

**ANALISIS VARIASI GEN *VITAMIN D RECEPTOR (VDR)* DAN  
*MACROPHAGE MIGRATION INHIBITION FACTOR (MIF)* PADA PASIEN  
TUBERKULOSIS PARU DAN KONTAK SERUMAHNYA DI KOTA  
MAKASSAR**

***ANALYSIS OF VITAMIN D RECEPTOR (VDR) AND MACROPHAGE  
MIGRATION INHIBITION FACTOR (MIF) VARIATIONS IN PULMONARY  
TUBERCULOSIS PATIENTS AND THEIR HOUSEHOLD CONTACTS IN  
MAKASSAR CITY***

**NAJDAH HIDAYAH**

**C131081051**



**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2021**

**ANALISIS VARIASI GEN *VITAMIN D RECEPTOR (VDR)* DAN  
*MACROPHAGE MIGRATION INHIBITION FACTOR (MIF)* PADA  
PASIEN TUBERKULOSIS PARU DAN KONTAK SERUMAHNYA DI  
KOTA MAKASSAR**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi

S3 Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

NAJDAH HIDAYAH

Kepada

**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2021**

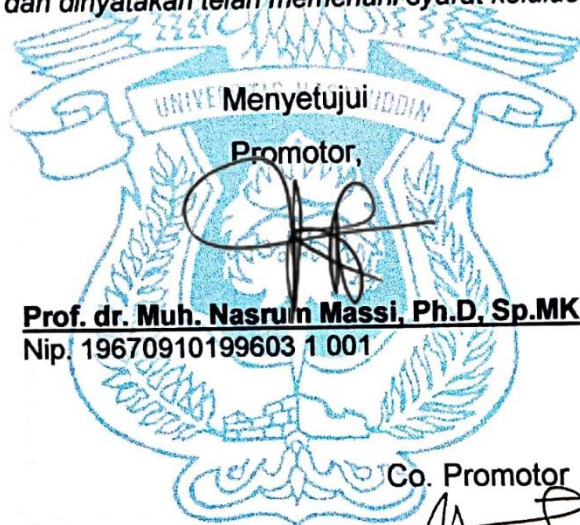
**DISERTASI**

**ANALISIS VARIASI GEN *VITAMIN D RECEPTOR (VDR)* DAN *MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR (MIF)* PADA PASIEN TUBERKULOSIS PARU DAN KONTAK SERUMAHNYA DI KOTA MAKASSAR**

Disusun dan diajukan oleh

**NAJDAH HIDAYAH**  
C013181051

*Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal, 05 Agustus 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*



Menyetujui

Promotor,

**Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK**

Nip. 19670910199603 1 001

Co. Promotor

**Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D**

Nip. 1967123199103 1 020

Co. Promotor

**Dr. dr. Irawaty Djaharuddin, Sp.P(K)**

Nip. 19680910199703 1 001

Ketua Program Studi S3  
Ilmu Kedokteran,

**dr. Agussalim Bukhar, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)**  
Nip. 19700821 199903 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin,



**Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed**  
Nip. 19661213 199503 1 009

## ABSTRAK

**NAJDAH HIDAYAH.** *Analisis Variasi Gen Vitamin D Receptor (VDR) dan Macrophage Migration Inhibition Factor (MIF) pada Pasien Tuberkulosis Paru dan Kontak Serumahnya di Kota Makassar (dibimbing oleh Muhammad Nasrum Massi, Ahyar Ahmad, dan Irawaty Djaharuddin).*

Penelitian ini bertujuan mengetahui hubungan antara polimorfisme dan ekspresi gen Vitamin D Receptor (VDR) dan *Macrophage Migration Inhibition Factor (MIF)* dengan kejadian TB paru aktif dan positifnya hasil IGRA.

Penelitian ini tergolong kajian kontrol kasus yang melibatkan 83 orang pasien tuberkulosis paru aktif dan 73 kontak serumah di Makassar. Pemeriksaan polimorfisme dilakukan dengan sekuensing Sanger Ekspresi *gen* VDR dan MIF dari pasien tuberkulosis paru aktif dan sampel kontak serumah diperiksa dengan metode kuantitatif *real-time* PCR (q-PCR). *Interferon-Gama Release Assay (IGRA)* berbasis ELISA digunakan untuk mengetahui status infeksi TB pada kontak serumah. Penelitian ini memeriksa IGRA berbasis ELISA pada kontak serumah dengan menggunakan *quanty FERON TB Gold Plus*.

Hasil penelitian menunjukkan terjadi peningkatan ekspresi gen VDR berkaitan dengan menurunnya risiko TB aktif (OR 0,67 95% CI 0,48 – 0,95,  $p=0,03$ ). Adapun positifnya IGRA tidak ditemukan berhubungan dengan polimorfisme VDR dan MIF yang diperiksa pada penelitian ini. Begitu juga dengan ekspresi gen VDR dan MIF. Dapat dikatakan bahwa polimorfisme dan ekspresi gen VDR berhubungan dengan kejadian TB paru aktif, tetapi tidak dengan positifnya IGRA. Namun, berdasarkan analisis *haplotype* menunjukkan gabungan varian VDR dan MIF dapat berkontribusi dalam kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis aktif.

Kata kunci: VDR, MIF, IGRA, tuberkulosis paru, ekspresi gen, polimorfisme



## ABSTRACT

**NAJDAH HIDAYAH.** *Analysis of Variation in Vitamin D Receptor (VDR) and Macrophage Migration Inhibition Factor (MIF) Genes in Pulmonary Tuberculosis Patients and Household Contacts in Makassar City* (Supervised by **Muhammad Nasrum Massi, Ahyar Ahmad, and Irawaty Djaharuddin**)

This study aims to determine the relationship between polymorphisms and gene expression of VDR and MIF with the incidence of active pulmonary TB and Interferon-Gamma Release Assay (IGRA) positivity.

This study was a case-control study involving 83 patients with active pulmonary tuberculosis and 73 household contacts in Makassar. Polymorphism examination was carried out by Sanger sequencing VDR and MIF gene expression from active pulmonary tuberculosis patients and household contact samples were examined by quantitative real-time PCR (qPCR) method. ELISA-based IGRA was used to determine the status of TB infection in household contacts. This study examined ELISA-based IGRA of household contacts using QuantiFERON TB Gold Plus, and we found that 61.64% (n = 45) of household contacts had positive IGRA results.

The results show that increased VDR gene expression is associated with a reduced risk of active TB (OR 0.67 95% CI 0.46-0.95; p=0.03). The positive IGRA is not found to be associated with the VDR and MIF polymorphisms examined in this study, nor was the expression of VDR and MIF genes. From this study, it can be concluded that the polymorphism and expression of the VDR gene are associated with the incidence of active pulmonary TB, but not with IGRA positivity. However, haplotype analysis shows that the combination of VDR and MIF variants might contribute to susceptibility to active tuberculosis.

**Keywords:** VDR, MIF, IGRA, pulmonary tuberculosis, gene expression, polymorphism





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
FAKULTAS KEDOKTERAN

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN**

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297

EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

**PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI**

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Najdah Hidayah  
NIM : C013181051  
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran  
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

ANALISIS VARIASI GEN VITAMIN D RECEPTOR (VDR) DAN MACROPHAGE MIGRATION INHIBITION FACTOR (MIF) PADA PASIEN TUBERKULOSIS PARU DAN KONTAK SERUMAHNYA DI KOTA MAKASSAR.

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 19 Juli 2021

Yang menyatakan,



Najdah Hidayah

## PRAKATA

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh. Alhamdulillah, segala puji serta syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat merampungkan disertasi dengan judul “Analisis Variasi Gen *Vitamin D Receptor (VDR)* dan *Macrophage Migration Inhibition Factor (MIF)* pada Pasien Tuberkulosis Paru dan Kontak Serumannya di Kota Makassar”. Disertasi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Doktor dari Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

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

Dengan tersusunnya disertasi ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada **Direktorat Jenderal Sumber Daya Ilmu Pengetahuan, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi (saat ini Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Dan Kebudayaan)** yang telah menerima penulis untuk mengikuti program Beasiswa Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU). Penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada **Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK** selaku Ketua Tim Promotor, yang telah bersedia menerima penulis

sebagai mahasiswa bimbingan dalam program PMDSU, memberikan ilmu, inspirasi dan motivasi serta senantiasa meluangkan waktu dan kesempatannya untuk membimbing selama masa studi terutama saat riset dan penyelesaian disertasi ini. Penulis juga menyampaikan terima kasih untuk **Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D** dan **Dr. dr. Irawaty Djaharuddin, Sp.P(K)** selaku kopromotor, yang berkenan memberi bimbingan, arahan dan masukan selama masa studi penulis dan penyelesaian disertasi ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada:

1. **Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, M.A.** selaku Rektor Universitas Hasanuddin Makassar;
2. **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc.** selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar;
3. **Prof. dr. Budu, Sp.M (K), M.Med, Ph.D** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar;
4. **dr. Agussalim Bukhari, M.Clin.Med, Sp.GK, Ph.D** selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin Makassar;
5. Seluruh Tim penguji: **Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp. Biok, Dr. dr. Ilham Jaya Patellongi, M.Kes, dr. Agussalim Bukhari, M.Clin, Med, Sp.GK, Ph.D, Dr. dr. Nur Ahmad Tabri, SpPD, K-P, SpP(K), Dr. Rosana Agus, M.Si, dan Dr. dr. Ni Nyoman Sri Budayanti, Sp. MK(K)** atas waktu dan kesempatannya dalam menguji serta arahan dan masukannya agar disertasi ini menjadi lebih baik.



6. **dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc, Ph.D**, selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik saat penulis menempuh studi S2, tahun pertama dari program PMDSU, dan **seluruh guru-guru penulis pada program studi S2 Ilmu Biomedik Konsentrasi Mikrobiologi**.
7. Kedua orang tua penulis, yang penulis hormati dan cintai, **Ummi Dra. Faridah Rahman, M.A, dan Abba Prof. Dr. Najmuddin, HS, M.A.** atas segala curahan kasih dan sayangnya sehingga penulis bisa sampai di titik ini. Penulis mengucapkan terima kasih untuk bimbingan, inspirasi, motivasi, dukungan baik secara morel dan materiel dan terutama untuk doa yang senantiasa dipanjatkan kepada Allah SWT.
8. Kedua orang tua penulis (dari suami penulis), **ibunda Dra. Hj. Safriah Buchari dan ayahnda Ir. Hamma, M.T**, atas doa yang senantiasa tercurahkan dan *support system* yang diberikan kepada penulis terutama selama masa studi. Terima kasih untuk saudara-saudara penulis (dari suami), **kakak Rahmat, adik Ridwan, Aulia, Nina, Ilmi, Haris, Yusril, Fauzi, dan Alif** atas bantuan dan dukungannya selama penulis menjalani studi.
9. **dr. Syamsuridzal Bali, MBA**, selaku Kepala Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat (BBKPM) Makassar telah menerima penulis untuk bekerja dan melakukan penelitian di BBKPM Makassar. Terimakasih juga untuk **Dr. dr. Adnan Ibrahim, Sp.PD (alm.)**, yang saat penulis bertugas, menjabat sebagai Kepala Bidang Pelayanan dan Penunjang Kesehatan, atas arahan dan kemurahan hatinya selama penulis bertugas. Ucapan terima kasih juga kepada **dr. Puji Astuti, M.Kes,**

selaku Kepala Seksi Pelayanan Kesehatan, **Ibu Angriany Rauf, S.Si, Apt, M.Adm.Kes**, selaku Kepala Bidang Promosi Kesehatan dan Pengembangan Sumber Daya, para dokter spesialis paru (**dr. Pither Sandy Tulak, Sp.P, dr. Arif Santoso, Sp.P(K), Ph.D, FAPSR, dr. Nurjannah, Sp.P**), dan **dr. Irmasari S, Sp.PK** selaku Kepala Instalasi Laboratorium. Terima kasih juga untuk seluruh staf laboratorium, terutama **Kak Kusnadi, M.Kes, Musdalifa, S.St, Ibu Evi, dan Kak Arfan** yang membantu selama kegiatan penelitian.

10. **Adinda Selviana, S.Si** yang telah membantu dalam proses pengambilan data saat *sampling*.
11. Staf Laboratorium HUM-RC Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, **Kak Handayani Halik, S.Si, M.Si, Yusuf, S.Si, Yuliana Sari, S.Si, Fathur, A.Md.A.K., Rina, S.Si, Gaby Maulida, S.Si, M.Si, Kak Uli, dan Kak Safri** serta **Kak Syahrani Hidayatullah, S.Si., M.Kes** atas bantuannya selama penulis melakukan penelitian.
12. Staf S3 Kedokteran Universitas Hasanuddin (**Bapak Akmal, S.Sos, MAP, Bapak Abdul Muin Amd.FT dan Bapak Rahmat**) atas bantuannya selama penulis menjalani masa studi.
13. Semua teman-teman seperjuangan selama baik di program studi S3 Ilmu Kedokteran, kakanda **Dr. Andi Tenriola, S.Kep, M.Kes, Dr. Subair, S.Si, M.Kes, Dr. dr. Adnan Ibrahim, Sp.PD (alm.), Dr. dr. Irda Handayani, Sp.PK, Dr. Tri Damayanti, S.Kep, Ns.**, dan teman-teman di program PMDSU, terutama untuk **Munirah, Arbaim, Agus, Arini, Ayu, Ayun, Umi, Budi, Asmi, Rahmat**, yang selalu memberikan

motivasi, dorongan, dan informasi-informasi kepada peneliti sehingga peneliti dimudahkan selama masa studi.

14. Sahabat-sahabat saya ketika menempuh studi di program Biomedik Konsentrasi Ilmu Mikrobiologi, **Kak dr. Rizky Amelia Noviyanthi, drh. Erdi, Ririn, Riyan, Hanasia, Asriyani, Riyan, Juni, dr. Yenni dan Indah.**

15. Sahabat-sahabat saya, **dr. Maghfirah Eksari Nadir, dr. Rezki Indriyanti, dr. Nurul Amiruddin, dr. Riza Fathiyah Tandah, dr. Wahyunita Do Toka, dr. Muthmainnah,** dan **dr. Hikmah Jaya,** atas dukungan dan doanya. Juga kepada **dr. Andi Meutiah Ilhamjaya, M.Kes, dr. Sri Jayanti,** dan **dr. Andi Alifia Ayu Delima, M.Kes,** atas motivasi dan bantuan yang diberikan selama penulis menempuh studi.

16. Sepupu saya, **Kak Tia, Kak Ira, adinda Hafizhah,** yang senantiasa memberikan dukungan, dan terkhusus untuk adinda **Ibtisamatul Aminah** yang juga merupakan awardee PMDSU batch 2 alumni Universitas Andalas Padang, sebagai informan pertama program PMDSU kepada penulis.

17. Suami saya tercinta, **Ibnu Hajar, S.St** yang senantiasa memberikan doa restu, kasih sayang, dan motivasi untuk penulis. Juga kepada Ananda tercinta, **Muhammad Ali Afham Najib** yang lahir di saat penulis sementara menjalani masa studi dan menjadi penyemangat jiwa penulis untuk menyelesaikan studi dengan baik dan sungguh-sungguh.

18. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian, atas perhatian, perkenan dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya

disertasi ini. Penulis juga menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya untuk seluruh partisipan penelitian, yaitu kepada para pasien dan kontak serumannya yang telah berkenan untuk berpartisipasi dalam penelitian ini.

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

Makassar, 30 Juli 2021

Najdah Hidayah

## DAFTAR ISI

|  |       |
|--|-------|
| HALAMAN SAMPUL.....                          | i     |
| HALAMAN PENGANTAR.....                       | ii    |
| HALAMAN PERSETUJUAN .....                    | iii   |
| ABSTRAK.....                                 | xiv   |
| ABSTRACT .....                               | v     |
| LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN .....             | vi    |
| PRAKATA.....                                 | vii   |
| DAFTAR ISI.....                              | xiv   |
| DAFTAR TABEL .....                           | xviii |
| DAFTAR GAMBAR .....                          | xx    |
| DAFTAR SINGKATAN.....                        | xxii  |
| BAB I PENDAHULUAN.....                       | 1     |
| A. Latar Belakang .....                      | 1     |
| B. Rumusan Masalah.....                      | 7     |
| C. Tujuan Penelitian.....                    | 8     |
| D. Manfaat Penelitian .....                  | 8     |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....                 | 10    |
| A. Tinjauan Umum Penyakit Tuberkulosis ..... | 10    |
| 1. Definisi Tuberkulosis.....                | 10    |

|  |     |
|--|-----|
| 2. Patogenitas TB Paru.....  | 13  |
| 3. Diagnosis TB Paru.....  | 42  |
| 4. <i>Interferon-Gamma Release Assay (IGRA)</i> .....                            | 49  |
| B. Tinjauan Umum Polimorfisme .....  | 58  |
| C. Tinjauan tentang <i>Vitamin D Receptor (VDR)</i> .....                        | 62  |
| 1. <i>Vitamin D Receptor (VDR)</i> .....   | 62  |
| 2. Hubungan <i>VDR</i> dengan Tuberkulosis .....                                 | 67  |
| D. Tinjauan tentang <i>Macrophage Migration Inhibition Factor (MIF)</i><br>..... | 93  |
| 1. Struktur Gen <i>Macrophage Migration Inhibition Factor (MIF)</i> .....        | 95  |
| 2. Hubungan <i>MIF</i> dengan Tuberkulosis.....                                  | 104 |
| E. Kerangka teori .....  | 110 |
| F. Kerangka konseptual.....  | 111 |
| G. Hipotesis.....  | 111 |
| BAB III METODE PENELITIAN.....   | 112 |
| A. Rancangan Penelitian .....  | 112 |
| B. Waktu dan Lokasi Penelitian .....   | 112 |
| C. Populasi dan Sampel Penelitian.....   | 112 |
| D. Kriteria Penelitian.....  | 113 |
| E. Definisi Operasional Variabel Penelitian.....                                 | 114 |
| F. Cara Kerja .....  | 115 |
| 1. Pengumpulan sampel .....  | 115 |

|  |            |
|--|------------|
| 2. Pemeriksaan sampel sputum (BTA dan kultur).....                                   | 116        |
| 3. Pemeriksaan Sampel darah.....   | 116        |
| a. Pemeriksaan IGRA dengan menggunakan<br>QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT- Plus) ..... | 116        |
| b. Pemeriksaan polimorfisme gen <i>VDR</i> dan <i>MIF</i> .....                      | 117        |
| c. Pemeriksaan ekspresi gen <i>VDR</i> dan <i>MIF</i> .....                          | 120        |
| 4. Analisis Data.....  | 127        |
| G. Alur Penelitian .....   | 130        |
| <b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>  | <b>131</b> |
| <b>A. HASIL.....</b>   | <b>131</b> |
| 1. Karakteristik sampel .....  | 131        |
| 2. Polimorfisme gen <i>VDR</i> dan <i>MIF</i> .....                                  | 133        |
| 3. Ekspresi gen <i>VDR</i> dan <i>MIF</i> .....                                      | 146        |
| 4. Analisis Multivariat .....  | 149        |
| <b>B. PEMBAHASAN.....</b>  | <b>151</b> |
| 1. Polimorfisme <i>Vitamin D Receptor (VDR)</i> .....                                | 154        |
| 2. Polimorfisme gen <i>MIF</i> .....   | 163        |
| 3. Ekspresi Gen <i>VDR</i> .....   | 164        |
| 4. Ekspresi gen <i>MIF</i> .....   | 177        |
| 5. Keterbatasan dalam penelitian .....   | 188        |
| <b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>  | <b>191</b> |
| <b>A. KESIMPULAN.....</b>  | <b>191</b> |
| <b>B. SARAN .....</b>  | <b>192</b> |

|                     |     |
|---------------------|-----|
| DAFTAR PUSTAKA..... | 193 |
| LAMPIRAN .....      | 225 |



## DAFTAR TABEL

|  |     |
|--|-----|
| Tabel 1. Polimorfisme <i>VDR</i> dan perubahan nukleotida.....   | 74  |
| Tabel 2. Studi polimorfisme <i>VDR</i> terhadap kerentanan tuberkulosis paru<br>(Studi dalam 10 tahun terakhir).....   | 80  |
| Tabel 3. Meta analisis kaitan polimorfisme <i>VDR</i> dengan kejadian<br>tuberkulosis paru .....   | 84  |
| Tabel 4. Studi ekspresi gen <i>VDR</i> terhadap kerentanan tuberkulosis paru<br>.....  | 92  |
| Tabel 5. Lokasi polimorfisme <i>MIF</i> dan perubahan nukleotida .....   | 102 |
| Tabel 6. Studi polimorfisme <i>MIF</i> -173 G/C (rs755622) dan mikrosatelit <i>MIF</i><br>-794 CATT5-8 (rs5844572) serta ekspresi gen <i>MIF</i> terkait<br>dengan penyakit tuberkulosis ..... | 107 |
| Tabel 7. Definisi Operasional Variabel Penelitian .....  | 114 |
| Tabel 8. Primer dan siklus yang digunakan pada Pemeriksaan<br>Polimorfisme Gen <i>VDR</i> dan <i>MIF</i> .....   | 119 |
| Tabel 9. Susunan Primer untuk Pemeriksaan Ekspresi Gen dengan qPCR<br>.....  | 124 |
| Tabel 10. Karakteristik sampel penelitian.....   | 132 |
| Tabel 11. Polimorfisme Gen <i>VDR</i> rs2228570, rs1544410, rs7975232,<br>rs731236 pada TB paru aktif dan kontak serumahnya.....   | 134 |
| Tabel 12. Polimorfisme Gen <i>VDR</i> rs2228570, rs1544410, rs7975232,<br>rs731236 pada kontak serumah IGRA negatif dan positif.....   | 136 |
| Tabel 13. Polimorfisme gen <i>MIF</i> -173 G/C (rs755622) pada pasien<br>tuberkulosis aktif dan kontak serumah.....  | 140 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabel 14. Polimorfisme gen <i>MIF</i> -173 G/C (rs755622) pada kontak serumah IGRA negatif dan positif.....  | 141 |
| Tabel 15. Analisis <i>haplotype</i> genotipe <i>VDR</i> (rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236).....   | 143 |
| Tabel 16. Analisis <i>haplotype</i> genotipe <i>VDR</i> (rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236) dan kombinasi dengan <i>MIF</i> -173 G/C (rs755622) .....          | 145 |
| Tabel 17. Perbandingan ekspresi gen <i>VDR</i> secara kuantitatif relatif antara kelompok TB aktif, kontak serumah IGRA positif, dan kontak serumah IGRA negatif ..... | 146 |
| Tabel 18. Perbandingan ekspresi gen <i>VDR</i> secara kuantitatif relatif antara kontak serumah IGRA positif, dan kontak serumah IGRA negatif .....                    | 146 |
| Tabel 19. Perbandingan ekspresi gen <i>MIF</i> secara kuantitatif relatif antara kelompok TB aktif, kontak serumah IGRA positif, dan kontak serumah IGRA negatif ..... | 148 |
| Tabel 20. Perbandingan ekspresi gen <i>MIF</i> secara kuantitatif relatif antara kontak serumah IGRA positif, dan kontak serumah IGRA negatif .....                    | 148 |
| Tabel 21. Analisis hubungan polimorfisme <i>VDR</i> dan <i>MIF</i> terhadap kejadian TB paru aktif .....   | 150 |
| Tabel 22. Analisis hubungan polimorfisme <i>VDR</i> dan <i>MIF</i> terhadap positifnya IGRA.....   | 151 |

## DAFTAR GAMBAR

|   |     |
|---|-----|
| Gambar 1. Perkembangan perjalanan alami penyakit TB.....  | 15  |
| Gambar 2. Penggunaan IGRA dalam algoritma pemeriksaan infeksi laten tuberkulosis dan terapi pencegahan tuberkulosis pada individu berisiko..... | 51  |
| Gambar 3. Interpretasi hasil IGRA dengan menggunakan QFT-Plus. ....   | 56  |
| Gambar 4. Diagram alur interpretasi hasil IGRA dengan menggunakan QFT-Plus.....   | 56  |
| Gambar 5. Lokasi gen <i>VDR</i> pada kromosom 12 pada lengan panjang (q) kromosom 12 di posisi 13.11.....                                       | 62  |
| Gambar 6. Struktur ekson-intron dari gen <i>VDR</i> dan posisi polimorfisme <i>FokI</i> , <i>TaqI</i> dan <i>Apal</i> .....                     | 63  |
| Gambar 7. Gambar skematik komposisi protein <i>VDR</i> .....  | 64  |
| Gambar 8. Fotosintesis dan metabolisme vitamin $D_3$ .....  | 67  |
| Gambar 9. Aktivasi sistem imun bawaan yang dimediasi vitamin D. ....  | 70  |
| Gambar 10. Lokasi gen <i>MIF</i> pada kromosom 22 pada lengan panjang (q) kromosom 12 di posisi 11.23.....                                      | 95  |
| Gambar 11. Struktur gen <i>MIF</i> manusia.....   | 96  |
| Gambar 12. Mekanisme kerja <i>MIF</i> .....   | 100 |
| Gambar 13. Kerangka Teori .....   | 110 |
| Gambar 14. Kerangka konseptual .....  | 111 |
| Gambar 15. Alur Penelitian .....  | 130 |

|  |     |
|--|-----|
| Gambar 16. Hasil sekuensing yang menunjukkan polimorfisme C/C (a), T/C (b), dan T/T (c) <i>VDR</i> rs2228570.....              | 137 |
| Gambar 17. Hasil sekuensing yang menunjukkan polimorfisme G/G (a), G/A (b), dan A/A (c) <i>VDR</i> rs1544410 .....             | 138 |
| Gambar 18. Hasil sekuensing menunjukkan polimorfisme G/G (a), G/T (b), dan T/T (c) <i>VDR</i> rs7975232 .....                  | 138 |
| Gambar 19. Hasil sekuensing menunjukkan polimorfisme T/T (a), T/C (b), dan C/C (c) <i>VDR</i> rs731236 .....                   | 139 |
| Gambar 20. Hasil sekuensing menunjukkan polimorfisme G/G (a), G/C (b), dan C/C (c) <i>MIF</i> -173 G/C (rs755622).....         | 141 |
| Gambar 21. Linkage disequilibrium (LD) pada <i>VDR</i> rs1544410, rs7975232, dan rs731236. ....                                | 142 |
| Gambar 22. Hasil pemeriksaan ekspresi gen <i>VDR</i> pada pasien TB, kontak serumah IGRA positif dan negatif. ....             | 147 |
| Gambar 23. Hasil pemeriksaan ekspresi gen <i>MIF</i> pada pasien TB paru aktif, kontak serumah IGRA positif, dan negatif. .... | 149 |

## DAFTAR SINGKATAN

|   |  |
|---|--|
| ATP   | : adenosine triphosphate   |
| $1\alpha,24,25(\text{OH})_3\text{D}$        | : $1\alpha, 24,25$ -trihidroksivitamin $\text{D}_3$  |
| $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$<br>/1,25D | : $1\alpha, 25$ - dihidroksivitamin $\text{D}_3$   |
| 25 (OH) D                                   | : 25-hidroksivitamin $\text{D}_3$  |
| 7-DHC                                       | : 7- dehydrocholecalciferol  |
| ADCP  | : <i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i>  |
| ANOVA                                       | : <i>Analysis of Variance</i>  |
| APC   | : <i>antigen-presenting cell</i>   |
| ARMS  | : <i>Amplification-refractory mutation system</i>  |
| BAL   | : <i>bronchoalveolar lavage</i>  |
| BBKPM                                       | : Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat  |
| BCG   | : <i>Bacillus Calmette-Guérin</i>  |
| bp  | : <i>basepair</i>  |
| BTA   | : <i>basil tahan asam</i>  |
| cAMP  | : <i>cyclic adenosine 3',5'-monophosphate</i>  |
| CD  | : <i>Cluster of differentiation</i>  |
| cDNA  | : complementary DNA  |
| CFP   | : <i>culture filtrate protein</i>  |
| CGI   | : <i>CpG islands</i>   |
| CI  | : <i>confidence interval</i>   |
| CLR   | : <i>C-type lectin receptor</i>  |
| COX2  | : <i>Cyclooxygenase</i>  |
| CpG   | : <i>cytosine-phosphate-guanine (cytosine and guanine separated by only one phosphate)</i> |
| CR3   | : <i>complement receptor 3</i>   |
| CREB  | : <i>cAMP response element-binding protein</i>   |

|               |   |
|---------------|---|
| CTL           | : <i>cytotoxic T lymphocyte</i>   |
| CYP24A1       | : <i>Cytochrome P450 Family 24 Subfamily A Member 1</i><br>(menyandi 25-Hidroksivitamin 24-hydroxylase) |
| CYP27B1       | : <i>cytochrome p450 27B1</i> ( menyandi 25-Hidroksivitamin D<br>1-alpha-hydroxylase)                   |
| CYP2R1        | : <i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily R Member 1</i>  |
| DC            | : <i>Dendritic cell</i>   |
| DC-sign       | : <i>Dendritic Cell-specific intercellular-adhesion-molecule-3-<br/>grabbing non- integrin</i>          |
| dkk           | : dan kawan-kawan   |
| DM            | : diabetes mellitus   |
| DNA           | : <i>Deoxyribonucleic Acid</i>  |
| DosR          | : <i>Dormancy survival regulator</i>  |
| DosR          | : <i>Dormancy survival regulator</i>  |
| ELISA         | : <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>  |
| ESAT-6        | : <i>early secretory antigen-6</i>  |
| GAPDH         | : <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>   |
| GIF           | : <i>Glucosylation Inhibition Factor</i>  |
| GM-CSF        | : <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>   |
| HIV           | : <i>Human immunodeficiency virus</i>   |
| HUM-RC        | : Hasanuddin University Medical – Research Center   |
| HWE           | : <i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>   |
| iBALT         | : <i>inducible bronchus-associated lymphoid tissue</i>  |
| IFN- $\gamma$ | : <i>Interferon-gamma</i>   |
| Ig            | : <i>Immunoglobulin (A,G)</i>   |
| IGRA          | : <i>Interferon-gamma release assay</i>   |
| IL            | : <i>Interleukin (1,2,4,5,6, 10, 12, 13, 17, 18,21,22,23)</i>   |
| ILTB          | : Infeksi laten tuberkulosis  |
| IMT           | : indeks massa tubuh  |
| iNOS          | : <i>isoform nitric oxide synthase</i>  |

|                  |   |
|------------------|---|
| JAB1             | : JUN-activation domain-binding protein                                 |
| JNK              | : JUN N-terminal kinase   |
| LAM              | : <i>Lipoarabinomannan</i>  |
| LD               | : <i>Linkage disequilibrium</i>   |
| LJ               | : Lowenstein-Jensen   |
| LM               | : <i>Lipomannan</i>   |
| LPA <sub>2</sub> | : Phospholipase A <sub>2</sub>  |
| Lpqh             | : <i>Lipoprotein 19 kDa</i>   |
| Lpr              | : <i>Lipoprotein (LprA, LprG, LprQ)</i>                                 |
| M1               | : <i>makrofag tipe 1</i>  |
| M2               | : <i>makrofag tipe 2</i>  |
| ManLAM           | : <i>Mannose-capped Lipoarabinomannan</i>                               |
| MarP             | : Mycobacterium tuberculosis protease                                   |
| MDR-TB           | : <i>multi-drug resistant TB</i>  |
| MGIT             | : <i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>                             |
| MHC              | : <i>major histocompatibility complex</i>                               |
| MIF              | : <i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>                         |
| Mincle           | : <i>Macrophage-inducible C-type lectin</i>                             |
| mRNA             | : <i>messenger RNA</i>  |
| <i>Mtb</i>       | : <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                                     |
| NAFLD            | : <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>                              |
| NALC-NaOH        | : <i>N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide</i>                           |
| NASH             | : <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>                                  |
| NCBI             | : <i>National Center for Biotechnology Information</i>                  |
| NF-κB            | : <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> |
| NK               | : <i>Natural killer (cell)</i>  |
| nm               | : nanometer   |
| NO               | : <i>Nitric oxide</i>   |

|                   |   |
|-------------------|---|
| NO                | : <i>nitrogen monoksida</i>   |
| NOD2              | : <i>Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2</i>   |
| OAT               | : obat anti tuberkulosis  |
| OD                | : <i>Optical density</i>  |
| OR                | : <i>Odds ratio</i>   |
| P2PTM Kemenkes RI | : Direktorat Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Tidak Menular, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia |
| PAMP              | : <i>pathogen-associated molecular pattern</i>  |
| PBMC              | : <i>peripheral blood mononuclear cells)</i>  |
| PCR               | : <i>polymerase chain reaction</i>  |
| PGE <sub>2</sub>  | : prostaglandin E <sub>2</sub>  |
| PIAS4             | : <i>protein inhibitor of activated STAT 4</i>  |
| PIM               | : <i>phosphalidyl-myo-inositol mannosides</i>   |
| PMN               | : polimorfonuklear  |
| PPD               | : <i>purified protein derivative</i>  |
| PRR               | : <i>Pattern Recognition Receptor</i>   |
| QFT-GIT           | : QFT-Gold in Tube  |
| QFT-Plus          | : QuantiFERON-TB Plus   |
| qPCR              | : <i>Quantitative PCR</i>   |
| RFLP              | : <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>   |
| rhGIF             | : <i>recombinant human Glucosylation Inhibition Factor</i>  |
| RNA               | : <i>Ribonucleic Acid</i>   |
| RNI               | : <i>reactive nitrogen intermediate</i>   |
| ROI               | : <i>reactive oxygen intermediate</i>   |
| Rpf               | : <i>resuscitation promoting factors</i>  |
| RT-PCR            | : <i>reverse transcription PCR</i>  |
| S,P,S             | : Sewaktu, pagi, sewaktu  |
| SD                | : standar deviasi   |
| SNP               | : <i>Single nucleotide polymorphism</i>   |



|              |   |
|--------------|---|
| Sp1          | : <i>transcription factors specificity protein</i>              |
| STAT         | : <i>Signal Transducer And Activator of Transcription (1,4)</i> |
| SUMO         | : <i>small ubiquitin-like modifier</i>                          |
| TB           | : <i>Tuberkulosis</i>   |
| Tc           | : <i>T-cytotoxic</i>  |
| TDM          | : <i>Trehalose dimycolate</i>                                   |
| TFIIB        | : <i>human basal transcription factor IIB</i>                   |
| TGF- $\beta$ | : <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>          |
| Th           | : <i>T-helper (1,2,17)</i>                                      |
| TLR          | : <i>toll-like receptors</i>                                    |
| TNF          | : <i>Tumor Necrosis Factor</i>                                  |
| TPOR         | : <i>tiol-protein oksidoreduktase</i>                           |
| Treg         | : <i>sel T regulator</i>  |
| TST          | : <i>Tuberculin Skin Test</i>                                   |
| UTR          | : <i>untranslated region</i>                                    |
| VDBP         | : <i>vitamin D binding protein</i>                              |
| VDR          | : <i>Vitamin D Receptor</i>                                     |
| WHO          | : <i>World Health Organization</i>                              |
| ZN           | : <i>Ziehl Neelsen</i>  |

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Tuberkulosis (TB), merupakan penyakit infeksi yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat secara global. Pada tahun 2019, terdapat sekitar 10 juta kasus TB dan sekitar 1,4 juta kematian akibat TB di seluruh dunia. Indonesia termasuk dalam delapan negara penyumbang dua pertiga kasus TB di seluruh dunia dan menempati urutan kedua insiden TB terbanyak (8,5%), dengan notifikasi kasus meningkat sebesar sekitar 69% dari tahun 2015 (331.703 kasus) hingga 2019 (562.049 kasus) (World Health Organization, 2020).

Di Sulawesi Selatan, tercatat jumlah kasus tuberkulosis paru BTA (basil tahan asam) positif sebanyak 11.476 kasus pada tahun 2019. Berdasarkan data dari seluruh kabupaten / kota se-Sulawesi Selatan, Kota Makassar menduduki peringkat pertama dengan jumlah penderita tuberkulosis sebanyak 5.418 kasus, menyusul Kabupaten Gowa sebanyak 1.810 kasus. Data tahun 2016 yang diperoleh dari Bidang Bina P2PL Dinas Kesehatan Kota Makassar, kasus baru penderita tuberkulosis Paru BTA (+) di Puskesmas dan Rumah Sakit tahun 2016 yaitu sebanyak 1.874 penderita dari 2.373 perkiraan sasaran sehingga diperoleh Angka Penemuan Kasus Baru tuberkulosis BTA (+) yaitu 78,97%. Angka ini meningkat dibandingkan tahun 2015 yaitu 1.928 penderita dari 2.600 perkiraan sasaran sehingga didapatkan angka

penemuan kasus baru tuberkulosis BTA (+) yaitu 74,15%. Pada tahun 2014 angka penemuan kasus baru tuberkulosis BTA (+) yaitu 73,76% ditemukan 1.918 penderita dari 2.600 sasaran. Prevalensi (seluruh kasus) penyakit tuberkulosis per 100.000 penduduk selama 3 tahun terakhir juga meningkat yaitu tahun 2016 sebanyak 271/100.000 penduduk meningkat dari tahun 2015 yaitu 249/100.000 penduduk dan pada tahun 2014 yaitu 247/100.000 penduduk (Dinas Kesehatan Sulawesi Selatan, 2020).

Target eliminasi TB tidak hanya dapat dicapai dengan pengobatan TB aktif yang efektif, tetapi juga dengan deteksi kasus dini untuk menghentikan penularan, dengan berbagai metode untuk mencegah infeksi baru dan menetralkan infeksi laten yang ada. Strategi *End TB* Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) tidak dapat dicapai tanpa mengatasi reservoir infeksi laten (Dye et al., 2013). Secara global, seperempat populasi di seluruh dunia diperkirakan terinfeksi oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, yang merupakan agen penyebab penyakit TB ini. Sekitar 5-10% di antara individu yang terinfeksi secara laten ini bermanifestasi secara klinis menjadi TB aktif (World Health Organization, 2020). Kerentanan seseorang terkena infeksi TB dan berkembang menjadi TB aktif dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya virulensi *mycobacterium*, imunitas inang, genetika inang, lingkungan, dan interaksi antar faktor tersebut (Qidwai et al., 2012).

Dalam penyelidikan kontak TB, kontak serumah adalah kelompok yang paling mungkin tertular oleh orang dengan TB aktif (indeks) (J.

Morrison et al., 2008). Dari beberapa penelitian kontak rumah tangga TB, beberapa kontak tetap negatif berdasarkan tes infeksi TB, bahkan setelah pajanan dalam waktu lama (Fox et al., 2013; Reichler et al., 2018). Beberapa studi menggunakan uji tuberkulin (*tuberculin skin test* / TST) atau Mantoux yang mengukur respons hipersensitivitas tipe lambat (*delayed-type hypersensitivity*) terhadap injeksi intradermal *purified protein derivative* (PPD), yang mengandung campuran beberapa antigen mikobakteri (Gualano et al., 2019; H. Yang et al., 2012), dan beberapa studi lainnya menggunakan pemeriksaan *Interferon-gamma release assay* (IGRA), yang mengukur sitokin interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) yang terlepas dari sel-T setelah distimulasi dengan antigen spesifik *Mtb* (Pai et al., 2008). Tinjauan sistematis studi kontak rumah tangga mendeteksi heterogenitas dalam resistensi terhadap infeksi, dengan rata-rata 50% dari kontak dekat tetap tidak terinfeksi (diuji dengan TST) (J. Morrison et al., 2008). Pada penelitian *cohort* di Uganda, terdapat 11.7% kontak serumah dewasa tetap negatif pada uji Mantoux setelah *follow-up* selama dua tahun (Stein et al., 2018). Studi INFECT (*The Innate Factors and Early Clearance of Mycobacterium tuberculosis*) di Bandung, Indonesia yang melibatkan 1347 kontak serumah mencatat sebesar 57.9% kontak serumah memiliki hasil IGRA positif dan setelah 14 minggu, sebesar 21.6% dari kontak serumah IGRA negatif mengalami konversi menjadi IGRA positif dan 71.2% tetap negatif (Verrall et al., 2020). Baliashvili dkk. melaporkan setidaknya sekitar 10% kontak rumah tangga resisten

terhadap *Mtb* meskipun terpapar kasus indeks infeksi dengan paparan cukup tinggi. Mereka mengatakan prevalensi resisten tidak berbeda secara substansial berdasarkan jenis kelamin, usia, koinfeksi *human immunodeficiency virus* (HIV) atau kondisi komorbiditas (Baliashvili et al., 2021). Pengamatan ini menimbulkan pertanyaan apakah beberapa orang mungkin dapat menahan infeksi *Mtb* atau dapat dengan cepat membersihkan infeksi. Dengan mempelajari lebih lanjut tentang siapa orang-orang ini dan faktor imunologis atau genetik apa yang memungkinkan mereka untuk melawan infeksi, tentu dapat membantu dalam mengembangkan alat pencegahan dan pengobatan biomedis yang lebih baik, termasuk vaksin TB.

Banyak penyelidikan telah menegaskan bahwa faktor genetik pejamu terlibat dalam penyakit tuberkulosis, salah satunya adalah gen *VDR* (*Vitamin D Receptor*). Gen *VDR* sangat menarik karena vitamin D memodulasi aktivitas monosit-makrofag di dalam tubuh dan memainkan peran dalam imunitas bawaan terhadap agen menular seperti *Mtb* (P. T. Liu et al., 2006).

Varian genetik dari gen *VDR* dikaitkan dengan risiko tuberkulosis berdasarkan pada hipotesis bahwa perubahan genetik dari gen *VDR* dapat menyebabkan cacat dalam aktivasi gen, dan mempengaruhi fungsi imunitas tubuh (C. Chen et al., 2013). Hasil penelitian menunjukkan genotip *VDR FokI Ff* dikaitkan dengan TB dan alel *f* dapat menjadi faktor risiko kerentanan TB paru (Salimi et al., 2015; Singla et al., 2015). Namun, pada penelitian lainnya, polimorfisme *FokI* tidak

menunjukkan adanya hubungan yang signifikan dengan kerentanan TB (S.-W. Lee et al., 2016; Sinaga et al., 2014). Pada polimorfisme *TaqI* dan *BsmI*, penelitian menunjukkan hasil yang bervariasi terhadap asosiasinya dengan TB paru. Tampaknya perbedaan yang bervariasi ini dapat berhubungan dengan perbedaan rasial, populasi, dan menunjukkan bahwa polimorfisme ini mungkin memiliki peran multifungsi dalam patogenesis TB atau berinteraksi dengan genetik dan faktor lingkungan lainnya (Cao et al., 2016). Selain itu, studi polimorfisme *VDR* pada infeksi TB laten masih minim, sehingga peran *VDR* pada infeksi TB laten belum diketahui sepenuhnya.

Adapun studi tentang ekspresi gen *VDR* pada penyakit tuberkulosis belum banyak dilakukan. Penelitian di India menggunakan kultur makrofag pasien TB paru yang diinfeksi kuman *Mtb* H37Rv menunjukkan adanya peningkatan ekspresi mRNA *VDR* pada kultur makrofag pasien TB yang distimulasi *Mtb* dibanding yang tidak distimulasi *Mtb* (Selvaraj et al., 2009). Studi lainnya, dengan subjek yang berbeda yaitu pasien yang sembuh dari TB ekstrapulmoner, menunjukkan peningkatan ekspresi *VDR* pada makrofagnya yang diinfeksi *Mtb* H37Rv (Fiske et al., 2019).

Selain *VDR*, *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF) juga berperan dalam respon imunitas bawaan yang penting terutama dalam melawan infeksi bakteri. Kemampuan respons *host* untuk meningkatkan aktivitas mikobakterisidal makrofag penting untuk pengembangan respons efektif dini dan untuk menahan infeksi *Mtb* (Cadena et al., 2016;

Weiss & Schaible, 2015; Zhai et al., 2019).

MIF merupakan suatu sitokin dalam respon imunitas bawaan yang dikodekan dalam lokus genetik polimorfik yang fungsional, yang berkontribusi terhadap inflamasi dan penting dalam mengendalikan infeksi (R. Das et al., 2013). Penelitian telah menunjukkan bahwa MIF dapat menghambat migrasi dan meningkatkan agregasi makrofag di lokasi peradangan lokal atau infeksi (Ma et al., 2018). Makrofag yang kekurangan MIF menunjukkan penurunan sitokin dan produksi oksigen reaktif dan gangguan aktivitas mikobakterisidal (Das et al., 2013).

Sejumlah penelitian telah menyelidiki relevansi antara polimorfisme *MIF* -173 G>C dengan risiko TB, namun hasilnya masih inkonklusif (Gehlen et al., 2020; Hashemi et al., 2015; Yanlin Li, Yuan, et al., 2012; A. Liu et al., 2016). Polimorfisme MIF yang lainnya yang telah diidentifikasi yaitu mikrosatelit *MIF* -794 berupa pengulangan tetranukleotida 5–8 (CATT). Beberapa penelitian telah menunjukkan hubungan antara polimorfisme mikrosatelit *MIF* -794 CATT dan kerentanan terhadap TB (Kuai et al., 2016; Yanlin Li, Zeng, et al., 2012; Reid et al., 2019). Sebuah meta-analisis menunjukkan bahwa polimorfisme mikrosatelit *MIF* -794 alel CATT<sub>7</sub> dan CATT<sub>8</sub> dapat menjadi faktor risiko untuk meningkatkan kerentanan terhadap TB (Ma et al., 2018). Pada penelitian lain, polimorfisme fungsional pada *MIF* -794 CATT menunjukkan stratifikasi populasi global, dengan prevalensi tertinggi ekspresi alel *MIF* yang rendah ditemukan di populasi Afrika sub-Sahara, yang merupakan populasi dengan dampak terbesar dari infeksi

TB dan HIV (Reid *et al.*, 2019). Adapun kadar MIF pada pasien TB ditemukan lebih tinggi dibanding kontrol (Kuai *et al.*, 2016; A. Liu *et al.*, 2016; X. Tong *et al.*, 2016). Namun penelitian ekspresi gen *MIF* pada pasien tuberkulosis masih minim.

Untuk itu, pada penelitian ini, akan dilakukan pemeriksaan untuk mengetahui polimorfisme dan ekspresi gen *VDR* dan *MIF* terhadap pasien TB paru, serta kontak serumahnya yang pada tahap awal akan diskriminasi apakah telah terinfeksi oleh *Mtb* dengan menggunakan pemeriksaan IGRA. Dengan demikian, dapat diketahui apakah polimorfisme gen *VDR* dan *MIF* memiliki peran terhadap kerentanan seseorang terkena infeksi TB paru. Rancangan penelitian ini merupakan bagian dari payung riset gen-gen yang berperan dalam susceptibilitas seseorang mengidap tuberkulosis.

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, maka dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah ada hubungan antara polimorfisme gen *VDR* dan *MIF* dengan kejadian TB paru aktif dan positifnya IGRA?
2. Apakah ada perbedaan ekspresi gen *VDR* pada pasien TB paru aktif, kontak serumah IGRA positif, dan negatif?



## **C. Tujuan Penelitian**

### **1. Tujuan Umum**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan variasi gen *Vitamin D Receptor (VDR)* dan *Macrophage Migration Inhibition Factor (MIF)* dengan kejadian TB paru aktif dan positifnya IGRA.

### **2. Tujuan Khusus**

- a. Mengetahui hubungan antara polimorfisme gen *VDR* dan *MIF* dengan kejadian TB paru aktif dan positifnya IGRA.
- b. Mengetahui perbedaan ekspresi gen *VDR* dan *MIF* pada pasien TB paru aktif, kontak serumah IGRA positif dan negatif.

## **D. Manfaat Penelitian**

### **1. Bagi akademik dan klinis**

- a. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu referensi ilmiah terkait polimorfisme dan ekspresi gen pada pasien TB paru aktif dan TB laten.
- b. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah serta dapat digunakan sebagai salah satu dasar acuan untuk sebagai bahan kajian penelitian selanjutnya terutama mengenai *host susceptibility gene* pada penderita TB dan pengembangan diagnosis dan terapi berbasis gen.
- c. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi berupa penemuan biomarker baru untuk diagnosis TB.

## 2. Bagi Masyarakat

- a. Sebagai informasi dan edukasi kepada masyarakat tentang faktor-faktor kerentanan seseorang menderita TB, perkembangan penyakit TB dan penularannya.
- b. Khusus bagi kontak serumah pasien TB, mendapatkan pelayanan kesehatan, terutama skrining infeksi TB melalui pemeriksaan IGRA yang dilakukan pada penelitian ini.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tinjauan Umum Penyakit Tuberkulosis**

##### **1. Definisi Tuberkulosis**

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh basil *Mycobacterium tuberculosis (Mtb) complex*, sebagian besar pada manusia disebabkan oleh spesies *Mtb* (Assam et al., 2013; Shuaib et al., 2020). Transmisi penyakit ini melalui *airborne droplet* (Nardell, 2016; Roy et al., 2004). Umumnya, penyakit ini menyerang paru-paru, namun dapat juga mempengaruhi organ lainnya (Advani et al., 2018; Sharma et al., 2017; Triasih et al., 2018).

TB sudah sejak dahulu menginfeksi manusia, dibuktikan dengan adanya penemuan kerusakan tulang vertebra toraks khas TB dari kerangka yang digali di Heidelberg (Jerman), dan Hungaria dari kuburan zaman neolitikum (Canci et al., 1996; Donoghue et al., 2013; Spekker et al., 2012). Jenis TB paru yang dikaitkan dengan tuberkel ditetapkan sebagai patologi oleh Dr. Richard Morton pada tahun 1689. Namun, TB memiliki berbagai gejala, sehingga TB tidak diidentifikasi sebagai satu jenis penyakit hingga akhir 1820-an. TB belum dinamakan tuberkulosis hingga 1839 oleh Johan Lukas Schönlein. Schönlein mulai mengajukan nama 'tuberkulosis' pada

tahun 1834 karena adanya tuberkel dalam segala bentuk penyakitnya. Baru pada tahun 1882, Robert Koch yang pertama kali mengidentifikasi kuman penyebab tuberkulosis, yaitu bakteri berbentuk batang (basil) dan dari sinilah diagnosis dimulai dan penatalaksanaannya lebih terarah (Cambau & Drancourt, 2014). Apalagi pada tahun 1896 ketika Roentgen menemukan sinar X sebagai alat bantu diagnostik untuk mendapatkan visualisasi kerusakan paru akibat *Mtb* (Amin & Bahar, 2014).

Genus *Mycobacterium* merupakan kelompok bakteri gram positif, berbentuk batang, dan berkapsul. Selain itu, basil ini bersifat aerob, sehingga menyukai jaringan dengan kandungan oksigen yang tinggi (Amin & Bahar, 2014). *Mtb* merupakan patogen intraseluler yang lambat tumbuh yang dapat bertahan dalam makrofag *host*. Bakteri ini tahan terhadap pewarnaan asam, sehingga setelah dilakukan pewarnaan tahan asam. *Mtb* merupakan bakteri tahan asam akibat dinding selnya yang komposisi utamanya adalah asam mikolat (Bhatt et al., 2007; Kleinnijenhuis et al., 2011). Asam mikolat merupakan komponen spesifik dinding sel *mycobacterium* dan merupakan 50% dari beratnya. Akibat lapisan tebal asam mikolat ini, nutrisi sulit masuk ke dalam bakteri sehingga bakteri lambat tumbuh, akan tetapi hal ini juga meningkatkan resistensi sel terhadap degradasi enzim lisosom. Asam mikolat terdistribusi sebagai layar yang tebal dan terletak di bagian eksternal

dinding sel, sedangkan bagian internalnya terdiri dari arabinogalaktan, *phosphatidyl-myo-inositol mannosides* (PIM), dan peptidoglikan. Setelah lapisan asam mikolat, komponen lainnya yaitu mannosa-yang berisi biomolekul termasuk lipoarabinomannan yang di bagian atasnya ditutupi mannosa (Man-LAM), lipomannan (LM), dan manoglikoprotein. Mannan dan arabinomannan terdapat di permukaan dan membentuk kapsul luar dari bakteri ini (Kleinnijenhuis et al., 2011). Dinding sel yang terdiri dari lapisan peptidoglikan yang tebal dan lapisan mikolat hidrofobik dengan polisakarida dan arabinogalaktan yang membuat genus ini resisten terhadap kerusakan kimia dan dehidrasi (Niederweis et al., 2010). Dinding sel yang kaya lipid dan asam mikolat ini akan melindungi bakteri ini dari proses fagolisosom, hal ini dapat menerangkan mengapa bakteri ini dapat bertahan hidup pada makrofag (Bhatt et al., 2007).

*Mtb* dapat tahan hidup di udara kering maupun dalam keadaan dingin, atau dapat hidup bertahun-tahun dalam lemari es. Ini dapat terjadi karena kuman berada dalam sifat dorman (tidur). Dari keadaan ini, kuman dapat bangkit kembali dan terjadi reaktivasi (Amin & Bahar, 2014). *Mycobacterium* tidak tahan panas, akan mati pada 60°C selama 15-20 menit. Biakan dapat mati jika terkena sinar matahari langsung selama 2 jam. Dalam dahak, ia dapat bertahan 20-30 jam. Basil yang berada dalam percikan bahan dapat bertahan

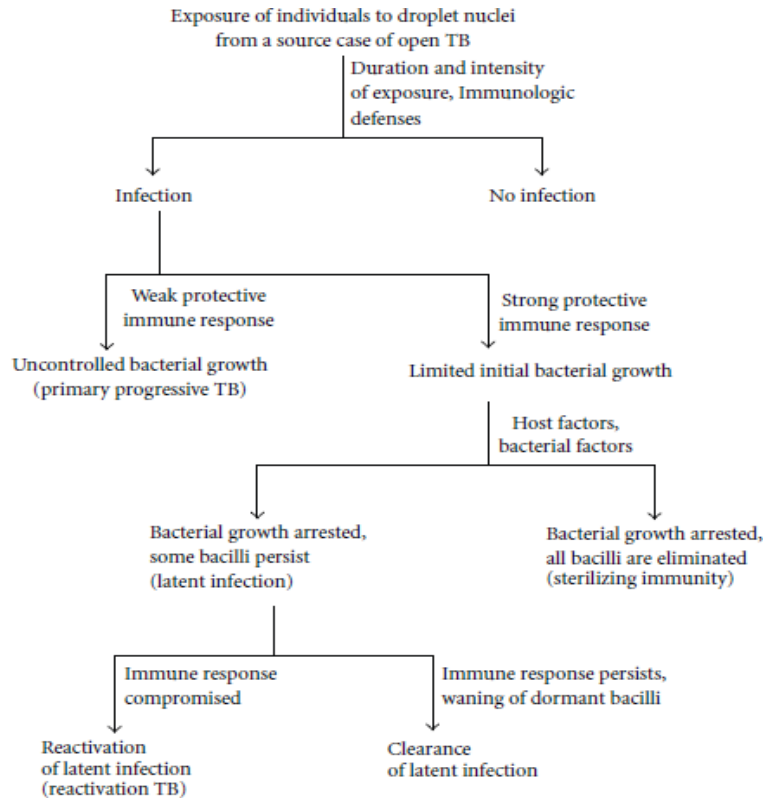
hidup 8-10 hari. Biakan basil ini dalam suhu kamar dapat hidup hingga 6-8 bulan dan dapat disimpan dalam lemari dengan suhu 20°C selama 2 tahun. Basil ini tahan terhadap berbagai khemikalia dan disinfektan seperti asam sulfat 15%, asam sitrat 3%, phenol 5%, dan NaOH 4%. Basil ini dihancurkan oleh jodium tinctur dalam 5 menit dan dengan alkohol 80 % akan hancur dalam 2-10 menit (Massi, 2012).

## 2. Patogenitas TB Paru

Rute utama infeksi TB melibatkan paru-paru. *Droplet nuclei*, yang mengandung *Mtb*, yang terhirup dapat menghindari pertahanan bronkus karena ukurannya yang kecil (diameter 0.3–0.5  $\mu\text{m}$  dan panjang bervariasi, mulai dari 0,5 hingga 4  $\mu\text{m}$ ) dan menembus ke alveoli terminal dimana *Mtb* dilumpuhkan oleh sel imun fagositik (makrofag dan sel dendritik) (Cook et al., 2009; Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010; Kleinnijenhuis et al., 2011; Ufimtseva et al., 2019). *Mtb* juga dapat menginfeksi sel non fagositik di ruang alveolar termasuk sel M, sel endotel alveolus, dan tipe 1 dan tipe 2 (pneumosit) (Ahmad, 2011). Pada fase awal infeksi, *Mtb*, diinternalisasi oleh sel imun fagositik, bereplikasi secara intraselular, dan sel bakteri dapat melintasi penghalang alveolar untuk menyebabkan diseminasi sistemik. Replikasi intraseluler dan diseminasi patogen secara simultan ke limfe nodus paru dan ke

berbagai situs ekstrapulmoner lainnya terjadi sebelum pengembangan respons imun adaptif (Ahmad, 2011; Kleinnijenhuis et al., 2011). Lokasi tersering manifestasi ekstrapulmoner termasuk limfe nodus (19%), pleura (7%), traktus gastrointestinal (4%), tulang (6%), sistem saraf pusat (3%) dan sistem genitourinaria (1%) (Houston & Macallan, 2014). Ini menunjukkan kemampuan *Mtb* yang luar biasa untuk membangun sebuah pertahanan yang melindunginya dan membuatnya dapat menghindari eliminasi oleh sistem kekebalan tubuh dan bertahan tanpa batas waktu (Ahmad, 2011; Kleinnijenhuis et al., 2011). Risiko infeksi bergantung pada beberapa faktor seperti infeksiusnya sumber, kedekatan kontak, jumlah basil yang terhirup, dan status kekebalan dari *host* potensial (R. D. Turner et al., 2017). Perkembangan perjalanan alami dan hasil pada individu yang imunokompeten setelah terpapar ditunjukkan

pada gambar 1.



Gambar 1. Perkembangan perjalanan alami penyakit TB (Ahmad, 2011)

Pada sebagian besar individu yang terinfeksi, respon imun seluler berkembang dalam berkembang 2-8 minggu setelah infeksi yang menghentikan perbanyakan lebih lanjut dari basil tuberkulum (Gambar 1) (Ahmad, 2011; Jasenosky et al., 2015). Limfosit T yang teraktivasi, makrofag, dan sel imun lainnya membentuk granuloma yang menghalangi jaringan nekrotik yang berkembang dan membatasi replikasi dan penyebaran basil tuberkulum lebih lanjut. Sebagian besar *Mtb* terbunuh dalam granuloma kaseosa ini, dan perkembangan penyakit terhenti (Ahmad, 2011; Dheda, Schwander,



Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010; Rao et al., 2019).

Namun, *Mtb* tersebut tidak sepenuhnya diberantas pada beberapa individu karena patogen ini memiliki strategi yang efektif untuk menghindari respons kekebalan melalui beberapa mekanisme termasuk pemblokiran pematangan dan pengasaman lisosom, sehingga kelangsungan hidup dan persistensi beberapa basil *Mtb* dalam keadaan non-replikatif pada *host* (infeksi laten TB) (Gideon et al., 2011; Zhai et al., 2019). Secara tradisional, telah diperkirakan bahwa basil pada individu yang terinfeksi secara laten berada di dalam granuloma dan lesi tuberkel matur. Namun, sebuah penelitian menunjukkan adanya DNA *Mtb* dari jaringan paru individu yang meninggal karena penyakit lain dan yang tidak menunjukkan tanda patologis penyakit TB (Hernández-Pando et al., 2000). Penelitian lainnya menunjukkan bahwa pada individu yang terinfeksi tuberkulosis secara laten juga dapat ditemukan di luar granuloma di tempat-tempat seperti sel endotel, fibroblas, dan jaringan adiposa (Leistikow et al., 2010). Dengan demikian, baik granuloma maupun lesi patologi lain yang terlihat tidak diperlukan dalam jaringan di mana bakteri hadir selama infeksi laten pada manusia. Selain itu, adanya laporan yang menunjukkan transmisi infeksi dari ayah ke anak laki-laki di Denmark pada tahun 1961 dan reaktivasi dari infeksi laten pada anak laki-lakinya tersebut terjadi lebih dari 30 tahun kemudian (didokumentasi dengan *molecular fingerprinting* dari

masing-masing isolat *Mtb* mereka) menunjukkan pertahanan basil dapat bersifat dorman dalam waktu yang panjang (dapat bertahan hingga seumur hidup) (Lillebaek et al., 2002). Adanya defek imunitas seluler dapat menghasilkan reaktivasi dari basil yang dorman ini dan menyebabkan penyakit TB aktif bertahun-tahun setelah infeksi primer kuman ini (Ahmad, 2011).

#### a. Respon imun bawaan

Jenis sel imun bawaan utama yang terlibat dalam infeksi TB adalah makrofag, sel dendritik, neutrofil dan sel pembunuh alami (*Natural killer cell* (NK)) (C. H. Liu et al., 2017). Infeksi TB dimulai dengan fagositosis basil *Mtb* oleh *antigen presenting cell* (APC) paru termasuk makrofag alveolar dan sel dendritik. Pengenalan *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) *Mtb* oleh reseptor pengenalan pola (*pattern recognition receptors* / PRR) *host* merupakan pusat inisiasi dan respon imun *host*. *Mtb* atau komponennya dikenali oleh PRR *host*, seperti *Toll-like receptors* (TLR), *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2* (NOD2), dan *C-type lectin receptors* (termasuk reseptor mannose (CD207), dektin-1, dan *Dendritic cell -specific intercellular adhesion molecule grabbing nonintegrin* (DC-SIGN)) (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010; Ehlers & Schaible, 2013; Hsieh et al., 2018; Thacker et al., 2020). Beberapa reseptor lainnya yang

potensial antara lain reseptor komplemen, dan *scavenger* receptor (Ahmad, 2011; Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010). Beberapa reseptor ini diekspresikan pada sel-sel imun (seperti makrofag, sel dendritik, sel B, dan tipe spesifik sel T) dan sel-sel non imun (seperti fibroblas dan sel epitel) (Ahmad, 2011). Interaksi *Mtb* dengan beberapa reseptor ini menginisiasi kaskade sinyal intraseluler yang merangsang sinyal yang berujung pada respons proinflamasi (bermanfaat bagi *host*). Namun, bakteri juga memiliki strategi yang dapat memicu sinyal yang meredam atau memodulasi respon imun bawaan (bermanfaat bagi patogen) (Ahmad, 2011; Ehlers & Schaible, 2013).

Interaksi awal dengan *Mtb* dianggap penting untuk aktivasi makrofag dan luaran penyakit. PRR yang diekspresikan dalam makrofag menentukan pengikatan, internalisasi, dan nasib hidup basil intraseluler. Di antara berbagai keluarga PRR yang mengenali *Mtb*, TLR2 merupakan reseptor imun bawaan utama yang mengenali beragam ligan yang *conserved* pada patogen dan berperan sebagai 'alarm' endogen. *Mtb* mengekspresikan sejumlah ligan TLR2, termasuk lipoprotein 19 kDa, lipoprotein mikobakteri, LprA (Rv1270), LprG (Rv1411c), lipoarabinomanan (LAM), lipomannan (LM), dan *phosphatidyl-myo-inositol mannoside* (PIM) juga berinteraksi dengan TLR2 untuk memulai aktivasi seluler (Gopalakrishnan & Salgame, 2016). Aktivasi TLR2 meningkatkan ekspresi reseptor vitamin D

(VDR) dan gen vitamin D-1-hidroksilase, yang mengubah pro-vitamin D menjadi bentuk aktif  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dan menyebabkan induksi peptida antimikroba katelisidin dan  $\beta$ -defensin untuk membunuh mikobakteri intraseluler (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010; P. T. Liu et al., 2009). Agonis TLR2 LpqH dari *Mtb* juga mengaktifkan autofagi dan apoptosis di makrofag, jalur yang membatasi pertumbuhan *Mtb* intraseluler (Gopalakrishnan & Salgame, 2016). Selain TLR2, terdapat pula TLR4 dan TLR9 yang mampu mengenali komponen *Mtb*. TLR4 telah dilaporkan berinteraksi dengan LM *in vitro* sementara TLR9 mengikat motif CpG yang tidak termetilasi dari DNA mikobakteri. Pengikatan ligan mikobakteri ke TLR pada makrofag dan sel dendritik menginduksi produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1b, TNF, dan IL-6 melalui aktivasi jalur pensinyalan *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) (Ishikawa et al., 2017).

PRR lainnya, NOD2 mengenali muramil dipeptida (komponen peptidoglikan *Mtb*) (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010). Ketika NOD2 diaktifkan komponen *Mtb* tersebut, NF- $\kappa$ B teraktivasi dan menghasilkan transkripsi mediator pro-inflamasi (Bai et al., 2013). Pada percobaan dengan model hewan, meskipun respon inflamasi pada tikus yang kekurangan NOD2 terganggu pada infeksi *Mtb*, NOD2 tidak diperlukan untuk kontrol beban mikobakteri *in vivo* pada fase awal infeksi. Namun, pada infeksi *Mtb* kronis,

kelangsungan hidup lebih pendek untuk tikus yang kekurangan NOD2 (Divangahi et al., 2008). Hasil ini menyiratkan bahwa NOD2 dapat berkontribusi pada perlindungan inang pada fase laten infeksi (Ishikawa et al., 2017).

Selain itu, PRR *C-type lectin receptor* (CLR), diketahui juga berkontribusi pada kontrol atau persistensi patogen ini dalam makrofag (Lugo-Villarino et al., 2018). *C-type lectin* adalah protein pengikat karbohidrat yang bergantung pada kalsium, yang pada gilirannya mengenali karbohidrat yang diekspresikan pada permukaan *Mtb* termasuk PIM, LAM, polisakarida, dan glikoprotein (misalnya, antigen 19 kDa). CLR dektin-1, yang sebagian besar diekspresikan pada makrofag, sel dendritik, dan neutrofil, berinteraksi dengan *Mtb* dan bekerjasama dengan TLR2 untuk mengaktifasi NF- $\kappa$ B dan memediasi berbagai respon imun, termasuk fagositosis, produksi sitokin dan kemokin, dan instruksi langsung imunitas tipe 1 *T-helper* 1 (Th1) dan Th17 (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010; Marakalala & Ndlovu, 2017). Aktivasi NF- $\kappa$ B menghasilkan produksi dan sekresi banyak mediator proinflamasi termasuk sitokin TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-18 dan kemokin, yang menarik neutrofil, sel NK, sel T, dan lebih banyak sel dendritik dan makrofag ke tempat infeksi (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010; Z. Feng et al., 2020).

DC-SIGN, salah satu reseptor yang juga tergolong dalam CLR,

mampu mengenali molekul yang mengandung mannan seperti yang ada dalam Man-LAM), arabinomannan, glikoprotein (misalnya, antigen 19, 38, dan 45 kDa), dan PIM *Mtb*. Selain itu, DC-SIGN juga berperan dalam endositosis/fagositosis dan transduksi sinyal (Azad et al., 2012; Lugo-Villarino et al., 2018). Aktivasi DC-SIGN mengarah pada produksi IL-10 dan *transforming growth factor-β* (TGF-β), mediator immunosupresif (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010; Lugo-Villarino et al., 2018). Dengan cara ini, *Mtb* mencegah aktivasi sel dendritik yang tepat, mengingat bahwa IL-10 menghambat ekspresi molekul kostimulatori (misalnya, CD86) dan produksi IL-12, yang penting untuk aktivasi respon imun tipe-1, yang diperankan oleh sel Th1, sel T sitotoksik (Tc), dan sel *natural killer* (NK) (Annunziato et al., 2015). Sebagai catatan, pembajakan produksi IL-10 melalui DC-SIGN dalam sel dendritik tampaknya menjadi strategi penghindaran umum oleh berbagai patogen. Lugo-Villarino dkk. menemukan bahwa DC-SIGN dapat mengganggu respons pro-inflamasi dan kontrol pertumbuhan intraseluler *Mtb*. DC-SIGN yang merupakan faktor *host* justru dapat memberikan keuntungan bagi *Mtb* (Lugo-Villarino et al., 2018).

CLR lainnya, yaitu reseptor mannan, berinteraksi dengan ManLAM yang terdapat pada *envelope Mtb*. Fagositosis basil tuberkel oleh makrofag melalui reseptor mannan dikaitkan dengan respons anti-inflamasi karena ManLAM menghambat produksi IL-12

reseptor yang tergantung reseptor mannose (*mannose receptor-dependent* IL-12). Penghambatan respon makrofag terhadap *Mtb* ini mendorong infeksi dan kelangsungan hidup *Mtb* di makrofag. (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011; Ahmad, 2011).

Makrofag memainkan peran sentral dalam patogenesis mikobakteri, karena mereka adalah tempat (seluler) utama untuk *Mtb* selama infeksi awal dan kronis (Lugo-Villarino *et al.*, 2018). Makrofag dapat mengeliminasi *Mtb* melalui berbagai mekanisme, termasuk produksi oksigen dan komponen nitrogen dan sitokin, pengasaman fagosom dan autofagi *Mtb* intraseluler (Ahmad, 2011; C. H. Liu *et al.*, 2017). *Mtb* difagositosis oleh makrofag alveolar, yang merupakan adalah sel pertama yang menghadapi patogen dan merekrut berbagai jenis makrofag, seperti turunan monosit makrofag, selama infeksi awal (C. H. Liu *et al.*, 2017). Perkembangan dan fungsi makrofag dibentuk oleh sinyal lingkungan mikro, yang mendorong diferensiasi makrofag, yaitu makrofag tipe 1 (M1) dan makrofag tipe 2 (M2) (Murray *et al.*, 2014). Biasanya, makrofag M1 yang diaktifkan secara klasik, yang merupakan efektor utama respon *host* terhadap bakteri intraseluler, menstimulasi imunitas Th1, dan menghasilkan sitokin perangsang imun, diinduksi oleh rangsangan mikroba (misalnya, lipopolisakarida) atau sitokin (misalnya, IFN $\gamma$ , dan TNF- $\alpha$ ). Sebaliknya, makrofag M2 yang diaktifkan secara alternatif, yang merupakan sel penyaji antigen yang buruk dan penekan respons

Th1, diinduksi oleh IL-4 dan IL-13 serta IL-10 dan TGF- $\beta$  (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010; Sica et al., 2015). Populasi makrofag tambahan ini memainkan peran penting dalam menjaga keseimbangan antara patologi yang diperburuk dan kontrol pertumbuhan mikobakteri (C. H. Liu et al., 2017).

Setelah fagositosis mikroorganisme, makrofag dan leukosit fagositik lainnya mengalami *respiratory burst* di mana ada peningkatan besar dalam konsumsi oksigen (Shastri et al., 2018). Fenomena ini dikatalisis oleh *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oksidase dan menghasilkan superoksida. Superoksida terdismutasi menjadi hidrogen peroksida, dan bersama-sama membentuk senyawa radikal hidroksil yang lebih reaktif dan oksigen singlet. Pembentukan *reactive oxygen intermediate* (ROI) ini merupakan mekanisme pertahanan antimikroba yang penting. Ketika dirangsang dengan sitokin seperti IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  makrofag juga dapat menghasilkan radikal toksik nitrogen. Produksi *reactive nitrogen intermediate* (RNI) ini bergantung pada pembentukan *isoform nitric oxide synthase* (iNOS) dan ketersediaan asam amino L-arginine, sebagai substrat. Nitrogen monoksida (NO) adalah gas yang berumur pendek, dapat menyebar dan tampaknya bekerja pada enzim yang mengandung gugus besi-sulfur yang menyebabkan efek statis atau sidal pada protozoa, jamur, bakteri, virus, dan sel tumor (L. B. Adams et al., 1997; Idh et



al., 2017).

Satu teori menyatakan bahwa, bahkan selama latensi, makrofag dari waktu ke waktu keluar dari lesi dan menyebarkan infeksi ke bagian lain dari paru-paru (Cardona, 2009; Cardona & Ruiz-Manzano, 2004). Meskipun ini bertentangan dengan definisi infeksi laten karena migrasi makrofag infeksi akan secara efektif membuat infeksi laten ini menjadi paten, ini mungkin mencerminkan perluasan lesi diam selama latensi. Sebuah konsensus mengajukan bahwa tidak hanya TB aktif, tetapi penyakit TB laten juga menunjukkan spektrum aktivitas lesi (Mack et al., 2009). Dalam hal ini, pencitraan *in vivo* mungkin untuk pertama kalinya memberikan klasifikasi fungsional dari beragam tahap "latensi", menggantikan deskripsi yang agak statis tentang respons imun yang bertahan lama terhadap stimulus infeksi yang terjadi di masa lalu (Mack et al., 2009).

Setelah masuknya *Mtb*, makrofag alveolar menghasilkan sitokin inflamasi dan kemokin yang berfungsi sebagai sinyal untuk infeksi. Monosit, neutrofil, dan limfosit bermigrasi ke tempat fokus infeksi, tetapi mereka tidak dapat membunuh bakteri secara efisien (Ahmad, 2011). Selama waktu ini, basil melawan mekanisme bakterisida makrofag (fagolisosom) dengan mencegah fusi fagosom-lisosom, berkembang biak di fagosom, dan menyebabkan nekrosis makrofag (Levitte et al., 2016). Basil yang dilepaskan berkembang

biak secara ekstraseluler, difagositosis oleh makrofag lain yang juga gagal mengendalikan pertumbuhan *Mtb*, dan juga dihancurkan. Sementara itu, sel dendritik (yang menelan basil), bermigrasi ke kelenjar getah bening regional, dan terjadi *priming* sel T (baik CD4+ dan CD8+) melawan antigen mikobakteri. Respon imun spesifik menghasilkan sel T spesifik yang bermigrasi kembali ke fokus infeksi, dipandu oleh kemokin yang diproduksi oleh sel yang terinfeksi. Akumulasi makrofag, sel T, dan sel inang lainnya (sel dendritik, fibroblas, sel endotel, dan sel stroma) menyebabkan pembentukan granuloma di tempat infeksi (Ahmad, 2011).

*Trehalose dimycolate* (TDM), faktor virulensi *Mtb* sendiri, dapat mendorong pembentukan granuloma (Ehlers & Schaible, 2013). TDM atau disebut juga *cord factor* merupakan glikolipid yang banyak ditemukan di permukaan *Mtb* dan dikenali oleh *Mincle* (*Macrophage-inducible C-type lectin*) *receptor* (Ishikawa et al., 2017). Pengenalan TDM oleh *Mincle* *receptor* ini mengaktifkan NF- $\kappa$ B, sehingga terjadi induksi sitokin proinflamasi dan kemokin yang berperan dalam formasi granuloma (Cirillo & Kong, 2019; Ishikawa et al., 2017).

Ehlers dkk. berpendapat bahwa respon imun bawaan awal terhadap infeksi *Mtb* tidak banyak membatasi dan justru lebih banyak mendorong replikasi *Mtb*. Akibatnya, akumulasi fokal sel mononuklear di berbagai keadaan diferensiasi, yaitu tahap awal granuloma, tidak terlalu bersifat protektif (Ehlers & Schaible, 2013).

Oleh karena itu, tidak mengherankan bahwa kurangnya reseptor seperti Toll atau NOD pada tikus, meskipun terlibat dalam pengenalan mikobakteri dan induksi peradangan selanjutnya, tidak berdampak besar pada perjalanan infeksi aerosol *Mtb* (Gandotra et al., 2007). Namun, penelitian Gill dkk. menunjukkan hal sebaliknya, yaitu respon imun bawaan berperan utama dalam melawan *Mtb*, dimana pembunuhan *Mtb* substansial dalam 3 minggu pertama infeksi (Gill et al., 2009).

#### **b. Respon imun seluler**

Makrofag yang terinfeksi mikobakteri dan sel dendritik (*antigen-presenting cell / APC*) dari imunitas bawaan menyajikan antigen ke sel T dan sel B yang termasuk dalam imunitas adaptif (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010). APC dari fokus inflamasi awal bermigrasi ke kelenjar getah bening regional, menyajikan antigen ke sel T sehingga terjadi *priming* sel T untuk berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th17 serta sel efektor T sitotoksik (Ehlers & Schaible, 2013). Semula, Sel T CD4+ dan sel T CD8+ yang mengenali peptida antigen yang dipresentasikan APC melalui *major histocompatibility complex* (MHC) yang terdapat pada permukaan APC. Sel T *helper* CD4 dapat berdiferensiasi menjadi sel Th1, Th2, Th17 dan Treg. Sel Th1 menghasilkan sitokin, terutama IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, limfotoksin dan *Granulocyte-macrophage colony-stimulating*

*factor* (GM-CSF), yang mendorong stimulasi sel Th1, limfosit T sitotoksik (CTL), serta pematangan dan aktivasi makrofag dan granulosit. Sel Th2 menghasilkan faktor stimulasi sel B seperti IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13, yang meningkatkan produksi antibody, namun sel Th2 ini menekan respons imun tipe Th1. Sementara sel Th17, subset sel T *helper* yang berbeda, menghasilkan sitokin unik IL-17, IL-17F, IL-21 dan IL-22, yang merangsang produksi defensin dan merekrut neutrofil dan monosit ke tempat peradangan, dan terlibat dalam fase awal pertahanan pejamu. Subset Th1, Th2 dan Th17 dapat dimodulasi oleh sel Treg (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-Smit, et al., 2010).

Sitokin yang berbeda dapat menentukan diferensiasi sel T. IL-12, IL-18 dan IFN- $\gamma$  mendorong perkembangan sel Th1, sedangkan IL-4, IL-5 dan IL-13 menginduksi perkembangan sel Th2. IL-23, IL-6, IL-21 dan TGF- $\beta$  konsentrasi rendah dapat menginduksi diferensiasi Th17, sedangkan IL-2 dan TGF- $\beta$  konsentrasi tinggi dapat menginduksi diferensiasi Treg (Dorhoi & Kaufmann, 2009). IL-6 menghambat pembentukan sel Treg yang diinduksi oleh TGF- $\beta$ , tetapi bersama-sama dengan TGF- $\beta$  menginduksi diferensiasi sel Th17 (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010).

Sel CD4<sup>+</sup> Th1 melepaskan IFN- $\gamma$  yang jauh lebih kuat daripada sel T CD8<sup>+</sup> setelah infeksi mikobakteri dan dianggap memainkan peran penting dalam perlindungan (Dheda, Schwander, Zhu, van

Zyl-smit, et al., 2010). IFN- $\gamma$ , yang disekresikan dari sel T teraktivasi dan sel NK, memiliki kemampuan untuk mengaktifkan makrofag dan mendorong pembunuhan bakteri dengan memungkinkan pematangan fagosom dan produksi antimikroba ROI dan RNI.

Adapun limfosit T sitotoksik CD8<sup>+</sup> (CTL) mensekresi granulin, granzim dan perforin untuk membunuh sel yang terinfeksi mikobakteri dan mampu melindungi kekebalan terhadap tantangan mikobakteri sekunder (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010). Seperti sel T CD4<sup>+</sup>, sel T CD8<sup>+</sup> mampu menghasilkan IL-2, IFN- $\gamma$ , dan TNF, sitokin yang diketahui memiliki fungsi kritis selama infeksi *Mtb*. Yang penting, sel T CD8<sup>+</sup> memiliki fungsi sitolitik untuk membunuh sel yang terinfeksi *Mtb* melalui perforin, granzim, dan granulin atau menginduksi apoptosis (Lin & Flynn, 2015).

Resirkulasi sel T spesifik patogen sangat penting untuk mengaktifkan makrofag dan membatasi pertumbuhan mikobakteri dalam lesi granulomatosa yang baru terbentuk. Dengan adanya sel T yang teraktivasi, granuloma menjadi terorganisir sepenuhnya, dengan makrofag yang menampung mikobakteri di tengah dan tepinya dikelilingi oleh limfosit (Ehlers & Schaible, 2013). Jalan buntu berikutnya antara inang dan patogen jauh lebih dinamis daripada yang diperkirakan sebelumnya, dan melibatkan hilangnya sel secara terus-menerus oleh kematian sel dan pengisian kembali oleh rekrutmen seluler, serta *remodeling* vaskular dan jaringan (Ehlers &

Schaible, 2013).

Adapun sel B, umumnya tidak begitu dianggap memainkan peran penting dalam perlindungan terhadap TB. Hal ini disebabkan oleh dogma historis, yang dikemukakan pada awal abad kedua puluh, yang mendalilkan bahwa pertahanan *host* terhadap patogen intraseluler dimediasi oleh imunitas yang dimediasi sel, sedangkan respons terhadap patogen ekstraseluler dimediasi oleh antibodi yang dihasilkan dari sel B. Namun, studi yang lebih baru telah memberikan bukti baru bahwa sel B dan antibodi dapat berkontribusi secara signifikan untuk pertahanan *host* terhadap *Mtb* (Chan et al., 2014; Rijnink et al., 2021). Sebuah studi menunjukkan bahwa sel B112 diperlukan dalam perlindungan optimal pada tikus yang terinfeksi *Mtb* melalui interaksi dengan respon imun seluler dan aktivasi komplemen (Maglione & Chan, 2009). Selain itu, penelitian Bénard dkk., yang menganalisis transkriptom sel B yang diisolasi dari tikus yang diinfeksi *Mtb*, menunjukkan IFN tipe I yang diproduksi oleh sel B yang dirangsang *Mtb* mendukung polarisasi makrofag menuju fenotipe antiinflamasi selama infeksi *Mtb* (Bénard et al., 2018). Sel B juga berperan dalam organisasi struktural granuloma. Granuloma TB klasik mengandung daerah sentral, yang biasanya terdiri dari makrofag yang terinfeksi *Mtb* dan dapat diinfiltrasi dengan neutrophil, dan dapat berkembang menjadi nekrotik dengan debris seluler kaseosa. Di sekeliling pusat nekrotik ini terdapat lapisan makrofag

berbusa dan epiteloid yang diselingi dengan sel raksasa Langhans, yang pada tepinya dikelilingi oleh lapisan luar limfosit yang tersebar dengan makrofag. Di perifer, sel B membentuk struktur yang sangat terorganisir (menyerupai folikel sel B organ limfoid sekunder), yang disebut organ limfoid tersier, folikel limfoid ektopik atau, jika terbentuk di paru disebut *inducible bronchus-associated lymphoid tissue* (iBALT). Agregat sel B lesi ini adalah tempat utama proliferasi imun di paru-paru pasien TB aktif (Rijnink et al., 2021).

Peran antibodi selama infeksi *Mtb* ditunjukkan dalam beberapa studi. Pada studi transfer pasif, serum dari beberapa individu yang terinfeksi TB laten atau petugas kesehatan yang sangat terpapar, (tetapi tidak terinfeksi), mengandung antibodi pelindung sebagaimana yang ditunjukkan dengan transfer serum ke tikus yang dipaparkan *Mtb* secara aerosol (H. Li et al., 2017). Infeksi *Mtb* mengakibatkan IgA dan IgG spesifik mikobakteri dalam cairan *bronchoalveolar lavage* (BAL) (Demkow et al., 2005). Antibodi dapat mengikat antigen spesifik *Mtb* di lokasi penyakit, seperti granuloma tuberkulosis di mana sel plasma telah terbukti mengeluarkan antibodi, yang berpotensi berinteraksi dengan *Mtb* ekstraseluler dan/atau antigen *Mtb* bebas yang ada dalam granuloma itu sendiri, atau dalam cairan pleura (L. Feng et al., 2011; Grosset, 2003; Phuah et al., 2012). Selain itu, peran efektor antibodi yang paling penting melawan *Mtb* adalah opsonofagositosis, juga disebut *antibody-*

*dependent cellular phagocytosis* (ADCP) (Abebe & Bjune, 2009). *Mtb* mampu menghambat fusi fagosom-lisosom untuk menghindari paparan kandungan lisosom antimikroba (Kumar et al., 2015). Namun, dengan adanya ADCP, penghambatan oleh *Mtb* ini dapat diatasi dengan memicu fusi fagolisosom (Rijnink et al., 2021). Demikian pula, penelitian yang lebih baru telah menemukan peningkatan pematangan fagosom dengan adanya opsonisasi antibodi dan menunjukkan penurunan viabilitas mikobakteri pada fusi fagolisosom (T. Chen et al., 2016, 2020).

Munculnya limfosit spesifik *Mtb* sekitar 2-3 minggu pasca infeksi menandai akhir dari fase replikasi bakteri yang cepat dan permulaan keadaan "penahanan" yang, pada tikus, ditandai dengan jumlah bakteri yang relatif stabil. Pada saat ini granuloma mengalami vaskularisasi yang luas dan sel-sel secara aktif direkrut ke tempat infeksi. Pada granuloma yang menunjukkan patologi yang terkait dengan perkembangan penyakit, selubung fibrosa menjadi lebih jelas dan jumlah pembuluh darah yang menembus struktur berkurang (Russell et al., 2010).

Keseimbangan keadaan fisiologis populasi bakteri di dalam granuloma selama perubahan dinamis dalam strukturnya menjadi esensial dalam persistensi *Mtb* dan perkembangan penyakit. Penelitian pada model hewan yang menguji strain bakteri yang cacat pada gen penting untuk berbagai jalur metabolisme telah



menunjukkan defek yang berbeda selama siklus infeksi. Ini menyiratkan bahwa bakteri mengatur metabolismenya secara berbeda selama perkembangan penyakit (Barry et al., 2009). Pergeseran metabolisme tersebut dapat didorong oleh ketersediaan nutrisi atau sumber karbon tertentu, sifat aerobik atau hipoksia granuloma, atau tingkat stres yang disebabkan oleh berbagai sel inang yang terinfeksi dan respon imun. Karena variabilitas antara granuloma dalam satu individu yang terinfeksi dan struktur internalnya yang sangat berbeda, granuloma menawarkan lingkungan yang sangat beragam untuk *Mtb* (Russell et al., 2010). Selama masa laten, di mana tidak ada kondisi patologis atau menular, *Mtb* terkandung dalam granuloma, yang merupakan ciri khas TB. Diperkirakan bahwa respon imun ikut bertanggung jawab untuk pembentukan dan pemeliharaan granuloma, yang pada akhirnya akan menentukan hasil penyakit (Lugo-Villarino et al., 2018).

Dalam lesi yang mengandung *Mtb*, beban bakteri tampak relatif statis dan telah dihipotesiskan bahwa bakteri berada dalam keadaan metabolisme vegetatif non-replikatif (Russell et al., 2010). Namun, sebuah studi memantau adanya replikasi bakteri melalui plasmid "*clock*" yang tidak stabil. Hal ini menunjukkan bahwa populasi bakteri terus mengalami replikasi bahkan pada lesi yang tampaknya stabil (Gill et al., 2009).

Di dalam granuloma, diasumsikan bahwa *Mtb* tidak membelah diri atau hanya bereplikasi sangat sedikit, tetapi tetap sepenuhnya mampu menghasilkan energi (Cirillo & Kong, 2019; Ehlers & Schaible, 2013). Profil ekspresi genom RNA *Mtb* yang diisolasi dari paru-paru tikus yang terinfeksi kronis atau dahak pasien tuberkulosis menunjukkan tanda transkripsi yang mencerminkan kondisi lingkungan seperti pH rendah, penipisan oksigen, pembatasan zat besi, stres nitrosatif (yang ditandai oleh overproduksi oksida nitrat), dan kekurangan nutrisi (Ehlers & Schaible, 2013). Kekurangan nutrisi esensial yang dihadapi oleh *Mtb* dalam granuloma, dapat menyebabkan terhentinya pertumbuhan basil dan berkurangnya metabolisme. Data ekspresi gen dan protein yang berasal dari *Mtb* yang kekurangan nutrisi mengungkapkan bukti perlambatan aparatus transkripsi, metabolisme energi, biosintesis lipid, dan pembelahan sel, serta induksi respons yang ketat (Betts et al., 2002).

Adanya peningkatan jumlah makrofag berbusa, (*foamy macrophage*) mungkin bertanggung jawab untuk peningkatan puing-puing kaseosa di pusat granuloma. Pada tahap "akhir" ini, bagian kaseosa dari granuloma menjadi hipoksia, suatu kondisi yang dapat menginduksi keadaan persistensi non-replikatif pada *Mtb* dalam kultur. Histologi jaringan yang terinfeksi dari pasien imunokompeten dengan TB aktif mengungkapkan granuloma di semua keadaan perkembangan dari penahanan hingga penyakit aktif, yang

menyiratkan bahwa nasib setiap granuloma ditentukan secara lokal, bukan sistemik. Granuloma aktif menunjukkan patologi yang luas dan, akhirnya granuloma pecah dan menumpahkan ribuan basil infeksius ke dalam *airway*, menghasilkan perkembangan batuk produktif yang memfasilitasi penyebaran aerosol basil infeksi (Russell et al., 2010).

### **c. Mekanisme *Mtb* menghindari respon imun *host***

Karakteristik struktural *Mtb* memungkinkan *Mtb* menghambat pematangan dan pengasaman fagolisosom. Protein bakteri seperti *early secretory antigen-6* (ESAT-6) / *culture filtrate protein* (CFP) dan ATP1/2 (sekresi ATPase1/2, protein secA1/2) dapat menurunkan pH dan ini mempengaruhi pematangan fagosit. Protein lain, awalnya disebut protein mantel kaya triptofan aspartat dan sekarang dikenal sebagai coronin 1, direkrut ke fagosom yang mengandung basil aktif tetapi dengan cepat dilepaskan dari fagosom yang mengandung mikobakteri tidak aktif. *Mtb* menghambat pembentukan lisosom dengan meningkatkan ekspresi coronin 1 pada membran fagosit *host*; durasi proses rekrutmen dan jumlah coronin 1 berkorelasi positif dengan jumlah dan aktivitas *Mtb* teraktivasi (Zhai et al., 2019).

Menghambat fusi fagosom dengan lisosom juga merupakan mekanisme penting untuk menghambat pematangan fagosom/lisosom dalam makrofag. Penelitian telah menunjukkan

bahwa faktor transkripsi pro-inflamasi NF- $\kappa$ B mengatur pelepasan enzim lisosom ke dalam fagosom, sehingga mengatur pembunuhan patogen. Selanjutnya, produksi molekul transpor membran ditingkatkan oleh NF- $\kappa$ B, yang mengatur fusi fagolisosom selama infeksi (Gutierrez et al., 2008). Namun ESAT-6, protein yang disekresikan *Mtb*, dapat menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B (Dheda, Schwander, Zhu, van Zyl-smit, et al., 2010). Selain itu, interaksi DC-SIGN dengan ManLAM menyebabkan penghambatan pematangan sel dendritik (Tailleux et al., 2003). Seperti disebutkan di atas, *Mtb* dapat bertahan hidup di makrofag dengan menghambat fusi lisosom-fagosom. Namun, beberapa strain *Mtb* tidak dapat beradaptasi dengan kehidupan dalam vesikel endositik makrofag (Jamwal et al., 2016). Blokade fusi fagolisosom dianggap sebagai strategi penting bagi mikobakteri untuk bertahan hidup di makrofag. Namun, pada kultur makrofag, telah diamati adanya mikobakteri yang hidup dalam fagolisosom selama infeksi, dan mikobakteri memiliki MarP, faktor virulensi yang memberikan ketahanan asam *in vitro* (Levitte et al., 2016).

Ada bukti bahwa *Mtb* mengeksploitasi keseluruhan ligan TLR2 untuk menghasilkan beberapa mekanisme dalam rangka menghindari fungsi efektor makrofag. Makrofag yang terinfeksi *Mtb* telah mengurangi ekspresi MHC Kelas II yang mengakibatkan berkurangnya kemampuan untuk mempresentasikan antigen ke sel

T. Penghambatan ini juga dapat dimediasi oleh paparan berkepanjangan agonis *Mtb* TLR2 LpqH, LprG dan LprA. Pensinyalan TLR2 berkelanjutan juga memblokir respons makrofag terhadap IFN- $\gamma$  (Harding & Boom, 2010).

#### **d. Sinyal dan protein regulator yang penting selama latensi**

Ada banyak penelitian yang berfokus pada pemahaman faktor regulasi yang terlibat dalam inisiasi latensi, tetapi masih banyak yang belum diketahui. Protein pengatur DosR telah diidentifikasi sebagai faktor yang diduga terlibat serta protein pengatur Rel<sub>*Mtb*</sub> yang mengontrol respons ketat. Karena DosR dan Rel<sub>*Mtb*</sub> memainkan peran dalam persistensi basil tuberkulosis di inang, pemahaman yang lebih baik terkait jalur ini dapat menawarkan target baru untuk intervensi terapeutik dan mungkin juga berdampak pada vaksin dan diagnostik yang berfokus pada infeksi laten. Ada banyak sinyal yang terlibat dalam memicu jalur yang penting untuk persistensi bakteri selama latensi, termasuk hipoksia dan komposisi nutrisi (Cirillo & Kong, 2019).

Sejumlah penelitian mengidentifikasi beberapa gen hilir yang dikendalikan oleh regulator ini. DosR mengatur sensor kinase DosS dan DosT yang terlibat dalam kelangsungan hidup di bawah kondisi hipoksia di laboratorium dan pada tikus Kramnik, yang memiliki lebih banyak granuloma hipoksia daripada tikus tipe liar C57BL/6 (Gautam

et al., 2015). Regulasi DosR tampaknya penting untuk kelangsungan hidup *Mtb* selama hipoksia progresif dengan mengalihkan metabolisme dari respirasi aerobik dan mempertahankan tingkat energi dan keseimbangan redoks (Dutta & Karakousis, 2014).

Regulator lain, CarD, dikendalikan oleh Rel<sub>*Mtb*</sub>, protein yang terlibat dalam persistensi dan respons terhadap keterbatasan nutrisi (Stallings et al., 2009). Peran kunci dari keterbatasan nutrisi lebih ditekankan oleh keterlibatan DosR dalam mengontrol perolehan besi, termasuk gen mikobaktin yang penting untuk memperoleh besi. Ketika nutrisi hadir dan bakteri menyerang jaringan *host*, gen yang diatur DosR ditekan dan gen untuk jalur yang terlibat dalam invasi, pertumbuhan aerobik dan metabolisme menjadi meningkat. Baik sinyal yang mengontrol protein regulator ini maupun prediksi fungsi dari gen hilir yang dikendalikan menunjukkan bahwa hipoksia dan pembatasan zat besi adalah dua sinyal terpenting dalam keadaan persisten yang ada selama infeksi laten. Sinyal yang terlibat dalam reaktivasi mungkin serupa, melalui proses yang membalikkan kondisi ini, kemungkinan besar oleh perubahan *host* yang mengakibatkan bakteri terpapar ke lingkungan yang memiliki nutrisi tambahan dan oksigen yang cukup untuk memicu pertumbuhan baru (Cirillo & Kong, 2019).

Untuk mengetahui bagaimana *Mtb* keluar dari keadaan dormansi dan melanjutkan pertumbuhan, mungkin diperlukan satu

petunjuk dari produksi *resuscitation promoting factors* (Rpf) (Ehlers & Schaible, 2013). Rpf adalah enzim muralitik yang meningkatkan kemampuan kultur bakteri dorman (Kana & Mizrahi, 2010). Di antara lima Rpf yang diekspresikan *Mtb*, RpfB merupakan faktor anti-dormansi yang sangat kuat yang memiliki peran penting dalam resusitasi dan stimulasi pertumbuhan *Mtb* dari keadaan laten (Mukamolova et al., 2010). RpfB tidak ada dalam sel mamalia, yang menjadikannya target yang berpotensi, sangat selektif, dan menarik untuk pengembangan obat baru dalam mencegah resusitasi *Mtb* yang tidak aktif (Dwivedi et al., 2020).

#### **2.4. Luaran Infeksi *Mtb***

Setelah paparan aerosol terhadap *Mtb*, tiga kemungkinan hasil klinis, yaitu resistensi atau pembersihan dini basil *Mtb*, infeksi *Mtb* yang asimtomatik atau TB laten yang dapat bertahan selama beberapa dekade, atau tuberkulosis aktif bergejala, yang meliputi penyakit paru yang dapat menyebabkan penularan lebih lanjut (Simmons et al., 2018). Profil transkriptomik darah lengkap baru-baru ini telah memberikan wawasan baru tentang transisi dari TB subklinis ke TB aktif (Thompson et al., 2017; Zak et al., 2016). Namun, mengapa beberapa individu yang sangat terpajan tidak pernah tertular, atau mungkin segera menghilangkan infeksi, belum sepenuhnya dipahami.

Tingkat reaktivasi TB dapat dikurangi secara substansial hingga 90%, jika pasien infeksi TB laten mendapatkan obat preventif (Kiazyk & Ball, 2017). Namun, hingga saat ini, belum ada tes yang dapat diandalkan yang secara langsung untuk mendeteksi ada atau tidaknya *Mtb* pada individu yang tidak memiliki gejala. Tes reaktivitas kulit (TST) mengukur hipersensitivitas tipe lambat terhadap antigen mikobakteri dan telah menjadi standar emas untuk diagnosis infeksi TB laten selama lebih dari 100 tahun (Prasad et al., 2013; Simmons et al., 2018). Karena pada TST menggunakan PPD yang mengandung antigen protein yang tidak selalu spesifik untuk *Mtb* (campuran heterogen lebih dari dua ratus peptida mikobakteri yang berbeda), imunisasi sebelumnya dengan *Mycobacterium bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) atau paparan mikobakteri non-tuberkulosis dapat memberikan hasil positif palsu (Farhat et al., 2006; Gualano et al., 2019; Prasad et al., 2013; H. Yang et al., 2012). Tes pelepasan IFN- $\gamma$  (IGRA) dikembangkan sebagai tes diagnostik dari darah yang mengukur pelepasan IFN- $\gamma$  dari sel T CD4<sup>+</sup> setelah stimulasi dengan antigen *M. tuberculosis* spesifik (ESAT-6 dan CFP-10) dan dengan demikian, uji ini dapat menghindari hasil positif palsu pada individu yang sebelumnya telah divaksinasi BCG (Barcellini, Borroni, Brown, Brunetti, Campisi, et al., 2016). Baik TST maupun IGRA, keduanya bergantung pada deteksi respon imun spesifik, sehingga pada populasi *immunocompromised* seperti HIV,



sensitivitas pemeriksaan ini berkurang dengan hilangnya jumlah sel T CD4<sup>+</sup>, dan mengarah ke tingkat hasil negatif palsu yang tinggi (Santin et al., 2012).

Infeksi *Mtb* yang baru diperoleh merupakan faktor risiko yang sangat penting untuk berkembang menjadi TB aktif, dan, meskipun TB juga disebabkan oleh infeksi yang didapat dari jarak waktu yang jauh, sebagian besar kasus secara global muncul dari infeksi yang baru didapat (Behr et al., 2018). Oleh karena itu, perlu dilakukan identifikasi dan terapi pada mereka yang baru saja terinfeksi. Hal ini dipersulit dengan adanya kemungkinan infeksi ulang yang tinggi di negara-negara dengan insiden tinggi (Behr et al., 2018).

Di area endemis TB, beberapa orang dewasa yang terpapar *Mtb* berulang kali dapat tetap negatif pada tes PPD dan IGRA. Dalam beberapa referensi, kelompok ini disebut sebagai “*resister*”, yang dapat didefinisikan secara klinis sebagai individu yang resisten terhadap infeksi (Baliashvili et al., 2021; Simmons et al., 2018). Sebutan ini mencakup beberapa asumsi tentang paparan dan hasil uji diagnostik. Simmons dkk. mengusulkan kriteria dalam mendefinisikan *resister*. Pertama, tingkat keterpaparan yang tinggi sangat penting dan harus mencakup indeks intensitas paparan, misalnya, *bacillary load* yang tinggi (sputum BTA positif) dari kasus indeks yang diketahui dan kedekatan kontak (seperti tinggal serumah) serta durasi paparan secara kumulatif (misalnya,

pajanan berulang di rumah atau pekerjaan dengan risiko tertinggi tertular TB). Kedua, diagnosis *resister* membutuhkan hasil negatif untuk tes reaktivitas kulit PPD dan IGRA untuk menghindari kesalahan klasifikasi (Simmons et al., 2018).

Fenotip *resister* mungkin heterogen dan mungkin melibatkan mekanisme sistem imun bawaan dari pembersihan awal *Mtb* (resistensi bawaan), atau kekebalan protektif mungkin juga terjadi melalui respons imun adaptif (resistensi adaptif). Dalam kasus klirens bakteri segera, atau resistensi total terhadap infeksi (diamati pada sebagian kecil populasi) sistem imun bawaan akan menonaktifkan bakteri di tempat infeksi tanpa stimulasi respon imun adaptif. Orang-orang ini, baru-baru ini diberi label sebagai "*resister* bawaan" oleh Simmons dkk. dan menunjukkan hasil TST atau IGRA negatif meskipun terpapar *Mtb* dan terus menerus dan tidak akan berisiko TB klinis (Simmons et al., 2018). *Resister* yang memasang respons imun adaptif protektif disebut *resister* adaptif, melibatkan sel B atau respons sel T selama klirens bakteri. Juga menarik adalah orang-orang dengan infeksi laten TB yang tidak memiliki risiko perkembangan menjadi TB klinis, disebut "non-pelanjut", mungkin karena eliminasi *Mtb* yang sangat baik atau tidak adanya bakteri yang hidup dalam granuloma. Penjelasan dari korelasi genetik yang berkontribusi terhadap infeksi dan fenotipe resistensi penyakit adalah prioritas karena dapat diterjemahkan ke intervensi baru untuk

mencegah, mendiagnosis, atau mengobati TB (Möller et al., 2018)

Banyak bukti penelitian, termasuk studi kembar, imunodefisiensi primer Mendelian (Rosain et al., 2019), hubungan genom dan studi kandidat-gen menunjukkan bahwa genetika inang mempengaruhi kerentanan terhadap TB (Ghanavi et al., 2020; Harishankar et al., 2018; Moller & Hoal, 2010; Rosain et al., 2019; Simmons et al., 2018). (H. van Tong et al., 2017). Alel resisten dapat memodulasi sejumlah fungsi pembersihan jalur napas atau mekanisme antimikroba makrofag. Beberapa penelitian telah mengaitkan kerentanan terhadap infeksi bakteri dengan polimorfisme di TLR, pengatur fungsi TLR, *C-type lectin* dan jalur lain untuk produksi sitokin pro-inflamasi. Namun, hanya beberapa dari studi ini mendefinisikan polimorfisme fungsional dan asosiasi yang diidentifikasi dengan fenotipe klinis memerlukan replikasi pada populasi lain (Dheda et al., 2016).

### **3. Diagnosis TB Paru**

Diagnosis penyakit TB berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan penunjang termasuk pemeriksaan radiologi, dan tes uji diagnostik berupa tes cepat molekuler, pewarnaan mikroskopik BTA, dan kultur. Keluhan yang dirasakan pasien TB dapat bermacam-macam atau malah tanpa keluhan sama sekali. Keluhan yang terbanyak adalah (Amin and Bahar, 2014):

- a. Demam berupa demam subfebril menyerupai demam influenza, tetapi kadang-kadang panas badan dapat mencapai 40-41°C,
- b. Batuk, terjadi karena adanya iritasi pada bronkus, mulai dari batuk kering (non-produktif) kemudian setelah timbul peradangan menjadi produktif (menghasilkan sputum). Keadaan yang lanjut dapat berupa batuk darah karena pembuluh darah yang pecah. Kebanyakan batuk darah pada TB terjadi pada kavitas, tetapi dapat juga terjadi pada ulkus dinding bronkus.
- c. Sesak napas, ditemukan pada penyakit yang sudah lanjut, yang infiltrasinya sudah meliputi setengah bagian paru-paru.
- d. Nyeri dada timbul bila infiltrasi radang sudah sampai ke pleura sehingga menimbulkan pleuritis, terjadi gesekan kedua pleura sewaktu pasien menarik/melepaskan napasnya.
- e. Malaise. Penyakit TB bersifat radang yang menahun. Malaise sering ditemukan berupa anoreksia, nafsu makan berkurang, penurunan berat badan, sakit kepala, meriang, nyeri otot, berkeringat pada malam hari.

Pemeriksaan fisis mencakup keadaan umum pasien, dapat ditemukan konjungtiva anemis, atau suhu badan subfebris, atau status gizi yang kurang. Pada pemeriksaan fisis, pasien sering tidak menunjukkan suatu kelainan, terutama pada kasus-kasus dini atau

yang sudah terinfiltrasi secara asimtomatik. Tempat kelainan lesi paru yang paling dicurigai adalah bagian apeks paru. Bila dicurigai adanya infiltrat yang agak luas, maka didapatkan perkusi yang redup. Dapat juga didapatkan ronkhi basah, kasar pada auskultasi. Bila terdapat kavitas yang cukup besar, perkusi dapat memberikan suara hipersonor atau timpani dan auskultasi memberikan suara amforik. Pada tuberkulosis paru lanjut dengan fibrosis yang luas, sering ditemukan atrofi dan retraksi otot-otot interkostal. Bagian paru yang sakit akan menciut dan menarik isi mediastinum atau bagian paru lainnya. Bila jaringan fibrotik meluas yakni lebih dari setengah jumlah paru, akan terjadi pengecilan daerah aliran darah paru dan selanjutnya meningkatkan tekanan arteri pulmonalis (hipertensi pulmonal) diikuti terjadinya kor pulmonal dan gagal jantung kanan. Dari proses tersebut, maka akan menimbulkan tanda-tanda cor pulmonal dengan gagal jantung kanan seperti takipnea, takikardi, sianosis, *right ventricular lift*, murmur, bunyi P2 yang mengeras, tekanan vena jugularis yang meningkat, hepatomegali, asites, dan edema (Amin and Bahar, 2014).

Pemeriksaan radiologi berupa foto x-ray dada dapat memberikan gambaran lesi dan lokasi lesi pada paru. Lokasi lesi TB umumnya di apeks paru (segmen apikal lobus atas atau segmen apikal lobus bawah) tetapi dapat juga mengenai bagian inferior atau daerah hilus menyerupai tumor paru. Pada awal penyakit, lesi dapat

tampak seperti gambaran berawan dengan batas yang tidak tegas. Bila lesi telah diliputi jaringan ikat, maka bayangan terlihat seperti bulatan dengan batas yang tegas. Lesi ini dikenal sebagai tuberkuloma. Pada kavitas bayangannya berupa cincin yang mula-mula berdinding tipis. Bila terjadi fibrosis maka terlihat bayangan yang bergaris (Amin and Bahar, 2014). Diagnosis pasti (*gold standard*) tuberkulosis adalah menemukan kuman *Mycobacterium tuberculosis* dalam sputum atau jaringan paru secara biakan atau kultur. Uji diagnostik TB ini mencakup:

a. Tes cepat molekuler (*Rapid molecular tests*)

Yang direkomendasikan oleh WHO saat ini hanyalah Xpert *MTB/RIF* assay (Cepheid, USA). Pemeriksaan ini memberikan hasil dalam waktu 2 jam, dan awalnya (tahun 2010) direkomendasikan untuk diagnosis TB pada dewasa. Sejak tahun 2013, pemeriksaan ini juga direkomendasikan untuk anak-anak dan diagnosis spesifik TB ekstrapulmoner. Tes ini memiliki akurasi yang lebih baik dibanding pewarnaan sputum mikroskopik (World Health Organization, 2018).

b. Pewarnaan sputum mikroskopik

Telah dikembangkan sejak 100 tahun lalu, teknik ini memeriksa ada tidaknya bakteri pada spesimen sputum dengan menggunakan mikroskop. Pemeriksaan ini dapat dilakukan

dengan melakukan pewarnaan basil tahan asam (BTA) metode Ziehl Neelsen (ZN) dan dilakukan pada sputum yang diambil pada tiga waktu berbeda atau yang dikenal dengan sewaktu, pagi, sewaktu (S,P,S). Berdasarkan rekomendasi WHO, satu di antara ketiganya saja yang positif maka tegak diagnosis TB paru. Namun, kuman ini mampu mendeteksi apabila jumlah basil  $> 10^5$ , sehingga hasil negatif dari pemeriksaan mikroskopik belum pasti menunjukkan pasien suspek TB secara klinis tidak terinfeksi kuman TB. Berdasarkan beberapa studi, sensitivitas pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan ZN pada sampel sputum sekitar 22-43%. Sensitivitas dapat mencapai 60% dibawah kondisi optimal jika dibandingkan dengan kultur. Beberapa modifikasi pewarnaan ZN telah dikembangkan untuk meningkatkan sensitivitas ini. Dengan demikian, idealnya, pemeriksaan kultur tetap harus dilakukan (Pai *et al.*, 2006; Massi, 2012).

#### c. Metode kultur

Pemeriksaan kultur metode konvensional terdiri dari media agar dan media telur seperti media Lowenstein-Jensen (LJ) dan middlebrook agar. Kedua media tersebut merupakan media padat dan memerlukan waktu 3-8 minggu untuk masa inkubasi. Bila sampai 8 minggu atau 56 hari tidak ada pertumbuhan koloni maka hasilnya dinyatakan kultur negatif.

Menurut WHO hasil pada media LJ diinterpretasikan dengan melihat bentuk koloni yang besar, bulat, berwarna kekuning-kuningan seperti kembang kol menunjukkan hasil positif. Media cair lebih cepat menimbulkan pertumbuhan kuman. Middlebrook 7H9 merupakan medium pertumbuhan cair khusus untuk kultur *M. tuberculosis*. Media ini telah menunjukkan hasil yang sangat baik dalam mengisolasi kuman TB dibanding LJ, namun harganya mahal. Medium Bactec MGIT 960 contohnya, merupakan medium kultur kuman *M. tuberculosis* yang berisi modifikasi dari Middlebrook 7H9 broth yang dihubungkan dengan suatu sinar yang dapat berfluoresens bila ditemukan mycobacteria yang hidup hidup karena menggunakan oksigen yang ada pada dasar tabung. Medium MGIT dapat mendeteksi kuman *Mycobacterium* dalam waktu 1 minggu (Massi, 2012).

Meskipun penyakit TB dapat dilihat sebagai infeksi yang bersifat kontinyu dan dinamis dari infeksi *Mtb* menjadi suatu penyakit menular atau aktif, secara sederhana, pasien TB dikategorikan menjadi dua kelompok, yaitu infeksi TB laten (LTBI) atau penyakit TB aktif. Infeksi dapat berkembang atau malah berhenti berkembang, tergantung pada sistem imun dan komorbiditas *host*. Eliminasi patogen ini dapat terjadi, baik karena respon imun bawaan atau karena respon imun seluler. Pada individu dimana patogen



telah tereliminasi oleh respon imun bawaan tanpa sel T *priming* atau sel memori, dapat menunjukkan hasil uji kulit tuberkulin (TST) atau hasil tes pelepasan interferon- $\gamma$  (IGRA) negatif. Pada beberapa individu, patogen dapat tereliminasi, namun respons sel T memori yang kuat tetap ada dan akan memberikan hasil positif pada TST atau IGRA. Orang-orang ini tidak akan mendapatkan keuntungan dari pengobatan infeksi TB laten. Jika patogen tidak tereliminasi, bakteri bertahan dalam keadaan dorman atau laten yang dapat dideteksi sebagai hasil TST atau IGRA positif. Kedua tes ini menghasilkan respons sel T terhadap antigen *Mtb*. Pasien-pasien ini akan mendapat manfaat dengan salah satu rejimen terapi pencegahan infeksi TB laten yang direkomendasikan (kebanyakan isoniazid 6-9 bulan). Pasien dengan TB subklinis mungkin tidak menunjukkan gejala, namun akan bersifat kultur positif (tapi umumnya BTA-negatif karena rendahnya jumlah basil). Pasien dengan penyakit TB aktif mengalami gejala seperti batuk, demam dan penurunan berat badan, dan diagnosis biasanya dapat dikonfirmasi dengan tes dahak, kultur dan molekuler. Pasien dengan penyakit TB aktif terkadang negatif pada TST atau IGRA karena alergi yang disebabkan oleh penyakit itu sendiri atau supresi imunitas yang disebabkan oleh kondisi komorbid, seperti infeksi HIV atau malnutrisi. Individu dengan penyakit TB subklinis atau aktif harus menerima salah satu rejimen pengobatan yang

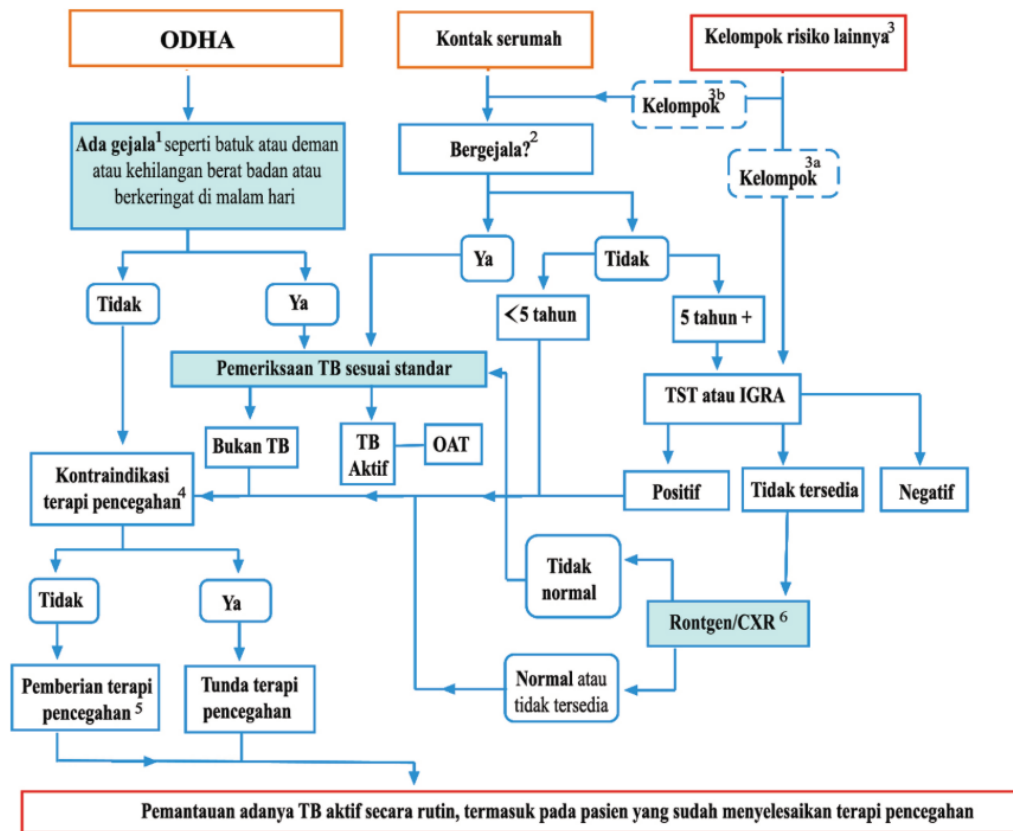
direkomendasikan untuk penyakit TB aktif, yang terdiri dari fase intensif dengan empat obat, dilanjutkan dengan fase kelanjutan yang lebih lama dengan dua obat (Pai *et al.*, 2016).

#### **4. Interferon-Gamma Release Assay (IGRA)**

IGRA adalah uji *in vitro* berbasis darah lengkap yang mengukur produksi interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oleh sel imun sebagai respons terhadap stimulasi antigen *Mtb* (Kiazyk & Ball, 2017). Prinsip IGRA adalah ketika sel T individu yang terinfeksi TB dirangsang kembali dengan antigen *Mtb*, sel T melepaskan sitokin IFN- $\gamma$ . IGRA positif menunjukkan adanya antibodi spesifik dalam tubuh pasien yang sistem kekebalannya telah terpapar TB, dan kadar IFN- $\gamma$  spesifik *Mtb* yang dihasilkan telah mencapai ambang hasil IGRA positif (Pai *et al.*, 2008). Hasil positif dapat menunjukkan adanya bakteri *Mtb*, baik dalam status aktif maupun dorman (J. Y. Kim *et al.*, 2018; Lalvani & Pareek, 2010).

IGRA digunakan untuk menyaring serta mendiagnosis TB laten sebagaimana yang ditunjukkan dalam algoritma pemeriksaan infeksi laten TB (Gambar 2), namun IGRA bukan satu-satunya metode yang digunakan untuk mengidentifikasi seseorang dengan TB laten (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020; Zellweger *et al.*, 2020). Konfirmasi TB laten memerlukan pemeriksaan klinis serta foto rontgen dada yang bersih dari bercak TB (Kementerian Kesehatan

Republik Indonesia, 2020). Metode lain yang dapat digunakan untuk mendeteksi latensi TB selain IGRA yaitu TST. Namun, IGRA dianggap memiliki nilai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi (Trajman et al., 2013). Keunggulan IGRA dibanding TST yaitu dengan pemeriksaan IGRA, hasil positif palsu dapat dihindarkan pada individu yang sebelumnya telah divaksinasi BCG (Barcellini, Borroni, Brown, Brunetti, Campisi, et al., 2016). Selain itu, pemeriksaan IGRA dapat dilakukan cukup dengan satu kali kunjungan pasien, berbeda dengan TST yang membutuhkan dua kali kunjungan pasien, dimana kunjungan pertama untuk injeksi tuberkulin dan kunjungan kedua untuk interpretasi hasil setelah 48-72 jam injeksi tuberkulin. Dengan IGRA, risiko *loss to follow up* dalam proses skrining infeksi TB dapat diminimalisir (Linas et al., 2011). Namun, pemeriksaan IGRA ini membutuhkan infrastruktur dan kapasitas teknis laboratorium yang lebih besar, yang berarti lebih mahal dibandingkan TST (Kiazyk & Ball, 2017).



Gambar 2. Penggunaan IGRA dalam algoritma pemeriksaan infeksi laten tuberkulosis dan terapi pencegahan tuberkulosis pada individu berisiko. Diadaptasi dari WHO consolidated guidelines on tuberculosis: tuberculosis preventive treatment, 2020 (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020)

Pengembangan IGRA berasal dari kemajuan penelitian genomik mikobakteri yang mengidentifikasi segmen genom (*Region of Difference 1*) yang tidak ditemukan pada semua strain BCG dan sebagian besar mikobakteri lingkungan (kecuali *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. flavescens*, dan *M. gastrii*) (Lalvani & Pareek, 2010; Whitworth et al., 2013). Dua antigen yang dikode oleh segmen ini, ESAT-6 dan CFP-10, merupakan target kuat sel T Th1 pada infeksi *Mtb*. Kedua antigen mampu memperoleh respons sel T

yang kuat dan spesifik mengurangi frekuensi hasil TST positif palsu pada individu yang sebelumnya telah menerima vaksinasi BCG (Barcellini, Borroni, Brown, Brunetti, Campisi, et al., 2016).

Interpretasi pemeriksaan IGRA terdiri dari positif, negatif, dan *indeterminate*. Hasil IGRA positif didefinisikan sebagai respons IFN- $\gamma$  terhadap satu atau lebih antigen spesifik *Mtb* di atas batas yang direkomendasikan, terlepas dari respons IFN- $\gamma$  terhadap kontrol mitogen. Hasil IGRA negatif adalah respons IFN- $\gamma$  di bawah batas untuk semua protein spesifik *Mtb*, dengan respons terhadap kontrol mitogen di atas batas. Hasil *indeterminate* didefinisikan sebagai respons IFN- $\gamma$  di bawah batas untuk kedua protein spesifik *Mtb* dan kontrol mitogen, atau respons IFN- $\gamma$  di atas batas dalam kontrol nihil (Banfield et al., 2012).

Salah satu kit komersial pemeriksaan IGRA berbasis *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yang banyak digunakan, yaitu QuantiFERON-TB Plus (QFT-Plus; Qiagen, Hilden, Jerman), merupakan generasi baru dari QFT-Gold in Tube (QFT-GIT), dengan tambahan tabung antigen (TB2). QFT-Plus terdiri dari empat buah tabung, yang terdiri dari Nil, TB1, TB2, dan Mitogen (Qiagen, 2019).

Tabung Nil merupakan tabung kontrol negatif, dimana tabung ini tidak mengandung tambahan antigen. Tabung Nil ini digunakan untuk menentukan apakah pasien memiliki respon imun yang sudah

ada sebelumnya (seperti efek antibodi heterofil, dan produksi interferon gamma non-spesifik) yang dapat menyebabkan hasil positif palsu pada tes. Agar tes valid, tabung Nil harus memiliki nilai  $\leq 8,0$  IU/mL (Qiagen, 2019).

Adapun tabung TB1 mengandung peptida turunan ESAT-6, dan CFP-10 (TB-7.7, yang sebelumnya ada pada QFT-GIT, tidak disertakan lagi pada QFT-Plus), dirancang untuk mengeluarkan respon imun yang dimediasi sel dari limfosit CD4<sup>+</sup> T-helper. Sedangkan TB2 mengandung peptida tambahan yang mampu menstimulasi produksi IFN- $\gamma$  oleh sel T CD8<sup>+</sup> (Barcellini, Borroni, Brown, Brunetti, Campisi, et al., 2016; Qiagen, 2019). Dalam riwayat alami infeksi *Mtb*, sel T CD4<sup>+</sup> memainkan peran penting dalam kontrol imunologis melalui sekresi sitokin IFN- $\gamma$ . Selain itu, sel T CD8<sup>+</sup> juga berpartisipasi dalam pertahanan inang terhadap *Mtb* dengan memproduksi IFN- $\gamma$  dan faktor terlarut lainnya, yang mengaktifkan makrofag untuk menekan pertumbuhan *Mtb*, membunuh sel yang terinfeksi, atau secara langsung melisis *Mtb* intraseluler (Brookes et al., 2003; J. Turner & Dockrell, 1996). Perbedaan dalam produksi IFN- $\gamma$  antara dua tabung antigen (TB2-TB1) memberikan perkiraan respons CD8<sup>+</sup> spesifik, dan dapat mengindikasikan infeksi TB baru-baru ini (Chee et al., 2018). Respons sel T CD8<sup>+</sup> dilaporkan meningkat pada subjek yang baru saja melakukan kontak dengan pasien TB, sedangkan respon sel T

CD4<sup>+</sup> tampaknya berkorelasi dengan TB aktif pada pasien yang diuji dengan QFT-GIT. Dengan demikian, respons sel T CD8<sup>+</sup> mungkin lebih kuat pada permulaan infeksi (Nikolova et al., 2012).

Tabung mitogen digunakan dalam uji QFT-Plus sebagai kontrol positif. Tabung kontrol mitogen berisi mitogen (phytohaemoglutin-P), yang merupakan stimulator sel T non-spesifik. Tabung ini digunakan untuk memastikan pasien memiliki status kekebalan yang sehat dan juga berfungsi sebagai kontrol untuk penanganan dan inkubasi darah yang benar. Tabung mitogen digunakan untuk mendeteksi pembacaan negatif palsu. Agar uji valid, tabung mitogen harus memiliki nilai interferon gamma 0,5 IU/mL lebih tinggi dari nilai tabung Nil. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol mitogen, sebagai kontrol positif, berfungsi dengan baik (Qiagen, 2019).

Uji QFT-Plus dianggap positif untuk respons IFN- $\gamma$  terhadap salah satu tabung antigen TB yang secara signifikan di atas nilai Nil IFN- $\gamma$  IU/ml. Sampel plasma dari tabung mitogen berfungsi sebagai kontrol positif IFN- $\gamma$  untuk setiap spesimen yang diuji. Respon yang rendah terhadap Mitogen (<0,5 IU/ml) menunjukkan hasil yang tidak pasti (*indeterminate*) ketika sampel darah juga memiliki respons negatif terhadap antigen TB. Pola ini dapat terjadi pada kondisi seperti kadar limfosit yang rendah, penurunan aktivitas limfosit karena penanganan spesimen yang tidak tepat,

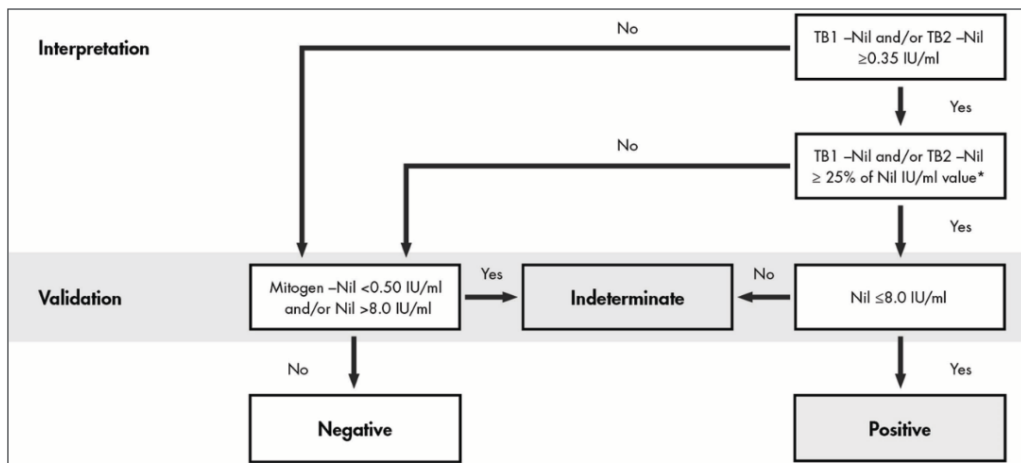
pengisian/pencampuran tabung Mitogen yang salah, atau ketidakmampuan limfosit pasien untuk menghasilkan IFN- $\gamma$ . Peningkatan kadar IFN- $\gamma$  dalam sampel Nil dapat terjadi dengan adanya antibodi heterofil, atau sekresi IFN- $\gamma$  intrinsik. Tabung Nil menyesuaikan latar belakang (misalnya, peningkatan kadar IFN- $\gamma$  dalam sirkulasi atau adanya antibodi heterofil). Kadar IFN- $\gamma$  tabung Nil dikurangi dari kadar IFN- $\gamma$  untuk tabung antigen TB dan tabung Mitogen (Qiagen, 2019).

Interpretasi hasil IGRA dengan menggunakan QFT-Plus ditunjukkan pada gambar 3. Respon terhadap kontrol positif Mitogen (dan kadang-kadang Antigen TB) dapat berada di luar jangkauan pembaca ELISA, namun hal ini tidak berdampak pada hasil tes. Nilai  $>10$  ml dilaporkan oleh perangkat lunak QFT-Plus sebagai  $>10$  IU/ml. ‡ Hasil indeterminate dapat disebabkan penyimpangan dalam proses ELISA, kadar IFN- $\gamma$  dalam sirkulasi yang berlebihan atau adanya antibodi heterofil, atau masa inkubasi yang lebih dari 16 jam antara pengambilan spesimen darah dan inkubasi pada  $37^{\circ}\text{C}$ . Dalam studi klinis, kurang dari 0,25% subjek memiliki kadar IFN- $\gamma$   $>8,0$  IU/ml untuk nilai Nil (Qiagen, 2019).



| Nil (IU/ml) | TB1 minus Nil (IU/ml)                | TB2 minus Nil (IU/ml)                | Mitogen minus Nil (IU/ml)* | QFT-Plus Result | Report/Interpretation   |
|-------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|-----------------|---|
| ≤8.0        | ≥0.35 and ≥ 25% of Nil value         | Any                                  | Any                        | Positive†       | <i>M. tuberculosis</i> infection likely                             |
|             | Any                                  | ≥0.35 and ≥ 25% of Nil value         |                            |                 |   |
|             | <0.35 or ≥0.35 and <25% of Nil value | <0.35 or ≥0.35 and <25% of Nil value | ≥0.5                       | Negative        | <i>M. tuberculosis</i> infection NOT likely                         |
|             | <0.35 or ≥0.35 and <25% of Nil value | <0.35 or ≥0.35 and <25% of Nil value | <0.5                       | Indeterminate‡  | Likelihood of <i>M. tuberculosis</i> infection cannot be determined |
| >8.0§       | Any                                  |                                      |                            |                 |   |

Gambar 3. Interpretasi hasil IGRA dengan menggunakan QFT-Plus (Qiagen, 2016).



Gambar 4. Diagram alur interpretasi hasil IGRA dengan menggunakan QFT-Plus  
 \*Untuk validitas TB1 minus Nil atau TB2 minus Nil, jumlah 25% dari nilai Nil IU/ml harus dari tabung yang sama dengan hasil asli 0,35 IU/ml (Qiagen, 2016).

Besarnya tingkat IFN- $\gamma$  yang diukur tidak dapat dikorelasikan dengan stadium atau derajat infeksi, tingkat respons imun, atau kemungkinan berkembang menjadi penyakit aktif. Respon TB positif

pada orang yang negatif terhadap mitogen jarang terjadi, tetapi telah terlihat pada pasien dengan penyakit TB. Hal ini menunjukkan respon IFN- $\gamma$  terhadap antigen TB lebih besar dibandingkan dengan mitogen, hal ini dimungkinkan karena kadar mitogen tidak secara maksimal merangsang produksi IFN- $\gamma$  oleh limfosit (Qiagen, 2019).

Hasil *indeterminate* mungkin dapat disebabkan karena adanya masalah dalam proses pengerjaan ELISA, seperti perubahan warna nonspesifik, pembacaan densitas optik yang rendah pada standar, dan kurva standar non-linear. Perubahan warna nonspesifik dapat disebabkan oleh proses pencucian *plate* yang tidak sempurna, kontaminasi silang sumur ELISA, kit / komponen telah kedaluwarsa, larutan substrat enzim terkontaminasi, dan pencampuran plasma dalam tabung QFT-Plus sebelum panen. Pembacaan densitas optik yang rendah pada standar, dapat disebabkan karena kesalahan teknis saat dilusi standar, pipetting, temperatur inkubasi saat ELISA terlalu rendah, waktu inkubasi yang terlalu singkat, panjang gelombang saat pembacaan ELISA yang tidak sesuai, dan suhu reagen yang rendah ketika digunakan (belum mencapai suhu ruangan). Adapun kurva standar yang tidak linear dapat disebabkan oleh proses pencucian yang tidak sempurna, masalah pipetting, atau kesalahan dalam dilusi reagen standar. Selain masalah teknis, hasil *indeterminate* juga dapat disebabkan tingginya kadar IFN- $\gamma$  dalam sirkulasi atau adanya antibodi heterofil,

atau masa inkubasi yang lebih dari 16 jam antara pengambilan spesimen darah dan inkubasi pada 37°C. Selain itu, hasil *indeterminate* dengan respon yang rendah terhadap Mitogen (<0,5 IU/ml) dan respons negatif terhadap antigen TB dapat ditemukan pada keadaan dimana limfosit tidak mampu menghasilkan kadar IFN- $\gamma$ , sebagaimana yang dijelaskan sebelumnya (Qiagen, 2019).

Sebuah studi yang mengevaluasi IGRA (di daerah dengan insiden TB rendah pada kontak TB dan imigran baru dari negara-negara dengan insiden tinggi) menunjukkan nilai prediksi negatif dari IGRA cukup tinggi, bahkan mencapai 99%. Namun, nilai prediksi positif IGRA hanya 3-4% (Abubakar et al., 2018). Dengan demikian, hasil IGRA negatif dapat diandalkan dalam memprediksi tidak berkembangnya TB aktif, tetapi hanya 3-4% dari individu dengan hasil IGRA positif dapat berkembang menjadi TB aktif. Dengan kata lain, jumlah orang yang terpajan TB dengan IGRA-positif yang perlu diobati untuk mencegah satu kasus TB adalah sebesar 25-33 orang, dengan asumsi kepatuhan 100% dan efektivitas terapi pencegahan (Lalvani et al., 2019).

## **B. Tinjauan Umum Polimorfisme**

Polimorfisme didefinisikan sebagai mutasi dengan frekuensi alel minimal 1% dalam suatu populasi. Polimorfisme merupakan varian sekuens DNA yang terjadi dalam populasi dan dapat menyebabkan efek

biologis sederhana namun nyata (Köstner et al., 2009). Karena kelimpahannya dalam genom manusia serta frekuensinya yang tinggi dalam populasi manusia, polimorfisme sering diteliti dengan tujuan menjelaskan variasi risiko penyakit, salah satunya adalah dengan studi asosiasi. (W. Li et al., 2001). Menurut Shastri dan Li, dkk., manusia membawa sejumlah besar polimorfisme yang dapat menyebabkan efek seluler yang berbeda karena berbagai mekanisme seperti meningkat atau menurunnya transkripsi, berubahnya aktivitas pasca transkripsi atau pasca translasi atau perubahan dalam struktur tersier produk gen (W. Li et al., 2001; Shastri, 2002).

Bentuk variasi DNA yang paling sederhana di antara individu adalah substitusi satu nukleotida tunggal dengan yang lain yang juga disebut polimorfisme nukleotida tunggal (*single nucleotide polymorphism* / SNP). SNP yang terletak di dalam kerangka pembacaan terbuka (*open reading frame*) dapat menyebabkan perubahan stabilitas mRNA atau efisiensi translasi, serta perubahan struktur atau aktivitas protein yang dikodekan. Namun, sebagian besar SNP terletak di luar gen dan diduga mempengaruhi tingkat ekspresi gen dan organisasi genom / kromatin. Oleh karena itu, menarik untuk menentukan peran SNP ini di bidang klinis (Shastri, 2009; Van Den Broeck et al., 2014).

Tujuan studi asosiasi dalam populasi adalah untuk mengidentifikasi pola polimorfisme yang bervariasi secara sistematis antara individu dengan keadaan atau status penyakit yang berbeda, dan

oleh karena itu pola polimorfisme ini dapat menggambarkan alel yang berefek meningkatkan risiko penyakit atau sebagai alel yang bersifat protektif dari penyakit. Dalam banyak situasi, polimorfisme kausal tidak diketahui. Untuk menemukannya, lebih dari satu polimorfisme dipertimbangkan untuk dianalisis. Kumpulan polimorfisme yang ditransmisikan bersama di setiap kromosom yang dihasilkan disebut *haplotype* (Balding, 2006). Dalam studi asosiasi *haplotype*, banyak genotipe direduksi menjadi *haplotype* dan ini telah terbukti menjadi teknik pemetaan yang lebih efisien daripada analisis SNP (Shastry, 2002).

Korelasi statistik yang dapat diamati antara polimorfisme berbeda yang lebih dekat terletak di kromosom yang sama, disebut *linkage disequilibrium* (LD) (Balding, 2006; Solé et al., 2006). Asosiasi ini berawal dari meiosis, proses pembelahan sel yang terjadi pada pematangan sel gamet. Pada akhir proses, ada dua gamet, masing-masing gamet dengan satu salinan dari setiap pasangan kromosom. Kromosom ini tidak akan identik dengan kromosom induk karena proses rekombinasi (fragmen salinan berbeda dari pasangan kromosom yang sama dipertukarkan selama meiosis). Dengan demikian, kromosom yang diwarisi oleh keturunannya akan menjadi kombinasi antara kromosom ibu dan ayah. Meskipun demikian, kemungkinan terjadinya rekombinasi antara lokus yang lebih dekat sangat rendah, dan biasanya lokus tersebut ditransmisikan dalam bentuk blok (Solé et al., 2006).

Sehingga, adanya suatu polimorfisme memprediksi adanya polimorfisme lain yang terkait dengannya, atau dengan kata lain polimorfisme yang terletak dekat dengan polimorfisme kausal akan terkait dengan penyakit juga, dan menganalisis kumpulan lokus dapat sangat berguna untuk menemukan polimorfisme kausal yang sebenarnya (Balding, 2006; Köstner et al., 2009). Dengan demikian, LD menggambarkan kejadian bersama dari alel polimorfisme yang berdekatan satu sama lain (Wall & Pritchard, 2003).

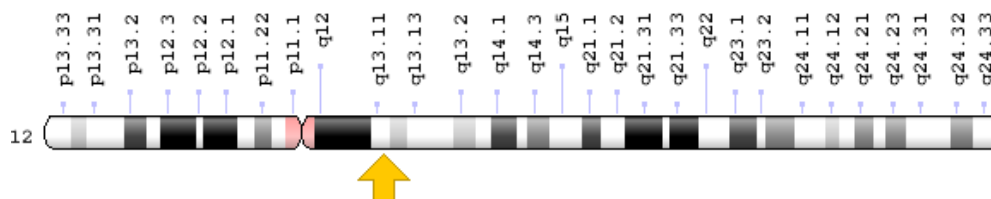
Banyak SNP terhubung satu sama lain melalui LD, yang merupakan asosiasi non-acak alel di dua lokus atau lebih, yang diturunkan dari satu kromosom leluhur (Van Den Broeck et al., 2014). Untuk menentukan LD, digunakan parameter statistik  $D$ , yaitu penyimpangan antara frekuensi *haplotype* yang diharapkan (dengan asumsi tidak ada asosiasi) dan frekuensi yang diamati (Solé et al., 2006). Sementara itu,  $D'$  didefinisikan sebagai rasio  $D$  terhadap nilai absolut maksimumnya, dengan frekuensi alelnya (Slatkin, 2008).  $D'$  berkisar antara -1 hingga +1 dimana nilai mendekati 0 bermakna kedua lokus tidak berada dalam LD, dan nilai -1 dan +1 bermakna kedua lokus berada dalam LD yang sempurna (tidak ada bukti rekombinasi antara kedua lokus) (Calabrese, 2019). Cara lain yang umum digunakan untuk mengukur LD adalah dengan  $r^2$ , yang merupakan koefisien korelasi antara alel. Nilai  $r^2$  berkisar antara 0 hingga 1, nilai 0 bermakna kedua lokus berada dalam ekuilibrium sempurna (tidak berada dalam LD), dan

nilai 1 menunjukkan kedua lokus memberikan informasi yang identik (berada dalam LD sempurna). Secara umum,  $r^2$  mirip dengan  $D'$  yang bisa menjadi hampir satu bahkan jika satu atau kedua alel memiliki frekuensi rendah (Slatkin, 2008).

### C. Tinjauan tentang *Vitamin D Receptor* (VDR)

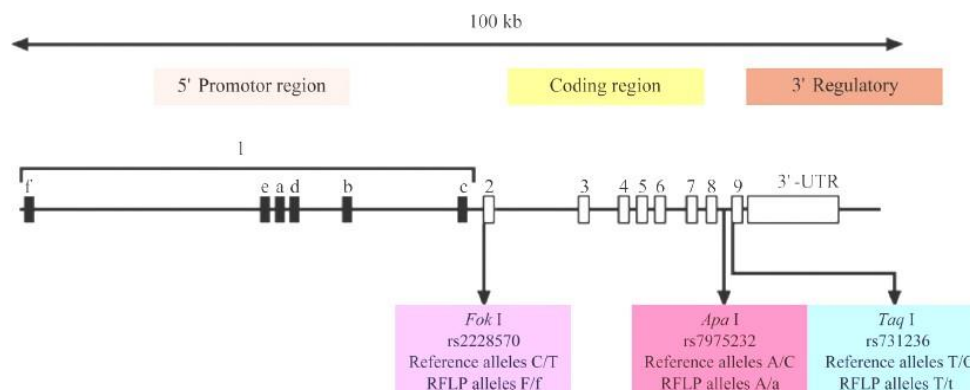
#### 1. *Vitamin D Receptor* (VDR)

Gen *Vitamin D Receptor* (VDR) dipetakan ke wilayah kromosom manusia 12q13-14 (gambar 5) dan panjangnya sekitar 100 kb, terdiri dari 5' wilayah promotor, 14 ekson (*protein-coding* ekson 2-9 dan ekson yang tidak diterjemahkan 1a-1f) sebagaimana yang ditunjukkan pada gambar 6 (Yongchao Li et al., 2015; Sato et al., 2012).



Gambar 5. Lokasi Gen *VDR* pada kromosom 12 pada lengan panjang (q) kromosom 12 di posisi 13.11

(Genetics Home Reference, 2019b)

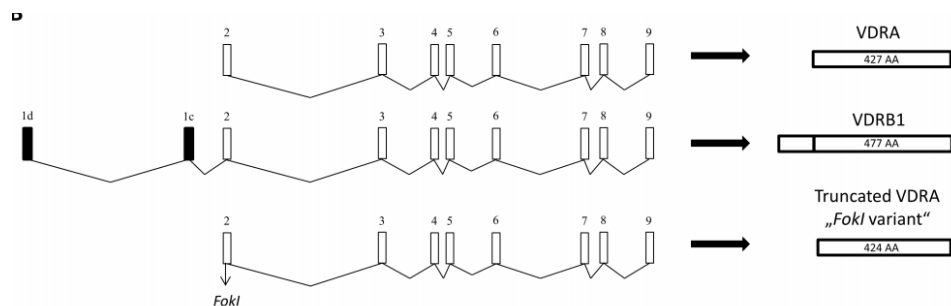


Gambar 6. Struktur ekson-intron dari gen *VDR* dan posisi polimorfisme *FokI*, *TaqI* dan *ApaI*. *VDR* terletak pada kromosom 12 dan berisi sembilan ekson: nomor 1, yang ditunjuk a-f dan ditandai dengan bilah hitam, berisi enam subunit yang tidak diterjemahkan di wilayah promotor, sedangkan delapan ekson lainnya, angka 2-9, ditunjukkan dengan kotak putih di wilayah pengkodean protein. Polimorfisme *FokI*, *TaqI* dan *ApaI* masing-masing terletak di ekson 2, ekson 9, dan intron 8 (Yongchao Li et al., 2015).

Gen yang terdiri dari 14 ekson ini dapat dibagi menjadi dua wilayah utama. Ekson pertama terletak di wilayah promotor dan memiliki enam varian (a - f) penting untuk penyambungan alternatif *VDR*. Ekson 2 - 9 hadir di wilayah pengkodean (*coding region*) yang umum untuk semua 14 transkrip yang diketahui (Zenata & Vrzal, 2017). Sampai saat ini, hanya tiga isoform (dua dibuat dengan splicing alternatif, satu oleh polimorfisme dalam kodon inisiasi translasi) dari *VDR* ditemukan dalam sel manusia atau *cell line* (Gambar 7). Bentuk yang paling banyak muncul adalah *VDRA* yang terdiri dari 427 asam amino (48 kDa). Isoform kedua, disebut *VDRB1*, memanjang pada domain N-terminal sekitar 50 asam amino (477 asam amino; 54 kDa) dengan situs awal (ATG) di ekson 1d (berbeda dengan *VDRA* memiliki situs awal di ekson 2) dan ditemukan di ginjal manusia, garis sel epitel usus dan ginjal (Crofts



et al., 1998; Sunn et al., 2001). Perpanjangan ini memungkinkan reaksi yang berbeda terhadap ligan (kalsitriol atau asam litokolat) di berbagai jenis jaringan, menunjukkan bahwa aktivasi VDRA dan VDRB1 adalah spesifik ligan dan jaringan (Esteban et al., 2005). Konstruksi ekspresi VDRB1 spesifik-Isoform menghasilkan transaktivasi bergantung ligan yang lebih rendah daripada VDRA (Sunn et al., 2001). Bentuk isoform ketiga karena polimorfisme *FokI* dari *VDR FokI* (didefinisikan oleh enzim restriksi) terdapat pada kodon inisiasi translasi dan menghasilkan pembentukan VDR yang lebih pendek (424 asam amino) yang memiliki aktivitas transkripsi lebih tinggi daripada VDR panjang komplit (427 asam amino) (Jurutka et al., 2000).



Gambar 7. Gambar skematik komposisi protein VDR

Varian paling umum disebut VDRA, yang terdiri atas 427 asam amino (AA). Varian VDRB1 memanjang pada domain N-terminal oleh dua ekson (1d dan 1c) dan memiliki 477 AA. VDRA yang pendek (*Truncated* VDRA) disebabkan karena polimorfisme *FokI*, yang terdapat pada kodon inisiasi, dan memiliki 424 AA (Zenata & Vrzal, 2017)

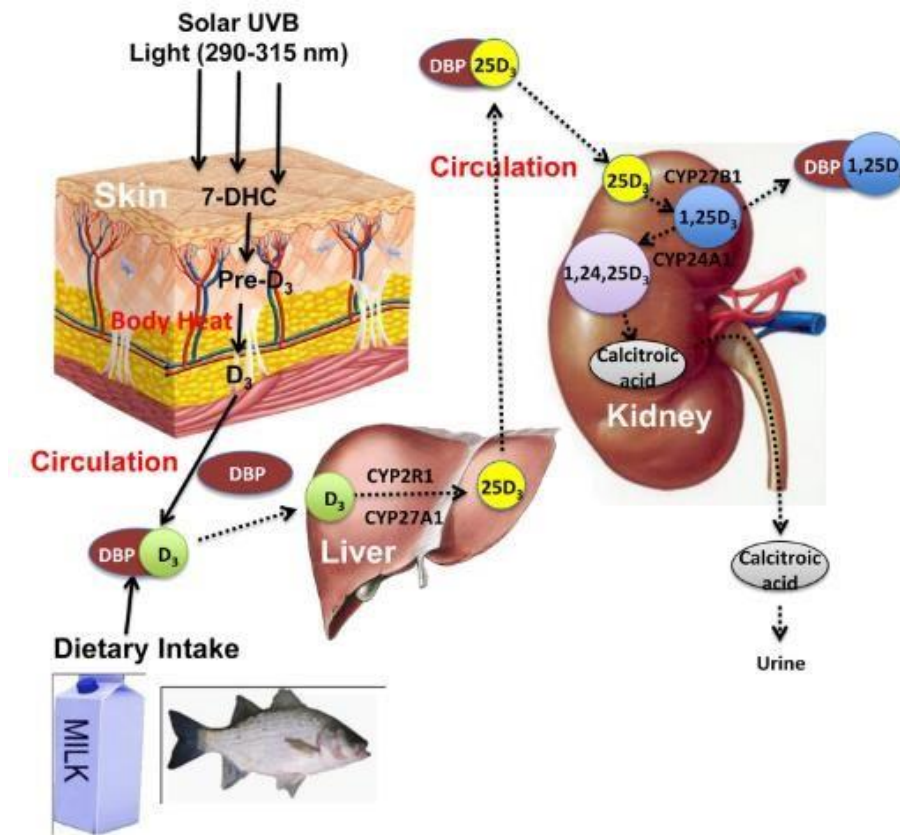
VDR adalah penentu mutlak aktivitas biologis 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), bentuk aktif dari vitamin D

(Pike and Meyer, 2012). Vitamin ini dapat diperoleh dari makanan dalam makanan atau dibuat dalam tubuh dengan bantuan paparan sinar matahari. Vitamin D terlibat dalam menjaga keseimbangan beberapa mineral dalam tubuh, termasuk kalsium dan fosfat, yang penting untuk pembentukan tulang dan gigi yang normal. Salah satu peran utama vitamin D adalah mengontrol penyerapan kalsium dan fosfat dari usus ke dalam aliran darah. Vitamin D juga terlibat dalam beberapa proses yang tidak terkait dengan pembentukan tulang dan gigi (Genetics Home Reference, 2019b).

Vitamin D, baik yang diproduksi secara endogen (vitamin D<sub>3</sub>) atau dari makanan (vitamin D<sub>2</sub> atau vitamin D<sub>3</sub>), harus diaktifkan untuk menghasilkan efeknya (Jones, 2013). Manusia menerima sebagian besar kebutuhan vitamin D dari paparan kulit mereka terhadap sinar matahari, sementara sebagian kecil dapat diperoleh dari sumber makanan, seperti susu dan ikan berminyak. Setelah terpapar dengan ultraviolet B yang memiliki panjang gelombang antara 290 dan 315 nm, *7-dehydrocholecalciferol* (7-DHC) di kulit difotolisis untuk membentuk 9,10-seco-sterol pre-vitamin D<sub>3</sub> (Pre-D<sub>3</sub>) yang mengalami isomerisasi (bergantung panas) untuk membentuk vitamin D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>). D<sub>3</sub> yang diproduksi secara khusus ditranslokasi oleh protein pengikat vitamin D (VDBP) ke sirkulasi dan kemudian ke hati untuk hidroksilasi pada karbon-25 untuk membentuk 25-hidroksivitamin D<sub>3</sub> (25 (OH) D) terutama oleh dua

enzim sitokrom P-450, CYP2R1 dan CYP27A1, sebagaimana yang ditunjukkan pada gambar 8. 25 (OH) D yang telah disintesis kemudian diangkut ke ginjal setelah terikat VDBP dalam aliran darah. Dalam ginjal, 25 (OH) D dihidroksilasi dengan adanya CYP27B1 hingga membentuk  $1\alpha, 25$ - dihidroksivitamin D<sub>3</sub> ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ ), bentuk aktif vitamin D, yang berfungsi sebagai hormon untuk mengatur berbagai fungsi seluler di organ lain, atau bertindak di dalam ginjal dengan cara otokrin dan / atau parakrin. Setelah menjalani hidroksilasi kedua, vitamin D dapat mengatur transkripsi gen di seluruh tubuh (J S Adams & Hewison, 2012; C. Chen et al., 2013; Jones, 2013; Sutaria et al., 2014).

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  dihidroksilasi lebih lanjut oleh CYP24A1 pada karbon-24 untuk membentuk  $1\alpha, 24,25$ -trihidroksivitamin D<sub>3</sub> ( $1\alpha,24,25(\text{OH})_3\text{D}$ ). Hidroksilasi pada karbon-24 oleh CYP24A1 adalah langkah pertama katabolisme  $1,25\text{D}_3$  untuk menghentikan aksinya, yang mengarah pada pembentukan asam sitroat, metabolit yang larut dalam air, dan diekskresikan ke dalam urin (Sutaria et al., 2014).



Gambar 8. Fotosintesis dan metabolisme vitamin D<sub>3</sub> (Sutaria et al., 2014).

## 2. Hubungan VDR dengan Tuberkulosis

Peran vitamin D terhadap immunitas *host* melawan infeksi TB telah lama diketahui. Ikatan metabolit aktif vitamin D (kalsitriol) dengan reseptor vitamin D (VDR) pada sel imun memodulasi aktivitas makrofag terhadap infeksi *mycobacterium* (Chocano-Bedoya & Ronnenberg, 2009). Untuk itu, rendahnya level calcitriol dan/atau abnormalitas reseptor vitamin D dapat mengganggu fungsi makrofag, sehingga meningkatkan kerentanan terhadap tuberkulosis (Nnoaham & Clarke, 2008). Studi telah membuktikan bahwa

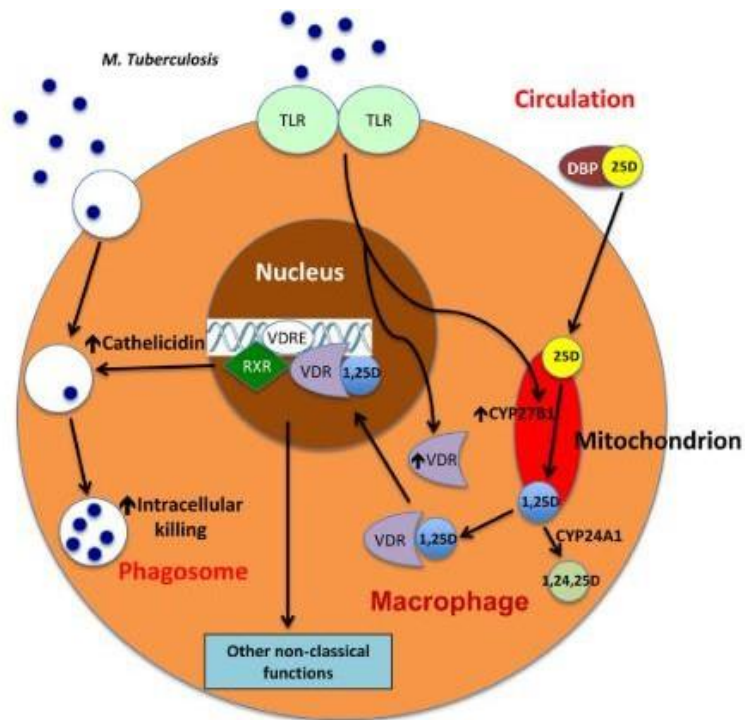
kekurangan vitamin D (serum 25 (OH) D (kadar <20 ng / mL atau <50 nmol / L) dan insufisiensi serum 25 (OH) D (kadar <30 ng / mL atau <75 nmol / L) dikaitkan dengan risiko TB aktif yang lebih tinggi (Holick, 2011; Sato et al., 2012). Namun, beberapa laporan tidak menemukan perbedaan yang signifikan dalam kadar vitamin D pada individu TB dan non-TB (Ashenafi et al., 2018; Koo et al., 2012; Sarin et al., 2016; Yuvaraj et al., 2016). Selain itu, meskipun ada banyak bukti bahwa vitamin D mungkin berperan dalam kerentanan *host* terhadap tuberkulosis (TB), *randomized controlled trials* belum menemukan efek yang signifikan dari pemberian vitamin D<sub>3</sub> dengan konversi dahak pada pasien TB (Bekele et al., 2018; Ganmaa et al., 2017; Tukvadze et al., 2015), atau mengurangi risiko infeksi TB (Ganmaa et al., 2020). Intervensi vitamin D<sub>3</sub> tampaknya dimodifikasi oleh varian genetik di *VDR* (Ganmaa et al., 2017). Akibatnya, efek vitamin D mungkin tergantung pada genotipe dan aktivitas *VDR* (Sutaria et al., 2014).

Vitamin D harus berikatan dengan VDR sebagai reseptor untuk dapat aktif bekerja di sel target (Gao et al., 2010). Setelah mengikat ke 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D, bentuk aktif vitamin D, atau analognya, kompleks VDR bergerak ke dalam nukleus tempat ia mengatur ekspresi gen. Di antara efeknya termasuk peningkatan sintesis komponen sistem kekebalan tubuh bawaan, seperti katelisin, yang memainkan peran penting terhadap infeksi mikobakteri, serta

molekul antibakteri, antimikobakteri, dan antivirus lainnya (Gambar 9). Autofagi, pencernaan makromolekul intraseluler dan inklusi, adalah fungsi seluler penting lainnya yang dirangsang oleh *VDR* teraktivasi. Fungsi ini sangat penting dimana ia terlibat dalam pembersihan patogen intraseluler, seperti mikobakteria, serta sel-sel neoplastik. *VDR* teraktivasi juga berperan dalam mengatur sistem imun adaptif dengan menghambat proliferasi limfosit dan mengurangi produksi sitokin proinflamasi untuk mencegah respon berlebihan. Terdapat beberapa studi polimorfisme gen *VDR*, dengan beberapa polimorfisme memediasi efek hilir yang lebih kuat daripada yang lain. Akibatnya, efek vitamin D tergantung pada genotipe *VDR* ini (John S Adams & Hewison, 2008; Sutaria et al., 2014).

Aktivasi sistem imun bawaan yang dimediasi vitamin D dijelaskan pada gambar 9. Sistem imun bawaan menyediakan lini pertahanan pertama melawan infeksi patogen. Setelah deteksi patogen, seperti *Mtb*, TLR pada membran makrofag diaktifkan untuk menginduksi regulasi transkripsional dari *VDR* dan meningkatkan ekspresi *CYP27B1*, yang mengarah pada peningkatan sintesis 1,25-dihidroksivitamin D dan *VDR*, dua komponen penting yang bertanggung jawab untuk regulasi berbagai gen yang bergantung pada *VDR* termasuk pengaturan regulasi ekspresi katelisin. Penggabungan katelisin ke dalam fagosom yang mengandung *Mtb* yang telah diinternalisasi memungkinkan peptida berfungsi sebagai

agen antimikroba untuk membunuh patogen yang menyerang (Sutaria et al., 2014)



Gambar 9. Aktivasi sistem imun bawaan yang dimediasi vitamin D *Mycobacterium tuberculosis* mengaktifasi *toll-like receptor* (TLR) pada membran makrofag untuk menginduksi *VDR* dan *CYP27B1*, yang mengarah regulasi ekspresi katelisin yang berperan sebagai mikobakterisidal (Sutaria et al., 2014).

Polimorfisme dari *VDR* menentukan aktivitas dari reseptor, sehingga diduga polimorfisme ini dapat menjadi penanda potensial pada *host* yang rentan terhadap TB (Gao et al., 2010). Perubahan pada sekuens protein *VDR* dapat berdampak fungsional, seperti perubahan pengikatan DNA, aktivasi transkripsi atau heterodimerisasi, dan afinitas ligan hormonal (Hassab et al., 2019). Telah diketahui beberapa polimorfisme gen *VDR*, seperti *FokI*, *BsmI*, *Apal* dan *TaqI*. Sebagian besar penelitian mengenai *VDR*

mendapatkan polimorfisme terjadi di *region coding FokI* dan 3' *untranslated region* (3' UTR) *TaqI*, *Apal* dan *Bsml*, yang menunjukkan adanya keterkaitan dengan aktivitas atau ekspresi *VDR* (Holick, 2007; Uitterlinden et al., 2004).

Polimorfisme *FokI* terletak di dalam ekson 2 gen *VDR*. Polimorfisme *VDR FokI* memiliki dua protein varian yang sesuai dengan dua situs awal yang tersedia, versi panjang (427a) dan versi pendek (424 aa). Variasi ini menyebabkan perbedaan dalam kemampuan transaktivasi sebagai faktor transkripsi. Dengan demikian, beberapa daerah promotor gen target vitamin D mungkin lebih sensitif terhadap perbedaan tergantung genotipe ini dalam aktivitas dibandingkan dengan orang lain (Uitterlinden et al., 2004). Pada penelitian sebelumnya didapatkan pada polimorfisme *FokI* terjadi perbedaan tiga asam amino yang mempengaruhi panjang *VDR*, semakin panjang varian protein *VDR* (berdasarkan alel f) maka secara biologis semakin kurang aktif (Gao et al., 2010). Penelitian Jurutka dkk. menunjukkan varian polimorfik alami dari *VDR* manusia, disebut F / M4 (tidak memiliki situs restriksi *FokI* (F)), yang tidak memiliki tiga asam amino pertama (*Methionine-Gluthamin-Alanine*), berinteraksi lebih efisien dengan *TFIIB* (*human basal transcription factor IIB*) dan juga memiliki aktivitas transkripsi yang meningkat dibandingkan dengan reseptor panjang (f / M1) (Jurutka et al., 2000).



Polimorfisme *VDR FokI* dikenal oleh enzim restriksi *FokI* (FF, Ff, dan ff), hasil dari transisi C → T yang menciptakan kodon inisiasi alternatif (ATG), dan tiga kodon dari arah downstream. Alel f (dengan situs restriksi) memulai translasi pada situs ATG pertama dan mengkode protein *VDR full-length* (427 asam amino), sedangkan alel F (tanpa situs restriksi) memulai translasi pada situs ATG kedua dan mengkode protein dengan panjang lebih pendek yang tidak memiliki tiga asam amino terminal -NH<sub>2</sub> (Vishnupriya et al., 2011). *VDR* yang dikode oleh alel f dari enzim restriksi *FokI* memanjang dengan 3 asam amino, dan transkripsi alel ini 1-7 kali kurang efisien dibanding alel F dan dapat mengubah jumlah *VDR* yang dibentuk (A. Singh et al., 2011). Polimorfisme varian 3' UTR (*TaqI*, *Apal*, dan *BsmI*) didapatkan berkaitan dengan ketidakseimbangan dan perpanjangan genotype *bbbaaTT* berhubungan dengan peningkatan jumlah *VDR*. Semakin banyak jumlah *VDR* berhubungan dengan peningkatan respon imun dan memodulasi ekspresi sitokin (Gao et al., 2010). Polimorfisme *BsmI* dan *TaqI* tidak mengubah protein yang diterjemahkan. Polimorfisme *BsmI* (BB, Bb dan bb) terletak di intron 8 gen *VDR* dan polimorfisme *TaqI* (TT, Tt dan tt) terletak di exon 9, yang mengarah ke perubahan kodon *silent*, ATT dan ATC, keduanya mengkode isoleusin dan telah dikaitkan dengan peningkatan stabilitas mRNA *VDR* (C. Chen et al., 2013; Selvaraj et al., 2009). Adapun polimorfisme *Apal*, yang

ditemukan pada intron 8, mengakibatkan perubahan T→G (alel T adalah "A" dan alel G adalah "a"). Karena *Apal* adalah intronik, jauh dari batas intron- ekson, tidak diketahui menghasilkan kesalahan *splicing*, dan oleh karena itu, tidak mungkin memiliki konsekuensi fungsional (Nejentsev et al., 2004). Meskipun tidak menghasilkan perubahan dalam asam amino atau struktur yang mengekspresikan protein VDR, perubahan nukleotida dari polimorfisme *Apal* dan *Bsml* dapat berada dalam hubungan disequilibrium dengan polimorfisme fungsional lainnya yang mengatur ekspresi gen *VDR* (N. A. Morrison et al., 1994). Perubahan nukleotida pada tiap polimorfisme *VDR* dirangkum pada tabel 1.

Frekuensi varian gen *VDR* ditemukan berbeda pada tiap ras. Frekuensi genotipe *ff* ditemukan sekitar 4% di antara orang Afrika-Amerika dan 13-18% di antara orang Asia dan Kaukasia dalam satu laporan. Frekuensi genotipe *Bsml* *bb* ditemukan sebesar 2% di antara orang Asia, 5% di antara orang Afrika dan Amerika, dan 17% di antara Kaukasia. Frekuensi genotipe *TaqI* dalam populasi ini mirip dengan frekuensi jenis gen *Bsml*. Frekuensi genotipe *Apal* *AA* sekitar 9% di antara orang Asia, 28% di antara Kaukasia, dan 44% di antara orang Afrika-Amerika (Zmuda et al., 2000).

Tabel 1. Polimorfisme VDR dan perubahan nukleotida

| SNP                                     | Genotipe          | Lokasi pada Gen VDR<br>( <i>Homo sapiens vitamin D receptor (VDR)</i> , RefSeqGene on chromosome 12 NCBI RefSequence: NG_008731.1)  | Perubahan nukleotida  |
|---|-------------------|---|---|
| <b>VDR<br/>rs2228570<br/>(VDR FokI)</b> | C/C<br>T/C<br>T/T | <ul style="list-style-type: none"> <li>ekson2</li> </ul> <p>rs2228570 VDR RefSeqGene NG_008731.1:g.30920T&gt;C</p> <p>30841 <u>tggtggtgac</u> <u>caaggatgcc</u> <u>agctggccct</u> <u>ggcactgact</u> <u>ctggctctga</u> <u>ccgtggcctg</u></p> <p>30901 <u>cttgctgttc</u> <u>ttacaggaat</u> <u>ggaggcaatg</u> <u>gcggccagca</u> <u>cttccctgcc</u> <u>tgaccctgga</u></p> <p>30961 <u>gactttgacc</u> <u>ggaacgtacc</u> <u>ccgatctat</u> <u>gggtatata</u> <u>gagaccgagc</u> <u>caactgcttt</u></p>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>transisi C (varian "F") →T (varian "f")</li> <li>transisi ini menciptakan kodon inisiasi alternative (ATG)</li> <li>alel C : produksi protein varian pendek 424 asam amino</li> <li>alel T :produksi protein varian panjang (427asam amino), yang secara biologis kurang aktif (Jurutka et al., 2000)</li> </ul>                                 |
| <b>VDR<br/>rs1544410<br/>(VDR BsmI)</b> | G/G<br>G/A<br>A/A | <ul style="list-style-type: none"> <li>intron 8</li> </ul> <p>rs1544410 VDR RefSeqGene NG_008731.1:g.63980G&gt;A</p> <p>63901 <u>gcagagtgtg</u> <u>caggcgattc</u> <u>gtagggggga</u> <u>ttctgaggaa</u> <u>ctagataagc</u> <u>agggttcctg</u></p> <p>63961 <u>gggccacaga</u> <u>caggcctgca</u> <u>cattcccaat</u> <u>actcaggctc</u> <u>tqctcttgcg</u> <u>tgaactgggc</u></p> <p>64021 <u>tcaacattcc</u> <u>tggtatttga</u> <u>ggtttcttgc</u> <u>gggcagggta</u> <u>caaaactttg</u> <u>gagcctgaga</u></p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>perubahan dari G (varian "B") di intron 8 gen VDR menjadi A (varian "b")</li> <li>polimorfisme BsmI dapat berada dalam hubungan disequilibrium dengan polimorfisme fungsional lainnya yang mengatur ekspresi gen VDR</li> </ul>  |
| <b>VDR<br/>rs7975232<br/>(VDR ApaI)</b> | G/G<br>G/T<br>T/T | <ul style="list-style-type: none"> <li>intron 8</li> </ul> <p>rs7975232 VDR RefSeqGene NG_008731.1:g.64978G&gt;T</p> <p>64921 <u>gggtgactac</u> <u>cattgaagtat</u> <u>ctatgatgat</u> <u>ggggggtgat</u> <u>gggattgagc</u> <u>agtgaggggc</u></p> <p>64981 <u>ccagctgaga</u> <u>gctcctgtgc</u> <u>cttcttctct</u> <u>atccccgtgc</u> <u>ccacagatcg</u> <u>tcctgggggtg</u></p> <p>65041 <u>caggacgccg</u> <u>cqctgattga</u> <u>ggccatccag</u> <u>gaccgcctgt</u> <u>ccaacacact</u> <u>gcagacgtac</u></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>perubahan G→T</li> <li>polimorfisme ApaI dapat berada dalam hubungan disequilibrium dengan polimorfisme fungsional lainnya yang mengatur ekspresi gen VDR</li> <li>Polimorfisme ini merupakan varian intronik yang diprediksi dapat mempengaruhi situs <i>splicing</i> yang mungkin berefek pada translasi VDR (Hussain et al., 2019)</li> </ul> |

Lanjutan tabel 1

| SNP   | Genotipe                   | Lokasi pada Gen <i>VDR</i><br>( <i>Homo sapiens vitamin D receptor (VDR)</i> , RefSeqGene on chromosome 12 NCBI RefSequence: NG_008731.1)   | Perubahan nukleotida  |
|---|----------------------------|---|---|
| <p><b><i>VDR</i></b><br/><b>rs731236</b><br/><b>(<i>VDR</i> TaqI)</b></p> | <p>T/T<br/>T/C<br/>C/C</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>ekson 9</li> </ul> <p style="text-align: center;"><a href="#">rs731236</a> <a href="#">VDR RefSeqGene</a> <a href="#">NG_008731.1:g.65058T&gt;C</a></p> <pre> 65041 <a href="#">caggacgccg</a> <a href="#">cgctgattga</a> <a href="#">ggccatccag</a> <a href="#">gaccgcctgt</a> <a href="#">ccaacacact</a> <a href="#">gcagacgtac</a> 65101 <a href="#">atccgctgcc</a> <a href="#">gccacccgcc</a> <a href="#">cccgggcagc</a> <a href="#">cacctgctct</a> <a href="#">atgccaagat</a> <a href="#">gatccagaag</a> 65161 <a href="#">ctagccgacc</a> <a href="#">tgcgcagcct</a> <a href="#">caatgaggag</a> <a href="#">cactccaagc</a> <a href="#">agtaccgctg</a> <a href="#">cctctccttc</a> </pre> | <ul style="list-style-type: none"> <li>transisi T (varian "T")→C (varian "t") di kodon 352 pada 3' end di ekson 9 perubahan kodon <i>silent</i>, ATT dan ATC, keduanya mengkode isoleusin dan telah dikaitkan dengan peningkatan stabilitas mRNA <i>VDR</i></li> <li>Polimorfisme ini dekat dengan batas ekson-intron (GCTG/attg) dan karena itu cenderung mempengaruhi penyambungan dan dengan demikian dapat mempengaruhi terjemahan <i>VDR</i> (Hussain et al., 2019).</li> <li>studi fungsional pada osteoblas telah menunjukkan bahwa <i>haplotype</i> risiko yang mengandung alel-t TaqI meningkatkan peluruhan mRNA sebesar 30% relatif terhadap <i>haplotype</i> yang mengandung alel T.</li> </ul> |

Pada penelitian yang dilakukan di Punjab, India oleh Salimi, dkk., genotip *VDR FokI* Ff dikaitkan dengan TB dan risiko TB paru dua kali lebih tinggi pada individu dengan genotipe Ff. Frekuensi yang lebih tinggi dari alel f diamati pada pasien TB paru dan oleh karena itu, alel f dapat menjadi faktor risiko kerentanan TB paru. Tidak ada hubungan antara polimorfisme *TaqI* dan *BsmI* dan TB paru. Selain itu, analisis *haplotype* menunjukkan bahwa *haplotype* f-T-B dan f-t-b (*FokI*, *TaqI* dan *BsmI*) dapat memiliki potensi untuk meningkatkan kerentanan TB paru (Salimi et al., 2015). Hasil ini serupa dengan hasil penelitian lainnya yang dilakukan oleh Singla, dkk. juga di India, yang menunjukkan adanya asosiasi antara polimorfisme gen *VDR FokI* dengan kerentanan TB. Mereka menemukan bahwa genotipe ff pada gen *VDR FokI* yang secara signifikan rentan terhadap TB, terutama pada TB ekstrapulmoner (efusi pleura). Selain itu, hasil penelitiannya juga mendapatkan bahwa polimorfisme *BsmI* juga memiliki hubungan, dimana pasien dengan varian alel b pada *BsmI* berkontribusi sebagai proteksi terhadap TB. Analisis hasil terapi menunjukkan genotipe Bb memberikan resiko gagalnya terapi ketika dibandingkan dengan pasien yang berhasil diterapi. Sementara *TaqI* tidak menunjukkan adanya hubungan dengan kerentanan TB (Singla et al., 2015). Hasil yang berbeda ditunjukkan pada penelitian di Taiwan yang dilakukan oleh Lee dkk., yaitu polimorfisme *VDR TaqI*, *VDR BsmI*, secara signifikan berhubungan dengan kerentanan TB, sedangkan *VDR*

*FokI* dan *Apal* tidak menunjukkan adanya hubungan yang signifikan dengan kerentanan TB (S. W. Lee et al., 2016).

Meta analisis dari Sutaria dkk. menunjukkan bahwa beberapa polimorfisme gen *VDR* dikaitkan dengan peningkatan kerentanan terhadap TB sementara terdapat juga polimorfisme *VDR* yang lain tidak berkaitan. Suplementasi dengan vitamin D mengarah pada hasil klinis yang lebih baik (Sutaria et al., 2014). Alel *f FokI* dapat menurunkan aktivitas protein *VDR* dan mencegah pengikatan vitamin D dan *VDR* aktif. Sejumlah meta-analisis pada polimorfisme *FokI* sesuai dan menunjukkan bahwa alel dalam model resesif akan meningkatkan risiko tuberkulosis, dan efek yang sama ditemukan pada populasi Cina tetapi tidak untuk etnis lain (C. Chen et al., 2013; Gao et al., 2010; Lewis et al., 2005), namun hal sebaliknya ditemukan pada penelitian lainnya dimana tidak ada hubungan yang signifikan antara polimorfisme *FokI* dan TB (S. W. Lee et al., 2016).

Secara umum, masih terdapat perbedaan hasil polimorfisme *VDR* terhadap rentannya seseorang terkena TB. Namun, sebuah meta-analisis menunjukkan adanya efek yang konsisten dari polimorfisme *VDR FokI*. Alel *f* dikaitkan dengan peningkatan risiko TB secara signifikan dalam model homozigot (*ff* vs. *FF*) dan model resesif (*ff* vs. *Ff* + *FF*), terutama pada populasi Timur dan Asia Tenggara. Namun, di Asia Selatan dan Barat, Afrika, Amerika dan Eropa untuk semua model pembandingan menunjukkan hubungan yang tidak signifikan. Hal ini dapat mencerminkan adanya perbedaan

rasial dan menunjukkan bahwa polimorfisme ini mungkin memiliki peran multifungsi dalam patogenesis TB atau berinteraksi dengan genetik dan faktor lingkungan lainnya (Cao et al., 2016).

Di Indonesia sendiri, penelitian yang dilakukan pada etnis Batak menunjukkan tidak ada hubungan antara polimorfisme *FokI* gen *VDR* dan kerentanan terhadap TB paru, sementara pada polimorfisme *BsmI* gen *VDR*, genotip *bb* berhubungan dengan penurunan risiko terhadap TB paru (Sinaga et al., 2014). Sementara hasil penelitian lainnya terhadap kasus TB anak menunjukkan kejadian polimorfisme *FokI* gen *VDR* untuk kelompok kasus TB adalah 2,94 kali lebih banyak dibandingkan dengan kontrol, dan pada polimorfisme *BsmI*, *Apal*, dan *TaqI* gen *VDR* tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kasus TB dibandingkan dengan kontrol (Setiabudiawan et al., 2010). Perbedaan hasil penelitian polimorfisme gen *VDR* pada berbagai populasi dikaitkan dengan kerentanan terhadap TB dapat dilihat pada tabel 2. Adapun meta-analisis yang telah dipublikasi sebelumnya terangkum pada tabel 3.

Studi sebelumnya mengenai polimorfisme *VDR* pada TB yang telah dilakukan di Makassar menunjukkan bahwa polimorfisme *Apal* dan *FokI* merupakan faktor risiko terjadinya *multi-drug resistant* TB (MDR-TB) (Thaha et al., 2012). Studi lainnya melaporkan adanya korelasi yang signifikan antara gen *VDR FokI* dengan peningkatan status nutrisi pasca terapi obat anti tuberkulosis (OAT) enam bulan,

namun tidak menemukan hubungan antara gen *VDR* dengan *outcome* terapi (Djharuddin, 2016).



**Tabel 2. Studi polimorfisme VDR terhadap kerentanan tuberkulosis paru (Studi dalam 10 tahun terakhir)**

| No | Lokasi studi                             | Jumlah subjek   | Metode   | Hasil penelitian   |  |                             |  |   | Referensi               |
|----|--|---|----------|--|--|-----------------------------|--|---|-------------------------|
|    |  |   |          | VDR (rs2228570) <i>FokI</i>  | VDR (rs1544410) <i>BsmI</i>                            | VDR (rs7975232) <i>ApaI</i> | VDR (rs731236) <i>TaqI</i>                   | Analisis haplotype  |                         |
| 1  | Kolkata, India                           | 101 pasien TB<br>225 kontrol sehat  | PCR-RFLP | Tidak ditemukan hubungan   | Tidak ditemukan hubungan                               |                             | Tidak ditemukan hubungan                     |   | (A. Singh et al., 2011) |
| 2  | District Shimla, Himachal Pradesh, India | 357 pasien TB (TB paru dan ekstrapulmoner)<br>380 kontrol (tanpa gejala/ tanpa riwayat keluarga menderita TB) | PCR-RFLP | Genotipe <b>ff</b> berkaitan dengan kerentanan terhadap TB dan TB ekstrapulmoner | Genotipe <b>bb</b> berkontribusi protektif terhadap TB |                             | Tidak ditemukan hubungan                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• TBf dan TBF lebih banyak pada TB</li> <li>• TbF lebih banyak pada kontrol</li> </ul> | (Singla et al., 2015)   |
| 3  | Andra Pradesh, India                     | 91 pasien TB paru<br>85 kontrol   | PCR-RFLP | Tidak ditemukan hubungan   |  |                             | <b>TT dan tt lebih banyak pada pasien TB</b> |   | (Medapati et al., 2017) |
| 4  | New Delhi, India                         | 150 pasien TB paru,<br>150 <b>kontak serumah</b> ,<br>150 kontrol sehat                                       | PCR-RFLP | Genotipe <b>ff</b> berkaitan dengan kerentanan TB                                |  |                             |  |   | (Panda et al., 2019)    |

Lanjutan tabel 2

| No | Lokasi studi               | Jumlah subjek   | Metode  | Hasil penelitian  |   |  |   |  | Referensi                |
|----|----------------------------|---|---|---|---|--|---|--|--------------------------|
|    |                            |   |   | VDR (rs2228570) FokI  | VDR (rs1544410) BsmI  | VDR (rs7975232) ApaI                             | VDR (rs731236) TaqI   | Analisis haplotype                           |                          |
| 5  | Sohag, Egypt               | 40 pasien TB paru<br>25 kontrol sehat   | PCR-RFLP                                      | Tidak ditemukan hubungan  |   |  |   |  | (Mahmoud & Ali, 2014)    |
| 6  | Zahedan, Southeastern Iran | 120 pasien<br>131 kontrol sehat   | PCR-RFLP                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Genotipe Ff berkaitan dengan TB</b>, dua kali lipat berisiko terkena TB</li> <li>• Alel f sebagai faktor risiko menderita TB</li> </ul> | Tidak ditemukan hubungan  |  | Tidak ditemukan hubungan  | <b>f-T-B dan f-t-b berisiko menderita TB</b> | (Salimi et al., 2015)    |
| 7  | Taiwan (Populasi Han)      | 198 pasien TB paru<br>170 kontrol (tanpa gejala/riwayat TB dan QuantiFERON negatif) | SNP Genotyping (TaqMan SNP genotyping assays) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alel A/G</li> <li>• Tidak ada hubungan dengan kerentanan TB</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alel A/G <b>GG berkaitan</b> dengan kerentanan TB</li> </ul> | Alel A/C Tidak ada hubungan dengan kerentanan TB | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alel A/G <b>AA berkaitan</b> dengan kerentanan TB</li> </ul> | Tidak ditemukan hubungan                     | (S.-W. Lee et al., 2016) |

Lanjutan tabel 2

| No | Lokasi studi       | Jumlah subjek   | Metode   | Hasil penelitian   |  |  |   |                   | Referensi                |
|----|--------------------|---|----------|--|--|--|---|-------------------|--------------------------|
|    |                    |   |          | VDR<br>(rs2228570)   | Fokl<br><i>BsmI</i><br>(rs1544410)   | VDR<br>(rs7975232)   | <i>Apal</i><br>(rs731236)   | VDR<br>(rs731236) |                          |
| 8  | Beijing, China     | 180 pasien TB paru (termasuk 52 TB-MDR)<br>59 kontrol sehat (tanpa gejala, tanpa riwayat TB, tanpa kontak dengan pasien TB) | PCR-RFLP | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Genotipe ff dan alel f merupakan risiko mengidap TB</b></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tidak ditemukan hubungan VDR <i>BsmI</i> dengan TB</li> </ul> | Tidak ditemukan hubungan VDR <i>Apal</i> dengan TB   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tidak ditemukan hubungan VDR <i>TaqI</i> dengan TB</li> </ul>  |                   | (Zhang et al., 2018)     |
| 9  | Bucharest, Romania | 68 pasien TB paru<br>110 kontrol sehat  | ARMS-PCR |  |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Aa berkaitan dengan kerentanan TB</b></li> <li>• <b>aa berkaitan dengan ketahanan terhadap TB</b></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Tt berkaitan dengan kerentanan terhadap TB</b></li> <li>• <b>tt berkaitan dengan ketahanan terhadap TB</b></li> </ul> |                   | (Alexandra et al., 2013) |

Lanjutan tabel 2

| No | Lokasi studi                   | Jumlah subjek   | Metode   | Hasil penelitian                                     |  |  |  |                           | Referensi                       |
|----|--------------------------------|---|----------|--|--|--|--|---------------------------|---------------------------------|
|    |                                |   |          | VDR (rs2228570) <i>FokI</i>                          | VDR (rs1544410) <i>BsmI</i>                    | VDR (rs7975232) <i>ApaI</i>                          | VDR (rs731236) <i>TaqI</i>                           | Analisis <i>haplotype</i> |                                 |
| 10 | Venezuela                      | 93 pasien TB paru<br>102 kontrol (tanpa gejala TB, <b>dengan riwayat kontak</b> ) | PCR-RFLP | • Tidak ditemukan hubungan VDR <i>FokI</i> dengan TB | •  | • Tidak ditemukan hubungan VDR <i>ApaI</i> dengan TB | • Tidak ditemukan hubungan VDR <i>TaqI</i> dengan TB |                           | (Fernández-Mestre et al., 2015) |
| 11 | Medan, Indonesia (Etnis batak) | 76 pasien TB paru<br>76 kontrol sehat   | PCR-RFLP | Tidak ditemukan hubungan VDR <i>FokI</i> dengan TB   | <b>bb berkaitan dengan penurunan risiko TB</b> |  |  |                           | (Sinaga et al., 2014)           |

Tabel 3. Meta analisis kaitan polimorfisme *VDR* dengan kejadian tuberkulosis paru

| No | Jumlah studi dalam meta analisis       | Hasil meta analisis  |  |   |   | Keterbatasan/ Rekomendasi   | Referensi          |
|----|--|--|--|---|---|---|--------------------|
|    |  | <i>VDR FokI</i> (rs2228570)  | <i>VDR BsmI</i> (rs1544410)  | <i>VDR ApaI</i> (rs7975232)   | <i>VDR TaqI</i> (731236)  |   |                    |
| 1  | 23 studi (4050 kasus dan 5321 kontrol) | <ul style="list-style-type: none"> <li>Di antara orang Asia, genotipe <i>FokI</i> ff menunjukkan hubungan positif dengan TB paru (OR 2.0, 95% CI 1,3-3,2)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pada populasi Asia, genotipe <i>BsmI</i> bb berisiko lebih rendah terhadap penyakit TB paru (OR 0,5, 95% CI 0,4-0,8)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pada populasi Asia, asosiasi marginal signifikan ditemukan untuk polimorfisme <i>ApaI</i> dengan TB paru (OR 1.3, 95% CI 0.4-1.2)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pada populasi Asia, asosiasi marginal signifikan ditemukan untuk polimorfisme <i>TaqI</i> dengan TB paru (OR 1.4, 95% CI 0.9-2.1)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Data heterogen</li> <li>Melibatkan studi dengan populasi yang tinggi risiko HIV → Status HIV harus dipertimbangkan dengan hati-hati dalam penelitian selanjutnya</li> <li>Beberapa studi yang dimasukkan tidak menyebutkan apakah populasi studi mereka berada di HWE (<i>Hardy-weinberg equilibrium</i>) untuk varian yang diselidiki.</li> </ul> | (Gao et al., 2010) |
|    |  | tidak ada polimorfisme yang secara signifikan terkait dengan TB di antara orang Afrika atau Amerika Selatan.   |  |   |   |   |                    |

Lanjutan tabel 3

| No | Jumlah studi dalam meta analisis                      | Hasil meta analisis  |   |  |  | Keterbatasan/ Rekomendasi   | Referensi              |
|----|---|--|---|--|--|---|------------------------|
|    |   | VDR <i>FokI</i> (rs2228570)  | VDR <i>BsmI</i> (rs1544410)   | VDR <i>ApaI</i> (rs7975232)  | VDR <i>TaqI</i> (731236)   |   |                        |
| 2  | 29 studi (6179 pasien TB paru dan 8585 kontrol sehat) | <ul style="list-style-type: none"> <li>ff berkaitan dengan peningkatan risiko TB pada populasi Cina (ff vs. Ff+FF: OR =1.97, 95%CI: 1.32-2.93, <math>P_{\text{bonferroni}}=0.0032</math>; heterogeneity test: <math>\chi^2 =0.24</math>, <math>P=0.62</math>)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>bb+BB berkaitan dengan penurunan risiko TB pada populasi Eropa (bb+Bb vs. BB: OR =0.41, 95%CI, 0.22-0.76, <math>P_{\text{bonferroni}}=0.02</math>; heterogeneity test: <math>\chi^2 =2.59</math>, <math>P=0.11</math>).</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>aa berkaitan dengan penurunan risiko TB pada populasi Eropa (aa vs. Aa+AA: OR =0.02, 95%CI: 0-0.41, <math>P_{\text{bonferroni}}=0.04</math>; heterogeneity test: <math>\chi^2 =0.24</math>, <math>P=0.62</math>)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Alel t dari tampaknya protektif untuk tuberkulosis pada populasi Afrika, meskipun hasilnya hanya signifikan secara marginal.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Tidak dilakukan stratifikasi berdasarkan status HIV, sebab 1/3 dari studi yang dianalisis tidak melaporkan status HIV sampelnya</li> <li>Analisis subkelompok dengan jumlah studi yang sedikit mengurangi kekuatan statistik analisis.</li> <li>Metode utama untuk diagnosis tuberkulosis didasarkan pada bakteriologi, dimana ia tidak dapat membedakan antara <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dan non-tuberkulosis <i>Mycobacterium</i></li> </ul> | (C. Chen et al., 2013) |

Lanjutan tabel 3

| No | Jumlah studi dalam meta analisis        | Hasil meta analisis  |   |   |   | Keterbatasan/Rekomendasi  | Referensi                |
|----|---|--|---|---|---|---|--------------------------|
|    |   | VDR <i>FokI</i> (rs2228570)  | VDR <i>Bsml</i> (rs1544410)                                     | VDR <i>Apal</i> (rs7975232)                                     | VDR <i>TaqI</i> (731236)  |   |                          |
| 3  | 16 studi (3231 pasien dan 3670 kontrol) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tidak ada hubungan antara alel f dengan risiko TB pada semua populasi yang dianalisis</li> <li>• <b>alel f ditemukan sebagai risiko TB hanya pada populasi Asia Timur</b> (2 studi) (OR = 1.507, 95%CI = 1.192-1.906, P = 0.001)</li> <li>• <b>dengan model Resesif, ff ditemukan sebagai risiko TB pada semua populasi</b> (OR = 1.232, 95%CI = 1.004-1.512, P = 0.046)</li> </ul> | tidak ditemukan hubungan polimorfisme ini dengan risiko TB paru | tidak ditemukan hubungan polimorfisme ini dengan risiko TB paru | tidak ditemukan hubungan polimorfisme ini dengan risiko TB paru | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Data heterogen</li> <li>• Tidak dilakukan meta analisis <i>haplotype</i> karena data yang minim</li> <li>• polimorfisme VDR mungkin dapat berkaitan dengan fitur klinis, namun data tidak memadai sehingga tidak dianalisis</li> <li>• diperlukan studi dengan skala yang lebih besar dan dengan populasi/etnis berbeda</li> </ul> | (Y. H. Lee & Song, 2015) |

Lanjutan tabel 3

| No | Jumlah studi dalam meta analisis       | Hasil meta analisis  |                             |                             |                          | Keterbatasan/ Rekomendasi   | Referensi            |
|----|--|--|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|---|----------------------|
|    |  | VDR <i>FokI</i> (rs2228570)  | VDR <i>BsmI</i> (rs1544410) | VDR <i>ApaI</i> (rs7975232) | VDR <i>TaqI</i> (731236) |   |                      |
| 4  | 32 studi (4894 kasus dan 5319 kontrol) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ff berisiko tinggi terkena TB paru</b> OR= 1,34 (95% CI=1.091–1.646, P=0.005) pada model resesif)</li> <li>• Dengan stratifikasi status HIV: <b>hubungan yang signifikan ditemukan hanya pada kelompok TB yang HIV-negatif</b> (OR=1.60, 95% CI 1.180-2.077, P=0.002;</li> <li>• Dengan stratifikasi etnis, <b>hubungan yang signifikan ditemukan pada kelompok Asia</b> (OR=1.65, 95% CI 1.205-2.261, P=0.002)</li> </ul> |                             |                             |                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tidak ada analisis dengan stratifikasi faktor-faktor lain, seperti jenis kelamin atau variabel klinis dan lingkungan, karena kurangnya data asli dari penulis.</li> <li>• analisis khusus status HIV mencakup 2 penelitian dari pasien TB-HIV-positif</li> </ul> | (Huang et al., 2015) |



Lanjutan tabel 3

| No | Jumlah studi dalam meta analisis       | Hasil meta analisis   |                             |                             |                          | Keterbatasan/ Rekomendasi  | Referensi          |
|----|--|---|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|--|--------------------|
|    |  | VDR <i>FokI</i> (rs2228570)   | VDR <i>BsmI</i> (rs1544410) | VDR <i>ApaI</i> (rs7975232) | VDR <i>TaqI</i> (731236) |  |                    |
| 5  | 34 studi (5669 kasus dan 6525 kontrol) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Korelasi yang signifikan secara statistik ditemukan antara polimorfisme gen <i>VDR FokI</i> dan peningkatan risiko TB dalam dua model: model homozigot (<b>ff vs. FF: OR = 1,37</b>, 95% CI: 1,17–1,60; P heterogenitas = 0,001) dan <b>model resesif (ff vs. Ff + FF: OR = 1,32</b>, 95% CI: 1,14–1,52; P heterogenitas = 0,006).</li> <li>• ada peningkatan risiko TB secara statistik di populasi Asia Timur dan Tenggara.</li> </ul> |                             |                             |                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• beberapa informasi individu seperti usia, jenis kelamin, status HIV dan faktor lingkungan tidak dapat diperoleh, yang membuat analisis sub-kelompok yang terperinci dan interpretasi hasil menjadi sulit.</li> <li>• status diabetes tidak dilaporkan dalam dua pertiga dari studi yang dianalisis sehingga stratifikasi berdasarkan status diabetes tidak diterapkan.</li> <li>• desain eksperimen dan standar diagnostik yang berbeda membuat analisis rentan terhadap bias.</li> </ul> | (Cao et al., 2016) |

Lanjutan tabel 3

| No | Jumlah studi dalam meta analisis | Hasil meta analisis  |   |  |  | Keterbatasan/ Rekomendasi  | Referensi            |
|----|----------------------------------|--|---|--|--|--|----------------------|
|    |                                  | VDR <i>FokI</i> (rs2228570)  | VDR <i>BsmI</i> (rs1544410)   | VDR <i>ApaI</i> (rs7975232)                | VDR <i>TaqI</i> (731236)   |  |                      |
| 5  | Lanjutan                         |  |   |  |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>penyimpangan signifikan dari HWE (<math>p &lt; 0,05</math>) pada kontrol diamati pada tiga studi pada ras Asia</li> </ul>   |                      |
| 6  | 42 studi                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>tidak ditemukan berkaitan dengan risiko TB</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li><b>VDR rs1544410 berkaitan dengan risiko TB</b> (dominant model: <math>P = 0.02</math>, <b>OR = 0,79</b>, 95% CI 0,65– 0,96, <math>I^2=71\%</math>, REM; allele model: <math>P = 0,03</math>, <b>OR = 0,86</b>, 95% CI 0,75–0,99,</li> </ul> | tidak ditemukan berkaitan dengan risiko TB | <ul style="list-style-type: none"> <li><b>VDR rs731236 berkaitan dengan risiko TB</b> (dominant model: <math>P = 0.04</math>, <b>OR = 0,85</b>, 95% CI 0,73–1,00, <math>I^2 = 74\%</math>, REM; recessive model: <math>P = 0,02</math>, <b>OR = 1,38</b>, 95% CI 1,05–1.82, <math>I^2 = 69\%</math>, REM; allele model:</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li><i>unadjusted analysis</i> karena minim studi yang melibatkan faktor <i>counfounding</i> lain dalam analisisnya sebagian besar studi mengabaikan interaksi gen-gen</li> <li>untuk mengilustrasikan dengan lebih baik hubungan potensial varian genetik tertentu dengan TB,</li> </ul> | (X. Xu & Shen, 2019) |

Lanjutan 3

| No | Jumlah studi dalam meta analisis | Hasil meta analisis         |  |                             |   | Keterbatasan/ Rekomendasi   | Referensi |
|----|----------------------------------|-----------------------------|--|-----------------------------|---|---|-----------|
|    |                                  | VDR <i>FokI</i> (rs2228570) | VDR <i>BsmI</i> (rs1544410)  | VDR <i>ApaI</i> (rs7975232) | VDR <i>TaqI</i> (731236)  |   |           |
| 6  | Lanjutan                         |                             | I <sup>2</sup> = 70%, REM) untuk seluruh populasi Analisis subkelompok (etnis): rs1544410 (model dominan dan alel) secara signifikan terkait dengan TB di Asia Selatan |                             | P = 0.01, <b>OR = 0.84</b> , 95% CI 0.74–0.97, I <sup>2</sup> = 79%, REM) untuk seluruh populasi Analisis subkelompok (etnis): rs731236 (model dominan, resesif, dan alel) secara signifikan terkait dengan TB di Asia Selatan. | sangat disarankan penelitian lebih lanjut untuk melakukan analisis <i>haplotype</i> dan mengeksplorasi interaksi gen-gen potensial. |           |

Lebih lanjut, dalam penelitian Selvaraj dkk. yang dilakukan pada pasien TB paru, ekspresi mRNA VDR ditemukan secara signifikan lebih tinggi di kultur makrofag yang distimulasi *Mtb* dibandingkan dengan kultur yang tidak distimulasi, dan kultur makrofag kontrol sehat yang distimulasi *Mtb*. Meskipun demikian, kadar ekspresi protein VDR pada pasien TB lebih rendah dibandingkan kontrol sehat (Selvaraj et al., 2009). Adapun penelitian ekspresi VDR pada tingkat mRNA ditemukan secara bermakna lebih rendah pada leukosit TB aktif pasien dibandingkan dengan kontak serumah (Panda et al., 2019). Hasilnya sejalan dengan penelitian pada penyakit lepra, di mana ekspresi VDR yang lebih rendah diamati pada pasien kusta dibandingkan dengan kontrol (I. Singh et al., 2018). Menurut Panda, dkk., *Mtb* dapat mengubah ekspresi beberapa gen seperti VDR untuk menghindari sistem imun, namun mekanisme pastinya perlu diteliti lebih lanjut (Panda et al., 2019).

Studi sebelumnya terkait ekspresi gen VDR terangkum dalam tabel 4.

**Tabel 4. Studi ekspresi gen *VDR* terhadap kerentanan tuberkulosis paru**

| No | Lokasi studi               | Jumlah subjek  | Metode                      | Hasil penelitian   | Referensi               |
|----|----------------------------|--|-----------------------------|--|-------------------------|
| 1  | Chennai, India             | 65 pasien TB<br>60 kontrol sehat   | qPCR (dari kultur makrofag) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pasien TB paru mengalami penurunan regulasi ekspresi <i>VDR</i> yang disebabkan oleh peningkatan kadar <math>1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3</math> (diduga akibat stimulasi <i>Mtb</i> yang memicu <i>upregulation</i> CYP27B1), namun belum diketahui apakah peningkatan <math>1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3</math> terkait dengan defisiensi 25-hidroksi vitamin D3</li> <li>• secara <i>ex vivo</i>, pasien TB memiliki ekspresi relatif <i>VDR</i> mRNA lebih tinggi pada kultur makrofag yang distimulasi dengan <i>Mtb</i> jika dibandingkan dengan kontrol sehat</li> </ul> | (Selvaraj et al., 2009) |
| 2  | Tennessee, Amerika Serikat | 12 kasus: riwayat selesai pengobatan TB ekstrapulmoner (EPTB) atau pengobatan sisa sebulan<br>61 kontrol: 20 individu dengan riwayat TB paru telah OAT atau pengobatan sisa sebulan, 20 individu TB laten, 20 individu tidak terinfeksi (ada riwayat kontak TB, namun TST dan IGRA negatif ) | qPCR (dari kultur makrofag) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ekspresi <i>VDR</i> mRNA relatif lebih tinggi pada kasus riwayat EPTB dibanding kontrol, namun tidak ada perbedaan ekspresi <i>VDR</i> mRNA pada kelompok riwayat TB paru dengan kelompok tidak terinfeksi TB.</li> </ul>   | (Fiske et al., 2019)    |
| 3  | New Delhi, India           | 150 pasien TB paru aktif<br>150 kontak serumah (TST negatif dan positif)   | qPCR                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• mRNA <i>VDR</i> lebih rendah pada pasien TB paru aktif dibanding kontak serumah</li> </ul>  | (Panda et al., 2019)    |

#### D. Tinjauan tentang Macrophage Migration Inhibition Factor (MIF)

*Macrophage Migration Inhibition Factor* (MIF atau *MMIF*), juga dikenal sebagai *glycosylation-inhibiting factor* (GIF), L-dopachrome isomerase, atau tautomerase fenilpiruvat adalah protein yang pada manusia dikodekan oleh gen *MIF*. *Macrophage Migration Inhibition Factor* (MIF) adalah protein 12,5-kDa yang sangat terkonservasi, terdiri dari 14 asam amino dan merupakan anggota superfamili tautomerase. Anggota keluarga tautomerase ini memiliki aktivitas enzim yang sama yang melibatkan prolin asam amino yang bertindak sebagai basa umum dalam reaksi tautomerisasi keto-enol  $\alpha$ -ketokarboksilat (Kok et al., 2018; Kraemer et al., 2012). Superfamili protein MIF juga termasuk anggota kedua dengan sifat terkait fungsional, D- dopachrome tautomerase (D-DT) (Günther et al., 2018).

MIF berkumpul menjadi trimer yang terdiri dari tiga subunit yang identik. Masing-masing monomer ini mengandung dua heliks alfa antiparalel dan selembur beta beruntai. Monomer mengelilingi *central channel* dengan 3-fold simetri rotasional (Calandra & Roger, 2003; Kraemer et al., 2012). MIF memiliki dua aktivitas katalitik yang menetap secara evolusioner, yakni tautomerase dan aktivitas tiol-protein oksidoreduktase (TPOR), yang dilakukan oleh dua pusat katalitik yang berbeda. Aktivitas tautomerase difasilitasi oleh N-terminal prolin yang dikonservasi, wilayah yang mencakup prolin N-terminal terlibat dalam pengikatan reseptor dan studi menunjukkan

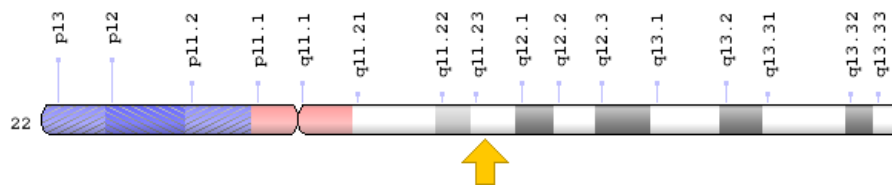
bahwa molekul inhibitor kecil yang menargetkan prolin N-terminal dapat menghambat beberapa aksi pro-inflamasi MIF (Bernhagen et al., 1998). Situs aktif tautomerase dieksplorasi sebagai target dalam terapi anti-inflamasi (Lubetsky et al., 2002).

MIF merupakan sitokin dengan berbagai fungsi biologis dan efek pleiotropik (Kasama et al., 2010; Presti et al., 2018). MIF awalnya digambarkan sebagai properti aktivitas imun yang diisolasi dari supernatan limfosit T dan ditemukan fungsinya dalam menghambat migrasi acak makrofag. Aktivitas MIF dikaitkan dengan fagositosis makrofag (Lue et al., 2002). MIF dilepaskan di tempat infeksi, menyebabkan makrofag berkonsentrasi dan melakukan pemrosesan antigen dan fagositosis (Kok et al., 2018).

Terkait perannya dalam imunitas, MIF telah diidentifikasi sebagai mediator inflamasi yang terlibat dalam regulasi aktivitas makrofag, kemotaksis, dan sekresi sitokin serta telah diindikasikan sebagai pemain utama dalam patogenesis penyakit inflamasi dan autoimun seperti termasuk sklerosis multipel, lupus eritematosus sistemik dan arthritis rheumatoid (Connelly et al., 2016; Stosic-Grujicic et al., 2009). Berbagai sel telah ditunjukkan dapat mengekspresikan dan menyekresikan MIF, termasuk limfosit T, makrofag / monosit, sel endotel, eosinofil, neutrofil polimorfonuklear (PMN) , sel-sel epitel, sel- sel otot polos, fibroblast sinovial, yang menunjukkan bahwa MIF terlibat dalam beragam proses fisiologis dan patofisiologis (Kasama et al., 2010).

## 1. Struktur Gen *Macrophage Migration Inhibition Factor (MIF)*

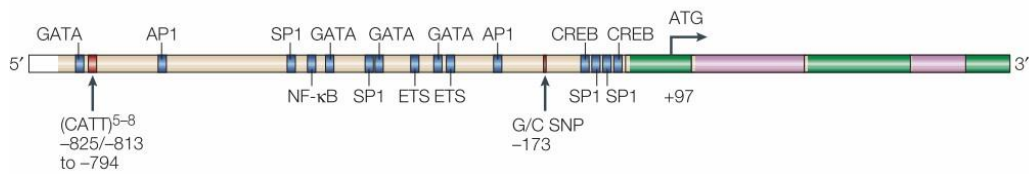
Gen *MIF* manusia telah dikloning dan diekspresikan untuk pertama kalinya pada tahun 1989 (Lue et al., 2002). Hanya ada satu gen *MIF* dalam genom manusia yang terletak pada kromosom 22 (22q11.2) (Calandra & Roger, 2003), sebagaimana yang ditampilkan pada gambar 10.



Gambar 10. Lokasi Gen *MIF* pada kromosom 22 pada lengan panjang (q) kromosom 22 di posisi 11.23 (Genetics Home Reference, 2019a)

Ilustrasi struktur gen *MIF* manusia dapat dilihat pada gambar 11. Gen *MIF* memiliki tiga ekson pendek (kotak hijau) masing-masing terdiri dari 107, 172 dan 66 pasangan basa; dua intron (kotak merah muda) yang terdiri dari 188 dan 94 pasangan basa; dan 5' *Regulatory region* yang mengandung beberapa sekuens pengikat DNA konsensus untuk faktor transkripsi (Calandra and Roger, 2003).





Gambar 11. Struktur gen *MIF* manusia

Gen *Macrophage Migration Inhibition Factor* manusia (*MIF*) terdiri dari tiga ekson pendek (kotak hijau) masing-masing mengandung 107, 172 dan 66 pasangan basa, dan dua intron (kotak merah muda) dari 188 dan 94 pasangan basa. 5' *Regulatory region* mengandung beberapa sekuens pengikat DNA konsensus untuk faktor transkripsi, terutama *activator protein 1* (AP1), *nuclear factor-κB* (NF-κB), ETS, GATA, SP1, dan protein pengikat elemen respons cAMP (CREB) (Calandra and Roger, 2003)

Sebuah messenger RNA *MIF*, berukuran ~ 0,8 kb, ditemukan pada manusia dan tikus. mRNA ini mengkode protein 114-asam amino non-glikosilat berukuran 12,5 kDa. Semua *MIF* mamalia (manusia, tikus, dan sapi) memiliki ~ 90% homologi. Anehnya, *MIF* tampaknya tidak termasuk dalam superfamili sitokin (Calandra and Roger, 2003). *MIF* telah terbukti memiliki setidaknya dua aktivitas katalitik yang berbeda, yaitu aktivitas tautomerase dan oksidoreduktase. Oleh karena itu, *MIF* disebut sebagai "sitokin dengan sifat enzimatis atau sitozim" dan "enzim yang disekresikan". Karena salah satu aktivitas katalitik yang ditemukan mengingatkan pada aktivitas oksidoreduktase dari keluarga protein thioredoxin, *MIF* baru-baru ini disebut "*redoxkine*" (Lue *et al.*, 2002; Kraemer *et al.*, 2012)

*MIF* memainkan peran penting dalam respon imun bawaan. Ekspresinya meningkat pada berbagai inflamasi (Akyildiz *et al.*, 2010). Molekul proinflamasi TNF-α, IL-5, IFN-γ, dan lipopolisakarida (LPS) semuanya telah terbukti merangsang ekspresi *MIF* dan

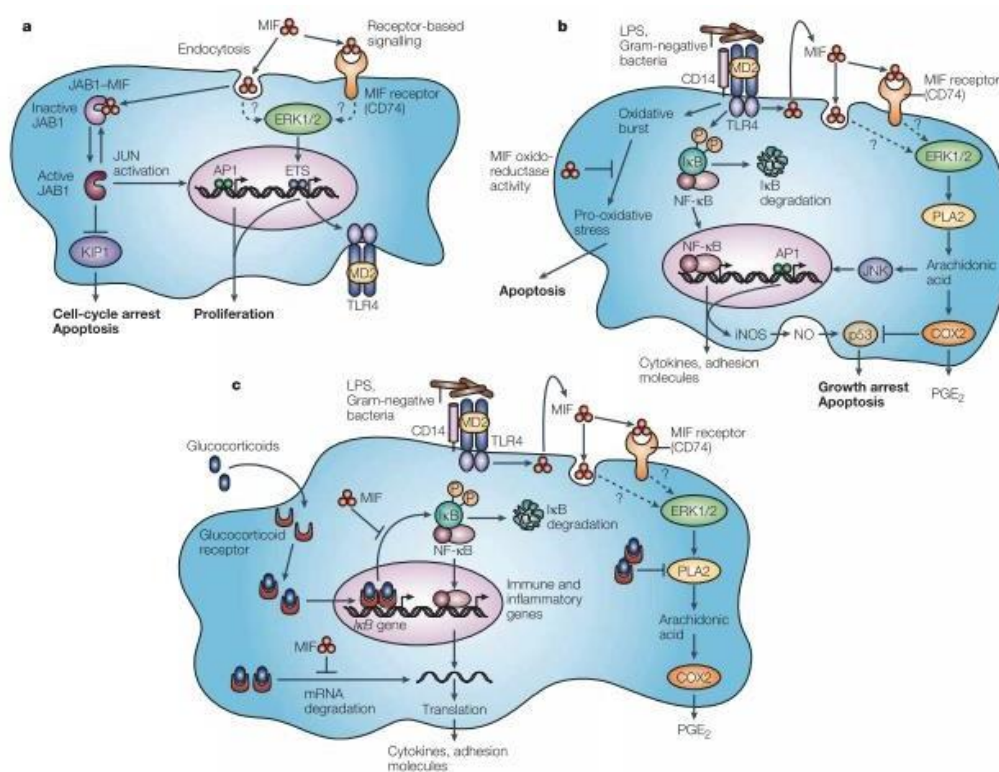
sekresi protein MIF (Daryadel *et al.*, 2006; Kasama *et al.*, 2010). Setelah dilepaskan di jaringan atau dalam sirkulasi sistemik, MIF bertindak sebagai sitokin proinflamasi klasik yang mempromosikan respons imun bawaan dan adaptif melalui aktivasi makrofag dan sel T (Calandra and Roger, 2003). Makrofag yang kekurangan MIF ditemukan mengalami hiporesponsif terhadap LPS dan bakteri Gram-negatif, tetapi tidak terhadap rangsangan lain, seperti yang ditunjukkan oleh berkurangnya produksi sitokin karena penurunan regulasi ekspresi TLR4 - molekul transduksi sinyal dari kompleks reseptor LPS. MIF mengatur ekspresi *TLR4* dengan bekerja pada famili faktor transkripsi ETS, yang sangat penting untuk transkripsi gen *TLR4* tikus (Alibashe-Ahmed *et al.*, 2019). Oleh karena itu, MIF memfasilitasi deteksi bakteri yang mengandung endotoksin, memungkinkan sel-sel yang berada di garis depan sistem pertahanan antimikroba *host*, seperti makrofag, untuk merespon dengan cepat terhadap bakteri invasif. Produksi sitokin proinflamasi yang cepat sangat penting untuk meningkatkan respons pertahanan inang (Calandra and Roger, 2003).

Peradangan akut adalah proses perlindungan, menguntungkan, dan merupakan proses *self-limiting* selama respons imun bawaan, tetapi peradangan kronis bersifat maladaptif dan dapat menyebabkan cedera dan disfungsi jaringan (Kok *et al.*, 2018). Sebagai contoh, beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa MIF memainkan peran penting dalam patologi peradangan

kandung kemih. Dalam substansi jaringan kandung kemih P, mediator inflamasi penting, meningkatkan kadar MIF. Peran penting MIF kemudian ditunjukkan oleh pemberian antibodi anti-MIF yang dapat menurunkan perubahan inflamasi yang diinduksi zat P pada kandung kemih (Bruchfeld *et al.*, 2016). MIF juga terbukti berperan dalam memburuknya peradangan paru-paru. Kadar MIF yang tinggi dilaporkan merusak kelangsungan hidup dalam model tikus pneumonia pneumokokus. Pengobatan tikus dengan inhibitor molekul kecil (*small molecule inhibitor*) MIF, MIF098 (Alissa-5), meningkatkan kelangsungan hidup tikus dengan mengurangi respon inflamasi (Weiser *et al.*, 2015). Selain itu, kadar MIF yang lebih tinggi dihasilkan oleh makrofag alveolar pada tikus coba dengan COPD dibandingkan dengan tikus yang sehat, dan penghambatan fungsi MIF oleh ISO-1 dapat memblokir peradangan paru yang tidak sensitif terhadap kortikosteroid (Russell *et al.*, 2016). Penelitian-penelitian juga dengan jelas menunjukkan bahwa MIF dapat memainkan peran dalam peradangan kronis, di mana pendekatan berbasis MIF juga tampaknya menjanjikan strategi terapi (Lue *et al.*, 2002; Hoi *et al.*, 2007; Weiser *et al.*, 2015; Russell *et al.*, 2016; Bruchfeld *et al.*, 2016).

Mekanisme kerja MIF diilustrasikan pada gambar 12. Pertama, MIF dapat memediasi aktivitas biologisnya baik melalui jalur klasik yang dimediasi reseptor atau melalui jalur endositik non-klasik. MIF telah ditunjukkan dapat mengikat CD74 dan memfosforilasi *Extracellular signal-regulated kinases 1* (ERK1) /

ERK2 protein. MIF merangsang pertumbuhan sel dan mengaktifkan faktor-faktor transkripsi famili ETS yang diketahui sangat penting untuk ekspresi gen TLR4 Toll yang mengkode molekul transduksi sinyal dari kompleks reseptor lipopolisakarida (LPS). MIF mengikat *JUN-activation domain-binding protein 1* (JAB1), mencegah aktivasi JUN yang diinduksi JAB1 dan degradasi inhibitor proliferasi sel KIP1 yang diinduksi JAB1, sehingga mengarah pada penghentian siklus sel dan apoptosis. Kedua, induksi dan regulasi respon inflamasi sel imun bawaan oleh MIF. MIF meningkatkan regulasi TLR4 oleh makrofag yang memungkinkan pengenalan cepat bakteri yang mengandung endotoksin, yang merangsang produksi sitokin (termasuk MIF), NO dan mediator lainnya. Setelah dikeluarkan, MIF mengaktifkan kaskade peristiwa yang terdiri dari fosforilasi ERK1 / ERK2, induksi sitoplasma fosfolipase A2 (PLA2), asam arakidonat, aktivitas JUN N-terminal kinase (JNK) dan prostaglandin E2 (PGE2). Melalui generasi aktivitas oksidoreduktasease dan siklooksigenase 2 (COX2), MIF mencegah apoptosis yang disebabkan oleh aktivasi yang dimediasi oleh ledakan oksidatif dan oleh p53. Ketiga, MIF mengatur balik efek immunosupresif glukokortikoid pada tingkat transkripsi dan pasca transkripsi. MIF menghambat induksi inhibitor NF- $\kappa$ B yang dimediasi glukokortikoid dan destabilisasi messenger RNA, dan mengesampingkan penghambatan aktivitas PLA2 yang dimediasi oleh glukokortikoid dan produksi asam arakidonat (Calandra and Roger, 2003).



Gambar 12. Mekanisme kerja MIF

MIF bekerja melalui tiga mekanisme: A. MIF dapat memediasi aktivitas biologisnya dengan mengikat CD74 dan memfosforilasi Extracellular signal-regulated kinases 1 (ERK1) / ERK2 protein yang pada akhirnya mengarah pada penghentian siklus sel dan apoptosis. B. MIF meningkatkan regulasi TLR4 oleh makrofag yang memungkinkan pengenalan cepat bakteri yang mengandung endotoksin, yang merangsang produksi sitokin (termasuk MIF), NO dan mediator lainnya. C. MIF mengatur balik efek immunosupresif glukokortikoid pada tingkat transkripsi dan pasca transkripsi. (Calandra and Roger, 2003).

Dua polimorfisme promotor fungsionalnya telah dipelajari.

Salah satunya adalah transisi G ke C pada -173 (rs755622) dan yang lainnya adalah pengulangan tetranukleotida 5-8 (CATT) pada -794 (Budarf et al., 1997). Alel *MIF* -173 C menciptakan tempat pengikatan untuk pengaktifan peningkat faktor transkripsi protein 4 dan dikaitkan dengan peningkatan ekspresi gen *MIF* dan tingkat protein dengan cara yang bergantung pada jenis sel (*cell-type*-

*dependent manner*) (Donn et al., 2002). Sedangkan studi mengenai polimorfisme MIF -794CATT<sub>5-8</sub> menunjukkan jumlah pengulangan CATT dapat mengatur aktivitas promotor gen MIF. Semakin tinggi jumlah pengulangan, semakin kuat aktivitas promotor (Yanlin Li, Zeng, et al., 2012). Alel MIF -173 C berada dalam *linkage disequilibrium* yang kuat dengan alel -794CATT<sub>7</sub>, dan *haplotype* -794CATT<sub>7</sub> – MIF -173C berkorelasi dengan peningkatan produksi MIF (Bae & Lee, 2018; Baugh et al., 2002). Tabel 5 memperlihatkan polimorfisme MIF -173 G/C, lokasi dan perubahan nukleotida.

Tabel 5. Lokasi polimorfisme *MIF* dan perubahan nukleotida

| SNP                               | Genotipe          | Lokasi pada Gen <i>MIF</i><br>( <i>Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (MIF)</i> ,<br><i>RefSeqGene on chromosome 22</i><br><i>NCBI Reference Sequence: NG_012099.1</i> )   | Perubahan nukleotida  |
|-----------------------------------|-------------------|---|---|
| <b>MIF -173 G/C</b><br>(rs755622) | G/G<br>G/C<br>C/C | <ul style="list-style-type: none"> <li>• promotor</li> </ul> <pre> rs755622_MIF RefSeqGene NG_012099.1:g.4828G&gt; 4801 gatttctagc cgccaagtgg agaacaggtt ggagcggatc gccgggctta gcggcggattg 4861 ctggaggaac gggcggagtc gcccagggtc ctgccctgcg ggggtcgagc cgaggcaggc 4921 ggtgacttcc ccactcgggg cggagccqca qcctcgcggg ggcggggcct ggcqccggcg           </pre> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• transisi G → C</li> <li>• Alel <i>MIF</i>-173 C menciptakan tempat pengikatan untuk pengaktifan peningkat faktor transkripsi protein 4 dan dikaitkan dengan peningkatan ekspresi gen <i>MIF</i> dan tingkat protein</li> </ul> |

Polimorfisme promotor gen *MIF* dikaitkan dengan produksi berlebih dari MIF dan telah ditemukan memberikan peningkatan risiko kerentanan terhadap penyakit inflamasi kronis. De Benedetti dkk. melaporkan bahwa alel *MIF*-173 \* C mencerminkan peningkatan risiko kerentanan terhadap artritis juvenil idiopatik dan merupakan prediktor *outcome* yang buruk pada penyakit ini (De Benedetti *et al.*, 2003). Studi Fei dkk. menggambarkan bahwa genotipe *MIF*-173 CC dapat dikaitkan dengan kerentanan terhadap kolitis ulseratif (Fei *et al.*, 2008). Sebaliknya, penelitian Nohara dkk. tidak menunjukkan perbedaan genotipe *MIF* pada pasien dengan kolitis ulserativa di Jepang dan tingkat keparahan penyakit usus (Nohara *et al.*, 2004). Pada penelitian lainnya oleh menunjukkan Alel *MIF* – 173\*C dan genotipe gen *MIF* tidak berpengaruh pada *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) dan pada ekspresi *MIF* dalam jaringan hati pada pasien dengan NAFLD. Namun, dalam studi ini diperoleh ekspresi *MIF* meningkat secara signifikan terutama pada sel mononuklear dalam jaringan hati pasien dengan *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) yang dapat disebabkan karena inflamasi, sehingga peningkatan ekspresi *MIF* tersebut dianggap sebagai konsekuensi akibat inflamasi, bukan sebagai faktor penyebab (Akyildiz *et al.*, 2010). Polimorfisme lain adalah pengulangan CATT-tetranukleotida pada posisi –794, yang berkorelasi dengan tingkat keparahan penyakit dalam kelompok pasien dengan artritis reumatoid (Baugh *et*



*al.*, 2002).

## 2. Hubungan MIF dengan Tuberkulosis

Penelitian telah menunjukkan bahwa MIF dapat menghambat migrasi dan meningkatkan agregasi makrofag di lokasi peradangan lokal atau infeksi, sehingga MIF dibutuhkan dalam pertahanan inang dari infeksi (Ma *et al.*, 2018). Studi mengenai hewan-hewan yang kekurangan MIF menunjukkan peningkatan akumulasi neutrofil paru sementara respons imun adaptif tetap berlangsung. Makrofag yang kekurangan MIF menunjukkan penurunan sitokin dan produksi oksigen reaktif serta gangguan aktivitas mikobakterisidal (Das *et al.*, 2013).

Dua polimorfisme dengan relevansi fungsional potensial telah diidentifikasi dalam promotor MIF: SNP pada posisi -173 (rs755622) (Donn *et al.*, 2002) dan polimorfisme mikrosatelit -794CATT<sub>5-8</sub> (Baugh *et al.*, 2002). Donn dkk. menemukan bahwa alel -173 G dan C secara signifikan terkait dengan peningkatan produksi protein MIF, dan menemukan bahwa polimorfisme mikrosatelit -794 CATT<sub>5-8</sub> dikaitkan dengan perubahan tingkat transkripsi gen *MIF* *in vitro* (Baugh *et al.*, 2002; Donn *et al.*, 2002). Signifikansi fungsional G / C pada posisi 173 dipelajari dengan menggunakan transeksi transien di 2 *cell line* manusia yang berbeda. Dalam *cell line* epitel, polimorfisme G ditemukan berkorelasi dengan peningkatan ekspresi *MIF*. Dalam *cell line* limfoblas T, ditemukan situasi sebaliknya, dengan *MIF*-173 \* C memberikan peningkatan ekspresi *MIF* secara

signifikan pada kondisi underbasal. Perbedaan ekspresi ini kemungkinan besar disebabkan oleh perbedaan interaksi faktor transkripsi dengan elemen *MIF* -173. Berdasarkan analisis urutan promotor, faktor transkripsi AP-4 (*activator protein 4*) merupakan kandidat tertentu (Donn et al., 2002).

Dua penelitian pada populasi Cina menunjukkan variasi genetik pada gen *MIF* terkait erat dengan tuberkulosis, yaitu baik -173 (GC + CC) SNP dan mikrosatelit -794 (7 / X + 8 / X) meningkatkan risiko TB (Li, Yuan, et al., 2012; Li, Zeng, et al., 2012). Berbeda (R. Das et al., 2013; Reid et al., 2019). Namun, pada studi yang lebih baru, Gehlen dkk. tidak menemukan asosiasi antara *MIF* -173 G/C dengan kerentanan terhadap TB (Gehlen et al., 2020). Pada studi *in vitro* dengan menggunakan *human THP-1 macrophages* (sel yang digunakan sebagai model untuk monosit manusia), MIF dilepaskan dengan cepat dari makrofag manusia begitu setelah distimulasi mikobakteri dan cukup stabil dalam waktu sejam lalu meningkat setelah empat dan enam jam, begitu juga dengan transkripsi *MIF* juga meningkat (*upregulated*) yang diukur dengan *reverse transcription* PCR (RT-PCR) (R. Das et al., 2013). Studi-studi keterkaitan MIF dan tuberkulosis dirangkum pada tabel 6.

Karena protein MIF tampaknya memainkan peran sentral dalam mediasi beragam respon imun terhadap patogen yang menyerang dalam sistem manusia, polimorfisme pada gen *MIF* dapat dikaitkan dengan onset dan / atau pengembangan TB. Namun,

ada spekulasi bahwa, ketika tubuh terinfeksi *Mtb*, seharusnya ada mekanisme yang dapat menyebabkan hilangnya MIF atau melemahkan penghambatan *Mtb*. Singkatnya, mekanisme MIF dalam pengembangan TB masih belum jelas, dan penelitian lebih lanjut masih diperlukan untuk memastikannya.

Tabel 6. Studi polimorfisme *MIF* -173 G/C (rs755622) dan mikrosatelit *MIF* -794CATT5-8 (rs5844572) serta ekspresi gen *MIF* terkait dengan penyakit tuberkulosis

| No | Lokasi studi                    | Jumlah subjek   | Hasil penelitian  |                         | Referensi                       |
|----|---------------------------------|---|---|-------------------------|---------------------------------|
|    |                                 |   | Polimorfisme <i>MIF</i> -173 G/C (rs755622) dan mikrosatelit <i>MIF</i> -794CATT <sub>5-8</sub> (rs5844572)   | Ekspresi Gen <i>MIF</i> |                                 |
| 1  | Populasi Northwestern Colombia  | 230 pasien TB paru<br>235 kontrol sehat (TST positif dan TST negatif) | Metode: Taqman SNP Genotyping Assay, konfirmasi dengan sekuensing (sebagian sampel)<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Alel C <i>MIF</i>-173 berhubungan dengan TB</b></li> <li>• Tidak ada perbedaan polimorfisme <i>MIF</i>-173 G/C antara TB dan kontrol dengan TST positif</li> </ul> |                         | (Go et al., 2007)               |
| 2  | Chongqing, China                | 151 pasien TB<br>149 kontrol sehat                                    | Metode: PCR-sekuensing<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Genotipe <i>MIF</i>-794 CATT 7/7 dan 7/8 dikaitkan dengan kerentanan TB</b></li> <li>• Genotipe CATT 5 + 6 dapat menghambat kerentanan TB.</li> </ul>   |                         | (Yanlin Li, Zeng, et al., 2012) |
| 3  | Chongqing, China (Populasi Han) | 215 pasien TB<br>245 kontrol sehat                                    | Metode: PCR-RFLP (enzim Alu1)<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Genotipe GC dan CC serta alel C dikaitkan dengan kerentanan TB</b></li> </ul> Metode: PCR-sekuensing<br>Genotipe <i>MIF</i> -794CATT 7/X dan 8/X serta alel -794 7+8 dikaitkan dengan kerentanan TB                      |                         | (Yanlin Li, Yuan, et al., 2012) |

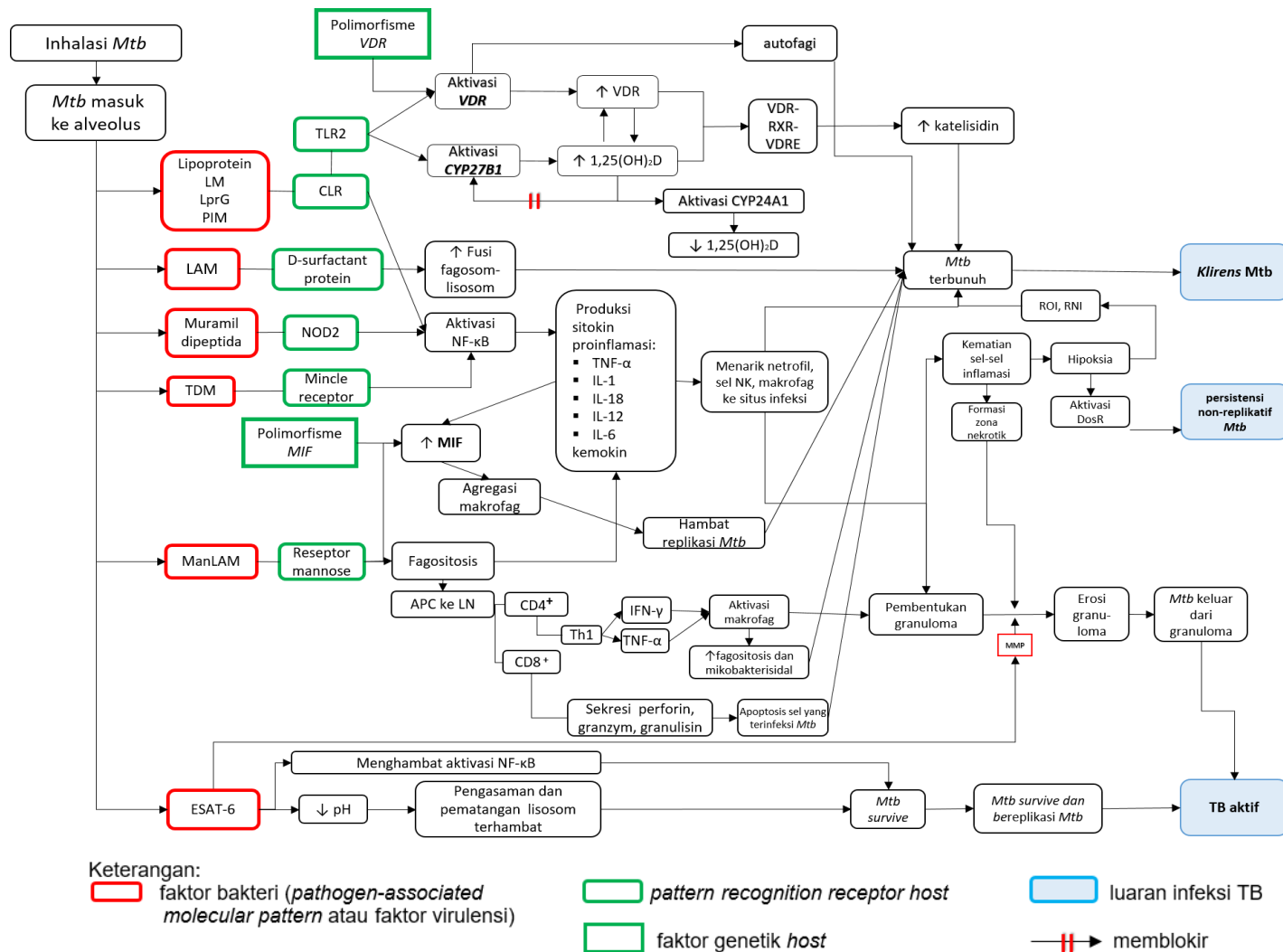
Lanjutan tabel 6

| No | Lokasi studi                                  | Jumlah subjek  | Hasil penelitian   |  | Referensi           |
|----|---|--|--|--|---------------------|
|    |   |  | Polimorfisme <i>MIF</i> -173 G/C (rs755622) dan dan mikrosatelit <i>MIF</i> -794 CATT <sub>5-8</sub> (rs5844572)   | Ekspresi Gen <i>MIF</i>  |                     |
| 4  | China (East China)                            | 47 pasien TB paru<br>50 kontrol  | Metode: PCR RFLP <ul style="list-style-type: none"> <li>-794 CATT<sub>7atau8</sub> dan -173 C lebih berisiko mengidap TB dengan peningkatan kadar MIF</li> </ul>   | Metode: real-time PCR dari PBMC ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ) <ul style="list-style-type: none"> <li>Ekspresi mRNA MIF meningkat pada pasien TB dibanding kontrol</li> <li>Ekspresi mRNA MIF lebih meningkat pada genotipe -794 CATT<sub>7atau8</sub> dibanding CATT<sub>5atau6</sub></li> </ul> Ekspresi mRNA MIF-173 GG lebih rendah daripada MIF-173 GC+CC, tapi tidak signifikan berbeda | (Kuai et al., 2016) |
| 5  | Durban, Tugella Ferry Greytown Afrika Selatan | Durban:<br>101 pasien TB paru-HIV<br>95 kontrol (TB laten-HIV dan HIV tanpa TB, TB laten diperiksa dengan TST, CXR, dan ELISpot) | Metode: real-time PCR dengan Taq- Man SNP Genotyping assay <ul style="list-style-type: none"> <li>Genotipe MIF-173 G/C tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik pada TB laten versus TB laten negatif</li> <li>ada hubungan antara MIF-173 G/C dengan kejadian TB pada pasien HIV</li> </ul> |  | (Reid et al., 2019) |

Lanjutan tabel 6

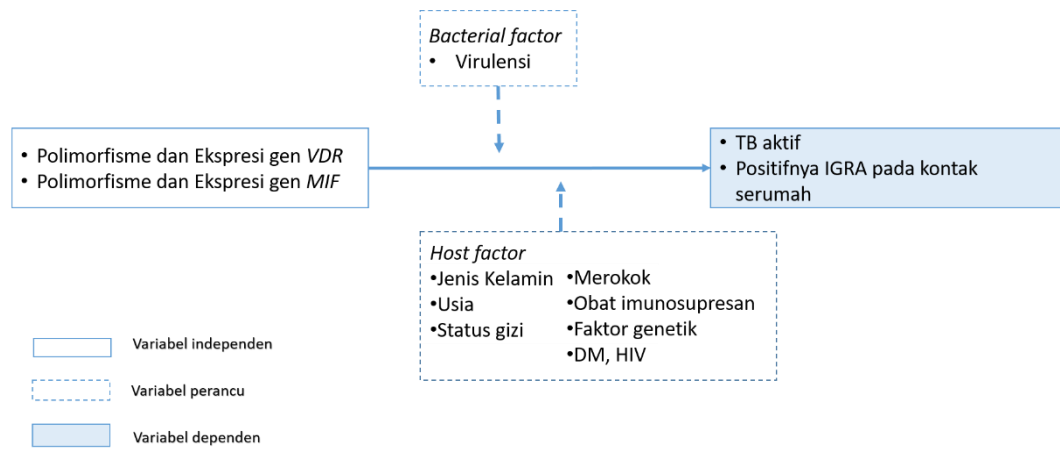
| No | Lokasi studi    | Jumlah subjek                           | Hasil penelitian  |   | Referensi             |
|----|-----------------|---|---|---|-----------------------|
|    |                 |   | Polimorfisme <i>MIF</i> -173 G/C (rs755622) dan dan mikrosatelit <i>MIF</i> -794 CATT <sub>5-8</sub> (rs5844572)                  | Ekspresi Gen <i>MIF</i>   |                       |
| 6  | Southern Brazil | 174 pasien TB paru<br>166 kontrol sehat | Metode: real-time PCR dengan Taq- Man<br>SNP Genotyping assay<br>Tidak ada hubungan polimorfisme <i>MIF</i> -173<br>G/C dengan TB |   | (Gehlen et al., 2020) |
| 7  | Studi in vitro  |   |   | Metode: <i>quantitative</i> PCR<br><b>Transkripsi <i>MIF</i> meningkat pada makrofag (sel THP-1 manusia) yang diinfeksi <i>Mtb</i>.</b> | (R. Das et al., 2013) |

## E. Kerangka teori



Gambar 13. Kerangka Teori

## F. Kerangka konseptual



Gambar 14. Kerangka konseptual

## G. Hipotesis

Adapun hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Terdapat hubungan antara polimorfisme gen *VDR* dan *MIF* dengan kejadian TB paru aktif dan positifnya IGRA.
2. Terdapat perbedaan ekspresi gen *VDR* dan *MIF* antara pasien TB paru aktif dengan kontak serumah IGRA positif dan IGRA negatif