

PERINGATAN !!!

*Bismillaahirrahmaanirrahiim
Assalamu'alaikum warahmatullaahi wabarakaatuh*

1. Skripsi digital ini hanya digunakan sebagai bahan referensi
2. Cantumkanlah sumber referensi secara lengkap bila Anda mengutip dari Dokumen ini
3. **Plagiarisme** dalam bentuk apapun merupakan pelanggaran keras terhadap etika moral penyusunan karya ilmiah
4. Patuhilah etika penulisan karya ilmiah

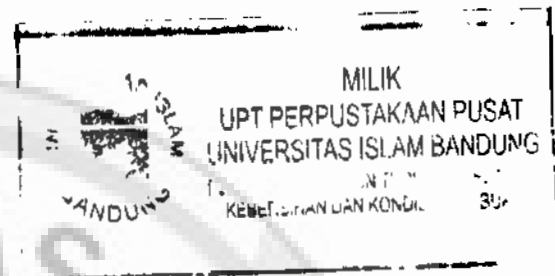
Selamat membaca !!!

Wassalamu'alaikum warahmatullaahi wabarakaatuh



UPT. PERPUSTAKAAN UNICBA

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN DISERTASI DOKTOR**



**PENGARUH MUTASI G1186A GEN *MACROPHAGE MANNOSE RECEPTOR*
TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-8 DAN *TRANSFORMING GROWTH*
FACTOR- β PADA PENDERITA TUBERKULOSIS PARU AKTIF DAN LATEN
SECARA EX VIVO**

17 6210

PENGUSUL

YANI TRIYANI, dr., SpPK., Mkes (NIDN 0430086802)

**UNIVERSITAS ISLAM BANDUNG
OKTOBER 2016**

HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN DISERTASI DOKTOR

Judul Penelitian : Pengaruh Mutasi G1186a Gen Macrophage Mannose Receptor Terhadap Kadar Interleukin-8 dan Transforming Growth Factor- β Pada Penderita Tuberkulosis Paru Aktif dan Laten Secara Ex Vivo

Judul Disertasi : Hubungan Polimorfisme Gen Macrophage Mannose Receptor, Kadar Interleukin-8 dan Transforming Growth Factor- β Terhadap Kejadian Tuberkulosis Paru

Kode>Nama Rumpun Ilmu Peneliti : 307/ Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis

a. Nama Lengkap : Yani Triyani, dr., SpPK, M.Kes

b. NIDN : 0430086802

c. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli

d. Program Studi : Program Pendidikan Sarjana Kedokteran

e. Nomor HP : 085724507397

f. Alamat surel (e-mail) : y3yani78@gmail.com

g. NIM : 130130110021

h. Semester ke : 8

PT Penyelenggara : Universitas Padjadjaran

Program Doktor : Ilmu Kedokteran

Nama Promotor : Prof.Dr.Nanan Sekarwana, dr.,SpA(K), MARS

NIP Promotor : 194911041976111001

Biaya yang diusulkan : Rp. 50.000.000,-

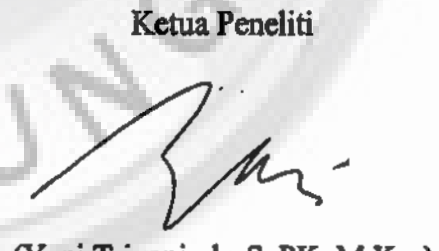
Bandung, 10 Oktober 2016

Mengetahui
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Islam Bandung



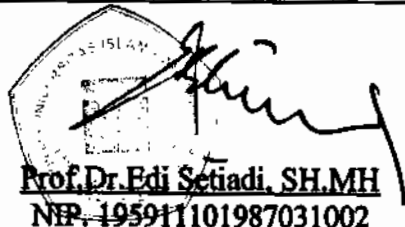
Prof. Dr. Ieva B. Akbar, dr. AIF
NIK D.09.0.506

Ketua Peneliti



(Yani Triyani, dr., SpPK, M.Kes)
NIK D 03.0.378

Mengetahui
Ketua LPPM Universitas Islam Bandung



Prof. Dr. Edi Setiadi, SH.MH
NIP. 195911101987031002

RINGKASAN

Variasi genetik pada gen *Macrophage Mannose Receptor (MMR)/ Mannose Receptor C type 1 (MRC-1)* yang menyandi MMR dan berlokasi pada kromosom 10p12 yang terdiri dari 30 exon, berhubungan dengan kejadian TB paru. Penelitian sebelumnya menemukan dari 6 *Single nucleotide polymorphisms (SNPs)* exon 7 pada gen *MMR*, dan pada situs G1186A dan T1212C tempat terjadinya polimorfisme yang terbanyak pada kelompok penderita TB paru aktif dan TB laten ($P = 0.037$; $OR = 0.76$; $95\% CI, 0.58-0.98$). Penelitian ini sebagai lanjutan untuk mengetahui pengaruh mutasi gen *MMR* situs G1186A terhadap kadar interleukin-8 dan *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) pada penderita TB paru aktif dan TB laten dengan induksi *M. Tuberculosis (Mtb)* nonpatogen (vaksin BCG) dan *Mtb* patogen (*strain* Beijing dan Non Beijing) secara *ex vivo* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Padjadjaran Bandung, dengan harapan dapat menjadi tambahan dasar mekanisme terjadinya kerentanan menderita penyakit TB.

Kegunaan akademis penelitian ini diantaranya memberikan informasi pengaruh mutasi G1186A gen *MMR* terhadap kadar IL-8 dan TGF- β pada penderita TB paru aktif dan TB laten.

Kegunaan praktis sebagai informasi pengaruh peranan reseptor makrofag dalam mengenali antigen manosylated, sebagai awal mekanisme jalur obat anti TB yang intraseluler.

Kadar IL-8 dengan stimulasi Nil, *Mtb* Non Beijing, dan *Mtb* Beijing lebih tinggi pada kelompok yang mengalami mutasi gen *MMR* situs G1186A dibanding dengan yang tidak. Namun kadar IL-8 dengan stimulasi *Mtb* nonpatogen lebih rendah pada kelompok yang mengalami mutasi gen *MMR* situs G1186A dibanding yang tidak. Terdapat perbedaan kadar TGF- β dengan stimulasi *Mtb* nonpatogen antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami mutasi gen *MMR* dengan nilai median (minimum-maksimum) 934,3 (169–4.322,4) pg/mL dan 1.422,5 (129–3.284) pg/mL dengan nilai $p=0,343$. Terdapat perbedaan kadar TGF- β dengan stimulasi *Mtb* patogen virulen (*strain* Non Beijing) antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami mutasi gen *MMR* dengan nilai median (minimum-maksimum): 1.294,25 (201,7–4.322,4) pg/mL dan 1.175,5 (12,1–4.322,4) pg/mL dengan nilai $p=0,751$

Simpulan penelitian Mutasi gen *MMR* situs G1186A berpengaruh terhadap kadar IL-8 dan TGF- β dengan pelbagai stimulasi antigen *Mtb* namun tidak bermakna secara statistik. Pada kelompok dengan stimulasi *Mtb* Beijing Kadar IL-8 dan TGF- β menunjukkan kecenderungan berhubungan dengan kejadian TB paru (nilai $p=0,065$) di Bandung.

Kata kunci: gen *MMR* situs G1186A, IL-8, TGF- β , TB paru aktif dan TB laten

PRAKATA

Segala puji dan syukur yang tiada habisnya penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhaanahuwata'ala yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga Penelitian Hibah Disertasi Doktor dapat dilakukan sampai dengan 100%.

Penelitian Hibah Disertasi Doktor yang berjudul “Pengaruh Mutasi G1186a Gen *Macrophage Mannose Receptor* Terhadap Kadar Interleukin-8 Dan *Transforming Growth Factor-B* Pada Penderita Tuberkulosis Paru Aktif Dan Laten Secara *Ex Vivo*” disusun untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar doktor pada Program Pendidikan Doktor, Universitas Padjadjaran, Bandung. Topik dengan judul ini dipilih karena sampai saat ini Tuberkulosis (TB) yaitu penyakit kronik yang disebabkan oleh spesies *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) masih menjadi masalah di dunia. Hubungan polimorfisme gen *MMR* dengan kejadian TB aktif belum pernah diteliti di Indonesia. Berdasarkan hal tersebut penulis bermaksud melakukan penelitian dengan judul di atas.

Penelitian ini dapat terlaksana dengan bantuan dan kerjasama berbagai pihak. Hasil penelitian telah dibuat dalam bentuk laporan dan artikel untuk dipublikasikan pada jurnal terakreditasi nasional dan jurnal internasional

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah memberikan dukungan berupa dana penelitian. Rasa terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya haturkan kepada unit penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung, yang terhormat Prof. Dr. Nanan Sekarwana, dr., Sp.A(K), MARS selaku Ketua Tim Promotor yang telah mencurahkan banyak perhatian, Kepada para pasien Klinik TB Laten RSP FK Unpad dan keluarganya, kepada tim Pusat studi TB-HIV, tim kerja *Home visite*, tim di Laboratorium Imunologi RSP Unpad, tim di Laboratorium Biologi Molekular Patologi Klinik RSHS, dan tim di Laboratorium Imunoserologi Patologi Klinik RSHS, Dekan Fakultas Kedokteran FK Unisba dan LPPM Unisba atas kerjasamanya.

Akhirnya mudah-mudahan penelitian ini dapat memberikan manfaat yang sebanyak-banyaknya dan semoga kita semua senantiasa berada dalam ridlo, rahmat, dan kasih sayang Allah Swt. Amiin Ya Robbal Aalamiin.

Bandung
Oktober 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN SAMPUL	1
HALAMAN PENGESAHAN	2
RINGKASAN	3
PRAKATA	4
DAFTAR ISI	5
DAFTAR TABEL	6
DAFTAR GAMBAR	7
DAFTAR LAMPIRAN	8
BAB 1. PENDAHULUAN	9
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	14
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	19
BAB 4. METODE PENELITIAN	19
BAB 5. HASIL YANG DICAPAI	21
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	38
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	44

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Nanodrop Jumlah Protein Antigen Mtb Hasil Sonikasi	27
Tabel 5.2 Karakteristik Subjek Penelitian yang Dilakukan Pemeriksaan Sitokin ...	33
Tabel 5.3 Kadar Sitokin Proinflamasi IL-8 dengan Beberapa Stimulasi	34
Tabel 5.4 Kadar Sitokin Anti inflamasi TGF- β dengan Beberapa Stimulasi.....	34
Tabel 5.5 Kadar Sitokin Proinflamasi IL-8 dengan Beberapa Stimulasi dari Kelompok Non Mutasi dan Mutasi pada Gen <i>MMR</i> situs G1186A.....	36
Tabel 5.6 Kadar Sitokin Proinflamasi TGF- β dengan Beberapa Stimulasi dari Kelompok Non Mutasi dan Mutasi pada Gen <i>MMR</i> situs G1186A	37
Tabel 5.7 Variabel yang mempengaruhi kejadian TB Paru Aktif	38

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar Skema Alur Penelitian	22
Gambar 5.1 Isolat Mtb Frozen Bioarchive.....	24
Gambar 5.2a Media Subkultur Mtb b Hasil Subkultur Isolat Mtb Setelah 2 minggu.....	24
Gambar 5.3 Alat Sonikasi Mtb	25
Gambar 5.4 Hasil Subkultur Mtb Setelah Disonikasi 1 Bulan.....	26
Gambar 5.5 Nanodrop.....	28
Gambar 5.6 Grafik Hasil Optimasi Pemeriksaan Kadar Sitokin IL-8 dan TGF-B Pada Darah Donor dengan Stimulasi Mtb Non Beijing Cluster No. 6 (6400016).....	29
Gambar 5.7 Grafik Hasil Optimasi Pemeriksaan Kadar Sitokin IL-8 dan TGF-B Pada Darah Donor dengan Stimulasi Mtb Non Beijing Cluster No.4 (6400030).....	29
Gambar 5.8 Grafik Hasil Optimasi Pemeriksaan Kadar Sitokin IL-8 dan TGF-B Pada Darah Donor dengan Stimulasi Mtb Beijing Cluster No. 10 (6400034).....	30
Gambar 5.9 Grafik Hasil Optimasi Pemeriksaan Kadar Sitokin IL-8 dan TGF-B Pada Darah Donor dengan Stimulasi Mtb Beijing Cluster No. 11 (6400220).....	30
Gambar 5.10. Skema Alur Pemilihan Subjek Penelitian Keseluruhan.....	32
Gambar 5.9 Skema Alur Penelitian Hibah Doktorat.....	33

DAFTAR LAMPIRAN

Buku Disertasi "Hubungan Polimorfisme Gen *Macrophage Mannose Receptor*, Kadar Interleukin-8 dan *Transforming Growth Factor β* Dengan Kejadian Tuberkulosis Paru"

Artikel "Single Nucleotide Polymorphisms (Snps) Of *Macrophage Mannose Receptor Gene* As Protective Factor Of Active Pulmonary Tuberculosis In Bandung" (Rencana Submitted ke "Journal International Tropical Life Sciences Research")

Artikel "Optimasi Pemeriksaan Interleukin-8 dan *Transforming Growth Factor β* Metode *Whole Blood Stimulating Assay* dengan Induksi *M.tuberculosis* Patogen dan Nonpatogen" (Masih revisi, Rencana Publikasi Jurnal Nasional terakreditasi "Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory" 2017)

Atikel "Hubungan Mutasi Gen *Macrophage Mannose Receptor* Situs G1186A dengan Kadar Interleukin-8 dan *Transforming Growth Factor β* Metode *Whole Blood Stimulating Assay* dengan Induksi *M.tuberculosis* Patogen dan Nonpatogen" (Masih revisi, Rencana Publikasi Jurnal Nasional terakreditasi "Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory" 2017)

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit kronis yang disebabkan oleh spesies *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) yang terdiri dari *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae* dan *M. pinnipedii*. Dari spesies MTBC tersebut *M. tuberculosis* merupakan salah satu penyebab utama kematian di dunia (Forrellad et al., 2013). Berdasarkan laporan *World Health Organization* (WHO) tahun 2013, ditemukan sekitar 3,5 juta kasus baru, 480.000 orang setiap tahunnya meninggal karena kasus tersebut dan sekitar satu-pertiga (2 milyar) dari penduduk dunia terinfeksi TB dengan tanpa gejala (TB laten). Indonesia dengan penduduk sekitar 245 juta sekarang berada pada ranking keempat negara dengan beban TB tertinggi di dunia setelah India, China dan Bangladesh. Estimasi prevalensi, insidensi dan angka kematian TB per tahun sebesar 281.187 dan 27 per 100.000 penduduk pada tahun 2011 (WHO, 2013).

Infeksi TB dimulai pada saat seseorang terhirup *droplet nuclei* yang mengandung *M. tuberculosis*. Kemudian struktur patogen *M. tuberculosis* yang disebut *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) dikenali oleh reseptor-reseptor pada sistem imun bawaan yang disebut *pattern recognition receptors* (PRRs) yang diekspresikan pada banyak sel efektor seperti makrofag, sel dendritik, sel limfosit T dan B (Kleinnijenhuis et al., 2011).

Respon imun pejamu terhadap *M. tuberculosis* sangat kompleks, karena struktur dinding sel *M. tuberculosis* mengandung 50-60% lipid hidrofobik dan kompleks. *Mannose-capped lipoarabinomannan* (Man-LAM) adalah komponen dinding sel *M. tuberculosis* yang paling virulen dan keunikannya komposisi struktur komponen ini berbeda-beda antara *Mycobacterium* patogen (yang virulen dan hipervirulen) dan non patogen, hal ini dianggap sebagai aspek penting dari perbedaan patogenesis pada respon imun pejamu (Forrellad et al., 2013)

Kehadiran ManLAM pada permukaan dinding sel *Mycobacterium* terutama dikenali oleh pejamu melalui reseptor utama yaitu *Macrophage Mannose Receptor* (MMR) dan *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3 Grabbing Non integrin* (DC-SIGN) (Neyrolles and Guilhot, 2011). Keunikan MMR dibandingkan reseptor lain adalah reseptor ini mampu mengenali struktur *lipoglycoconjugate mannosylated* atau polisakarida dari *M. tuberculosis* patogen yang kaya akan ManLAM dan tidak mengenali struktur

polisakarida *M. tuberculosis* non patogen atau yang hipervirulen karena mengandung sedikit ManLAM dan kaya akan *phosphatidyl-myo-inositol mannosides* (PIMs), *Mannose-capped lipoarabinomannan* (Man-LAM) selama proses fagositosis merupakan komponen kunci yang mampu menghambat fusi *phagosome-lisosom*. Penghambatan fusi *phagosome-lisosom* tidak terjadi apabila PAMPs selain ManLAM seperti *phosphatidylinositol-capped lipoarabinomannan* masuk ke dalam tubuh pejamu melalui ikatan dengan Fc reseptor atau DC-SIGN (Torrelles JB and LS, 2010).

Setelah terjadinya ikatan antara antigen *M. tuberculosis* dan makrofag alveolar yang terinfeksi kemudian akan dihasilkan sitokin dan kemokin yang dihasilkan oleh makrofag alveolar, sel Dendritik, sel Limfosit T ($TC\Delta 4^+$, $TC\Delta 8^+$, $T\gamma\delta$) yaitu sitokin *pro inflammatory* antara lain *tumor necrosis factor α* (TNF- α), keluarga *inter leukin* (IL)-1 yaitu (IL-1 β , IL-18), IL-2, IL-12, IL-18 dan INF γ , dengan kemokin (IL-8, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *macrophage inflammatory protein-1 alpha* (MIP-1 α), sedangkan sitokin *antiinflammatory* yang dikeluarkan adalah IL-10 dan *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) (Sahiratmadja et al., 2007) (Kleinnijenhuis et al., 2011). Interaksi antara respon imun pejamu dan mekanisme pertahanan yang dilakukan oleh *M. tuberculosis* menyebabkan keseimbangan antara produksi sitokin dan kemokin pro dan anti inflamasi inilah yang berperan dalam patogenesis infeksi TB (Nicod, 2007). Terdapat beberapa kemungkinan hasil akhir respon imun setelah seseorang terinfeksi TB, kemungkinan pertama, *M. tuberculosis* yang masuk ke paru-paru dapat langsung dihancurkan oleh respon imun alamiah (sekitar 5-10% kasus). Kemungkinan kedua, sebagian besar (sekitar 90-95%) akan berkembang menjadi infeksi TB laten atau dalam keadaan subklinis tanpa gejala, tidak menularkan kepada orang lain dan tes kulit tuberkulin positif. Kemungkinan ketiga, sebagian (5-10%) yang mengalami infeksi TB laten dapat berkembang menjadi penyakit TB aktif dengan gejala-gejala kerusakan jaringan dalam jangka waktu tertentu (umumnya 1-3 tahun), hal ini sangat tergantung keseimbangan antara sistem imun pejamu dan strategi pertahanan *M. tuberculosis*. Dengan adanya koinfeksi HIV-TB, reaktivasi dari TB laten menjadi aktif meningkat sekitar 50% (Kleinnijenhuis et al., 2011, Zhang et al., 2012).

Reaktivasi TB laten akan bertambah besar lagi jumlahnya dengan adanya faktor-faktor lain seperti halnya mutasi berbagai gen pada kedua belah pihak yaitu pada *M. tuberculosis* dan pejamu seperti pada gen penyandi PRRs dengan salah satunya MMR, *Diabetes mellitus*, paparan rokok, alkoholisme, penggunaan obat immunosupresi, polusi dan

infeksi kecacingan (Azad et al., 2012, Inoue et al., 2013). Berdasarkan studi meta analisis Qidwai diperkirakan terdapat sekitar 275 *Single nucleotide polymorphism* (SNP) yang berlokasi pada 19 gen yang berperan dalam memengaruhi struktur protein, dan berpengaruh terhadap kerentanan seseorang menjadi terinfeksi TB (Qidwai et al., 2012a). Selain itu terdapat juga meta analisis dari Azad yang menjelaskan bahwa terdapat lebih dari 50 gen yang berpengaruh terhadap kerentanan seseorang untuk mengalami penyakit TB. Penelitian tersebut di atas, berhipotesis bahwa gen memainkan peran penting dalam kerentanan terhadap kejadian infeksi TB melalui perubahan ekspresi dari protein, namun pada meta analisis di atas masih sedikit penelitian tentang adanya variasi genetik/ mutasi gen MMR (Azad et al., 2012).

Pada tahun 2012 Zhang dkk melaporkan pertama kali di China bahwa variasi genetik pada gen *Macrophage Mannose Receptor (MMR)/ Mannose Receptor C type 1 (MRC-1)* yang menyandi MMR dan berlokasi pada kromosom 10p12 yang terdiri dari 30 exon, berhubungan dengan kejadian TB paru. Penelitian ini melibatkan 222 orang penderita TB dan 232 orang sehat sebagai kontrol, dari 6 *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) exon 7 pada *MMR* (G1186A, G1195A, T1212C, C1221G, C1303T dan C1323T) ditemukan hanya pada alel G1186A (rs34039386) tempat terjadinya mutasi yang bermakna pada kedua kelompok tersebut ($P = 0.037$; OR = 0.76; 95% CI, 0.58-0.98) (Zhang et al., 2012).

Peranan mutasi gen MMR exon 7 sebelumnya pernah dilakukan di berbagai penelitian antara lain terhadap kerentanan infeksi *M. leprae* di Vietnam dan Brazil, (Alter et al., 2010) terhadap kerentanan penyakit asma (Hattori et al., 2009a) dan terhadap kerentanan penyakit Sarcoidosis (Hattori et al., 2010a).

Telah banyak diteliti tentang berbagai variasi genetik yang berhubungan dengan kerentanan terhadap terjadinya infeksi TB baik di luar negeri maupun di Indonesia (Png et al., 2012, Qidwai et al., 2012b, Pakasi et al., 2012). Namun belum pernah dilaporkan penelitian tentang pengaruh variasi genetik/ mutasi gen MMR dihubungkan dengan kerentanan terjadinya TB paru di Indonesia khususnya Rumah Sakit Pendidikan Universitas Padjadjaran Bandung.

Berdasarkan hal tersebut, peneliti telah melakukan penelitian untuk mengetahui peranan genotipe 6 SNPs exon 7 pada gen *MMR* (G1186A, G1195A, T1212C, C1221G, C1303T dan C1323T) terhadap kerentanan TB paru pada kelompok kasus penderita TB paru aktif dan kelompok kontrol penderita TB laten menggunakan PCR dan sekuensing DNA, pada tahun 2014. Penelitian ini menggunakan metode kasus kontrol. Data hasil sekuensing dianalisis proporsinya dan dihitung odd rasionya untuk tiap jenis mutasi dan

tiap titik, sedangkan analisis bivariat dengan menggunakan uji *chi-square*. Penelitian dilakukan sejak bulan Februari-Oktober 2014, diperoleh 78 orang kelompok kontrol dan 55 orang kelompok kasus yang memenuhi kriteria inklusi. Ditemukan bahwa frekuensi alel G1186A (rs34039386) dari gen *MMR* pada kelompok TB paru aktif adalah 46,15% dan kelompok kontrol TB laten 38,18%. Analisis genotipe menunjukkan bahwa genotipe AG pada TB paru aktif dan laten merupakan genotype dengan frekuensi yang paling tinggi dibandingkan dengan 5 SNP lain yaitu G1195A (1,92% dan 1,82%), T1212C (8,33% dan 24,55%), C1221G (1,28% dan 0,91%), C1303T (1,28% dan 2,73%) dan C1323T (0% dan 1,82%). Kesimpulan penelitian ini Terdapat 6 SNPs exon 7 pada gen *MMR* yaitu G1186A, G1195A, T1212C, C1221G, C1303T dan C1323T. Terdapat hubungan antara SNPs exon 7 pada gen *MMR* G1186A dengan kejadian kejadian TB paru aktif, dengan OR = 2,5 ($P = 0,107$) yang menunjukkan bahwa mutasi *MMR* G1186A lebih sering terjadi pada pasien TB paru sebesar 250 % dibandingkan TB laten.

Berdasarkan uraian tersebut di atas dan diperkuat kenyataan bahwa belum terdapatnya penelitian tentang peranan mutasi gen *MMR* dengan perubahan kadar sitokin pro dan *antiinflammatory* pada orang Indonesia, maka diperlukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh mutasi gen *MMR* G1186A terhadap kadar interleukin-8 dan TGF- β pada penderita TB paru aktif dan TB laten dengan induksi *M. tuberculosis* secara *ex vivo* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Padjadjaran Bandung, dengan harapan dapat menjadi tambahan dasar mekanisme terjadinya kerentanan penderita penyakit TB.

1.2 Rumusan Masalah

Terdapat beberapa rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Apakah mutasi G1186A gen *MMR* berpengaruh terhadap kadar IL-8 dan TGF- β pada penderita TB paru aktif dan TB laten?
2. Pada kelompok mana terdapat perbedaan kadar IL-8 dan TGF- β yang paling bermakna?

1.4 Urgensi (Keutamaan Penelitian)

Kerentanan seseorang terhadap *M. tuberculosis* sangat bergantung pada sistem imun penderita, dimana terdapat 2 hal yang paling mendasari yaitu pengenalan *M. tuberculosis* sebagai benda asing dan bagaimana tubuh merespon *M. tuberculosis*. Kedua faktor diatas dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah gen-gen yang mengkode reseptor pada monosit/ makrofag.

Kadar sitokin yang dihasilkan oleh monosit akan mempengaruhi respon tubuh terhadap kerentanan dan keberhasilan pengobatan TB sehingga diperlukan pemahaman yang komprehensif mengenai peranan sitokin pro inflamasi IL-8, serta sitokin anti inflamasi TGF- β pada patogenesis molekuler dan diagnosis penyakit TB paru serta hubungannya dengan mutasi G1186A gen MMR.

1.5 Hasil yang Diharapkan (Luaran)

Ditemukannya Patogenesis molekuler TB sebagai landasan strategi pengelolaan penyakit TB Paru di klinik.

1. Aspek Ilmiah

Dapat mengungkap patogenesis molekuler penyakit TB yang dapat menjadi landasan faktor predisposisi, diagnosis dan prognosis.

Akan dapat ditemukan mekanisme obat antituberkulosis pendekatan mekanisme ligan MMR dengan bahan nano partikel *mannosylated* antituberkulosis yang dapat menjadi landasan *drug discovery* pengobatan penyakit TB di kemudian hari.

2. Disertasi

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian disertasi yang berjudul Hubungan Mutasi Gen *Macrophage Mannose Receptor*, Kadar IL-8 Dan *Transforming Growth Factor-B* Terhadap Kejadian Tuberkulosis Paru

3. Jurnal internasional

Direncanakan publikasi pada *International Journal of Biological Science* dan Publikasi berupa presentasi dan poster pada seminar International.

4. Hak Paten

- Rancangan Primer spesifik Gen *Macrophage Mannose Receptor* sebagai dasar sekuensing DNA gen MMR.
- *Drug discovery* mekanisme ligan MMR dengan bahan nano partikel *mannosylated* antituberkulosis yang dapat membasmi *M. tuberculosis dormant*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Mycobacterium adalah bakteri penyebab kematian penyakit infeksi terbesar di dunia yang mempunyai keunikan karena komponen komposisi struktur dinding selnya yang berbeda-beda antara *Mycobacterium* patogen dan non patogen, hal ini dianggap sebagai aspek penting dari perbedaan patogenesis pada respon imun pejamu. Respon imun pejamu terhadap *M. tuberculosis* terjadi setelah adanya ikatan *M. tuberculosis* dengan *pattern recognition receptors* (PRRs) yang terlibat dalam mengenali stuktur dinding sel *M. tuberculosis*, dengan *Macrophage Mannose Receptor* (MMR) yang utama mengenali ManLAM sebagai *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). Pengenalan imunitas terhadap komponen utama *M. tuberculosis* berupa ManLAM melalui MMR menyebabkan tersambungannya jembatan antara imunitas alamiah dan bawaan, dengan mengatur jalur endosomal dan fagosomal serta produksi sitokin *pro inflammatory* yang paling penting adalah *interleukin* (IL)-8, dan sitokin *anti inflammatory* yang dikeluarkan adalah TGF- β . Interaksi antara respon imun pejamu dan mekanisme pertahanan yang dilakukan oleh *M. tuberculosis* menyebabkan keseimbangan antara produksi sitokin pro dan anti inflamasi inilah yang berperan dalam patogenesis infeksi TB, dengan hasil akhir respon imun tersebut, yaitu *M. tuberculosis* dapat langsung dihancurkan oleh respon imun alamiah (sekitar 5-10% kasus) sehingga seseorang tetap sehat, berkembang menjadi infeksi TB laten (sekitar 90-95%). Sebagian (5-10%) dari TB laten dapat berkembang menjadi penyakit TB aktif dengan gejala-gejala kerusakan jaringan (Kleinnijenhuis et al., 2011).

Dengan adanya koinfeksi HIV-TB, reaktivasi dari TB laten menjadi aktif meningkat sekitar 50%, demikian juga halnya dengan adanya faktor-faktor lain seperti mutasi pada kedua belah pihak yaitu pada *M. tuberculosis* dan pejamu seperti halnya pada MMR. Namun masih belum jelas apakah terdapat hubungan adanya mutasi pada gen MMR yang berlokasi pada kromosom 10p12 dan exon 7 dan perubahan kadar sitokin (IL-8 dan TGF- β). Faktor genetik tertentu diperkirakan terlibat dan memainkan peran penting dalam kekebalan bawaan dan kerentanan terhadap TB pada tingkat individu. Beberapa studi genetik menunjukkan bahwa faktor genetik dari host dan MTB, serta faktor lingkungan berhubungan dengan patofisiologi TB. (Zhang et al., 2012) Berdasarkan hal tersebut, identifikasi gen yang mempengaruhi kerentanan terhadap TB menjadi banyak dipelajari belakangan ini.

Macrophage Mannose Receptor (MMR) pertama kalinya pada tahun 1970 diidentifikasi pada makrofag alveolar kelinci sebagai 175 kDa reseptor transmembran yang mengenali enzim lisosomal glikosilasi dan rantai sakarida *mannose, fucose* atau *N-*

asetilglukosamin. Karakteristik MMR, merupakan protein yang mampu mendaur ulang antara membran plasma dan aparat endosomal, serta mampu mengenali struktur ManLAM yang merupakan antigen paling virulen dari *M. tuberculosis* dan tidak mengenali struktur PAMPs yang tidak atau sedikit kandungan ManLAMnya. (Torrelles JB and LS, 2010, Schlesinger et al., 2008, Fukuda et al., 2013) Gen MMR adalah suatu gen yang menyandi protein MMR yang berfungsi untuk mengenali struktur karbohidrat kompleks pada glikoprotein dari beberapa proses biologis, termasuk pengakuan sel-sel, glikoprotein serum, dan netralisasi patogen. Protein yang dikode oleh gen ini (MMR) adalah reseptor membran tipe I yang memediasi endositosis glikoprotein oleh makrofag. *Macrophage Mannose Receptor* mampu mengikat struktur *high-mannose* pada permukaan mikroorganisme yang berpotensi patogen, baik virus, bakteri, dan jamur sehingga mereka dapat dinetralkan oleh proses fagositosis. Selain itu MMR berfungsi sebagai media yang menjembatani respon imun alamiah dengan adaptif, sehingga dipertimbangkan sebagai target kandidat vaksin (Keler et al., 2004, Taylor et al., 1990).

Gen MMR/ MRC1 berdasarkan data *NCBI Bioinformatic Gene Bank*, berlokasi pada kromosom 10p 12,33 dengan panjang 448 pasangan basa.

Terdapat beberapa penelitian yang menjelaskan peranan mutasi gen MMR, antara lain:

Penelitian Hattori tahun 2009 menjelaskan bahwa terdapat peranan variasi genetik gen MMR/ MRC-1 terhadap kerentanan penyakit asma pada populasi etnis Jepang (Subjek penelitian 870 orang, 446 orang asmatis dan 424 orang kontrol). dan Afrika-Amerika (Subjek penelitian 176 orang, 86 orang asmatis dan 90 orang kontrol). Analisis SNP yang bermakna pada 2 *haplotype* (rs692527 dan rs1926736) dari 7 SNP yang dianalisis (SNPs; rs2477637, rs2253120, rs2477631, rs2477664, rs692527, rs1926736, and rs691005) (Hattori et al., 2009b).

Penelitian Alter dkk tahun 2010 melakukan pemeriksaan variasi genetik pada 12 genotif gen MMR/ MRC-1 dan gen IFN γ pada populasi *Han Chinese* yang menderita *Leprosy* sebanyak 527 orang dan sebagai kontrol sebanyak 583 orang sehat dari Yunnan China. Hasil penelitian ini adalah ditemukan variasi genetik MRC-1 pada kromosom 10p exon 7 rs692527 ($P = 0.022$) and rs34856358 ($P = 0.022$) berhubungan dengan kejadian *paucibacillary leprosy*, dan variasi gen IFN γ rs3138557 secara bermakna berhubungan dengan kejadian *multibacillary leprosy*. Namun diperlukan penelitian lebih lanjut untuk lebih tepat memahami peranan gen MRC1 dan IFN γ dalam terhadap kerentanan penyakit lepra (Alter et al., 2010).

Penelitian Hatori pada tahun 2010 bertujuan mengetahui variasi genetik gen MMR/MRC-1 terhadap kerentanan penyakit Sarcoidosis, dengan menganalisis 9 SNP pada 605 orang Jepang dengan 181 orang berpenyakit Sarcoidosis dan 424 orang sehat. Dari hasil penelitian ini diperoleh variasi rs691005 SNP dan terdapat hubungan yang bermakna antara variasi genetik gen MMR dengan risiko kejadian Sarcoidosis tanpa mempertimbangkan jenis kelamin dan umur ($P = 0.001$) (Hattori et al., 2010b).

Penelitian Zhang dkk tahun 2012 melaporkan pertama kali di China bahwa variasi genetik pada gen MMR/MRC-1 yang mengkode MMR dan berlokasi pada kromosom 10p12 yang terdiri dari 30 exon, berhubungan dengan kejadian TB paru. Penelitian ini melibatkan 222 orang penderita TB dan 232 orang sehat sebagai kontrol, dari 6 *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) exon 7 pada MMR (G1186A, G1195A, T1212C, C1221G, C1303T dan C1323T) ditemukan hanya pada alel G1186A (rs34039386) tempat terjadinya mutasi yang bermakna pada kedua kelompok ($P = 0.037$; OR = 0.76; 95% CI, 0.58-0.98) (Zhang et al., 2012).

Peneliti telah melakukan penelitian secara bertahap pada bulan November 2014–Januari 2015 untuk mengetahui peranan genotipe 6 SNPs exon 7 pada gen MMR terhadap kerentanan TB paru pada kelompok kasus penderita TB paru aktif dan kelompok kontrol penderita TB laten menggunakan PCR dan sekuensing DNA. Tahap 1, dilakukan optimasi penggunaan primer PCR hasil perancangan peneliti sebelumnya di China dan hasil perancangan peneliti di Lab Biomol Patologi klinik RSHS Bandung dan kemudian menilai hasil sekuensing DNA gen MMR nya. Tahap 2 penelitian dilakukan metode kasus kontrol sekuensing DNA gen MMR menggunakan primer hasil perancangan peneliti pada kelompok kasus dan kontrol. Distribusi hasil sekuensing DNA tersebut, dianalisis menggunakan *software DNA baser* pada 6 SNPs exon 7 gen MMR sesuai dari informasi penelitian sebelumnya (G1186A, G1195A, T1212C, C1221G, C1303T dan C1323T). Data hasil sekuensing dianalisis proporsinya dan dihitung odd rasionya untuk tiap jenis mutasi dan tiap titik, sedangkan analisis bivariat dengan menggunakan uji *chi-square*. Sejak bulan Februari–Oktober 2014, diperoleh 78 orang kelompok kontrol dan 55 orang kelompok kasus yang memenuhi kriteria inklusi. Ditemukan bahwa frekuensi alel G1186A (rs34039386) dari gen MMR pada kelompok TB paru aktif adalah 46,15% dan kelompok kontrol TB laten 38,18%. Analisis genotipe menunjukkan bahwa genotipe AG pada TB paru aktif dan laten merupakan genotipe dengan frekuensi yang paling tinggi dibandingkan dengan 5 SNP lain yaitu G1195A (1,92% dan 1,82%), T1212C (8,33% dan 24,55%), C1221G (1,28% dan 0,91%), C1303T (1,28% dan 2,73%) dan C1323T (0% dan

1,82%). Kesimpulan penelitian ini Terdapat 6 SNPs exon 7 pada gen *MMR* yaitu G1186A, G1195A, T1212C, C1221G, C1303T dan C1323T. Terdapat hubungan antara SNPs exon 7 pada gen *MMR* G1186A dengan kejadian kejadian TB paru aktif, dengan OR = 2,5 ($P = 0,107$) yang menunjukkan bahwa mutasi *MMR* G1186A lebih sering terjadi pada pasien TB paru sebesar 250 % dibandingkan TB laten.

Berdasarkan literatur dijelaskan bahwa setelah terjadinya ikatan antara *MMR* dan komponen patogen akan meregulasi pengeluaran sitokin IL-10, *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), IL-4, dan IL-13 yang meningkatkan ekspresi makrofag *alternatively-activated* dan menjadikan makrofag tidak aktif serta menghambat IL-12 dan aktivitas NADPH oksidase. Selain sitokin *anti-inflammatory* ikatan *MMR* tersebut menghasilkan sitokin *pro-inflammatory* IFN- γ yang menstimulasi makrofag *classical activation* sehingga makrofag menjadi reaktif. Regulasi *MMR* ini menyebabkan kerusakan pejamu dapat dikurangi dan inflamasi dapat diatasi. Oleh karena itu, *MR* dilaporkan menghambat enzim lisosom *myeloperoxidase* dan aktivator jaringan plasminogen yang dikeluarkan neutrofil pada fase awal inflamasi. Namun dilain pihak peran *MMR* adalah menghambat terjadinya pematangan *phagosome* dan fusi *phagosome-lisosome*, sehingga proses fagositosis terganggu, fungsi mikrobisidal, produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) menurun, peran *Antigen Presenting Cell* (APC) melalui *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-I dan MHC-II juga terhambat sehingga mikroorganisme dapat bertahan hidup di dalam makrofag (Gordon and Taylor, 2005, Gazi, 2010, Welin, 2011, Kang et al., 2005). Berdasarkan mekanisme tersebut, memperlihatkan bahwa ikatan antara *MMR* dan ManLAM yang merupakan PAMP dari *M. tuberculosis* berperan dalam patogenesis terjadinya kondisi TB laten. Berdasarkan penelitian Rajaram dkk, ditemukan bahwa setelah terjadinya ligan antara ManLam dengan *MMR* selain dapat menyebabkan *pathway* di atas, dapat juga mengaktifasi secara langsung *Peroxisome Proliferator-Activated receptor- γ* (PPAR- γ) yang merupakan *nuclear receptor*. *Peroxisome Proliferator-Activated receptor* adalah anggota dari superfamili *lipid-activated nuclear receptor*, yang berperan sebagai regulator kunci dalam metabolisme seluler, proliferasi, diferensiasi dan inflamasi. Hasil dari aktivasi PPAR- γ pada makrofag terinfeksi TB merupakan regulator negatif dengan pengeluaran kemokin IL-8, yang membantu peran makrofag yang terinfeksi untuk mempercepat rekrutmen leukosit terutama neutrofil ke daerah inflamasi (Rajaram et al., 2010).

Berdasarkan uraian tersebut di atas dan diperkuat kenyataan bahwa belum terdapatnya penelitian tentang peranan mutasi gen *MMR* dengan perubahan kadar sitokin

pro dan *antiinflammatory* pada orang Indonesia, maka diperlukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh mutasi gen MMR G1186A terhadap kadar inter leukin-8 dan TGF- β dengan induksi *M. tuberculosis* secara *ex vivo* di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Padjadjaran Bandung, dengan harapan dapat menjadi tambahan dasar mekanisme terjadinya kerentanan menderita penyakit TB.

Terdapat *Road map* penelitian ini sebagaimana dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tahun Penelitian	Tujuan Penelitian	Pendanaan	Luaran
	Melakukan pemeriksaan PCR dan Sekuensing DNA gen MMR dari bahan pemeriksaan Pasien TB Paru aktif dan Laten		Oral Presentasion pada Pekan Ilmiah Tahunan dan Kongres Nasional Patologi Klinik 2014 Publikasi Jurnal Nasional terakreditasi (<i>Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory</i> , Vol. 22, No. 2 Maret 2016)
Tahap-2 (Thn 2015-2016)	Melakukan penelitian mengenai pengaruh mutasi G1186A gen MMR terhadap kadar Kadar IL-8 dan TGF- β pada Pasien TB Paru aktif dan Laten secara <i>ex vivo</i>	Hibah Penelitian Disertasi Doktoral 2015-16	Publikasi Jurnal Nasional terakreditasi (<i>Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory</i>) 2017 Tropical Life Sciences Research atau The Malaysian journal of pathology
Tahap-3 (Tahun 2017)	Menganalisis Pengaruh Bahan nano partikel mannosylated Obat Antituberkulosis terhadap <i>M. tuberculosis dormant</i> secara <i>in vitro</i>	Usuan Hibah Penelitian DIKTI 2017	
Tahap-4 (Tahun 2018-2019)	Menganalisis Pengaruh Bahan nano partikel <i>mannosylated</i> Obat Antituberkulosis sebagai target <i>M. tuberculosis dormant</i> dalam Makrofag secara <i>in vivo</i>	Usulan Hibah Penelitian DIKTI 2018	

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Penelitian

1. Menganalisis pengaruh mutasi G1186A gen MMR terhadap kadar IL-8 dan TGF- β pada penderita TB paru aktif dan TB laten.
2. Menganalisis pada kelompok mana terdapat perbedaan kadar IL-8 dan TGF- β yang paling bermakna.

Manfaat Penelitian

1. Mengurai mekanisme peranan sitokin pro inflamasi IL-8, serta sitokin anti inflamasi TGF- β pada patogenesis dan diagnosis penyakit TB paru serta hubungannya dengan mutasi gen MMR pada kromosom 10p12 exon 7 pada orang Indonesia terhadap kerentanannya menderita TB paru.
2. Sebagai dasar teori untuk mengidentifikasi terdapatnya kerentanan menderita TB paru di Indonesia, sehingga memungkinkan intervensi lebih dini mencegah timbulnya penyakit TB paru.

BAB 4. METODE PENELITIAN

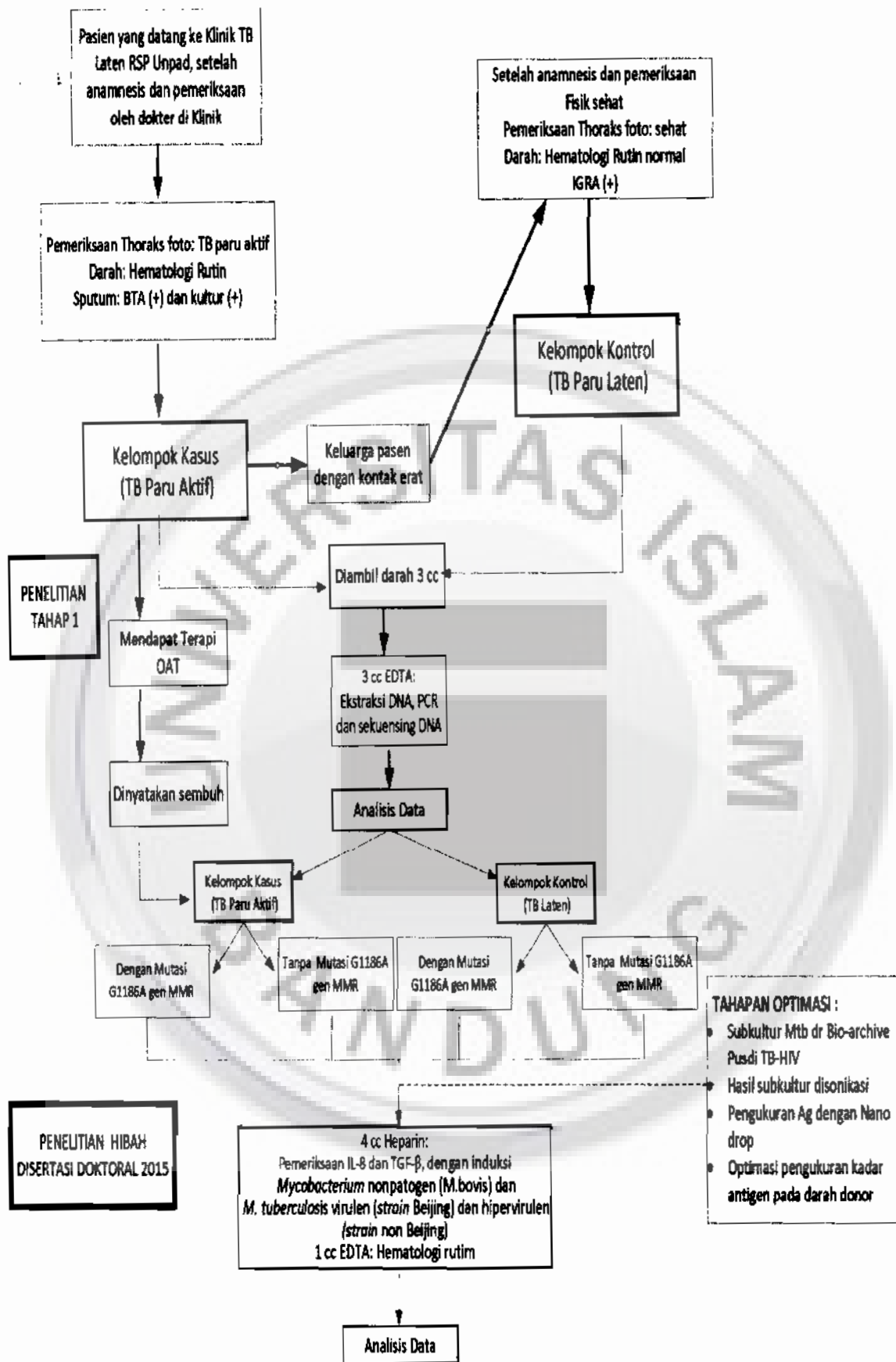
Penelitian ini merupakan tahap ke-4 bagian dari penelitian disertasi yang sedang dilaksanakan. Pada penelitian ini digunakan metode eksperimental dengan bahan pemeriksaan darah dari pasien TB paru aktif dan laten yang sebelumnya sudah dilakukan sekuensing DNA gen MMR, sehingga diketahui ada yang mengalami mutasi (dominan dan resesif) G1186A gen MMR dan yang tidak mutasi (*wild type*). Pada penelitian ini terdapat 6 kelompok dengan 3 perlakuan stimulasi *M. tuberculosis* yang patogen (strain Beijing an non Beijing) dan non patogen (*M. bovis*/vaksin BCG). Sehingga berdasarkan rumus Federer diperlukan jumlah sampel darah dari masing-masing kelompok adalah sebanyak 8 orang.

Tabel di bawah ini merupakan penjabaran penelitian ini dengan penelitian disertasi secara keseluruhan :

Perihal	Hibah Penelitian Disertasi Doktor	Disertasi
Judul	Pengaruh Mutasi G1186A Gen <i>Macrophage Mannose Receptor</i> Terhadap Kadar Interleukin-8 Dan <i>Transforming Growth Factor-β</i>	Hubungan Mutasi Gen <i>Macrophage Mannose Receptor</i> , Kadar Interleukin-8 Dan <i>Transforming Growth Factor-B</i> Terhadap Kejadian Tuberkulosis Paru
Rumusan masalah	<ol style="list-style-type: none"> 1. Apakah mutasi G1186A gen MMR berpengaruh terhadap kadar IL-8 dan TGF-β pada penderita TB paru aktif dan TB laten? 2. Pada kelompok mana terdapat perbedaan kadar IL-8 dan TGF-β yang paling bermakna? 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Apakah terdapat polimorfisme gen MMR pada penderita TB paru aktif? 2. Apakah polimorfisme gen MMR merupakan faktor risiko untuk menderita TB paru aktif? 3. Apakah terdapat perbedaan kadar IL-8 antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami polimorfisme gen MMR pada penderita TB paru? 4. Apakah terdapat perbedaan kadar TGF-β antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami polimorfisme gen MMR pada penderita TB paru? 5. Apakah kadar sitokin IL-8 dan TGF-β merupakan faktor risiko untuk menderita TB paru aktif?
Tujuan Penelitian	<ol style="list-style-type: none"> 1. Menganalisis pengaruh mutasi G1186A gen MMR terhadap kadar IL-8 dan TGF-β pada penderita TB paru aktif dan TB laten. 2. Menganalisis pada kelompok mana terdapat perbedaan kadar IL-8 dan TGF-β yang paling bermakna. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Menganalisis kejadian polimorfisme gen MMR pada penderita TB paru aktif. 2. Menganalisis kejadian polimorfisme gen MMR merupakan faktor risiko untuk menderita TB paru aktif. 3. Menganalisis perbedaan kadar IL-8 antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami polimorfisme

		<p>gen MMR pada penderita TB paru.</p> <p>4. Menganalisis perbedaan kadar TGF-β antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami polimorfisme gen MMR pada penderita TB paru.</p> <p>5. Menganalisis kadar sitokin IL-8 dan TGF-β merupakan faktor risiko untuk menderita TB paru aktif.</p>
Metodologi	Eksperimental	Kasus kontrol dan eksperimental
Luaran	Aspek ilmiah, Disertasi, Jurnal Internasional, Hak Paten	Aspek ilmiah, Disertasi, Jurnal Internasional, Hak Paten
Lokasi Penelitian	<ul style="list-style-type: none"> - RS Pendidikan Unpad Bandung - Lab Biomol Patklin RSHS Bandung - Lab Immunology RS Pendidikan FK Unpad Bandung 	<ul style="list-style-type: none"> - RS Pendidikan Unpad Bandung - Lab Biomol Patklin RSHS Bandung - Lab Immunology RS Pendidikan FK Unpad Bandung - Lab Mikrobiologi RS Al Islam Bandung - Lembaga Biomolekuler Eijkman Jakarta
Indikator Pencapaian	Diperoleh data tentang pengaruh mutasi G1186A gen MMR terhadap kadar IL-8 an TGF- β pada kedua kelompok kasus dan kontrol	Diperoleh data Polimorfisme gen MMR dan kadar IL-8 an TGF- β pada kedua kelompok serta pengaruhnya terhadap kejadian TB

Berdasarkan uraian tabel di atas dapat lebih dijelaskan alur penelitian seperti yang terdapat pada skema alur penelitian di bawah ini.



Gambar Skema Alur Penelitian

BAB 5. HASIL YANG DICAPAI

Pemeriksaan sitokin dengan menggunakan metode *Whole Blood stimulating Assays* (WBSA) yaitu pemeriksaan sitokin sebagai respon imunologis dari seseorang dengan menggunakan darah lengkap dan stimulasinya menggunakan antigen yang berasal dari mikroorganisme yang akan dinilai pengaruhnya terhadap pengeluaran sitokin tersebut. Pemeriksaan ini merupakan metode terbaru dan terbaik yang saat ini dilakukan untuk menganalisis kadar sitokin sebagai respons imunologis terhadap antigen tertentu yang lebih spesifik.

Berdasarkan penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa metode WBSA mempunyai keunggulan dari segi sensitivitas dan spesifisitasnya juga menggunakan bahan pemeriksaan darah yang jauh lebih sedikit dibanding metode sebelumnya seperti menggunakan *peripheral blood monocyctic cell* (PBMC) ataupun pemeriksaan sitokin langsung dari serum.

Sebelum melakukan penelitian tahap ini, dilakukan penelitian optimasi sebagai persiapan pemeriksaan sitokin IL-8 dan TGF β dengan metode *Whole blood stimulating assays* pada subjek penelitian, yang terdiri dari: sub kultur isolat Mtb strain Beijing dan Non Beijing dari isolat *Bioarchive* Pusat Studi TB-HIV FK Unpad, sonikasi isolat Mtb hasil subkultur, Subkultur isolat Mtb hasil sonikasi, pengukuran kadar protein Mtb hasil Sonikasi, Optimasi Pengukuran IL-8 dan TGF- β metode WBSA menggunakan stimulasi Protein Antigen Mtb strain Beijing dan non Beijing Hasil Sonikasi pada Darah Donor. Hal ini dilakukan dengan tujuan penelitian Tahap ini dapat berhasil dengan baik.

5.1 Hasil Sub kultur Isolat *M. tuberculosis* strain Beijing dan non Beijing dari Bioarchive Pusat Studi TB-HIV

Subkultur isolat *M. tuberculosis* (Mtb) strain Beijing dan non Beijing dari *Bioarchive* Pusat Studi TB-HIV FK Unpad dilakukan supaya pada penelitian ini menggunakan antigen dari isolat Mtb yang berasal dari biakan sputum pasien yang memang berada di Indonesia.

Peneliti mendapatkan frozen isolat *bioarchive* yang tersimpan pada suhu -80°C tahun lalu, dan sudah diketahui jenis *lineage* nya dengan spoligotyping yang terdiri dari: Mtb Non Beijing LAM9 VNTR Cluster No.6 dan Mtb H3 VNTR Cluster No. 4, dan Mtb Beijing VNTR Cluster No. 10, dan VNTR Cluster No. 11.

Subkultur dilakukan dengan menggunakan media Ogawa 3% pada tabung reaksi dengan masing-masing strain sebanyak 8 tabung dan diinkubasi pada suhu 37°C , dengan hasil

pertumbuhan sangat cepat yaitu sekitar 2 minggu sudah dapat ditemukan koloni Mtb dengan subur. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 5.1



Gambar 5.1 Isolat Mtb Frozen Bioarchive



a

Gambar 5.2a Media Subkultur Mtb



b

b. Hasil Subkultur Isolat Mtb Setelah 2 minggu

Setelah koloni Mtb tumbuh dengan subur kemudian dilakukan pengerokan dan koloni Mtb disimpan sebagian di dalam tube berisi air deion kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 30 menit yang kemudian dilakukan sonikasi dan sebagian disimpan dalam media Middle brook 7H11 untuk di frozen pada suhu -80°C sebagai arsip.

5.2 Hasil Sonikasi Subkultur *M. tuberculosis* strain Beijing dan non Beijing

Untuk stimulasi pada metode WBSA diperlukan antigen Mtb yang aman tidak infeksius, sehingga dilakukan sonikasi isolat Mtb hasil subkultur, dengan tujuan supaya antigen Mtb yang digunakan sebagai stimulasi merupakan protein Mtb yang sudah dimatikan dan tidak infeksius.

Sonikasi dilakukan menggunakan Sonikator dengan frekuensi 47kHz, hal ini dapat dilihat pada Gambar 5.3 sebagai berikut:



Gambar 5.3 Alat Sonikasi Mtb

5.3 Hasil Subkultur Mtb yang Telah Disonikasi

Hasil Mtb setelah disonikasi diharapkan menjadi antigen yang dapat dijadikan stimulan pada pemeriksaan sitokin dengan metode WBSA. Namun harus dipastikan bahwa hasil sonikasi Mtb tersebut aman atau tidak infeksius, hal ini dilakukan dengan cara melakukan subkultur dari Mtb hasilsonikasi tersebut pada media Ogawa 3%, sama seperti halnya perlakuan ketika subkultur dari isolat frozen *bioarchive*.

Hasil subkultur Mtb hasil sonikasi selama pengamatan 1 bulan tidak menunjukkan adanya tanda-tanda pertumbuhan koloni Mtb, berbeda ketika melakukan subkultur dari isolat frozen *bioarchive* yang sudah menunjukkan adanya pertumbuhan koloni dalam waktu 2 minggu, hal ini menunjukkan bahwa sonikasi Mtb berhasil mematikan Mtb dan antigen yang diperoleh sudah aman atau tidak infeksius untuk dijadikan stimulan pada pemeriksaan sitokin dengan metode WBSA. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 5.4



Gambar 5.4 Hasil Subkultur Mtb Setelah Disonikasi 1 Bulan

5.4 Hasil Pengukuran Kadar Protein Mtb Hasil Sonikasi

Isolat Mtb hasil sonikasi yang akan dijadikan stimulasi pada pemeriksaan sitokin metode WBSA setelah diyakinkan tidak infeksius, kemudian diukur kadar proteinnya dengan menggunakan Nanodrop, yang dapat dilihat pada Gambar 5.5

Hasil pengukuran kadar protein Mtb dengan menggunakan Nanodrop sebagai berikut:

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Nanodrop Jumlah Protein Antigen Mtb Hasil Sonikasi

No Urut	ID Isolat	Spoligotyping	Pengenceran (kali)	Protein Conc.	Unit
1	6400016	LAM9	2	3,137	mg/ml
2	6400016	LAM9	2	49,192	mg/ml
3	6400016	LAM9	2	2,928	mg/ml
4	6400016	LAM9	4	0,906	mg/ml
5	6400016	LAM9	4	1,024	mg/ml
6	6400016	LAM9	8	0,292	mg/ml
7	6400016	LAM9	8	0,3329	mg/ml
8	6400030	H3	2	8,225	mg/ml
9	6400030	H3	2	6,939	mg/ml
10	6400030	H3	2	11,46	mg/ml
11	6400030	H3	4	2,523	mg/ml
12	6400030	H3	4	2,444	mg/ml
13	6400030	H3	8	0,931	mg/ml
14	6400030	H3	8	0,809	mg/ml
15	6400034	Beijing typical	2	5,923	mg/ml
16	6400034	Beijing typical	2	9,286	mg/ml
17	6400034	Beijing typical	4	1,839	mg/ml
18	6400034	Beijing typical	4	1,839	mg/ml
19	6400034	Beijing typical	8	0,597	mg/ml
20	6400034	Beijing typical	8	0,611	mg/ml
21	6400220	Beijing typical	2	13,18	mg/ml
22	6400220	Beijing typical	2	14,087	mg/ml
23	6400220	Beijing typical	4	3,141	mg/ml
24	6400220	Beijing typical	4	3,587	mg/ml
25	6400220	Beijing typical	8	2,066	mg/ml
26	6400220	Beijing typical	8	1,02	mg/ml
27	6400220	Beijing typical	8	1,142	mg/ml

Berdasarkan hasil perhitungan Nanodrop pada Tabel di atas, kemudian ditentukan oleh peneliti bahwa yang dijadikan Antigen stimulasi pada pemeriksaan sitokin dengan metode WBSA adalah protein Mtb dengan pengenceran 4 kali, karena melihat dengan pengenceran tersebut kadar protein antigen relatif stabil, tidak terlalu pekat ataupun tidak terlalu sedikit sehingga beberapa kali pengukuran menghasilkan angka kadar yang relatif sama.



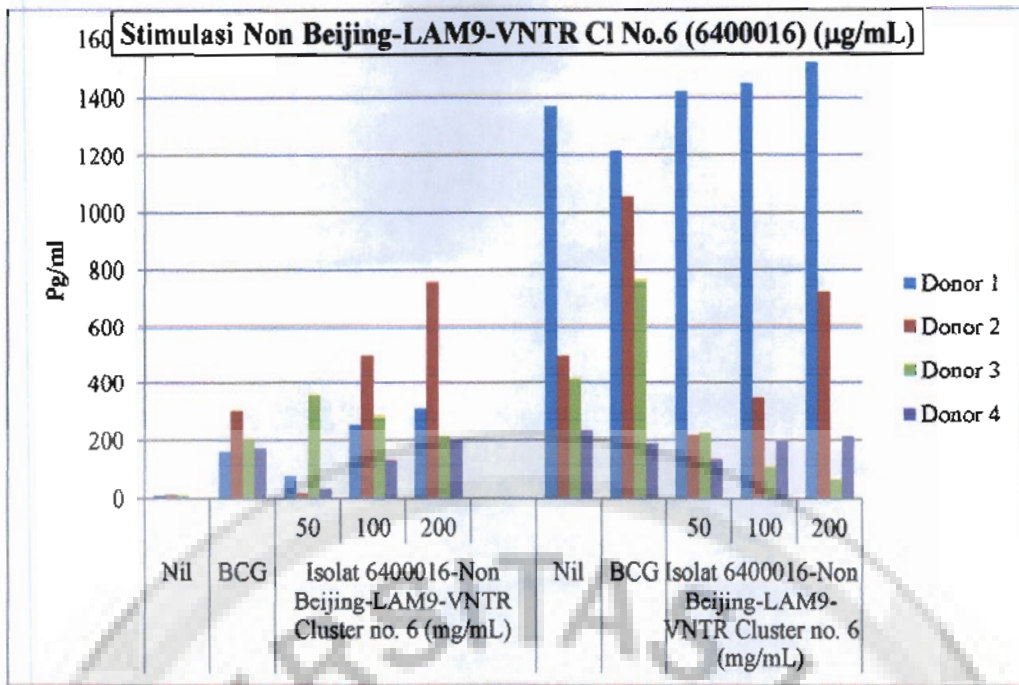
Gambar 5.5 Nanodrop

5.5 Hasil Optimasi Pengukuran IL-8 dan TGF- β metode *Whole blood stimulating assays* menggunakan stimulasi Protein Antigen *M. tuberculosis* strain Beijing dan non Beijing pada Darah Donor

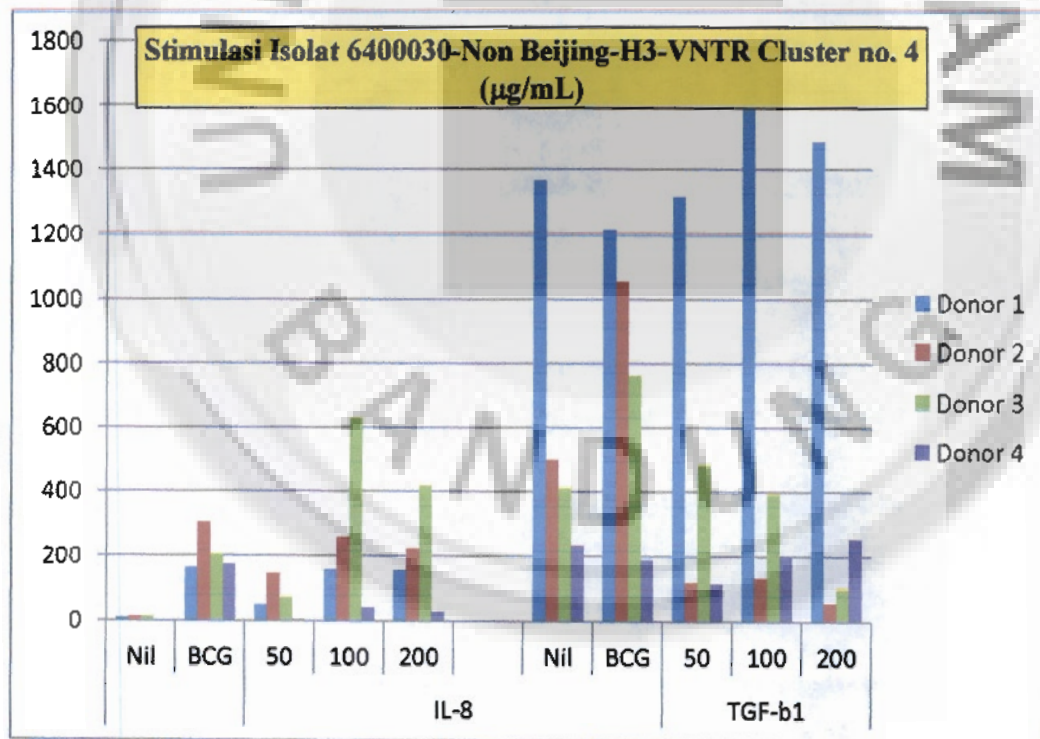
Sebelum melakukan pemeriksaan sitokin kepada bahan pemeriksaan dari kelompok kasus dan kontrol, dilakukan optimasi pemeriksaan sitokin IL-8 dan TGF- β pada darah donor terlebih dahulu. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan dosis stimulasi yang efektif dan memilih jenis antigen Mtb patogen yang akan digunakan.

Pada tahapan optimasi dilakukan pada 4 orang darah donor dengan acuan konsentrasi stimulasi penelitian WBSA terdahulu yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya di Lab Immunologi RSP Unpad, yaitu 100 μ g/mL. Tahapan optimasi ini menggunakan dosis stimulasi 50 μ g/mL, 100 μ g/mL dan 200 μ g/mL untuk masing-masing antigen yang telah diukur sebelumnya.²³

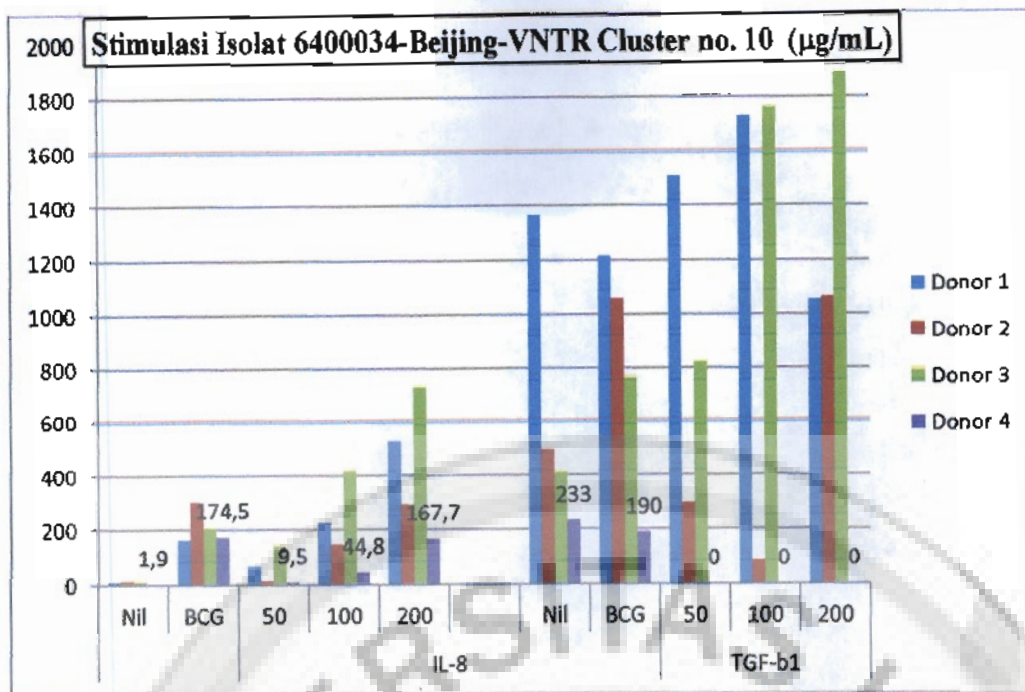
Hasil optimasi pemeriksaan sitokin IL-8 dan TGF- β pada darah donor dapat dilihat pada Gambar 5.6–9 di bawah ini:



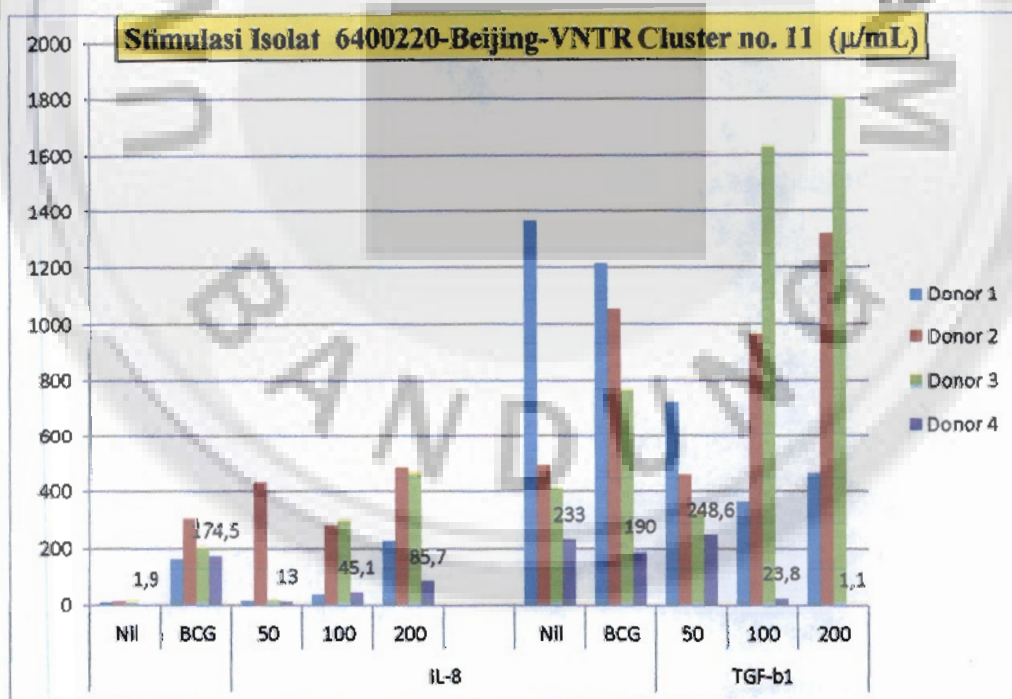
Gambar 5.6 Kadar IL-8 dan TGF- β dengan Stimulasi Mtb Non Beijing LAM9-VNTR Cluster No. 6



Gambar 5.7 Kadar IL-8 dan TGF- β dengan Stimulasi Mtb Non Beijing H3-VNTR Cluster No. 4



Gambar Lampiran 5.8 Kadar IL-8 dan TGF- β dengan Stimulasi Mtb Beijing VNTR Cluster No. 10



Gambar 5.9 Kadar IL-8 dan TGF- β dengan Stimulasi Mtb Beijing VNTR Cluster No. 11

Stimulan yang digunakan pada pemeriksaan sitokin metode WBSA ini adalah vaksin BCG sebagai perwakilan *mycobacterium* nonpatogen, Mtb strain Non Beijing sebagai

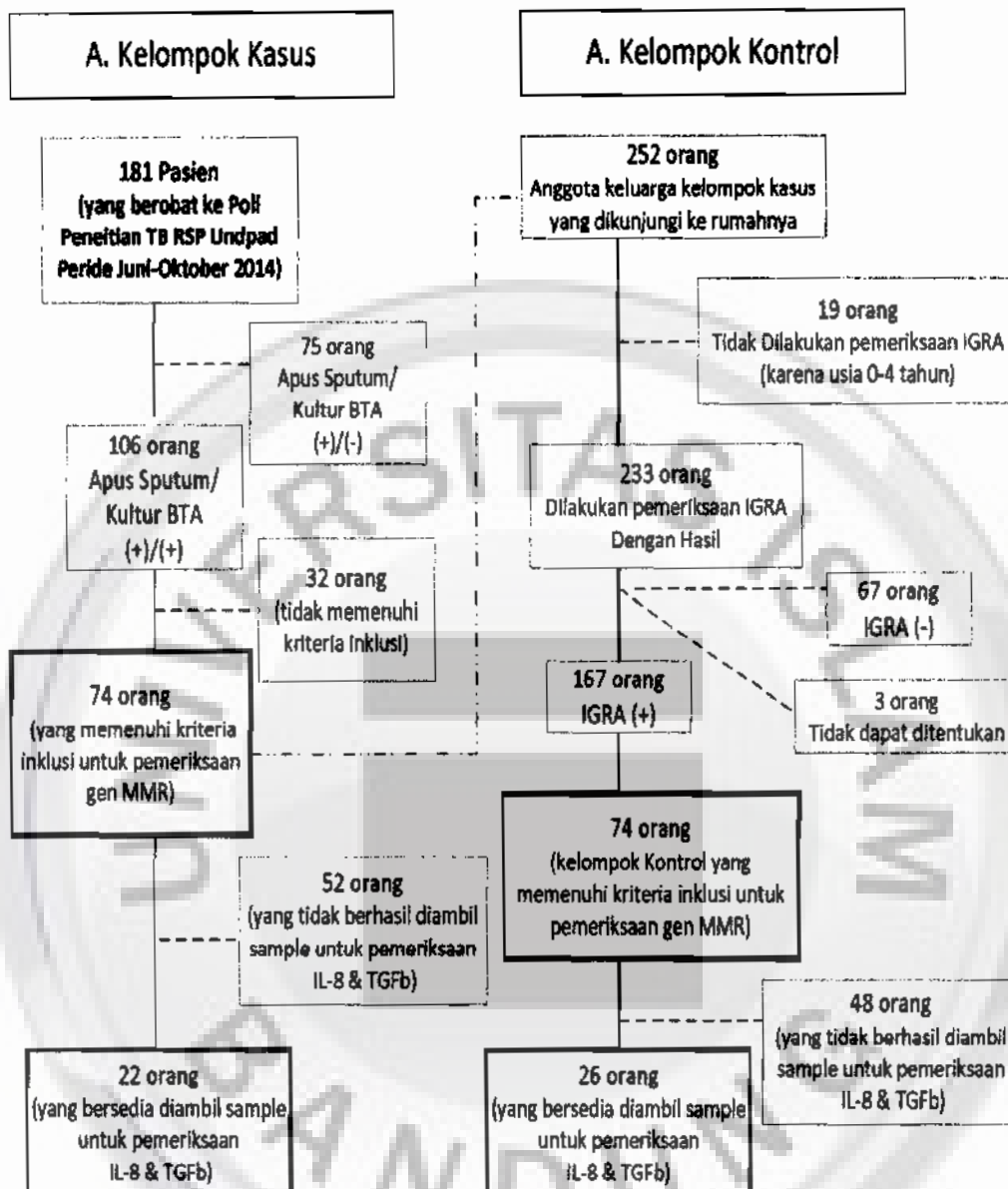
perwakilan Mtb patogen yang virulen dan Mtb Beijing sebagai perwakilan Mtb patogen yang hipervirulen.

Secara umum hasil optimasi dosis antigen pada kadar 200 µg/mL memberikan produksi sitokin yg paling optimal, sehingga diputuskan selanjutnya antigen yang dipakai untuk stimulasi pemeriksaan sitokin kelompok kasus dan kontrol menggunakan dosis 200 µg/mL dengan jenis Mtb patogen dari isolat no 6400220-Beijing dan 6400030-Non Beijing, karena merupakan antigen stimulan dengan hasil sitokin yang paling optimal.

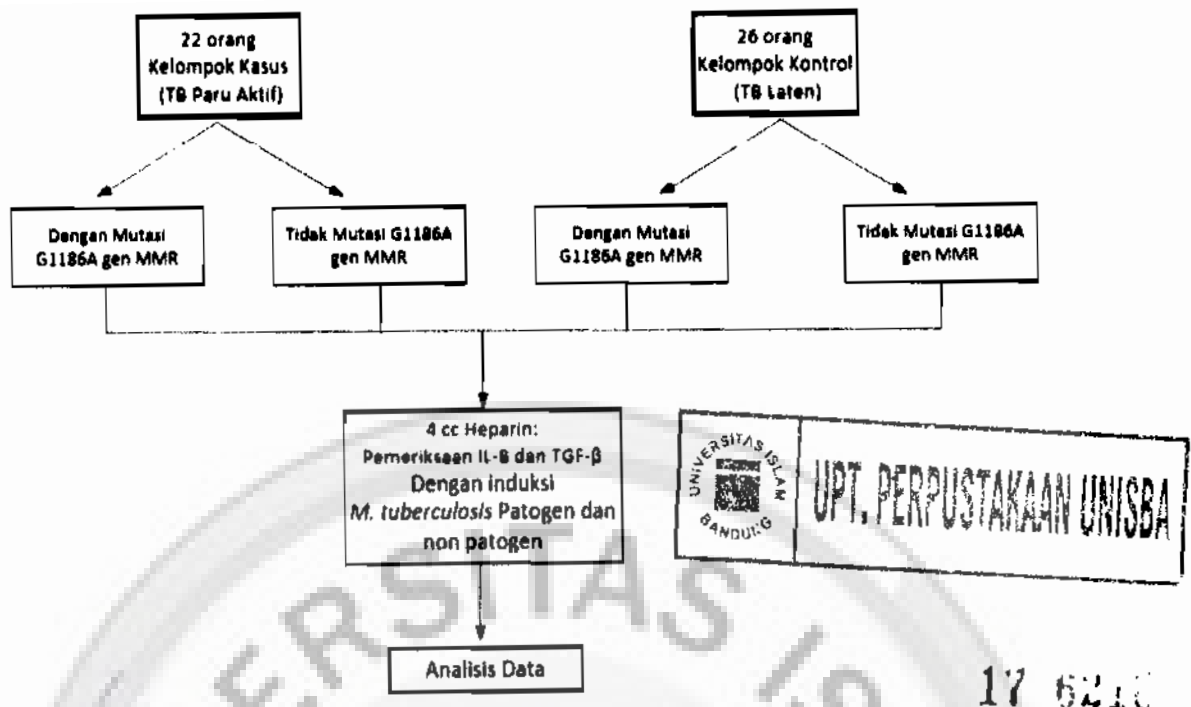
5.6 Hasil Pengukuran IL-8 Dan TGF-β *Whole Blood Stimulating Assays* Menggunakan Stimulasi Protein Antigen *M. Tuberculosis* Strain Beijing dan Non Beijing pada Subjek Penelitian

Setelah optimasi, selanjutnya pemeriksaan sekuensing untuk subjek penelitian menggunakan rancangan primer sendiri. Jumlah pasien yang berhasil dilakukan untuk pemeriksaan sitokin ini berjumlah 48 orang yang terdiri dari 22 orang kelompok kasus dan 26 orang kelompok kontrol dari target 60 orang yang direncanakan dari kelompok kasus dan kontrol yang sebelumnya pernah dilakukan pemeriksaan sekuensing DNA gen MMR kelompok G1186A. Hal ini diperoleh dengan mengunjungi rumah-rumah pasien tersebut oleh tim Home visite tersendiri. Sebanyak 80 jumlah kunjungan yang telah dilakukan, namun yang berhasil diperoleh hanya 48 orang yang bersedia diambil darahnya kembali, karena berbagai kendala, antara lain pasien sudah meninggal dunia, pindah alamat dan alamat baru tidak diketahui, bercerai, pindah pekerjaan dan menolak karena merasa sudah sembuh.

Alur pemilihan sample pemeriksaan IL-8 dan TGF-β pada kedua kelompok secara skematis dapat dilihat pada Gambar 5.10. Kemudian setelah diperoleh sample dari kedua kelompok silakukan pemeriksaan sitokin dengan metode WBSA dengan melihat status genotif gen MMR pada lokus G1186A, secara skematis alur pemeriksaan sitokin pada kedua kelompok dapat dilihat pada Gambar 5.10.



Gambar 5.10 Skema Alur Pemilihan Subjek Penelitian Keseluruhan



Gambar 5.11 Skema Alur Penelitian Hibah Doktorat

Berdasarkan Tabel 5.1, karakteristik subjek penelitian tidak terdapat perbedaan secara bermakna dalam hal jenis kelamin dan usia, hanya terdapat perbedaan yang bermakna indeks massa tubuh (IMT), kelompok kasus mempunyai IMT yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Tabel 5.1 Karakteristik Subjek Penelitian yang Dilakukan Pemeriksaan Sitokin

Karakteristik	Kelompok		Total (n=48)	Nilai p
	Kasus (n=22)	Kontrol (n=26)		
Usia (tahun), rerata (SB)	39,0 (10,7)	38,0 (10,7)	38,5 (10,6)	0,749 [#]
Jenis kelamin, frekuensi (%)				
Laki-laki	11 (50)	9 (35)	20 (42)	0,281 [§]
Perempuan	11 (50)	17 (65)	28 (58)	
IMT (kg/m ²), rerata (SB)	18,8 (3,0)	24,1 (5,2)	21,7 (5,1)	<0,001 [#]

Keterangan Tabel:

SB = simpangan baku; [#]Uji t tidak berpasangan; [§]Uji chi-kuadrat; IMT: Indeks Massa Tubuh

Berdasarkan Tabel 5.1 karakteristik subjek penelitian tahap 2 seperti halnya penelitian tahap 1, ditinjau dari umur dan jenis kelamin tidak terdapat perbedaan yang bermakna.

Namun dilihat dari IMT, terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,001$) antara kelompok TB paru aktif dan TB laten.

Hasil Pemeriksaan Sitokin IL-8 dan TGF- β pada Subjek Penelitian

Hasil pemeriksaan kadar sitokin IL-8 dan TGF- β pada kelompok kasus dan kontrol memakai pelbagai stimulasi dapat dilihat pada Tabel 4.7 dan Tabel 4.8

Tabel 5.2 Kadar Sitokin Proinflamasi IL-8 dengan Beberapa Stimulasi

Subjek Grup	Jenis Stimulasi				Nilai p
	Nil	BCG	Non Beijing	Beijing	
IL-8 (pg/mL)					
Kasus (n=22)	1,4 (0-12,6)	193,75 (24,3-1.378)	685,75 (25,8-2.458,4)	537,1 (14,4-2.356,7)	<0,001
Kontrol (n=26)	3,2 (0-11,4)	179,18 (8,8-1.051)	473,7 (11,7-1.525,4)	348,9 (56,7-2.244,6)	<0,001
Nilai p	0,446	0,69	0,301	0,179	

Tabel 5.3 Kadar Sitokin Anti-inflamasi TGF- β dengan Beberapa Stimulasi

Subjek Grup	Jenis Stimulasi				Nilai p
	Nil	BCG	Non Beijing	Beijing	
TGF-B (pg/mL)					
Kasus (n=22)	982,6 (34,7-3.228)	934,3 (129-3.219)	1306 (201,7-4.322,4)	1224 (14,9-3.192)	0,896
Kontrol (n=26)	647,2 (10,4-2.631,9)	1185,95 (169-4.322,4)	1091 (12,1-2.153,2)	469,7 (3,8-2.058)	0,061
Nilai p	0,3	0,52	0,298	0,031*	

Keterangan Tabel 5.2 dan Tabel 5.3:

Nil: tanpa stimulasi; **BCG:** stimulasi dengan *Mycobacterium non patogen* (*M. bovis* 100 $\mu\text{g/mL}$); **Non Beijing:** stimulasi menggunakan *Mtb Non Beijing Cluster* No. 4 (6400030) 200 $\mu\text{g/mL}$; **Beijing:** stimulasi menggunakan *Mtb Beijing Cluster* No. 11 (6400220) 200 $\mu\text{g/mL}$. Nilai di atas adalah median (rentang minimum-maksimum); Analisis statistik dengan uji Mann U-Whitney

Hasil pemeriksaan sitokin IL-8 dan TGF- β pada kedua kelompok kasus dan kontrol terdapat perbedaan bahwa IL-8 kelompok kasus mempunyai nilai yang lebih tinggi daripada kelompok kontrol kecuali pada kelompok yang distimulasi dengan Nil. TGF- β

memberikan hasil yang lebih tinggi pada kelompok kasus dibanding dengan kontrol, kecuali yang distimulasi BCG kelompok kontrol lebih tinggi dibanding dengan kasus.

5.7 Hasil Pemeriksaan Sitokin IL-8 dan TGF- β pada Kelompok Mutasi dan Non Mutasi Gen *MMR* Situs G1186A

Hasil pemeriksaan sitokin IL-8 dan TGF- β pada kedua kelompok kasus dan kontrol dengan melihat jenis genotip mutasi (polimorfisme) dan nonmutasi (nonpolimorfisme) pada gen *MMR* situs G1186A dapat dilihat pada Tabel 5.4 dan Tabel 5.5.

Pada Tabel 5.4, dapat dilihat bahwa kadar IL-8 dengan stimulasi nil pada kelompok yang mengalami mutasi dibanding dengan kelompok yang nonmutasi gen *MMR* terdapat perbedaan tidak bermakna dengan nilai $p=0,403$; median dan nilai minimum-maksimumnya adalah 2,3 (0–12,1) pg/mL dan 0,775 (0–12,6) pg/mL.

Terdapat perbedaan kadar IL-8 dengan stimulasi *Mtb* nonpatogen (vaksin BCG) antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami mutasi gen *MMR* dengan nilai median dan minimum-maksimum 180,35 (8,8–1.051) pg/mL dan 227,3 (59,7–1.378) pg/mL dengan nilai $p=0,564$.

Terdapat perbedaan kadar IL-8 dengan stimulasi *Mtb* patogen virulen (strain Non Beijing) antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami mutasi gen *MMR* dengan nilai median dan minimum-maksimum 665,9 (12–2.458) pg/mL dan 473,7 (26–1.525) pg/mL dengan nilai $p=0,54$.

Terdapat perbedaan kadar IL-8 dengan stimulasi *Mtb* patogen hipervirulen (strain Beijing) antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami mutasi gen *MMR* pada subjek penelitian dengan nilai median dan minimum-maksimum 578,7 (59,6–2.356,7) pg/mL dan 379,6 (14,4–2.244,6) pg/mL dengan nilai $p=0,347$.

Kadar IL-8 dengan stimulasi Nil, Mtb Non Beijing, dan Mtb Beijing lebih tinggi pada kelompok yang mengalami mutasi gen MMR situs G1186A dibanding dengan yang tidak. Namun, Kadar IL-8 dengan stimulasi Mtb nonpatogen (BCG) lebih rendah pada kelompok yang mengalami mutasi gen MMR situs G1186A dibanding yang tidak, hal ini dapat dilihat pada Tabel 4.9.

Berdasarkan Tabel 4.10 terdapat perbedaan kadar TGF- β tanpa stimulasi (Nil) antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami mutasi gen MMR dengan nilai median (minimum-maksimum) 647,2 (10,4–3.228) pg/mL dan 1.030,35 (22,2–2.960) pg/mL dengan nilai $p=0,784$.

Terdapat perbedaan kadar TGF- β dengan stimulasi Mtb nonpatogen (vaksin BCG) antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami mutasi gen MMR dengan nilai median (minimum-maksimum) 934,3 (169–4.322,4) pg/mL dan 1.422,5 (129–3.284) pg/mL dengan nilai $p=0,343$.

Terdapat perbedaan kadar TGF- β dengan stimulasi Mtb patogen virulen (*strain* Non Beijing) antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami mutasi gen MMR dengan nilai median (minimum-maksimum): 1.294,25 (201,7–4.322,4) pg/mL dan 1.175,5 (12,1–4.322,4) pg/mL dengan nilai $p=0,751$

Tabel 5.4 Kadar Sitokin Proinflamasi IL-8 dengan Beberapa Stimulasi dari Kelompok Nonmutasi dan Mutasi pada Gen MMR Situs G1186A

Sitokin	Subjek Grup	Jenis Stimulasi			
		Nil	BCG	Non Beijing	Beijing
IL-8 (pg/mL)	Non Mutasi (n=16)	0,775 (0–12,6)	227,3 (59,7–1.378)	473,7 (26–525)	379,6 (14,4–2.244,6)
	Mutasi (n=32)	2,3 (0–12,1)	180,35 (8,8–1.051)	665,9 (12–2.458)	578,7 (59,6–2.356,7)
	Nilai p	0,403	0,564	0,54	0,347

Tabel 5.5 Kadar Sitokin Anti-inflamasi TGF- β dengan Beberapa Stimulasi dari Kelompok Nonmutasi dan Mutasi pada Gen *MMR* Situs G1186A

Sitokin	Subjek Grup	Jenis Stimulasi			
		Nil	BCG	Non Beijing	Beijing
TGF-B (pg/mL)	Non Mutasi (n=16)	1.030,35 (22,2– 2.960)	1.422,5 (129–3.284)	1.175,5 (12,1–4.322,4)	486,9 (3,8–3.176)
	Mutasi (n=32)	647,2 (10,4–3.228)	934,3 (169–4.322,4)	1.294,25 (201,7–4.322,4)	932,65 (14,9–3.192)
	Nilai p	0,784	0,343	0,751	0,57

Keterangan Tabel 5.4 dan Tabel 5.5:

Non Mutasi: seluruh kelompok kasus dan kontrol yang mengalami *wild type* (GG pada situs G1186A pada gen *MMR*); **Mutasi:** seluruh kelompok kasus dan kontrol yang mengalami mutasi (AA dan GA pada situs G1186A pada gen *MMR*)

Nil: tanpa stimulasi; **BCG:** stimulasi dengan *Mycobacterium non patogen* (*M. bovis* 100 μ g/mL; **Non Beijing:** stimulasi menggunakan *Mtb Non Beijing Cluster* No. 4 (6400030) 200 μ g/mL; **Beijing:** stimulasi menggunakan *Mtb Beijing Cluster* No. 11 (6400220) 200 μ g/mL. Nilai di atas adalah median (rentang minimum–maksimum); Analisis statistik dengan uji Mann U-Whitney

Terdapat perbedaan kadar TGF- β dengan stimulasi *Mtb* patogen hipervirulen (strain Beijing) antara kelompok yang mengalami dan yang tidak mengalami mutasi gen *MMR* dengan nilai median (minimum-maksimum): 932,65 (14,9–3.192) pg/mL dan 486,9 (3,8–3.176) pg/mL dengan nilai $p=0,57$.

Kadar TGF- β dengan stimulasi *Mtb* Non Beijing dan *Mtb* Beijing lebih tinggi pada kelompok yang mengalami mutasi gen *MMR* situs G1186A dibanding dengan yang tidak.

Kadar IL-8 dengan stimulasi Nil dan *Mtb* nonpatogen (BCG) lebih rendah pada kelompok yang mengalami mutasi gen *MMR* situs G1186A dibanding dengan yang tidak.

Kadar TGF- β dengan stimulasi *Mtb* patogen virulen Non Beijing dan hipervirulen Beijing lebih tinggi pada kelompok yang mengalami polimorfisme gen *MMR* situs G1186A dibanding yang tidak. Kadar TGF- β dengan stimulasi Nil dan *Mtb* nonpatogen (BCG) lebih rendah pada kelompok yang mengalami polimorfisme gen *MMR* situs G1186A dibanding yang tidak (dengan nilai $p=0,343$) pada Tabel 5.5

Hubungan kadar IL-8 dan TGF- β dengan kejadian TB paru aktif pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6 Hubungan Kadar IL-8 dan TGF- β dengan Kejadian TB Paru Aktif

Hubungan	Stimuli	Koefisien korelasi	Nilai p**
Kadar IL-8 dengan kejadian TB paru aktif	Nil	-0,057	0,729
	BCG	0,077	0,609
	Non Beijing	0,174	0,243
	Beijing	0,202	0,109
Kadar TGF- β dengan kejadian TB paru aktif	Nil	0,216	0,193
	BCG	-0,109	0,475
	Non Beijing	0,22	0,133
	Beijing	0,268	0,065

Berdasarkan Tabel di atas kadar IL-8 dan TGF- β tidak mempunyai hubungan bermakna pada semua stimulasi dengan kejadian TB paru aktif (nilai $p > 0,05$). Namun kalau dilihat yang paling mendekati bermakna adalah kelompok yang distimulasi dengan Mtb Beijing, kadar TGF- β berhubungan dengan kejadian TB paru ($p = 0,065$).

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Mutasi gen *MMR* situs G1186A berpengaruh terhadap kadar IL-8 dan TGF- β dengan pelbagai stimulasi antigen Mtb namun tidak bermakna secara statistik
2. Pada kelompok dengan stimulasi Mtb Beijing Kadar IL-8 dan TGF- β menunjukkan kecenderungan berhubungan dengan kejadian TB paru (nilai $p = 0,065$) di Bandung.

6.2 Saran

6.2.1 Saran Ilmiah:

Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang mutasi gen *MMR* dengan jumlah subjek penelitian yang lebih besar, sehingga diperoleh gambaran pengaruhnya sebagai faktor risiko terjadinya penyakit TB menjadi lebih bermakna.

6.2.2 Saran Praktis:

Diperlukan pengembangan metode pemeriksaan sitokin dengan cara *Whole Blood Stimulating Assays* secara *ex vivo*, karena merupakan metode pemeriksaan terbaru dan lebih banyak kelebihanannya dibandingkan pemeriksaan sitokin serum secara *in vivo* dan pemeriksaan sitokin secara *ex vivo* dengan bahan *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC).



DAFTAR PUSTAKA

- Alter, A., Leseleuc, L. D., Thuc, N. V., Thai, V. H., Ba, N. N., Cardoso, C. C., Abel, L. & Moraes, M. O. 2010. Genetic And Functional Analysis Of Common Mrc1 Exon 7 Polymorphisms In Leprosy Susceptibility. *Hum Genet*, 127, 337-48.
- Azad, A. K., Sadee, W. & Schlesinger, L. S. 2012. Innate Immune Gene Polymorphisms In Tuberculosis. *Infect Immun*, 80, 3343-59.
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., García, J. S. Y., Morbidoni, H. R., Santangelo, M. D. L. P., Cataldi, A. A. & Bigi, F. 2013. Virulence Factors Of The Mycobacterium Tuberculosis Complex. *Virulence Landes Bioscience*, 4:1, 3-66, 1-64.
- Fukuda, T., Matsumura, T., Ato, M., Hamasaki, M., Nishiuchi, Y., Murakami, Y., Maeda, Y., Yoshimori, T., Matsumoto, S., Kobayashi, K., Kinoshita, T. & Morita, Y. S. 2013. Critical Roles For Lipomannan And Lipoarabinomannan In Cell Wall Integrity Of Mycobacteria And Pathogenesis Of Tuberculosis. *Mbio*, 4, E00472-12.
- Gazi, U. 2010. *The Mannose Receptor In Macrophage Biology*. Doctor Of Philosophy, University Of Nottingham.
- Gordon, R. & Taylor, P. 2005. Monocyte And Macrophage Heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5, 953-64.
- Hattori, T., Konno, S. & Hizawa, N. 2009a. Genetic Variants In The Mannose Receptor Gene (Mrc1) Are Associated With Asthma In Two Independent Populations. *Immunogenetics*, 61, 731-8.
- Hattori, T., Konno, S., Hizawa, N., Isada, A., Takahashi, A., Shimizu, K., Gao, P., Beaty, T. H., Barnes, K. C., Huang, S. K. & Nishimura, M. 2009b. Genetic Variants In The Mannose Receptor Gene (Mrc1) Are Associated With Asthma In Two Independent Populations. *Immunogenetics*, 61, 731-8.

- Hattori, T., Konno, S., Takahashi, A., Isada, A., Shimizu, K., Shimizu, K., Taniguchi, N., Gao, P., Yamaguchi, E., Hizawa, N., Huang, S.-K. & Nishimura, M. 2010a. Genetic Variants In Mannose Receptor Gene (Mrc1) Confer Susceptibility To Increased Risk Of Sarcoidosis. *Bmc Med Genet*, 11: 151
- Hattori, T., Konno, S., Takahashi, A., Isada, A., Shimizu, K., Shimizu, K., Taniguchi, N., Gao, P., Yamaguchi, E., Hizawa, N., Huang, S. K. & Nishimura, M. 2010b. Genetic Variants In Mannose Receptor Gene (Mrc1) Confer Susceptibility To Increased Risk Of Sarcoidosis. *Bmc Med Genet*, 11, 151.
- Inoue, M., Nagi, S., Chadeka, E., Mutungi, F., Osada-Oka, M., Ono, K., Oda, T., Tanaka, M., Yuriko, Ozeki, Yombo, K. D. J., Okabe, M., Niki, M., Hirayama, Y., Fukui, M., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Shimada, M., Kaneko, S., Ogura, H., Ichinose, Y., Njenga, S. M., Haman, S. & Matsumoto, S. 2013. Relationship Between Mycobacterium Tuberculosis And Hookworm Infections Among School Children In Mbita, Kenya *Journal Of Tropical Diseases*, 1, 1-5.
- Kang, P. B., Azad, A. K., Torrelles, J. B., Kaufman, T. M., Beharka, A., Tibesar, E., Desjardin, L. E. & Schlesinger, L. S. 2005. The Human Macrophage Mannose Receptor Directs Mycobacterium Tuberculosis Lipoarabinomannan-Mediated Phagosome Biogenesis *Jem*, 202, No. 7 987-999
- Keler, T., Ramakrishna, V. & Fanger, M. W. 2004. Mannose Receptor-Targeted Vaccines. *Expert Opin Biol Ther*, 4, 1953-62.
- Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Netea, M. G. & Crevel, R. V. 2011. Innate Immune Recognition Of Mycobacterium Tuberculosis. *Review Article Clinical And Developmental Immunology* 2011 Id 405310, 1-12.
- Neyrolles, O. & Guilhot, C. 2011. Recent Advances In Deciphering The Contribution Of Mycobacterium Tuberculosis Lipids To Pathogenesis *Tuberculosis*, 91, 187-195.
- Nicod, L. P. 2007. Immunology Of Tuberculosis. *Swiss Med Wkly*, 137, 357-62.

- Pakasi, T. A., Melani, A., Bramantyo, A., Putera, I., Syahmar, I., Karyadi, E. & Sahiratmadja, E. 2012. Distribution Of D543n Nramp1 Polymorphism In Tuberculosis Patients From Kupang, East Region Of Indonesia. *Medical Journal Of Indonesia*, Vol. 21, No. 3, August 160-6.
- Png, E., Alisjahbana, B., Sahiratmadja, E., Marzuki, S., Ron Nelwan, Balabanova, Y., Nikolayevskyy, V., Drobniewski, F., Nejentsev, S., Iskandar Adnan⁶, Vosse, E. V. D., Hibberd, M. L., Crevel, R. V., Ottenhoff, T. H. & Seielstad, M. 2012. A Genome Wide Association Study Of Pulmonary Tuberculosis Susceptibility In Indonesians *Bmc Medical Genetics* 13:5.
- Qidwai, T., Jamal, F. & Khan, M. Y. 2012a. Dna Sequence Variation And Regulation Of Genes Involved In Pathogenesis Of Pulmonary Tuberculosis. *Scand J Immunol*, 75, 568-87.
- Qidwai, T., Jamal, F. & Khan, M. Y. 2012b. Dna Sequence Variation And Regulation Of Genes Involved In Pathogenesis Of Pulmonary Tuberculosis. *Scandinavian Journal Of Immunology*, 568-83.
- Rajaram, M. V., Brooks, M. N., Morris, J. D., Torrelles, J. B., Azad, A. K. & Schlesinger, L. S. 2010. Mycobacterium Tuberculosis Activates Human Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Linking Mannose Receptor Recognition To Regulation Of Immune Responses. *J Immunol*, 185, 929-42.
- Sahiratmadja, E., Baak-Pablo, R., De Visser, A. W., Alisjahbana, B., Adnan, I., Van Crevel, R., Marzuki, S., Van Dissel, J. T., Ottenhoff, T. H. & Van De Vosse, E. 2007. Association Of Polymorphisms In Il-12/Ifn-Gamma Pathway Genes With Susceptibility To Pulmonary Tuberculosis In Indonesia. *Tuberculosis (Edinb)*, 87, 303-11.
- Schlesinger, L., Azad, A., Torrelles, J., Roberts, E., Vergne, I. & Deretic 2008. Determinants Of Phagocytosis, Phagosome Biogenesis And Autophagy For Mycobacterium Tuberculosis. *In: Kaufmann, S. & Britton, W. (Eds.) Handbook Of*

Tuberculosis. Immunology And Cell Biology. Weinheim, Germany: Wiley-Vch Verlag Gmbh&Co. Kгаа

Taylor, M. E., Conary, J. T., Lennartz, M. R., Stahl, P. D. & Drickamer, K. 1990. Primary Structure Of The Mannose Receptor Contains Multiple Motifs Resembling Carbohydrate-Recognition Domains. *J Biol Chem*, 265, 12156-62.

Torrelles Jb & Ls, S. 2010. Diversity In M. Tuberculosis Mannosylated Cell Wall Determinants Impacts Adaptation To The Host. *Tuberculosis*, 90(2), 84-93.

Welin, A. 2011. *Survival Strategies Of Mycobacterium Tuberculosis Inside The Human Macrophage.* Linköping University.

Who. 2013. World Tuberculosis Day, 24 March 2013.

Zhang, X., Jiang, F., Wei, L., Li, F., Liu, J., Wang, C., Zhao, M., Jiang, T., Xu, D., Fan, D., Sun, X. & Li, J.-C. 2012. Polymorphic Allele Of Human Mrcl Confer Protection Against Tuberculosis In A Chinese Population. *International Journal Of Biological Sciences*8(3), 375-382.

HUBUNGAN POLIMORFISME GEN *MACROPHAGE MANNOSE RECEPTOR*, KADAR INTERLEUKIN-8, DAN *TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β* DENGAN KEJADIAN TUBERKULOSIS PARU

ASSOCIATION OF MACROPHAGE MANNOSE RECEPTOR GENE POLYMORPHISM, INTERLEUKIN-8, AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β LEVEL WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Oleh:

Yani Triyani

NPM: 130130110021

DISERTASI

Untuk memperoleh gelar Doktor dalam Ilmu Kedokteran
Pada Universitas Padjadjaran
Dengan wibawa Rektor Universitas Padjadjaran
Dipertahankan pada tanggal 15 Agustus 2016
di Universitas Padjadjaran



**UNIVERSITAS PADJADJARAN
BANDUNG
2016**

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS) OF MACROPHAGE MANNOSE RECEPTOR GENE AS PROTECTIVE FACTOR OF ACTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS IN BANDUNG

Yani Triyani¹, Julia Hartati¹, Budiman¹, Nanan Sekarwana², Endang Sutedja²,
Dida Akhmad Gurnida², Maya Tejasari¹, Bacht Alisjahbana²
Faculty of Medicine Universitas Islam Bandung, ²Faculty of Medicine
Universitas Padjadjaran

Abstract

Macrophage Mannose Receptor (MMR) gene is Mannose receptor (MR) coder, which recognize the mannose-capped lipoarabinomannan (ManLAM), is the most virulent antigen of Mycobacterium tuberculosis (Mtb). The interaction between MR and ManLAM trigger an innate and adaptive immune response and produce pro and anti-inflammatory cytokine, which play a role in the pathogenesis of tuberculosis (TB) infection. MMR gene polymorphism is one of the risk factors for active pulmonary TB incidence. This study was aimed to determine the description of MMR gene polymorphism in patients with active and latent pulmonary tuberculosis have a correlation to pulmonary TB incidence.

The study was conducted in two phases. In the first phase MMR gene polymorphism was analyzed by using control case design consisting 148 subjects of the control group (patients with latent TB) and case group (patients with active pulmonary TB), each group had 74 subjects. The subject's venous blood was taken as 3mL for MMR gene DNA sequencing examination. and analysis. The study was conducted from February 2014 to January 2015 at the Teaching Hospital, Faculty of Medicine, Universitas Padjadjaran Bandung, a collaboration between research team TB-HIV Study Centre, Tuberculosis and Diabetes Mellitus (TANDEM) and Innate Factors in Early Clearance of Tuberculosis (INFECT) team. The analysis used Chi-square and odds ratio.

The study's result has shown, there was 5 single nucleotide polymorphism (SNPs) of MMR gene on both groups (G1186A, G1195A, T1212C, C1221G, and C1303T) and one SNP on the control group (C1323T) only. The MMR gene polymorphism factor that correlated to the incidence of active pulmonary TB was T1212C (Odds Ratio=0.253; CI 95%=0.111–0.575; p=0.001).

It can be concluded that there were 5 SNPs MMR gene (G1186A, G1195A, T1212C, C1221G, and C1303T) on both groups, MMR gene polymorphism on T1212C site associated with the incidence of pulmonary tuberculosis and were protective.

Keywords: Active pulmonary TB, latent TB, mannose-capped lipoarabinomannan (Man-LAM), Macrophage Mannose Receptor (MMR) gene, Polymorphism

Introduction

Mycobacterium tuberculosis (MTB) is one of the most successful bacteria that infect human, about one-third (two billion) of people in the world infected TB without symptom (latent TB).⁽¹⁻⁵⁾ TB coinfections with HIV increase about 50% reactivation of latent TB to be more active. Latent TB reactivation will increase if there are other factors, such as some gene polymorphisms on *M. tuberculosis* and host like on the *pattern recognition receptors* (PRRs) encoded gene, diabetes mellitus, cigarettes exposure, alcoholism, immunosuppressant drug using, pollution and intestinal worm infection.^(6,7)

An interaction between host immune response and defense mechanism conducted by MTB creates a balance of cytokine production and pro and anti-inflammation chemokine. This causes the pathogenesis of TB infection.⁽⁶⁾

Host immune response of MTB is started by recognizing microorganism antigen structure called *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). PAMPs are specifically recognized by receptors on a congenital immune system called *pathogen recognition receptors* (PRRs). PRRs are expressed on many effector cells such as macrophages, dendrite cell and lymphocyte cell. B^(1,2,8-12)

The most important pathogen associated molecular patterns on TB infection is the lipid riched-MTB cell wall structure, such as mannose-capped lipoarabinomannan (Man-LAM) which has immunogenic effects and is the most important virulence factor of MTB. The interaction between PAMPs and MTB can be recognized by a number of PRRS' role, namely the C-type lectins, toll-like receptors (TLRs), nucleotide oligomerization domain (NOD) like receptors (NLRs), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN), and Dectin-1.^(1,6,10,11)

C-type lectins are PRRS involved in recognizing pathogens polysaccharide structure with one of the most important receptors, mannose receptor (MR), which consists of eight bond identifier domains with one cysteine-rich domain on alveolar macrophages. MTB stimulation through MR creating a bridge between the natural and congenital immunity will be connected by setting the endosomal and phagosomal pathway and also the production of proinflammatory cytokines and chemokines. The most important of these are tumor necrosis factor α (TNF-

α), a family of interleukin (IL) -1, namely (IL-1 β , IL-18), IL-12 and INF γ , as well as anti-inflammatory cytokines of which IL-10 and transforming growth factor- β (TGF- β).^(1,6,9,11,12)

Based on Qidwai meta-analysis study, it was estimated that there are about 275 single nucleotide polymorphisms (SNPs) located on 19 genes that are involved in affecting protein structure and a person's vulnerability to being infected with TB.⁽¹³⁾ In addition, there is also a meta-analysis of Azad, it was explained that there are more than 50 genes that affect a person's susceptibility to TB disease.⁽¹⁴⁾

It has been reported in Vietnam and Brazil that exon 7 *macrophage mannose receptor/mannose receptor C type 1 (MMR/MRC-1)* gene polymorphism is effected on susceptibility of leprosy, asthma, and sarcoidosis.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

The study in China found that there are six *single nucleotide polymorphisms (SNPs) MMR / MRC-1* encoding MR and located on chromosome 10p12 consisted of 30 exons are associated with the incidence of pulmonary tuberculosis (G1186A, G1195A, T1212C, C1221G, C1303T, and C1323T) in exon 7 by using PCR and DNA sequencing method on pulmonary TB patients and a control group of healthy people. Allelic G1186A frequency (rs34039386) of MMR gene in Chinese population was higher in pulmonary tuberculosis patients than on the healthy control group. There were significant differences between the frequency distribution of the two groups ($P = 0.037$; OR = 0.76; 95% CI, .58-.98). The genotypic analysis also showed that genotype AG in the Chinese population was significantly correlated with pulmonary tuberculosis ($P < 0.01$; OR = 0.57; 95% CI, 0.37 to 0.87). This study firstly reported that the SNP in MMR genes may be associated with pulmonary tuberculosis in Chinese population and can reduce the risk of pulmonary tuberculosis.⁽¹⁸⁾

This study was aimed to determine the picture of MMR gene mutations and polymorphisms type in patients with active pulmonary TB and latent TB and to analyze the incidence of MMR gene polymorphism that is a risk factor for active pulmonary tuberculosis. There has not been yet a study about the role of MMR gene SNPs in Indonesia so it is expected that the study can be a basic addition mechanism of susceptibility to pulmonary TB disease in Indonesia.

Method

This study used a case-control with 148 subjects consisted of a control group (patients with latent TB) and a case group (patients with active pulmonary TB). Each group is 74 people. The study was conducted from February 2014 to January 2015 in TB research clinic of Teaching Hospital Faculty of Medicine, Universitas Padjadjaran Bandung. Schematically, the groove of subject selection can be seen in Figure 1.

The inclusion criteria for the case group were patients aged 15-55 years with clinical symptoms of pulmonary tuberculosis, sputum examination of positive acid-fast bacilli (AFB) with Ziehl Neelsen method by collecting samples during the early when, at least 2 times positive and positive smear culture. The inclusion criteria of the control group were latent TB patients aged 15-55 years who live together with people with TB, but do not have any complaints and symptoms of TB with the results of interferon gamma release assay (IGRA) is positive. Exclusion criteria were subject to disease conditions that interfered with the immunological response include diabetes mellitus, HIV / AIDS or were in the steroid treatment. Characteristics of research subjects can be seen in Table 1.

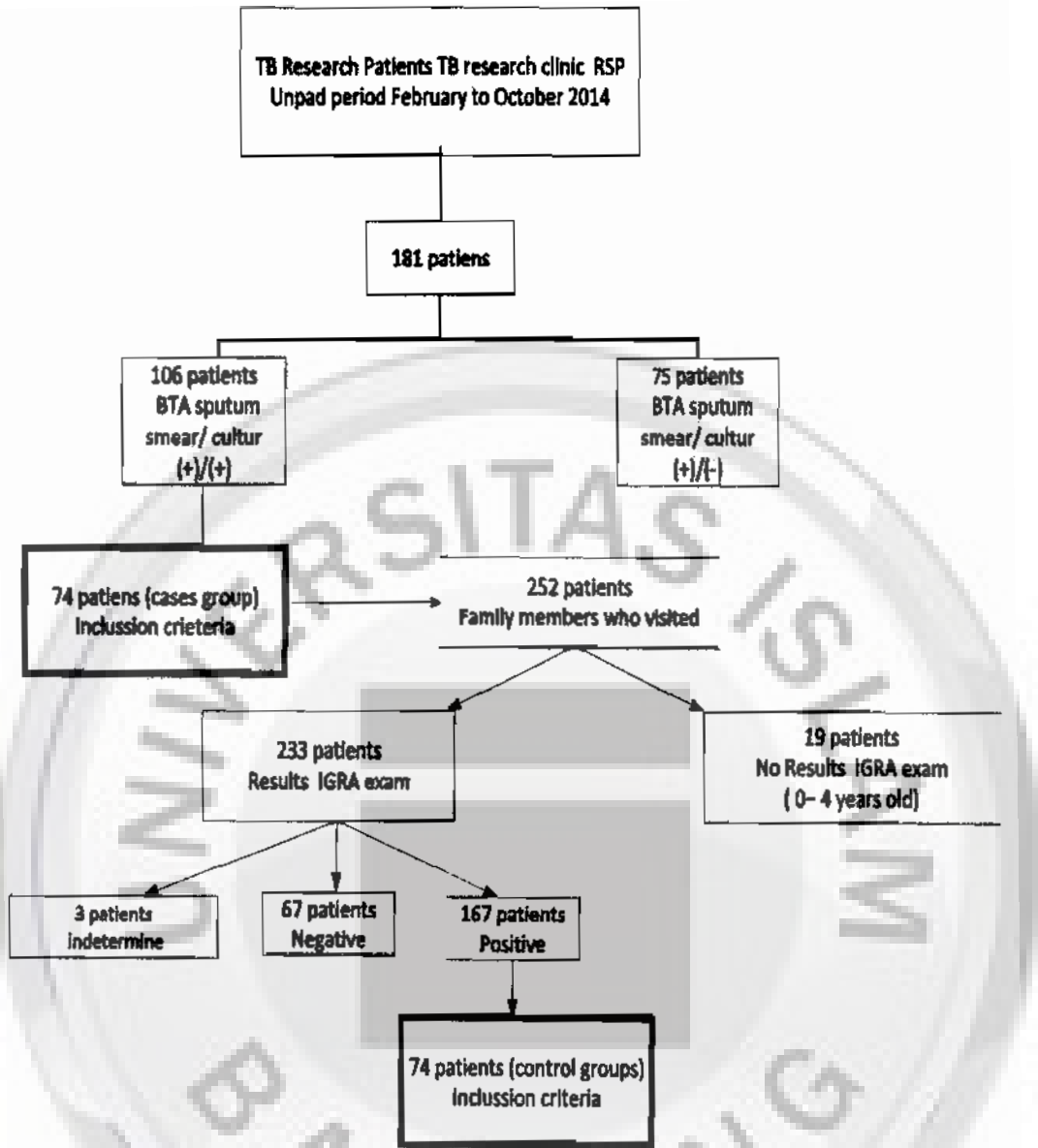


Figure 1. The Groove Scheme of Subject Selection

Table 1 The Characteristic of Case And Control Group Based on Age, Sex and Body Mass Index

Variable	Case (n = 74)	Control (n = 74)	Total (n = 148)	P value
Sex, frequency (%)				
Male	34 (46)	33 (45)	67 (45)	0.869 [§]
Female	40 (54)	41 (55)	81 (55)	
Age (year), median (JIK)	36 (17)	34 (19)	35 (19)	0.711 [#]
Aged Group, frequency (%)				
< 20 years old	5 (7)	8 (11)	13 (9)	0.775 [§]
20 – 29 years old	16 (22)	18 (24)	34 (23)	
30 – 39 years old	22 (30)	17 (23)	39 (26)	
40 – 49 years old	24 (32)	22 (30)	46 (31)	
50 – 59 years old	7 (9)	9 (12)	16 (11)	
IMT (kg/m ²), median (JIK)	17.83 (3.16)	23.73 (8.26)	19.46 (7.89)	< 0.001 [#]
IMT category, frequency (%)				
Underweight (< 18.5 kg/m ²)	47 (64)	11 (15)	58 (39)	< 0.001 [§]
Normal (18.5 – 24.99 kg/m ²)	25 (34)	28 (38)	53 (36)	
Overweight (≥ 25 kg/m ²)	2 (3)	35 (47)	37 (25)	

BMI = Body Mass Index; JIK = Interquartil space; [§] chi-square test; [#] Mann-Whitney Test

Both groups were taken about 3 mL of venous blood for examination of DNA isolation, PCR, and DNA sequencing.

MMR gene sequences were obtained using the NCBI Gene database and Ensemble Genome Browser database. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) information in the gene was acquired by using dbSNP database, while SNP frequency was by using the HapMap database.

DNA isolation used a DNA extraction kit (QIAamp DNA Blood Midi, Germany). PCR primers (20 bp long) were used to detect DNA fragments of MMR gene using "primer3" software. Confirmation was done using a gene bank basic local alignment search tool (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) to look at the possibility of primary mispriming with other areas on the MMR genes other than the region to be amplified.

The existence of MMR genes was detected using conventional PCR with DreamTaq master mix PCR reagent and gel-based PCR method. The PCR products were then performed by PCR purification and PCR clean up kit (Geneaid) then performed a DNA sequencing with ABI 3130xl genetic analyzer tool. Examination of exon 7 chromosome 10p MMR gene sequencing DNA was

conducted in Eijkman Biomolecular Institute in Jakarta. Data of sequencing results were calculated in proportion to the type of mutation and analyzed by chi-square test for assessing the odds ratio (OR) of each type of mutase by using R software.

Result

The results of DNA sequencing genes MMR exon 7 according to the information from the previous study were analyzed using DNA baser software. It was found 6 site mutations, namely G1186A (rs34039386, Gly396Ser), G1195A (rs71497223, Gly396-Ser), T1212C (rs71497224, Ile404Ile), C1221G (rs34284571, Leu407Phe), C1303T (Leu435 Phe), and C1323T (Asn441Asn) on both groups. The overview of MMR genes DNA sequencing in both groups, with baser DNA software as an example can be seen in Figure 2a-2f.

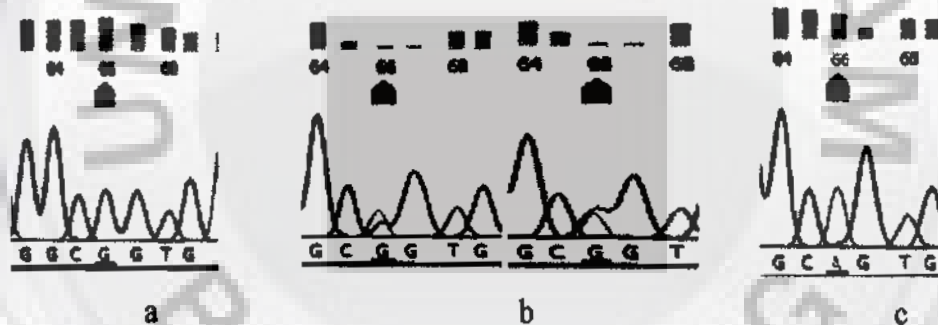


Figure 2a G1186A DNA sequencing on exon 7 MMR gene,
a Genotype G/G, b Genotype G/A, c Genotype A/A.

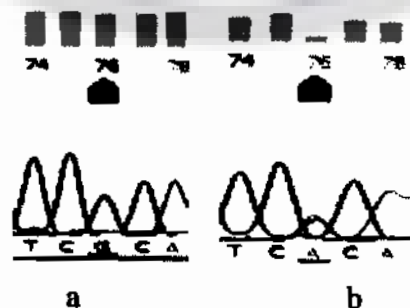


Figure 2b G1195A DNA sequencing on exon 7 MMR gene,
a Genotype G/G, b Genotype G/A

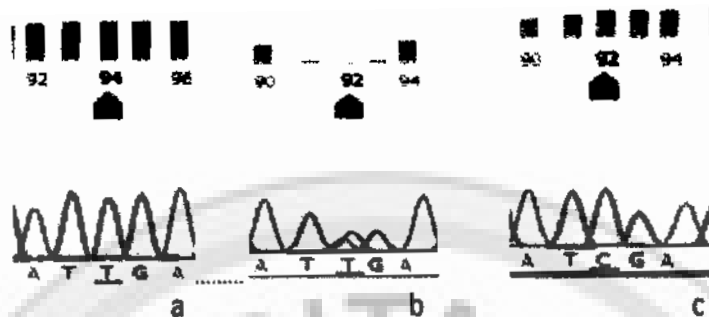


Figure 2c T1212C DNA sequencing on exon 7 MMR gene,
 a Genotype T/T b Genotype T/C, c Genotype C/C.

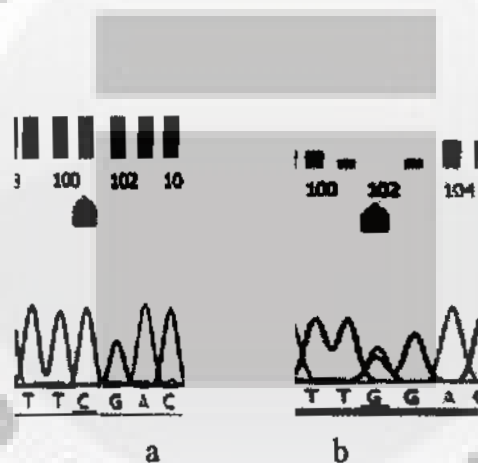
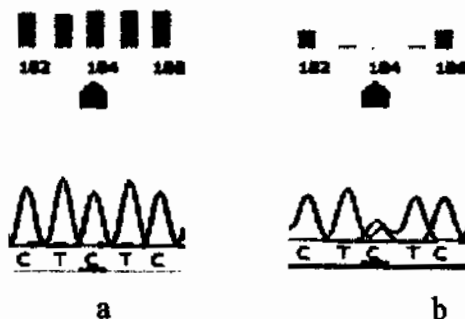
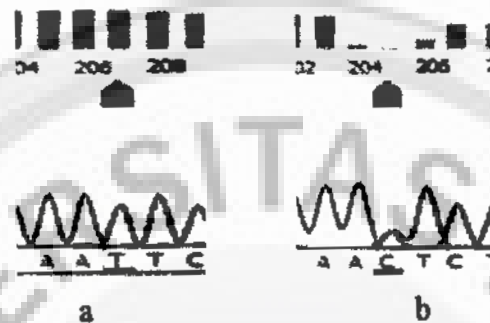


Figure 2d C1221G DNA sequencing on exon 7 MMR gene,
 a Genotype C/C b Genotype C/G



**Figure 2e C1303T DNA sequencing on exon 7 MMR gene,
a Genotype C/C b Genotype C/T**



**Figure 2f T1232C DNA Sequencing on exon 7 MMR gene ,
a Genotype T/T b Genotype T/C**

Having been found the MMR gene mutations, MMR gene polymorphisms confirmation was conducted in Asian populations using genome browser HapMap software.

On G1186A site sequentially, the frequency of genotype A/A 24% and 16%, on the case group was higher than on the control group (odds ratio = 1.313; 95% CI =0.515 to 3.347, $p = 0.569$). But the frequency of genotype G/A 43% and 55%, on the case group was lower than on the control group (OR= 0.6833; 95% CI =-0.324 to 1.440, $p = 0.316$)

On T1212C sites sequentially, the C/C and T/C genotype frequency on the case group was lower than on the control group (OR=0.171; CI 95% = 0.018 to 1.580, $p = 0.161$ and OR = 0,253; CI 95% = 0.111 to 0.575, $p = 0.001$).

On G1195A, C1221G, C1303T, and C1323T sites, there was no significant difference of genotype frequency in both groups, this can be seen in Table 2.

Table 2 The distribution of SNP Exon 7 Gen MMR Genotype Frequency

SNP Site	Genotype	Case group		Control group		P value	OR (CI 95%)
		n	frequency (%)	n	frequency (%)		
G1186A	GG	24	32	21	28	-	Reference
	AA	18	24	12	16	0.569	1.313 (0.515; 3.347)
	GA	32	43	41	55	0.316	0.683 (0.324; 1.440)
G1195A	GG	71	96	71	96	-	Reference
	AA		0	-	0	1	1 (0.019; 51.091)
	GA	3	4	3	4	1	1 (0.219; 4.560)
T1212C	TT	63	85	43	58	-	Reference
	CC	1	1	4	5	0.161	0.171 (0.018; 1.580)
	TC	10	14	27	37	0.001	0.253 (0.111; 0.575)
C1221G	CC	72	97	72	97	-	Reference
	GG	-	0	-	0	1	1 (0.019; 51.081)
	GC	2	3	2	3	1	1 (0.168; 5.948)
C1303T	CC	72	97	70	95	-	Reference
	TT	-	0	-	0	1	1.028 (0.020; 52.541)
	CT	2	3	4	5	0.681	1.851 (0.3811; 8.991)
C1323T	CC	74	100	72	97	-	Reference
	TT	-	0	-	0	1	1.028 (0.020; 52.481)
	CT	-	0	2	3	0.681	1.850 (0.381; 8.975)

Note:

The analysis of genotype difference between patient group and control group was conducted by using chi-square test if the assumption was fulfilled or by using Fisher Exact if the assumption of chi-square was not fulfilled.

The frequency of the C allele at the site of T1212C on the case group was lower than on the control group. The frequency was statistically significant (0.081 and 0.236) with odds ratio = 2.982; CI 95% = 1484-5993. $p = 0.002$). The frequency of alleles at the site G1186A, G1195A, C1221G, C1303T, and C1323T was not significantly different between the two groups. This can be seen in Table 3.



Table 3
The distribution of *MMR Gene Exon 7* SNP Allele Frequency on Case and Control Group

SNP sites	Allele	Case Group		Control Group		P Value	OR (IK 95%)
		n	Frequency	n	Frequency		
G1186A	G	80	0.541	83	0.561	-	1.00
	A	68	0.459	65	0.439	0.726	0.921(0.583–1.457)
	HWE (P)	0.266		0			
G1195A	G	145	0.980	145	0.980	-	1.00
	A	3	0.020	3	0.020	1.000	1.00 (0.199–5.037)
	HWE (P)	0.859		1			
T1212C	T	136	0.919	113	0.764	-	1.00
	C	12	0.081	35	0.236	0.002	2.982 (1.484–5.993)
	HWE (P)	0.423		1			
C1221G	C	146	0.986	146	0.986	-	1.00
	G	2	0.014	2	0.014	1.000	1.00 (0.139–7.195)
	HWE (P)	0.906		1			
C1303T	C	146	0.986	144	0.973	-	1.00
	T	2	0.014	4	0.027	0.684	2.028 (0.366–11.244)
	HWE (P)	0.906		1			
C1323T	C	148	1.000	146	0.986	-	1.00
	T	0	0.000	2	0.014	0.498	5.068 (0.241–106.477)
	HWE (P)	0.00		1			

Note:

All difference analysis between patient and control group was conducted by using chi-square test if the assumption was fulfilled or by using Fisher Exact if the chi-square test's assumption was not fulfilled HWE: Hardy-Weinberg equilibrium

Discussion

The characteristic of study's subject (Table 1) on the case and the control group based on sex. the male subjects.that were 34 male subjects (46%) in the case group and 33 male subjects (45%) in the control group was less than female subjects. that were 40 female subjects (54%) on case group and 41 female subjects (55%) on control group but this difference was not statistically significant. If it was seen based on aged group. there was median aged. 36 years old. with 19

interquartile distance in the case group. while in the control group. there was median aged. 34 years old. with 19 interquartile distance.

According to the characteristic of Body Mass Index (BMI). the underweight condition was the most in the case group. that is 47 subjects (64%). while on control group. 35 subjects (47%) that experience overweight of BMI ($\geq 25 \text{ kg/m}^2$). This was accordance with the previous study. It was stated that BMI was related to the nutrition status which was one of the influential factor on host body resistant in defending microorganism attacking someone's body such as TB. The low body mass index is one of risk factor of TB infection. However. good IMT did not guarantee someone was free of TB infection. It could be seen that most of control group with IGRA (+) had good IMT status and overweight^(19,20).

This study showed that there were six SNPs in exon 7 G1186A (rs34039386. Gly396Ser). G1195A (rs71497223. Gly396Ser). T1212C (rs71497224. Ile404Ile). C1221G (rs34284571. Leu407Phe). C1303T (Leu435 Phe). dan C1323T (Asn441Asn) MMR gene. In addition. it was found that there were two mutations. *transitions* and *transversions*. *Transitions* are mutation changes of the same base couple. pain to purine (A become G or G become A) or from pyrimidine to pyrimidine (C become T or T become C). This occurred on 2 sites .G1186A. G1195A. T1212C. C1303T. and C1323T. Only one site that experienced transversion was nitrogen base changes which caused base couple changes. purine to pyrimidine (G become C; G become T; A become C or A become T) or from pyrimidine to purine (C become G; C become A; T become A at T become G). This was found on T1221C site.

In this study. there were polymorphisms of a gene which can change protein produced by gene so it could lower its function. There was also polymorphism which was influenced by ethnic. race. and geographic. This was accordance with the previous study in China reporting that MR played an important role in congenital and adaptive immunity. This receptor activated immune response by recognizing extracellular carbohydrate which bond glycan from pathogen microbe structure and could play an important role causing TB infection. Six SNPs in exon 7 from MRC1 gene were analyzed. That study showed that genotype frequency ($P = 0.037$; $OR = 0.76$; $95\% \text{ CI}: 0.58-0.98$) and

allele ($P < 0.01$; OR = 0.57; 95% CI:0.37–0.87) were statistically significant. OR genotype and allele value for G1186A were less than 1. It indicated that MMR gene polymorphism had an effect on pulmonary TB development and could reduce the risk of pulmonary TB. (18.19)

G1186A site of *MMR* gene was a non-identical mutation that could change Gly amino acid into Ser. This site mutation could change MR function that could influence MR protein bind of polysaccharide structure on MTB surface. Therefore, it gave a contribution to anti-inflammation factor secretion. Different from the previous study in China, it indicated that 5 sites of other SNPs of MMR gene [G1195A (rs71497223, Gly396Ser), T1212C (rs71497224, Ile404Ile), C1221G (rs34284571, Leu407Phe), C1303T (Leu435Phe), and C1323T (Asn441Asn) did not show a significant relationship with pulmonary TB ($P > 0.05$). The study also showed that polymorphism site was not related to the susceptibility to pulmonary TB. However, in this study, it was found that there was a significant difference between the case group and the control group. T1212C (rs71497224, Ile404Ile), respectively genotype frequency T/T, C/C, and T/C on the case group, 85%; 1%; and 14% while on the control group 58%; 5%; and 36%. T/C genotype frequency in the case group was lower than on the control group (odd ratios=0.253; CI 95%=1.111–0.575, $p=0.001$).

This indicated that AA dominant mutation more often occurred in pulmonary TB patients than on latent TB. However, this incident has not been meant significantly because of $P > 0.05$. This was caused by the total of study; subject has not been enough. This condition indicated that G1186A played an important role on pulmonary TB appropriate with the previous study in China. (18.21)

Dominant and recessive mutation model on G1195A, C1221G, C1303T, and C1323T sites on both groups were not different from the previous study.

Alter et al. found that the frequency of allele SNP G1186A exon 7 of the MMR gene had significant differences between the leprosy patients as case group and healthy people as a control group in the Vietnamese population ($P = 0.036$; OR = 0.76; 95% CI = 0.60 to 0.96). Because OR value was less than 1, the results showed that the site had a significant protective role for leprosy and could reduce

the risk of infection. Similarly, it was found that G1186A SNP allele frequency on leprosy as case group was different from healthy people as a control group in the population of Brazil ($P = 0.016$; $OR = 1.34$; $95\% CI: 1.06$ to 1.70).⁽¹⁵⁾ OR value more than 1 indicated that the polymorphism was associated with the susceptibility to leprosy. Hattori et al reported that the frequency of G1186A SNP allele in exon 7 of the MMR gene was not significantly associated with the incidence of asthma in the Japanese population. This suggested that differences in genetics as a key factor in differences in individual's susceptibility to disease and gene polymorphism. In the study, it could be concluded that the MMR gene polymorphism G1186A SNP was associated with TB and may have a protective function.⁽¹⁶⁾

There was no associated between SNPs exon 7 on G1195A, C1221G, C1303T, and C1323T MMR gene and the incidence of pulmonary tuberculosis. Therefore, further research is needed to analyze SNPs on MMR gene with more samples. It is expected that the relationship of MMR gene SNP with the incidence of pulmonary tuberculosis in both groups can be statistically significant. It is still needed to look for more practical methods other than DNA sequencing, such as PCR TaqMan method or DNA sequencing using restriction fragment length polymorphism enzymes. In addition, it is also proposed an analysis of pro-inflammatory cytokine and anti-inflammatory cytokine level that are influenced by the expression of mannose receptor on the whole subject of study so can further clarify the mechanism of the effect of genetic variation on cytokine products and the incidence of pulmonary tuberculosis

Conclusion

It can be concluded that there were 5 SNPs MMR gene (G1186A, G1195A, T1212C, C1221G, and C1303T) on both groups, MMR gene polymorphism on T1212C site associated with the incidence of pulmonary tuberculosis and were protective.

Acknowledgments

9. Saiga H. Shimada Y. Takeda K. 2011. Review Article Innate Immune Effectors in Mycobacterial Infection. *Clinical and Developmental Immunology*. Volume 2011:1-8.
10. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway PAMPs M.tuberculosis and PR. Tersedia date: www.genome.jp/kegg/pathway
11. Abbas AK. Litcman AH. Pillai S. editors.. 2007. *Immunity To Microbe. Cellular and molecular immunology*
12. Janeway Charles A MK. Travers P. Walport M editor. 2012. *Janeway's Immunobiology*. 8th ed. London & New York: Garland Science.
13. Qidwai T. Jamal F. Khan MY. DNA Sequence Variation and Regulation of Genes Involved in Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis *Scandinavian Journal of Immunology*. 2012:568-83.
14. Azad AK. Sadee W. Schlesinger LS.. 2012. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun*. 80(10):3343-59. PubMed PMID: 22825450. Pubmed Central PMCID: 3457569.
15. Alter A. Leseleuc Ld. Thuc NV. Thai VH. et all.. 2010. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet*.127:337-48.
16. Hattori T. Konno S. Hizawa N. 2009. Genetic variants in the mannose receptor gene (MRC1) are associated with asthma in two independent populations. *Immunogenetics* 61:731-8.
17. Hattori T. Konno S. Takahashi A. et all.. 2010. Genetic variants in mannose receptor gene (MRC1) confer susceptibility to increased risk of Sarcoidosis. *BMC Med Genet* 11: 151.
18. Zhang X. Jiang F. Wei L. et all.. 2012. Polymorphic Allele of Human MRC1 Confer Protection against Tuberculosis in a Chinese Population. *International Journal of Biological Sciences* 8(3):375-82.

19. Ilavská S. Horváthová M. Szabová M. Nemessányi T. Jahnová E. Tulinská J. et. al 2012. Association Between The Human Immune Response and Body Mass Index. Hum Immunol; 73(5): 480-5. doi: 10.1016/j.humimm.02.023
20. Zheng W. McLerran. Rolland B. Zhang X. Inoue M. Matsuo K. et.al.2011. Association between Body-Mass Index and Risk of Death in More Than 1 Million Asians. N Engl J Med. vol 36
21. Zhang X . Li X. • Zhang W. Wei L. Jiang T. Chen Z. et.al. The novel human MRC1 gene polymorphisms are associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Chinese Uygur and Kazak populations . Mol Biol Rep (2013) 40:5073–5083. DOI 10.1007/s11033-013-2610-7•

