

**HUBUNGAN POLIMORFISME INTERFERON GAMMA
+874T/A DENGAN KERENTANAN DAN DERAJAT
KEPARAHAN PENYAKIT TUBERKULOSIS PARU
DI MALANG INDONESIA**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Spesialis Paru**



Oleh:

dr. David Alvianto

NIM. 128070300011002

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
PULMONOLOGI DAN KEDOKTERAN RESPIRASI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
RSU Dr. SAIFUL ANWAR MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**HUBUNGAN POLIMORFISME INTERFERON GAMMA +874T/A
DENGAN KERENTANAN DAN DERAJAT KEPARAHAN PENYAKIT
TUBERKULOSIS PARU DI MALANG INDONESIA**

Oleh:

dr. David Alvianto

NIM. 128070300011002

Telah diuji pada

Hari: Senin

Tanggal: 23 April 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

Dr. dr. Susanthi Djajalaksana, SpP(K)

NIP. 196205071989032007

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Yani Jane Sugiri, SpP(K)
NIP. 196312171989112001

dr. Iin Noor Chozin, SpP(K)
NIP. 19710920 201410 2 002

**Mengetahui,
Ketua Program Studi Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi**

Dr. dr. Susanthi Djajalaksana, SpP(K)
NIP. 196205071989032007

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : dr. David Alvianto

NIM : 128070300011002

Program Studi : Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya

Judul Penelitian: Hubungan Polimorfisme Interferon Gamma +874T/A dengan
Kerentanan dan Derajat Keparahan Penyakit Tuberkulosis Paru
di Malang Indonesia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 30 April 2018

Yang membuat pernyataan,

dr. David Alvianto
NIM. 128070300011002

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa yang senantiasa memberikan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “HUBUNGAN POLIMORFISME INTERFERON GAMMA +874T/A DENGAN KERENTANAN DAN DERAJAT KEPARAHAN PENYAKIT TUBERKULOSIS PARU DI MALANG INDONESIA” tepat pada waktunya.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang setulus tulusnya kepada:

1. dr. Yani Jane Sugiri, SpP(K) selaku pembimbing pertama yang senantiasa dengan sabar memberikan arahan sekaligus motivasi kepada penulis.
2. dr. lin Noor Chozin, SpP(K) selaku pembimbing kedua atas bimbingan dan masukannya dalam penyusunan makalah.
3. dr. Nanik Setijowati, MKes yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing statistik dan metodologi penelitian.
4. dr. Teguh Rahayu Sartono, SpP(K) selaku Kepala SMF/Lab Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi FKUB/RSSA Malang sekaligus sebagai pembimbing akademis atas bimbingan dan motivasinya.
5. Dr. dr. Susanthi Djajalaksana, SpP(K) selaku Ketua Program Studi Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi FKUB/RSSA yang selalu mendukung dan memberikan inspirasi kepada penulis.
6. Para supervisor Program Studi Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi FKUB, dr. Ngakan Putu Parsama Putra, SpP(K), dr. Triwahju Astuti, MKes, SpP(K), dr. Suryanti Dwi Pratiwi, SpP(K), dr. Ungky Agus Setiawan, SpP untuk semua dukungan dan bimbingannya.

7. Segenap petugas admin SMF Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi, Mbak Rini, Mbak Elly, Mas Deni, Mbak Desrina atas semua bantuannya kepada penulis.
8. Segenap petugas laboratorium Lab Biosain Universitas Brawijaya, Mbak Susi, Mbak Rista dan Mbak Farah atas bantuannya selama mengerjakan penelitian di Laboratorium.
9. Ibunda tercinta, Yoke Elvire Souhuwat untuk doa, kasih sayang dan dukungan kepada penulis.
10. Istri tercinta, dr Dewi Astasari, SpA atas semua dukungan, doa, dan pengertiannya.
11. Ketiga anak tersayang, Grace Safira Putridevi, Gevarel Pramaditya Putradewanto, dan Ghefira Anindya Putridevi yang menjadi motivasi dan penyemangat penulis untuk segera menyelesaikan tugas penelitian ini.
12. dr. Wahyu dan dr. Anis atas kerjasama selama proses penelitian.
13. Semua pihak lain yang terlibat dan membantu menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk saran dan masukan yang membangun. Pada akhirnya semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 30 April 2018

Penulis

ABSTRAK

Alvianto, David. 2018. Hubungan Polimorfisme Interferon Gamma +874T/A Dengan Kerentanan Dan Derajat Keparahan Penyakit Tuberkulosis Paru Di Malang Indonesia. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis I Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1). dr. Yani Jane Sugiri, Sp.P (K). (2). dr. Iin Noor Chozin, Sp.P(K). (3). dr. Nanik Setijowati, M.Kes.

Latar Belakang: Tuberkulosis paru merupakan masalah kesehatan dunia. Dari semua orang yang terinfeksi tuberkulosis hanya sebagian kecil berkembang menjadi sakit tuberkulosis. Masih belum jelas penyebab mengapa seseorang yang terinfeksi tuberkulosis bisa menjadi sakit sementara yang lainnya bisa bertahan dari infeksi tersebut. Faktor genetik dipercaya mempengaruhi kerentanan seseorang terhadap infeksi tuberkulosis. IFN- γ merupakan sitokin kunci dalam patogenesis infeksi tuberkulosis. **Tujuan:** Mengetahui hubungan polimorfisme IFN- γ +874T/A dengan kerentanan dan derajat keparahan penyakit tuberkulosis paru. **Metode:** Penelitian *case control* dari Maret 2018 sampai Mei 2018 melibatkan 80 orang yang terdiri dari 27 penderita tuberkulosis paru sensitif obat, 27 penderita tuberkulosis paru resisten obat dan 26 subjek sehat di Malang Indonesia. Pemeriksaan polimorfisme menggunakan metode Elektroforesis multipleks. **Hasil:** Polimorfisme IFN- γ +874 alel A dan genotip AA meningkatkan kerentanan terhadap terjadinya tuberkulosis paru (baik sensitif obat maupun resisten obat) (OR: 9.8, 95% CI 2.955-32.506, $p < 0.001$; dan OR: 18.85, 95% CI 4.340–81.864, $p < 0.001$). Genotip AA secara signifikan berhubungan dengan gambaran lesi luas pada foto toraks ($p = 0.007$) dan juga dengan jumlah kuman Mtb yang banyak dalam sputum ($p = 0.029$). **Kesimpulan:** Polimorfisme Interferon Gamma +874 alel A dan genotip AA meningkatkan kerentanan terhadap tuberkulosis paru dan berhubungan dengan derajat penyakit tuberkulosis paru yang lebih berat.

Kata kunci : Polimorfisme, interferon gamma +874T/A, tuberkulosis paru, kerentanan, keparahan penyakit

ABSTRACT

Alvianto, David. 2018. Association of Interferon Gamma +874T/A Gene Polymorphism with Susceptibility and Disease Severity of Pulmonary Tuberculosis in Malang Indonesia. Final Assignment, Pulmonology and Respiriology Medical Program, Medical Faculty of Brawijaya University – Saiful Anwar Hospital. Supervisors: (1). dr. Yani Jane Sugiri, Sp.P (K). (2). dr. Iin Noor Chozin, Sp.P(K). (3). dr. Nanik Setijowati, M.Kes.

Background: Pulmonary tuberculosis are a global health problem. Of all people infected with tuberculosis only a small proportion develops into tuberculosis. It remains unclear why a person who is infected with tuberculosis can become ill while others can survive the infection. Genetic factors are believed to affect a person's susceptibility to tuberculosis infection. IFN- γ is the key cytokine in the pathogenesis of tuberculosis infection. **Objective:** To determine the relationship of Interferon Gamma +874T/A gene polymorphism with susceptibility and disease severity of pulmonary tuberculosis. **Method:** The case control study from March 2018 to May 2018 involved 80 people consisting of 27 drug-sensitive pulmonary tuberculosis patients, 27 patients with drug-resistant pulmonary tuberculosis and 26 healthy subjects in Malang Indonesia. Polymorphism detected using multiplex electroforesis method. **Results:** IFN- γ +874 A allele and AA genotype increases susceptibility to both drug-sensitive and drug-resistant pulmonary tuberculosis (OR: 9.8, 95% CI 2.955-32.506, $p < 0.001$; dan OR: 18.85, 95% CI 4.340–81.864, $p < 0.001$). AA genotype is significantly associated with high load of Mtb in sputum ($p = 0.029$) and far advanced lesion in the chest x-ray ($p = 0.007$). **Conclusions:** Interferon Gamma +874 A allele and AA genotype polymorphisms increases susceptibility to pulmonary tuberculosis and .is associated with severe disease.

Keywords: Polymorphism, interferon gamma +874T/A, pulmonary tuberculosis, susceptibility, disease severity

DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Pengesahan	ii
Lembar Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
<i>Abstract</i>	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xii
Daftar Singkatan	xiv
Daftar Lampiran	xvi
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Akademik	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 6
2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2.2 Patogenesis TB	7
2.2.1 Konsep patogenesis TB	7
2.2.2 TB post primer	8
2.3 Respon imun terhadap <i>Mtb</i>	11
2.3.1 Respon imun bawaan	11
2.3.2 Respon imun adaptif	13
2.4 Faktor resiko terjadinya penyakit TB	16
2.4.1 Faktor paparan kuman TB	16
2.4.2 Faktor individu itu sendiri (host)	16
2.4.3 Faktor eksternal	17
2.5 Diagnosis TB Paru pada orang dewasa	18
2.6 Interferon gamma (IFN- γ)	22
2.7 Polimorfisme	26
2.7.1 <i>Deletion/Insertion Polymorphism</i>	29
2.7.2 <i>Microsatellite Polymorphism</i>	29
2.7.3 <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP)	30
2.7.4 Prosedur pemeriksaan polimorfisme	31
2.7.4.1 Sekuensing DNA	31
2.7.4.2 Elektroforesis multiplex	31
2.7.4.3 PNA Directed PCR Clamping	31
2.7.4.4 Microarrays (DNA chips)	31
2.7.4.5 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	32
2.7.4.6 Flow Cytometry Based Genotyping	33
2.7.5 Polimorfisme gen pada TB	33
2.7.6 Polimorfisme IFN- γ +874 T/A pada TB	34

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
3.1 Kerangka Teori Penelitian	36
3.2 Kerangka Konsep Penelitian	40
3.3 Hipotesis Penelitian.....	42
 BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Desain Penelitian	43
4.2 Subyek Penelitian dan Besar Sampel.....	43
4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian	44
4.4 Variabel Penelitian	44
4.5 Definisi Operasional dan Parameter.....	45
4.6 Instrumen Pengumpulan Data	47
4.7 Prosedur Pemeriksaan	48
4.7.1 Prosedur Pengambilan Darah Vena	48
4.7.2 Prosedur Pemeriksaan Polimorfisme Interferon- γ +874T/A.....	49
4.7.3 Prosedur Kerja Isolasi DNA Metode Salting Out.....	49
4.8 Teknik Pengumpulan Data	51
4.9 Teknik Pengolahan dan Analisa Data.....	51
4.10 Alur Penelitian	52
 BAB 5 HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN	
5.1 Karakteristik Subyek Penelitian	53
5.1.1 Karakteristik Sosiodemografi Subyek Penelitian	53
5.1.2 Karakteristik Klinis Subyek Penelitian	55
5.2 Hasil Pemeriksaan Polimorfisme IFN γ +874T/A	58
5.2.1 Frekuensi Alel dan Genotip Polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB dan Kontrol Sehat	59
5.2.2 Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A dengan Kerentanan terhadap TB Paru	60
5.2.3 Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A dengan Derajat Keparahan Penyakit TB Paru.....	63
 BAB 6 DISKUSI	
6.1 Karakteristik Subyek Penelitian	65
6.1.1 Karakteristik Sosiodemografi Subyek Penelitian	65
6.1.2 Karakteristik Klinis Subyek Penelitian	67
6.2 Frekuensi Alel dan Genotip Polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB dan Kontrol Sehat	69
6.3 Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A dengan Kerentanan terhadap TB Paru	70
6.4 Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A dengan Derajat Keparahan Penyakit TB Paru.....	71
 BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	73
7.2 Saran	73

DAFTAR PUSTAKA	75
LAMPIRAN	82



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Struktur dari Interferon gamma.....	23
Tabel 2.2 Polimorfisme Gen pada TB.....	34
Tabel 5.1 Karakteristik Sosiodemografi Subyek Penelitian.....	54
Tabel 5.2 Keluhan Utama Subyek Penelitian Setiap Kelompok Kasus.....	56
Tabel 5.3 Gambaran Rontgen Dada Pada Setiap Kelompok Kasus.....	57
Tabel 5.4 Pemeriksaan TCM Subyek Penelitian.....	57
Tabel 5.5 Frekuensi Alel dan Genotip Polimorfisme IFN- γ +874T/A.....	59
Tabel 5.6 Hubungan Polimorfisme IFN- γ +874T/A Kelompok TB dengan Kontrol Sehat.....	60
Tabel 5.7 Hubungan Polimorfisme IFN- γ +874T/A Kelompok TB SO dengan Kontrol Sehat.....	61
Tabel 5.8 Hubungan Polimorfisme IFN- γ +874T/A Kelompok TB RO dengan Kontrol Sehat.....	61
Tabel 5.9 Hubungan Polimorfisme IFN- γ +874T/A Kelompok TB SO dengan TB RO.....	62
Tabel 5.10 Hubungan Polimorfisme IFN- γ +874T/A Kelompok TB dengan Gambaran Lesi pada Foto Toraks.....	63
Tabel 5.11 Hubungan Polimorfisme IFN- γ +874T/A Kelompok TB dengan Jumlah Mtb yang Terdeteksi dalam Sputum TCM.....	64

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>High-Power Micrograph</i> Basil Tahan Asam Dalam (BTA) Dahak Pasien TB.....	7
Gambar 2.2 Perjalanan Infeksi <i>Mtb</i>	7
Gambar 2.3 Tahapan Patogenesis Tuberkulosis.....	8
Gambar 2.4 Patogenesis Tuberkulosis Post Primer.....	10
Gambar 2.5 Sistem Imun Bawaan pada Tuberkulosis.....	12
Gambar 2.6 Respon imun adaptif terhadap infeksi TB	13
Gambar 2.7 Alur Diagnosis Tuberkulosis Paru pada Orang Dewasa.....	18
Gambar 2.8 Proses pengaktifan makrofag dan sel T, penghancuran <i>Mtb</i> dan pembentukan granuloma	24
Gambar 2.9 Peranan Interferon gamma pada <i>Mtb</i>	25
Gambar 2.10 Spektrum Klinis Polimorfisme dan Mutasi Genetik	28
Gambar 2.11 Deletion/Insertion Polymorphism (DIP).....	29
Gambar 2.12 Single Nucleotide Polymorphism (SNP).....	30
Gambar 2.13 Pemeriksaan Polimorfisme Menggunakan Metode Microarrays .	32
Gambar 2.14 Ilustrasi pemeriksaan RFLP	33
Gambar 3.1 Kerangka Teori Penelitian	36
Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian	40
Gambar 4.1 Alur Penelitian	52
Gambar 5.1 Keluhan Utama Subyek Penelitian	55
Gambar 5.2 Gambaran Rontgen Dada Subyek Penelitian	56
Gambar 5.3 Distribusi Tipe Pasien TB Resisten Obat.....	58

Gambar 5.4 Hasil Elektroforesis Multiplex Polimorfisme IFN- γ +874T/A 58



DAFTAR SINGKATAN

APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
BAL	: <i>Broncho Alveolar Lavage</i>
BCG	: <i>Bacille Calmette Guerin</i>
CTLA	: <i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated</i>
CMI	: <i>cell-mediated immunity</i>
DIP	: <i>Deletion/Insertion Polymorphism</i>
DM	: <i>Diabetes Mellitus</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	: <i>Ethylenediametetraaceti acid</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
LAM	: <i>lipoarabinomannan</i>
MDR	: <i>Multi Drug Resistant</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
Mtb	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NFkB	: <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
NRAMP1	: <i>Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1</i>
OAT	: <i>Obat Anti Tuberkulosis</i>
PAMPs	: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>

PNA	: <i>Peptide Nucleic Acid</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptor</i>
RBC	: <i>Red Blood Cell</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RFLP	: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RO	: <i>Resisten Obat</i>
rs	: <i>Reference SNP Cluster Id</i>
SNP	: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SO	: <i>Sensitif Obat</i>
STR	: <i>Short Tandem Repeats</i>
SSR	: <i>Simple Sequence Repeats</i>
TB	: <i>Tuberkulosis</i>
TCM	: <i>Tes Cepat Molekuler</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TLR	: <i>Toll Like Receptor</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
VDR	: <i>Vitamin D Receptor</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Formulir Data Dasar	82
Lampiran 2 Penjelasan Untuk Mengikuti Penelitian	83
Lampiran 3 Pernyataan Persetujuan Berpartisipasi Dalam Penelitian	84
Lampiran 4 Formulir “Informed Consent”	85
Lampiran 5 Analisa Statistik	89
Lampiran 6 Kelayakan Etik Penelitian	110
Lampiran 7 Dokumentasi Proses Penelitian	111
Lampiran 8 Pernyataan Keaslian Tulisan	112
Lampiran 9 Data Subyek Penelitian	113

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

HUBUNGAN POLIMORFISME INTERFERON GAMMA +874T/A
DENGAN KERENTANAN DAN DERAJAT KEPARAHAN PENYAKIT
TUBERKULOSIS PARU DI MALANG INDONESIA

Oleh:

dr. David Alvianto

NIM. 128070300011002

Telah diuji pada

Hari: Senin

Tanggal: 23 April 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

Dr. dr. Susanthi Djajalaksana, SpP(K)

NIP. 196205071989032007

Pembimbing I

dr. Yani Jane Sugiri, SpP(K)

NIP. 196312171989112001

Pembimbing II

dr. Iin Noor Chozin, SpP(K)

NIP. 19710920 201410 2 002

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi

Dr. dr. Susanthi Djajalaksana, SpP(K)

NIP. 196205071989032007

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : dr. David Alvianto

NIM : 128070300011002

Program Studi : Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya

Judul Penelitian: Hubungan Polimorfisme Interferon Gamma +874T/A dengan
Kerentanan dan Derajat Keparahan Penyakit Tuberkulosis Paru
di Malang Indonesia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 30 April 2018

Yang membuat pernyataan,




dr. David Alvianto
NIM. 128070300011002

ABSTRAK

Alvianto, David. 2018. Hubungan Polimorfisme Interferon Gamma +874T/A Dengan Kerentanan Dan Derajat Keparahan Penyakit Tuberkulosis Paru Di Malang Indonesia. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis I Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1). dr. Yani Jane Sugiri, Sp.P (K). (2). dr. Iin Noor Chozin, Sp.P(K). (3). dr. Nanik Setijowati, M.Kes.

Latar Belakang: Tuberkulosis paru merupakan masalah kesehatan dunia. Dari semua orang yang terinfeksi tuberkulosis hanya sebagian kecil berkembang menjadi sakit tuberkulosis. Masih belum jelas penyebab mengapa seseorang yang terinfeksi tuberkulosis bisa menjadi sakit sementara yang lainnya bisa bertahan dari infeksi tersebut. Faktor genetik dipercaya mempengaruhi kerentanan seseorang terhadap infeksi tuberkulosis. IFN- γ merupakan sitokin kunci dalam patogenesis infeksi tuberkulosis. **Tujuan:** Mengetahui hubungan polimorfisme IFN- γ +874T/A dengan kerentanan dan derajat keparahan penyakit tuberkulosis paru. **Metode:** Penelitian *case control* dari September 2017 sampai Januari 2018 melibatkan 80 orang yang terdiri dari 27 penderita tuberkulosis paru sensitif obat, 27 penderita tuberkulosis paru resisten obat dan 26 subjek sehat di Malang Indonesia. Pemeriksaan polimorfisme menggunakan metode Elektroforesis multipleks. **Hasil:** Polimorfisme IFN- γ +874 alel A dan genotip AA meningkatkan kerentanan terhadap terjadinya tuberkulosis paru (baik sensitif obat maupun resisten obat) (OR: 9.8, 95% CI 2.955-32.506, $p < 0.001$; dan OR: 18.85, 95% CI 4.340–81.864, $p < 0.001$). Genotip AA secara signifikan berhubungan dengan gambaran lesi luas pada foto toraks ($p = 0.007$) dan juga dengan jumlah kuman Mtb yang banyak dalam sputum ($p = 0.029$). **Kesimpulan:** Polimorfisme Interferon Gamma +874 alel A dan genotip AA meningkatkan kerentanan terhadap tuberkulosis paru dan berhubungan dengan derajat penyakit tuberkulosis paru yang lebih berat.

Kata kunci : Polimorfisme, interferon gamma +874T/A, tuberkulosis paru, kerentanan, keparahan penyakit

ABSTRACT

Alvianto, David. 2018. Association of Interferon Gamma +874T/A Gene Polymorphism with Susceptibility and Disease Severity of Pulmonary Tuberculosis in Malang Indonesia. Final Assignment, Pulmonology and Respiriology Medical Program, Medical Faculty of Brawijaya University – Saiful Anwar Hospital. Supervisors: (1). dr. Yani Jane Sugiri, Sp.P (K). (2). dr. Iin Noor Chozin, Sp.P(K). (3). dr. Nanik Setijowati, M.Kes.

Background: Pulmonary tuberculosis are a global health problem. Of all people infected with tuberculosis only a small proportion develops into tuberculosis. It remains unclear why a person who is infected with tuberculosis can become ill while others can survive the infection. Genetic factors are believed to affect a person's susceptibility to tuberculosis infection. IFN- γ is the key cytokine in the pathogenesis of tuberculosis infection. **Objective:** To determine the relationship of Interferon Gamma +874T/A gene polymorphism with susceptibility and disease severity of pulmonary tuberculosis. **Method:** The case control study from September 2017 to January 2018 involved 80 people consisting of 27 drug-sensitive pulmonary tuberculosis patients, 27 patients with drug-resistant pulmonary tuberculosis and 26 healthy subjects in Malang Indonesia. Polymorphism detected using multiplex electroforesis method. **Results:** IFN- γ +874 A allele and AA genotype increases susceptibility to both drug-sensitive and drug-resistant pulmonary tuberculosis (OR: 9.8, 95% CI 2.955-32.506, $p < 0.001$; dan OR: 18.85, 95% CI 4.340–81.864, $p < 0.001$). AA genotype is significantly associated with high load of Mtb in sputum ($p = 0.029$) and far advanced lesion in the chest x-ray ($p = 0.007$). **Conclusions:** Interferon Gamma +874 A allele and AA genotype polymorphisms increases susceptibility to pulmonary tuberculosis and is associated with severe disease.

Keywords: Polymorphism, interferon gamma +874T/A, pulmonary tuberculosis, susceptibility, disease severity

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan masalah kesehatan utama di dunia, karena secara global menjadi penyebab utama kematian karena suatu penyakit menular. Di seluruh dunia diperkirakan ada 9,6 juta kasus TB baru dan 1,5 juta kematian akibat TB. Di Indonesia sendiri berdasarkan WHO global report didapatkan peningkatan dari sebelumnya peringkat 4 dunia sekarang naik ke peringkat 2 setelah India dengan 1 juta kasus TB baru pada tahun 2015. Ditambah lagi kasus TB resisten obat (TB RO) yang membutuhkan pengobatan yang lebih sulit dan waktu yang lebih lama serta biaya yang lebih besar. Untuk mencapai target global pengurangan insiden TB 90% pada tahun 2035, diperlukan pendekatan dan inovasi baru baik di bidang diagnosis, tatalaksana terapi, maupun pendekatan terhadap faktor-faktor risiko terjadinya TB (WHO, 2016).

Sampai saat ini, masih belum jelas penyebab mengapa seseorang yang terinfeksi TB bisa menjadi sakit TB sementara yang lainnya mendemonstrasikan sistem imunitas efektif yang membatasi penyebaran *Mtb* sehingga bisa bertahan dari infeksi tersebut. Dari semua orang yang terinfeksi *Mtb* hanya 5 - 10% menjadi sakit TB (Butov *et al.*, 2016). Penelitian pada orang kembar monozigot dan dizigot mengindikasikan faktor genetik seseorang berpengaruh terhadap kerentanan terhadap infeksi (Hill, 2001). Respon imunitas tubuh pada awal terjadinya infeksi *Mtb* diperkirakan akan menentukan perjalanan penyakit selanjutnya. Pada orang yang rentan, kegagalan imunitas tubuh mengeliminasi

Mtb menyebabkan polipulsi *Mtb* meningkat dan beresiko terjadinya mutasi sehingga terjadi TB RO (Cadena *et al.*, 2016).

Kerentanan seseorang menderita TB ditentukan oleh kode genetik yang tersandi didalam gen pada untaian molekul DNA. Distribusi genotip ini sangat unik untuk setiap populasi dan ras. Polimorfisme suatu gen mungkin akan mengubah struktur protein yang dihasilkan sehingga akan berpengaruh pada fenotip individu tersebut termasuk kerentanan terhadap penyakit. Beberapa penelitian tentang polimorfisme pada TB MDR diantaranya gen HLA-DRB1, NRAMP1 dan VDR di India, siltokin IL-2, IL-4 dan IL-10 di Ukraina, SLC11A1 di Jepang (Sharma *et al.*, 2003; Vasantha *et al.*, 2015; Butov *et al.*, 2016). Di Indonesia, penelitian polimorfisme pada TB MDR diantaranya gen HLA-G, IL-10 dan IFN γ (Marwoto *et al.*, 2015; Sudarmo *et al.*, 2017).

Manifestasi klinis TB selain dipengaruhi faktor kuman *M. tuberculosis* dan lingkungan juga dapat dipengaruhi faktor pejamu yaitu umur, respons imun, malnutrisi, penyakit penyerta, dan faktor genetik (Glaziou *et al.*, 2013; Peresi *et al.*, 2012; Kulkarni *et al.*, 2013). Pengaruh faktor genetik juga dapat dilihat dari perbedaan angka kejadian TB jika didasarkan ras, etnis, dan famili (Azad *et al.*, 2012). Hubungan antara latar belakang genetik host dan kerentanan infeksi *M.tuberculosis* telah banyak terbukti (Valinoto *et al.*, 2010). Interferon- γ bertugas memperkuat potensi fagosit makrofag yang terinfeksi bakteri *M.tuberculosis* dengan cara menstimuli pembentukan fagolisosom. Interferon- γ juga menstimuli pembentukan radikal bebas untuk menghancurkan komponen bakteri *M.tuberculosis* yaitu DNA dan dinding sel bakteri. Terjadinya gangguan atau penurunan aktivitas sel Th1 dan sitokinnya yaitu Interferon- γ cukup bermakna dalam mempengaruhi mekanisme pertahanan tubuh terhadap penyakit tuberkulosis paru (ECDC, 2011). Interferon- γ merupakan penentu utama perlindungan terhadap tuberkulosis (Mosaad *et al.*, 2010; Ansari *et al.*, 2011).

Beberapa varian gen sitokin dihubungkan dengan kemungkinan terjadinya TB. Polimorfisme nukleotida tunggal berlokasi di intron pertama gen Interferon- γ +874T/A mempengaruhi sekresi sitokin akibat infeksi TB (Mosaad et al., 2010).

Di Spanyol dilaporkan terdapat hubungan polimorfisme gen Interferon- γ +874 T/A dengan angka kejadian TB dan lebih sering ditemukan memiliki genotipe A/A dibandingkan genotype T/A atau T/T. Kadar Interferon- γ serum pasien TB Spanyol genotipe A/A dilaporkan lebih rendah dibandingkan genotipe lainnya (Lopez-Maderuello et al., 2003). Namun penelitian di Kroasia dilaporkan polimorfisme gen Interferon- γ +874 T/A tidak berhubungan dengan angka kejadian TB. Kerentanan terhadap TB meningkat dipengaruhi produksi sitokin Interferon- γ pada individu dengan genotip A/A (Etokebe et al., 2006). Penelitian di Pakistan dilaporkan polimorfisme gen Interferon- γ +874 T/A berkaitan dengan angka kejadian dan derajat keparahan TB. Pasien dengan genotip T/T atau alel T derajat keparahan lebih ringan dibanding genotipe A/A atau alel A.

Diperlukan pemeriksaan adanya polimorfisme Interferon- γ +874 T/A untuk mengetahui adanya pengaruh genetik pada kerentanan dan derajat keparahan penyakit TB paru di Indonesia. Kemajuan biologi molekuler dan teknik sekuensing DNA telah membuka harapan adanya terapi personal pada TB. Penelitian di Jepang tentang terapi TB laten berdasarkan polimorfisme genotip NAT2 adalah salah satu contoh penerapan terapi berdasarkan genetika. Di masa depan terapi genetik mungkin dapat dilakukan pada kelompok pasien yang sakit TB dan memiliki polimorfisme ini untuk membantu penyembuhan penyakit TB (Matsumoto et al., 2014).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah polimorfisme gen Interferon- γ +874 T/A berhubungan dengan kerentanan dan derajat keparahan penyakit TB paru?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan adanya hubungan polimorfisme gen IFN- γ +874 T/A dengan kerentanan dan derajat keparahan penyakit tuberkulosis paru.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui frekuensi alel dan genotip dari polimorfisme IFN- γ +874 T/A pada penderita TB paru baik sensitif obat maupun resisten obat.
2. Mengetahui apakah polimorfisme IFN- γ +874 T/A menyebabkan kerentanan terhadap penyakit TB paru baik sensitif obat maupun resisten obat.
3. Mengetahui apakah polimorfisme IFN- γ +874 T/A mempengaruhi derajat keparahan penyakit TB paru.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Memberikan pengetahuan tentang efek polimorfisme genetik di Malang, Indonesia terhadap kerentanan dan derajat keparahan penyakit TB paru.

1.4.2 Manfaat Praktis

Diharapkan dengan pemahaman ini, di masa mendatang akan dikembangkan terapi genetik pada penderita dengan polimorfisme ini sebagai salah satu upaya preventif terhadap penyakit TB paru.



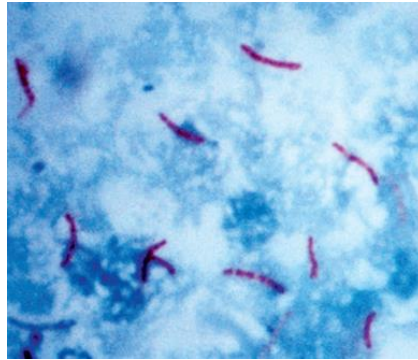
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Infeksi dan penyakit TB disebabkan oleh *Mtb* yang patogen pada manusia dan termasuk pada genus *Mycobacterium* dari keluarga *Mycobacteriaceae*. Lebih dari 100 spesies *mycobacterium* telah diidentifikasi, namun sebagian besar spesies ini tidak patogen. Penyakit *mycobacterium* penyebab penyakit pada mamalia dengan kesamaan genetik yang dikategorikan dalam kompleks *Mycobacterium*, yang terdiri dari tujuh spesies *mycobacteria*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* dan *M. Pinnipedii*. *Mycobacteria* adalah *aerobic*, *non-motil*, *hidrofobik*, berbentuk batang, intraselular bakteri dengan ukuran 2-4 μm (gambar 2.1). Spesies patogen biasanya bereplikasi perlahan dengan waktu penggandaan 12 sampai 24 jam, menghasilkan spesimen klinis kultur yang lama (4-8 minggu) (Lawn *et al.*, 2011).

Dinding sel lipid *Mtb* kompleks terdiri dari *eptidoglikan*, asam *mycolic* unik, *arabinogalaktan* dan *lipoarabinomannan* (LAM). Menariknya, dinding sel *mycobacterium* sekitar dua kali lebih tebal dibandingkan bakteri gram positif dan gram negatif. Sifat yang sangat unik dari dinding tebal sel *mycobacterium* membuatnya tahan terhadap banyak senyawa toksik dan juga asam lambung (Lawn *et al.*, 2011).

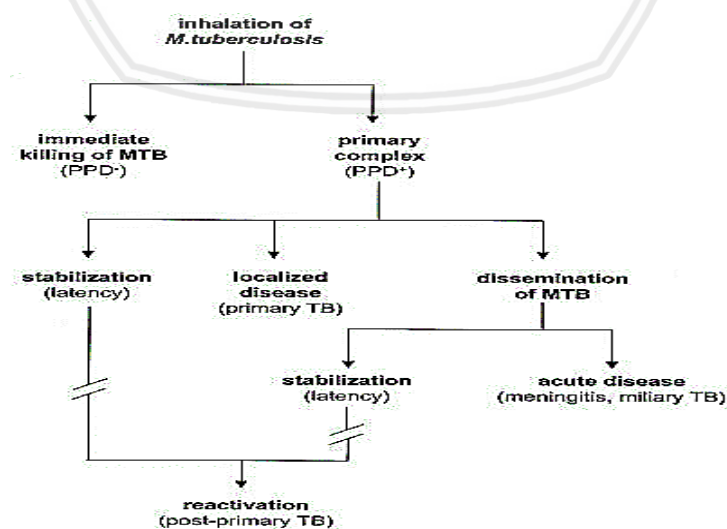


Gambar 2.1. High-Power Micrograph Basil Tahan Asam (BTA) Dalam Dahak Pasien TB. Basil tahan asam *Mtb* (merah) ditunjukkan dengan Pewarnaan Ziehl-Neelsen ($\times 1000$) (Lawn et al, 2011).

2.2 Patogenesis TB

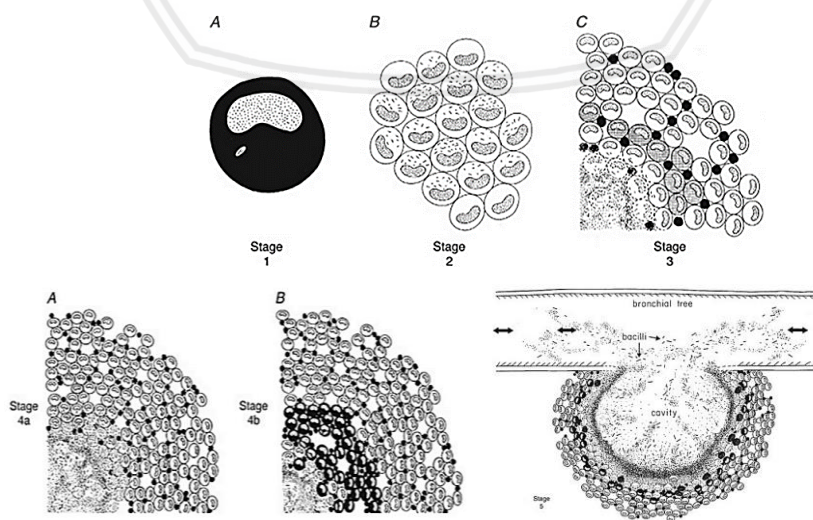
2.2.1 Konsep Patogenesis TB

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) harus melewati beberapa pertahanan tubuh sebelum menimbulkan infeksi dalam tubuh. Refleks batuk, mukosa dan sel epitel bersilia saluran nafas atas akan berusaha mengeluarkan *Mtb* yang terinhalasi melalui pergerakan retrograde (North and Jung., 2004). Gambar 2.2 menunjukkan beberapa skenario mungkin terjadi jika droplet yang mengandung *Mtb* berhasil mencapai alveoli sehingga memicu interaksi dengan sistem imunitas bawaan dan adaptif tubuh (Reinout et al., 2002).



Gambar 2.2. Perjalanan Infeksi *Mtb* (Reinout et al., 2002)

Terdapat 5 tahap patogenesis infeksi Mtb berdasarkan model infeksi Mtb pada kelinci seperti digambarkan pada gambar 2.3. Tahap pertama (fase inisiasi) adalah ketika makrofag alveolar menghancurkan Mtb. Hanya makrofag alveolar yang aktif berhasil menghancurkan Mtb, sementara beberapa Mtb berhasil bertahan didalam makrofag alveolar yang belum aktif. Tahap kedua (fase simbiosis) dimulai ketika Mtb yang berhasil bertahan didalam makrofag mulai pertumbuhan secara logaritma didalam makrofag. Beberapa Mtb berhasil keluar dari makrofag namun segera dihancurkan oleh makrofag lainnya. Tahap ketiga (fase nekrosis kaseosa) terjadi ketika sel neutrophil dan limfosit T spesifik mulai melakukan infiltrasi. Sel T akan mengaktifkan makrofag dan menghancurkan Mtb sehingga pertumbuhan Mtb terhenti didalam granuloma dengan inti nekrosis kaseosa. Tahap keempat (imunitas seluler) dimulai ketika imunitas seluler yang diperantarai oleh limfosit T mengaktifkan makrofag dan menjaga integritas granuloma. Tahap kelima (nekrosis likuefaksi dan kavitas) dimulai jika daya tahan tubuh menurun, terjadi nekrosis likuefaksi di pusat granuloma yang mendukung pertumbuhan Mtb. Granuloma akan pecah, Mtb bisa mencapai jalan nafas dan beresiko penularan (Reinout *et al.*, 2002; Schlossberg, 2011).



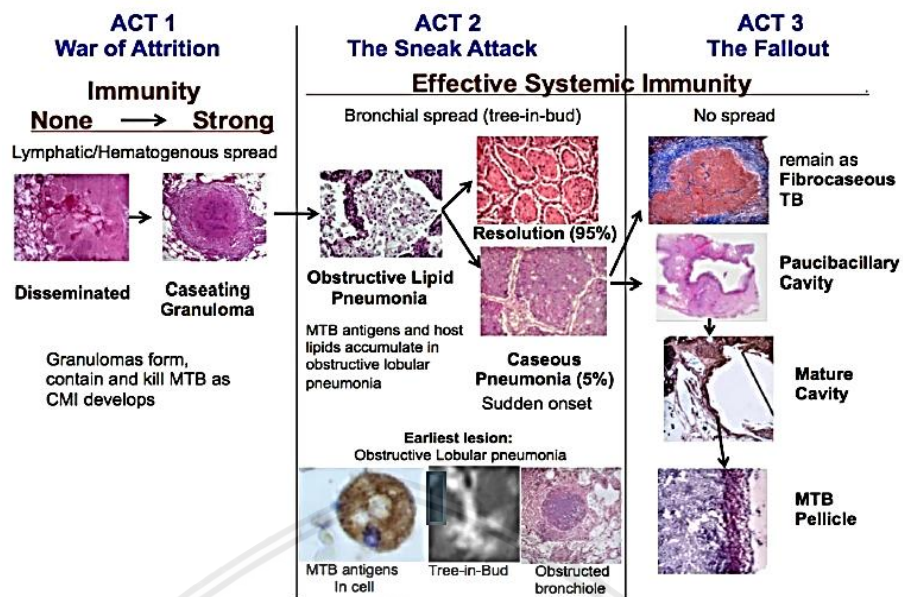
Gambar 2.3 Tahapan Patogenesis Tuberkulosis (Schlossberg, 2011)

2.2.2 TB Post-Primer

TB paru post-primer biasa disebut sebagai TB reaktif, TB sekunder, ataupun TB dewasa. Reaktivasi infeksi ini timbul dikarenakan adanya supresi dari sistem imun dengan alasan apapun dan dapat menyebabkan transmisi penyakit ke host baru (Bezuidenhout and Schneider, 2009). Reaktivasi ini terjadi setelah beberapa bulan/ tahun setelah infeksi primer dan memiliki fokus infeksi di apeks dari lobus paru atas, dikarenakan tingginya tekanan oksigen yang baik bagi pertumbuhan Mtb. Keterlibatan parenkim paru dapat bervariasi mulai dari lesi berukuran kecil hingga kavitas yang besar (Grippi *et al.*, 2015; Raviglione., 2015).

Konsep granuloma telah diterima selama beberapa lama sebagai konsep patogenesis tuberkulosis. Konsep ini berdasarkan temuan patologi pada model hewan yang diinfeksi Mtb dan menjelaskan infeksi primer Mtb. Selama ini, tidak ada model yang menjelaskan perjalanan alamiah infeksi Mtb pada jaringan manusia. Konsep granuloma ini tidak bisa menjawab beberapa pertanyaan mengenai infeksi post primer pada manusia seperti proteksi vaksin tuberkulosis, kerentanan tuberkulosis pada orang dewasa sehat, sifat lesi infeksi post primer dan lainnya (Lalvani *et al.*, 2013; Hunter, 2016).

Patologi utama infeksi post primer adalah pneumonia lobaris obstruktif dan patogenesisnya terdiri dari tiga tahap dan bukannya suatu proses berkelanjutan dari suatu proses tunggal. Pernyataan ini berdasarkan dari temuan gambaran patologi dan CT scan jaringan paru manusia. Patogenesis ini terdiri dari tahap 1 (*War of Attrition*), tahap 2 (*The Sneak Attack*) dan tahap 3 (*The Fallout*). Patogenesis seperti pada gambar 2.4 ini dianggap mampu menjelaskan patologi infeksi post primer dan menjawab beberapa pertanyaan mendasar tentang tuberkulosis (Hunter, 2016).



Gambar 2.4 Patogenesis Tuberkulosis Post Primer (Hunter, 2016)

Tahap pertama menjelaskan multiplikasi Mtb dalam makrofag alveolar. Infeksi ini akan dihambat oleh makrofag dan imunitas seluler. Pada host imunokompromised, terjadi penyebaran melalui jalur limfogen atau hematogen. Pada host imunokompeten, infeksi ini akan berhenti dengan terbentuknya granuloma namun masih menyisakan jumlah kecil Mtb sehingga terjadi tuberkulosis laten. Pada tahap kedua, infeksi Mtb terjadi secara asimtomatik mulai di apeks paru. Alveolar makrofag berubah menjadi "*foam cell*" dan bersama sel adiposit akan menyumbat bronkiolus sehingga menimbulkan pneumonia lobaris obstruktif. Kondisi ini sangat ideal bagi Mtb untuk melakukan replikasi sampai terjadi nekrosis kaseosa jaringan pneumonia tersebut. Pada tahap tiga, jaringan kaseosa tersebut dibatukkan ke jalan nafas dan meninggalkan kavitas. Dinding kavitas mengandung banyak neutrophil dan enzim *matrix metalloproteinase* (MMP) yang semakin melemahkan kavitas (Hunter, 2016).

2.3 Respon Imun Terhadap *Mtb*

Respon imun tubuh terhadap *Mtb* tergantung pada interaksi antara sistem imun bawaan dan adaptif. Imunitas bawaan dan adaptif adalah dua elemen yang esensial pada mekanisme pertahanan imun. *Mtb* yang masuk akan difagositosis oleh makrofag alveolar dan akan mengaktifasi sistem imun bawaan serta adaptif untuk memperkuat kemampuan makrofag dalam membunuh kuman TB tersebut (Eley and Beatty, 2009).

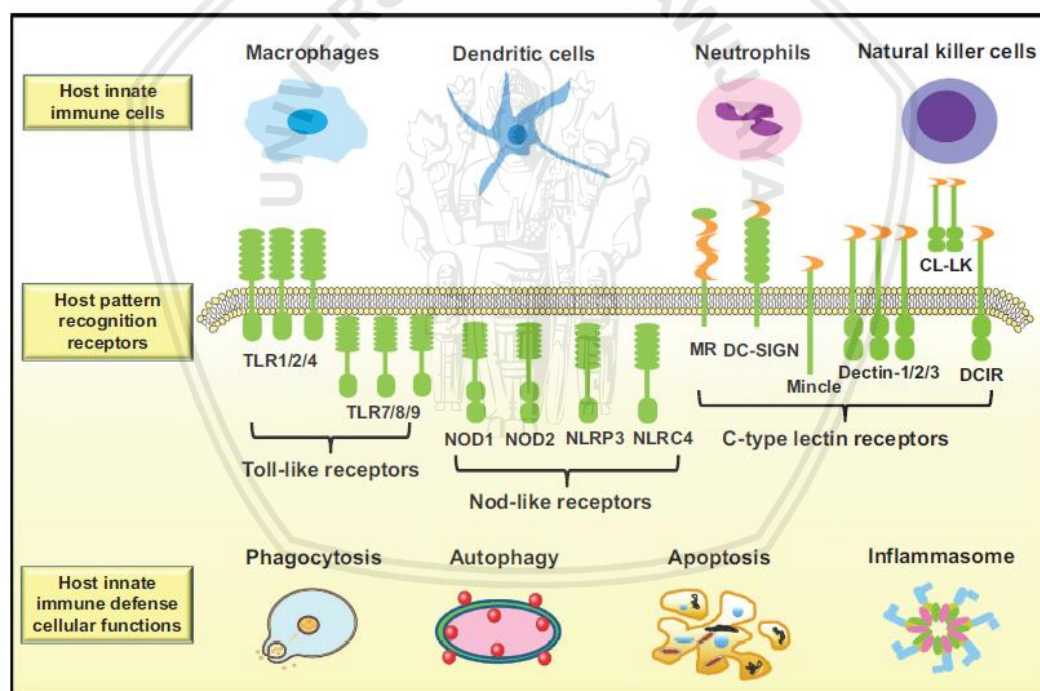
Fagositosis dari *Mtb* oleh makrofag alveolar merupakan peristiwa pertama dalam hubungan host-patogen dalam melawan infeksi. Dalam waktu 2 sampai 6 minggu infeksi, *cell-mediated immunity* (CMI) berkembang, dan kemudian terdapat masuknya limfosit dan mengaktifasi makrofag ke dalam lesi yang akan menghasilkan pembentukan granuloma (Raja. 2004).

2.3.1 Respon Imun Bawaan

Imunitas bawaan adalah lini pertama pertahanan terhadap masuknya patogen yang akan melindungi semua jaringan dan organ tubuh terhadap paparan patogen luar. Imunitas bawaan ini bersifat segera sebagai pertahanan non spesifik terhadap patogen dan tidak menimbulkan memori imunologis (Azuma. 2006; Shingadia and Burgner. 2008).

Selain berfungsi dalam pengenalan antigen sebagai benda asing dan mempunyai kemampuan dalam melemahkan patogen, imunitas bawaan juga berperan sebagai jembatan penghubung dengan imunitas adaptif dalam mengaktifkan sel-sel imun dari sistem imun adaptif seperti limfosit T. Epitel dari saluran pernafasan berfungsi sebagai *barier* namun juga akan secara aktif berkontribusi dalam sistem imun bawaan ini (Azuma. 2006; Hanekom. 2007; Shingadia and Burgner. 2008).

Pengenalan kuman Mtb oleh sel fagosit memicu produksi dan aktivasi sitokin dan kemokin. Terdapat bermacam-macam tipe sel imun bawaan utama yang terlibat dalam infeksi tuberkulosis, antara lain makrofag, sel dendritik, netrofil dan sel *Natural Killer* (NK cell). Selain sel-sel efektor ini terdapat juga sistem pertahanan tubuh bawaan berupa *barrier* mukosa saluran nafas beserta dengan sel-sel yang ada didalamnya. Sel-sel imun ini mengenali kuman Mtb melalui berbagai reseptor pengenalan (PPRs, *pattern recognition receptors*) seperti *Toll-like receptors* (TLRs), *Nod-like receptors* (NLRs), dan *C-type lectin receptors* (CLRs). (Liu et al, 2017).



Gambar 2.5 Sistem Imun Bawaan pada Tuberkulosis (Liu et al, 2017)

Kuman Mtb masuk ke saluran nafas dan mencapai alveolar. Di alveolar kuman akan menginfeksi sel-sel imun bawaan seperti makrofag, sel dendrit, netrofil dan sel *Natural Killer*. Sel-sel imun ini mengenali kuman Mtb melalui berbagai reseptor pengenalan Toll like receptors (TLR1, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8 dan TLR9), Nod like receptors (NOD1, NOD2, NLRP3 dan NLRC4) dan C-type

lectin receptors (MR, DC-SIGN, Mincle, Dectin-1 and Dectin-2, Dectin-3, CL-LK dan DCIR). Berbagai sinyal dari berbagai sel melalui reseptor-reseptor tersebut akan membuat berbagai fungsi seluler fagositosis, autofagi, apoptosis dan aktivasi inflammasom yang bertujuan untuk mengendalikan dan mematikan kuman *Mtb*. Berbagai tipe sel, reseptor pengenalan dan aktivasi seluler yang terlibat dalam sistem imun bawaan pada tuberkulosis digambarkan pada gambar 2.5 (Liu *et al*, 2017).

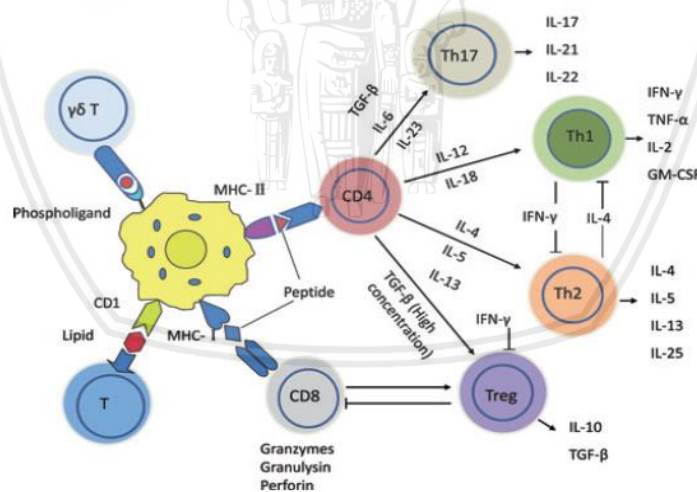
2.3.2 Respon Imun Adaptif

Respon imun adaptif merupakan proses lanjutan dari proses imunitas bawaan sampai akhirnya terjadi ekspresi yang spesifik dari host terhadap infeksi. Kebalikan dari imunitas bawaan, imunitas adaptif bersifat spesifik terhadap suatu patogen, dan membutuhkan waktu hingga timbulnya memori imunologis. (Orme I. 2004 ; Hanekom, *et al*. 2007).

Seperti terlihat pada gambar 2.6, sistem imun adaptif terutama sistem imun adaptif seluler terbentuk setelah *Mtb* telah diproses dan dipresentasikan oleh sel dendritik sebagai *antigen presenting cell*, biasanya melalui Molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) atau molekul CD1, serta melalui keterlibatan beberapa sitokin, pada sel limfosit T. Pembentukan granuloma sebagai hasil dari interaksi antara imunitas bawaan dan adaptif, merupakan respon imunopatologis yang utama akibat infeksi *Mtb*, mempunyai peran dalam pengendalian infeksi serta terjadinya infeksi laten. Sedangkan sistem imun adaptif humoral walaupun peranannya terhadap infeksi *Mtb* masih belum jelas, namun ada beberapa bukti yang menunjukkan bahwa terdapat aktivasi dari *antibody-mediate immune reaction* pada perjalanan penyakit ini (Eley and Beatty, 2009; Dheda *et al.*, 2010).

Dalam respon imun adaptif, sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ sangat penting untuk mengendalikan infeksi *mycobacterial*. Fungsi utama sel T CD4⁺ adalah

untuk memberikan bantuan kepada limfosit lain, terutama dengan menghasilkan sitokin. Bila sel T CD4⁺ diaktifkan oleh trigger TCR karena kehadiran IL-2 dan IL-12, sel tersebut akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi efektor sel T CD4⁺ Th1. Kehadiran sitokin tertentu seperti IFN- γ dapat menstimulasi pembentukan, sementara sitokin Th2 seperti IL-4 dapat menghambat pembentukan. Selama awal infeksi *mycobacterial*, DC menghasilkan IL-12, dan dapat menghasilkan IL-2 dan IFN- γ . Produksi IL-2 oleh DC akan ditingkatkan neutrofil yang terinfeksi *Mtb* (Jinfang, 2009). Sel T CD8⁺ juga dapat menghasilkan sitokin seperti IFN- γ dan IL-4 yang berperan dalam sistem keseimbangan Th1 dan Th2 pada pasien dengan infeksi TB. Sel T CD8⁺ jelas memiliki peran dalam stimulasi sistem imun untuk proteksi infeksi dan mengontrol penularan tapi sejauh mana mereka mengendalikan pertumbuhan bakteri masih belum diketahui (Skold *et al.*, 2003; Dheda *et al.*, 2010).



Gambar 2.6. Respon imun adaptif terhadap infeksi TB

(Dheda *et al.*, 2010)

Leukosit lainnya seperti sel NK, makrofag dan $\gamma\delta$ dapat juga menghasilkan IFN- γ selama awal infeksi *mycobacterial*. Oleh karena itu, beberapa jenis sel dapat berkontribusi selama infeksi *mycobacterial* dan

memastikan pengembangan Th1 yang dianggap sebagai pelindung terhadap TB (Kaufmann, 2002; Boom *et al.*, 2003 ; Raja, 2004).

Sitokin lain yang penting untuk perlindungan terhadap infeksi mycobacterial adalah TNF- α . TNF- α diproduksi oleh beberapa jenis sel yang berbeda selama infeksi, termasuk makrofag, DC, sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺. Pemberian antibodi penetral TNF- α setelah timbul infeksi kronis mengakibatkan ketidakstabilan granuloma dan re-aktivasi infeksi. Pasien yang terinfeksi TB laten, akan berkembang menjadi TB aktif setelah pemberian anti-TNF- α . Oleh karena itu, TNF- α dianggap penting untuk pembentukan dan retensi dari struktur granuloma dan menjadi pertahanan terhadap infeksi mycobacterial (van der Wel *et al.*, 2007).

Selain sitokin Th1 klasik, IFN- γ dan TNF- α , sitokin lain dapat memiliki peran *immunomodulatory* selama infeksi. IL-17 akhir-akhir ini dikatakan merupakan sitokin yang berperan dalam infeksi *mycobacterial* walaupun belum dapat dijelaskan dengan baik. IL-17 adalah sitokin pro-inflamasi yang mendorong rekrutmen neutrofil dengan merangsang produksi kemokin dan produksi sitokin, seperti IL-6, IL-8 dan TNF- α oleh makrofag (van der Wel *et al.*, 2007).

Sel T regulator merupakan sel yang penting untuk mencegah autoimunitas, dengan menahan respon imun yang reaktif terhadap antigen sel inang. Peranan sel T reg dalam memfasilitasi keberadaan *Mtb* masih belum jelas. Peranan sel T reg pada TB, terutama pada 4 minggu pertama, waktu yang kritis untuk melokalisasi *Mtb* oleh sistem imun. Penurunan jumlah sel T reg selama awal infeksi bertujuan mempertahankan klirens bakteri (Vernal *et al.*, 2008; Shafiani *et al.*, 2009).

Selain sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ terdapat limfosit yang lain yang berperan dalam pertahanan terhadap *Mtb* yaitu sel T CD1-restricted dan NK yang diaktifkan melalui presentasi glikolipid pada CD1. Populasi limfosit yang

lain, yang dikenal sebagai sel T $\gamma\delta$. Peran sel T $\gamma\delta$ dalam respon imun terhadap TB belum terungkap secara lengkap. Pada umum, sel T $\gamma\delta$ merupakan non-MHC *restricted* dan berfungsi terutama sebagai sel T sitotoksik (Raja, 2004).

2.4 Faktor Risiko Terjadinya Penyakit TB

2.4.1 Faktor Paparan Kuman TB

Telah diketahui bahwa penyebaran infeksi dari penderita dengan hapusan BTA positif lebih tinggi daripada dari penderita dengan hapusan BTA negatif. Serta kontak erat dengan penderita TB mempermudah terjadinya sakit TB.

2.4.2 Faktor Individu Itu Sendiri (Host)

Koinfeksi dengan HIV, penderita dengan terapi immunosupresif anti TNF α , malnutrisi, usia kanak-kanak, gagal ginjal serta diabetes terbukti meningkatkan resiko sakit TB. Imunitas seluler yang sangat terganggu pada HIV, gangguan fungsi imun bawaan dan adaptif dari Diabetes Mellitus (DM) terbukti menyebabkan peningkatan resiko sakit TB pada penderita ini. (Padmanesan, 2013).

Penurunan jumlah sel CD4+ pada pasien HIV, membuat progresifitas TB semakin cepat. Proses absorpsi obat OAT khususnya rifampisin dan etambutol juga dilaporkan berkurang pada pasien HIV (Mesfin *et al.*, 2014). Kontrol gula darah yang buruk berhubungan dengan tingginya populasi *Mtb* pada pasien diabetes. Kondisi hiperglikemi dihubungkan dengan penurunan fungsi makrofag dan kemotaksis sel radang, penurunan produksi ROS sehingga eradikasi *Mtb* terganggu (Fisher-Hock *et al.*, 2008). Gagal ginjal kronik stadium lanjut berhubungan dengan tingkat oksidatif yang tinggi, defisiensi vitamin D dan malnutrisi. Kondisi tersebut akan menurunkan fungsi sel limfosit T dan limfosit B.

Pasien transplantasi ginjal akan menerima obat penekan sistem imun sehingga berpotensi terjadi reaktivasi tuberkulosis (Romanowski *et al.*, 2016).

Penelitian pada orang kembar monozigot dan dizigot mengindikasikan faktor genetik seseorang berpengaruh terhadap kerentanan terhadap infeksi (Hill, 2001). Kerentanan seseorang menderita TB ditentukan oleh kode genetik yang tersandi didalam gen pada untaian molekul *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). Distribusi genotip ini sangat unik untuk setiap populasi dan ras. Polimorfisme suatu gen mungkin akan mengubah struktur protein yang dihasilkan sehingga akan berpengaruh pada fenotip individu tersebut termasuk kerentanan terhadap penyakit. Pengaruh faktor genetik juga dapat dilihat dari perbedaan angka kejadian TB jika didasarkan ras, etnis, dan famili (Azad *et al.*, 2012). Hubungan antara latar belakang genetik host dan kerentanan infeksi *Mtb* telah banyak terbukti (Valinoto *et al.*, 2010).

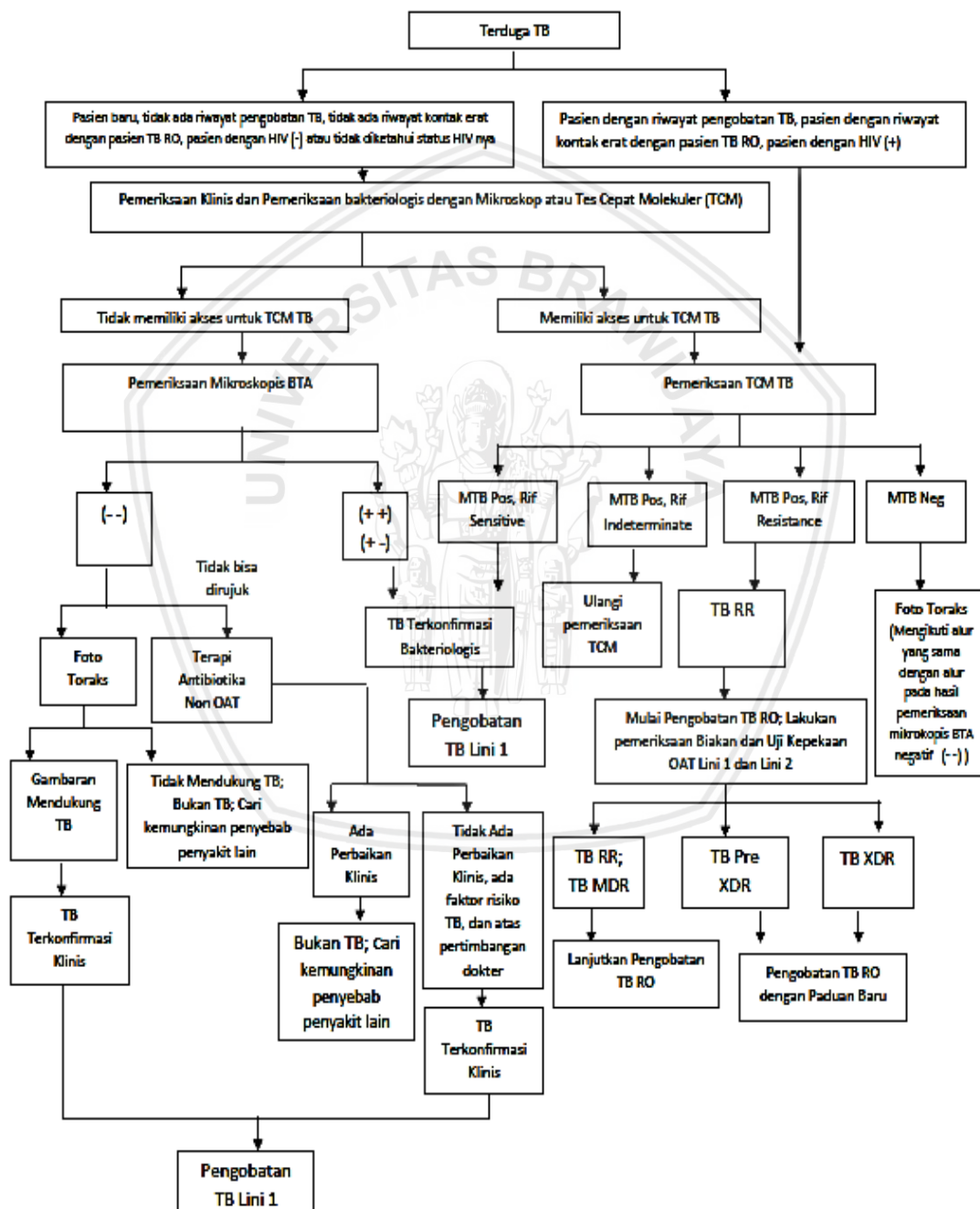
2.4.3 Faktor Eksternal

Perilaku hidup dan keadaan sosioekonomi juga berpengaruh pada terjadinya penyakit TB. Perokok, peminum alkohol, serta polusi udara telah terbukti meningkatkan resiko terjadinya sakit TB dengan cara mengganggu fungsi makrofag alveolar serta sistem transport mukosilier. (Slama, 2007)

Perbedaan demografis juga dapat mempengaruhi terjadinya penyakit TB. Studi dari Kanada dan Australia menunjukkan bahwa penduduk aborigin memiliki resiko lebih tinggi terjadinya TB. Beberapa studi menunjukkan adanya pengaruh polimorfisme genetik yang mungkin mendasari terjadinya fenomena ini. Dilaporkan bahwa penduduk Tunisia memiliki polimorfisme reseptor IL10 yang meningkatkan kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis. Beberapa polimorfisme lain seperti NRAMP, interferon, reseptor vitamin D, reseptor P2X7, dll dilaporkan meningkatkan kerentanan terhadap sakit TB. (BenSelma, 2012)

Sistem pelaporan kasus tuberkulosis yang baik secara otomatis akan meningkatkan jumlah angka kesakitan TB. (Padmanesan, 2013)

2.5 Diagnosis TB Paru Pada Orang Dewasa



Gambar 2.7 Alur Diagnosis Tuberkulosis Paru pada Orang Dewasa
(Permenkes 67, 2016)

Gambar 2.7 menunjukkan alur diagnosis TB dibagi sesuai dengan fasilitas yang tersedia: (Permenkes 67, 2016)

- a. Faskes yang mempunyai akses pemeriksaan dengan alat tes cepat molekuler
 - 1) Faskes yang mempunyai akses pemeriksaan TCM, penegakan diagnosis TB pada terduga TB dilakukan dengan pemeriksaan TCM. Pada kondisi dimana pemeriksaan TCM tidak memungkinkan (misalnya alat TCM melampaui kapasitas pemeriksaan, alat TCM mengalami kerusakan, dll), penegakan diagnosis TB dilakukan dengan pemeriksaan mikroskopis.
 - 2) Jika terduga TB adalah kelompok terduga TB RO dan terduga TB dengan HIV positif, harus tetap diupayakan untuk dilakukan penegakan diagnosis TB dengan TCM TB, dengan cara melakukan rujukan ke layanan tes cepat molekuler terdekat, baik dengan cara rujukan pasien atau rujukan contoh uji.
 - 3) Jumlah contoh uji dahak yang diperlukan untuk pemeriksaan TCM sebanyak 2 (dua) dengan kualitas yang bagus. Satu contoh uji untuk diperiksa TCM, satu contoh uji untuk disimpan sementara dan akan diperiksa jika diperlukan (misalnya pada hasil indeterminate, pada hasil Rif Resistan pada terduga TB yang bukan kriteria terduga TB RO, pada hasil Rif Resistan untuk selanjutnya dahak dikirim ke Laboratorium LPA untuk pemeriksaan uji kepekaan Lini-2 dengan metode cepat)
 - 4) Contoh uji non-dahak yang dapat diperiksa dengan MTB/RIF terdiri atas cairan serebrospinal (*Cerebro Spinal Fluid/CSF*), jaringan biopsi, bilasan lambung (*gastric lavage*), dan aspirasi cairan lambung (*gastric aspirate*).
 - 5) Pasien dengan hasil Mtb Resistan Rifampisin tetapi bukan berasal dari kriteria terduga TB RO harus dilakukan pemeriksaan TCM ulang. Jika terdapat perbedaan hasil, maka hasil pemeriksaan TCM yang terakhir yang menjadi acuan tindakan selanjutnya.

- 6) Jika hasil TCM indeterminate, lakukan pemeriksaan TCM ulang. Jika hasil tetap sama, berikan pengobatan TB Lini 1, lakukan biakan dan uji kepekaan.
 - 7) Pengobatan standar TB MDR segera diberikan kepada semua pasien TB RR, tanpa menunggu hasil pemeriksaan uji kepekaan OAT lini 1 dan lini 2 keluar. Jika hasil resistensi menunjukkan MDR, lanjutkan pengobatan TB MDR. Bila ada tambahan resistensi terhadap OAT lainnya, pengobatan harus disesuaikan dengan hasil uji kepekaan OAT.
 - 8) Pemeriksaan uji kepekaan menggunakan metode LPA (*Line Probe Assay*) Lini-2 atau dengan metode konvensional
 - 9) Pengobatan TB pre XDR/ TB XDR menggunakan paduan standar TB pre XDR atau TB XDR atau menggunakan paduan obat baru.
 - 10) Pasien dengan hasil TCM M.tb negatif, lakukan pemeriksaan foto toraks. Jika gambaran foto toraks mendukung TB dan atas pertimbangan dokter, pasien dapat didiagnosis sebagai pasien TB terkonfirmasi klinis. Jika gambaran foto toraks tidak mendukung TB kemungkinan bukan TB, dicari kemungkinan penyebab lain.
- b. Faskes yang hanya mempunyai pemeriksaan mikroskopis dan tidak memiliki akses ke tes cepat molekuler.
- 1) Faskes yang tidak mempunyai alat TCM dan kesulitan mengakses TCM, penegakan diagnosis TB tetap menggunakan mikroskop.
 - 2) Jumlah contoh uji dahak untuk pemeriksaan mikroskop sebanyak 2 (dua) dengan kualitas yang bagus. Contoh uji dapat berasal dari dahak Sewaktu-Sewaktu atau Sewaktu-Pagi.
 - 3) BTA (+) adalah jika salah satu atau kedua contoh uji dahak menunjukkan hasil pemeriksaan BTA positif. Pasien yang menunjukkan hasil BTA (+)

pada pemeriksaan dahak pertama, pasien dapat segera ditegakkan sebagai pasien dengan BTA (+)

- 4) BTA (-) adalah jika kedua contoh uji dahak menunjukkan hasil BTA negatif. Apabila pemeriksaan secara mikroskopis hasilnya negatif, maka penegakan diagnosis TB dapat dilakukan secara klinis menggunakan hasil pemeriksaan klinis dan penunjang (setidak-tidaknya pemeriksaan foto toraks) yang sesuai dan ditetapkan oleh dokter.
- 5) Apabila pemeriksaan secara mikroskopis hasilnya negatif dan tidak memiliki akses rujukan (radiologi/TCM/biakan) maka dilakukan pemberian terapi antibiotika spektrum luas (Non OAT dan Non kuinolon) terlebih dahulu selama 1-2 minggu. Jika tidak ada perbaikan klinis setelah pemberian antibiotik, pasien perlu dikaji faktor risiko TB. Pasien dengan faktor risiko TB tinggi maka pasien dapat didiagnosis sebagai TB Klinis. Faktor risiko TB yang dimaksud antara lain:
 - a) Terbukti ada kontak dengan pasien TB
 - b) Ada penyakit komorbid: HIV, DM

Prinsip penegakan diagnosis TB paru:

- Diagnosis TB Paru pada orang dewasa harus ditegakkan terlebih dahulu dengan pemeriksaan bakteriologis. Pemeriksaan bakteriologis yang dimaksud adalah pemeriksaan mikroskopis, tes cepat molekuler TB dan biakan.
- Pemeriksaan TCM digunakan untuk penegakan diagnosis TB, sedangkan pemantauan kemajuan pengobatan tetap dilakukan dengan pemeriksaan mikroskopis.
- Tidak dibenarkan mendiagnosis TB hanya berdasarkan pemeriksaan foto toraks saja. Foto toraks tidak selalu memberikan gambaran yang spesifik pada

TB paru, sehingga dapat menyebabkan terjadi overdiagnosis ataupun underdiagnosis.

- Tidak dibenarkan mendiagnosis TB dengan pemeriksaan serologis (Permenkes 67, 2016).

Foto toraks dapat digunakan untuk menilai derajat keparahan dari TB paru. Untuk keperluan klinis dan penelitian, dapat digunakan penderajatan berdasarkan *National TB and Respiratory Disease Association of the USA classification*: (Falk *et al.*, 1969; Dongola, 1997; Ansari *et al.*, 2011)

a. *Minimal lesion*

Luas lesi yang terlihat tidak melebihi daerah yang dibatasi oleh garis median, apeks dan iga 2 di depan, lesi soliter dapat berada di mana saja dan tidak ditemukan kavitas.

b. *Moderate advanced lesion*

Luas sarang-sarang yang berupa bercak tidak melebihi luas satu paru, bila ada kavitas ukurannya tidak melebihi 4 cm, bila ada konsolidas luasnya tidak melebihi satu lobus.

c. *Far advanced lesion*

Lesi lebih dari *moderate advanced lesion*.

2.5 Interferon Gamma

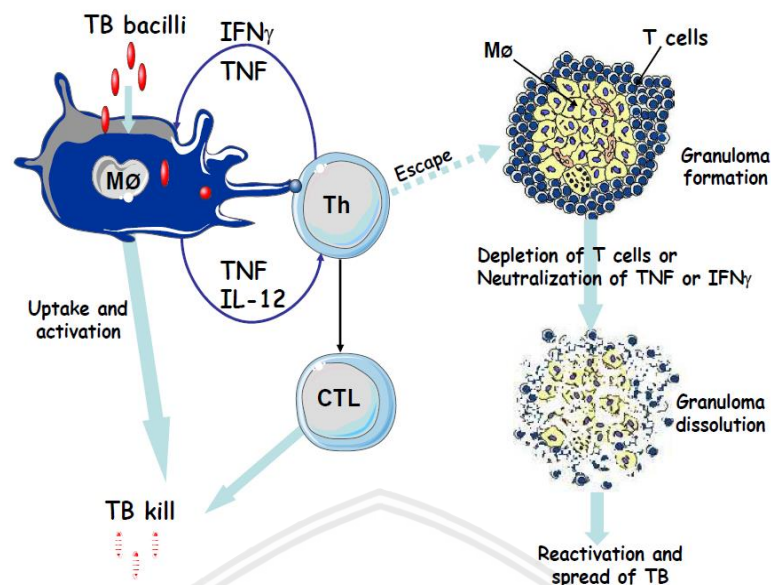
Interferon merupakan bahan yang pertama kali ditemukan dari supernatan kultur sel yang terinfeksi oleh virus, dan mampu mempengaruhi replikasi virus. Interferon dibagi menjadi 2 tipe. Tipe I yang dirangsang dan berperan pada infeksi virus, terdiri dari IFN- α yang diproduksi oleh leukosit dan IFN- β yang diproduksi oleh fibroblast. Interferon tipe II atau yang lebih dikenal dengan IFN- γ dihasilkan oleh sel T dan sel NK setelah menjadi aktif dengan

stimulus inflamasi (Abbas et al,2016). IFN- γ merupakan sitokin utama yang berperan sebagai pelindung dari infeksi TB (Cavalcanti *et al.*, 2012).

Tabel 2.1 : Struktur dari Interferon gamma (Abbas et al.,2016)

Sitokin dan subunit	Sumber sel utama	Reseptor sitokin dan subunit	Sel Target dan efek biologis
Interferon- γ (IFN- γ)	Sel T (Th1, sel T CD8+), sel NK dan ILCs grup 1	CD119 (IFNGR1) IFNGR2	Makrofag: aktivasi klasik (meningkatkan fungsi mikrobisidal) Sel B: beralihnya isotope menjadi sub klas IgG opsonisasi dan fiksasi komplemen(pada mencit) Sel T: diferensiasi Th1 berbagai sel meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan kelas II meningkatkan proses dan presentasi antigen kepada sel T

Fungsi utama IFN- γ adalah mengaktifkan makrofag sehingga meningkatkan kemampuannya sebagai antimikroba. Fungsi IFN- γ pada makrofag antara lain: (1). Meningkatkan kemampuan makrofag untuk menghancurkan bakteri intraseluler, (2). Menghasilkan nitrit oxide, oksidatif radikal dan hidrogen peroksida yang akan disekresikan ke lingkungan mikronya sehingga dapat menghancurkan Mtb atau sel-sel disekitarnya, (3). Meningkatkan ekspresi reseptor permukaan bagi antibodi di regio konstan, (4). Menginduksi ekspresi reseptor permukaan bagi TNF, (5). Menginduksi produksi sitokin-sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, dan IL-12, (6). Merangsang makrofag untuk menghasilkan kemokin IL-8 yang akan menarik leukosit dan limfosit ke paru melalui kemokin CXCL10 sehingga menyebabkan inflamasi pada dinding alveoli serta pembentukan granuloma (Cavalcanti *et al.*, 2012; Dembic, 2015).



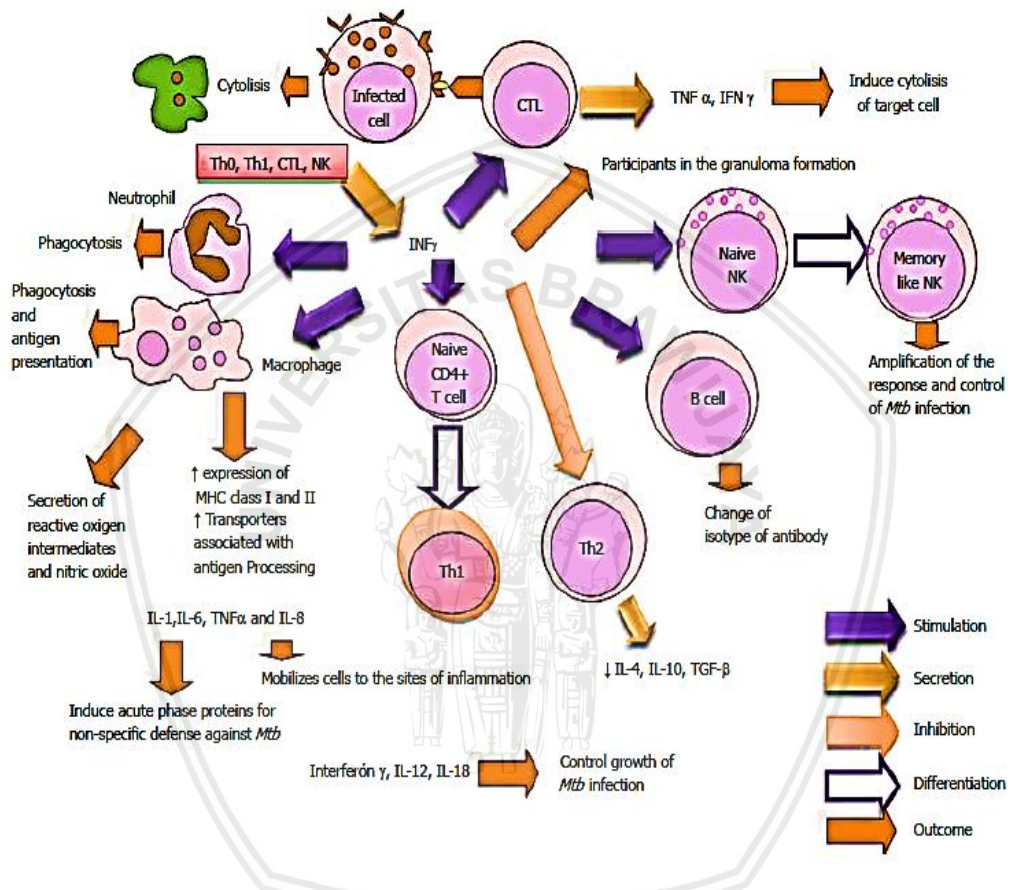
Gambar 2.8. Proses pengaktifan makrofag dan sel T, penghancuran *Mtb* dan pembentukan granuloma

(Quesniaux et al., 2012)

Fungsi lain IFN- γ yaitu meningkatkan kemampuan presentasi antigen oleh MHC I dan II dan membantu perubahan sel T CD4 menjadi subpopulasi Th1. Interferon- γ merangsang transkripsi lebih dari 200 gen di makrofag, termasuk produksi molekul antimikroba seperti radikal oksigen dan NO, yang sangat berperan dalam penghancuran *Mtb*. Beberapa antigen *Mtb* seperti 19 kDa lipoprotein dapat menghambat respons makrofag dengan cara menghambat transkripsi gen yang responsif terhadap IFN- γ (Cavalcanti *et al.*, 2012; Dembic, 2015).

Salah satu sitokin yang diproduksi sel Th1 adalah IFN- γ yang berperan penting dalam mengeliminasi bakteri *Mtb* bertugas untuk memperkuat potensi fagosit dari makrofag yang terinfeksi bakteri *Mtb* yaitu dengan cara menstimulasi pembentukan fagolisosom. Interferon gamma juga menstimulasi pembentukan radikal bebas untuk menghancurkan komponen bakteri *Mtb* yaitu DNA dan dinding sel bakteri. Terjadinya gangguan atau penurunan aktivitas sel Th1 dan sitokinnya yaitu IFN- γ cukup bermakna dalam mempengaruhi mekanisme

pertahanan tubuh terhadap penyakit TB paru. Penurunan produksi IFN- γ menjadi bukti bahwa IFN- γ mempunyai peran proteksi terhadap infeksi TB. Pada TB yang berat akan menunjukkan kadar IFN- γ yang lebih rendah daripada TB yang ringan (Cavalcanti *et al.*, 2012).



Gambar 2.9 : Peranan Interferon gamma pada *Mtb*

(Raminero et al, 2015)

Pathan dkk mendapatkan kadar IFN- γ yang lebih rendah pada penderita TB aktif dengan kultur positif dibandingkan pada orang kontak sehat, penderita TB minimal atau bakteriologis negatif. (Pathan *et al.*, 2001). Hasil penelitian lain oleh Koksall dkk yang membandingkan kadar IFN- γ pada penderita TB aktif, TB inaktif dan orang sehat tidak menunjukkan perbedaan bermakna sehingga disimpulkan bahwa pemeriksaan ini tidak dapat digunakan untuk membedakan

apakah TB aktif atau inaktif. (Koksal *et al.*,2006). Penyebab turunnya kadar IFN- γ tidak diteliti melalui penelitian ini, namun dapat diasumsikan beberapa faktor yang dapat menyebabkan penurunan kadar IFN- γ diantaranya :

1. Faktor penjamu terutama faktor genetik : Pengaruh faktor genetik ini menurut Maderuelo *et.al* dan Etokebe *et.al* berupa kelainan polimorfisme gen IFN- γ +874 T/A, yaitu gen yang berperan dalam produksi IFN- γ yang menyebabkan penurunan kadar IFN- γ . Penurunan IFN- γ akan mendepresi fungsi makrofag sehingga *Mtb* akan terus bermultiplikasi dan proses infeksi terus berlangsung. (Maderuelo *et al.*, 2003)
2. Status gizi penjamu yaitu bila nutrisi seseorang buruk maka aktivitas sistem imun orang tersebut akan berkurang Menurut Chandra, status nutrisi seseorang mempengaruhi kerentanan (*susceptibility*) terhadap penyakit infeksi, salah satunya TB. Defisiensi nutrisi mengakibatkan penurunan respon imun, fungsi fagosit, produksi sitokin dan sistem komplemen.(Chandra *et al.*,1996)
3. Usia penjamu: Vasto *et.al* melakukan penelitian mengenai hubungan usia dengan imunitas dan mengemukakan bahwa pada usia lanjut terjadi penurunan sistem imun, disebut juga *immunosenescence*. Jumlah sel T relatif tetap pada usia lanjut namun fungsinya menurun seiring bertambahnya usia. sel T disebabkan adanya perubahan pada lipid membran sel yang menyebabkan lambatnya proses penghantaran sinyal pada sel T CD4+.(Vasto *et al.*,2006)

2.7 Polimorfisme

Gen adalah materi genetik yang diwariskan dari orangtua ke anaknya dalam proses reproduksi, dapat mempengaruhi satu atau lebih sifat yang

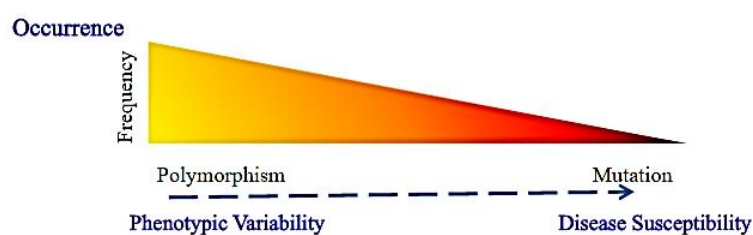
diwariskan. Dalam sel, gen terletak didalam kromosom. Setiap sel reproduksi manusia memiliki 23 kromosom dengan 3×10^9 pasang basa DNA. Setiap kromosom memiliki sekitar 3500 gen. Posisi dari gen dalam kromosom disebut sebagai lokus. Dilihat dari struktur DNA, gen adalah unit molekul DNA atau RNA dengan panjang minimum tertentu yang membawa informasi mengenai urutan asam amino yang lengkap suatu protein atau molekul mRNA (Yuwono, 2005). Panjang urutan pasangan nukleotida yang menyusun sebuah gen berbeda beda. Bentuk alternatif dari sebuah gen yang terletak pada lokus tertentu pada kromosom tunggal disebut allele dari gen. (Hartl, 2005; Yuwono 2005).

Secara umum struktur lengkap gen pada eukariota terdiri dari tiga bagian utama yaitu promoter, bagian struktural (*coding region*) dan terminator. Promoter adalah bagian gen yang berfungsi sebagai pengatur proses ekspresi genetik. Bagian ini akan dikenali pertama kali oleh RNA polymerase dan protein regulator sebelum proses transkripsi. Bagian struktural adalah bagian gen yang membawa kode genetik yang akan ditranskripsi dan kemudian ditranslasi. Bagian struktural terdiri dari ekson dan intron. Ekson adalah bagian sekuen nukleotida yang akan diterjemahkan (mengkode informasi genetik) sementara intron adalah bagian nukleotida yang tidak diterjemahkan (tidak mengkode informasi genetik). Intron mengalami proses transkripsi namun tidak akan ditranslasi. Suatu mutasi atau polimorfisme pada daerah ekson akan menyebabkan perbedaan sintesa protein. Terminator adalah bagian gen yang berperan dalam proses penghentian transkripsi (Yuwono, 2005; Fatchiyah dkk., 2011).

Pada proses pembelahan sel, terjadi duplikasi DNA dengan bantuan enzim DNA polymerase. Proses duplikasi ini sangat teliti, namun terkadang terjadi kesalahan satu atau beberapa nukleotida. Perbedaan nukleotida akan menyebabkan perbedaan sintesa protein yang dihasilkan sehingga menyebabkan variasi genetik. Variasi genetik, dalam bentuk alel multipel dari

gen, terdapat secara alami di populasi. Perbedaan genetik antar individu itu disebut sebagai polimorfisme (secara harafiah berarti bentuk bermacam-macam) DNA. Polimorfisme ini dapat menyandi protein yang berbeda dan menimbulkan genotip (sifat fisik atau biokimia) yang berbeda. Terkadang polimorfisme dapat menjelaskan sebagian kenapa beberapa orang dapat menangkal infeksi lebih baik dibandingkan orang lain. (Hartl, 2005)

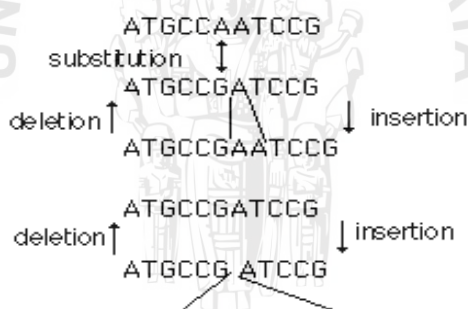
Sebuah mutasi genetik didefinisikan sebagai perubahan dalam urutan DNA yang jauh menyimpang dari normal. Hal ini berarti terdapat alele normal yang lazim dalam populasi dan bahwa perubahan mutasi ini merupakan varian langka dan bersifat abnormal. Sebaliknya, polimorfisme adalah variasi urutan DNA yang umum di populasi. Dalam hal ini tidak ada alel tunggal dianggap sebagai urutan standar. Sebaliknya ada dua atau lebih alele alternatif yang bisa diterima. Batas frekuensi kejadian antara mutasi dan polimorfisme adalah 1 persen. Artinya, untuk digolongkan sebagai polimorfisme, alel paling umum harus memiliki frekuensi 1 persen atau lebih dalam populasi. Jika frekuensi frekuensinya kurang dari 1 persen, alel ini dianggap sebagai mutasi. Mutasi terjadi sebagai akibat dari kerusakan DNA, kegagalan proses perbaikan DNA dan kesalahan dalam proses replikasi. Berbeda dengan mutasi, polimorfisme tidak menyebabkan suatu penyakit namun hanya mempengaruhi tingkat kerentanan terhadap suatu penyakit yang merupakan bagian dari suatu variasi genetik didalam populasi (Karki *et al.*, 2015)



Gambar 2.10 Spektrum Klinis Polimorfisme dan Mutasi Genetik
(Karki *et al.*, 2015)

2.7.1 Deletion/Insertion Polymorphism

Terdapat bermacam macam polimorfisme DNA yang telah diketahui diantaranya *Deletion/Insertion Polymorphism* (DIP), *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), *Microsatellites Polymorphism*. Polimorfisme DIP merupakan variasi genetik dimana terjadi penambahan (*insertion*) atau pengurangan (*deletion*) dari nukleotida yang spesifik. Angka kejadian DIP sangat jarang dibandingkan dengan SNP. Polimorfisme DIP melebihi kelipatan tiga nukleotida akan menjadikan kecenderungan menjadi suatu mutasi karena akan mengubah kerangka format suatu DNA dan akan diturunkan seterusnya. Polimorfisme DIP kelipatan tiga nukleotida akan menghasilkan penambahan atau pengurangan dari asam amino yang dihasilkan namun tidak merubah asam amino asal.



Gambar 2.11 Deletion/Insertion Polymorphism

(Murilo and Salem, 2013)

2.7.2 Microsatellite Polymorphism

Polimorfisme ini juga dikenal dengan sebutan *Short Tandem Repeats* (STR) dan *Simple Sequence Repeats* (SSR). Pada polimorfisme jenis ini, terjadi pengulangan nukleotida. Locus mikrosatelit yang terdapat pada alel dapat ditentukan secara genotip dengan menentukan panjang fragmen nukleotida melalui metode PCR. Mikrosatelit dalam nukleotida merupakan suatu urutan basa n pada DNA, terdiri dari dua sampai tujuh basa yang berulang-

Nucleotide Polymorphism adalah perubahan urutan basa DNA yang terjadi dalam proporsi tertentu (Gambar 2.12). Pada populasi manusia, sekitar 0.1% DNA berbeda yang merujuk ke suatu lokasi pada satu gen. Polimorfisme ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi individu. Polimorfisme ini dapat disebabkan oleh substitusi, insersi, atau delesi. Polimorfisme ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi individu. Polimorfisme ini dapat disebabkan oleh substitusi, insersi, atau delesi. Polimorfisme ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi individu. Polimorfisme ini dapat disebabkan oleh substitusi, insersi, atau delesi.

The diagram illustrates the genetic code and the effect of a silent mutation. It is divided into two panels: a control (left) and a mutant (right).

Control Panel (Left):

- DNA:** The coding strand (top) has the sequence 5'-ATG-3', and the template strand (bottom) has the sequence 3'-TAC-5'. A red box highlights the GAT codon on the template strand.
- mRNA:** Transcribed from the template, the mRNA sequence is 5'-AUG-3'.
- RNA Codon:** The mRNA codon is AUG.
- Protein:** The amino acid Leucine (represented by a blue and red amino acid) is added to the growing polypeptide chain.

Mutant Panel (Right):

- DNA SNP:** A mutation has occurred, changing the template strand codon from GAT to GAG (indicated by a red box and a dashed line).
- mRNA:** Transcribed from the mutant template, the mRNA sequence is 5'-AUG-3'.
- RNA Codon:** The mRNA codon is AUG.
- Protein:** The amino acid Leucine (represented by a blue and red amino acid) is added to the growing polypeptide chain.

Conclusion: The mutation (GAT to GAG) is a silent mutation, as it does not change the amino acid sequence. The resulting protein has no change in shape, as indicated by the identical polypeptide chains and the final folded protein structures.

Gambar 2.12 Single Nucleotide Polymorphism

2.7.4 Prosedur Pemeriksaan Polimorfisme

2.7.4.1 Sekuensing DNA

Ini merupakan cara yang paling langsung untuk mendeteksi adanya SNP. DNA dapat disekuensing dengan menggunakan mesin sekuenser. Pemeriksaan ini membutuhkan waktu lama dan biaya mahal. Kerugian lain adalah kesalahan sekuensing. Tingkat kesalahan satu basa per 100 basa akan menyulitkan deteksi dari SNP. (Jehan et Lakhanpaul, 2006)

2.7.4.2 Elektroforesis Multiplex

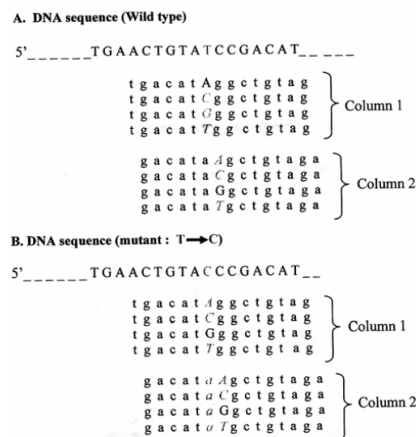
Merupakan cara mendeteksi polimorfisme melalui perbedaan pola migrasi sekuens DNA. Ini merupakan cara yang sensitif dan murah untuk mendeteksi adanya SNP.

2.7.4.3 PNA Directed PCR Clamping

Peptide Nucleic Acid (PNA) merupakan analog DNA. PNA merupakan kopi dari DNA yang poten. Dupleks dari PNA/DNA lebih stabil terhadap suhu dibandingkan dupleks DNA/DNA. Hal ini membuatnya menjadi alat efektif untuk analisa genotyping SNP. (Jehan et Lakhanpaul, 2006)

2.7.4.4 Microarrays (DNA chips)

Merupakan oligonukleotida yang ditempelkan pada permukaan padat. Sekarang digunakan rutin untuk analisa SNP dan sering digunakan untuk analisa multiplex. Gambar 2.13 adalah contoh pemeriksaan polimorfisme dengan metode microarrays dimana dasar teorinya adalah prinsip *sequencing by hybridization*.



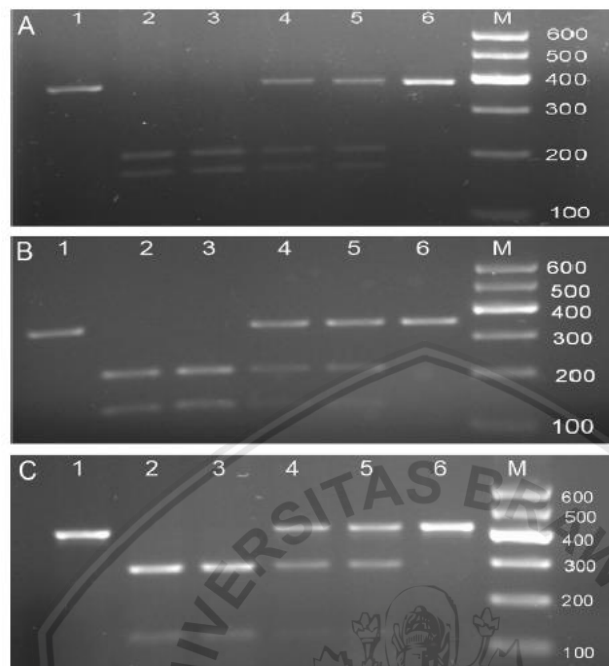
Gambar 2.13. Pemeriksaan Polimorfisme Menggunakan Metode Microarrays

2.7.4.5 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Teknik ini berdasarkan dari sifat enzim *cleavase*. Hal ini berdasarkan pada pengamatan bahwa satu untai DNA melipat sendiri. Dari pemeriksaan elektroforesis didapatkan gambaran *barcode* yang menggambarkan karakteristik DNA. Perubahan pada satu nukleotida saja akan menyebabkan perubahan barcode. RFLP adalah salah satu teknik pertama yang secara luas digunakan untuk mendeteksi variasi pada tingkat sekuens DNA. Deteksi RFLP dilakukan berdasarkan adanya kemungkinan untuk membandingkan profil pita-pita yang dihasilkan setelah dilakukan pemotongan oleh enzim restriksi terhadap DNA (Gambar 2.14). Berbagai mutasi atau polimorfisme yang terjadi pada suatu organisme mempengaruhi molekul DNA dan menghasilkan fragmen dengan panjang berbeda. Perbedaan panjang fragmen ini dapat dilihat setelah elektroforesis pada gel, hibridisasi dan visualisasi (Fatchiyah dkk., 2011).

RFLP merupakan metode yang mempunyai akurasi yang tinggi dan mudah ditransfer antar laboratorium. Selain itu, RFLP bersifat kodominan sehingga dapat mendeteksi heterozigositas dan tidak diperlukan informasi sekuens target. Adapun kekurangan RFLP diantaranya adalah dibutuhkan DNA dengan kemurnian tinggi dalam jumlah banyak, tidak bisa dilakukan otomatisasi,

sedikit lokus yang terdeteksi, memerlukan pustaka probe yang sesuai, membutuhkan waktu yang banyak dan biaya yang besar (Fatchiyah dkk., 2011)



Gambar 2.14. Ilustrasi pemeriksaan RFLP (Fatchiyah dkk., 2011)

2.7.4.6 Flow Cytometry Based Genotyping

Pemeriksaan ini sangatlah efisien dan sensitif, tetapi memiliki keterbatasan dalam pemilihan primer yang harus sangat teliti. (Jehan et Lakhanpaul, 2006)

2.7.5 Polimorfisme Gen pada TB

Beberapa polimorfisme genetik telah diteliti kaitannya dengan tuberkulosis dengan hasil konsisten maupun tidak (Tabel 2.2). Gen yang diteliti mencakup gen yang bertanggung jawab tentang HLA/MHC, reseptor, sitokin dan molekul lainnya (Azad *et al.*, 2012)

Tabel 2.2 Polimorfisme Gen pada Tuberkulosis

Gen	Polimorfisme	Negara	Hubungan dengan TB
MR	1186G/A	China	Ya
TLR1	N2485, S6021	Amerika	Ya
		Eropa	Ya
TLR2	R753Q (exon)	Turki	Ya
TIRAP	S180L	Indonesia	Tidak
		Rusia	Tidak
TLR4	D299G	Gambia	Tidak
TLR9	Rs352143	Amerika	Ya
CR1	Q1022H	Malawi	Ya
NOD2	P2685, R702W	Amerika	Ya
P2X7	1513A/C (exon)	Gambia, China	Tidak
		India	Ya
	-762T/C	Gambia, India	Ya
		Meksiko	Tidak
VDR	Apal	Guina-Bissau	Ya
MBL	Q allele	India	Ya
TNF	-238G/A	Colombia	Ya
IL-1B	-511T/C (promotor)	Gambia	Ya
IL-6	-174G/C	India	Tidak
		Iran	Ya
IL-8	-251T/A	Gambia	Tidak
IL-10	-1082G/A	Kamboja	Ya
MCP-1	-2518A/G	Tunisa	Ya
iNOS	-1026G Allele	Brazil	Ya
NRAMP1	274C Allele	Amerika	Ya

(Azad et al., 2012)

2.7.6 Polimorfisme IFN- γ +874 T/A pada TB

Jenis polimorfisme IFN- γ pada TB berupa SNP. Terdapat beberapa lokus gen yang merupakan tempat terjadinya SNP diantaranya di intron 3: rs1861494, rs2069718, dan di intron 1: rs2430561 (+847T/A) (Wei Lee et al., 2012). Istilah “rs” merupakan singkatan dari *Reference SNP Cluster Id* yang artinya tempat atau lokasi terjadinya SNP pada suatu cluster sekuensing molekul DNA (Zhao et al., 2016).

Lio dkk. adalah yang pertama kali meneliti hubungan antara polimorfisme +874T/A (rs2430561) di IFN- γ dengan perlindungan terhadap TB di Sicilia dan hasilnya signifikan berhubungan ($p < 0,05$) (Wei et al., 2017). SNP +874T/A

terletak pada akhir dari pengulangan CA yang ke 50 pada intron pertama IFN- γ manusia. Alel T terkait dengan 12 pengulangan CA, sedangkan alel A dihubungkan dengan pengulangan CA non-12. Urutan spesifik dari alel T ditemukan untuk mengetahui tempat ikatan faktor transkripsi NF- κ B, karena NF- κ B menginduksi ekspresi IFN- γ . Alel T berkorelasi dengan ekspresi IFN- γ yang tinggi, sedangkan alel A berkorelasi dengan ekspresi rendah (Tso *et al.*, 2005).

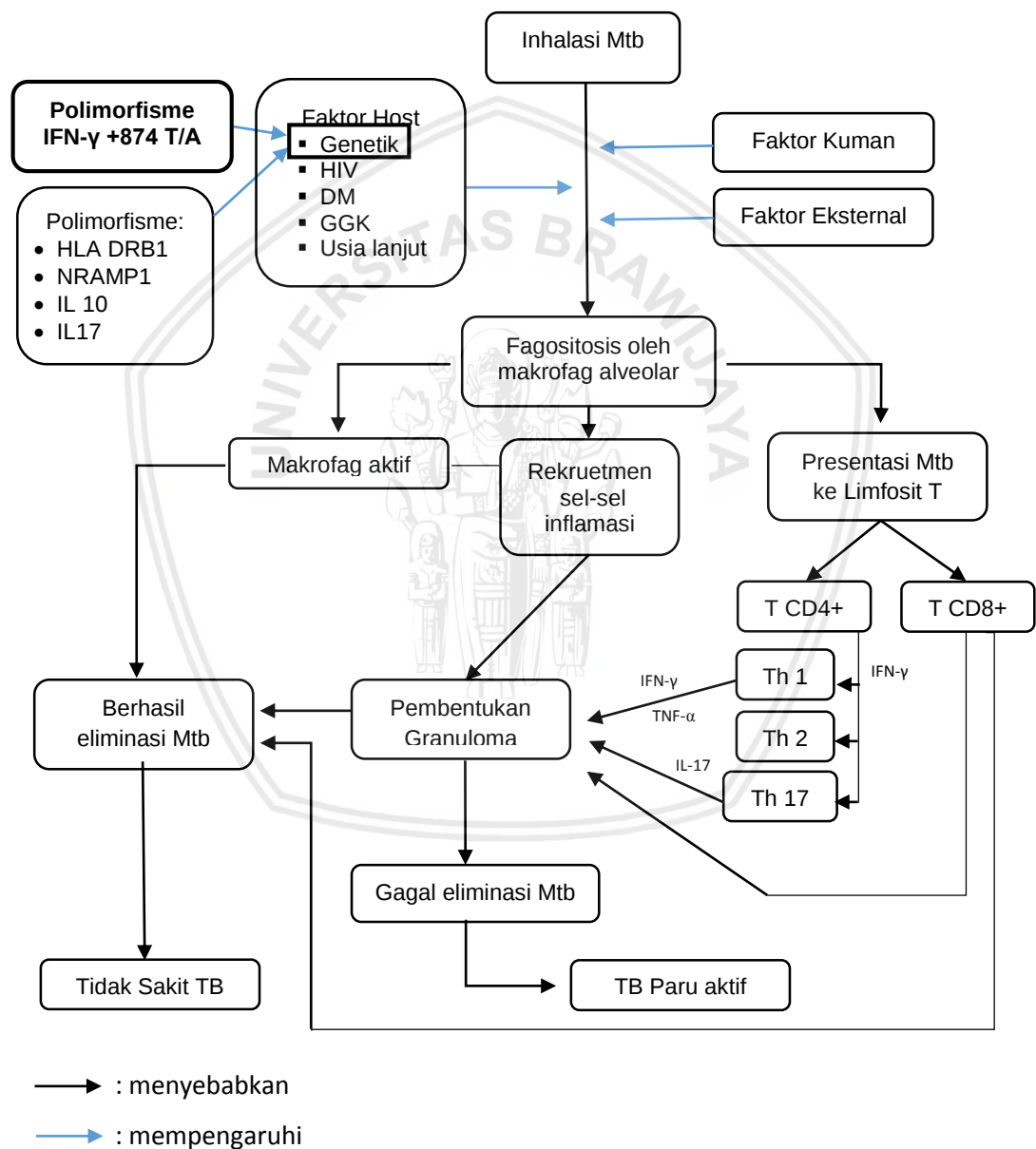
Penelitian metaanalisa tahun 2008, dari 11 penelitian case control disimpulkan bahwa polimorfisme IFN- γ +874 alel T secara signifikan (OR = 0.75; 95% CI, 0.634–0.887; P = 0.0008) menurunkan resiko TB paru (Pacheco *et al.*, 2008). Penelitian metaanalisa 3 tahun kemudian di Cina justru menunjukkan hasil yang tidak konsisten. Dari 21 penelitian case control disebutkan bahwa pembawa alel T menurunkan resiko TB sebesar 27% dibandingkan dengan homozigot AA (OR= 0.73, 95% CI=0.61– 0.87 untuk TT+TA dibanding AA). Analisa berdasarkan etnis menunjukkan pembawa alel T pada ras Asia secara signifikan menurunkan resiko TB (OR= 0.71, 95% CI= 0.52-0.97, p= 0.03) tapi tidak untuk ras kaukasia (OR=0.87, 95% CI= 0.65–1.17, p= 0.37). dan kesimpulan akhir dari metaanalisa ini bahwa polimorfisme IFN- γ +874 T/A berkontribusi pada kerentanan terhadap TB (Tian *et al.*, 2011).

Penelitian di Pakistan tahun 2011 mengkombinasikan polimorfisme gen IFN- γ +874 T/A dengan polimorfisme gen sitokin yang lainnya dan melihat derajat keparahan penyakit TB. Hasilnya genotip TT dan alel T pada IFN- γ +874 menunjukkan derajat penyakit yang ringan. Kombinasi polimorfisme gen IFN- γ +874 dengan IL-6 menunjukkan derajat yang ringan, sedangkan kombinasi IFN- γ +874 dengan IL-10 menunjukkan derajat penyakit yang berat (Ansari *et al.*, 2011)

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori Penelitian

Saat seseorang terinfeksi *Mtb*, hanya 5-10% saja yang menjadi sakit TB. Hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, dapat dari faktor individu itu sendiri (*host*), faktor kuman *Mtb*, dan faktor eksternal. Faktor *host* terutama dikaitkan dengan respon imunnya terhadap *Mtb* yang dapat dipengaruhi oleh genetik dan keadaan lain yang menurunkan imunitas seperti infeksi HIV, gagal ginjal kronis, diabetes melitus, usia lanjut. Penurunan jumlah sel CD4+ pada pasien HIV, membuat progresifitas TB semakin cepat (Mesfin *et al.*, 2014). Kontrol gula darah yang buruk berhubungan dengan tingginya populasi *Mtb* pada pasien diabetes. Kondisi hiperglikemi dihubungkan dengan penurunan fungsi makrofag dan kemotaksis sel radang, penurunan produksi ROS sehingga eradikasi *Mtb* terganggu (Fisher-Hock *et al.*, 2008). Gagal ginjal kronik stadium lanjut berhubungan dengan tingkat oksidatif yang tinggi, defisiensi vitamin D dan malnutrisi. Kondisi tersebut akan menurunkan fungsi sel limfosit T dan limfosit B. Pasien transplantasi ginjal akan menerima obat penekan sistem imun sehingga berpotensi terjadi reaktivasi tuberkulosis (Romanowski *et al.*, 2016).

Mtb yang terinhalasi dan kemudian sampai ke alveoli akan difagositosis oleh makrofag alveolar. Hanya makrofag yang aktif yang dapat mengeliminasi *Mtb*, sedang dalam makrofag yang belum aktif *Mtb* akan terus bertumbuh. Aktivasi makrofag mengakibatkan pelepasan sitokin pro-inflammatory seperti IL-1, Tumor Nekrosis Faktor (TNF)- α dan yang paling penting IL-12 dan juga kemokin, yang menginisiasi tempat peradangan untuk mempromosikan masuknya monosit, neutrofil dan sel NK dan kemudian limfosit yang sudah diaktifkan (Bafica *et al.*, 2005)

Sistem imun adaptif terutama sistem imun adaptif seluler, terbentuk setelah *Mtb* telah diproses dan dipresentasikan oleh sel dendritik sebagai *antigen presenting cell*, biasanya melalui Molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC), serta melalui keterlibatan beberapa sitokin, pada sel limfosit T.

Pembentukan granuloma sebagai hasil dari interaksi antara imunitas bawaan dan adaptif, merupakan respon imunopatologis yang utama akibat infeksi *Mtb*, mempunyai peran dalam pengendalian infeksi serta terjadinya infeksi laten (Eley and Beatty, 2009).

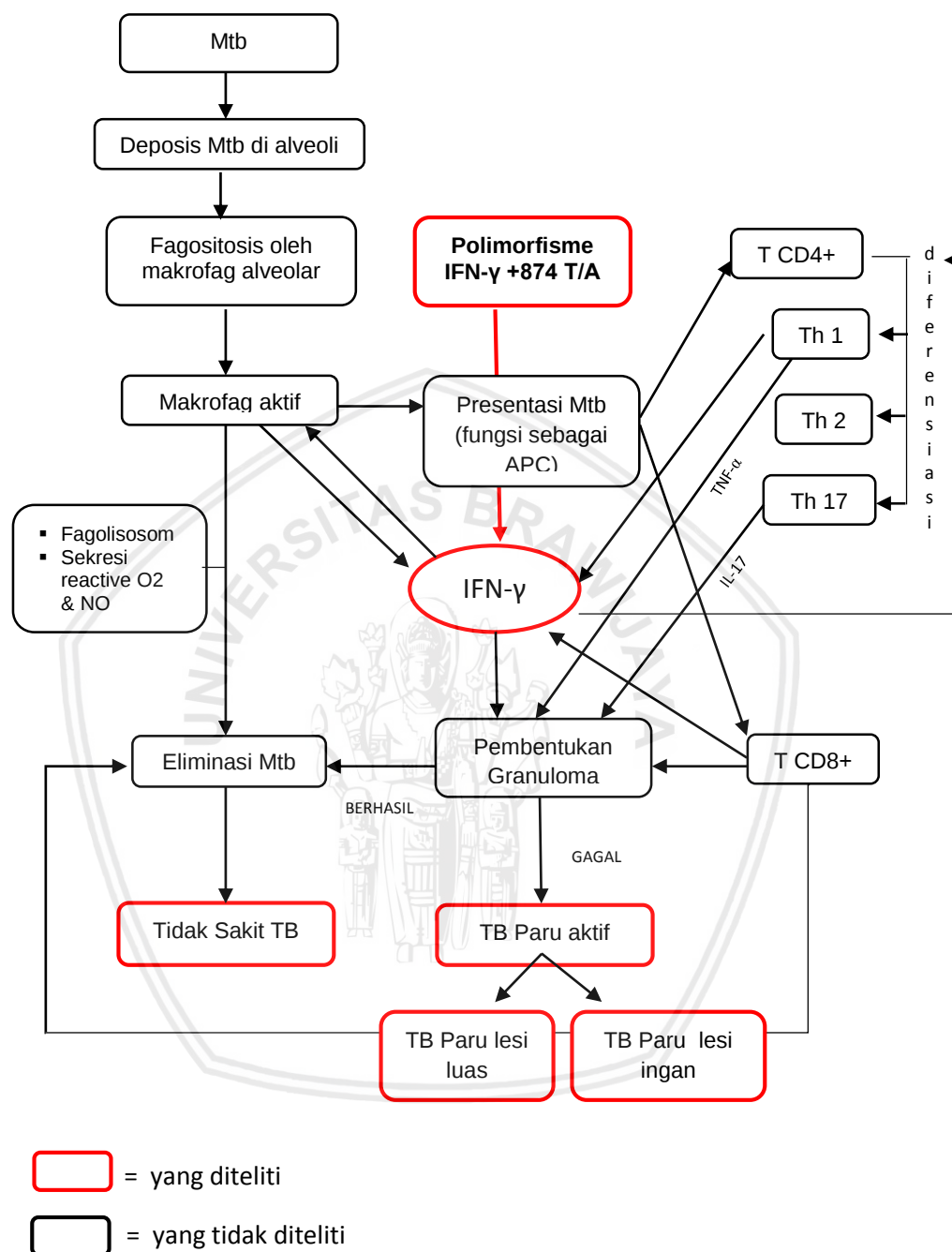
Dalam respon imun adaptif, sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ sangat penting untuk mengendalikan infeksi *mycobacterial*. Fungsi utama sel T CD4⁺ adalah untuk memberikan bantuan kepada limfosit lain, terutama dengan menghasilkan sitokin. Bila sel T CD4⁺ diaktifkan oleh trigger TCR karena kehadiran IL-2 dan IL-12, sel tersebut akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi efektor sel T CD4⁺ Th1. Kehadiran sitokin tertentu seperti IFN- γ dapat menstimulasi pembentukan, sementara sitokin Th2 seperti IL-4 dapat menghambat pembentukan. Selama awal infeksi *mycobacterial*, DC menghasilkan IL-12, dan dapat menghasilkan IL-2 dan IFN- γ . Produksi IL-2 oleh DC akan ditingkatkan neutrofil yang terinfeksi *Mtb* (Jinfang, 2009). Sel T CD8⁺ juga dapat menghasilkan sitokin seperti IFN- γ dan IL-4 yang berperan dalam sistem keseimbangan Th1 dan Th2 pada pasien dengan infeksi TB. Sel T CD8⁺ jelas memiliki peran dalam stimulasi sistem imun untuk proteksi infeksi dan mengontrol penularan tapi sejauh mana mereka mengendalikan pertumbuhan bakteri masih belum diketahui (Skold, *et al.* 2003).

Beberapa polimorfisme genetik telah diperiksa untuk menentukan kerentanan genetik terhadap TB. Polimorfisme gen sistem imun bawaan diantaranya HLA DRB1, NRAMP1 telah dilakukan dengan hasil konsisten. Polimorfisme sistem imun adaptif yang telah diperiksa diantaranya interleukin 2, IL-4, dan IL-10 juga dengan hasil konsisten (Sharma *et al.*, 2003; Vasantha *et al.*, 2015; Butov *et al.*, 2016). Polimorfisme gen IFN γ +874T/A telah banyak diteliti dan hasilnya berhubungan dengan kerentanan terhadap TB. Penelitian *in vitro* menunjukkan produksi IFN γ dari darah perifer penderita TB aktif pembawa alel A

lebih rendah daripada pembawa alel T. Sehingga pada penelitian tersebut sampai pada kesimpulan genotip AA merupakan faktor resiko TB aktif dan TB relaps, sedangkan genotip TT menunjukkan fungsi protektif terhadap TB (Selma *et al.*, 2011).



3.2 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian

Masuknya droplet Mtb ke dalam saluran napas akan diikuti dengan deposisi kuman Mtb di dalam alveoli. Sistem imunitas bawaan di dalam alveoli diperankan oleh makrofag yang akan memfagositosis kuman Mtb.

IFN- γ merupakan sitokin utama yang berperan sebagai pelindung dari infeksi TB (Cavalcanti *et al.*, 2012). IFN- γ dihasilkan oleh sel T dan sel NK setelah menjadi aktif dengan stimulus inflamasi (Abbas *et al.*, 2016). Fungsi utama IFN- γ adalah mengaktifkan makrofag sehingga meningkatkan kemampuannya sebagai antimikroba. Fungsi IFN- γ pada makrofag antara lain: (1). Meningkatkan kemampuan makrofag untuk menghancurkan bakteri intraseluler, (2). Menghasilkan nitrit oxide, oksidatif radikal dan hidrogen peroksida yang akan disekresikan ke lingkungan mikronya sehingga dapat menghancurkan Mtb atau sel-sel disekitarnya, (3). Meningkatkan ekspresi reseptor permukaan bagi antibodi di regio konstan, (4). Menginduksi ekspresi reseptor permukaan bagi TNF, (5). Menginduksi produksi sitokin-sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, dan IL-12, (6). Merangsang makrofag untuk menghasilkan kemokin IL-8 yang akan menarik leukosit dan limfosit ke paru melalui kemokin CXCL10 sehingga menyebabkan inflamasi pada dinding alveoli serta pembentukan granuloma (Cavalcanti *et al.*, 2012; Dembic, 2015).

Fungsi lain IFN- γ yaitu meningkatkan kemampuan presentasi antigen oleh MHC I dan II dan membantu perubahan sel T CD4 menjadi subpopulasi Th1. IFN- γ merangsang transkripsi lebih dari 200 gen di makrofag, termasuk produksi molekul antimikroba seperti radikal oksigen dan NO, yang sangat berperan dalam penghancuran M.tb (Cavalcanti *et al.*, 2012; Dembic, 2015).

Polimorfisme gen IFN- γ +874T/A genotip AA menyebabkan produksi IFN γ yang rendah sehingga aktivitas penghancuran Mtb berkurang menyebabkan TB paru aktif ataupun relaps dan derajat keparahan penyakit TBpun meningkat. Sedangkan polimorfisme gen IFN- γ +874T/A genotip TT menyebabkan produksi

IFN- γ yang tinggi sehingga menunjukkan fungsi protektif terhadap TB (Selma *et al.*, 2011).

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Frekuensi polimorfisme IFN- γ +874 alel A dan genotip AA lebih tinggi pada kelompok TB paru dibanding pada subyek sehat.
2. Adanya polimorfisme IFN- γ +874 T/A berhubungan dengan kerentanan terhadap TB paru (SO maupun RO).
3. Adanya polimorfisme IFN- γ +874 T/A berhubungan dengan derajat keparahan penyakit TB paru



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian adalah *Case Control Study*. Penelitian untuk mengetahui polimorfisme IFN- γ +874 T/A pada penderita TB paru (baik SO maupun RO).

4.2 Subyek Penelitian dan Besar Sampel

Populasi sampel adalah pasien dengan TB paru (baik SO maupun RO) yang berobat di poli paru atau rawat inap RS dr. Saiful Anwar Malang.

Seluruh etnis yang berobat di poli paru atau rawat inap RS dr. Saiful Anwar Malang dimasukkan dalam penelitian dan dicatat.

Jumlah sampel dihitung dengan rumus :

$$n = \frac{(p_0 \cdot q_0 + p_1 \cdot q_1)(Z_{1-\alpha^2} + Z_{1-\beta})^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

Keterangan :

n = jumlah sampel minimal kelompok kasus dan kontrol

$Z_{1-\alpha^2}$ = nilai pada distribusi normal standar yang sama dengan tingkat kemaknaan (untuk $\alpha = 0,05$ adalah 1,96)

$Z_{1-\beta}$ = nilai pada distribusi normal standar yang sama dengan kuasa (power) sebesar diinginkan (untuk $\beta = 0,10$ adalah 1,28)

p_0 = proporsi pada kelompok sehat (0.4)

p_1 = proporsi kelompok tuberkulosis paru bta positif (0.73)
(Permenkes RI, 2011).

$q_0 = 1 - p_0$

$q_1 = 1 - p_1$

Maka

$$n = \frac{(0,4 \times 0,6 + 0,73 \times 0,27)(1,96 \times 1,28)^2}{[0,73 - 0,4]^2} = 25.26 \text{ dibulatkan menjadi } 26/\text{klmpk}$$

Kelompok Kasus:

- Penderita TB paru baik TB paru SO maupun RO.

Kelompok Kontrol adalah:

- Subyek sehat

Kelompok kontrol digunakan subyek sehat. Pada kelompok ini dilakukan pemeriksaan foto toraks terlebih dahulu untuk menyingkirkan kemungkinan infeksi TB paru aktif.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di bagian rawat jalan dan rawat inap SMF Paru di RS Saiful Anwar Malang dan laboratorium Biosain Universitas Brawijaya

Pembuatan proposal : Nopember - Desember 2017

Waktu penelitian : Maret - April 2018

Pengolahan dan analisa data : April - Mei 2018

Penyusunan laporan : Mei 2018

4.4 Variabel Penelitian

Variabel Bebas:

- Polimorfisme gen IFN- γ +874 T/A

Variabel Tergantung:

- Kerentanan Terhadap TB paru (SO dan RO)

4.5 Definisi Operasional dan Parameter

1. Tuberkulosis Paru

Subyek dengan TB paru yang baru terdiagnosis secara klinis ataupun radiologis dan terkonfirmasi hasil sputum TCM TB dengan metode Xpert MTB/RIF terdeteksi adanya Mtb, baik yang sensitif rifampisin (TB paru SO) maupun resisten rifampisin (TB paru RO) (Permenkes RI, 2016).

2. Tuberkulosis Paru Sensitif Obat (TB SO)

Subyek dengan hasil sputum TCM TB dengan metode Xpert MTB/RIF terdeteksi adanya Mtb, dan tidak resisten rifampisin (Permenkes RI, 2016).

3. Tuberkulosis Paru Resisten Obat (TB RO)

Subyek dengan hasil sputum TCM TB dengan metode Xpert MTB/RIF terdeteksi adanya Mtb, dan resisten rifampisin (Permenkes RI, 2016).

4. Kerentanan terhadap tuberkulosis paru

Mudahnya seseorang terkena penyakit TB paru, dilihat berdasarkan nilai *odds ratio*

5. Kontrol sehat

Subyek sehat yang tidak ada klinis TB, tidak mempunyai riwayat TB sebelumnya, dan gambaran foto dada dalam batas normal.

6. Derajat keparahan penyakit TB paru

Keparahan penyakit TB paru berdasar gambaran lesi pada foto toraks yang dikelompokkan berdasar *National TB and Respiratory Disease Association of the USA classification*: (Falk *et al.*, 1969; Dongola, 1997; Ansari *et al.*, 2011)

a. Lesi minimal (*minimal lesion*)

Luas lesi yang terlihat tidak melebihi daerah yang dibatasi oleh garis median, apeks dan iga 2 di depan, lesi soliter dapat berada di mana saja dan tidak ditemukan kavitas.

b. Lesi lanjut sedang (*moderate advanced lesion*)

Luas sarang-sarang yang berupa bercak tidak melebihi luas satu paru, bila ada kavitas ukurannya tidak melebihi 4 cm, bila ada konsolidas luasnya tidak melebihi satu lobus.

c. Lesi sangat lanjut (*far advanced lesion*)

Luas lesi melebihi lesi minimal dan lesi lanjut sedang, atau bila ada kavitas dengan ukuran lebih dari 4 cm.

Untuk keperluan uji statistik dikelompokkan menjadi 2: (Ansari *et al.*, 2011)

- Kelompok *minimal lesion* dan *moderate advanced lesion*
- Kelompok *far advanced lesion*

7. Polimorfisme Interferon- γ +874 T/A

Adanya polimorfisme Interferon- γ +874 T/A diperiksa dengan menggunakan teknik deteksi Multiplex PCR .

8. Penderita HIV-AIDS

Seseorang dengan gejala infeksi virus HIV-AIDS yang dibuktikan dengan hasil pemeriksaan determinan reaktif.

9. Penderita diabetes mellitus

Penderita yang sudah didiagnosis diabetes mellitus berdasarkan catatan rekam medis baik yang menggunakan obat antidiabetes oral atau insulin.

10. Penderita penyakit autoimun

Penderita yang didiagnosis menderita penyakit-penyakit autoimun berdasarkan catatan rekam medis.

11. Penderita gagal ginjal kronik

Penderita yang didiagnosis menderita gagal ginjal kronik berdasarkan catatan rekam medis baik yang rutin menjalani hemodialisa atau tidak.

12. Wanita hamil

Wanita yang diketahui sedang hamil berdasarkan hasil wawancara.

Kriteria Inklusi:

- a. Pasien yang didiagnosis TB paru SO
- b. Pasien yang didiagnosis TB paru RO
- c. Usia antara 14-65 tahun
- d. Bersedia ikut penelitian dan menandatangani "informed consent"

Kriteria Eksklusi:

1. Penderita HIV-AIDS
2. Penderita dengan gagal ginjal kronik
3. Penderita dengan diabetes mellitus
4. Penderita penyakit autoimun
5. Penderita yang sedang hamil

4.6 Instrumen Pengumpulan Data

1. Formulir *informed consent*
2. Formulir data pasien penelitian
3. *Kit* pemeriksaan PCR
4. *Kit* pemeriksaan Elektroforesis
5. Kapas alkohol
6. *Vacutainer*
7. Tabung EDTA
8. Sduit *disposable* 3 cc
9. Alat tulis untuk pencatatan

4.7 Prosedur pemeriksaan

4.7.1 Prosedur Pengambilan Darah Vena

Alat : Sduit *disposable* 3 ml, vakutainer, *torniquet*

Bahan : Kapas alkohol 70%

Cara pengambilan darah:

1. Bersihkan kulit di atas lokasi tusukan dengan alkohol 70% dan biarkan sampai kering.
2. Darah diambil dari *vena mediana cubiti* pada lipat siku.
3. Pasang *tourniquet* pada lengan atas dan subyek penelitian diminta untuk mengepal dan membuka telapak tangan berulang kali agar vena jelas terlihat.
4. Lokasi penusukan didesinfeksi dengan kapas alkohol 70% dengan cara berputar dari dalam ke luar.
5. Sduit disiapkan dengan memeriksa jarum dan penutupnya.

6. Setelah itu, *vena mediana cubiti* ditusuk dengan posisi sudut 45° dengan jarum menghadap ke atas.
7. Darah dibiarkan mengalir dalam jarum kemudian jarum diputar menghadap ke bawah. Agar aliran bebas, penderita diminta membuka kepalan tangannya, darah kemudian dihisap sebanyak 3 ml.
8. *Tourniquet* dilepas, kemudian jarum ditarik dengan tetap menekan bekas tusukan dengan kapas alkohol.
9. Tempat bekas tusukan ditekan dengan kapas alkohol sampai tidak keluar darah lagi.
10. Setelah itu, bekas tusukan ditutup dengan plester.

4.7.2 Prosedur Pemeriksaan Polimorfisme Interferon- γ +874 T/A

Sampel darah vena diambil dengan cara aspirasi menggunakan jarum suntik sebanyak 3 cc dan dimasukkan dalam tabung bercampur EDTA kemudian dimasukan ke dalam frezer -20° C sampai dianalisa. Ekstraksi DNA menggunakan metode *salting out* berdasarkan protokol manual. Dilakukan amplifikasi DNA menggunakan PCR (BIO RAD C1000 Thermal Cycler) dengan *generic primer*, *antisense*: 5'-TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA-3'; *primer T*, *allele1 sense*: 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT-3', dan *primer A*, *allele2, sense*: 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA-3'. Identifikasi posisi alel tempat terjadinya polimorfisme dilakukan dengan menginkubasi produk PCR 94°C selama 30 detik untuk denaturasi genom DNA, diikuti dengan annealing primer pada suhu 68°C selama 20 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 20 detik. PCR dilakukan selama 35 siklus, diikuti dengan ekstensi final pada suhu 72°C selama 3 menit. Masing-masing sampel akan dikelompokkan sesuai hasil

elektroforesis gel agarose 2% (Saitoh *et al.*, 2011). Visualisasi hasil gel elektroforesis dengan UV-transiluminator dan kamera polaroid.

4.7.3 Prosedur Kerja Isolasi DNA Metode *Salting Out*

1. Masukkan 2 ml darah ke dalam tabung EDTA-vacutainer, kemudian goyangkan secara perlahan membentuk angka delapan.
2. Pindahkan darah dari tabung EDTA ke tabung sentrifuga, tambahkan 6 ml larutan pelisis darah merah (RBC lysis solution), kemudian inkubasi suhu ruang selama 10 menit.
3. Sentrifugasi kecepatan 1500 rpm pada suhu ruang selama 10 menit.
4. Ambil supernatant
5. Ulangi prosedur no 2 -4 sampai pellet berwarna putih.
6. Tambahkan pellet dengan 750 uL larutan pelisis sel, kemudian lakukan homogenisasi.
7. Tambahkan 2 uL RNase A, kocok kurang lebih 25 kali, dan inkubasi pada suhu 37° C selama 15 menit.
8. Tambahkan 500uL larutan presipitasi protein (NH₄COOH) kemudian divorteks.
9. Sentrifugasi kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4° C selama 15 menit
10. Presipitat protein akan terbentuk berwarna coklat muda.
11. Pindahkan supernatant yang mengandung DNA kedalam tabung eppendorf steril yang sudah berisi 1.5 ml etanol absolut
12. Kocok tabung secara perlahan sampai benang DNA berwarna putih dan pindahkan ke tabung baru.
13. Sentrifugasi kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit untuk mengendapkan DNA.

14. Buang supernatant, Tambahkan pellet dengan etanol 70% kemudian sentrifugasi kecepatan 10.000rpm suhu 4°C selama 15 menit.
15. Buang supernatant, kemudian keringkan pellet dalam incubator pada suhu 57°C.
16. Rehidrasi DNA dalam larutan buffer TE, kemudian tempatkan pada suhu 37°C selama 2 jam untuk memperoleh DNA terlarut.

4.8 Teknik Pengumpulan Data

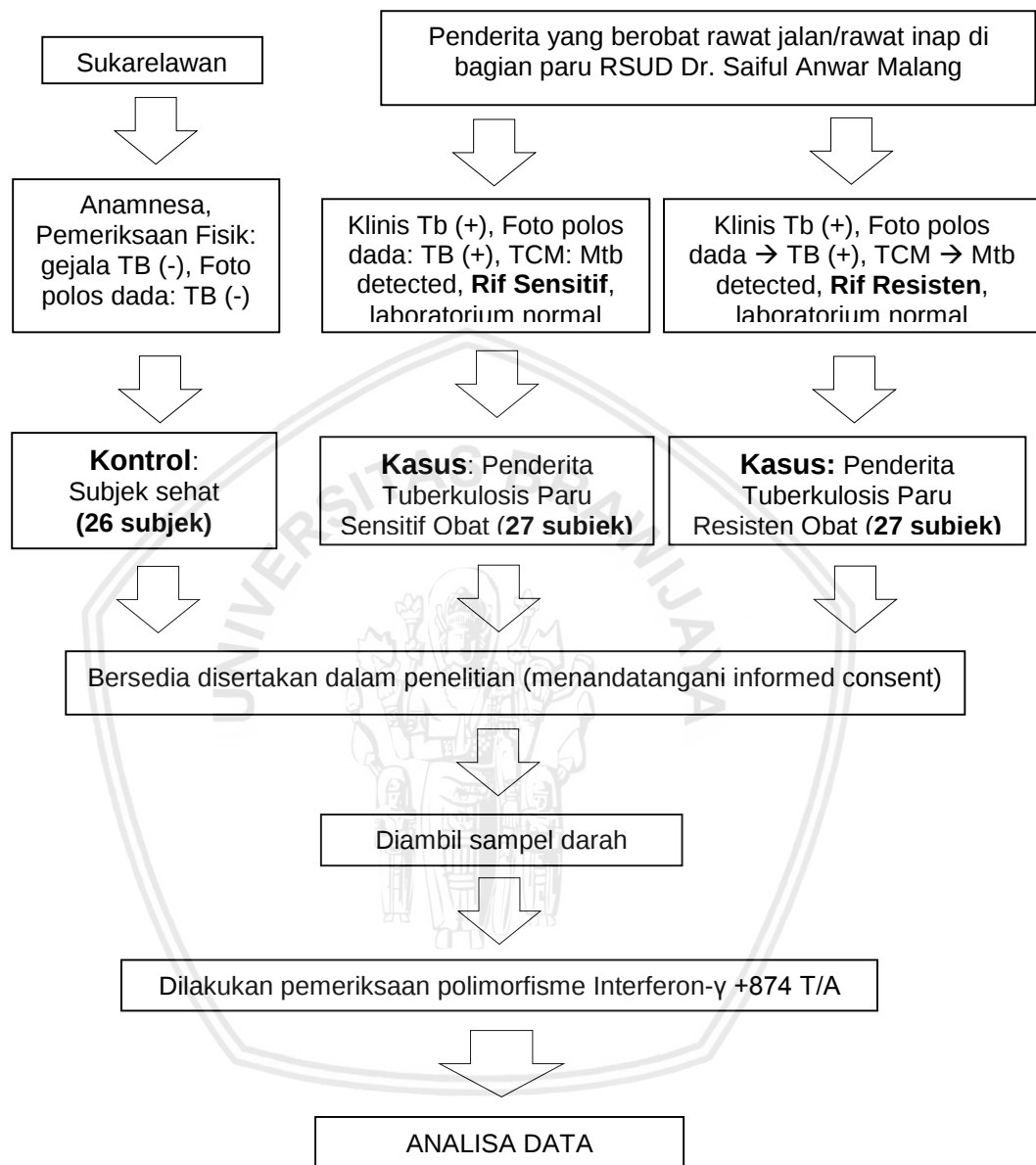
Cara Pengambilan sampel: Sampel diperoleh secara konsekutif pada penderita yang memenuhi kriteria inklusi – eksklusi di bagian rawat inap dan rawat jalan SMF Paru di RS Saiful Anwar Malang.

4.9 Teknik Pengolahan dan Analisa Data

Pengolahan dan Analisis Data menggunakan software IBM SPSS versi 20.0. Hubungan antara polimorfisme dengan kerentanan dan derajat keparahan tuberkulosis paru dianalisis dengan menggunakan uji *chisquare* menggunakan derajat kepercayaan 95%, $\alpha=0,05$, bermakna bila $p<0,05$. Sedangkan untuk mengetahui besar faktor resiko, dihitung dengan menggunakan OR (*odds ratio*).

4.10 Alur Penelitian

BAGAN ALUR PENELITIAN



Gambar 4.1 Alur Penelitian

BAB 5

HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN

5.1. Karakteristik Subyek Penelitian

5.1.1. Karakteristik Sosiodemografi Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini terdiri dari 80 subyek dengan masing-masing kelompok studi terdiri dari 26 orang kelompok kontrol sehat dan 54 orang kelompok kasus dengan TB paru. Dari 54 orang kelompok kasus, 27 orang kasus TB SO dan 27 orang kasus TB RO. Karakteristik sosiodemografi subyek penelitian dapat dilihat pada tabel 5.1.

Berdasarkan usia subyek penelitian didapatkan usia rata-rata 35.37 tahun pada kelompok kasus TB SO, 37.15 tahun pada kelompok TB RO dan 27.19 tahun pada kelompok kontrol. Untuk variabel usia dilakukan uji normalitas dengan uji Kolmogorov – smirnov dan menunjukkan data tidak terdistribusi normal ($p < 0.05$). Kemudian dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis, hasilnya menunjukkan hipotesis 0 ditolak $p = 0.014$ (< 0.05). Kemudian dilanjutkan dengan uji berganda dengan Mann Withney. Hasil uji Mann Withney menunjukkan bahwa rata rata usia kelompok kontrol memiliki beda yang bermakna dengan kelompok TB RO dan TB SO. Rata rata usia kelompok TB SO memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol, tetapi tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok TB RO. Rata rata umur kelompok TB RO memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol, tetapi tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok TB SO.

Tabel 5.1 Karakteristik Sosiodemografi Subyek Penelitian.

Karakteristik		Kontrol N = 26		Kasus				Total		P
				TB SO		TB RO		N=80		
				N = 27		N = 27				
		Jml	%	Jml	%	Jml	%	Jml	%	
Usia	Minimum	18		18		22		18		0.014 ^a
	Maksimum	37		58		65		65		
	Rata-rata±SD	27.19±6.09		35.37±13.2		37.15±12.6		33.31±11.8		
Jenis Kelamin	Laki-laki	15	57.69	14	51.85	18	66.67	47	58.7	0.268
	Perempuan	11	42.31	13	48.15	9	33.33	33	41.2	
Status Perkawinan	Kawin	16	61.54	18	66.67	23	85.19	57	71.3	0.111
	Belum Kawin	10	38.46	9	33.33	4	14.81	23	28.7	
Merokok	Ya	3	11.54	14	51.85	17	62.96	34	42.5	0.477
	Tidak	23	88.46	13	48.15	10	37.03	46	57.5	
Pendidikan	S1	25	96.15	9	33.33	12	44.44	46	57.5	0.409
	D3	0	0.00	1	3.70	1	3.70	2	2.5	
	SMA	1	3.85	17	62.96	10	37.04	28	35	
	SMP	0	0.00	0	0.00	4	14.81	4	5	
Pekerjaan	Pedagang	0	0.00	2	7.41	4	14.81	6	7.5	0.260
	Swasta	3	13.04	15	55.56	18	66.67	36	45	
	IRT	0	0.00	4	14.81	3	11.11	7	8.75	
	Petani	0	0.00	2	7.41	2	7.41	4	5	
	Mahasiswa	23	88.46	3	11.11	0	0.00	26	32.5	
Penghasilan	Pensiunan	0	0.00	1	3.70	0	0.00	1	1.25	0.033 ^b
	> 3.5 jt/bulan	0	0.00	4	14.81	2	7.40	6	11.1	
	2.5-3.5 jt/bulan	2	7.69	6	22.22	8	29.62	16	29.6	
	1.5-2.5 jt/bulan	0	0.00	9	33.33	11	40.74	18	33.3	
	< 1.5 jt/bulan	0	0.00	8	29.62	6	22.22	14	25.9	

a uji Kruskal Wallis,
b uji chi square,
SD: Standar deviasi

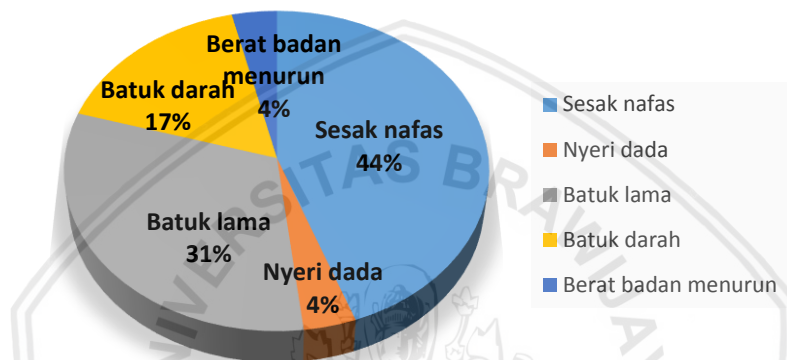
(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Untuk jenis kelamin didapatkan 51.85% laki-laki pada kelompok TB SO, 66.67% pada kelompok TB RO dan 57.69% pada kelompok kontrol. Untuk status perkawinan, sebagian besar subjek penelitian telah kawin yaitu 66.67% pada kelompok TB SO, 85.19% pada kelompok TB RO dan 61.54% pada kelompok kontrol.

Sebanyak 51.85% subjek merokok pada kelompok TB SO dan 62.96% pada kelompok TB RO. Namun pada kelompok kontrol sebagian besar tidak merokok yaitu sebanyak 88.46%. Sebagian besar kelompok kontrol berpendidikan sarjana sebesar 96.15% begitu juga kelompok TB RO yaitu sebesar 44.44%. Sedangkan pada kelompok TB SO terbanyak berpendidikan SMA sebesar 62.96%. Pekerjaan pada sektor swasta mendominasi pada

kelompok TB SO dan TB RO yaitu sebesar 55.56% dan 66.67%, sedangkan pada kelompok kontrol terbanyak adalah mahasiswa sebesar 88.46%. Penghasilan 1.5 – 2.5 juta per bulan paling banyak pada kelompok TB SO dan TB RO yaitu sebanyak 33.33% dan 40.74%.

5.1.2. Karakteristik Klinis Subyek Penelitian



Gambar 5.1. Keluhan Utama Subyek Penelitian (Sumber: Data primer penelitian diolah)

Pada gambar 5.1 dapat dilihat keluhan terbanyak pada kelompok kasus (gabungan kelompok TB SO dan TB RO) adalah sesak nafas (44%). Disusul kemudian dengan keluhan batuk lama (33%), batuk darah (17%), nyeri dada dan penurunan berat badan (masing-masing 4%).

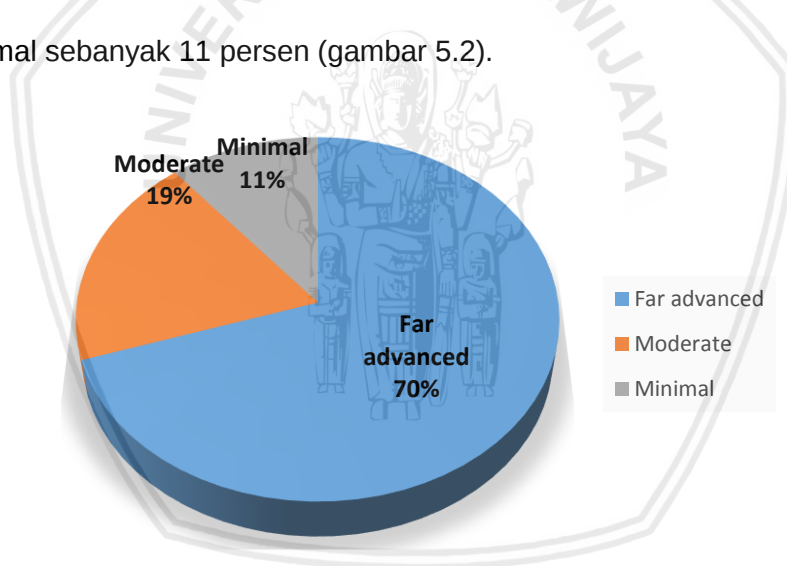
Bila diperinci keluhan utama pada setiap kelompok kasus didapatkan keluhan utama terbanyak pada kelompok TB SO adalah batuk lama sebesar 55.55%, sedangkan keluhan utama terbanyak pada kelompok TB RO adalah sesak nafas sebanyak 62.96% (tabel 5.2).

Tabel 5.2 Keluhan Utama Subyek Penelitian Setiap Kelompok Kasus

Keluhan Utama	TB SO		TB RO		Total	
	Jml	%	Jml	%	Jml	%
Sesak nafas	7	25.92	17	62.96	24	44
Batuk lama	15	55.55	2	7.40	17	31
Nyeri dada	1	3.70	1	3.70	2	4
Batuk darah	3	11.11	6	22.22	9	17
Berat badan menurun	1	3.70	1	3.70	2	4
Total	27	100	27	100	54	100

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Gambaran rontgen dada terbanyak subjek penelitian untuk semua kelompok kasus baik kelompok TB SO dan TB RO adalah gambaran lesi luas (*far advanced lesion*) sebanyak 70 persen, sedangkan yang paling sedikit adalah lesi minimal sebanyak 11 persen (gambar 5.2).



Gambar 5.2. Gambaran Rontgen Dada Subyek Penelitian (Sumber: Data primer penelitian diolah)

Tabel 5.3 menunjukkan gambaran rontgen dada pada setiap kelompok kasus dimana gambaran lesi luas tetap lebih banyak pada kelompok kasus TB RO (77.78 %) dan TB SO (62.96%).

Tabel 5.3 Gambaran Rontgen Dada Pada Setiap Kelompok Kasus

Gambaran Rontgen Dada	TB SO		TB RO		Total	
	Jml	%	Jml	%	Jml	%
<i>Far advanced lesion</i>	17	62.96	21	77.78	38	70
<i>Moderate lesion</i>	4	14.82	6	22.22	10	19
<i>Minimal lesion</i>	6	22.22	0	0.00	6	11
Total	27	100	27	100	54	100

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

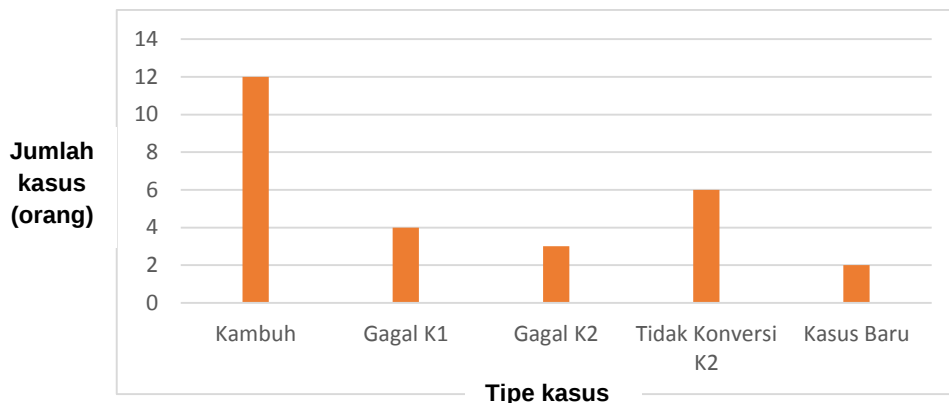
Hasil pemeriksaan sputum TCM dapat dilihat pada tabel 5.4. Kuman Mtb yang terdeteksi dari pemeriksaan TCM pada kelompok TB SO menunjukkan persentase yang sama yaitu 29.62 persen pada tingkat *low*, *medium* dan *high*. Sementara pada kelompok TB RO, kuman Mtb yang terdeteksi pada tingkat *medium* dan *high* masing-masing sebesar 33.33 persen.

Tabel 5.4 Pemeriksaan TCM Subyek Penelitian

Jumlah Mtb	TB SO		TB RO		Total	
	Jml	%	Jml	%	Jml	%
<i>Very low</i>	3	11.11	2	7.40	5	9
<i>Low</i>	8	29.62	7	25.92	15	29
<i>Medium</i>	8	29.62	9	33.33	17	31
<i>High</i>	8	29.62	9	33.33	17	31
Total	27	100	27	100	54	100

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Pada gambar 5.3 tampak tipe pasien TB resisten obat paling banyak adalah kasus kambuh sebanyak 12 orang (44.4%), sementara yang paling sedikit adalah kasus baru sebanyak 2 orang (7.4%).



Gambar 5.3 Distribusi Tipe Pasien TB Resisten Obat (Sumber: Data primer penelitian diolah)

5.2. Hasil Pemeriksaan Polimorfisme IFN γ +874T/A

Pemeriksaan polimorfisme IFN γ +874T/A pada penelitian ini menggunakan metode elektroforesis multiplex yang akan memperlihatkan potongan pita DNA yang sesuai (ukuran produk 264bp) dengan pembacaan pada gel agarosa (Gambar 5.4).



Gambar 5.4 Hasil Elektroforesis Multiplex Polimorfisme IFN γ +874T/A.

M=marker 100bp. Tampak pita DNA pada 264bp. Genotip TT bila pita muncul hanya di bagian T (*line*: 7). Genotip AA bila pita muncul hanya di bagian A (*line*: 2, 3, 4, 6, 8, 10). Genotip TA bila pita muncul di bagian T dan A (*line*: 1, 5, 9). (Sumber: Data primer penelitian diolah)

Produk yang terlihat dari metode ini adalah genotip AA, TT dan TA. Setiap genotip mengandung dua alel (kromosom diploid). Genotip AA mempunyai dua buah alel A, genotip TT mempunyai dua alel T dan genotip TA masing masing mempunyai satu alel T dan alel A.

5.2.1. Frekuensi Alel dan Genotip Polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB dan Kontrol Sehat

Pada tabel 5.5 dapat dilihat bahwa frekuensi alel A lebih tinggi secara bermakna pada kelompok TB baik SO maupun RO dibandingkan dengan kelompok kontrol (masing-masing $p < 0.001$). Begitu pula dengan presentase genotipe AA pada kelompok TB SO maupun RO lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p=0.007$ dan $p=0.002$). Tidak ada perbedaan bermakna antara frekuensi alel A dan genotip AA pada kelompok TB SO dibanding TB RO.

Tabel 5.5 Frekuensi Alel dan Genotip Polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB dan Kontrol Sehat

Variabel	TB SO		TB RO		Kontrol		P	P*	P**
	N	%	N	%	N	%			
TT	3	11.1	2	7.4	13	50.0	<0.001	0.001	NS
TA	7	25.9	13	48.1	9	34.6	NS	NS	NS
AA	17	63.0	12	44.5	4	15.4	0.007	0.002	NS
Alel T	13	24.1	17	31.5	35	67.3	<0.001	0.003	NS
Alel A	41	75.9	37	68.5	17	32.7	<0.001	<0.001	NS

P: TB SO vs Kontrol; P*: TB RO vs kontrol; P**: TB SO vs TB RO; NS= *Not Significant*

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Frekuensi alel T lebih tinggi secara bermakna pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok TB SO maupun dengan TB RO ($p < 0.001$ dan $p=0.003$). Begitu pula dengan frekuensi genotipe TT pada kelompok kontrol lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok TB SO maupun TB RO

($p < 0.001$ dan $p = 0.001$). Frekuensi genotip TA lebih rendah pada kelompok TB SO dibanding kontrol dan lebih tinggi pada kelompok TB RO dibanding kontrol, namun keduanya tidak bermakna secara statistik.

Tidak ada perbedaan yang bermakna frekuensi alel A, alel T, genotip AA, TA, maupun TT pada kelompok TB SO dibandingkan kelompok TB RO.

5.2.2. Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A dengan Kerentanan terhadap TB Paru

Tabel 5.6 Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB dengan Kontrol Sehat

Variabel		TB SO + RO		Kontrol		OR (95%CI)	P
		N	%	N	%		
Genotip	TT	5	9.3	13	50.0	Ref.	
	TA	20	37.0	9	34.6	5.778 (1.579–21.141)	0.006
	AA	29	53.7	4	15.4	18.85 (4.340–81.864)	<0.001
Alel T		25	33.8	22	62.9	0.157 (0.048–0.518)	0.001
Alel A		49	66.2	13	37.1	9.8 (2.955–32.506)	<0.001

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Pada tabel 5.6 dapat dilihat bahwa hasil Uji Chi-Square menunjukkan nilai bermakna ($p < 0.05$) pada semua variabel alel maupun genotip. Subyek dengan alel A (pemilik genotip AA atau TA) berisiko terkena TB paru 9.8 kali lebih tinggi dibandingkan subyek yang tanpa alel A (OR: 9.8 (2.955–32.506); $p < 0.001$). Sedangkan subyek dengan alel T (pemilik genotip TT atau TA) berisiko terkena TB paru 0.157 kali dibandingkan subyek yang tanpa alel T (OR: 0.157 (0.048–0.518); $p = 0.001$). Subyek dengan genotip TA dan AA secara bermakna lebih berisiko TB paru dibandingkan genotip TT (OR: 5.778 (1.579–21.141), $p = 0.006$; dan OR: 18.85 (4.340–81.864), $p < 0.001$).

Tabel 5.7 Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB SO dengan Kontrol Sehat

Variabel		TB SO		Kontrol		OR (95%CI)	P
		N	%	N	%		
Genotip	TT	3	11.1	13	50.0	Ref.	
	TA	7	25.9	9	34.6	3.370 (0.682–16.650)	0.127
	AA	17	63.0	4	15.4	18.417 (3.495–97.055)	<0.001
Alel T		10	29.4	22	62.9	0.107 (0.029-0.401)	<0.001
Alel A		24	70.6	13	37.1	8 (1.923-33.274)	0.002

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Pada tabel 5.7 dapat dilihat bahwa subyek dengan alel A secara bermakna berisiko terkena TB paru SO 8 kali lebih tinggi dibandingkan subyek yang tanpa alel A (OR: 8 (1.923-33.274); $p=0.002$). Sedangkan subyek dengan alel T secara bermakna berisiko terkena TB paru SO 0.107 kali dibandingkan subyek yang tanpa alel T (OR: 0.107 (0.029-0.401); $p < 0.001$). Subyek dengan genotip AA secara bermakna lebih berisiko terjadi TB paru SO dibanding genotip TT (OR: 18.417 (3.495–97.055); $p < 0.001$). Sedangkan subyek dengan genotip TA tidak memiliki hubungan yang bermakna dengan kerentanan terhadap TB SO ($p=0.127$).

Tabel 5.8 Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB RO dengan Kontrol Sehat

Variabel		TB RO		Kontrol		OR (95%CI)	P
		N	%	N	%		
Genotip	TT	2	7.4	13	50.0	Ref.	
	TA	13	48.1	9	34.6	9.389 (1.691–52.130)	0.005
	AA	12	44.5	4	15.4	19.5 (3.006–126.515)	0.001
Alel T		15	37.5	22	62.9	0.227 (0.061-0.841)	0.021
Alel A		25	62.5	13	37.1	12.5 (2.443-63.964)	0.001

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Pada tabel 5.8 dapat dilihat bahwa subyek dengan alel A secara bermakna berisiko terkena TB paru RO 12.5 kali lebih tinggi dibandingkan subyek yang tanpa alel A (OR: 12.5 (2.443-63.964); $p=0.001$). Sedangkan

subyek dengan alel T berisiko terkena TB paru RO 0.227 kali dibandingkan subyek yang tanpa alel T (OR: 0.227 (0.061-0.841); $p=0.021$). Subyek dengan genotip AA dan TA secara bermakna lebih berisiko TB RO dibandingkan genotip TT (OR: 19.5 (3.006–126.515), $p=0.001$; dan OR: 9.389 (1.691–52.130), $p=0.005$).

Tabel 5.9 Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB SO dengan TB RO

Variabel		TB SO		TB RO		OR (95%CI)	P
		N	%	N	%		
Genotip	TT	3	11.1	2	7.4	Ref.	
	TA	7	25.9	13	48.1	2.786 (0.373-20.819)	0.301
	AA	17	63.0	12	44.5	1.059 (0.153-7.337)	0.672
Alel T		10	29.4	15	37.5	2.125 (0.715-6.315)	0.172
Alel A		24	70.6	25	62.5	1.563(0.240–10.871)	0.5

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Tabel 5.9 menunjukkan perbandingan polimorfisme IFN γ +874T/A pada kelompok TB SO dengan TB RO dengan tujuan melihat adakah hubungan polimorfisme IFN γ +874T/A dengan risiko terjadinya resistensi obat. Dari hasil analisis data didapatkan kesimpulan bahwa tidak ada hubungan antara genotip TA dan AA dibanding TT, begitu pula alel A maupun alel T dengan risiko terjadinya resistensi obat ($p > 0.05$).

5.2.3. Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A dengan Derajat Keparahan Penyakit TB Paru

Derajat keparahan penyakit pada penelitian ini diukur dari luas lesi TB pada gambaran foto toraks subyek TB paru. Hasil uji statistik seperti terlihat pada tabel 5.11 menunjukkan signifikansi sebesar 0.007 ($p < 0.05$) pada subyek dengan genotip AA dibanding TT, sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa ada hubungan genotip AA dengan luas lesi TB pada foto toraks (OR: 15.333 (1.436-163.756)). Demikian juga pada subyek dengan alel A didapatkan signifikansi

sebesar 0.023 ($p < 0.05$), sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa ada hubungan alel A dengan luas lesi TB pada foto toraks (OR: 12.333 (1.254-121.304)).

Tabel 5.10 Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB dengan Gambaran Lesi pada Foto Toraks

Variabel		Lesi Pada Foto Toraks				OR (95%CI)	P
		Minimal+ Moderate		Luas			
		N	%	N	%		
Genotip	TT	4	25.0	1	2.6	Ref.	
	TA	6	37.5	14	36.9	9.33 (0.854-101.952)	0.064*
	AA	6	37.5	23	60.5	15.333 (1.436-163.756)	0.007*
Alel T		10	45.5	15	28.8	0.391 (0.117-1.303)	0.121
Alel A		12	54.5	37	71.2	12.333 (1.254-121.304)	0.023*

* 1- sided Fischer exact test

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Berbeda dengan yang didapatkan pada genotip TA dan alel T dimana nilai $p > 0,05$ ($p=0.064$ dan $p=0.121$), sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa tidak ada hubungan antara genotip TA dan alel T dengan luas lesi pada foto toraks pada kelompok TB paru.

Pada penelitian ini kami juga melihat hubungan polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB dengan jumlah Mtb yang terdeteksi dalam sputum TCM sebagai tambahan analisa. Untuk keperluan uji statistik, hasil sputum TCM dikelompokkan menjadi:

- Jumlah kuman sedikit : hasil TCM Mtb *detected very low* $\rightarrow$ *low*
- Jumlah kuman banyak: hasil TCM Mtb *detected medium* $\rightarrow$ *very high*

Hasil uji statistik seperti terlihat pada tabel 5.11 menunjukkan signifikansi sebesar 0.035 ($p < 0.05$) pada subyek dengan alel T dibanding yang tanpa alel T, sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa ada hubungan alel T dengan jumlah Mtb dalam sputum (OR: 0.294 (0.294–0.934)). Demikian juga pada subyek dengan genotip AA dibanding TT, didapatkan signifikansi sebesar 0.029 ($p <$

0.05), sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa ada hubungan genotip AA dengan jumlah Mtb dalam sputum (OR: 12.571 (1.198-131.895)).

Tabel 5.11 Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB dengan Jumlah Mtb yang Terdeteksi dalam Sputum TCM

Variabel		Jumlah MTB				OR (95%CI)	P
		Sedikit		Banyak			
		N	%	N	%		
Genotip	TT	4	20.0	1	2.9	Ref.	
	TA	9	45.0	11	32.4	4.889 (0.461-51.869)	0.186*
	AA	7	35.0	22	64.7	12.571 (1.198-131.895)	0.029*
Alel T		13	44.8	12	26.7	0.294 (0.294–0.934)	0.035
Alel A		16	55.2	33	73.3	8.250 (0.851-79.950)	0.057*

* 1- sided Fischer exact test

(Sumber: Data primer penelitian diolah)

Sebaliknya pada subyek dengan genotip TA dan subyek dengan alel A didapatkan nilai $p > 0.05$ ($p = 0.186$ dan $p = 0.057$), sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa tidak ada hubungan antara genotip TA dan alel A dengan jumlah Mtb dalam sputum.

BAB 6

DISKUSI

6.1. Karakteristik Subyek Penelitian

6.1.1. Karakteristik Sosiodemografik Subyek Penelitian

Secara sosiodemografis tidak terdapat perbedaan bermakna rata rata usia pada kelompok TB SO dan TB RO namun berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p=0.014$). Rata rata usia pada kelompok TB SO dan TB RO masuk pada kelompok usia dewasa produktif namun usia kelompok TB SO sedikit lebih muda daripada kelompok TB RO. Hal ini sesuai dengan laporan WHO tahun 2015 dan Permenkes RI tahun 2016 yang menyatakan bahwa insiden tuberkulosis terbanyak pada kelompok usia dewasa produktif. Penelitian yang dilakukan Dodd *et al* menemukan bahwa insiden tuberkulosis pada usia dewasa lebih tinggi 1.5-6 kali lipat daripada kelompok anak dan remaja. Hal ini disebabkan oleh kecenderungan kontak yang lebih besar diantara pergaulan sosial dan rumah tangga terutama kontak dengan laki-laki dewasa (Dodd *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini didapatkan jenis kelamin laki laki lebih banyak dibandingkan perempuan pada semua kelompok kasus dan kontrol. Data dari WHO global report 2016 insiden TB pada laki laki diperkirakan 6,4 juta jiwa dan pada perempuan sekitar 4 juta jiwa (68% laki laki dan 32% perempuan), dengan 90% adalah pasien usia dewasa. Di Indonesia sendiri berdasarkan data profil kesehatan Indonesia tahun 2016 menunjukkan pasien TB laki laki mencapai 95.382 jiwa (61%) dan perempuan 61.341 jiwa (39%). Data tersebut

menunjukkan laki laki lebih rentan menderita TB dibandingkan dengan perempuan. Salah satu faktor risikonya adalah kebiasaan merokok dan minum alkohol pada laki laki mengakibatkan peningkatan kerentanan terhadap infeksi TB. Selain hal tersebut penelitian terbaru juga menunjukkan adanya peranan hormon testoteron pada laki laki dan estrogen pada perempuan yang mempengaruhi respon imun seluler antara lain sel B, sel T, neutrofil, sel dendrit dan makrofag terhadap antigen (Permenkes, 2016; WHO, 2016; Nhamoyebonde et al., 2014; Corona et al., 2006).

Jumlah subyek yang merokok lebih tinggi pada kelompok kasus TB SO dan TB RO daripada kelompok kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian di India, Korea Selatan dan China (Ho Lin *et al.*, 2008; Ha Jee *et al.*, 2009; Gambhir *et al.*, 2010). Merokok merupakan faktor resiko tuberkulosis paru. Merokok akan memperburuk respon terapi dan *outcome* terhadap tuberkulosis (Leung *et al.*, 2014). Suatu studi populasi menemukan bahwa merokok akan meningkatkan resiko terjadinya reaktivasi dari kasus tuberkulosis yang telah sembuh dan meningkatkan resiko terjadinya TB RO (Yen *et al.*, 2014). Pada tingkat sel, asap rokok dapat mengganggu pergerakan silia sel epitel saluran nafas, menyebabkan hiperplasia sel gobet, dan metaplasia sel epitel gepeng (Schamberger *et al.*, 2015). Asap rokok juga mengganggu fungsi makrofag diantaranya menghambat migrasi menuju tempat infeksi tuberkulosis dan menghambat pembentukan fagolisosom pada makrofag yang terinfeksi Mtb (O'leary *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2017).

Tingkat pendapatan subyek pada kelompok kasus TB SO dan TB RO paling tinggi pada kisaran 1.5-2.5 juta perbulan. Berdasarkan penggolongannya, Badan Pusat Statistik (BPS) tahun 2014 membedakan pendapatan menjadi 4 golongan yaitu Golongan pendapatan sangat tinggi, adalah jika pendapatan rata-rata lebih dari Rp. 3.500.000,00 per bulan. Golongan pendapatan tinggi

adalah jika pendapatan rata-rata antara Rp. 2.500.000,00 s/d Rp. 3.500.000,00 per bulan. Golongan pendapatan sedang adalah jika pendapatan rata-rata antara Rp. 1.500.000,00 s/d Rp. 2.500.000,00 per bulan. Golongan pendapatan rendah adalah jika pendapatan rata-rata 1.500.000,00 per bulan (BPS, 2014). Namun jika mengacu pada Upah Minimum Regional (UMR) tahun 2018 di kota Malang tempat penelitian ini dilakukan, maka pendapatan subyek pada kelompok kasus TB SO dan TB RO tergolong rendah karena batas UMR sebesar Rp 2.500.000,- perbulan. Penelitian di India tahun 2012 menemukan prevalensi tuberkulosis paling tinggi pada kelompok masyarakat miskin. Kemiskinan erat kaitannya dengan kurangnya nutrisi, lemahnya akses kesehatan dan sanitasi lingkungan yang buruk. Semua faktor tersebut berhubungan dengan resiko penularan dan sakit tuberkulosis (Oxlade and Murray, 2012).

6.1.2. Karakteristik Klinis Subyek Penelitian

Pada penelitian ini terdapat perbedaan keluhan utama antara kelompok TB SO dan TB RO ($p = 0.007$). Keluhan terbanyak subjek penelitian kelompok TB SO adalah batuk lama lebih dari 2 minggu sementara keluhan utama terbanyak pada kelompok TB RO adalah sesak nafas. Menurut penelitian di Ethiopia dan India, keluhan utama terbanyak pasien tuberkulosis paru adalah batuk lama lebih dari 2 minggu (Tolossa *et al.*, 2014; Binopal *et al.*, 2015). Penelitian lain juga menyatakan tidak ada perbedaan manifestasi klinis antara TB SO dan TB RO kecuali jika dibarengi dengan infeksi HIV (Gandhi *et al.*, 2006; Schaaf *et al.*, 2009). Pada penelitian ini, sebagian besar subyek kasus TB RO sudah pernah terinfeksi tuberkulosis sebelumnya yang menyebabkan derajat kerusakan parunya lebih berat sehingga keluhan utamanya lebih berat. Hal ini sesuai dengan penelitian di Brazil yang menyatakan bahwa *outcome* pada kasus TB MDR lebih buruk daripada TB SO (Micheletti *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini, gambaran foto rontgen terbanyak pada kelompok kasus TB SO dan TB RO adalah lesi luas (*far advanced lesion*). Hal ini sesuai dengan di Vietnam yang menyatakan gambaran rontgen terbanyak adalah lesi luas yang meliputi kavitas, konsolidasi, fibrosis terutama pada kelompok subjek dengan jenis kelamin laki-laki (Thorson et al., 2006). Penelitian lainnya lebih lanjut membuktikan adanya perbedaan yang signifikan antara foto rontgen TB SO dan TB RO, dimana derajat kerusakan lebih luas pada kelompok TB RO. Kerusakan tersebut diantaranya kavitas, konsolidasi, bronkiektasis, atelectasis, bulla dan kalsifikasi (Icksan et al., 2018).

Jumlah kuman Mtb yang terdeteksi melalui pemeriksaan TCM tidak berbeda bermakna antara kelompok TB SO dan TB RO. Pemeriksaan TCM pada kelompok TB RO menunjukkan sedikit lebih banyak jumlah kuman Mtb pada tingkat *medium* dan *high*. Penelitian kami tidak menggunakan pemeriksaan konvensional yaitu pengecatan sputum BTA. Menurut alur diagnosis TB, pemeriksaan TCM dapat menggantikan pemeriksaan BTA pada fasilitas kesehatan yang memiliki pemeriksaan TCM karena hasilnya yang lebih sensitif dibandingkan dengan pemeriksaan BTA. Selain itu, pemeriksaan TCM juga dapat mengidentifikasi resistensi Rifampisin sehingga langsung dapat memisahkan antara kelompok TB SO dan TB RO (Permenkes RI, 2016). Pemeriksaan TCM merupakan pemeriksaan molekuler yang mendeteksi kuman Mtb berdasarkan teknik amplifikasi DNA. Pengerjaannya berdasarkan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang menghitung jumlah ambang batas siklus pengulangan amplifikasi DNA dari Mtb itu sendiri / *Mtb-ct* (*M tuberculosis threshold-cycle*). Pemeriksaan TCM merupakan metode semi kuantitatif yang hasilnya dinyatakan kedalam kelompok *very low*, *low*, *medium* dan *high*. Tingkat *high* dinyatakan jika terdapat ≤ 16 *Mtb Ct*, *medium* jika terdapat 16-22 *Mtb Ct*, *low* jika terdapat 22-28 *Mtb Ct* dan *very low* jika terdapat 28-38 *Mtb Ct*. Semakin

rendah jumlah *Mtb Ct* semakin tinggi jumlah kuman *Mtb* yang terdeteksi. Hasil dari pemeriksaan TCM dapat disesuaikan dengan pemeriksaan sputum BTA menggunakan skala dari IUATLD (*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*) dimana tingkat *high* setara dengan diatas atau sama dengan +2, *medium* setara dengan diatas atau sama dengan +1, *low* setara dengan dibawah atau sama dengan +1, *very low* setara dengan *scanty* atau dibawahnya (Blakemore *et al.*, 2011).

6.2. Frekuensi Alel dan Genotip Polimorfisme IFN γ +874T/A Kelompok TB dan Kontrol Sehat

Pada penelitian ini didapatkan frekuensi alel T dan genotip TT lebih banyak terdapat pada kelompok kontrol sehat dibandingkan kelompok TB paru baik SO maupun RO, dan signifikan secara statistik. Hasil ini sesuai dengan metaanalisa di Cina tahun 2011, dimana 16 dari 21 penelitian yang dianalisis menunjukkan frekuensi alel T lebih banyak pada kelompok kontrol sehat dibandingkan kelompok kasus. Frekuensi genotip TT juga secara umum (12 dari 21 penelitian) lebih banyak pada kelompok kontrol dibandingkan kelompok kasus, demikian pula dengan genotip TA (16 dari 21 penelitian) (Tian *et al.*, 2011). Metaanalisa tahun 2017 menunjukkan frekuensi alel T lebih banyak pada kelompok kontrol sehat dibandingkan kelompok kasus TB baik pada ras Afrika, kaukasia, Asia, ataupun campuran (Wei *et al.*, 2017). Hasil ini menunjukkan efek protektif terhadap TB paru dari pembawa alel T (Pacheco *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2011; Ansari *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2017).

Dari hasil penelitian ini frekuensi alel A dan genotip AA lebih tinggi secara bermakna pada kelompok kasus (baik pada kelompok TB SO maupun RO) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil ini sesuai dengan metaanalisa di Cina tahun 2011, dimana 14 dari 21 penelitian yang dianalisis menunjukkan

frekuensi alel A lebih banyak pada kelompok kasus dibandingkan kelompok kontrol. Frekuensi genotip AA juga secara umum (14 dari 21 penelitian) lebih banyak pada kelompok kasus dibandingkan kelompok kontrol (Tian *et al.*, 2011). Polimorfisme IFN γ +874 alel A merupakan faktor risiko terjadinya TB paru (Pacheco *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2011; Selma *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015).

Frekuensi genotip TA pada penelitian ini secara umum lebih tinggi pada kelompok kasus (TB SO dan RO) dibanding dengan kelompok kontrol, namun tidak signifikan secara statistik. Frekuensi genotip TA pada kelompok TB SO lebih rendah dibanding dengan kontrol, sedangkan pada kelompok TB RO frekuensinya lebih tinggi dibanding kontrol. Namun keduanya tidak signifikan secara statistik. Hasil penelitian di Tunisia menunjukkan genotip TA lebih banyak terdapat pada kelompok kontrol dan secara signifikan berhubungan dengan resistensi terhadap TB paru (Selma *et al.*, 2011). Tidak ada perbedaan yang bermakna antara presentase alel A, alel T, genotip AA, TT, maupun TA pada kelompok TB SO dibanding TB RO.

6.3. Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A dengan Kerentanan terhadap TB Paru

Hasil penelitian kami menemukan adanya hubungan yang signifikan antara polimorfisme IFN γ +874T/A dengan kerentanan terhadap TB paru. Pembawa alel A, genotip AA dan genotip TA secara signifikan berhubungan dengan peningkatan risiko terhadap TB paru (OR: 9.8, 95% CI= 2.955-32.506; OR: 18.85, 95% CI= 4.340-81.864; OR 5.778, 95% CI= 1.579-21.141). Pembawa alel T secara signifikan berhubungan dengan penurunan risiko terhadap TB paru (OR: 0.157, 95% CI= 0.048-0.518).

Hasil ini sesuai dengan metaanalisis tahun 2017 yang kesimpulannya secara umum pembawa alel T berhubungan dengan penurunan risiko terhadap TB paru maupun ekstraparu, terkait dengan ekspresi terhadap IFN γ yang tinggi sehingga kadar IFN γ meningkat yang berdampak pada efektivitas mengontrol jumlah Mtb melalui aktivasi makrofag. Pembawa alel A berhubungan dengan peningkatan risiko TB paru. Diperkirakan alel A menyebabkan ekspresi terhadap IFN γ rendah sehingga kadar IFN γ turun yang berdampak depresi terhadap fungsi makrofag dalam mengontrol Mtb (Wei *et al.*, 2017). Genotip TA pada penelitian ini secara signifikan berhubungan dengan peningkatan risiko TB paru. Hasil ini berbeda dengan penelitian di Tunisia dimana genotip TA secara signifikan berhubungan dengan resistensi terhadap TB paru (Selma *et al.*, 2011). Demikian pula dengan metaanalisis tahun 2011 di Cina menunjukkan hasil pembawa alel T (genotip TT dan TA) berhubungan dengan penurunan risiko TB (Tian *et al.*, 2011).

6.4. Hubungan Polimorfisme IFN γ +874T/A dengan Derajat Keparahan Penyakit TB Paru

Kolonisasi Mtb yang tinggi akan menyebabkan kerusakan organ semakin luas bahkan berisiko terjadinya mutasi yang dapat menyebabkan terjadinya TB RO (Colijn *et al.*, 2011). Derajat keparahan penyakit TB paru pada penelitian ini dilakukan melalui luasnya lesi TB pada gambaran foto toraks subyek TB paru. Dari hasil penelitian didapatkan genotip AA dan alel A secara signifikan berhubungan dengan lesi TB paru yang luas. Genotip TA menunjukkan hasil uji statistik yang tidak signifikan meski cenderung meningkatkan luas lesi. Demikian pula dengan alel T yang cenderung menunjukkan lesi yang tidak luas namun tidak signifikan secara statistik.

Penelitian di Pakistan tahun 2011 mengkombinasikan polimorfisme gen IFN- γ +874 T/A dengan polimorfisme gen sitokin yang lainnya dan melihat derajat keparahan penyakit TB. Hasilnya genotip TT dan alel T pada IFN- γ +874 menunjukkan derajat penyakit yang ringan. Kombinasi polimorfisme gen IFN- γ 874 dengan IL-6 menunjukkan derajat yang ringan, sedangkan kombinasi IFN- γ +874 dengan IL-10 menunjukkan derajat penyakit yang berat (Ansari *et al.*, 2011)

Pada penelitian ini kami juga menganalisa jumlah kuman Mtb yang terdeteksi pada pemeriksaan sputum TCM sebagai analisa tambahan, karena kami tidak memeriksa kualitas sputum sampel. Dari hasil penelitian kami dapatkan genotip AA secara signifikan berhubungan dengan tingginya jumlah kuman Mtb pada pemeriksaan sputum TCM. Sebaliknya alel T secara signifikan berhubungan dengan rendahnya jumlah kuman Mtb. Alel A dan genotip TA menunjukkan kecenderungan meningkatkan jumlah kuman Mtb namun tidak signifikan secara statistik.

Tingginya jumlah kuman Mtb yang terdeteksi pada pemeriksaan sputum TCM seharusnya berbanding lurus dengan luas lesi TB yang tergambar pada foto toraks, kecuali pada 7 subyek di kelompok kasus, dimana hasil foto toraks menunjukkan lesi luas namun hasil sputum TCM terdeteksi Mtb yang sedikit. Dari ketujuh subyek penelitian tersebut, 4 dengan genotip TA, 2 dengan genotip AA, dan 1 dengan genotip TT. Lima subyek penelitian merupakan kelompok TB RO kriteria kasus kambuh, dimana sebelumnya pernah mendapatkan terapi obat anti TB sehingga jumlah Mtb yang didapatkan dalam sputum rendah. Pada penelitian ini kami juga tidak memeriksa kualitas sputum sampel. Kualitas sputum sangat mempengaruhi diagnosis TB. Jumlah kuman Mtb yang terdeteksi melalui metode TCM berbanding lurus dengan kekentalan sputum. Sputum yang kental mengandung jumlah Mtb yang banyak sedangkan sputum encer karena terlalu banyak air liur biasanya sedikit mengandung Mtb (Blakemore *et al.*, 2011).

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

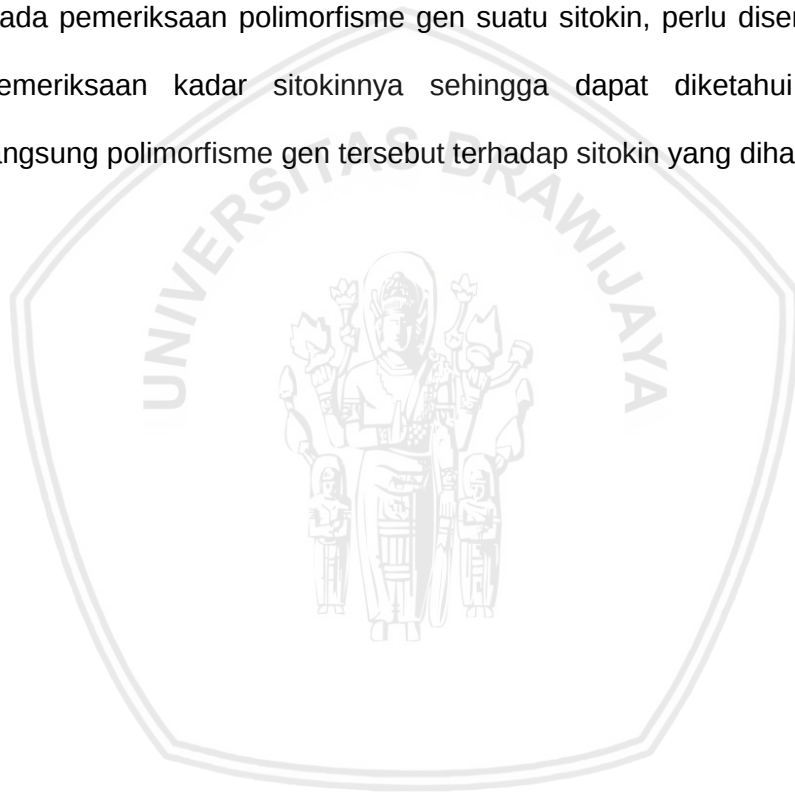
1. Frekuensi polimorfisme IFN- γ +874 alel A dan genotip AA lebih tinggi pada kelompok TB paru baik SO maupun RO, sedangkan alel T dan genotip TT lebih tinggi frekuensinya pada kelompok kontrol sehat. Hasil ini menunjukkan peran protektif alel T terhadap TB paru dan sebaliknya alel A sebagai faktor risiko terjadinya TB paru.
2. Polimorfisme IFN- γ +874 T/A berhubungan dengan kerentanan terhadap TB paru baik TB SO maupun RO, dimana subyek dengan alel A secara signifikan lebih berisiko terjadi TB paru 9 kali lipat, TB SO 8 kali lipat, dan TB RO 12 kali lipat.
3. Polimorfisme IFN- γ +874 T/A berhubungan dengan Derajat Keparahan penyakit TB paru, dimana subyek dengan alel A dan genotip AA masing-masing secara signifikan berisiko 12 kali dan 15 kali lipat menderita TB dengan lesi yang luas.

7.2 Saran

1. Selain faktor genetika terdapat faktor risiko lain yang mempengaruhi terjadinya TB paru, seperti faktor pejamu yang lain (kebiasaan minum alkohol, merokok, status gizi), faktor kuman, dan faktor eksternal/lingkungan. Pada penelitian selanjutnya sebaiknya dipertimbangkan

faktor-faktor risiko tersebut dalam pemilihan sampel agar faktor risiko lain lebih homogen.

2. Kerentanan terhadap TB paru bersifat poligenit, perlu dilakukan pemeriksaan polimorfisme gen yang lebih luas (melibatkan banyak gen) sehingga dapat lebih banyak menjelaskan pengaruh gen tertentu terhadap TB paru bahkan pengaruhnya terhadap derajat keparahan penyakit yang ditimbulkan.
3. Pada pemeriksaan polimorfisme gen suatu sitokin, perlu disertai dengan pemeriksaan kadar sitokinnya sehingga dapat diketahui pengaruh langsung polimorfisme gen tersebut terhadap sitokin yang dihasilkan.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K. Lichtman, Andrew H. 2016. *Basic Immunology – Functions dan Disorders of The Immune System*. Edisi kelima. Elsevier. Kanada. p.1–307.
- Asgharzadeh M, Ghorghanlu S, Rashedi J, Poor BM, Khaki-Khatibi F, Moaddab SR, et al. 2016. Association of Promoter Polymorphisms of Interleukin-10 and Interferon Gamma Genes with Tuberculosis in Azeri Population of Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunology*. June 2016; 15(3):167-173.
- Azuma M. 2006. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodont Res*; 41: 361- 373.
- Ansari A, Hasan Z, Dawood G, Hussain R. 2011. Differential Combination of Cytokine and Interferon- γ +874 T/A Polymorphisms Determines Disease Severity in Pulmonary Tuberculosis. *Plos One* 6(11): e27848.
- Azad A. K, Sadee W, Schlesinge L. S. 2012. Innate Immune Gene Polymorphisms in Tuberculosis. *Infection and Immunity*. 80, (10) : 3343–3359.
- Ben-Selma, Walid, Ben-Abderrahmen, Yosra, Boukadida, Jalel, Harizi, Hedi. 2011. IL-10R1 S138G loss-of-function polymorphism is associated with extrapulmonary tuberculosis risk development in Tunisia. *Molecular Biologi Report* 2012 39:51-56
- Binepal G, Agarwal P, Kaur N, Singh B, Bhagat V, Verma R, Satyanarayana P. S, Oeltmann J. E, Moonan P. K. 2015. Screening difficult-to-reach populations for tuberculosis using a mobile medical unit, Punjab India. *Public Health Action*. vol 5 (4). pp. 241–245.
- Boom N. W, Canaday D. H, Fulton S. A, Gehring A. J, Rojas R. E, Torres M. 2003. Human Immunity to M.Tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis*;83;98-106
- Blakemore R, Nabeta P, Amy L. D, Virali V, Rasim T, Vanisha My, Mark N, Martin J, David H. P, Doris H, Felicity L, Carlos Z, Camilla R, Catharina C. B, Mark D. P. 2011. A Multisite Assessment of the Quantitative Capabilities of the Xpert MTB/RIF Assay. *Am J Respir Crit Care Med*. Vol: 184 (9) pp.1076–1084.
- Butov D. O, Kuzhko M. M, Makeeva N. I, Butova T. S, Stepanenko H. L, Dudnyk A. B. 2016. Association of interleukins genes polymorphisms with multi-drug resistant tuberculosis in Ukrainian population. *Pneumonol Alergol*. 84, (3) : 168-73.
- Cadena A. M, Flynn J. L, Fortune S. M. 2016. The importance of first impressions: early events in Mycobacterium tuberculosis infection influence outcome. *mBio*. 7, (2) : 1-9.

- Cavalcanti Y. V. N, Brelaz M. C. A, Neves J. K d A. L, Ferraz JeC, Pereira aVeReA. 2012. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the development of pulmonary tuberculosis. *Pulmonary Medicine*. 2012: 1-10.
- Chandra R. K. 1996 Nutrition, immunity and infection: From basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proct Natl Acad Sci USA*. 93:14304-7.
- Dembic Z. Cytokines of the Immune System: Interferon. In: Dembic Z (Ed). *The cytokines of the immune system: The Role of Cytokines in Disease Related to Immune Response*, Elsevier. 2015; p.129-140
- Dheda K, Schwander S. K, Zhu B, Richard N, Zhang Y. 2010. The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology*; 15, pp. 433–450.
- Dodd P.J, Clare Looker, Ian D. P, Virginia B, Ab Schaap, Kwame, Monde M, Emilia V, Peter G-F, Elizabeth L. C, Nulda B, Helen A, Richard G. 2016. Age- and Sex-Specific Social Contact Patterns and Incidence of Mycobacterium tuberculosis Infection. *American Journal of Epidemiology*. 183 (2): pp. 156-166.
- Eley BS, Beatty D. W. 2009. *The basic immunology of tuberculosis*. Saunders; P75-86.
- Falk A, O'Connor J. B, Pratt P. C. 1969. Classification of pulmonary tuberculosis. *Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis*. Vol. 12. New York, N.Y: *National Tuberculosis and Respiratory Disease Association*. p: 68-76.
- Fatchiyah, Arumingtyas E. L, Widyarti S, Rahayu S. 2011. *Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis*. Edisi 1. Bab 3: Kromosom, Gen dan DNA. *Penerbit Erlangga*, Hal. 11-21.
- Gambhir H. S, Rajeev M. K, Reshma K, Girish S. 2010. Tobacco smoking-associated risk for tuberculosis: a case-control study. *International Health*. 2; pp. 216–222.
- Gandhi N. R, Anthony M, Willem S, Robert P, Thiloshini G, Umesh L, Kimberly Z, Jason A, Gerald F. 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet*. Vol 368: pp. 1575–1580.
- Grippi M. A., dkk. 2015. *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*. Edisi kelima. McGraw-Hill Education. Amerika Serikat. p. 3971 – 4010.
- Guerra R and Yu Z. 2005. *Single Nucleotide Polymorphism and Their Application*. Chapter : 16 . p. 309-348.
- Ha Jee S, Jonathan E. G, Jaeseong J, Heechoul O, Jonathan M. S. 2009. Smoking and Risk of Tuberculosis Incidence, Mortality, and Recurrence in South Korean Men and Women. *American Journal of Epidemiology*. Vol

- 170 (2). pp. 1478-1485. Hanekom WA, Abel B, Scriba TJ, 2007. Immunological protection against tuberculosis. *SAMJ*; 97:973-7.
- Hill A. V. 2001. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* (2) : 373-400.
- Ho Lin. H, Megan M, Ted C, Caroline C, Majid E. 2008. Effects of smoking and solid-fuel use on COPD, lung cancer, and tuberculosis in China: a time-based, multiple risk factor, modelling study. *Lancet.* 372: pp. 1473-1483.
- Hu Y, Wu L, Li D, Zhao Q, Jiang W, Xu B. 2015. Association between cytokine gene polymorphisms and tuberculosis in a Chinese population in Shanghai: a case-control study. *BMC Immunology.* 16:8
- Hunter R. L. 2016. Tuberculosis as a three-act play: A new paradigm for the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* : 97 pp. 8-17.
- Icksan A. G, Napitupulu M. R, Nawas M. A, Nurwidya F. 2018. Chest X-Ray Findings Comparison between Multi-drug-resistant Tuberculosis and Drug-sensitive Tuberculosis. *J Nat Sci Biol Med.* vol 9(1): pp.42-46
- Karki R, Pandya D, Elston R. C, Ferlini C. 2015. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics.* 8, (37) : 1-7.
- Kaufmann S. H. 2002. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61(II):ii54-ii8.
- Kaufmann S. H. 2002. How can Immunology Contribute to the control of tuberculosis. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61(II):ii54-ii8.
- Koksal D, Unsal E, Poyraz B, Kaya A, Savas H, Sipit T, *et al.* 2006. The value of serum interferon-gamma level in the differential diagnosis of active and inactive pulmonary tuberculosis. *Tuberk Toraks* ;54(1):17-21.
- Lalvani A, Sridhar S, von Reyn C F. 2013. Tuberculosis vaccines: time to reset the paradigm? *Thorax.* (68): pp. 1092-1094.
- Lawn S., Alimuddin. 2011. *Tuberculosis. Division of Infection and Immunity*, University College, London Medical School, London, UK. *The Lancet*, vol 378 (2011): p.57-72.
- Lee S. W, Chuang T. Y, Huang H. H, Lee K. F, Chen T. T. W, Kao Y. H, *et al.* 2015. Interferon gamma polymorphisms associated with susceptibility to tuberculosis in a Han Taiwanese population. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 48, 376-380
- Leung C. C, Wing W. Y, Chi K. C, Kwok C. C, Wing S. L, Shuk N. L, *et al.* 2014. Smoking adversely affects treatment response, outcome and relapse in tuberculosis. *ERJ Express.* pp. 1-8
- Liu C.H, Liu H, Ge B. 2017. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cellular & Molecular Immunology*; 14: 1-13

- Luna J. A. C. 2004. Pathogenesis of tuberculosis: infection and disease. *A Tuberculosis Guide for Specialist Physicians*. 5 : 50– 55.
- Maderuelo D. L. 2003. Interferon-g and Interleukin-10 Gene Polymorphisms in Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 167:970-5.
- Marwoto, Hani U, Vismayanti, Lismana, Prasetyo A A, Suradi, *et al*. 2015. Correlation of Single Nucleotide Polymorphism 35-Kb Upstream of HLA-C and Clinical Profile of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*.(9): DC10-DC13.
- Menon B, Nima G, Dogra V, Jha S. 2015. Evaluation of the radiological sequelae after treatment completion in new cases of pulmonary, pleural, and mediastinal tuberculosis. *Lung India*; Vol 32; Issue 3; p.241-5
- Micheletti V. C, Afrânio L. K, José Ueleres B. 2016. Clinical Features and Treatment Outcomes of Patients with Drug-Resistant and Drug- Sensitive Tuberculosis: A Historical Cohort Study in Porto Alegre, Brazil. *PLOS ONE*. 11(8). pp. 1-13.
- Murillo L. R, Salem RM. 2013. Insertion/Deletion Polymorphism. *Encyclopedia of Behavioral Medicine* ; 1076.
- National Tuberculosis Association of the USA. 1961. Diagnostic Standards & Classification of Tuberculosis. National Tuberculosis Association, New York, p.5-56
- Nhamoyebonde, S. and Leslie, A., 2014. *Biological differences between the sexes and susceptibility to tuberculosis*. The Journal of infectious diseases, 209(suppl_3), pp.S100-S106.
- North R J and Jung Y J. 2004. Immunity to Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. (22) : pp. 599-623.
- O'Leary S.M, Laura E. G, Frederick J. S, Eva M. P, Denise T, Mary P, Luke A. J. Joseph K. 2016. Cutting Edge: Mycobacterium tuberculosis Induces Aerobic Glycolysis in Human Alveolar Macrophages That Is Required for Control of Intracellular Bacillary Replication. *J Immunol March*. vol :196 (6). pp. 2444-2449.
- Orme I. 2004. Adaptive immunity to mycobacteria. *Curr opin immunol*; 7: 58 – 61
- Oxlade O, Murray M. 2012. Tuberculosis and Poverty: Why Are the Poor at Greater Risk in India? *PLOS ONE*. Vol 7; (11). pp. 1-8.
- Pacheco A. G, Cardoso C. C, Moraes M. O. 2008. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet*. 123:477–484
- Pando H. F. 2007. Immunology, Pathogenesis, and Virulency, Tuberculosis 2007.p. 157 – 189.
- Pathan A. A, Wilkinson K. A, Klenerman P, McShane H, Davidson R. N, Pasvol G, *et al*. 2001. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-

secreting CD4 T cells in Mtb-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol.* ;167(9):5217-25.

Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No 67 tahun 2016 tentang Penanggulangan Tuberkulosis. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Jakarta, pp 1-61.

Quesniaux V, Garcia I, Jacobs M, Ryffel B. 2012. Role of TNF in host resistance to tuberculosis infection: membrane TNF is sufficient to control acute infection. Dalam: Cardona, P. J. (ed.) *Understanding tuberculosis - analyzing the origin of Mtb pathogenicity*. Kroasia: InTech, p.237-9

Raja A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 120: 213-32.

Rabson A, Roitt IM, Delves PJ. 2005. Really Essential Medical Immunology, 2nd. London: *Blackwell Publishing*; 17-21.

Ralph A. P, Ardian M, Wiguna A, Maguire G. P, Becker N. G, Drogumuller G, Wilks M. J, *et al.* 2010. A simple, valid, numerical score for grading chest x-ray severity in adult smear-positive pulmonary tuberculosis. *Thorax*; 65:863e869. doi:10.1136/thx.2010, p.136-242

Raviglione M.C. 2015. Tuberculosis. In: Kasper D.L(Eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Nineteenth Edition. McGraw-Hill Education. New York; p.1102-21

Reinout V. C, Tom H. M. Ottenhoff, Jos W. M. van der Meer. 2002. Bawaan Immunity to Mtb. *Clin Microbiol Rev*: 15 ; 2. pp. 294-309.

Schaaf, Simon H., Zumla, Alimuddin. 2009. Tuberculosis: A Comprehensive Clinical Reference. Elsevier 2009. Pp 324-26

Schaaf H. S, Anthony P. M, Dheda K. 2009. Extensively Drug-resistant Tuberculosis in Africa and South America: Epidemiology, Diagnosis and Management in Adults and Children. *Clin Chest Med* (30): pp. 667–83.

Schamberger A. C, Claudia A. S, Nikica M. R, Oliver E. 2015. Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Sci Rep.* (5): pp. 63-81.

Schlossberg D. 2011. Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infection, Edisi Ke 6, Chapter 3, p.125-34

Selma WB, Harizi H, Bougmiza I, Hannachi N, Kahla IB, Zaieni R, *et al.* 2011. Interferon Gamma +874T/A Polymorphism Is Associated with Susceptibility to Active Pulmonary Tuberculosis Development in Tunisian Patients. *DNA and Cell Biology*. Volume 30, Number 6, Mary Ann Liebert, Inc. p. 379–387

Shafiani S, Tucker-Heard Gs, Kariyone A, Takatsu K, Urdahl KB. 2009. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *J Exp Med.* 209;207 (7) :1409-20.

- Sharma S. K, Turaga K. K, Balamurugan A, Saha P. K, Pandey R. M, *et al.* 2003. Clinical and genetic risk factors for the development of multi-drug resistant tuberculosis in non-HIV infected patients at a tertiary care center in India: a case-control study. *Infect Genet E.* 3, (3): 183-8.
- Shingadia D, Burgner D. 2008. Mycobacterium infection. Dalam: Taussig LM, Landau LI. *Pediatric Respiratory Medicine*, 2sd. Philadelphia : Mosby Elsevier; 597-614.
- Slama, K., Chiang, C.Y., Enarson, D.A. 2007. Tobacco and tuberculosis: a qualitative systematic review and meta-analysis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, vol. 11, no 10. Pp. 1049-61.
- Skold, Markus, Samuel Behar. 2003. Role of CD1d restricted NKT cells in microbial immunity. *American society for microbiology: infection and immunity*. vol. 71 no. 10, p.5447-55
- Sudarmo H. H, Burhan E, Prasetyo A. A, Suradi S, Reviono R. 2017. Association of Interferon- γ +874T/A and Interleukin-10 -1082G/A Gene Polymorphisms with MDR-TB Susceptibility and Culture Conversion. Poster Session. American Thoracic Society International Conference.
- Thorson A, Nguyen H. L, Lars O. L. 2007. Chest X-Ray Findings In Relation To Gender and Symptoms: A Study of Patients with Smear Positive Tuberculosis In Vietnam. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 39: pp. 33-37. Tian C, Zhang Y, Zhang J, Deng Y, Li X, Xu D, *et al.* 2011. The +874T/A polymorphism in the interferon- γ gene and tuberculosis risk: An update by meta-analysis. *Human Immunology* 72, p.1137-42
- Tolossa D, Girmay M, Mengistu L. 2014. Community knowledge, attitude, and practices towards tuberculosis in Shinile town, Somali regional state, eastern Ethiopia: a cross-sectional study. *Public Health*, vol 14 (804). pp. 1 – 13. Van der Wel N and Peters. 2007. Mtb and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell. P. J.* 2007;129:1287-98
- Vasantha R. M., Sudhakar G, Sridevi S. 2015. Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1 Polymorphism Susceptibility To Multi Drug Resistance Tuberculosis In South Indian Population: A Case –Control Study. *Int J Cur Res Rev.* (7): 32-35.
- Vasto S, Malavolta M, Pawelec G. 2006. Age and immunity. *Immunity & Ageing*;3(2)
- Vernal R, Garcia-Sanz JA. 2008. Th17 and Treg Cells, Two New Lymphocyte Subpopulations with a Key Role in the Immune Response Against Infection. *Infectious Disorders - Drug Targets*; 8(4):207-20.
- Wei Z., Wenhao S., Yuanyuan M., Yang L., Daming Z., Jiangchun X., Jijun J. 2017. A single nucleotide polymorphism in the interferon- γ gene (IFNG +874 T/A) is associated with susceptibility to tuberculosis. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 31), p: 50415-50429

- Welin A. 2011. Survival strategies of Mtb inside the human macrophage. Linköping University Medical Dissertations. No. 1223. p 1-90
- WHO. 2016. *WHO : Global Tuberculosis Report 2016*. Geneva. World Health Organization.p.36-158
https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ_Reports%2FG2%2FPROD%2FEXT%2FTBCountryProfile&ISO2=ID&LAN=EN&outtype=html)
- Yen Y. F, Yen M. Y, Lin Y. S, Lin Y. P, Shih H. C, Li L. H, Chou P, Deng C. Y. 2014. Smoking increases risk of recurrence after successful anti-tuberculosis treatment: a population-based study. *Int J Tuberc Lung Dis*. vol 18 (4): pp. 492-498.
- Yuwono T. 2005. Biologi Molekuler. Edisi 1. Bab 6: Organisasi Genom. *Penerbit Erlangga* : 75-92.
- Zuniga, J., Diana, T. G., Teresa, S. M., Tatiana, S. R. R., Granados, J. & Yunis, E. J. 2012. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012: 1-18.

