = Selisih proporsi minimal anatar

2.6. Alur Penelitian



2.8. Alat dan Bahan Penelitian

2.8.1 Alat Penelitian

Tabel 2.1 Daftar Alat Penelitian

No.	Alat
1.	Mesin RT-PCR CFX 96 (BioRad, USA)
2.	Sentrifuge
3.	Laminar Flow (ESCO)
4.	BSC Tipe II (ESCO)
5.	Mikropipet (1000ul, 100ul, 20ul, 10ul) (BioRad)
6.	Tips (1000ul, 100ul, 20ul, 10ul)
7.	Tabung eppendorf (Axygen)
8.	PCR tube strip (Axygen)
9.	Vortex

2.8.2 Bahan Penelitian

Tabel 2.2 Daftar Bahan Penelitian

No.	Bahan
1.	Primer spesifik <i>miRNA 146a-5p</i> : 5' UGA GAA CUG AAU UCC AUG GGU U 3'
2.	Primer kontrol U6 : 5'CTCGCTTCGGCAGCACAT3'
3.	Kit ekstraksi RNA Zymo Research Quick-RNA™ MiniPrep Plus Kit (Cat. No. R108)
4.	Master mix miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen, Cat No. 339345)
5.	Refrigerated Microcentrifuge
6.	Etanol 70%
7.	14,3 M β -mercaptoetanol (β -ME)
8.	Tabung polipropilena

2.9 Prosedur Penelitian

2.9.1. Pemilihan subyek penelitian

2.9.1. Metode PCR

1. Melakukan Ekstraksi RNA dari Plasma darah

Step 1. Cell Lysis :

- a. Ditambahkan 400 uL RB Buffer dan 4 uL β -mercaptoethanol lalu diinkubasi selama 3 menit pada suhu ruang.
- b. Dipasang filter column dengan collection tube 2 mL.
- c. Seluruh campuran dipindahkan kedalam filter column kemudian dicentrifuge 1.000 xg selama 30 detik.
- d. Secara hati-hati filter column dipindahkan kedalam tabung effendorf 1.5 mL yang baru

Step 2. RNA Binding :

- a. Ditambahkan 400 uL etanol 70% yang dipreparasi dengan H₂O ke dalam tabung lalu pindahkan seluruh campuran ke dalam RB column (pasang RB column dengan collection tube 2 mL terlebih dahulu).
- b. Sentrifus 14-16.000 x g selama 1 menit lalu supernatant dibuang dan pasang kembali RB column.

Step 3. Wash :

- a. Sebanyak 400 uL W1 Buffer ditambahkan ke dalam RB Column
- b. lalu disentrifugasi 14-16.000 x g selama 1 menit, Supernatan pada tabung penampung dibuang dan dipasang kembali RB Column
- c. ditambahkan 600 uL Wash Buffer (Pastikan Wash Buffer sudah di tambah Ethanol) ke dalam RB column.
- d. Dilakukan sentrifus 14-16.000 xg selama 30 detik lalu buang dan pasang kembali RB column.
- e. Sebanyak 600 uL Wash Buffer ditambahkan kedalam RB Column kemudian sentrifus 14-16.000 xg selama 30 detik.
- f. RB column dibuang dan dipasang kembali lalu disentrifus kembali 14-16.000 xg selama 3 menit untuk mengeringkan matrix column

Step 4. RNA Elution :

- a. RB Column dipindahlan kedalam tube effendorf 1.5 mL baru (steril)
- b. selanjutnya ditambahkan 50 uL RNase free water (untuk meningkatkan konsentrasi RNA,
- c. diinkubasi pada suhu ruang selama menit) lalu disentrifus 14-16.000 xg selama 1 menit.

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

Amplifikasi cDNA dari hasil ekstraksi RNA dengan RT PCR dilakukan berdasarkan metode dari Invitrogen. Metode dilakukan dengan menggunakan *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)*.

- a. Membuat Master mix I dibuat dengan menambahkan RNA sebanyak 5 µg total RNA, 3 µl *random hexamers* (50 ng/µl), 1 µl 10mM dNTP mix dan *nuclease free water* (H₂O) sehingga total volume PCR 50 µl.
- b. Kemudian diinkubasi sampel pada 65°C selama 5 menit dan kemudian di atas es selama minimal 1 menit.
- c. Selanjutnya disiapkan campuran reaksi master mix II dengan menambahkan 2 µl 10x RT buffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT dan 1 µl *RNAase out*.
- d. Ditambahkan campuran reaksi ke campuran RNA / primer, campurkan sebentar, lalu tempatkan pada suhu kamar selama 2 menit.
- e. Ditambahkan 1 µl (50 unit) SuperScript II RT ke setiap tabung, campurkan dan inkubasi pada 25°C selama 10 menit, lalu diinkubasi pada 42°C selama 50 menit, untuk inaktivasi dipanaskan pada 70°C selama 15 menit, dan kemudian didinginkan di atas es.
- f. Selanjutnya ditambahkan 1 µl RNase H dan inkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Strand cDNA dapat disimpan di -20°C hingga digunakan untuk *real time* PCR.

3. Pemeriksaan ekspresi *miRNA-146a-5p* dengan real-time PCR

Ekspresi miR-146a-5p dinilai melalui Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) CFX 96 (BioRad, AS), menggunakan RNA nuklir kecil (snRNA) U6 sebagai gen referensi. Kadar ekspresi miRNA dianalisis menggunakan miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Kat. No. 339345) sesuai petunjuk produsen. Siklus qPCR dimulai dengan denaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit. Prosedur ini terdiri dari 45 siklus yang meliputi denaturasi pada suhu 95°C selama 10 detik, dilanjutkan dengan annealing pada suhu 59,5°C selama satu menit, dan diakhiri dengan pembacaan plat. Kurva leleh dihasilkan dengan mengukur plat selama lima detik setelah kenaikan suhu sebesar 0,5°C dari 65 menjadi 95°C.

2.9.3 Melakukan Analisis Data Pada Software

Tingkat ekspresi gen diketahui melalui munculnya sinyal amplikon pada grafik. Sinyal yang terdeteksi pada jumlah siklus yang kecil menunjukkan tingkat ekspresi gen 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, yaitu level ekspresi gen control GAPDH (*housekeeping gene*), dengan perhitungan:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target gen}} - Ct_{\text{control.}}$$

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

2.10 Melakukan Pengambilan Data

Data hasil pemeriksaan ekspresi *miRNA-146a-5p* dari sampel plasma darah tersimpan di catat dalam bentuk formulir isian (lampiran) untuk kemudian dilakukan analisis secara statistik. Adapun turut dilakukan pengambilan data untuk informasi demografis seperti usia dan jenis kelamin penderita TB dan individu kontak serumah penderita TB tersebut untuk kemudian dilakukan analisis secara statistik.

2.11. Melakukan Pengolahan dan Analisa Data

2.11.1. Melakukan Pengolahan Data

2.11.2. Melakukan Analisa Data

Data yang diperoleh diolah menggunakan aplikasi SPSS (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Frekuensi genotipe pada kelompok penderita dan kontrol diuji untuk keseimbangan Hardy-Weinberg (HWE) menggunakan uji χ^2 . Perbedaan distribusi genotipe antara penderita TB dan tuberkulosis laten yang kontak serumah dilakukan dengan uji Chi-square dan uji Fisher exact. Untuk analisis ekspresi relatif, data disajikan sebagai median dengan rentang, rata-rata $\pm$ SD, atau sebagai angka absolut dengan persentase. Distribusi data kontinyu diuji dengan uji Shapiro-Wilk dan Kolmogorov-Smirnov. Perbedaan variabel-variabel ini dianalisis menggunakan uji Mann-Whitney U nonparametrik untuk distribusi antara dua kelompok. Korelasi antar variabel dalam kelompok penderita TB dianalisis menggunakan koefisien korelasi peringkat (r) *Spearman*. Untuk semua analisis, nilai p adalah 2-tailed, dan $*p < 0,05*$ dianggap signifikan secara statistik. Data disajikan dalam bentuk grafik dan tabel.

2.12. Aspek Etika Penelitian

Dilakukan permintaan izin secara tertulis dari Rumah Sakit Universitas Hasanuddin, serta persetujuan Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Adapun, *Ethical Clearance*

tidak memberikan kerugian pada subjek penelitian, kerahasiaan data tetap dijaga. Surat Izin Penelitian dan Ijin Etik terlampir pada lampiran.