

DISERTASI

VARIAN GENOTIP GEN *NRAMP1* DAN EKSPRESI PROTEIN NRAMP1 PADA PERAWAT DAN PENDERITA TUBERKULOSIS PARU



RAHAYU ANGGRAINI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008**

DISERTASI

VARIAN GENOTIP GEN *NRAMP1* DAN EKSPRESI PROTEIN NRAMP1 PADA PERAWAT DAN PENDERITA TUBERKULOSIS PARU

RAHAYU ANGGRAINI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008**

**VARIAN GENOTIP GEN *NRAMP1* DAN
EKSPRESI PROTEIN NRAMP1 PADA
PERAWAT DAN PENDERITA
TUBERKULOSIS PARU**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari: Selasa
Tanggal: 29 April 2008**

Oleh:

**RAHAYU ANGGRAINI
NIM: 090315212D**

Lembar Pengesahan

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI UNTUK UJIAN TERBUKA
TANGGAL 29 APRIL 2008**

Oleh

Promotor



Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS.
NIP. 130934628

Ko-Promotor I



Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK
NIP. 131406054

Ko-Promotor II



Dr. I Ketut Suidiana, drs., M.Si
NIP. 130877636

Telah diuji pada Ujian Disertasi Tahap I (Tertutup)
Tanggal 25 Maret 2008

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Kuntoro, dr., M.PH., Dr.PH

Anggota : 1. Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS
2. Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK
3. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., M.Si
4. Dr. H.M. Rasjad Indra, dr. , MS
5. Dr. J.F. Palilingan, dr., Sp.P
6. Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK(K)
7. Dr. Elyana Asnar, dr., MS

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomer: 3055/J03/PP/2008
Tanggal: 3 April 2008**

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga disertasi ini dapat selesai dengan baik. Banyak hambatan dan tantangan ketika menyelesaikan disertasi ini, namun berkat bimbingan, bantuan moril dan materiil serta dorongan dari berbagai pihak, akhirnya semua rintangan tersebut dapat teratasi.

Dengan segala kerendahan hati, perkenankan saya menyampaikan terimakasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS. selaku promotor yang dengan penuh kesabaran, ikhlas, dan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan, dan saran yang besar sekali manfaatnya bagi kemajuan cara berfikir ilmiah saya, memberikan kemampuan untuk melakukan analisis yang tajam, memberikan arahan dalam menyusun kerangka konseptual penelitian, memberi bekal dalam menyusun presentasi ilmiah yang efektif. Sikap dan kepribadian beliau mengagumkan dan patut dihormati. Beliau juga memberi suri tauladan menjadi ilmuwan yang berwawasan luas. Semoga Allah Yang Maha Kuasa senantiasa melimpahkan berkah dan rahmat yang sebesar-besarnya kepada beliau.

Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK , sebagai Ko-promotor I yang telah memberikan bimbingan dan saran, terutama memberikan arahan yang sangat mendasar dalam menyusun karya ilmiah, hasil pemeriksaan awal, dan pemeriksaan biologi molekuler, serta kesediaan memberikan berbagai informasi dalam menyusun disertasi yang sangat bermanfaat bagi

kesempurnaan disertasi ini, untuk ini saya ucapkan terimakasih yang sedalam-dalamnya serta penghargaan yang setinggi-tingginya.

Dr. I Ketut Suidiana, drs., M.Si, sebagai ko-promotor II yang banyak memberikan masukan penting dan mendasar dari bidang keahliannya Imunositokimia yang sangat bermanfaat bagi peningkatan mutu disertasi ini dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran, serta memberikan dukungan mental, meluangkan banyak waktu untuk berdiskusi, saya mengucapkan banyak terimakasih yang tak terhingga.

Selesainya disertasi ini perkenankan saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

Pemerintah Republik Indonesia cq. Menteri Pendidikan Nasional melalui Tim Managemen Program Doktor yang telah memberikan beasiswa, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan pendidikan ini.

Badan Litbangkes Departemen Kesehatan Republik Indonesia bersama Lembaga Biologi Molekuler Eijkmann yang telah menyediakan anggaran penelitian, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan disertasi ini.

Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt, selaku Rektor Universitas Airlangga, dan mantan Rektor Prof. Dr. Med Puruhito, dr., Sp.KV yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Hj. Sri Hajati, SH., MS selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan mantan Direktur Program Pascasarjana Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., Sp.P(K), juga Prof. Dr. Laba Mahaputra, drh., M.Sc selaku Asisten Direktur Bidang Akademik, serta seluruh pimpinan dan staf

Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk menjadi mahasiswa Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Harjanto JM, dr., AIFM selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Prof. Dr. Mandoyo Rukmo, drg., M.Sc dan Prof. Dr. Yuliati Hood Alsagaf, dr., MS., Sp.PA, FIAC yang telah membantu dalam proses pelaksanaan ujian kualifikasi dan proposal serta disertasi.

Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., Sp.P(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, dan mantan Dekan Prof. Dr. HMS Wiyadi, dr., Sp.THT(K), serta Dr. Slamet Riyadi Yuwono, dr., DTMH, MARS selaku Direktur RSUD Soetomo yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Kuntoro, dr., MPH, Dr.PH selaku Konsultan, dan Dr. Rr. Soenartalina Melaniani, Ir., M.Kes; Mahmudah, Ir., M.Kes dari Bagian Biostatistik dan Kependudukan Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Airlangga yang telah membimbing dan memberi saran yang sangat berharga dalam metode penelitian serta analisis data dan interpretasinya.

Dr. J.F. Palilingan, dr., Sp.P selaku Konsultan dalam Ilmu Penyakit Paru yang dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran, serta memberikan dukungan yang sangat bermanfaat bagi peningkatan mutu disertasi ini.

Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK(K) selaku Konsultan dalam Ilmu Patologi Klinik yang telah memberikan arahan penelitian dengan penuh

pengertian, perhatian dan kesabaran, serta memberikan dukungan mental, meluangkan banyak waktu untuk berdiskusi yang sangat bermanfaat bagi peningkatan mutu disertasi ini.

Dr. HM Rasjad Indra, dr., MS selaku Kepala Laboratorium Ilmu Faal Universitas Brawijaya Malang, yang dengan sabar memberikan petunjuk pelaksanaan dalam tahapan pemeriksaan Imunositokimia yang dikuasainya.

Kepala Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Fery Hudowo Soedewo, dr., MS., Sp.PK(K) dan mantan Kepala Laboratorium Patologi Klinik, SP. Edijanto, dr., Sp.PK(K) yang telah memberikan kesempatan dan dukungan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga, juga Juli Soemarsono, dr., Sp.PK selaku Direktur Laboratorium Medis "Klinika" Surabaya yang telah membantu untuk melakukan pemeriksaan Faeces lengkap, Hb, BUN, Creatinine, Glukosa, HIV, dan Foto Thorax terhadap sampel penelitian ini.

Prof. Hood Alsagaff, dr., Sp.P. selaku Ketua Bagian Ilmu Penyakit Paru dan Prof. Dr. Benyamin Palgunadi M., dr., Sp.P(K), selaku Kepala Ruangan, dan Ibu Sjenie selaku Kepala Perawat Ruang Paru Laki, serta Ibu Wardjiati selaku Kepala Perawat Ruang Paru Wanita RSUD Dr. Soetomo/FK Universitas Airlangga yang telah membantu untuk melakukan pemeriksaan uji PPD dan pengambilan sampel penelitian ini.

Dr. Tahan Hutapea, dr. selaku Direktur RS Paru Karang Tembok Surabaya, Drs. Ec. Koeshartono, SH, MM. Selaku Kepala BP4, Bapak Pietra selaku Pimpinan dan Staf Administrasi, serta Ibu Ellya selaku Kepala Perawat Ruang Paru, serta Ibu Ervina selaku perawat pelaksana program DOTs di

Poli Dot Rawat Jalan, beserta teman-teman di laboratorium RS Paru Karang Tembok Surabaya yang telah membantu tanpa lelah melakukan pengambilan sampel penderita TB paru untuk penelitian ini.

Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD selaku Ketua *Institute Of Tropical Diseases*, dan mantan Ketua ITD, Prof. Dr. Yoes Priyatna Dachlan, dr., M.Sc. beserta staf: Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D selaku Ketua Direktorat Riset Dasar ITD, dan Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr., M.S., Sp.MK, selaku Sekretaris Eksekutif Riset Terapan dan Dasar ITD; Dr. J.F. Palilingan, dr., Sp.P selaku Kepala Laboratorium Tuberkulosis ITD; Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK, Lindawati Alimsardjono, dr., M.Kes; Dadik Rahardjo, drh., M.Si; Wahyu Hidayatiningsih, S.Si., M.Kes; Sugeng Haryono, Amd yang telah berkenan memberikan kesempatan dan bimbingan untuk melakukan pemeriksaan uji BTA, kultur LJ Medium, kultur *Middlebrook*, Isolasi DNA, PCR, dan RFLP terhadap sampel penelitian ini.

Dr. I Ketut Sudiana, drs., M.S. selaku Kepala Unit Pelaksana Teknis (UPT) Mikroskopi Elektron dan Lenny Irawati, Amd di laboratorium Gramik Universitas Airlangga yang telah berkenan memberikan kesempatan dan bimbingan untuk melakukan pemeriksaan uji Imunositokimia.

Staf pengajar Program Pascasarjana Universitas Airlangga tahun 2003/2004, Prof. Dr. Lasiyo; Widodo Jatim Pujiraharjo, dr., MS, MPH, Dr.PH; Fuad Amsyari, dr., MPH., Ph.D; Prof. Soegeng Soekamto Martoprawiro, dr., MS, Sp.PA, Ph.D (Alm); Siti Pariani, dr., MS., M.Sc, Ph.D; Prof. H. Ari Gunawan, dr., MS., Ph.D; Aucky Hinting, dr., Ph.D, Sp.And; Prof. Dr. H. A. Zainuddin, drs., Apt; Prof. Dr. Joseph Glinka, SVD; Prof. Dr. L. Dyson P., MA; Dr. F. Sustini, MD., MS; Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr.; Prof. Dr.

Soehartono Taat Putra, dr., MS.; Prof. Kuntoro, dr., MPH., Dr.PH; Dr. I Ketut Sudiana, drs., M.Si; Prof. Soedarto, dr., D.TMH, Ph.D; Widya Asmara, drh., MS., Ph.D (Universitas Gajah Mada Yogyakarta) yang telah memberikan kuliah, tugas, dan diskusi selama masa pendidikan di program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Seluruh rekan pada program studi Ilmu Kedokteran Program Pacasarjana Universitas Airlangga yang telah bekerjasama dan saling memberi motivasi untuk menyelesaikan pendidikan ini.

Seluruh rekan di Laboratorium Patologi Klinik, *Institute of Tropical Diseases*, di Ruang Paru Laki dan Perempuan RSUD Dr. Soetomo, Di Laboratorium, Ruang, dan Poli Paru RS Karang Tembok dan Laboratorium Medis Klinika, yang dengan penuh semangat membantu pelaksanaan demi kelancaran penelitian ini.

Akhirnya dalam kesempatan ini saya sampaikan rasa hormat dan penuh kasih sayang kepada:

Orangtua saya tercinta ayahanda alm. Ronald Piet Andrew Meulenhoff, dan ibunda Zaidatun Nasbah yang telah mengasuh, mendidik, dan memberi sari tauladan yang baik dengan penuh kasih sayang mendukung pendidikan saya hingga saat ini. Juga kepada mertua saya ayahanda alm. Idrus Mulachela dan ibunda alm. Aluyah Alhabsyi yang sangat mendukung saya untuk menempuh pendidikan S1, S2, dan S3.

Ke-enam saudara kandung saya terkasih, Ina Daryati, B.Sc; Dra. Erni Rochiani; Terry Komaryari; Thelma Herlina, MM; Enny Andreany, dan Nancy Claudiana, SE yang selalu saling membantu dalam menjalani kehidupan dan pendidikan.

Kasih sayang dan terima kasih kepada suami tercinta Abdullah Mulachela, SE dan kelima anak terkasih Zakaria Perkasa Mulachela, Idrus Satria Mulachela, Adnan Kharisma Mulachela, Isa Agung Putra Mulachela, dan Adam Gagah Putra Mulachela yang telah memberikan dorongan, pengertian, pengorbanan, dan iringan doa kepada saya untuk dapat segera menyelesaikan pendidikan doktor ini.

Akhirnya melalui perjalanan panjang hingga terselesaikan disertasi ini, saya mohon dengan kerendahan hati atas segala sesuatu yang kurang berkenan untuk dimaafkan. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karuniaNya kepada semua pihak yang telah membantu dengan tulus ikhlas, Amin.

RINGKASAN

VARIAN GENOTIP GEN *NRAMP1* DAN EKSPRESI PROTEIN *NRAMP1* PADA PERAWAT DAN PENDERITA TUBERKULOSIS PARU

Tuberkulosis masih menduduki peringkat pertama sebagai penyebab kematian dari penyakit infeksi, dengan perkiraan 8-9 juta kasus baru terjadi di dunia setiap tahun. Studi epidemiologi menunjukkan kurang dari 10% dari individu yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* akan berkembang menjadi TB Paru (Aditama, 2000) dan hanya sejumlah kecil dari penderita ini yang mempunyai faktor risiko penyakit *Diabetes Melitus* (DM) dan *Human immunodeficiency virus* (HIV), sedangkan lainnya dipengaruhi faktor genetik dan lingkungan, di mana kedua faktor ini berkontribusi menimbulkan penyakit tuberkulosis. Berpijak pada landasan ini, identifikasi faktor genetik untuk mengetahui kerentanan dan kekebalan terhadap *M. tuberculosis*, dalam hal ini difokuskan pada varian genotip gen *natural resistance associated macrophage protein-1* (*NRAMP1*) dan ekspresi protein *NRAMP1* pada *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) perawat yang merawat penderita TB paru ≥ 2 tahun dan penderita TB paru, sehingga dapat diketahui gen kebal atau gen rentan terhadap penyakit tuberkulosis paru.

Metode penelitian ini bersifat *observational crosssectional analytic* dengan populasi penelitian di RS Karang Tembok dan RSUD Dr. Soetomo, Surabaya. Jumlah sampel penelitian 43 orang perawat dan 69 penderita TB paru yang telah memenuhi kriteria inklusi.

Tujuan umum penelitian ini adalah menjelaskan ada keterkaitan antara varian genotip gen *NRAMP1* dengan kerentanan (atau kekebalan) terhadap penyakit tuberkulosis paru pada manusia.

Tujuan khusus adalah membuktikan ada perbedaan distribusi frekuensi varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* antara kelompok penderita TB paru dan perawat, membuktikan ekspresi protein *NRAMP1* pada makrofag kelompok perawat lebih tinggi daripada ekspresi protein *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru, membuktikan ada perbedaan ekspresi protein *NRAMP1* antara varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat, membuktikan ada perbedaan ekspresi protein *NRAMP1* antara varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru, membuktikan ada interaksi antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/+, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat, membuktikan ada interaksi antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/+, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru, membuktikan ada hubungan antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/+, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat, membuktikan ada hubungan antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/+, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.

Karakteristik sampel penelitian, bahwa distribusi usia terbanyak pada rentang usia 25-45 tahun di mana pada perawat sebesar 60,5% (26/43) dan 65,2% (45/69) pada penderita TB paru. Distribusi jenis kelamin terbanyak perempuan pada perawat sebesar 58,1% (25/43) dan terbanyak laki-laki sebesar 55,1% (38/69) pada penderita TB paru.

Hasil analisis perbedaan distribusi frekuensi varian genotip D543N gen *NRAMP1* antara kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru tidak terdapat perbedaan secara bermakna dengan nilai $p=0,098$ ($p>0,05$).

Hasil analisis perbedaan distribusi frekuensi varian genotip 3'UTR gen *NRAMP1* antara kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru terdapat perbedaan secara bermakna dengan nilai $p=0,007$ ($p<0,05$).

Hasil analisis perbedaan distribusi frekuensi varian genotip INT4 gen *NRAMP1* antara kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru tidak terdapat perbedaan bermakna dengan nilai $p=0,370$ ($p>0,05$).

Hasil analisis perbedaan ekspresi protein NRAMP1 antara kelompok perawat dan penderita TB paru terdapat perbedaan secara bermakna dengan nilai $p = 0,002$ ($p<0,05$).

Hasil analisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* pada kelompok perawat terdapat perbedaan secara bermakna dengan nilai $p=0,002$ ($p<0,05$).

Hasil analisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* dan pada kelompok penderita TB paru terdapat perbedaan secara bermakna didapat nilai $p=0,000$ ($p<0,05$).

Hasil analisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada perawat terdapat perbedaan secara bermakna didapat nilai $p=0,008$ ($p<0,05$).

Hasil analisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada penderita TB paru terdapat perbedaan secara bermakna didapat nilai $p=0,000$ ($p<0,05$).

Hasil uji perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok tidak terdapat perbedaan secara bermakna dengan nilai $p=0,592$ ($p>0,05$).

Hasil analisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru tidak terdapat perbedaan secara bermakna didapat nilai $p=0,125$ ($p>0,05$).

Hasil analisis interaksi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat, tidak terdapat interaksi, karena sebesar 73,63% tidak dapat dijelaskan oleh model.

Hasil analisis interaksi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru tidak terdapat interaksi, karena sebesar 64,86% tidak dapat dijelaskan oleh model.

Hasil analisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G genotip D543N, varian TGTG+/+ genotip 3'UTR meningkatkan

ekspresi protein NRAMP1 secara bermakna, sedangkan varian G/A genotip D543N, varian TGTG+/del, dan varian TGTGdel/del genotip 3'UTR menurunkan ekspresi protein NRAMP1 secara bermakna. Pada varian G/G genotip INT4 menurunkan ekspresi protein NRAMP1 dan varian G/C genotip INT4 meningkatkan ekspresi protein NRAMP1, namun tidak bermakna pada kelompok perawat.

Hasil analisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G genotip D543N, varian TGTG+/+ genotip 3'UTR meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 secara bermakna, sedangkan varian G/A genotip D543N, dan varian TGTGdel/del genotip 3'UTR menurunkan ekspresi protein NRAMP1 secara bermakna. Pada varian TGTG+/del genotip 3'UTR dan varian G/G genotip INT4 menurunkan ekspresi protein NRAMP1 dan varian G/C genotip INT4 meningkatkan ekspresi protein NRAMP1, namun tidak bermakna pada kelompok penderita TB paru.

Kesimpulan, distribusi frekuensi varian TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* lebih banyak terdapat pada penderita TB paru daripada perawat, dan varian TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* kuat menurunkan mengekspresikan protein NRAMP1 secara bermakna.

Saran, penelitian ini perlu dilanjutkan dengan menganalisis susunan basa dari varian TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* untuk dijadikan gen marker (probe) dari kit diagnostik untuk mengidentifikasi individu apakah mengandung gen penyebab kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis paru.

SUMMARY

NRAMP1 GENOTYPE VARIANT AND PROTEIN EXPRESSION IN NURSES AND PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS

Tuberculosis (TB) remains the first cause of death in infectious diseases. Approximately 8-9 million new cases occur worldwide. Epidemiological studies showed that less than 10% of *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals would develop to become pulmonary TB (Aditama, 2000) and only a few of these patients had the risk factor of Diabetes mellitus (DM) and Human Immunodeficiency Virus (HIV), while others were affected by genetic and environmental factors that contributed to the occurrence of TB. Based on these facts, the identification of genetic factors was undertaken to find the susceptibility and resistant against *M. tuberculosis*, which was focused on natural resistance associated macrophage protein-1 (*NRAMP1*) genotype variant gene and the expression of *NRAMP1* on PBMC (peripheral blood mononuclear cells) in nurses and pulmonary TB patients to find the resistant or susceptible gene against tuberculosis.

This was an crosssectional analytic observational study, observing population in Karang Tembok and Dr Soetomo Hospital, Surabaya. Total sample was 43 nurses and 69 pulmonary TB patients who met the inclusion criteria.

The general objective of this study was to explaining there is related between *NRAMP1* gene genotype variant with susceptibility (or impenetrability) to pulmonary tuberculosis disease of human being.

The particular objectives were to prove the difference between *NRAMP1* gene of the variant of D543N, 3'UTR, and INT4 genotypes in pulmonary TB patients and nurses; to prove that the *NRAMP1* protein expression in macrophage of nurses was higher than the expression of *NRAMP1* protein in macrophage of pulmonary TB patients; to prove the presence of difference between *NRAMP1* protein expression with D543N, 3'UTR, and INT4 genotype variant of *NRAMP1* gene in nurses; to prove the presence of difference between *NRAMP1* protein expression with D543N, 3'UTR, and INT4 genotype variance of *NRAMP1* gene in pulmonary TB patients; to prove the presence of interaction between the *NRAMP1* protein expression with the D543N genotype of G/G, G/A, A/A variant; 3'UTR genotype of TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del variant ; and INT4 genotype of G/G, G/C, C/C variant of *NRAMP1* gene in nurses; to prove the presence of interaction between the *NRAMP1* protein expression with the D543N genotype of G/G, G/A, A/A variance; 3'UTR genotype of TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del variant; and INT4 genotype of G/G, G/C, C/C variant of *NRAMP1* gene in TB patients; to prove the presence of correlation between the *NRAMP1* protein expression with the D543N genotype of G/G, G/A, A/A variance; 3'UTR genotype of TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del variance; and INT4 genotype of G/G, G/C, C/C variance of *NRAMP1* gene in nurses and, finally; to prove the presence of correlation between the *NRAMP1* protein expression with the D543N genotype of G/G, G/A, A/A variant; 3'UTR genotype of TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del variance; and INT4

genotype of G/G, G/C, C/C variant of the *NRAMP1* gene in pulmonary TB patients.

Sample characteristics are as follows: nurse distribution showed that most of them 60.6% (26/43) persons, aged 25-45 years, and pulmonary TB patients were 65.2% (45/69) patients. Sex distribution showed that most of the nurses with pulmonary TB patients 58.1% (25/43), were female, and pulmonary TB patients 55.1% (38/69) were male.

The results of difference analysis the *NRAMP1* gene of D543N genotype variance between nurses and pulmonary TB patients revealed no significant difference with $p=0.098$ ($P>0.05$).

The results of difference analysis the *NRAMP1* gene of 3'UTR genotype variance between nurses and pulmonary TB patients revealed significant different with $p=0.007$ ($P<0.050$).

The results of difference analysis the *NRAMP1* gene of INT4 genotype variance between nurses and pulmonary TB patients revealed no significant different with $p=0.370$ ($P>0.05$).

The results of difference analysis between the NRAMP1 protein expression in nurses and pulmonary TB patients revealed indicating significant different with $p=0.002$ ($p<0.05$).

The results of analysis between the NRAMP1 protein expression with the *NRAMP1* gene of D543N genotype of G/G, G/A, A/A variant in nurses revealed indicating significant different with $p=0,002$ ($p<0,05$).

The results of analysis between the NRAMP1 protein expression with the *NRAMP1* gene of D543N genotype of G/G, G/A, A/A variant in TB patients revealed indicating significant difference with $p=0,000$ ($p<0,05$).

The results of different analysis between the NRAMP1 protein expression with the *NRAMP1* gene of the 3'UTR genotype of TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del variant in nurses revealed indicating significant different with $p=0,008$ ($p<0,05$).

The results of difference analysis between the NRAMP1 protein expression with the *NRAMP1* gene of the 3'UTR genotype of TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del variance in pulmonary TB patients revealed indicating significant difference with $p=0,000$ ($p<0,05$).

The results of difference test revealed that NRAMP1 protein expression with the *NRAMP1* gene of the genotype INT4 of G/G, G/C, C/C variance in nurses revealing no significant different with $p=0,592$ ($p>0,05$).

The results of different analysis revealed that the NRAMP1 protein expression with the *NRAMP1* gene of genotype INT4 of G/G, G/C, C/C variant in pulmonary TB patients revealing no significant different with $p=0,125$ ($p>0,05$).

The results of interaction analysis of the NRAMP1 protein expression with the *NRAMP1* gene of D543N genotype of G/G, G/A, A/A variant; the 3'UTR genotype of TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del variant; and INT4 genotype of G/G, G/C, C/C variant in nurses revealed no interaction, because equal to 73,63% cannot be explained by the model.

The results of interaction analysis between the *NRAMP1* gene of D543N genotype of G/G, G/A, A/A variant; the variant 3'UTR genotype of TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del; and the INT4 genotype of G/G, G/C, C/C variant with the NRAMP1 protein expression in pulmonary TB patients

revealed no interaction, because equal to 64,86% cannot be explained by the model.

The results of correlation analysis between the NRAMP1 protein expression with the *NRAMP1* gene of D543N genotype of G/G, genotype 3'UTR of TGTG+/+ improving of the NRAMP1 protein expression revealed significant different, while the *NRAMP1* gene of D543N genotype of G/A, genotype 3'UTR of TGTG+/del and TGTGdel/del had degrading of the NRAMP1 protein expression revealed significant different. The *NRAMP1* gene of INT4 genotype of G/G had degrade of the NRAMP1 protein expression and INT4 genotype G/C had improve of the NRAMP1 protein expression, but revealed no significant difference in nurses.

The results of correlation analysis expression between the NRAMP1 protein expression with the *NRAMP1* gene of D543N genotype of G/G, and genotype 3'UTR of TGTG+/+ had improving of the NRAMP1 protein expression revealed significant different, while the *NRAMP1* gene of D543N genotype of G/A, and TGTGdel/del had degrading of the NRAMP1 protein expression revealed significant different. The *NRAMP1* gene genotype 3'UTR of TGTG+/del and INT4 genotype of G/G had degrade of the NRAMP1 protein expression, and INT4 genotype of G/C had improve of the NRAMP1 protein expression, but revealed indicating significant difference in pulmonary TB patients.

In conclusion, distribution of frequency of the *NRAMP1* gene of 3'UTR genotype of TGTGdel/del variant is more abundant in pulmonary TB patients, and had degrade of the NRAMP1 protein expression in pulmonary TB patients.

As suggestions, this study require to be continued with analysed formation of nucleotide sequence of the *NRAMP1* gene of 3'UTR genotype of TGTGdel/del variant to be made gene marker (probe) for diagnostic kit to identify individual, whether containing gene of cause of susceptance to of pulmonary TB disease.

ABSTRACT***NRAMP1* GENOTYPE VARIANT AND PROTEIN EXPRESSION IN PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS AND NURSES**

The relationship between natural resistance associated macrophage protein-1 (*NRAMP1*) genotype variant and susceptibility or resistance against pulmonary tuberculosis has not yet been explored in Indonesia. In order to prove this relationship, a research was conducted on 112 total samples consisting of 69 pulmonary tuberculosis patients and 43 pulmonary ward nurses from May 2006 until April 2007, as a observational - crosssectional analytic design.

This study was focused on observing the *NRAMP1* gene of genotype variant of D543N, 3'UTR, INT4 using PCR-RFLP method and the *NRAMP1* protein expression in macrophage using immunocytochemistry in both tuberculosis patients and pulmonary ward nurses group. The data obtained were analyzed towards difference, interaction and relationship between the *NRAMP1* gene of genotype variant of D543N, 3'UTR, INT4 and the *NRAMP1* protein expression, in both groups.

The result of *Chi-Square* analysis the *NRAMP1* gene of 3 UTR genotype of TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del variant between in nurses with in pulmonary TB patients revealed a significant difference with $p=0,007$ ($p<0,05$). The result of *Oneway Anova* analysis between the *NRAMP1* protein expression with the *NRAMP1* gene of 3 UTR genotype of TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del variant in pulmonary TB patients revealed a significant difference with $p=0.000$ ($p<0.05$).

In conclusion, the *NRAMP1* gene of 3'UTR genotype of TGTGdel/del variant occurs more frequently in tuberculosis patients than in nurses, and this variant had degrade of the *NRAMP1* protein expression.

Keywords : *NRAMP1* Gene – *NRAMP1* Protein – Pulmonary Tuberculosis

DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Prasyarat gelar	iii
Lembar Pengesahan	iv
Lembar Penetapan Panitia Penguji	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	xiii
Summary	xvi
Abstract	xix
DAFTAR ISI	xx
DAFTAR GAMBAR	xxv
DAFTAR TABEL	xxviii
DAFTAR LAMPIRAN	xxx
DAFTAR ARTI LAMBANG, SINGKATAN, DAN ISTILAH	xxxix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.4.1 Manfaat Teoritis	7
1.4.2 Manfaat Praktis	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Epidemiologi Tuberkulosis Paru	8
2.2 Patogenesis Tuberkulosis	9
2.3 Ciri <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
2.4 Respons Imun <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
2.4.1 Mekanisme bakterisidal pada makrofag teraktivasi	13
2.4.2 Respons limfosit T	15
2.4.3 Reaksi hipersensitivitas tipe lambat	21
2.5 Protein NRAMP1	22
2.5.1 Metabolisme Fe pada sel Inang	22
2.5.2 Peran NRAMP1 dan NRAMP2 dalam metabolisme besi di makrofag	25
2.5.3 Polimorfisme gen <i>NRAMP1</i> dan kaitannya dengan Tuberkulosis Paru	27

2.6 Dasar Pemeriksaan Diagnostik Tuberkulosis	30
2.6.1 Diagnostis Mikobakteriologis	31
2.6.2 Metoda <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	32
2.7 Analisis Biologi Molekuler	33
2.7.1 Ekstraksi DNA	34
2.7.2 Amplifikasi DNA	35
2.7.3 <i>Electrophoresis</i>	37
2.7.4 Analisis <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP)	38
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL	39
3.1.1 Kerangka Konseptual Penelitian (I)	39
3.1.2 Kerangka Konseptual Penelitian (II)	40
3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual	40
3.3 Hipotesis Penelitian	42
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	44
4.1 Jenis/Rancangan Peneltan yang digunakan	44
4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik pengambilan Sampel	44
4.2.1 Populasi Penelitian	44
4.2.2 Sampel Penelitan	44
4.2.3 Perhitungan Besar Sampel	45
4.2.4 Teknik Pengambilan Sampel	45
4.3 Variabel Penelitian, Klasifikasi Variabel, Definisi Operasonal ..	45
4.4 Bahan Penelitian	46
4.4.1 Kriteria inklusi untuk penderita TB paru	46
4.4.2 Kriteria inklusi untuk perawat	47
4.5 Reagen pada Penelitian	47
4.6 Instrumen Penelitian	48
4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian	49
4.7.1 Lokasi Penelitian	49
4.7.2 Waktu Penelitian	49
4.8 Prosedur Pengambilan Data	50
4.8.1 Penentuan varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen <i>NRAMP1</i>	50
4.8.2 Penentuan ekspresi protein NRAMP1 secara Imunositokima Di Lab. Gramik FK Unair	54
4.8.3 Uji statistik	56
4.9 Kerangka Operasional Penelitan	57
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN	58
5.1 Data penelitian	58
5.2 Analisis dan Hasil Penelitian	63

5.2.1	Distribusi frekuensi usia antara penderita TB paru dan perawat	63
5.2.2	Distribusi frekuensi jenis kelamin antara penderita TB paru dan perawat	64
5.2.3	Hasil Isolasi DNA dari monosit darah perifer (PBMC) perawat	65
5.2.4	Hasil Isolasi DNA dari monosit darah perifer (PBMC) penderita TB paru	66
5.2.5	Hasil amplifikasi DNA target D543N dan 3'UTR dari DNA perawat dan penderita TB paru	66
5.2.6	Hasil amplifikasi DNA target INT4 gen <i>NRAMP1</i> dari DNA perawat	68
5.2.7	Hasil PCR amplifikasi DNA target INT4 gen <i>NRAMP1</i> dari DNA penderita TB paru	69
5.2.8	Hasil <i>Genotyping</i> menggunakan teknik RFLP dari hasil amplifikasi PCR D543N dari PBMC penderita TB paru dan perawat	69
5.2.9	Hasil analisis perbedaan distribusi frekuensi antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen <i>NRAMP1</i> pada perawat	72
5.2.10	Hasil <i>Genotyping</i> menggunakan teknik RFLP dari hasil amplifikasi PCR 3'UTR dari PBMC penderita TB paru dan perawat	73
5.2.11	Hasil analisis perbedaan distribusi frekuensi antara varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> pada perawat	75
5.2.12	Hasil <i>Genotyping</i> menggunakan teknik RFLP dari hasil amplifikasi PCR INT4 dari PBMC penderita TB paru dan perawat	76
5.2.13	Hasil analisis perbedaan distribusi frekuensi antara varian G/G, G/C genotip INT4gen <i>NRAMP1</i> pada perawat	79
5.2.14	Hasil Uji Imunositokimia pada PBMC pada kelompok Perawat dan Penderita TB Paru	80
5.2.15	Hasil <i>independent T test</i> menganalisis perbedaan ekspresi protein <i>NRAMP1</i> antara kelompok perawat dan penderita TB paru	83
5.2.16	Hasil <i>One Way Anova</i> menganalisis perbedaan antara ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat	84
5.2.17	Hasil <i>Oneway Anova</i> menganalisis perbedaan antara ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian G/G, G/A, A/A	

genotip D543N gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok penderita TB Paru -----	85
5.2.18 Hasil <i>Oneway Anova</i> menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat -----	86
5.2.19 Hasil <i>Oneway Anova</i> menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok penderita TB paru -----	87
5.2.20 Hasil <i>Oneway Anova</i> menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada perawat -----	88
5.2.21 Hasil <i>Oneway Anova</i> menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada penderita TB paru -----	89
5.2.22 Hasil analisis univariat /Anova interaksi dua faktor menganalisis interaksi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat -----	90
5.2.23 Hasil analisis univariat /Anova interaksi dua faktor menganalisis interaksi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok penderita TB paru -----	91
5.2.24 Hasil analisis korelasi <i>Spearman</i> menganalisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat -----	92
5.2.25 Hasil analisis korelasi <i>Spearman</i> menganalisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok penderita TB paru -----	94
BAB 6 PEMBAHASAN -----	97
6.1 Karakteristik Sampel Penelitian -----	97
6.2 Hasil Penentuan Varian Genotip Gen <i>NRAMP1</i> dengan metode PCR-RFLP -----	99
6.2.1 Hasil penentuan varian D543N genotip gen <i>NRAMP1</i> -----	102
6.2.2 Hasil penentuan varian 3'UTR genotip gen <i>NRAMP1</i> -----	102

6.2.3 Hasil penentuan varian INT4 genotip gen <i>NRAMP1</i>	103
6.3 Hasil penentuan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat dan penderita TB paru	104
6.4 Hasil analisis perbedaan antara varian genotip D543N, 3'UTR, dan INT4 gen <i>NRAMP1</i> dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru	107
6.5 Hasil uji Anova interaksi dua faktor antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; dan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru	109
6.6 Hasil analisis korelasi <i>Spearman</i> antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; dan varian G/G, G/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok Perawat dan kelompok penderita TB paru	110
6.6.1 Hasil analisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru	110
6.6.2 Hasil analisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru	111
6.6.3 Hasil analisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru	115
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	117
7.1 Kesimpulan	117
7.2 Saran	119
DAFTAR PUSTAKA	120
LAMPIRAN	125

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Fagosit makrofag alveolar menyerang mikobakteria -----	9
Gambar 2.2 Makrofag alveolar, sel epiteloid, sel giant langhans (terbentuk melalui fusi sel epiteloid) tempat mikobakteria intraseluler bersembunyi dalam granuloma -----	10
Gambar 2.3 Integritas granuloma terganggu, menjadi lesi kaseus menyebabkan <i>M. tuberculosis</i> masuk ke dalam peredaran darah dan menyebar ke jaringan di sekitar paru dan organ tubuh yang lain -----	17
Gambar 2.4 Metabolisme besi pada sel inang -----	23
Gambar 2.5 Peran NRAMP1 dan NRAMP2 di dalam makrofag -----	25
Gambar 2.6 Lokasi dan jenis polimorfisme gen <i>NRAMP1</i> manusia ---	28
Gambar 2.7 Proses ekstraksi DNA -----	33
Gambar 2.8 Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) -----	36
Gambar 2.9 Proses Electrophoresis -----	37
Gambar 2.10 Proses PCR-RFLP -----	38
Gambar 5.1 Diagram <i>column</i> distribusi frekuensi usia antara kelompok penderita TB paru dan perawat -----	63
Gambar 5.2 Diagram <i>column</i> distribusi jenis kelamin antara kelompok penderita TB paru dan perawat -----	64
Gambar 5.3 Hasil Isolasi DNA dari PBMC perawat yang merupakan jumlah DNA total pada PBMC dan termasuk di dalamnya DNA gen <i>NRAMP1</i> -----	65
Gambar 5.4 Hasil Isolasi DNA dari PBMC penderita TB paru yang merupakan jumlah DNA total pada PBMC dan termasuk di dalamnya DNA gen <i>NRAMP1</i> -----	66
Gambar 5.5 Hasil PCR amplifikasi DNA genotip D543N dan 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> dari DNA perawat -----	67
Gambar 5.6 Hasil PCR amplifikasi DNA sasaran INT4 gen <i>NRAMP1</i> dari DNA perawat dengan primer INT4 -----	68
Gambar 5.7 Hasil PCR amplifikasi DNA genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> dari DNA penderita TB paru dengan primer INT4 -----	69
Gambar 5.8 Hasil <i>genotyping</i> RFLP genotip D543N gen <i>NRAMP1</i> pada penderita TB paru -----	71
Gambar 5.9 Hasil <i>genotyping</i> RFLP genotip D543N gen <i>NRAMP1</i> pada perawat -----	71

Gambar 5.10	Diagram column distribusi frekuensi varian G/G, G/A, A/A genotip D543N antara kelompok perawat dan penderita TB paru -----	72
Gambar 5.11	Hasil <i>genotyping</i> RFLP genotip 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> pada perawat -----	74
Gambar 5.12	Hasil <i>genotyping</i> RFLP genotip 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> penderita TB paru -----	75
Gambar 5.13	<i>Diagram Column</i> distribusi frekuensi varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR antara kelompok perawat dan penderita TB paru -----	75
Gambar 5.14	Hasil <i>genotyping</i> RFLP genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada penderita TB paru -----	78
Gambar 5.15	Hasil <i>genotyping</i> RFLP genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada perawat -----	78
Gambar 5.16	Diagram <i>column</i> distribusi frekuensi varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 antara kelompok perawat dan penderita TB paru -----	79
Gambar 5.17	Hasil Imunositokimia perawat dengan metode DAB <i>Indirect Enzyme Immuno Assay</i> -----	81
Gambar 5.18	Hasil Imunositokimia penderita TB paru dengan metode DAB <i>Indirect Enzyme Immuno Assay</i> -----	82
Gambar 5.19	Diagram <i>column</i> diskripsi ekspresi protein NRAMP1 rata-rata antara kelompok penderita TB paru dan perawat ----	83
Gambar 5.20	Diagram <i>column</i> diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat -----	84
Gambar 5.21	Diagram <i>column</i> diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok penderita TB paru -----	85
Gambar 5.22	Diagram <i>column</i> diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat -----	86
Gambar 5.23	Diagram <i>column</i> diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok penderita TB paru -----	87
Gambar 5.24	Diagram <i>column</i> diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4	

gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat	88
Gambar 5.25 Diagram <i>column</i> diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada perawat	89
Gambar 6.1 Uji <i>Western blotting</i> dari granuloma tuberkulosis sapi untuk mendeteksi adanya protein NRAMP1	105

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Hasil analisis <i>Chi-Square</i> menganalisis perbedaan distribusi frekuensi varian G/G, G/A, A/A genotip D543N antara kelompok perawat dan penderita TB paru-----	72
Tabel 5.2 Hasil analisis <i>Chi-Square</i> menganalisis perbedaan distribusi frekuensi varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> antara perawat dan penderita TB paru--	76
Tabel 5.3 Uji <i>Chi Square</i> menganalisis perbedaan distribusi frekuensi varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 antara kelompok perawat dan penderita TB paru -----	79
Tabel 5.6 <i>Independent T test</i> menganalisis perbedaan ekspresi protein <i>NRAMP1</i> antara kelompok perawat dan penderita TB paru ---	83
Tabel 5.7 <i>OneWay Anova</i> menganalisis perbedaan ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen <i>NRAMP1</i> pada perawat -----	84
Tabel 5.8 <i>Oneway Anova</i> menganalisis perbedaan antara ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen <i>NRAMP1</i> pada penderita TB paru -----	85
Tabel 5.9 <i>Oneway Anova</i> menganalisis perbedaan antara ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> pada perawat----	87
Tabel 5.10 <i>OneWay Anova</i> menganalisis perbedaan antara ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen <i>NRAMP1</i> pada penderita TB paru -----	88
Tabel 5.11 <i>OneWay Anova</i> menganalisis perbedaan antara ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian G/G, G/C dan C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada perawat -----	89
Tabel 5.12 <i>OneWay Anova</i> menganalisis perbedaan antara ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada penderita TB paru -----	90
Tabel 5.13 Analisis Univariat menganalisis interaksi antara ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen	

	<i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat	91
Tabel 5.14	Analisis Univariat menganalisis interaksi antara ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok penderita TB paru	92
Tabel 5.15	Analisis Korelasi <i>Spearman</i> menganalisis hubungan antara ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok perawat	92
Tabel 5.16	Analisis korelasi <i>Spearman</i> menganalisis hubungan antara ekspresi protein <i>NRAMP1</i> dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen <i>NRAMP1</i> pada kelompok penderita TB paru	94

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
LAMPIRAN 1. Hasil isolasi Perawat dan Penderita TB paru -----	125
LAMPIRAN 2. Hasil ekstraksi DNA Perawat dan penderita TB paru ----	128
LAMPIRAN 3. Hasil amplifikasi DNA Perawat dan penderita TB paru dengan PCR pada regio D543N/3'UTR -----	131
LAMPIRAN 4. Hasil amplifikasi DNA dan penderita TB paru dengan PCR pada regio INT4 -----	136
LAMPIRAN 5. Hasil RFLP dari amplicon regio D543N dengan RE <i>Ava</i> // pada perawat penderita TB paru \geq 2 tahun dan penderita TB paru -----	139
LAMPIRAN 6. Hasil RFLP dari amplicon regio 3'UTR dengan RE <i>Fok</i> / pada perawat penderita TB paru \geq 2 tahun dan penderita TB paru -----	143
LAMPIRAN 7. Hasil RFLP dari amplicon regio INT4 dengan RE <i>Apa</i> / pada Perawat dan penderita TB paru -----	146
LAMPIRAN 8. Hasil imunositokimia mendeteksi protein NRAMP1 Perawat dengan USB PC Camera 301P -----	149
LAMPIRAN 9. Hasil imunositokimia mendeteksi protein NRAMP1 penderita TB paru dengan USB PC Camera 301P -----	154
LAMPIRAN 10. Tabulasi hasil penelitian PCR-RFLP dan Imunositokimia -----	162
LAMPIRAN 11. Analisis Statistik dengan SPSS 13.0 for Windows -----	165
LAMPIRAN 12. Lembar Informasi -----	185
LAMPIRAN 13. Lembar Pernyataan Persetujuan -----	186
LAMPIRAN 14. Lembar Keterangan Biaya Kontak -----	187
LAMPIRAN 15. Surat Keterangan <i>Ethical Clearance</i> -----	188
LAMPIRAN 16. Surat Ijin Penelitian di RSUD Dr. Soetomo -----	191
LAMPIRAN 17. Surat Ijin Penelitian di RS Karang Tembok -----	193

DAFTAR SINGKATAN

BPIP	: <i>Bactericidal permeability increasing protein</i>
BCG	: <i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
BTA	: Bakteri tahan asam
CD	: <i>Cluster Differentiation</i>
CMI	: <i>Cell Mediated Immunity</i>
CFTR	: <i>cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator</i>
DAB	: <i>Diaminobenzidine</i>
DMTI	: <i>divalent-metal transporter-1</i>
DCYTB	: <i>Duodenal cytochrome-b</i>
DTH	: <i>delayed type hypersensitivity</i>
DMT1	: <i>divalent-metal transporter-1</i>
dNTPs	: <i>deoxynucleoside triphosphate</i>
ddNTP	: <i>dideoxynucleotides</i>
DGGE	: <i>Degradative Gradien Gel Electrophoresis EDTA</i>
ELISA	: <i>Enzyme linked immunosorbance assay</i>
gp91Phox	: <i>glycoprotein 91 phagocyte oxidase</i>
GM-CSF	: <i>Granulocyt Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
HSP	: <i>Heat shock protein</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IFN- γ	: <i>interferon gamma</i>
IdeR	: <i>Iron-dependent regulator</i>
IUATLD	: <i>International Union Against Tuberculosis Lung Disease</i>
Ipr1	: <i>Intracellular Pathogen Resistance 1</i>
iNOS	: <i>inducible nitric oxide synthase</i>
LJ	: <i>Lowenstein-Jensen</i>
LF	: <i>lactoferrin</i>
LTd3	: <i>lymphotoxin α3</i>
M.tbc	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MPO	: <i>Mieloperoksidase</i>
MBP	: <i>major basic protein</i>

MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MFLP	: <i>Macrorestricted Fragment Length Polymorphism</i>
NLS	: <i>nuclear localization signal</i>
NRB	: <i>nuclear receptor binding</i>
NRAMP1	: <i>natural resistance macrophage protein-1</i>
PAP	: <i>polyadenylic acid polymerase</i>
PBMC	: <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
P2TB	: <i>Program Penanggulangan Penyakit Tuberkulosis</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKC	: <i>protein kinase C</i>
PPD	: <i>Purified Protein Derivative</i>
RNA	: <i>single-stranded ribonucleic acid</i>
ROS	: <i>reactive oksigen species</i>
RNI	: <i>reactive nitrogen intermediate</i>
ROI	: <i>reactive oksigen intermediate</i>
RFLP	: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SLC11A1	: <i>solute carrier 11 a 1</i>
SOD	: <i>superoxide dismutase</i>
TNF- α	: <i>tumor necrosis factor-alfa</i>
TB	: <i>tuberculosis</i>
TGF- β	: <i>tumor growth factor -beta</i>
TF	: <i>transferrin</i>
TBE	: <i>tris buffer electrophoresis</i>
Tm	: <i>Temperature melting</i>
TM	: <i>trans membrane</i>
UTR	: <i>untranslated region</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit tuberkulosis (TB) merupakan suatu penyakit infeksi yang masih sulit dikendalikan. Di dunia angka kejadian TB pada tahun 1990 diperkirakan terjadi sekitar 1,7 milyar atau sekitar 1/3 dari populasi dunia terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Insidens TB terjadi 8 juta kasus dan *mortality* terjadi 3 sampai 4 juta kasus per tahun, oleh karena itu WHO menyatakan TB sebagai salah satu penyakit infeksi yang sangat penting untuk diperhatikan dan ditanggulangi di seluruh dunia (WHO,2002). Di Indonesia, angka kejadian TB pada tahun 1999 diperkirakan WHO, setiap 100.000 penduduk terdapat 130 penderita baru TB paru dengan BTA (bakteri tahan asam) positif (Dep Kes RI, Pedoman P2TB, 2002). Situasi TB global pada tahun 2005, terdapat sekitar 9 juta kasus baru TB dan perkiraan 1,6 juta orang (27/100.000) meninggal karena TB. Indonesia termasuk 22 negara dengan jumlah kasus TB terbanyak (WHO, 2007). Cara penularan penyakit TB paru melalui *droplet* yang masuk melalui udara pernafasan ke dalam alveoli paru, kemudian timbul respons inflamasi akumulasi makrofag dan neutrofil, dilanjutkan migrasi ke kelenjar limfe regional membentuk kompleks primer. Basil di jaringan paru atau kelenjar limfe ditelan oleh makrofag dan bermultiplikasi dalam makrofag. Penyembuhan lesi primer terjadi sebagai eksudat inflamasi dan destruksi basil. Bila kuman bertahan hidup dapat mencapai aliran limfe dan darah ke organ lain.

Fenomena yang terjadi di lapangan, ada sekelompok orang mudah tertular dan di sisi lain ada sekelompok yang terpapar *droplet* dari penderita TB paru namun tidak menderita penyakit TB paru. Di Ruang Rawat Inap penderita TB paru di RSUD Dr. Soetomo, perawat yang merawat penderita TB paru selama bertahun-tahun, secara klinis tidak menunjukkan gejala menderita TB paru. Hasil berbagai penelitian menunjukkan bahwa dari sejumlah orang yang terinfeksi TB hanya sekitar 10% yang sakit, sebagian diketahui karena mereka merupakan *immunocompromized host* akibat infeksi *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) atau *Diabetes Melitus*. Sisanya diduga disebabkan oleh faktor lingkungan dan atau genetik (Kim, 2002; Zhang, 2005). *M. tuberculosis* merupakan bakteri yang proliferasi di dalam sel terutama di dalam makrofag. Berdasarkan fakta tersebut penulis menduga kuat terdapat keterkaitan genetik pada imunitas di dalam makrofag dengan kejadian kerentanan (atau kekebalan) terhadap TB paru.

Menurut Bellamy tahun 1998, di Gambia melaporkan bahwa genotip 5'(CA)_n, INT4, D543N, 3'UTR gen *NRAMP1* rentan terhadap *M. tuberculosis*, maka hal ini membuktikan bahwa *NRAMP1* (*natural resistance associated macrophage protein 1*) yang seharusnya terkait dengan kekebalan ternyata terkait dengan kerentanan terhadap *M. tuberculosis*.

Gen tersebut diekspresikan selain pada makrofag juga pada sel-sel darah yang dikenal sebagai *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC). Gen ini ternyata menyandi suatu protein yang berfungsi sebagai saluran ion divalent termasuk ion Fe⁺⁺. Ion Fe⁺⁺ dapat menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* dan akhirnya membunuh *M. tuberculosis* (Blackwell, 2001). Bila karena suatu mutasi pada gen *NRAMP1* akan menghasilkan protein

NRAMP1 yang tak fungsional atau mutasi tersebut menyebabkan ekspresi protein menurun, maka hambatan terhadap pertumbuhan *M. tuberculosis* akan hilang atau berkurang, sehingga kuman akan berkembang biak secara bebas.

Ceiller (1994) telah berhasil mengidentifikasi gen *NRAMP1* yang terletak pada kromosom no. 2 lokus 2q35 dan memiliki panjang 14kb (cDNA sekitar 2kb). Gen ini mengandung 15 exon. Berdasar deteksi amplicon dengan primers spesifik ditemukan 11 varian genetik (*polymorphism*) yaitu (GT)_n; 136del9; 274C/T; 469+14G/C (INT4); 577-18G/A; 823C/T; A318V; 1465-85G/A; D543N; 1729+55del4 (3'UTR); (CAAA)_n/(CA)_n (Camstock, 1978).

Dari berbagai varian genotip tersebut, hanya beberapa yang terkait dengan kerentanan (atau kekebalan) terhadap *M. tuberculosis* yaitu varian genotip 5'(GT)_n, 274C/T, INT4, D543N, dan 3'UTR (Bellamy, 1998; Dalgado, 2002). Dari kelima varian ini ditemukan pula ada ketidak sesuaian temuan antar para peneliti, misalnya varian genotip D543N ada yang menyatakan menimbulkan kekebalan (Dalgado, 2002; Kim, 2003) ada pula yang menyatakan menimbulkan kerentanan (Bellamy, 1998; Gao, 2000; Liu, 2004, Zhang, 2005). Disamping itu, Bellamy (1998) menemukan bahwa kerentanan dapat ditimbulkan oleh lebih dari satu varian genotip, yaitu 5'(GT)_n, INT4, D543N, dan 3'UTR, sehingga memungkinkan terjadi interaksi antara berbagai varian genotip tersebut. Hasil dua penelitian yang dilakukan di China: Liu menemukan varian yang rentan adalah varian D543N dan 3'UTR, sedangkan Zhang (2005) menemukan varian yang rentan adalah D543N dan INT4. Di Indonesia sampai saat ini keterkaitan antara varian genotip gen *NRAMP1*

terhadap kerentanan (atau kekebalan) terhadap TB paru belum diketahui karena belum pernah diteliti.

Berdasarkan penemuan Liu dan Zhang di China yang etnis Mongolia dan serumpun dengan Indonesia, maka penulis meneliti varian genotip INT4, D543N, dan 3'UTR, khususnya pada penderita tuberkulosis paru dan para perawatnya yang walaupun terinfeksi oleh kuman yang sama ternyata tetap sehat. Perawat yang penulis pilih adalah mereka yang secara berkelanjutan telah berdinamis minimal 2 (dua) tahun.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan apa yang telah diuraikan di atas maka, dibuatlah perumusan masalah sebagai berikut,

1. Apakah ada perbedaan distribusi frekuensi pada varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* antara kelompok penderita TB paru dan perawat?
2. Apakah ekspresi protein NRAMP1 pada makrofag dari kelompok perawat lebih tinggi daripada ekspresi protein NRAMP1 pada makrofag dari kelompok penderita TB paru?
3. Apakah ada perbedaan ekspresi protein NRAMP1 dengan varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat?
4. Apakah ada perbedaan ekspresi protein NRAMP1 dengan varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru?
5. Apakah ada interaksi antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat?

6. Apakah ada interaksi antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok penderita TB paru?
7. Apakah ada hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat?
8. Apakah ada hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menjelaskan ada keterkaitan antara varian genotip gen *NRAMP1* dengan kerentanan (atau kekebalan) terhadap penyakit tuberkulosis paru pada manusia.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan ada perbedaan distribusi frekuensi pada varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* antara kelompok penderita TB paru dan perawat.
2. Membuktikan ekspresi protein NRAMP1 pada makrofag dari kelompok perawat lebih tinggi daripada ekspresi protein NRAMP1 pada makrofag dari kelompok penderita TB paru.

3. Membuktikan ada perbedaan ekspresi protein NRAMP1 dengan varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.
4. Membuktikan ada perbedaan ekspresi protein NRAMP1 dengan varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.
5. Membuktikan ada interaksi antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat.
6. Membuktikan ada interaksi antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok penderita TB paru.
7. Membuktikan ada hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.
8. Membuktikan ada hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Temuan penelitian ini diharapkan memberi informasi tentang keterkaitan berbagai varian genotip INT4, D543N, 3'UTR gen *NRAMP1* dengan kerentanan (atau kekebalan) pada manusia terhadap kuman *M.tuberculosis*, sehingga memberikan sumbangan terhadap ilmu pengetahuan khususnya mengenai akibat infeksi *M. tuberculosis* di Indonesia.

1.4.2 Manfaat Praktis

Apabila pada penelitian ini ditemukan ada korelasi antara varian genotip INT4, D543N, dan 3'UTR gen *NRAMP1* dengan kerentanan (atau kekebalan) terhadap penyakit tuberkulosis paru, maka temuan ini dapat dikembangkan untuk menciptakan pelacak (*probe*) guna mendeteksi mereka yang rentan (atau kebal), sehingga dapat dilakukan upaya pencegahan penyebaran penyakit tuberkulosis paru.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Epidemiologi Tuberkulosis Paru

Pada tahun 1992, Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) menerbitkan suatu perkiraan infeksi *M. tuberculosis*, mendata kejadian penyakit tuberkulosis paru (TB) di seluruh dunia. Data ini didasarkan pada hasil survei tes kulit, pemberitahuan kasus, pemenuhan jasa kesehatan, dan tingkat kematian TB yang dilaporkan oleh negara-negara anggota dan dihitung menggunakan model epidemiologik sederhana (Sudre P, 1992).

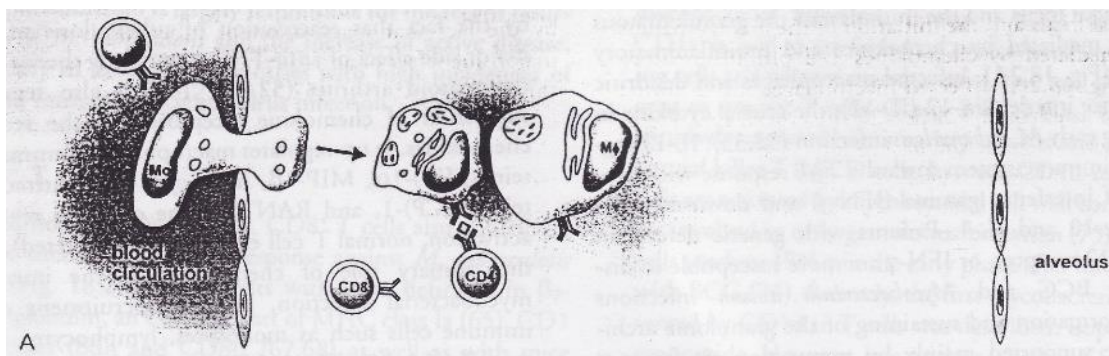
Perkiraan kasus ditinjau kembali pada tahun 1997. Kejadian infeksi TB pada tahun 1990 diperkirakan sekitar 1,7 milyar atau kira-kira sepertiga dari populasi dunia. Kejadian kasus baru TB pada tahun 1997 diperkirakan 8 juta pasien baru dan 1,87 juta mengalami kematian setiap tahun. Ada variasi yang menyolok berdasarkan letak geografi, dan diperkirakan oleh WHO jumlah kasus TB baru ditandai suatu peningkatan kasus baru TB diakibatkan infeksi HIV yang merebak. Pada tahun 2000, WHO memperkirakan terjadi kasus baru akan mencapai 8,7 juta (WHO, 2002).

Penderita tuberkulosis di Indonesia pada tahun 1995 berjumlah 460.190, angka ini relatif tinggi jika dibandingkan dengan negara lain (Ratnawati, 2000) dan menduduki peringkat kedua penyebab kematian di Indonesia setelah kardiovaskuler (Aditama, 2000). Data terbaru yang dikeluarkan WHO di bulan Agustus 1999 menyebutkan bahwa prevalensi BTA (+) di Indonesia sebesar 715.000 dengan insiden 262.000 dan kematian 140.000 per tahun (Aditama, 2000). Pada tahun 2004 terjadi kenaikan

tertinggi dalam lima tahun terakhir, di mana ditemukan sebanyak 16.636 penderita atau di antara 100.000 penduduk di Propinsi Jawa Timur ditemukan 46 penderita baru TB paru dengan BTA positif. Meskipun jumlah terus meningkat, jumlah ini masih kurang dari yang diperkirakan. Menurut perkiraan WHO, setiap 100.000 penduduk di Provinsi Jawa Timur ditemukan 115 penderita baru TB Paru dengan BTA positif (Ratgono, 2005)

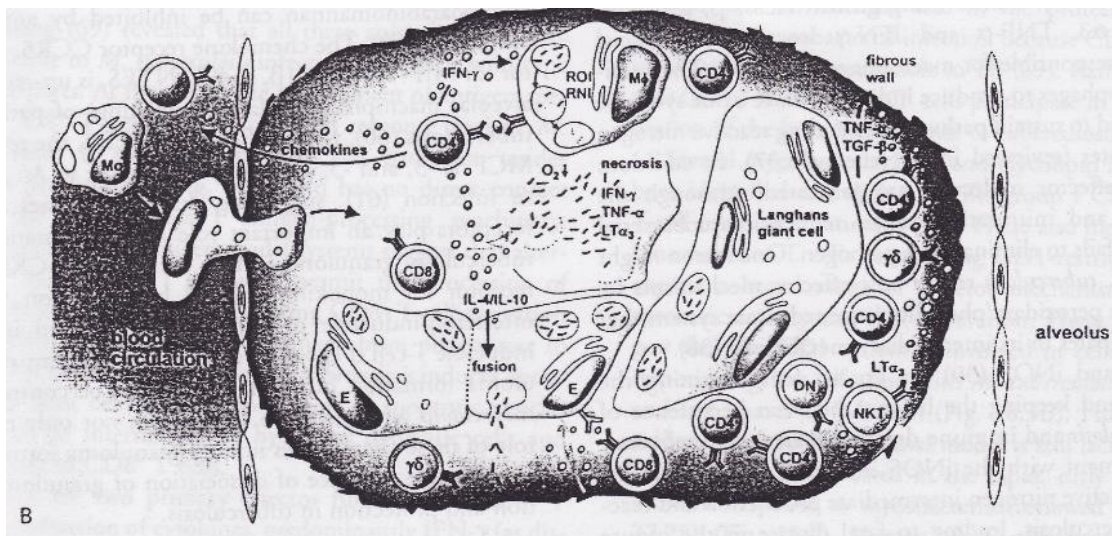
2.2 Patogenesis Tuberkulosis

Tuberkulosis adalah penyakit menular yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis*. Kuman tersebut masuk tubuh melalui udara pernafasan yang masuk ke dalam paru, kemudian kuman menyebar dari paru ke bagian tubuh lain melalui sistem peredaran darah, sistem saluran limfe, melalui saluran nafas atau penyebaran langsung ke tubuh yang lain (P2M PLP, 1997). Infeksi primer TB paru menyebar dari penderita ke orang lain melalui inhalasi udara yang mengandung butiran air berisi bakteri (*droplet nuclei*). Sejumlah bakteri tahan asam akan masuk ke alveolus. Mikroorganisme ini akan difagositosis oleh makrofag alveolus (gambar 2.1).



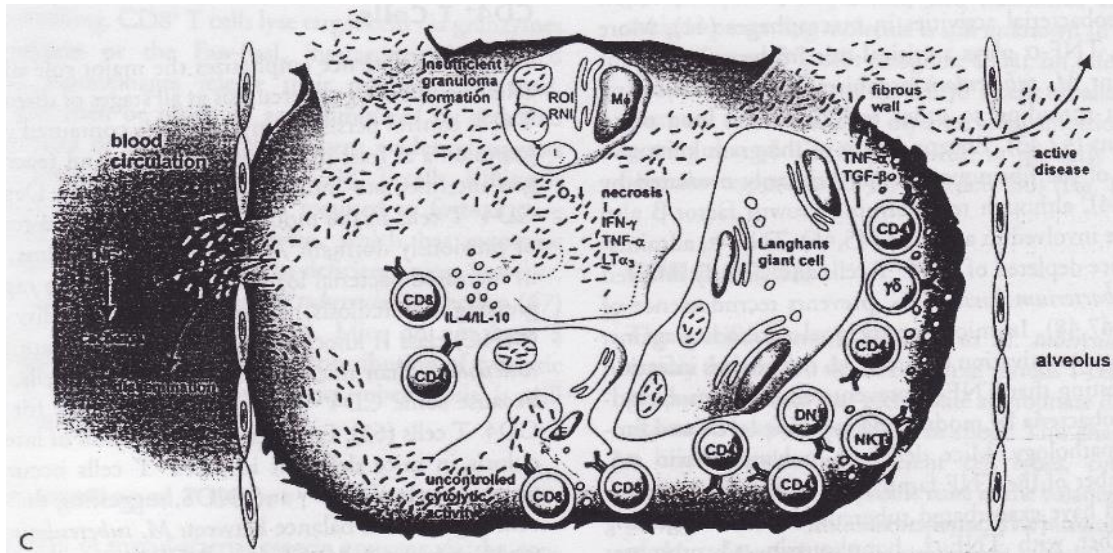
Gambar 2.1 Fagosit makrofag alveolar menyerang mikobakteria (Ulrichs, 2004).

Organ paru merupakan salah satu sasaran *M. tuberculosis* untuk berkembang biak. Lingkungan di dalam paru terutama apex paru merupakan bagian yang paling sering terkena. Dalam makrofag dan di dalam histiosit paru akan memacu penggumpalan sejumlah sel efektor seperti limfosit T, netrofil, dan histiosit dalam jumlah besar membentuk granuloma yang lazim disebut “Ghon Focus” (gambar 2.2).



Gambar 2.2 Makrofag alveolar, sel epiteloid, sel giant langhans (terbentuk melalui fusi sel epiteloid) tempat mikrobakteria intraseluler bersembunyi dalam granuloma (Ulrichs, 2004).

Ghon Focus bersama limfadenitis regional disebut “Kompleks Primer” (*primary complex*). Bila granuloma mengalami destruksi jaringan, maka akan terjadi nekrosis pengejuran (*caseous necrosis*) di mana sel monosit dan limfosit mengelilingi suatu area nekrotik sentral. Apabila kemudian integritas dinding granuloma pecah, maka bakteri *M. tuberculosis* yang masih hidup dapat memasuki peredaran darah atau menembus dinding alveolus memasuki saluran pernafasan (gambar 2.3).



Gambar 2.3 Integritas granuloma terganggu, menjadi lesi kaseus menyebabkan *M. tuberculosis* masuk ke dalam peredaran darah dan menyebar ke jaringan di sekitar paru dan organ tubuh yang lain (Ulrichs, 2004).

Melalui saluran pernafasan ini, bakteri *M. tuberculosis* akan menyebar menularkan ke orang lain (Grosset, 1990; Grosset, 2000). Jaringan nekrotik akan terlihat sebagai “kaverne” pada foto Rontgen paru berupa area (bulatan) yang tembus cahaya (*translucent*). Daya penularan pada seorang ditentukan oleh beberapa faktor yaitu, banyaknya kuman yang terdapat dalam paru penderita, penyebaran kuman di udara, dan kuman yang terdapat dalam dahak berupa droplet yang berada di udara sekitar penderita tersebut (Abbas, 1994). Sebagian besar orang yang terinfeksi *M. tuberculosis* (80-90%) belum tentu menjadi sakit TB. Untuk sementara waktu, bakteri *M. tuberculosis* akan berada dalam keadaan tidak aktif (*dormant*), dan keberadaannya hanya dapat diketahui melalui uji tuberkulin. Tuberkulosis biasanya paling cepat terjadi 3-6 bulan setelah infeksi. Reaksi imunologi tubuh akan terbentuk sekitar 4-6 minggu setelah infeksi primer yang berupa reaksi hipersensitivitas tipe lambat dan imunitas seluler (P2M PLP, 1997).

2.3 Ciri *Mycobacterium tuberculosis*

Genus *Mycobacterium* merupakan kelompok bakteri gram positif, berbentuk batang, berukuran lebih kecil dibandingkan bakteri lain. Genus ini mempunyai karakteristik unik, karena dinding sel kaya akan lipid dan lapisan tebal peptidoglikan yang mengandung arabinogalaktan, lipoarabinomanan, dan asam mikolat. Asam mikolat tidak biasa dijumpai pada bakteri lain dan hanya dijumpai pada dinding sel *Mycobacterium* dan *Corynebacterium* (Abbas, 1994; Slayer, 1994; Ryan, 1997).

M. tuberculosis dibedakan dari sebagian besar bakteri dan mikobakteri lain karena bersifat patogen dan dapat berkembang biak dalam makrofag hewan dan manusia. Pertumbuhan *M. tuberculosis* relatif lambat dibandingkan *Mycobacterium* lain (Schwander, 1996). *M. tuberculosis* tidak menghasilkan endotoksin maupun eksotoksin (Abbas, 1994). Bagian selubung *M. tuberculosis* mempunyai sifat pertahanan khusus terhadap proses mikobakterisidal sel hospes. Dinding sel yang kaya lipid akan melindungi mikobakteri dari proses fagositosis, hal ini dapat menerangkan mengapa mikobakteri dapat hidup pada makrofag normal yang tidak teraktivasi (Brennan, 1994). Selain bersifat patogen, *M. tuberculosis* dapat berfungsi sebagai ajuvan, yaitu komponen bakteri yang dapat meningkatkan respon imun sel T dan sel B, apabila dicampur dengan antigen terlarut.

2.4 Respons Imun *Mycobacterium tuberculosis*

Akibat klinis pada infeksi *M. tuberculosis* lebih dipengaruhi oleh sistem imunitas seluler daripada imunitas humoral (Ryan, 1997; Barnes, 1994). Sebagai contoh manusia yang menderita kerusakan imunitas seluler seperti

terinfeksi HIV mempunyai risiko tuberkulosis yang lebih tinggi, sebaliknya manusia yang menderita kerusakan imunitas humoral seperti mieloma multipel tidak menunjukkan peningkatan predisposisi terhadap tuberkulosis (Barness, 1994). Bukti secara eksperimental menunjukkan bahwa pertahanan anti mikrobakteri adalah makrofag dan limfosit T sebagai pendukung proteksi atau kekebalan (Barness, 1994; Orme, 1999). Koordinasi antara fagosit mononuklear dan limfosit T sangat diperlukan untuk perlindungan yang optimal. Aktivitas anti mikrobial dikontrol oleh limfosit T melalui mediator terlarut yang dikenal sebagai sitokin (Dannenberg, 1994; Orme, 1999). Selain seperti netrofil dan sel NK dapat menunjukkan efek mikobakteriostatik secara *in vitro*, sedangkan eosinofil dapat memakan mikobakteri, akan tetapi peran mereka sebagai pertahanan imunitas secara *in vivo* belum diketahui (Barness, 1994).

2.4.1 Mekanisme bakterisidal pada makrofag teraktivasi

Ada dua jenis mekanisme bakterisidal di dalam makrofag teraktivasi,

1. Mekanisme tergantung oksigen. Mekanisme ini dipicu oleh aktivasi NADPH oksidase, melalui proses reduksi O_2 menjadi superoksida ($O_2^{\cdot-}$) dan membentuk H_2O_2 . Mieloperoksidase (MPO) yang terdapat dalam granula spesifik kemudian mengubah H_2O_2 , bila terdapat Cl^- , menjadi senyawa $HOCl^*$ yang sangat bakterisidal.
2. Mekanisme tak tergantung oksigen, termasuk *bactericidal permeability increasing protein* (BPIP), lisosim, protein dasar utama eosinofil, dan defensin kaya arginin. Organisme yang mati

kemudian dihancurkan oleh enzim hidrolase dan enzim lain dalam lisosom.

Selama proses fagositosis, makrofag melepaskan enzim lisosomal, dengan cara regurgitasi selama *feeding*, endositosis terbalik (*reverse endocytosis*), dan pelepasan senyawa sitotoksik. Juga pelepasan metabolit aktif yang berasal dari oksigen, dan melepaskan hasil metabolisme asam arakidonat. Jadi *M. tuberculosis* yang terhirup dan masuk ke paru akan ditelan oleh makrofag alveolar, selanjutnya makrofag akan melakukan 3 fungsi penting, yaitu:

1. menghasilkan enzim proteolitik dan metabolit lain yang mempunyai efek mikobakterisidal,
2. menghasilkan mediator terlarut (sitokin) sebagai respon terhadap *M.tuberculosis* berupa IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β , dan memproses serta mempresentasikan antigen mikobakteri pada limfosit T (Barness, 1994).

IL-1 merupakan pirogen endogen menyebabkan demam sebagai karakteristik tuberkulosis. IL-6 akan meningkatkan produksi imunoglobulin oleh sel B yang teraktivasi, menyebabkan hiperglobulinemia yang banyak dijumpai pada penderita tuberkulosis. TGF- β berfungsi sama dengan IFN- γ untuk meningkatkan produksi metabolit nitrit oksida dan membunuh bakteri serta pembentukan granuloma dalam mengatasi infeksi mikobakteri. TNF- α dapat menyebabkan efek patologis seperti demam, penurunan berat badan dan nekrosis jaringan yang merupakan ciri khas tuberkulosis (Abbas, 1994; Barness, 1994). Pada penderita tuberkulosis TNF- α juga berperan untuk meningkatkan kerentanan, di mana sel T melakukan apoptosis baik secara

spontan maupun oleh stimulasi *M.tuberculosis* secara in vitro. IL-10 menghambat produksi sitokin IFN- γ oleh monosit dan limfosit, sedangkan TGF- β menekan proliferasi sel T dan menghambat fungsi efektor makrofag (Barness, 1994). Karbohidrat dan komponen glikolipid pada dinding sel mikobakteri berfungsi sama dengan protein yang disekresikan yaitu meningkatkan efek immunosupresi pada makrofag penderita tuberkulosis. Lipoarabinomanan, suatu kompleks heteropolisakarida yang terletak di dalam membran sel mikobakteri akan menekan respons proliferasi melalui rangsangan terhadap makrofag untuk melepaskan sitokin immunosupresif seperti IL-10. *Lipoarabinomanan* akan menghambat aktivasi makrofag oleh IFN- γ dan akan mengambil radikal bebas oksigen serta menghambat kerusakan oleh patogen intraseluler. Dengan menghindari aktivasi makrofag, lipoarabinomanan yang berasal dari strain *M. tuberculosis* virulen berperan sebagai faktor virulen yang menyebabkan organisme lolos dari mekanisme eliminasi sitokin (Slayer, 1994; Barness, 1994).

2.4.2 Respons limfosit T

Limfosit T merupakan mediator obligat kekebalan, mereka tidak bekerja sendiri tetapi harus berinteraksi dengan sel-sel respons imun lain untuk mencapai ketahanan yang optimal. Semua populasi sel T (CD4+, CD8+ dan sel CD1) berperan dalam proteksi. Sel T yang mengekspresikan reseptor CD8+, 95% lebih terdiri dari sel T post timus terdapat pada organ perifer dan darah. Sebaliknya sel T/CD4+ hanya sedikit terdapat pada daerah tersebut, tetapi lebih banyak terdapat pada jaringan mukosa seperti paru. Bukti bahwa sel T/CD4+ sangat diperlukan untuk ketahanan tuberkulosis berdasarkan

percobaan pada tikus bahwa tikus mutan yang dihilangkan sel T/CD4+ dengan cara delesi pada gen yang mengkode sel T/CD4+, selama 4 minggu infeksi masih relatif resisten terhadap infeksi BCG subletal, tetapi kemudian pertumbuhan BCG meningkat dan akhirnya tikus mati karena infeksi BCG.

Makrofag terinfeksi mempresentasikan antigen mikobakteri kepada limfosit T /CD4+. Limfosit T /CD4+ kemudian menghasilkan bermacam sitokin dan chemokin atau membunuh bakteri intraseluler dan sel terinfeksi. Chemokin yang dihasilkan juga merekrut sel yang ada dalam sirkulasi ke lokasi infeksi. INF- γ mengaktifkan makrofag dan mempresentasikan antigen untuk membunuh mikobakteria melalui iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), yang merangsang timbulnya RNI (*reactive nitrogen intermediates*). Limfosit T /CD4+ dan makrofag memproduksi TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) dan LT α 3 (*lymphotoxin α 3*) yang diperlukan untuk membentuk dinding kapsul dari granuloma. Di dalam senter granuloma, tekanan oksigen rendah yang mana memungkinkan tercipta lingkungan yang sulit untuk melenyapkan mikobakteria. Limfosit T/CD8+ aktif akan membunuh mikobakteria dalam makrofag melalui granulin dan perforin. Penghancuran sel terinfeksi memerlukan kontrol untuk menahan integritas granuloma (Ulrichs, 2004).

Limfosit T dapat dibagi menjadi sel T /CD4+ yang mengenal peptida antigenik yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas II dan sel T /CD8+ yang mengenal peptida antigenik yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I (Chan, 1994). Sel T/CD4+ berperan penting pada sistem pertahanan terhadap tuberkulosis. Tikus yang mengalami delesi sel T/CD4+ yang sebelumnya terinfeksi *M. bovis*, terbukti tidak dapat mengontrol pertumbuhan mikobakteri, sedangkan tikus yang delesi sel T/CD8+ menunjukkan efek yang

sebaliknya. Selain itu transfer adoptif sel T/CD4+ pada binatang yang telah disensitisasi akan memberi perlindungan terhadap tuberkulosis. Delesi sel T /CD4+ karena infeksi HIV ditandai dengan peningkatan kerentanan terhadap tuberkulosis primer dan reaktivasi (Barness, 1994). Berdasarkan studi eksperimental dan studi tuberkulosis pada manusia menunjukkan bahwa delesi sel T/CD4+ akan memperburuk infeksi *M. tuberculosis* dan BCG. Konsisten dengan penemuan tersebut, bahwa tikus mutan dengan defisiensi gen MHC kelas II fungsi aktif sel T /CD4+ tidak ada, maka tikus tersebut akan mati karena infeksi BCG dan *M. tuberculosis*. Delesi sel T /CD4+ pada infeksi virus HIV juga dapat mengakibatkan penyakit tuberkulosis pada pasien AIDS (Chan, 1994).

Bila *M. tuberculosis* masuk ke dalam bronchi dan dibatukkan *M. tuberculosis* akan mencemari udara dan menginfeksi individu yang lain. Kaseus yang mencair memungkinkan *M. tuberculosis* berkembang biak mencapai jumlah $>10^9$ organisme. Jumlah yang banyak ini dapat menyebabkan pengobatan *chemotherapy* tidak adekuat, sehingga memungkinkan muncul strain yang resisten (Ulrichs, 2004). Berdasarkan fungsi sel T /CD4+ dibedakan menjadi 2 sub populasi yaitu sel Th1 dan Th2. Sel Th1 menghasilkan IFN- γ , IL-2 dan limfotoksin yang berfungsi meningkatkan aktivitas mikrobisidal makrofag serta menimbulkan hipersensitifitas tipe lambat. Sedangkan sel Th2 menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10 yang berfungsi merangsang diferensiasi dan pertumbuhan sel B. Sel Th1 dan sel Th2 menghasilkan IL-3, GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) dan TNF- α . Baik Th1 dan Th2 berpengaruh terhadap manifestasi infeksi oleh patogen intraseluler. Sel Th1 memberikan

ketahanan imunologi terhadap infeksi melalui produksi IFN- γ , sedangkan sel Th2 akan memperburuk penyakit melalui IL-4 (Schwander, 1996). Data yang telah dipublikasi menunjukkan bahwa jenis sitokin yang diproduksi sebagai respon terhadap *M. tuberculosis* masih diperdebatkan. Beberapa studi menunjukkan bahwa klon sel T /CD4+ yang reaktif terhadap *M. tuberculosis* adalah Th1 yang menghasilkan IFN- γ dalam konsentrasi tinggi dan IL-4 dan IL-5 dalam konsentrasi rendah. Penelitian lain menunjukkan bahwa klon sel T yang reaktif terhadap *M. tuberculosis* akan menghasilkan IFN- γ dan IL-4 atau IFN- γ , IL-2, IL-5 dan IL-10. Studi terakhir melaporkan beberapa klon akan mengekspresikan mRNA terhadap IL-4 meskipun IL-4 tidak terdeteksi pada supernatan kultur sel (Barness, 1994). Meskipun beberapa penelitian menitikberatkan pada fungsi sel T/CD4+ yang berperan sebagai antimikobakteri melalui produksi sitokin dan aktivasi makrofag, mekanisme lain dari sel T pada sistem pertahanan tubuh adalah melalui sitolisis langsung pada makrofag dan fagosit yang terinfeksi *M. tuberculosis*. Kultur sel T sitolitik yang spesifik terhadap *M. tuberculosis* secara in vitro adalah sel T/CD4+ dan aktivitas sel tersebut pada lokasi penyakit meningkat dibandingkan pada sel darah tepi. Kaufmann (1988) menyatakan bahwa beberapa makrofag yang terinfeksi *M. tuberculosis* mempunyai potensi antimikobakteri yang rendah sehingga basil terhindar dari sistem imun hospes. Sel T sitolitik yang mengenal antigen mikobakteri dapat melisis makrofag tersebut sehingga basil yang dilepaskan akan dimakan dan dibunuh oleh makrofag lain dengan aktivitas mikobakteri yang lebih tinggi. Selain itu sel T sitolitik dapat berperan sebagai scavenger dengan melisis makrofag yang mati sehingga dapat dikatabolis oleh sel mononuklear di sekitarnya (Barness, 1994).

Sel T CD8⁺ merupakan populasi sel T sitolitik yang mempunyai fungsi pertahanan terhadap patogen intraseluler pada binatang percobaan. Tidak seperti sel T/CD4⁺, sel T/CD8⁺ tidak menghasilkan IL-2 tetapi lebih tergantung pada sumber eksogen (Orme, 1999). Peran sel T /CD8⁺ dapat dibuktikan dengan percobaan bahwa delesi sel T/CD8⁺ akan memperburuk infeksi *M. tuberculosis* dan BCG pada tikus, dan transfer sel T/CD8⁺ yang selektif akan melindungi terhadap tuberkulosis. Penelitian lain menggunakan tikus mutan dengan delesi gen 2-mikro-globulin, yaitu gen yang dibutuhkan untuk ekspresi MHC kelas I sehingga sel T/CD8⁺ tidak berfungsi secara aktif, maka tikus akan mati dengan cepat karena infeksi *M. tuberculosis* tetapi tidak dengan infeksi BCG (Chan, 1994). Namun sel T/CD8⁺ jarang diidentifikasi pada tuberkulosis manusia (Barness, 1994; Chan, 1994). Sel T/CD8⁺ tidak terkonsentrasi secara selektif pada lokasi penyakit (*site of disease*) pada pasien tuberkulosis dan penyakit tuberkulosis pada pasien HIV tidak dipengaruhi oleh jumlah sel T/CD8⁺. Sebaliknya tidak ada korelasi antara tes tuberkulin kulit positif dan proteksi terhadap tuberkulosis. Hal ini disebabkan tes tuberkulin tidak dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas sel T/CD8⁺ sitotoksik (Barness, 1994). Berbagai studi in vitro menunjukkan bahwa sel T /CD4⁺ yang reaktif terhadap mikobakterium sangat potensial menghasilkan IFN- γ . Namun IFN- γ juga dihasilkan oleh sel T/CD8⁺ yang spesifik terhadap mikobakterium. Sitokin IFN- γ merupakan mediator utama ketahanan terhadap tuberkulosis. Sel T /CD4⁺ dan sel T/CD8⁺ yang reaktif mikobakterium juga mengekspresikan aktifitas sitolitik yang spesifik yaitu: dapat melisis makrofag yang telah disensitisasi antigen mikobakterial atau terinfeksi BCG

atau *M. tuberculosis*. Kedua fungsi proteksi tersebut dapat ditunjukkan secara *in vitro* tetapi juga secara *in vivo* (Chan, 1994).

Limfosit T *unconventional* /CD1 (sel T/ $\gamma\delta$) berperan pada respon imunitas awal terhadap infeksi *M. tuberculosis*. Selain sel T/CD1 menghasilkan IFN γ , sel ini juga mengekspresikan aktivitas sitolitik yang berperan pada resistensi. Sel NK maupun sel T/CD1 menghasilkan IFN- γ dan melisis sel target yang tersensitisasi mikobakterium. Keberadaan *M. tuberculosis* pada individu sehat selama beberapa tahun tanpa menyebabkan penyakit menunjukkan bahwa sistem imun gagal menghilangkan patogen tersebut dan masih harus mengandalkan efek mikobakterisidal dan penghambatan pertumbuhan mikobakteri (Chan, 1994). Limfosit T/CD1 pada manusia dengan tes tuberkulin memberi hasil negatif dan pada bayi baru lahir akan berproliferasi sebagai respon terhadap *M. tuberculosis*. Berdasarkan penelitian menunjukkan bahwa frekuensi sel T/CD1 yang reaktif terhadap *M. tuberculosis* berkisar antara 5-40%. Hal ini menunjukkan bahwa sel T/CD1 pada manusia mempunyai kapasitas untuk mengenal antigen mikobakteri. *Rechallenge* atau infeksi ulang dengan *M. tuberculosis* tidak meningkatkan jumlah sel T /CD1, hal ini menunjukkan bahwa sel tersebut tidak berperan pada respon anamnese. Persentase sel T/CD1 tidak mengalami peningkatan dalam darah orang sehat maupun penderita tuberkulosis. Sel T/CD1 berperan pada respon imunitas awal yaitu pada paru dan limfonodi penderita yang baru terinfeksi *M. tuberculosis*, sebelum terbentuk respon ke sel T/CD4+. Sel T/CD1 yang reaktif terhadap *M. tuberculosis* akan menghasilkan IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 dan IL-10 sama dengan sitokin yang dihasilkan oleh sel T /CD4+. Selain itu supernatan

dari sel T /CD1 yang dirangsang oleh *M. tuberculosis* akan meningkatkan agregasi makrofag dan selanjutnya berperan pada pembentukan granuloma (Hirsh, 1996).

2.4.3 Reaksi hipersensitivitas tipe lambat

Reaksi hipersensitivitas tipe lambat (*delayed type hypersensitivity*) adalah reaksi yang tidak melibatkan antibodi tetapi melibatkan sel limfosit. Pemindahan hipersensitivitas ini dapat dilakukan dengan memindahkan limfosit T. Reaksi tipe IV ini juga disebut reaksi tipe lambat karena timbul lebih dari 12 jam setelah terpapar antigen (Kresno,1998). Respons hipersensitivitas tipe lambat terhadap *M. tuberculosis* dapat dilakukan dengan tes kulit tuberkulin yaitu suntikan intradermal dengan PPD (*Purified Protein Derivatif*). Reaksi tuberkulin mencapai puncaknya 48-72 jam setelah paparan. Reaksi ini dapat diikuti dengan reaksi yang lebih lambat yang ditandai dengan agregasi dan proliferasi makrofag membentuk granuloma yang menetap selama beberapa minggu (Kresno, 1998). Respons hipersensitivitas tipe lambat tidak identik dengan imunitas protektif. Tes kulit tuberkulin negatif pada orang sehat menunjukkan tidak adanya infeksi *M. tuberculosis* sebelumnya dan tidak adanya populasi sel T memori yang reaktif terhadap *M. tuberculosis*. Pada pasien tuberkulosis, tes kulit tuberkulin menjadi negatif merupakan hasil dari proses yang berhubungan dengan respons hipersensitivitas tipe lambat, seperti infeksi HIV dan tuberkulosis itu sendiri (Chan, 1994).

2.5 Protein NRAMP1

Protein NRAMP1 (*natural resistance associated macrophage protein* 1) adalah suatu protein yang ditemukan pada makrofag dan berperan penting dalam menciptakan kekebalan terhadap berbagai jenis mikro-organisma termasuk *M. tuberculosis*. Selain pada makrofag, NRAMP1 juga ditemukan pada *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) (Buschman, 2004).

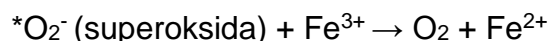
Protein NRAMP1 disandi oleh gen *NRAMP1* yang terletak pada kromosom no.2 pita 2q35 (Ceiller, 1994). Gen *NRAMP1* memiliki panjang 14 kb mengandung 15 exon dan panjang cDNA sekitar 2 kb. Protein NRAMP1 adalah protein transmembran yang berfungsi sebagai saluran ion divalent termasuk ion Fe^{2+} . Ion Fe^{2+} berperan penting pada proses pembentukan radikal hidroksil ($*OH$) yang dapat membunuh mikroorganisme termasuk *M. tuberculosis*.

2.5.1 Metabolisme Fe pada sel Inang

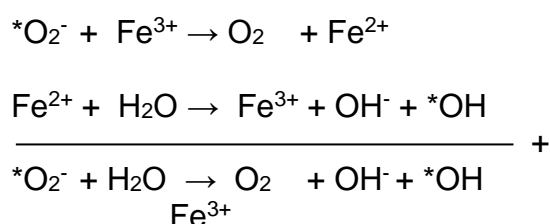
Besi dalam bentuk Fe^{2+} dapat menghasilkan radikal hidroksil $*OH$ melalui reaksi Fenton (Suryohudoyo, 2000):



Ion Fe^{2+} dapat dibentuk kembali melalui reaksi :

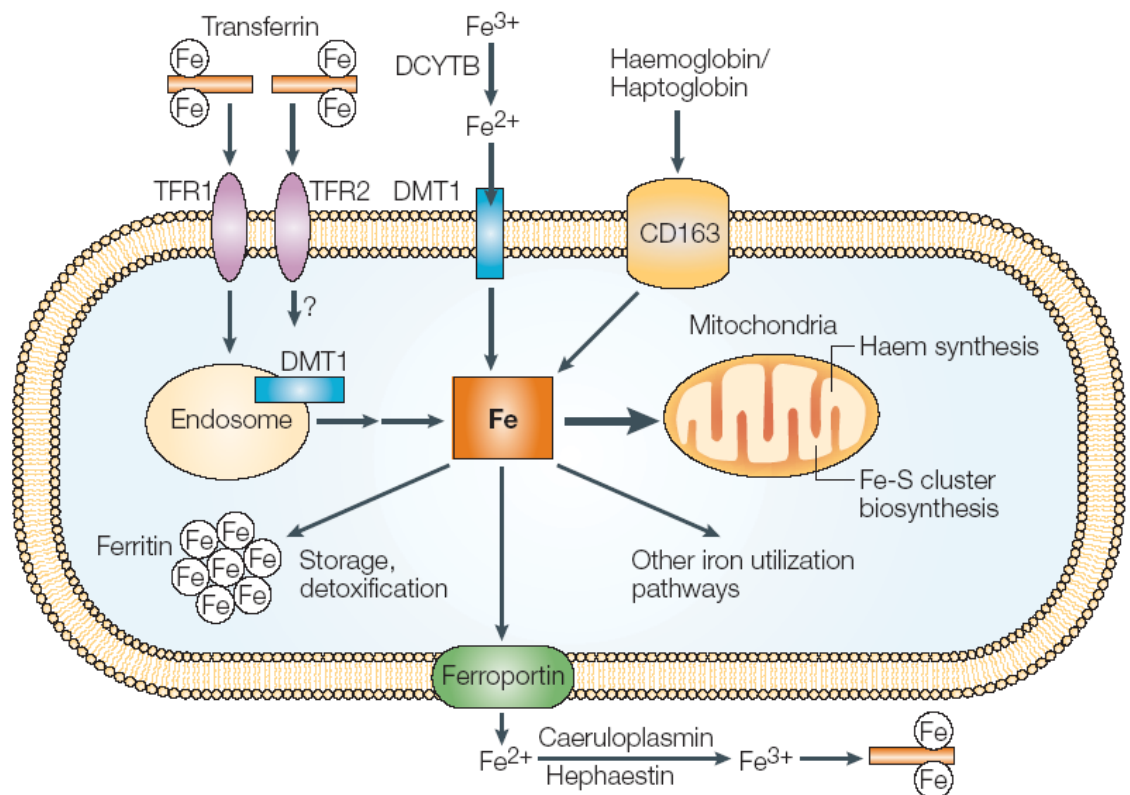


Reaksi ini merupakan bagian dari reaksi Haber-Weiss :



Radikal *OH sangat berbahaya bagi kehidupan sel dan bisa merusak membrane sel yang dapat mengakibatkan kematian sel, karena sel pecah akibat kebocoran membrane sel, sehingga air masuk sel. Karena itu, dalam tubuh, besi hanya ditemukan dalam bentuk terikat pada protein, seperti transferin (TF), lactoferin (LF), Feritin, dan hemosiderin atau dalam bentuk heme yang terikat pada hemoprotein seperti hemoglobin atau hemoprotein lain seperti berbagai jenis sitokrom (Hentze, 2004; Kaplen, 2002).

Rangkuman singkat metabolisme Fe pada sel inang mikro-organisme misalnya manusia atau mammalia lain dapat dilihat pada gambar berikut (Schable, 2004).

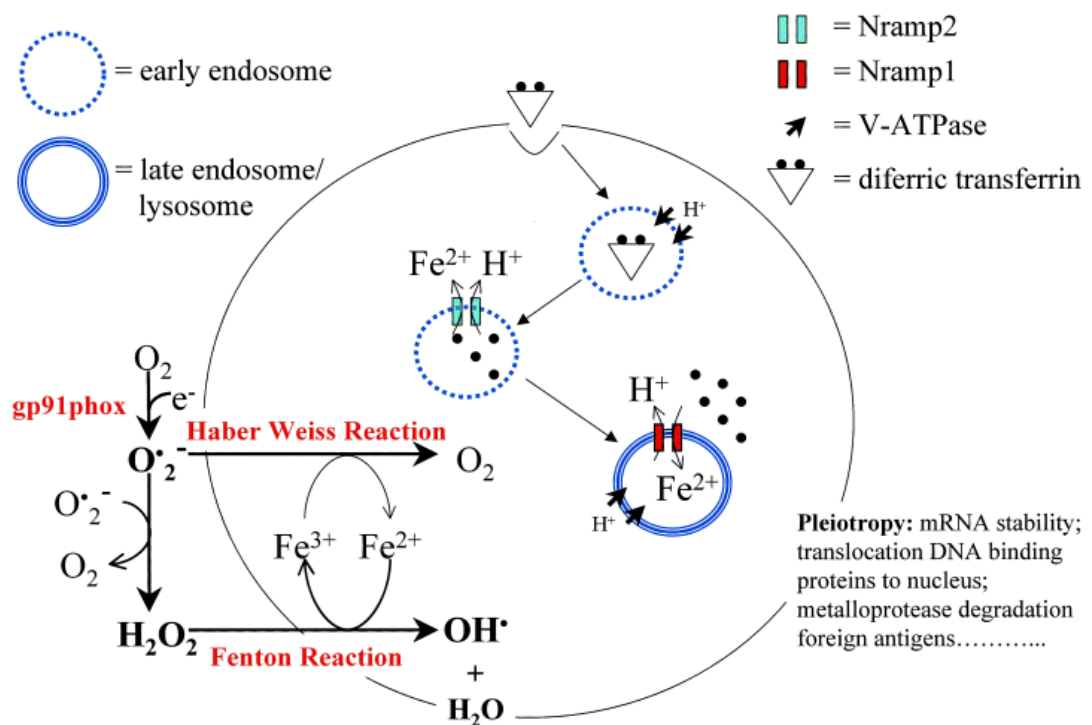


Gambar 2.4 Metabolisme besi pada sel inang (Schable, 2004).

Besi diserap oleh sel mukosa usus (enterosit) setelah Fe^{3+} direduksi oleh *ferrereduktase* usus *duodenal cytochrome-b* (DCYTB) menjadi Fe^{2+} . Fe^{3+} kemudian diserap masuk sel melalui saluran ion divalent = *divalent metal transporter 1* (DMT1) atau disebut juga NRAMP2. Besi kemudian dikeluarkan menembus membran basolateral enterosit melalui suatu permease. ferroportin masih dalam bentuk Fe^{2+} untuk kemudian dioksidasi menjadi bentuk Fe^{3+} oleh hephaesten, suatu oksidase terikat membran dan ceruloplasmin yang terlarut dalam plasma darah. Fe^{3+} kemudian diikat oleh transferrin (TF) ($2\text{Fe}^{3+}\text{TF}$) atau disebut juga holo-transferin (Holo-TF) yang kemudian beredar ke seluruh tubuh. Selain dalam bentuk holo-transferin besi dalam peredaran darah juga terikat dalam heme dalam bentuk hemoglobin atau haptoglobin. Besi memasuki sel-sel lain (termasuk makrofag) dengan mengikat holo-transferin pada *receptor transferrin* (TFR) yang berlokasi pada membran sel. Kompleks Holo-TF-TFR kemudian ditarik masuk sel melalui proses *receptor mediated endocytosis*, sehingga kompleks Holo-TF-TFR akan berada dalam suatu gelembung yang disebut endosom awal (*early endosome*). Dalam endosom awal Fe^{3+} akan dilepas dan sementara kompleks TF.TFR yang sudah tidak mengandung besi diangkut kembali (*recycle*) ke permukaan membran, Fe^{3+} akan direduksi menjadi Fe^{2+} . Fe^{2+} kemudian dikeluarkan dari endosom oleh saluran ion DMT1 (NRAMP2) masuk sitosol. Sementara itu besi dalam bentuk hemoglobin atau haptoglobin dapat memasuki sel melalui *haemoglobin scavenger receptor* (CD163). Besi di dalam sel dapat digunakan untuk membentuk berbagai senyawa yang mengandung besi atau disimpan dalam bentuk ferritin.

2.5.2 Peran NRAMP1 dan NRAMP2 dalam metabolisme besi di makrofag (Blackwell, 2001)

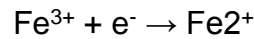
Makrofag mengekspresi baik NRAMP1 maupun NRAMP2. Walaupun keduanya merupakan saluran ion Fe^{2+} (dan ion divalen lain seperti Zn^{2+} dan Mn^{2+}) namun cara kerjanya berbeda. NRAMP1 adalah suatu “anti porter” yang menukarkan ion Fe^{2+} dengan ion H^+ , sedangkan NRAMP2 adalah suatu “symporter” yang menyalurkan ion Fe^{2+} bersama ion H^+ (gambar 2.5).



Gambar 2.5 Peran NRAMP1 dan NRAMP2 di dalam makrofag (Blackwell, 2001).

Makrofag adalah sel yang melaksanakan fagositosis berbagai mikro organisme termasuk *M. tuberculosis*. Besi memasuki makrofag dalam bentuk *diferric transferrin* ($2\text{Fe}^{3+}.\text{TF}$ atau disebut juga : *holotransferrin*) setelah terlebih dahulu mengikat pada *reseptor transferin* (TFR). Kompleks *holotransferrin-reseptor transferin* (HoLo-TF-TFR) kemudian ditarik masuk

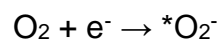
sel melalui proses *receptor mediated endocytosis* yang menghasilkan endosom awal (lihat bab 2.5.1). Di dalam endosom awal, ion Fe^{3+} dilepas dari kompleks (Holo-TF-TFR). Sementara kompleks TF-TFR diangkut kembali ke permukaan sel, Fe^{3+} akan direduksi oleh suatu reduktor (kemungkinan protein gp91 phox: *glycoprotein 91 phagocyte oxidase*) menjadi Fe^{2+} .



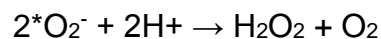
Sementara itu oleh aktivitas enzim V-ATPase (*Vascular ATPase*) ion H^{+} masuk endosom dari sitosol. Selanjutnya oleh NRAMP2, ion Fe^{2+} bersama ion H^{+} dialirkan masuk sitosol (lihat bab 2.5.1). Sementara itu karena berlanjutnya aktivitas V-ATPase terus menurun sampai mencapai pH 4,0 dan endosom awal berubah menjadi endosom akhir (*late endosome*) (Blackwell, 2001).

Pada endosom akhir oleh NRAMP1, Fe^{2+} dari sitosol memasuki endosom dipertukarkan dengan ion H^{+} . Dalam endosom akhir akan terjadi serangkaian reaksi kimia :

1. Pembentukan ion superoksida ($^*\text{O}_2^{-}$) oleh gp91 phox:



2. Pembentukan hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh enzim superoksida dismutase (SOD):



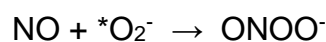
3. Pembentukan radikal hidroksil ($^*\text{OH}$) melalui reaksi Fenton:



Radikal $^*\text{OH}$ sangat berbahaya, karena dapat membunuh mikro organisme termasuk *M. tuberculosis* melalui kerusakan membran sel (lihat bab 2.5.1). *M. tuberculosis* yang memasuki saluran pernafasan akan difagositosis oleh

makrofag (lihat bab 2.2). Fagosom yang berisi *M. tuberculosis* akan mengalami fusi degradasi endosom akhir, sehingga menimbulkan peluang untuk diserang dan dibunuh oleh radikal *OH . Namun fusi fagosom dengan endosom akhir hanya terjadi apabila makrofag telah teraktivasi oleh interferon- γ (IFN- γ), sehingga dapat disimpulkan bahwa NRAMP1 tidak (belum) bersifat bakterisidal pada makrofag yang belum teraktivasi (*resting macrophage*) (Blackwell, 2001).

Sebagaimana diketahui IFN- γ dihasilkan oleh sel Th1 (lihat bab 2.4.2). Ion Fe^{2+} diketahui menimbulkan "*pleiotropic effect*", karena ion Fe^{2+} mengendalikan ekspresi sejumlah gen melalui apa yang disebut "*metal-response-element*" yang salah satu diantaranya gen NOS2A yang menyandi enzim iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) (Blackwell, 2001). Sesuai dengan namanya, iNOS berperan dalam sintesis NO, salah satu produk makrofag yang teraktivasi. NO dapat bereaksi dengan ion superoksida ($^*O_2^-$) menghasilkan ion peroksinitrit $ONOO^-$ yang sangat toksik :

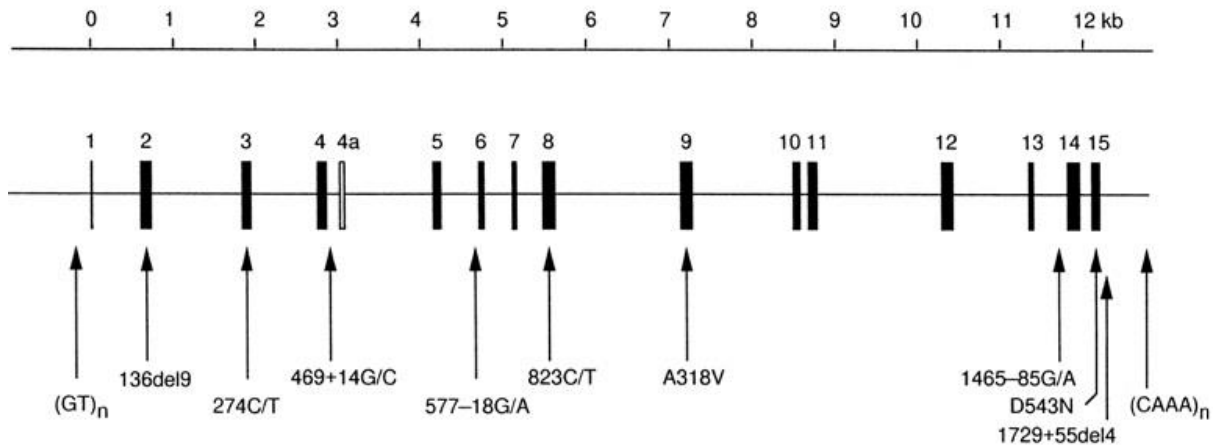


Terbentuknya peroksinitrit ini lebih mengukuhkan peran NRAMP1 sebagai protein yang menimbulkan kekebalan terhadap *M. tuberculosis* (Blackwell, 2001).

2.5.3 Polimorfisme gen *NRAMP1* dan kaitannya dengan Tuberkulosis

Paru

Dari penelitian beberapa etnik ditemukan polimorfisme gen *NRAMP1* pada 15 lokasi (Liu, 1995; Buu, 1995; Abel, 1998), seperti terlihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.6 Lokasi dan jenis polimorfisme gen *NRAMP1* manusia. Ekson ditentukan dengan garis tegak lurus hitam ditandai dengan nomor 1 sampai 15. Lokasi masing-masing polimorfisme ditunjukkan dengan panah tegak lurus disertai nama jenis polimorfisme. Garis mendatar paling atas menunjukkan ukuran gen dengan skala kilobasa (kb) (Camstock, 1978).

Berbagai polimorfisme tersebut ditemukan pada berbagai etnik yang diteliti. Bellamy (1998) dalam penelitiannya di Gambia meliputi 4 suku yang berbeda, menemukan varian genetik 5'(CA)_n (disebut juga 5'(GT)_n), INT4 (disebut juga 469+14G/C), D543N, 3'UTR (disebut juga 1729+55del4) (Camstock, 1978) lebih sering ditemukan pada penderita tuberkulosis paru dengan nilai *p* masing-masing : 0,008; 0,066; 0,004; dan 0,004 (lihat tabel).

Polimorfisme pada mikrosatelit daerah 5' ditemukan delapan alel yang berbeda, enam diantaranya merupakan alel yang jarang ditemukan. Dua alel yang sering ditemukan adalah alel dengan urutan:

T(TG)₅ AC(GT)₅ AC(GT)₉ G disebut alel (GT)₉

T(TG)₅ AC(GT)₅ AC(GT)₁₀ G disebut alel (GT)₁₀

TABLE 2. RELATION BETWEEN *NRAMP1* POLYMORPHISMS AND TUBERCULOSIS IN THE GAMBIA.

POLYMORPHISM	PATIENTS WITH TUBERCULOSIS (N=410)	CONTROLS (N=417)	ODDS RATIO (95% CI)*	CHI-SQUARE TEST†		P VALUE	
				UNADJUSTED	ADJUSTED	UNADJUSTED	ADJUSTED
	no. of subjects						
5'(CA) _n							
199/199	263	303	1.0				
199/other	125	99	1.45 (1.05–2.01)	6.94	6.96	0.03	0.008
Other/other	13	8	1.87 (0.71–5.02)				
INT4							
G/G	320	360	1.0				
G/C	78	48	1.83 (1.22–2.75)	9.37	7.69	0.009	0.006
C/C	3	3	1.13 (0.18–7.01)				
D543N							
G/G	337	375	1.0				
G/A	68	41	1.85 (1.20–2.85)	9.54	8.18	0.008	0.004
A/A	0	1	0.00 (0–19.35)				
3'UTR‡							
TGTG+/+	244	301	1.0				
TGTG+/del	150	100	1.85 (1.35–2.54)	16.72	8.32	<0.001	0.004
TGTGdel/del	11	16	0.85 (0.36–1.97)				

*Odds ratios are for the comparison with the more common homozygous genotype for each polymorphism. CI denotes confidence interval.

†The chi-square test with 2 df was performed for the comparison of overall genotypic frequencies. The adjusted values were obtained with the use of the Mantel–Haenszel test after stratification according to ethnic group.

‡The plus sign denotes the presence of TGTG, and *del* the absence of these four bases.

Alel (GT)₉ pada beberapa populasi tertentu ditemukan dengan frekuensi 70-80%, sedangkan alel (GT)₁₀ dengan frekuensi lebih rendah yaitu 15-25% (Ma, 2002). Searle (1999) menemukan frekuensi yang sedikit berbeda yaitu (GT)₉ : 78-80% dan (GT)₁₀ : 20-25%. Alel (GT)₁₀ ternyata menunjukkan ekspresi gen *NRAMP1* yang lebih rendah dibanding dengan alel (GT)₉, sehingga diduga polimorfisme (GT)_n ada kaitannya dengan kerentanan (untuk (GT)₁₀) atau kekebalan (untuk (GT)₉) terhadap infeksi *M. tuberculosis* (Ma, 2002).

Peran varian genotip gen *NRAMP1* dapat menjadi faktor risiko untuk tuberkulosis, sehingga dianalisis di Jepang, Korean, Conakry, dan Guinea. Di Jepang (Gao, 2000), mendapatkan hasil yang sama dengan di Gambia yaitu varian genotip D543N gen *NRAMP1* adalah gen yang rentan terhadap *M. tuberculosis*, sedangkan allele/varian yang jarang ditemukan menjadi

faktor yang bersifat melindungi terhadap tuberkulosis. Studi di Korea polimorfisme 3'UTR gen *NRAMP1* ditemukan ada hubungan dengan tuberkulosis (Ryu, 2000). Studi di Conakry, Guinea transmisi allele *NRAMP1* terjadi pada anak yang ditaksir mempengaruhi 44 keluarga (Cervino, 2000), di mana analisis polimorfisme, hanya 460+14G/C polimorfisme (INT4) terdapat hubungan kerentanan dengan tuberkulosis. Menurut Dalgado pada tahun 2002, genotip D543N dan 3UTR adalah genotip yang kebal dan genotip INT4 dan 236C/T gen *NRAMP1* adalah genotip yang rentan. Menurut Soborg pada tahun 2002 di Denmark, genotip INT4 dan 5'(CA)_n dari gen *NRAMP1* adalah varian genotip yang rentan. Menurut Liu tahun 2004, di China melaporkan bahwa genotip D543N dan 3'UTR dari gen *NRAMP1* adalah gen yang rentan dan menurut Zhang tahun 2005 juga di China melaporkan bahwa genotip D543N dan INT4 dari gen *NRAMP1* adalah genotip yang rentan terhadap *M. tuberculosis*.

2.6 Pemeriksaan Diagnostik Tuberkulosis

Pertimbangan penentuan alat diagnosis TB harus sesuai dengan manifestasi klinis TB, seperti:

- 1 Kasus TB paru aktif (batuk lama dan produktif >3 minggu dengan gejala simtomatis umum untuk infeksi kronis) Dilakukan diagnosis laboratorium: mikroskopis BTA (Zn, Ao), kultur, PCR dari spesimen sputum/BAL/PBMC, Radiologis, dan patologi darah.
- 2 Kasus TB laten (sudah lama kontak dengan penderita TB Paru aktif >2 tahun), tidak sakit atau baru sembuh dari sakit, belum pernah atau sudah pernah berobat lengkap, serta hasil Mantoux/Skin test positif

atau negatif) Dilakukan Mantoux test serial untuk melihat adanya respons CMI/DTH, uji serologis ELISA, serta PCR dari PBMC (Mertaniasih, 2005).

2.6.1 Diagnosis Mikobakteriologis

Akurasi diagnosis laboratorium bakteriologis ditentukan mulai dari pemeriksaan klinis suspek TB, spesimen representatif dari fokus infeksi dengan metode standar, dan metode pemeriksaan laboratorium yang akurat, cepat, mudah dan murah (Mertaniasih, 2005).

1. Pemeriksaan Mikroskopis Bakteri Tahan Asam

Pemeriksaan mikroskopis pada hapusan dahak dengan pewarnaan *Ziehl Neelson* atau *Gobet Kinyoun*, merupakan metode diagnosis TB Paru yang paling efektif dan efisien untuk menjangkit kasus TB Paru infeksius. Tes ini sederhana, cepat (kurang dari satu jam), dan murah. Pada program penanggulangan penyakit tuberkulosis (P2TB), prosedur teknik mikroskopis Bakteri Tahan Asam (BTA) dilakukan 3x berturut-turut (sewaktu-pagi-sewaktu). Penggunaan metode pewarnaan ZN berdasarkan standar *International Union Against Tuberculosis Lung Disease (IUATLD)*. Hasil mikroskopis BTA 3X standar IUATLD sangat berguna untuk menegakkan diagnosis TB Paru. Tes ini untuk penentuan klasifikasi pengobatan, menilai kemajuan pengobatan, dan menentukan tingkat penularan. Kelemahan mikroskopis BTA, sensitivitasnya rendah, karena hanya dapat mendeteksi >5.000 basil/ml dahak, dan spesifisitasnya tidak dapat membedakan antara *M.tuberculosis* dengan spesies mikobakteria yang lain (Mertaniasih, 2005).

2. Metode Kultur

Metode kultur merupakan metode “*Gold standard*”, karena dapat mengisolasi penyebab infeksi sesuai dengan postulat “Koch”, dan sensitivitasnya 95%, karena dapat mendeteksi 1–100 basil/ml dahak, serta spesifisitasnya 100%. Media yang digunakan *Lowenstein-Jensen/LJ* medium dengan suplemen *ribo-nucleic-acid* atau *pyruvic acid*, dan media *Middlebrook 7H10* dan *7H11*, juga media *Wellenstein*, *Ogawa*, dan lain-lain. Pertumbuhan koloni dapat dideteksi antara 3 – 6 minggu. Pada isolat ini dilakukan uji biokimia serial terutama uji akumulasi niacin, uji reduksi nitrat, uji katalase pada 68°C, uji hambatan pertumbuhan oleh *Thiophen 2-Carboxylic acid hydrazine* (TCH), atau hibridisasi DNA (Forbes, 1998). Kelemahannya waktu pemeriksaan lama, sehingga tidak dapat segera menentukan pengobatan dengan cepat (Mertaniasih, 2005).

2.6.2 Metoda *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Teknik amplifikasi DNA paling akurat dari spesimen cairan serebrospinal dan pleura dengan sensitivitas dan spesifisitas mendekati 100%. Hasil PCR dari spesimen dahak masih kontroversial, karena dalam dahak masih banyak mengandung bahan inhibitor pada reaksi PCR, sehingga sensitivitas 50-80% dan spesifisitas 95%. Reaksi PCR mengandung campuran dari DNA target, DNA polymerase untuk perpanjangan rantai nukleotida, Nukleotida dATP, dTTP, dGTP, dCTP (dNTP) untuk menyusun rantai baru, *primer* oligonukleotida (potongan rantai DNA yang spesifik dan komplementer dengan bagian DNA sasaran), dan larutan buffer sebagai pereaksi. Prinsip kerja PCR yaitu siklus reaksi mulai dari denaturasi (pada

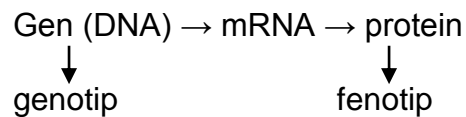
suhu 95-98 °C): terjadi pemisahan rantai ganda DNA sasaran menjadi rantai tunggal sebagai *template* (cetakan), kemudian *annealing* (pada suhu 50-60 °C) terjadi pengikatan *primer* pada rantai tunggal DNA *template* yang komplementer, dan elongasi (pada suhu 72 °C) terjadi pemanjangan rantai primer sesuai dengan DNA *template*. Siklus terjadi berulang kali, sehingga terjadi amplifikasi DNA sasaran secara eksponensial menghasilkan *copy* spesifik DNA sasaran 10^5 atau lebih pada siklus 35X (30-40X) dalam waktu beberapa jam. Hasil amplifikasi DNA dapat divisualisasi dengan pewarnaan *ethidium bromide* dan dilihat dengan menggunakan sinar ultra violet. Hasil PCR dapat dilaporkan dalam waktu 24-48 jam. *Primer* yang digunakan untuk TB adalah *primer* yang spesifik untuk DNA sasaran, *insertion sequence* IS 6110m, 16S rRNA dan HSP 60. Hasil PCR menggunakan *primer* IS 6110 sangat efektif dengan spesimen cairan pleura, serebrospinal, darah, dan jaringan, karena dapat mendeteksi 1-10 kuman dengan sensitivitas 90% dan spesifisitas 97%. Kelemahan teknik PCR, mahal dan tidak dapat membedakan basil hidup dan mati (Mertaniasih, 2005).

2.7 Analisis Biologi Molekuler

Sejak awal tahun 1950, metoda laboratorium untuk melaksanakan analisis genetika telah berkembang. Pengembangan yang bermakna meliputi penemuan tiga struktur dimensional dari DNA, yang digunakan untuk teknologi *sequencing* dan sintesis DNA dan pengembangan reagen dan prosedur laboratorium untuk mengidentifikasi gen yang diekspresikan.

Analisis genetika digunakan untuk menentukan hubungan antara genotip yang ditentukan oleh gen (DNA) dan fenotip yang ditentukan adalah

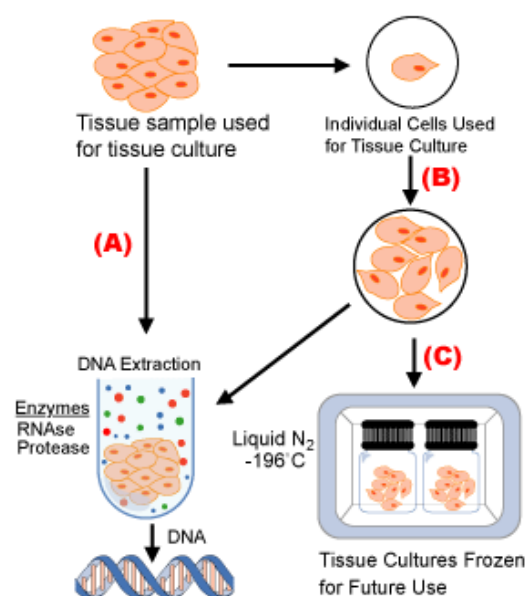
protein. Sekarang dengan menggunakan teknologi sekuensing, yaitu penentuan urutan nukleotida dari suatu gen dapat dipahami secara langsung dasar molekuler hubungan antara genotip dan fenotip berdasarkan apa yang disebut “dogma sentral”, yang berbunyi : “ urutan nukleotida pada DNA menentukan urutan nukleotida pada mRNA dan urutan nukleotida pada mRNA menentukan urutan asam amino pada protein”.



namun metoda sekuensing adalah metoda yang relatif mahal, sehingga untuk menentukan adanya polimorfisme biasanya digunakan metoda lain yang lebih murah, seperti misalnya analisis PCR-RFLP (*PCR-restriction fragment length polymorphism*) yang diterapkan dalam penelitian ini, untuk menentukan polimorfisme gen *NRAMP1*.

2.7.1 Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA dapat dilihat pada gambar 2.7.



Gambar 2.7 Proses ekstraksi DNA (<http://www.NBII.gov>, 9/9/2005).

DNA dapat diekstraksi secara langsung dari jaringan (A) ataupun melalui kultur jaringan (B). Untuk mendapatkan DNA murni digunakan campuran reagen yang pada dasarnya bertujuan memecah sel dan merusak berbagai komponen sel (RNA, protein) kecuali DNA. DNA yang sudah dimurnikan disentrifugasi dan akan mengendap pada dasar tabung sentrifugasi.

Kultur jaringan atau kultur sel dapat memberikan sumber DNA yang tak terbatas. Untuk memelihara kultur sel, kultur sel disimpan pada suhu di bawah $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ dengan menggunakan nitrogen cair.

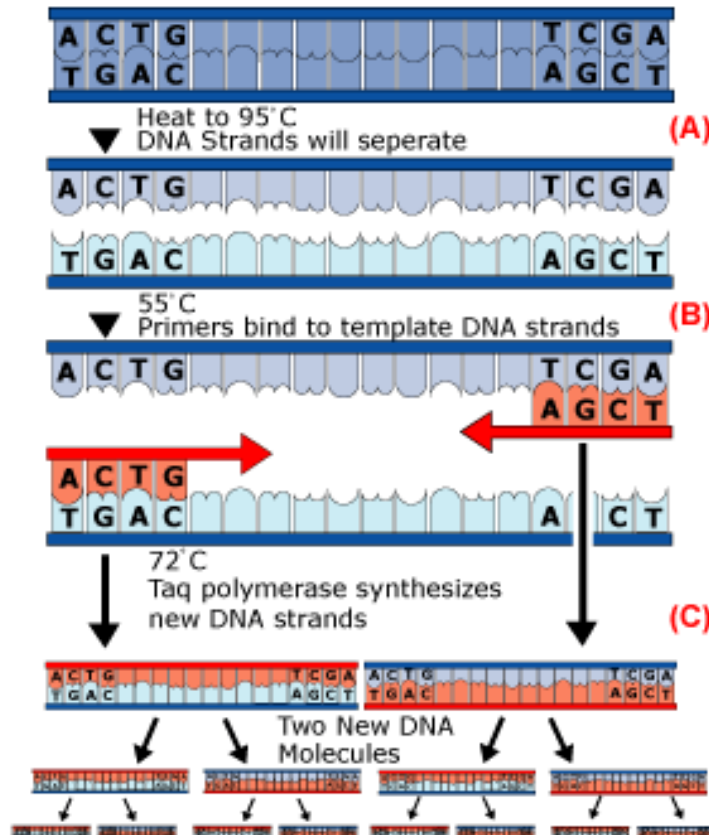
Kemudian dilakukan uji kemurnan DNA dengan spektrofotometer dengan menentukan rasio antara nilai OD_{260} dan OD_{290} pada sampel DNA. Untuk mengetahui konsentrasi DNA dapat dilakukan elektroforesis dengan menggunakan marker DNA (Muladno, 2002).

2.7.2 Amplifikasi DNA

Untuk memperoleh sejumlah DNA yang banyak dan spesifik, diperlukan prosedur pemeriksaan "*Cloning*" dan "*PCR*" yang dapat memproduksi dengan cepat sejumlah besar target urutan DNA.

PCR dapat memproduksi berjuta-juta *copy* urutan target dari DNA. Komponen penting dari reaksi adalah sepasang *primer* (oligonukleotida) urutan pendek (10-20 basa) yang komplementer. *Primer* yang berada sebelum daerah target disebut *forward primer* dan yang berada setelah daerah target disebut *reverse primer*. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA baru dikenal sebagai *enzyme DNA polymerase* yang berasal dari bakteri *Thermus aquaticus* yang hidup di

sumber air panas (*Taq polymerase*). Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan dNTPs yang terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP. Amplifikasi DNA target terjadi di dalam tiga langkah siklus berulang sebagai berikut.



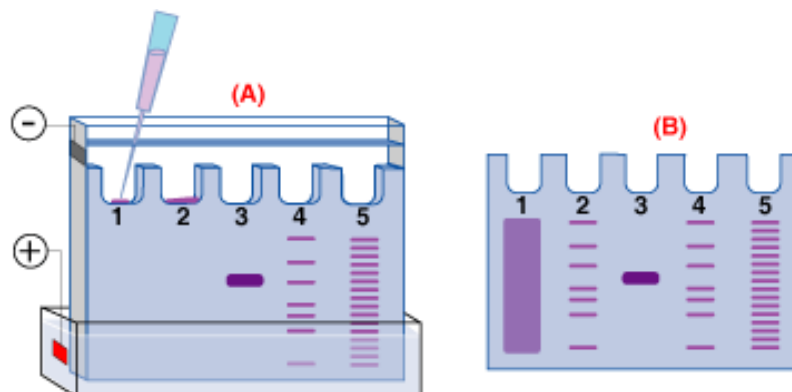
Gambar 2.8 Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (<http://www.NBII.gov>, 9/9/2005).

Larutan dipanaskan sampai suhu 95°C untuk memisahkan dua rantai dari *double-stranded target* DNA (A) menjadi untai tunggal (proses denaturasi). Larutan didinginkan sampai suhu 55°C (50-60°C) untuk membiarkan primers mengikat (proses *annealing*) pada urutan nukleotida berkomplemen dengan rantai DNA target (B). Larutan dipanaskan kembali sampai suhu 72°C (temperatur optimal untuk *Taq polymerase*) untuk menghasilkan salinan dari tiap rantai (proses ekstensi). Dengan demikian

satu molekul DNA akan berlipat ganda jumlahnya menjadi dua molekul DNA. Proses denaturasi-penempelan-ekstensi disebut satu siklus. Setelah itu proses diulang lagi sampai 35-40 siklus (C). Biasanya suhu denaturasi dan ekstensi bersifat permanen, masing-masing 95°C dan 72°C, sedangkan suhu penempelan bergantung pada panjang pendeknya primer.

2.7.3 Elektroforesis

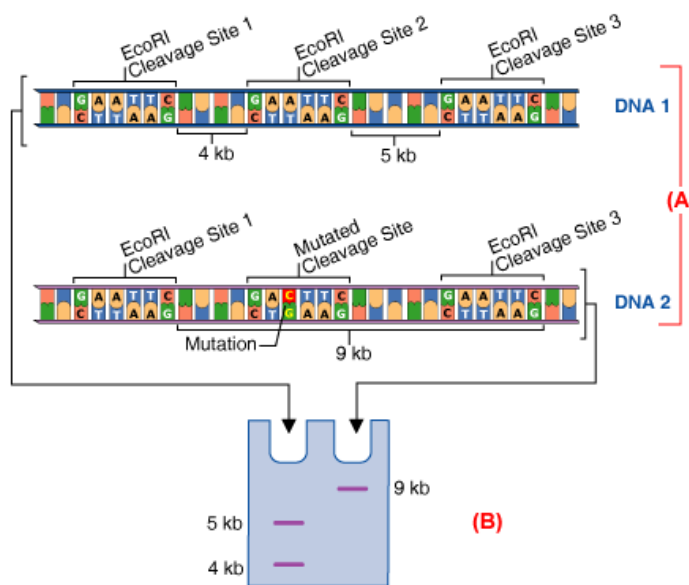
Elektroforesis digunakan untuk memisahkan potongan DNA menjadi bermacam-macam ukuran panjang. DNA terutama disaring melalui lapis tipis "gel". Gel dibuat dari *agarose* atau *acrylamide* yang berbeda konsistensinya sesuai dengan berat fragmen DNA yang akan dipisahkan. Gel yang mengandung pewarna *ethidium bromide* dituang ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir pembuat sumur yang kemudian setelah mengeras akan terlihat sumur untuk menempatkan sampel DNA (A). Arus listrik dijalankan selama 30 menit. DNA yang telah terbagi dalam beberapa fragmen dalam gel berupa urutan pita yang berjajar seperti tangga dapat dilihat di bawah sinar ultra violet.



Gambar 2.9 Proses Electrophoresis (<http://www.NBII.gov>, 9/9/2005)

2.7.4 Analisis *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

Analisis RFLP digunakan untuk mendeteksi mutasi di dalam urutan DNA yang dikenali oleh enzim restriksi spesifik. Urutan basa DNA dapat dipotong oleh enzim restriksi di sepanjang urutan genom dengan membandingkan jumlah dan tempat lokasi yang dipotong. RFLP merupakan metode efektif untuk menyaring perbedaan DNA dari individu berbeda.



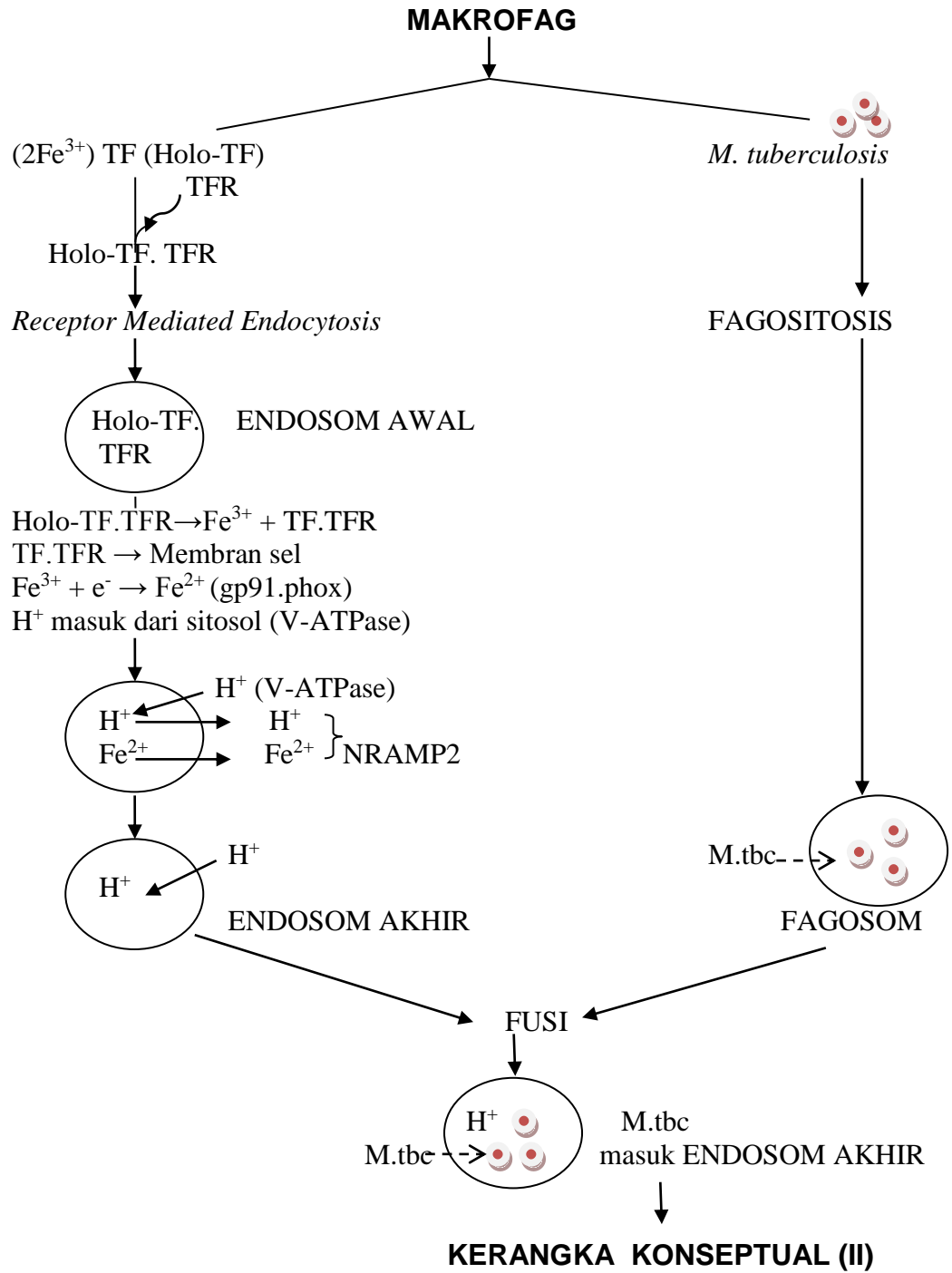
Gambar 2.10 Proses PCR-RFLP (<http://www.NBII.gov>, 9/9/2005)

Untuk pelaksanaan analisis RFLP, sampel DNA dari hasil amplifikasi PCR dicerna oleh enzim restriksi (contoh: *EcoR1* (dari bakteri *Escherichia coli*)). Enzim *EcoR1* selalu memotong molekul DNA pada posisi : G | AATTC. Pada DNA-1 setelah inkubasi dengan enzim *EcoR1*, terdapat 3 tempat lokasi untuk *EcoR1* dan membagi DNA-1 menjadi dua potongan pendek. Pada DNA-2 terjadi mutasi pada lokasi *EcoR1*, sehingga menjadi satu potongan. Untuk dapat mengetahui hasil potongan, DNA-1 dan DNA-2 dapat dipisahkan secara *electrophoresis*.

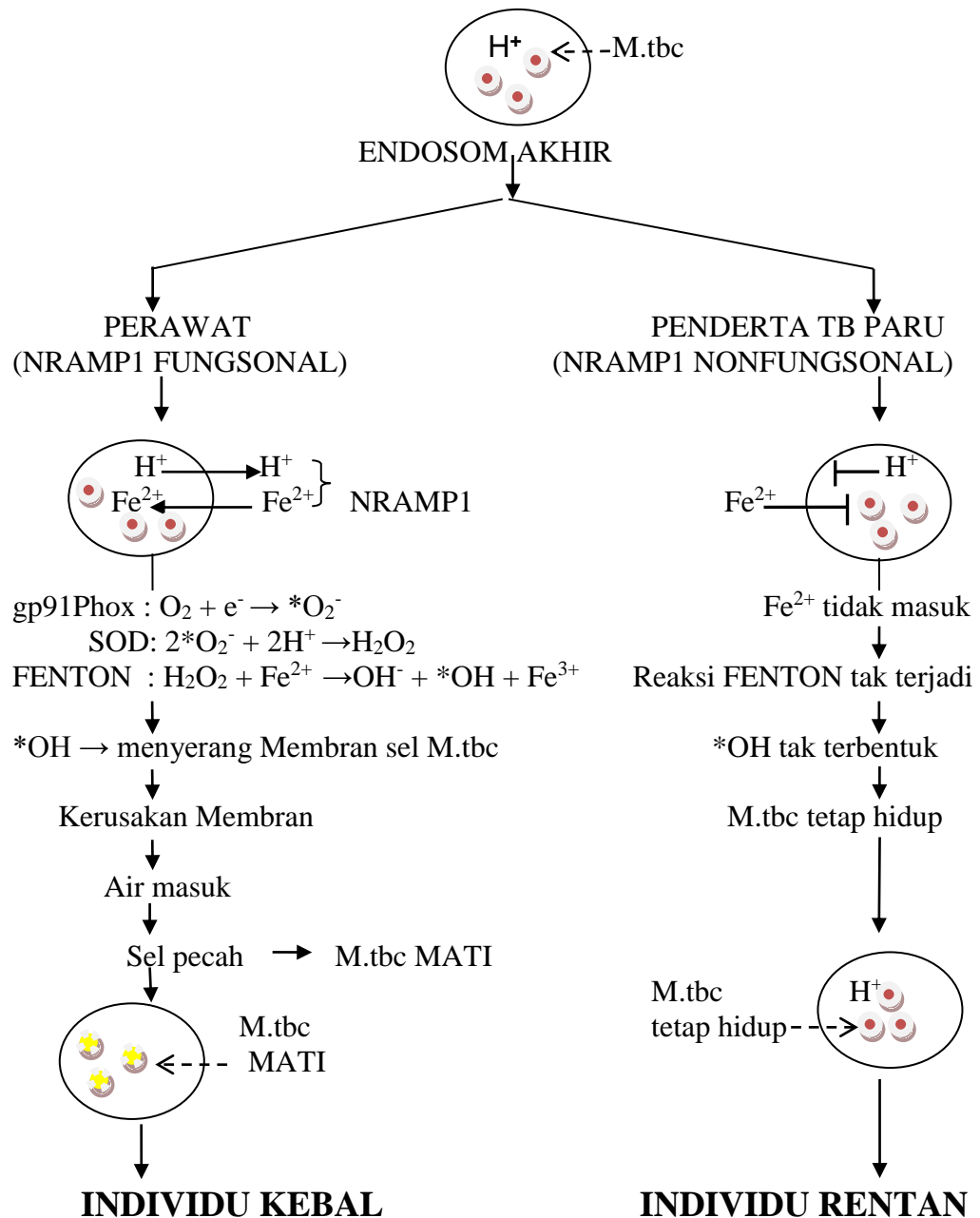
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

3.1.1 KERANGKA KONSEPTUAL (I)



3.1.2 KERANGKA KONSEPTUAL (II)



3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual

Besi (Fe) berperan penting dalam pertahanan tubuh terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb), karena melalui reaksi Fenton dapat menghasilkan radikal hidroksil (*OH) yang dapat membunuh M.tb.

Makrofag mendapatkan besi dalam bentuk holotransferrin (Holo-TFR) yaitu transferrin (TF) yang mengikat 2 ion Fe^{3+} ($2 \text{Fe}^{3+}.\text{TF}$) setelah sebelumnya mengikat pada reseptor transferrin (TFR) yang terdapat pada permukaan membran makrofag.

Kompleks Holo-TF.TFR kemudian melalui *receptor mediated endocytosis* ditarik masuk sitosol, sehingga akhirnya kompleks Holo-TF.TFR akan ditemukan dalam endosom awal (*early endosome*).

Dalam endosom awal, Fe^{3+} akan dilepas dari kompleks Holo-TF.TFR sebagai berikut: $\text{Holo-TF.TFR} \rightarrow 2 \text{Fe}^{3+} + \text{TF.TFR}$

Sementara kompleks TF.TFR dikembalikan ke permukaan membran makrofag, Fe^{3+} direduksi menjadi Fe^{2+} : $\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$

Reaksi reduksi ini mungkin diperantarai oleh protein gp91phox (*glycoprotein 91 phagocyte oxidase*). Fe^{2+} kemudian dikeluarkan ke sitosol bersama ion H^+ oleh symporter NRAMP2 (Blackwell, 2001).

Ion H^+ berasal dari sitosol, memasuki endosom diperantarai oleh V-ATPase (*vesicular ATPase*, Blackwell, 2001). Endosom awal akhirnya berubah menjadi endosom akhir (*late endosome*). Sementara itu M.tbc masuk makrofag melalui proses fagositosis, sehingga M.tbc ini akan terdapat dalam fagosom. Fagosom akhirnya akan bergabung (fusi) dengan endosom akhir, sehingga M.tbc sekarang hadir dalam endosom akhir.

Dengan masuknya Fe^{2+} , maka terbuka peluang pembentukan radikal $^*\text{OH}$ melalui reaksi Fenton yang kemudian berakibat terbunuhnya M.tbc. Namun hal ini hanya akan terjadi apabila terbentuk protein NRAMP1 yang fungsional, tetapi apabila karena ada suatu mutasi sehingga tidak terbentuk protein NRAMP1 atau terbentuk protein NRAMP1 yang tidak aktif (NRAMP1

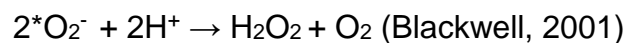
nonfungsional), maka reaksi Fenton tidak akan terjadi dan *M.tbc* akan tetap hidup.

Pada perawat yang merawat penderita TB paru yang walaupun terpapar dan terinfeksi, tetapi tetap sehat diperkirakan memiliki protein NRAMP1 yang fungsional. Sebaliknya pada penderita TB paru diperkirakan tidak memiliki NRAMP1 yang fungsional (NRAMP1 nonfungsional).

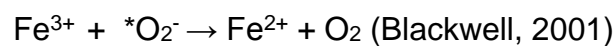
Pada individu dengan NRAMP1 yang fungsional akan terjadi reaksi Fenton sebagai berikut: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + *OH$

H_2O_2 diperoleh melalui 2 reaksi yang masing-masing dikatalisis oleh gp91Phox, sebagai berikut: $O_2 + e^- \rightarrow *O_2^-$

dan superoksida dismutase (SOD), sebagai berikut :



Radikal hidroksil (*OH) akan menyerang membran sel *M.tbc*, menimbulkan kerusakan membran dan berakhir dengan pecahnya sel, karena masuknya air ke dalam sel *M.tbc*. Fe^{2+} yang terpakai akan dibentuk kembali melalui reaksi Haber-Weiss sebagai berikut:



Pada individu tanpa protein NRAMP1 yang fungsional, radikal hidroksil (*OH) tidak terbentuk, sehingga akhirnya *M.tbc* akan tetap hidup.

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Ada perbedaan distribusi frekuensi pada varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* antara kelompok penderita TB paru dan perawat.

2. Ekspresi protein NRAMP1 pada makrofag dari kelompok perawat lebih tinggi daripada ekspresi protein NRAMP1 pada makrofag dari kelompok penderita TB paru.
3. Ada perbedaan ekspresi protein NRAMP1 dengan varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.
4. Ada perbedaan ekspresi protein NRAMP1 dengan varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.
5. Ada interaksi antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat.
6. Ada interaksi antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok penderita TB paru.
7. Ada hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.
8. Ada hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Jenis/Rancangan Penelitian yang digunakan

Jenis penelitian yang digunakan adalah *observational crossectional analytic design* pada populasi penderita TB Paru di RS Karang Tembok, Surabaya dan populasi perawat yang merawat penderita TB paru ≥ 2 tahun di RSUD Dr. Soetomo, Surabaya.

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1 Populasi penelitian

Perawat yang merawat penderita TB paru ≥ 2 tahun di RSUD Dr. Soetomo dan penderita TB paru di RS Karang Tembok, Surabaya yang memenuhi kriteria inklusi dalam kurun waktu Mei 2006 s/d April 2007.

4.2.2 Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah populasi penderita TB Paru di Poli Dot Rawat Jalan RS Karang Tembok Surabaya dan perawat yang merawat penderita TB paru ≥ 2 tahun di Ruang Paru Laki-laki dan Perempuan RSUD Dr. Soetomo, Surabaya. Pengambilan sampel telah mendapat ijin dari Kepala BP4 RS Karang Tembok Surabaya dengan nomer surat 070/316.07/III.17/2007 dan Ketua Bagian Ilmu Penyakit Paru RSUD Dr. Soetomo dengan nomer surat 059/J03.1.17/P.Um/2006. *Ethical Clearance* diperoleh dari Panitia Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Soetomo Surabaya dengan No. 57/Panke.KKE/2005 terhitung mulai tanggal 22 Desember 2005.

4.2.3 Perhitungan besar sampel

Perhitungan besar sampel berdasarkan penelitian observasional (Zainuddin, 1999).

Rumus :

$$n = \frac{N \cdot (Z_{\alpha})^2 \cdot p \cdot q}{d^2 \cdot (N-1) + (Z_{\alpha})^2 \cdot p \cdot q}$$

Di mana :

- n = besar sampel
- N = besar populasi (104 orang)
- Z_{α} = nilai distribusi normal baku (tabel Z) pada $\alpha = 0,05 = 1,96$
- p = perkiraan proporsi D543N (G/A) pada penderita TB paru = 16% = 0,16 di Denmark (Soborg Ch, 2002)
- q = 1 - p
- d = besarnya penyimpangan yang masih bisa ditolerir atau batas toleransi kesalahan (5% = 0,05)

Jadi N penderita TB paru= 69 sampel

N perawat penderita TB paru ≥ 2 tahun= 43 sampel

4.2.4 Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel diambil secara *total population sampling* dari populasi penderita TB paru di Poli Dot Rawat Jalan RS Karang Tembok, Surabaya dan populasi perawat yang merawat penderita TB paru ≥ 2 tahun dan di Ruang Paru Laki dan Perempuan RSUD Dr. Soetomo, Surabaya.

4.3 Variabel Penelitian, Klasifikasi Variabel, Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Klasifikasi Variabel	Definisi Operasional Variabel
Protein NRAMP1	Variabel dependen	Didapat dari hasil Imunositokimia berupa persentase monosit positif dengan skala data rasio, yaitu jumlah monosit dengan warna kuning kecoklatan pada sitoplasma, yang diamati sebanyak 20 lapang pandang pada perbesaran 40X dengan USB Camera 301P.

Varian genotip D543N	Variabel independen	Didapat varian G/G , G/A , dan A/A dari hasil pemeriksaan PCR-RFLP dan hasil ini kemudian dikategorisasi dengan skala data nominal, yaitu G/G=1, G/A=2, dan A/A=3, kemudian dilakukan analisis statistik.
Varian genotip 3'UTR	Variabel independen	Didapat varian TGTG+/+ , TGTG+/del, dan TGTGdel/del dari hasil pemeriksaan PCR-RFLP dan hasil ini kemudian dikategorisasi dengan skala data nominal, yaitu TGTG+/+=1, TGTG+/del=2, dan TGTGdel/del=3, kemudian dilakukan analisis statistik.
Varian genotip INT4	Variabel independen	Didapat varian G/G, G/C dan C/C dari hasil pemeriksaan PCR-RFLP dan hasil ini kemudian dikategorisasi dengan skala data nominal, yaitu G/G=1, G/C=2, dan C/C=0, kemudian dilakukan analisis statistik.

4.4 Bahan penelitian

Sampel darah dari penderita TB paru dan perawat penderita TB paru ≥ 2 tahun yang telah memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut,

4.4.1 Kriteria inklusi untuk penderita TB paru,

1. bersedia menandatangani "Pernyataan Persetujuan" untuk ikut berpartisipasi dalam penelitian,
2. umur antara 18-55 tahun,
3. hasil pengecatan BTA positif,
4. hasil kultur dahak positif *M. tuberculosis*,
5. hasil Foto Thorax: TB Paru,
6. hasil uji HIV : negatif,
7. hasil uji Hb (>10 g/dl), Glukosa Darah Acak (<200 mg/dl), BUN (4,67-23,36 mg/dl), dan Creatinine ($<1,5$ mg/dl).

4.4.2 Kriteria inklusi untuk perawat,

1. bersedia menandatangani “Pernyataan Persetujuan” untuk ikut berpartisipasi dalam penelitian,
2. umur antara 18-55 tahun,
3. hasil uji PPD positif >10 mm,
4. hasil pengecatan BTA negatif,
5. hasil kultur dahak negatif *M. tuberculosis*,
6. hasil Foto Thorax: Normal,
7. hasil uji TB Dot negatif pada titer 1/260,
8. hasil uji HIV negatif.
9. Hasil uji Faeces lengkap : Negatif tidak mengandung parasit cacing,
10. Hasil tes Hb (>11 g/dl), Glukosa Darah Acak (<200 mg/dl), BUN (4,67-23,36 mg/dl), dan Creatinine ($<1,5$ mg/dl).

4.5 Reagen penelitian

1. Kit BUN
2. Kit Creatinine
3. Kit Glucose
4. Kit Hemoglobin
5. Kit HIV (ELISA, Kromatografi kertas, *Immunocomb*)
6. Kit TB Dot (Produksi Prof.Indro Handoyo)
7. Kit *Ultra Vision Detection System Anti-Polyvalent, HRP/DAB Plus (RTU)* Cat.no.TP-015-HD, BioLabs untuk uji Imunositokimia.
8. *Antibody Diluent* untuk pengenceran dari *antibody NRAMP1*
9. Media *Lowenstein-Jensen*

10. Tes identifikasi: Niacin, Katalase, Nitrat, dan *para-NitroBenzoid Acid*
11. Kit *Ziehl Neelsen* (untuk pengecatan BTA)
12. *Rabbit polyclonal antibody NRAMP1 (E-20): sc-16885 SANTA CRUZ BOTECHNOLOGY, INC*
13. Larutan *Igepal CA-63*
14. Larutan *Loading Buffer 6x*
15. *HighPurePCRTemplatePreparationKit* (Roche, Cat no11796828 001)
16. *HighPurePCRProductPurification Kit* (Roche, Cat no11 732 668 001)
17. *FastStart PCR Master*, (Roche, Cat.No.04 710 436 00100)
18. Enzim Restriksi *Avall* 500 U (5 U/tes), Cat. No. 740756, Roche
19. Enzim Restriksi *Apal* 5000 U (10 U/tes), Cat. No. 899 208, Roche
20. Enzim Restriksi *FokI* 4.000 U (5 U/tes), Lot 45A, BioLabs
21. *Phosphate Buffer Salin pH 7,0 (10X)*, Roche
22. Larutan *Tris Buffer Electrophoresis (TBE 10X)*, Roche
23. DNA *Weight Marker VIII* (0.019–1.1 kbp), Roche
24. Agarose LE, Roche
25. *Specific Primer D543N dan 3'UTR* :

D543N-F: 5'-GCA TCT CCC CAA TTC ATG GT-3'
D543N-R: 5'-AAC TGT CCC ACT CTA TCC TG-3'
26. *Specific Primer INT4* :

INT4-F: 5'-TCT CTG GCT GAA GGC CTC TCC-3'
INT4-R: 5'-GAG GCT CAA ACT GAT AGC ACA-3'

4.6 Instrumen Penelitian

1. Semprit
2. Tabung EDTA
3. *Incubator*

4. *Laminar Flow*
5. Timbangan
6. *Microwave*
7. *Autoclave*
8. *Centrifuge*
9. *Spectrophotometer*
10. *Microscope*
11. USB Personal Computer Camera 301P
12. *Hardware : Thermal Cyclers* Parkin Elmer
13. *Horizontal gel electrophoresis apparatus*
14. Transilluminator UVP Chromato-vue Model NTM-20
15. Kamera polaroid Mamiya RB67 Pro SD 45 mm.

4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.7.1 Lokasi penelitian

1. Poli Dot Rawat Jalan RS Paru Karang Tembok Surabaya,
2. Ruang Paru Wanita dan Laki-laki RSUD Dr. Soetomo Surabaya,
3. Laboratorium Medis "Klinika" Surabaya,
3. Laboratorium Gramik FK Universitas Airlangga Surabaya,
4. *Tropical Disease Centre (TDC)* Universitas Airlangga Surabaya.

4.7.2 Waktu penelitian

1. Uji PPD, pengambilan sampel darah dan pemeriksaan pendahuluan untuk mendapatkan sampel penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dilaksanakan sejak bulan Mei 2006 s/d April 2007.

2. Pemeriksaan PCR-RFLP dilaksanakan sejak bulan Juni 2006 s/d Juli 2007.
3. Pemeriksaan Imunositokimia dilaksanakan sejak bulan Desember 2006 s/d Juli 2007.
4. Uji Statistik dan penulisan disertasi dilaksanakan sejak bulan Agustus 2007 s/d Desember 2007.

4.8 Prosedur Pengambilan Data

4.8.1 Penentuan varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 gen *NRAMP1*

dilakukan di Lab *Tropical Disease Centre* (TDC) Universitas Airlangga sebagai berikut.

1. Isolasi PBMC dari darah EDTA

Darah EDTA 2 ml disentrifus 3000 rpm selama 30 menit, kemudian dipipet *buffycoat* (lapisan putih antara endapan darah dan serum) sebanyak 200 μ l dalam tabung *ependorf*, lalu disimpan beku pada -20°C sampai digunakan.

2. Isolasi DNA dengan "*High Pure PCR Template Preparation Kit*" sebagai berikut, Suspensi PBMC dipipet 200 μ l lalu ditambah 200 μ l *Binding buffer* dan 40 μ l *Proteinase-K*, lalu dicampur dan diinkubasi 10 menit pada 72°C. 100 μ l *Isopropanol* ditambahkan lalu dicampur dan dipipet ke tabung filter, lalu disentrifus 1 menit pada 8000 rpm, kemudian dibuang cairan pada tabung koleksi. 500 μ l *inhibitor removal buffer* ditambahkan, lalu disentrifus 1 menit pada 8000 rpm, kemudian dibuang cairan pada tabung koleksi. 500 μ l *wash buffer* ditambahkan lalu disentrifus 1 menit pada 8000 rpm,

kemudian cairan pada tabung koleksi dibuang. 500 μ l *wash buffer* ditambahkan lalu disentrifus 1 menit pada 8000 rpm, kemudian dibuang cairan pada tabung koleksi lalu disentrifus 10 detik pada 13.000 rpm, kemudian tabung kolektor dibuang, dan diganti dengan tabung *eppendorf* baru. 200 μ l *elution buffer* (70°C) ditambahkan lalu disentrifus 1 menit pada 8000 rpm. DNA yang diperoleh dapat disimpan pada suhu 4°C dan bila tidak segera digunakan dapat disimpan pada suhu -20°C yang dapat bertahan sampai 6 bulan.

Dilakukan interpretasi hasil isolasi DNA (untuk mengetahui kadar dan kemurniannya) dengan :

1. Spektrofotometer (metode *DNA Quant*) dengan dibaca pada panjang gelombang (λ) = 260 nm (A1); 280 nm (A2); 320 nm (A2); 230 nm (A3), di mana : $A1/A2 = 1,6$; $A1/A3 = 0,08$
2. Elektroforesis menggunakan Agarose LE (*Roche*) 1% (0,2 gr agarose LE ditambah 20 ml TBE 0,5X yang dicampur dengan 5 μ l *Ethidium bromide*. Pada saat aplikasi pada agarose, DNA dicampur dengan *loading buffer* (250mg *Bromphenol Blue* ditambah 250mg *Xylene Cyanol FF + 30% Glycerol*) sebanyak 2 μ l, lalu ditambah 7 μ l DNA dan sebagai petanda digunakan *Marker* (Marker DNA: 50 bp – 2.000 bp), kemudian dijalankan pada alat Elektroforesis pada 100 Volt selama 30 menit. Hasil dibaca dengan sinar UV dan dilakukan dokumentasi menggunakan Polaroid.

3. Amplifikasi DNA varian genotip D543N, 3'UTR, INT4 menggunakan "*Fast Start PCR Master*" sebagai berikut, untuk amplifikasi varian genotip D543N/3'UTR, pada tabung mikrosentrifus steril dengan selubung es, diisi 25µl Master Mix, 2x lalu ditambah 5µl *Forward primer* D543N (3µM) dan 5 µl *Reverse primer* D543N (3µM), kemudian ditambah 10µl Water (PCR-grade). Terakhir ditambahkan 5µl *Template DNA*, sehingga total volume menjadi 50 µl. Untuk amplifikasi varian genotip INT4, pada tabung mikrosentrifus steril dengan selubung es, diisi 25µl Master Mix, 2x lalu ditambah 5µl *Forward primer* INT4 (3µM) dan 5µl *Reverse primer* INT4 (3µM), kemudian ditambah 10µl Water. Terakhir ditambahkan 5µl *Template DNA*, sehingga total volume menjadi 50 µl.

4. Melakukan PCR

Thermal Cycler diatur hingga mencapai temperatur 95°C dan dijalankan selama 5 menit. PCR dijalankan sebanyak 35 siklus dengan tahapan setiap siklusnya sebagai berikut :

Denaturation : selama 30 detik pada temperatur 95°C.
Annealing : selama 30 detik pada temperatur 60°C.
Extension : selama 3 menit pada temperatur 72°C.

Final Extension selama 7 menit pada temperatur 72°C. Setelah siklus selesai, didinginkan hingga temperatur 4°C. Hasil PCR yang merupakan ampikon dari DNA genotip D543N, 3'UTR, dan INT4 dapat disimpan pada 4°C atau -20°C (bertahan 6 bulan) sampai digunakan untuk pemeriksaan RFLP. Dilakukan interpretasi hasil PCR dengan Elektroforesis menggunakan *agarose* LE 2% (0,4gr

agarose LE ditambah 20ml TBE 0,5X yang dicampur dengan 5 μ l *Ethidium bromide* 10mg/ml. Pada saat aplikasi pada sumur agarose, DNA dicampur dengan *loading buffer* sebanyak 2 μ l lalu ditambah 7 μ l DNA, dilanjutkan aplikasi 5 μ l *Marker (Molecular Weight Marker VIII, Roche)* dan dijalankan pada *chamber Electrophoresis*. Proses elektroforesis dijalankan pada 100 Volt selama 30 menit. Hasil dibaca pada sinar UV dan dilakukan dokumentasi menggunakan Polaroid.

5. *Restriction fragment length polymorphism (RFLP) Analisis*. Pemeriksaan RFLP untuk genotip D543N akan didapatkan varian G/G, G/A, dan A/A dengan menggunakan enzim *restriction endonuclease Avall* sebanyak 1 μ l dalam tabung PCR ditambah 2 μ l 10xSuRE/Cut Buffer A, selanjutnya ditambah 9 μ l *water, PCR-grade* dan terakhir ditambahkan 8 μ l *template DNA*. Pada pemeriksaan RFLP untuk genotip 3'UTR menggunakan enzim *restriction endonuclease FokI* sebanyak 1 μ l dalam tabung PCR, kemudian ditambah 2 μ l 10x SuRE/Cut Buffer A, selanjutnya ditambah 13 μ l *water (PCR-grade)*, dan terakhir ditambahkan 4 μ l *template DNA*. Pada pemeriksaan RFLP untuk genotip INT4 menggunakan enzim *restriction endonuclease Apal* sebanyak 2 μ l dalam tabung PCR, lalu ditambah 2 μ l 10x SuRE/Cut Buffer A, selanjutnya ditambah 12 μ l *water, PCR-grade* dan terakhir ditambahkan 4 μ l *template DNA*. Kemudian tabung diinkubasi 37°C selama semalam dalam Inkubator yang dilengkapi kipas angin. Keesokan harinya dilakukan reaksi inaktivasi dengan diinkubasi dalam *waterbath* selama 5

menit pada suhu 70°C. Hasil potongan DNA dideteksi secara *Electrophoresis* menggunakan agarose LE 2% (0,4gr agarose LE ditambah 20 ml TBE 0,5X yang dicampur dengan 5 µl *ethidium bromide* 10 mg/ml. Pada saat aplikasi pada agarose 20µl potongan DNA dicampur dengan *loading buffer* sebanyak 2µl, lalu dijalankan bersama marker (*molecular weight marker VIII, Roche*) pada alat *Electrophoresis* pada 100 Volt selama 30 menit. Hasil dibaca dengan sinar UV lalu dilakukan dokumentasi menggunakan Polaroid.

4.8.2 Penentuan ekspresi protein NRAMP1 secara Imunositokimia di lakukan di Lab. Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran (Gramik) FK Unair

1. Pembuatan *Slide* PBMC dari darah EDTA

Darah dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung EDTA lalu disentrifus 3000 rpm selama 30 menit, diambil *buffycoats* (PBMC). Dipipet lapisan putih diantara sel darah dan plasma lalu dihapuskan di permukaan *object glass*. Setelah kering direndam di dalam wadah yang mengandung Bufer formalin 10% (larutan PZ + Formalin 3,8% dengan perbandingan 9:1). Setelah kering disimpan di dalam kotak preparat untuk dilanjutkan pemeriksaan Imunositokimia.

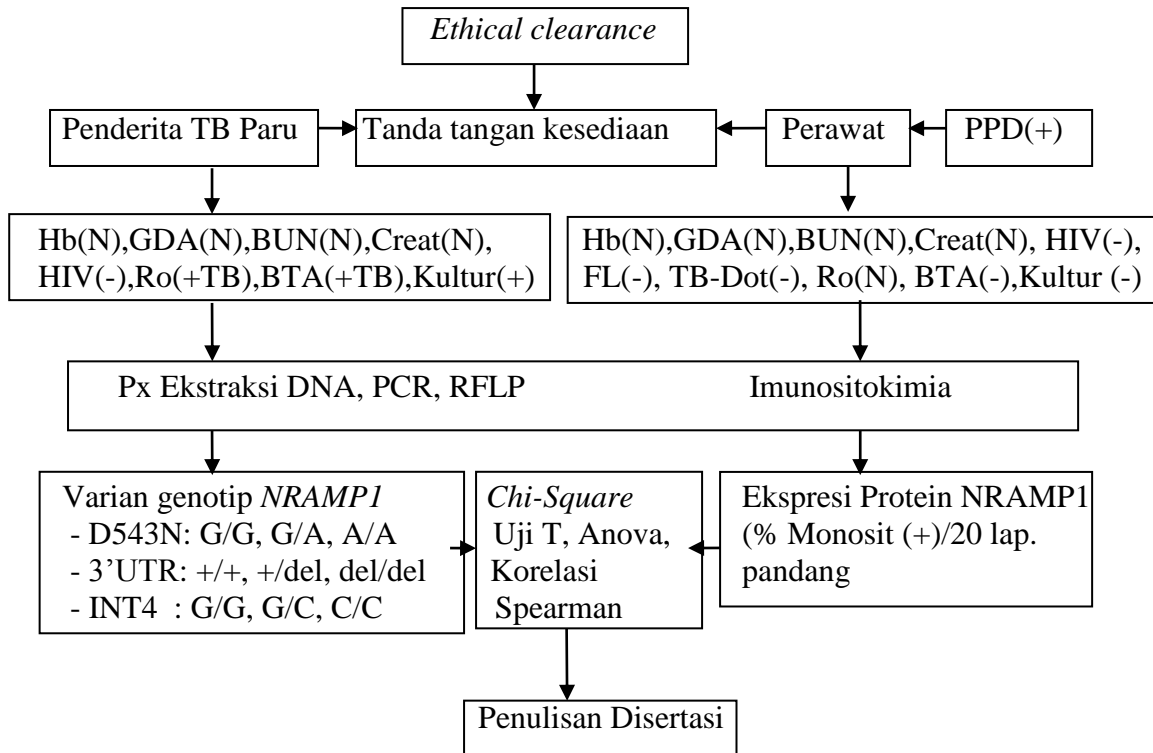
2. Pemeriksaan Imunositokimia metode indirek menggunakan “*Ultra Vision Detection System Anti-Polyvalent, HRP/DAB (Ready-to-use)*”, sebagai berikut. Slide yang sudah mengandung hapusan PBMC

dicuci dengan PBS sebanyak 3x @ 10 menit. Dilakukan *permeabilization* dengan larutan Igepal CA-630 0,5% dalam PBS dingin selama 10 menit. Untuk mengurangi efek pengecatan latar belakang, slide diteteskan H₂O₂ 0,3% selama 10 menit. Slide dicuci dengan PBS sebanyak 2x @ 10 menit. *Goat polyclonal antibody NRAMP1 (E-20)* diteteskan (mengandung 200 µg IgG dalam 1 ml PBS) dengan pengenceran 1:50 dengan *antibody diluent*. Slide diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar dan lembab. Slide dicuci dengan PBS sebanyak 3 x @ 10 menit. *second antibody (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent)* diteteskan dan slide diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan lembab. Slide dicuci dengan PBS sebanyak 3 x @ 10 menit. Slide diteteskan *Streptavidin Peroxidase* dan slide diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan lembab. Slide dicuci dengan PBS 3 x @ 10 menit. Slide diteteskan *DAB chromogen working solution (DAB Plus Chromogen + DAB Plus Substrat dengan perbandingan 1:50)* diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar dan lembab. Slide dicuci dengan *deionized water* selama 1 menit. Slide diteteskan *CounterStain (Hematoxyline Mayer)*, dan slide diinkubasi 10 menit pada suhu kamar dan lembab. Slide dicuci dengan *deionized water* selama 10 menit. Slide dikeringkan di udara dan dimounting (entelan + *cover glass*). Slide dibaca di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x sebanyak 20 lapang pandang menggunakan USB PC Camera 301P.

4.8.3 Uji statistik

1. “Uji *Chi-Square*” untuk menganalisis distribusi frekuensi varian genotip D543N, 3’UTR, INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru dan kelompok perawat.
2. “*Independent T test*” untuk menganalisis perbedaan ekspresi protein NRAMP1 antara kelompok penderita TB paru dan kelompok perawat.
3. “*Independent T test*” dan “*Oneway Anova*” untuk menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian genotip D543N, 3’UTR, INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru dan kelompok perawat.
4. “Uji Anova Interaksi dua faktor” untuk menganalisis interaksi antara varian genotip D543N, 3’UTR, INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok penderita TB paru dan kelompok perawat.
5. “Uji Korelasi *Spearman*” untuk menganalisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian genotip D543N, 3’UTR, INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok Penderita TB paru dan kelompok perawat.

4.9 KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Data Penelitian

Pengambilan data penelitian dilakukan mulai bulan Maret 2006 sampai dengan bulan Juli 2007 meliputi beberapa tahap sebagai berikut,

Tahap I: Pemeriksaan pendahuluan pada populasi sampel penelitian terhadap 75 orang perawat dan 185 orang penderita TB Paru, sebagai berikut.

1. Pemeriksaan awal bagi populasi perawat dengan uji PPD, apabila uji PPD memberikan hasil positif dengan diameter reaksi >10mm, maka perawat tersebut dapat diikuti sebagai sampel penelitian. Selanjutnya perawat diambil darah sebanyak 5 ml yang diperuntukkan 2 ml dimasukkan kedalam tabung yang mengandung anti koagulan EDTA untuk pemeriksaan Hemoglobin, uji PCR-RFLP dan uji Imunositokimia. Sisa darah sebanyak 3ml dimasukkan ke dalam tabung kosong untuk diambil serum dan dilakukan tes Gula Darah Acak (GDA), *Blood Urea Nitrogen* (BUN), Creatinine, *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), TB-Dot. Dilakukan pula pemeriksaan Faeces Lengkap dan Foto Thorax. Ke-semua tes ini dilakukan di Laboratorium Medis Klinika, Surabaya, sedangkan pengecatan Bakteri Tahan Asam (BTA) dan Kultur dahak dilakukan di *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga. Hasil pemeriksaan pendahuluan

pada populasi perawat yang memenuhi kriteria inklusi sebanyak 43 sampel.

2. Pemeriksaan awal bagi penderita TB paru berdasarkan hasil BTA sewaktu pagi sewaktu dan hasil Foto Thorax, apabila memberikan hasil positif pada salah satu dari hasil BTA ditambah dengan hasil Foto Thorax yang mendukung TB paru, maka penderita TB paru tersebut dapat dipakai sebagai sampel penelitian. Selanjutnya dilakukan tes Hemoglobin, Gula Darah Acak (GDA), Blood Urea Nitrogen (BUN), Creatinine, dan HIV dilakukan di Laboratorium Medis Klinika, sedangkan konfirmasi BTA dan Kultur dahak dilakukan di *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga. Hasil pemeriksaan pendahuluan dari populasi penderita TB paru yang memenuhi kriteria inklusi sebanyak 69 sampel.

Tahap II: Melakukan pemeriksaan analisis PCR-RFLP pada sampel darah EDTA perawat dan penderita TB paru sebagai berikut,

1. Darah EDTA setelah diperiksa kadar Hemoglobin, disentrifus 3000 rpm selama 30 menit akan didapatkan daerah lingkaran putih di antara sel darah merah dan plasma yang dinamakan *buffycoat*. *Buffycoat* ini diambil sebanyak 300 μ l, di mana yang 100 μ l dihapuskan di atas permukaan objekglas untuk pemeriksaan imunositokimia, sedangkan yang 200 μ l di bekukan untuk dilakukan ekstraksi DNA, PCR, dan RFLP.
2. Melakukan amplifikasi DNA dengan metode PCR menggunakan sepasang primer. Untuk mendapatkan amplicon D543N/3'UTR,

DNA diamplifikasi menggunakan sepasang primer D543N/3'UTR. Untuk mendapatkan amplicon INT4, DNA diamplifikasi menggunakan sepasang primer INT4. Selanjutnya dilakukan analisis varian genotip gen *NRAMP1* pada hasil amplicon perawat dan penderita TB paru dengan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Varian G/G, G/A, dan A/A genotip D543N gen *NRAMP1* didapatkan melalui proses pemotongan dengan enzim restriksi *Avall*. Varian TGTG+/+, TGTG+/del, dan TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* didapatkan melalui proses pemotongan dengan enzim restriksi *FokI*. Varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* didapatkan melalui proses pemotongan dengan enzim restriksi *Apal*.

Tahap III: Melakukan uji imunositokimia pada PBMC yang telah dihapuskan di atas permukaan objekglas untuk dilakukan analisis ekspresi protein *NRAMP1* pada sampel perawat dan penderita TB paru dengan metode *streptavidin-biotin indirect enzyme immune assay*. Hasil yang akan didapatkan adalah jumlah persentase monosit positif per 20 lapang pandang yang kemudian dibagi dengan jumlah monosit positif dan negatif.

Tahap IV: melakukan analisis statistik varian genotip gen *NRAMP1*, ekspresi protein *NRAMP1* pada sampel perawat dan penderita TB paru sebagai berikut,

1. uji *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi frekuensi usia antara kelompok penderita TB paru dan perawat.

2. uji *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi frekuensi jenis kelamin antara kelompok penderita TB paru dan perawat.
3. uji *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi frekuensi antara varian G/G, G/A, dan A/A genotip D543N gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru dan perawat.
4. uji *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi frekuensi antara varian TGTG+/, TGTG+/del, dan TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru dan perawat.
5. uji *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi frekuensi antara varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru dan perawat.
6. *Independent T test* menganalisis perbedaan rata-rata ekspresi protein NRAMP1 antara kelompok penderita TB paru dan perawat.
7. Uji *Oneway Anova test* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.
8. Uji *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.
9. Uji *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del,

TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.

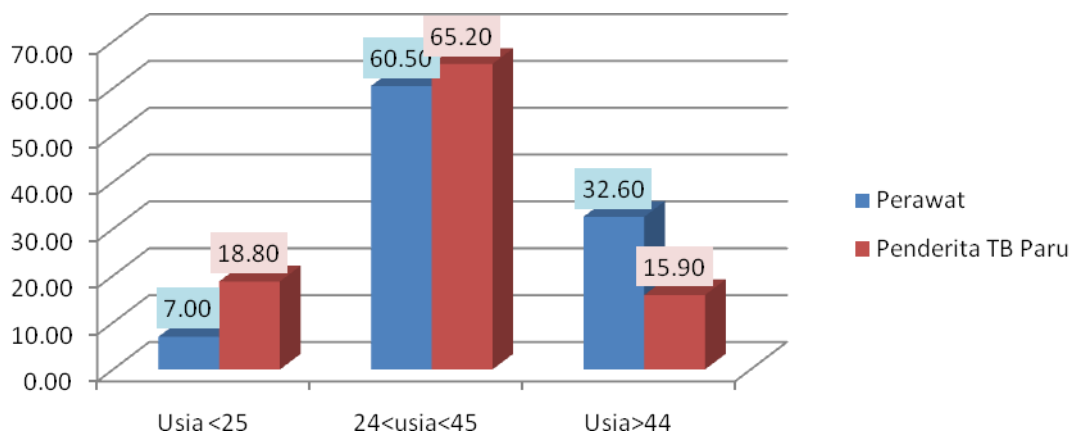
10. Uji *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada penderita TB paru.
11. Uji *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G dan G/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.
12. Uji *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G dan G/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.
13. Uji *Anova* interaksi dua faktor menganalisis interaksi antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N, varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR, varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein *NRAMP1* pada kelompok perawat.
14. Uji *Anova* dua faktor menganalisis interaksi antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N, varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR, varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.
15. Uji Korelasi *Spearman* menganalisis hubungan antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N, varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del

genotip 3'UTR, varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.

16. Uji Korelasi *Spearman* menganalisis hubungan antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N, varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR, varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.

5.2 Analisis Data dan Hasil Penelitian

5.2.1 Distribusi usia antara kelompok penderita TB paru dan perawat

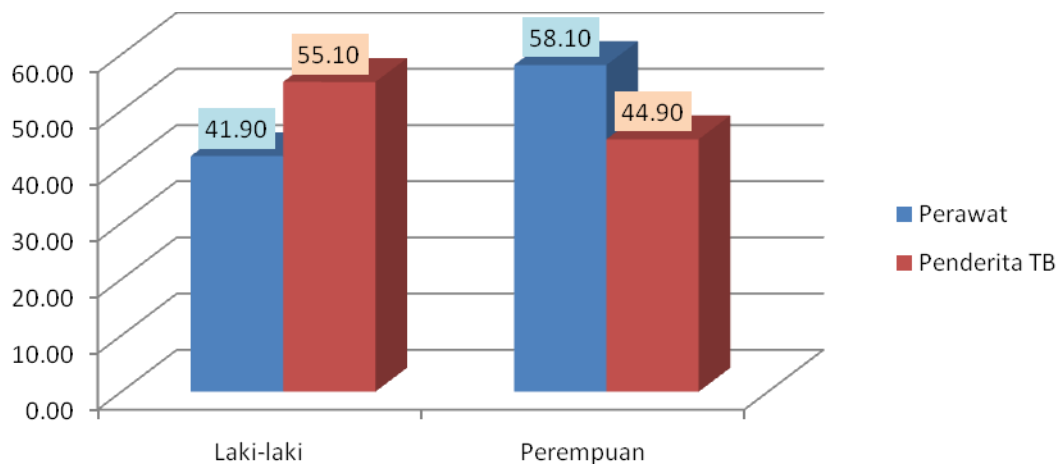


Gambar 5.1 Diagram *column* distribusi frekuensi usia antara kelompok penderita TB paru dan perawat.

Berdasarkan pembagian usia, dari 43 sampel kelompok perawat ditemukan distribusi terbanyak pada usia 25-45 tahun yaitu sebesar 60,50 % (26/43), dan dari 69 sampel penderita TB paru dengan kasus terbanyak juga terjadi pada usia 25-45 tahun, yaitu sebesar 65,20 % (45/69).

Berdasar hasil uji “*Chi-Square*”, distribusi frekuensi usia antara kelompok penderita TB paru dan perawat tidak ada perbedaan bermakna dengan $p=0,05$ ($p>0,05$), berarti kedua kelompok penelitian adalah homogen dalam distribusi normal.

5.2.2 Distribusi jenis kelamin antara kelompok penderita TB paru dan perawat



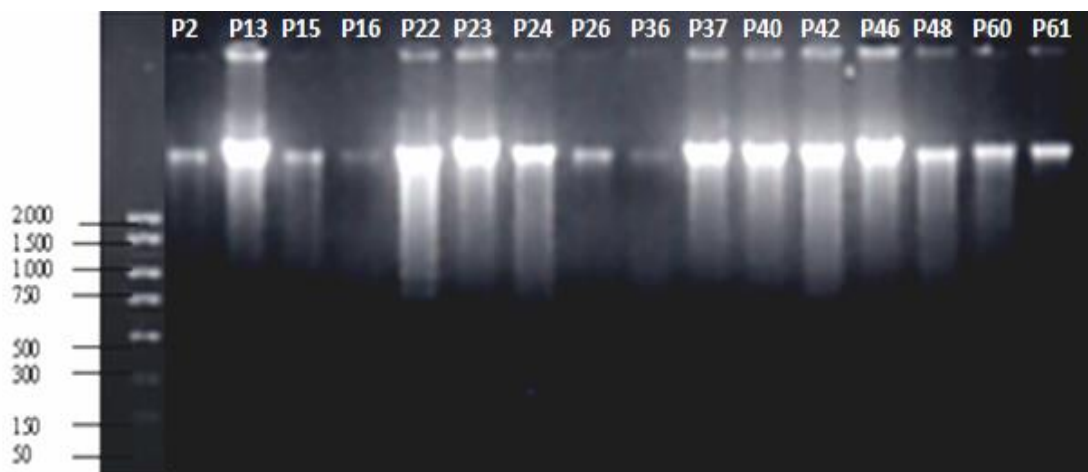
Gambar 5.2 Diagram *column* distribusi jenis kelamin antara kelompok penderita TB paru dan perawat.

Berdasarkan pembagian jenis kelamin, dari 43 sampel perawat ditemukan distribusi jenis kelamin terbanyak adalah perempuan yaitu sebesar 58,10% (25/43), dan dari 69 sampel penderita TB Paru dengan kasus terbanyak terjadi pada laki-laki, yaitu sebesar 55,10 % (38/69).

Berdasar hasil uji “*Chi-Square*”, distribusi jenis kelamin antara kelompok perawat dan penderita TB paru tidak ada perbedaan bermakna dengan nilai $p=0,174$ ($p>0,05$), berarti kedua kelompok penelitian adalah homogen dalam distribusi normal.

5.2.3 Hasil Isolasi DNA dari monosit darah perifer (PBMC) perawat

Hasil isolasi DNA pada PBMC 43 orang perawat dilakukan dengan metode *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche). Isolasi DNA menggunakan 200µl *buffycoat* darah EDTA (PBMC) perawat, divisualisasikan secara elektroforesis pada agarose LE 1% yang mengandung *Ethidium Bromide* 10 mg/ml. Elektroforesis dijalankan dengan voltage 100 V selama 30 menit dalam buffer TBE 0,5 (Tris bufer elektroforesis).



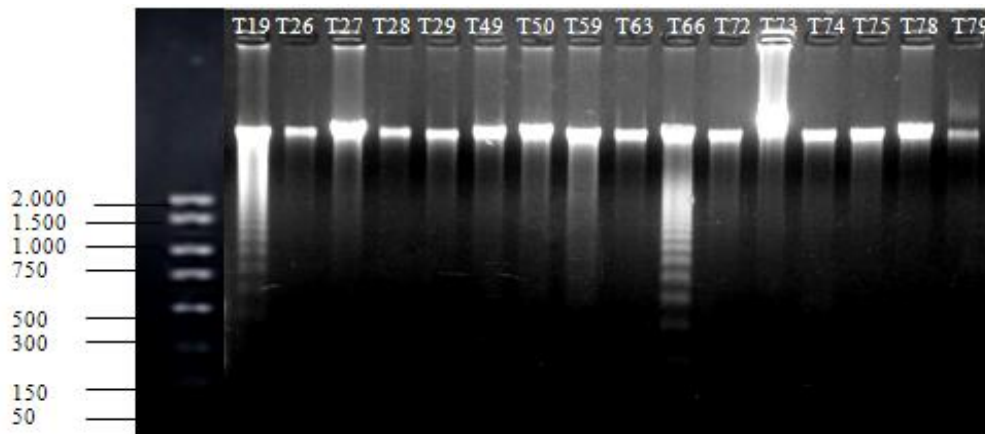
Gambar 5.3 Hasil Isolasi DNA dari PBMC perawat yang merupakan jumlah DNA total pada PBMC dan termasuk di dalamnya DNA gen *NRAMP1*.

Panjang DNA manusia >2 kb. Pada 43 sampel perawat yang mengandung semua DNA manusia dan termasuk di dalamnya DNA gen *NRAMP1* telah berhasil diisolasi (hasil isolasi DNA perawat ada pada lampiran 2). Pada penelitian yang menggunakan PBMC sebagai sumber DNA, sebaiknya diambil dari *buffycoat*, hasil DNA akan diperoleh banyak dengan tingkat kemurnian dan keberhasilan 100% daripada menggunakan *Red Blood Cells Lysis Buffer, Roche* atau *Ficoll-Hypaque*. Pada saat melakukan optimasi, tingkat kemurnian DNA sudah diuji menggunakan Spektrofotometer dengan menghitung rasio antara nilai OD₂₆₀ dan OD₂₈₀.

Molekul DNA dikatakan murni apabila rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1,8 - 2,0.

5.2.4 Hasil Isolasi DNA dari PBMC penderita TB paru

Hasil isolasi DNA dari PBMC 69 penderita TB paru dilakukan dengan metode *HighPure PCR Template Preparation Kit* (Roche).



Gambar 5.4 Hasil Isolasi DNA dari PBMC penderita TB paru yang merupakan jumlah DNA total pada PBMC dan termasuk di dalamnya DNA gen *NRAMP1*.

Pada 69 sampel penderita TB paru, semua DNA manusia dan termasuk di dalamnya DNA gen *NRAMP1* telah berhasil diisolasi (hasil isolasi DNA penderita TB paru ada pada lampiran 2).

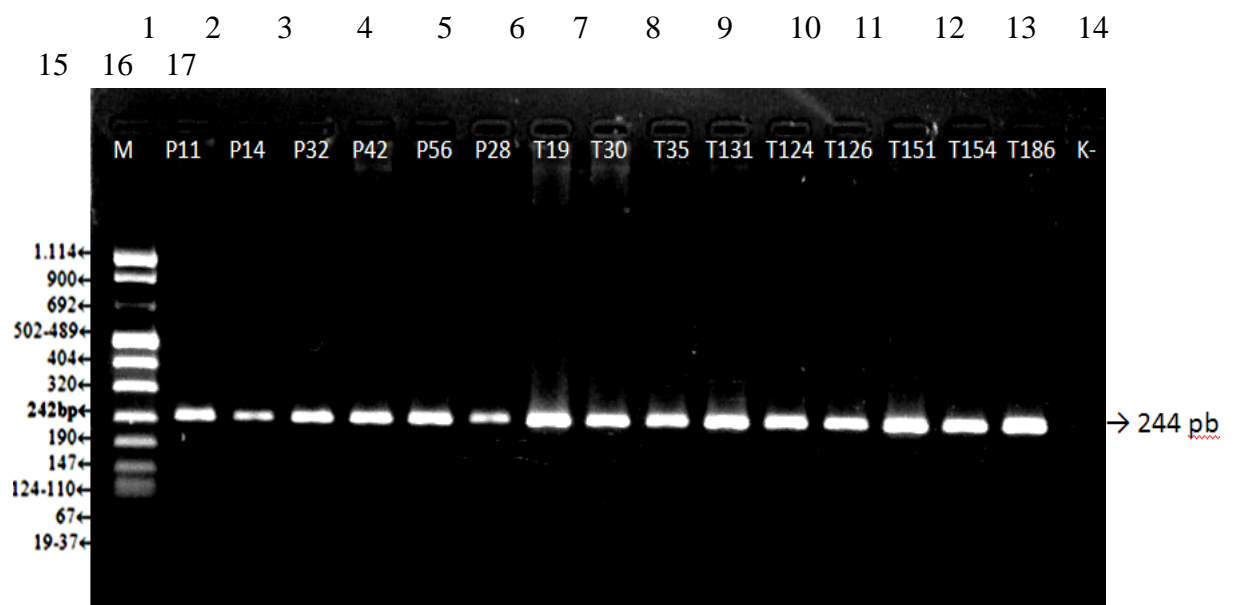
5.2.5 Hasil amplifikasi DNA sasaran D543N dan 3'UTR dari DNA perawat dan penderita TB paru

Hasil amplifikasi DNA perawat dan penderita TB paru untuk genotip regio DNA D543N dan 3'UTR dari gen *NRAMP1* dengan metode *FastStart PCR Master*. Regio DNA D543N dan 3'UTR terdapat pada 1 pita DNA, dikarenakan kedua regio D543N dan 3'UTR gen *NRAMP1* berada pada satu

exón yaitu exón 15 dari gen *NRAMP1*, maka untuk keperluan amplifikasi DNA sasaran D543N dan 3'UTR menggunakan 1 pasang *primer* yaitu,

D543N-Forward: 5'-GCA TCT CCC CAA TTC ATG GT-3'
D543N-Reverse: 5'-AAC TGT CCC ACT CTA TCC TG-3'

Hasil amplicon DNA genotip D543N dan 3'UTR pada PBMC 43 orang perawat dan 69 orang penderita TB paru ditemukan dengan panjang 244 pb seperti pada gambar 5.5



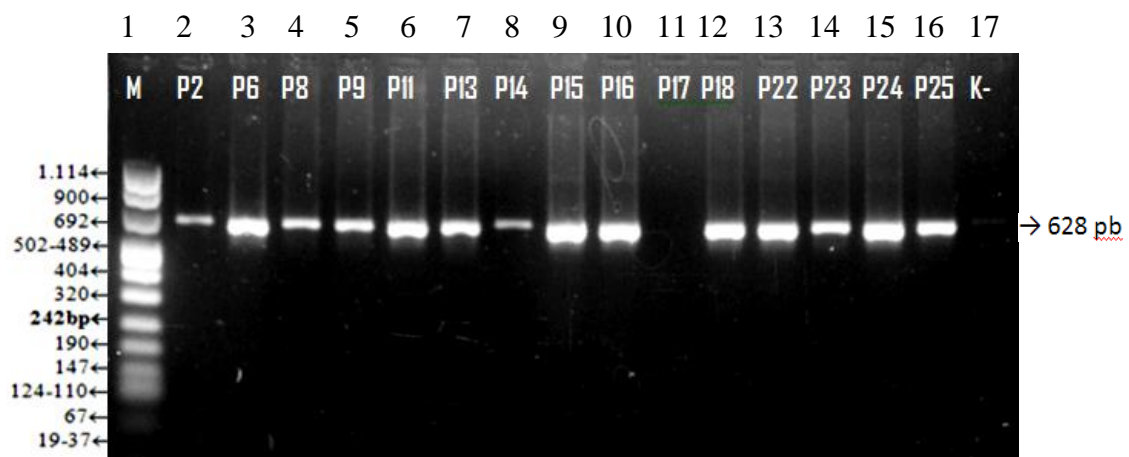
Gambar 5.5 Hasil PCR amplifikasi DNA genotip D543N dan 3'UTR gen *NRAMP1* dari DNA perawat. Jalur 2 s/d 7 dan amplifikasi DNA genotip D543N dan 3'UTR gen *NRAMP1* dari DNA penderita TB paru: jalur 8 s/d 16. Jalur 17: control negatif. Regio DNA target D543N dan 3'UTR berada pada 244 pb.

Pengukuran berat molekul DNA dalam pasangan basa (pb) berdasarkan perhitungan rentang marker DNA (antara 242-320 pb) dengan jarak pita DNA. Pita DNA divisualisasikan secara elektroforesis menggunakan *DNA Molecular Weight Marker VIII*, Roche dengan interval antara 0,019-1,114 kpb pada agarose LE 2% yang mengandung *Ethidium Bromide* 10 mg/ml. Elektroforesis dijalankan dengan voltage 100 V selama 30 menit dalam buffer

TBE 0,5. Hasil amplifikasi DNA sasaran genotip D543N dan 3'UTR dari DNA perawat dan penderita TB paru ada pada lampiran 3).

5.2.6 Hasil amplifikasi DNA target INT4 gen *NRAMP1* dari DNA perawat

Hasil amplifikasi DNA sasaran regio INT4 gen *NRAMP1* dari DNA perawat dilakukan dengan metode *Fast Start PCR Master*, Roche seperti pada gambar 5.6



Gambar 5.6 Hasil PCR amplifikasi DNA sasaran INT4 gen *NRAMP1* dari DNA perawat dengan primer INT4. Jalur 1 : marker, Jalur 2-16 : Regio DNA INT4 berada pada 628 pb. Jalur 17 : Kontrol negatif.

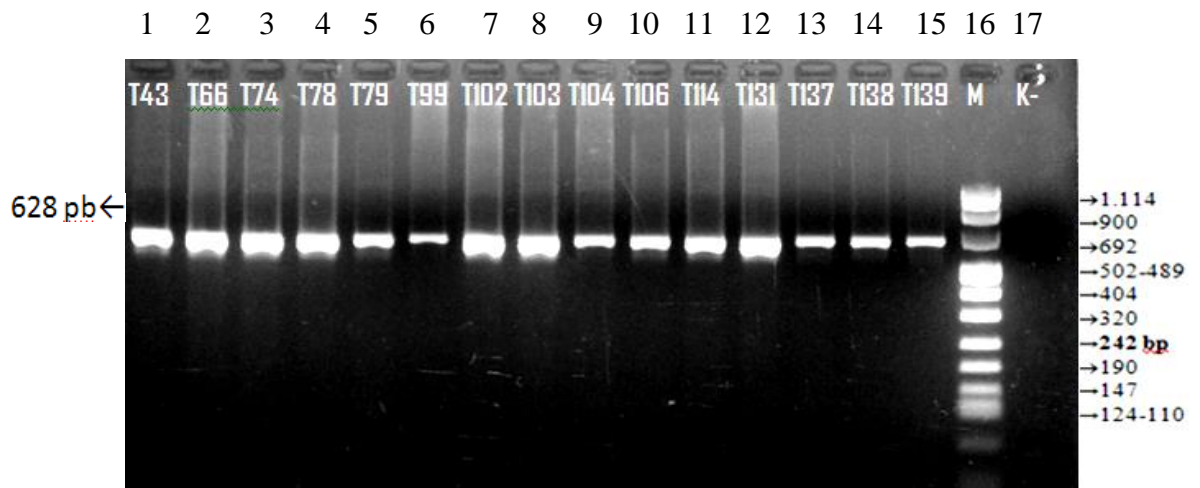
Amplikon DNA regio INT4 gen *NRAMP1* berada pada exon 4 dari gen *NRAMP1* diamplifikasi menggunakan 1 pasang primer yaitu,

INT4-Forward: 5'-TCT CTG GCT GAA GGC CTC TCC-3'

INT4-Reverse: 5'-GAG GCT CAA ACT GAT AGC ACA-3'

Pengukuran berat molekul DNA dalam pasangan basa (pb) berdasarkan perhitungan rentang marker DNA (antara pita marker 502-692 pb) dengan jarak pita DNA. Hasil amplikon DNA dari PBMC 43 orang perawat dan 69 orang penderita TB paru ditemukan dengan panjang 628 pb.

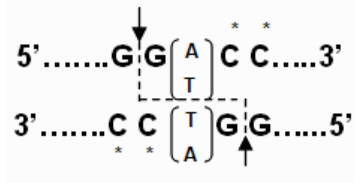
5.2.7 Hasil PCR amplifikasi DNA sasaran INT4 gen *NRAMP1* dari DNA penderita TB paru



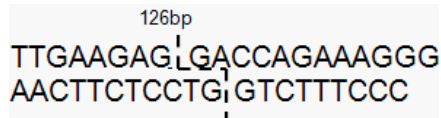
Gambar 5.7 Hasil PCR amplifikasi DNA sasaran INT4 gen *NRAMP1* dari DNA penderita TB paru. Jalur 1-15: Regio DNA INT4 penderita TB paru berada pada 628 bp. Jalur 16: Marker, dan jalur 17: Kontrol negatif. Hasil amplifikasi DNA sasaran genotip INT4 dari DNA perawat dan penderita TB paru ada pada lampiran 4.

5.2.8 Hasil *genotyping* menggunakan teknik *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dari hasil amplifikasi PCR D543N perawat dan penderita TB paru

Hasil PCR-RFLP dari hasil amplifikasi PCR D543N perawat dan penderita TB paru. Varian G dan varian A terdapat pada urutan basa 1703, di mana varian G/GAC (*Asp/Aspartic acid*) dan varian A/AAC (*Asn/Asparagine*) terdapat pada codon 543 di exon 15. Teknik RFLP dilakukan menggunakan enzim restriksi *Avall*, yang akan memotong pada tempat pemotongan spesifik pada suatu rangkaian molekul DNA pada susunan basa sebagai berikut:



Sebelum dipotong:



Setelah dipotong enzim *AvaII* :



Pada pemotongan dengan enzim *AvaII*, hasil pemotongan disebut *sticky end*, karena ada bagian molekul DNA yang mempunyai bentuk *single stranded* (tidak berpasangan), yaitu GAC dan CTG.

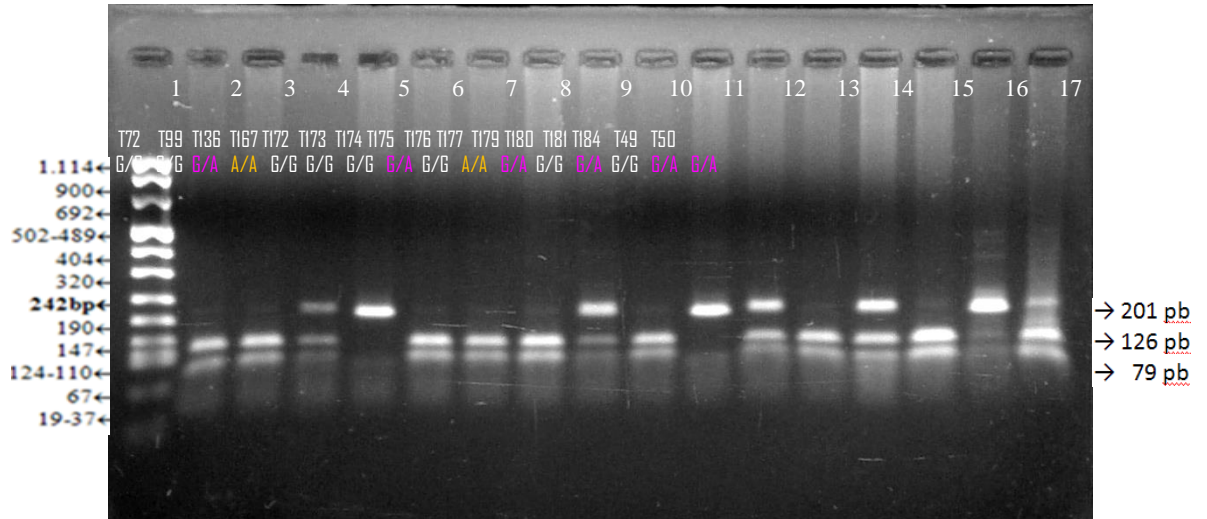
Hasil *genotyping* RFLP didapatkan variasi potongan seperti pada gambar 5.8 dan 5.9 sebagai berikut:

1. varian G (Asp) menunjukkan 3 pita DNA dengan ukuran basa nukleotida: 126 pb, 79 pb, dan 39 pb
2. varian A (Asn) menunjukkan 2 pita DNA dengan ukuran basa nukleotida : 201 pb, dan 39 pb.

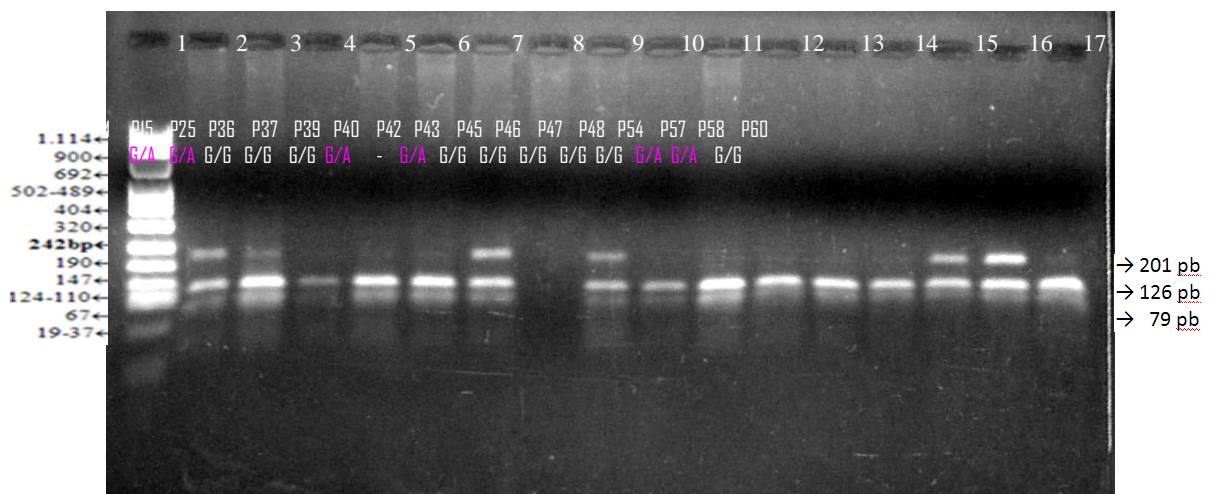
Hasil *genotyping* RFLP genotip D543N gen *NRAMP1* pada:

1. individu G/G disebut homozigot akan terlihat tempat potongan pita DNA pada 126 pb dan 79 pb,
2. individu G/A akan disebut heterozigot terlihat tempat potongan pita DNA pada 201 pb, 126 pb dan 79 pb,
3. individu A/A disebut homozigot akan terlihat tempat potongan pita DNA pada 201 pb.

Hasil *genotyping* RFLP divisualisasikan pada agarose LE 2% yang mengandung *ethidium bromide* 10mg/ml secara elektroforesis dengan voltage 100 V selama 30 menit dalam buffer TBE 0,5, hasil selengkapnya ada pada lampiran 5.

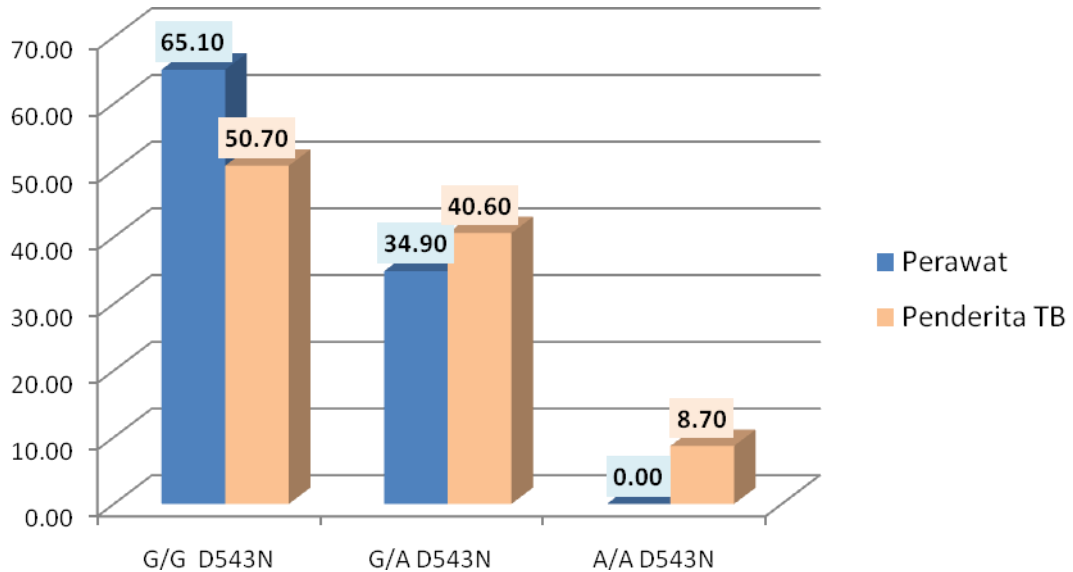


Gambar 5.8 Hasil *genotyping* RFLP genotip D543N gen *NRAMP1* pada penderita TB paru. Jalur 1: Marker; Jalur 2, 3, 6, 7, 8, 10, 13,15: varian G/G yang menunjukkan 2 pita: 126 pb, 79 pb. Jalur 4, 9, 12, 14, 16, 17: varian G/A yang menunjukkan 3 pita: 201 pb, 126 pb, 79 pb. Jalur 5,11: varian A/A yang menunjukkan 1 pita : 201 pb.



Gambar 5.9 Hasil *genotyping* RFLP genotip D543N gen *NRAMP1* pada perawat. Jalur 1 : Marker ; Jalur 2, 3, 7, 9, 15, 16: varian G/G yang menunjukkan 2 pita: 126 pb, 79 pb. Jalur 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 17: varian G/A yang menunjukkan 3 pita: 201 pb, 126 pb, 79 pb. Jalur 8: gagal.

5.2.9 Hasil analisis perbedaan distribusi frekuensi varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* antara kelompok perawat dan penderita TB Paru.



Gambar 5.10 Diagram column distribusi frekuensi varian G/G, G/A, A/A genotip D543N antara kelompok perawat dan penderita TB paru.

Di sini dapat dilihat bahwa, gambaran diskripsi varian G/G lebih besar pada perawat 65,1% (28/43) dibanding penderita TB paru 50,7% (35/69). Gambaran diskripsi varian G/A lebih besar pada penderita TB paru 40,6% (28/69) dibanding perawat 34,9% (15/43), dan gambaran diskripsi varian A/A lebih besar pada penderita TB Paru 8,7% (6/69) dibanding perawat 0% (0/43).

Tabel 5.1 Hasil analisis *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi frekuensi varian G/G, G/A, A/A genotip D543N antara kelompok perawat dan penderita TB paru

Gen D543N	Penderita TB (n=69)	Perawat (n=43)	<i>Fisher's Exact Test</i>	<i>P value</i>
G/G	35 (50,7%)	28 (65,1%)	9,438	0,098
G/A	28 (40,6%)	15 (34,9%)		
A/A	6 (8,7%)	0 (0%)		

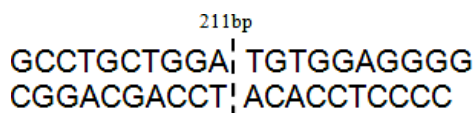
Uji *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi frekuensi varian genotip D543N antara kelompok perawat dan penderita TB paru terdapat 1 sel yang nilai anggotanya kurang dari 5, maka hasil *expected count* 33%, sehingga perlu dilakukan uji *Fisher's Exact test* atau *SAS Monospace*. Distribusi varian G/G, G/A, dan A/A pada perawat dan penderita TB paru dari hasil uji *SAS Monospace* didapat nilai $p=0,98$, maka tidak terdapat perbedaan secara bermakna dengan nilai $p= 0,098$ ($p>0,05$).

5.2.10 Hasil *genotyping* menggunakan teknik RFLP dari hasil amplifikasi PCR 3'UTR perawat dan penderita TB paru

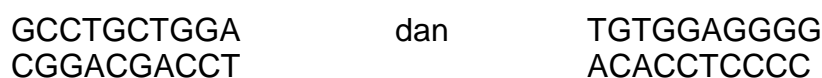
Varian TGTGdelesi dalam 3' *untranslated region* (1729 + 55del4) dinamakan 3'UTR. Region 3'UTR terletak pada 3' akhir kodon di exon 15. Teknik RFLP dilakukan menggunakan enzim restriksi *FokI*, yang akan memotong pada tempat pemotongan spesifik pada suatu rangkaian molekul DNA pada susunan basa sebagai berikut:



Sebelum dipotong:



Setelah dipotong enzim *FokI* :



Pada pemotongan dengan enzim *FokI*, hasil pemotongan disebut *blunt end* (tumpul), karena kedua bagian molekul DNA mempunyai bentuk *double*

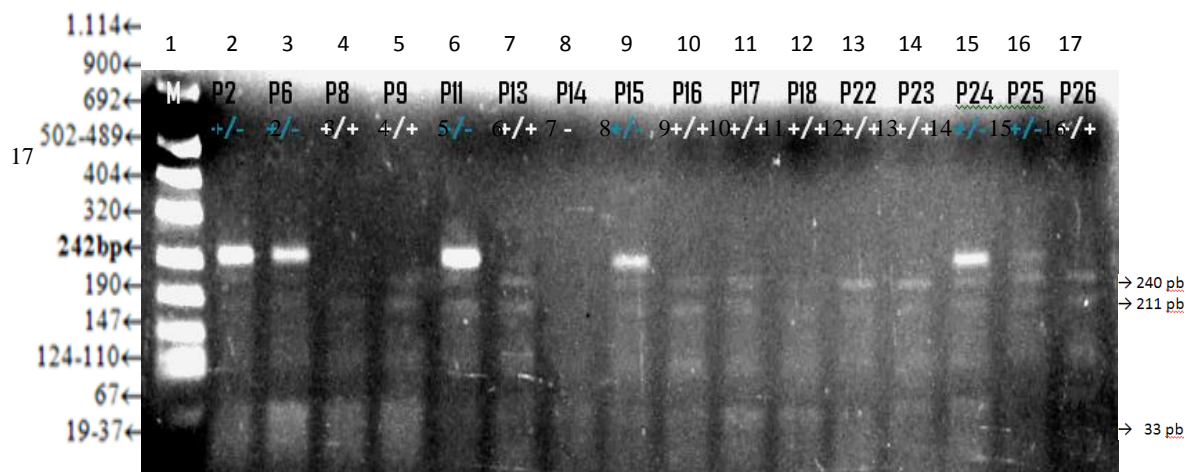
stranded (berpasangan). Hasil *genotyping* RFLP didapatkan variasi potongan seperti pada gambar 5.11 dan 5.12 sebagai berikut:

1. varian TGTGdel/del menunjukkan 1 pita DNA : 240 pb,
2. varian TGTG+/+ menunjukkan 2 pita DNA : 211 pb, dan 33 pb

Hasil *genotyping* RFLP genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada :

1. individu homozigot TGTG+/+, akan terlihat tempat potongan pita DNA pada : 211 pb, dan 33 pb
2. individu heterozigot (TGTG+/del) akan terlihat tempat potongan pita DNA pada : 240 pb, 211 pb, dan 33 pb
3. individu homozigot TGTGdel/del akan terlihat tempat potongan pita DNA pada : 240 pb

Hasil *genotyping* RFLP genotip 3'UTR gen *NRAMP1* divisualisasikan pada agarose LE 2% yang mengandung *ethidium bromide* 10mg/ml secara elektroforesis dengan voltage 100 V selama 30 menit dalam buffer TBE 0,5.

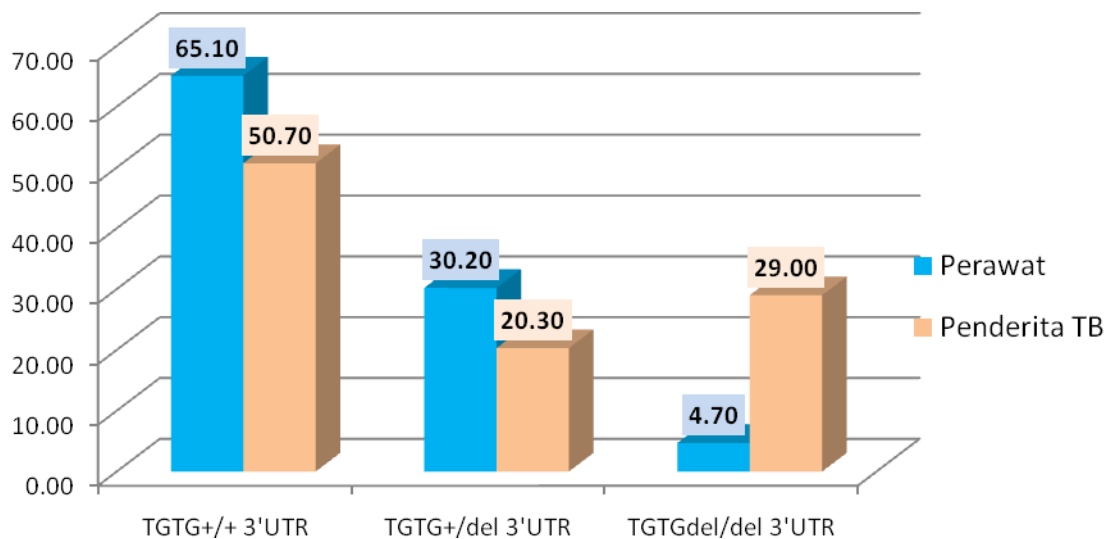


Gambar 5.11 Hasil *genotyping* RFLP genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada perawat. Jalur 1: Marker; Jalur 2, 3, 6, 9, 15: varian TGTG+/del yang menunjukkan 2 pita: 240 pb, 211 pb. Jalur 4, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17: varian TGTG+/+ yang menunjukkan 1 pita : 211 pb. Jalur 8: gagal.



Gambar 5.12 Hasil *genotyping* RFLP genotip 3'UTR gen *NRAMP1* penderita TB paru. Jalur 1: Marker; Jalur 2, 11: varian TGTG +/-del yang menunjukkan 2 pita: 240 pb, 211 pb. Jalur 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13: varian TGTG+/+ yang menunjukkan 1 pita: 211 pb. Jalur 3, 5, 12, 14: varian TGTGdel/del menunjukkan 1 pita : 240 pb. Jalur 15, 16: gagal. Hasil selengkapnya pada lampiran 6.

5.2.11 Hasil analisis perbedaan distribusi frekuensi varian TGTG+/+, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* antara kelompok perawat dan penderita TB Paru



Gambar 5.13 *Diagram Column* distribusi frekuensi varian TGTG+/+, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR antara kelompok perawat dan penderita TB paru

Di sini dapat dilihat bahwa, gambaran distribusi frekuensi varian TGTG+/+ lebih besar pada perawat 65,1% (28/43) dibanding penderita TB paru 50,7% (35/69), dan varian TGTG+/del lebih besar pada perawat 30,2% (13/43) dibanding penderita TB paru 20,3% (14/69), serta varian TGTGdel/del lebih besar pada penderita TB paru 29% (20/69) dibanding perawat 4,7% (2/43).

Tabel 5.2 Hasil analisis *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi frekuensi varian TGTG+/+, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* antara perawat dan penderita TB paru

Gen 3'UTR	Penderita TB (n=69)	Perawat (n=43)	<i>Chi-Square</i>	<i>P value</i>
TGTG+/+	35/69 (50,7%)	28/43 (65,1%)	10,048	0,007
TGTG+/del	14/69 (20,3%)	13/43 (30,2%)		
TGTGdel/del	20/69 (29%)	2/43 (4,7%)		

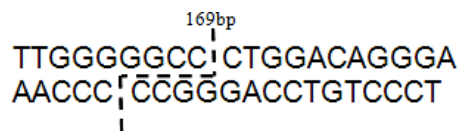
Hasil analisis perbedaan distribusi frekuensi varian TGTG+/+, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* antara perawat dan penderita TB paru terdapat perbedaan secara bermakna dengan nilai $p=0,007$ ($p<0,05$).

5.2.12 Hasil *genotyping* menggunakan teknik RFLP dari hasil amplifikasi PCR INT4 perawat dan penderita TB paru

Hasil PCR-RFLP pada hasil PCR genotip INT4 perawat dan penderita TB paru. Varian G berubah menjadi varian C (tipe mutan) pada intron 4, pada nukleotida 469+14G/C. Teknik RFLP dilakukan menggunakan enzim restriksi *ApaI*, yang akan memotong pada tempat pemotongan spesifik pada suatu rangkaian molekul DNA pada susunan basa sebagai berikut:



Sebelum dipotong:



Setelah dipotong enzim *ApaI* :



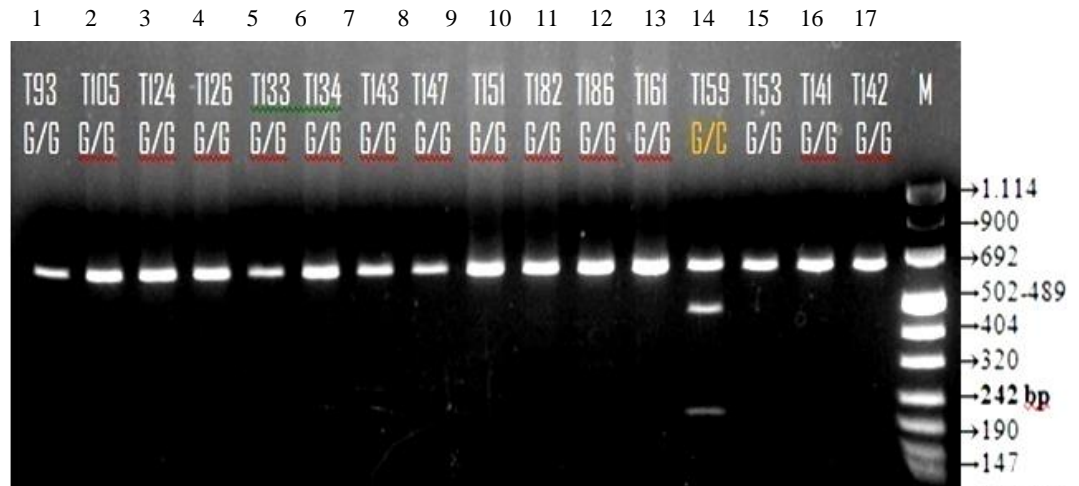
Pada pemotongan dengan enzim *ApaI*, hasil pemotongan disebut *sticky end*, karena ada bagian molekul DNA yang mempunyai bentuk *single stranded* (tidak berpasangan), yaitu GGCC dan CCGG.

Hasil *genotyping* RFLP didapatkan variasi potongan seperti pada gambar 5.14 dan 5.15 sebagai berikut:

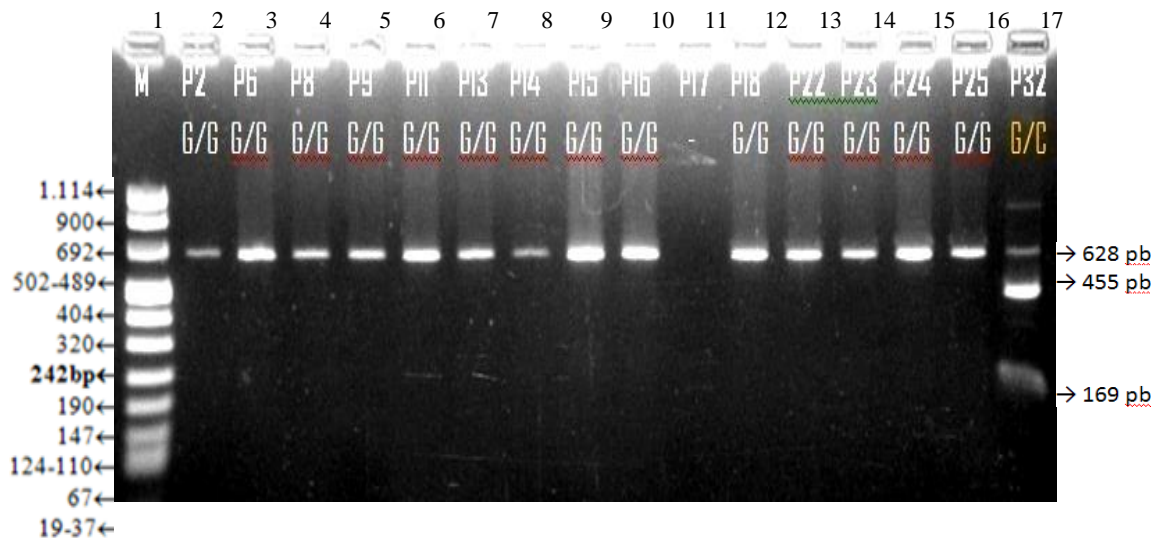
1. varian G menunjukkan 1 pita DNA : 628 pb
2. varian C menunjukkan 2 pita DNA : 455 pb, dan 169 pb.

Hasil *genotyping* RFLP genotip INT4 gen *NRAMP1* pada :

1. individu homozigot G/G, akan terlihat pita DNA pada: 628 pb.
2. individu heterozigot G/C akan terlihat pita DNA pada: 628 pb, 455 pb, dan 169 pb.
3. individu homozigot C/C akan terlihat pita DNA pada: 455 pb, dan 169 pb.



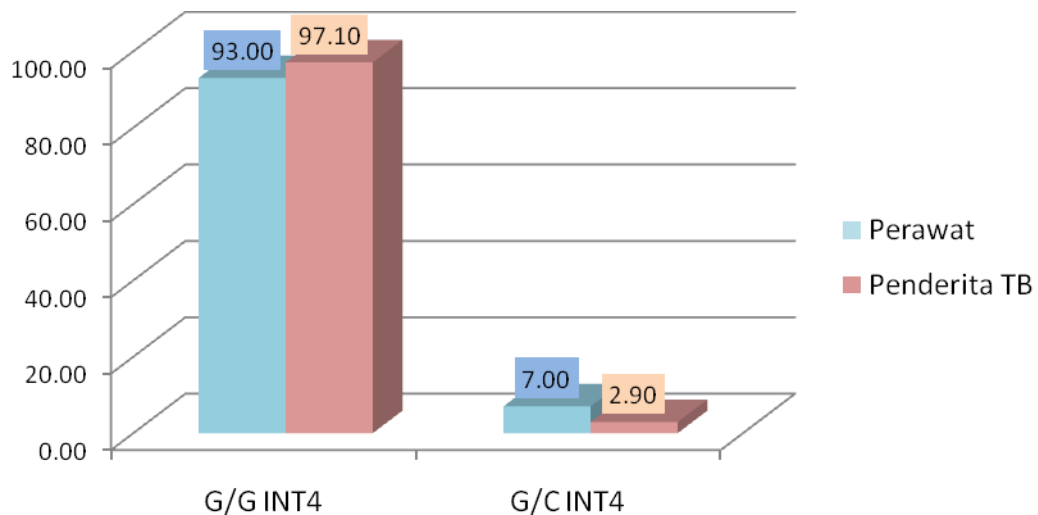
Gambar 5.14 Hasil *genotyping* RFLP genotip INT4 gen *NRAMP1* pada penderita TB paru. Jalur 17: Marker ; Jalur 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16: varian G/G yang menunjukkan 1 pita : 628 pb. Jalur 13: varian G/C yang menunjukkan 3 pita : 628 pb, 455 pb, dan 169 pb.



Gambar 5.15 Hasil *genotyping* RFLP genotip INT4 gen *NRAMP1* pada perawat. Jalur 1: Marker ; Jalur 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16: varian G/G yang menunjukkan 1 pita : 628 bp. Jalur 17: varian G/C yang menunjukkan 3 pita : 628 bp, 455 bp, dan 169 bp. Jalur 11: gagal.

Hasil *genotyping* RFLP genotip INT4 gen *NRAMP1* divisualisasikan pada agarose LE 2% yang mengandung *ethidium bromide* 10mg/ml secara elektroforesis. Hasil selengkapnya ada pada lampiran 6.

5.2.13 Hasil analisis perbedaan distribusi frekuensi antara varian G/G, G/C dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat dan penderita TB Paru



Gambar 5.16 Diagram *column* distribusi frekuensi varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 antara kelompok perawat dan penderita TB paru.

Di sini dapat dilihat bahwa, gambaran distribusi frekuensi varian G/G lebih besar pada penderita TB paru 97,1% (67/69) dibanding perawat 93,0% (40/43), dan varian G/C lebih besar pada perawat 7,0% (3/43) dibanding penderita TB paru 2,9% (2/69), sedangkan untuk varian C/C tidak ada pada populasi perawat dan penderita TB paru.

Tabel 5.3 Uji *Chi Square* menganalisis perbedaan distribusi frekuensi varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 antara kelompok perawat dan penderita TB paru

Gen INT4	Penderita TB (n=69)	Perawat (n=43)	<i>Fisher's Exact Test</i>	<i>P value</i>
G/G	67 (97.10%)	40 (93.0%)	1.033	0.370
G/C	2 (2.9%)	3 (7.0%)		
C/C	0 (0%)	0 (0%)		

Hasil uji *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi frekuensi varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 antara kelompok perawat dan penderita TB paru, ada 1 sel yang nilai anggotanya kurang dari 5, maka hasil *expected count* 50%, karenanya perlu dilakukan *Fisher's Exact test* atau *SAS Monopace*. Hasil analisis antara varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* antara perawat dan penderita TB paru tidak terdapat perbedaan secara bermakna dengan $p=0,370$ ($p>0,05$).

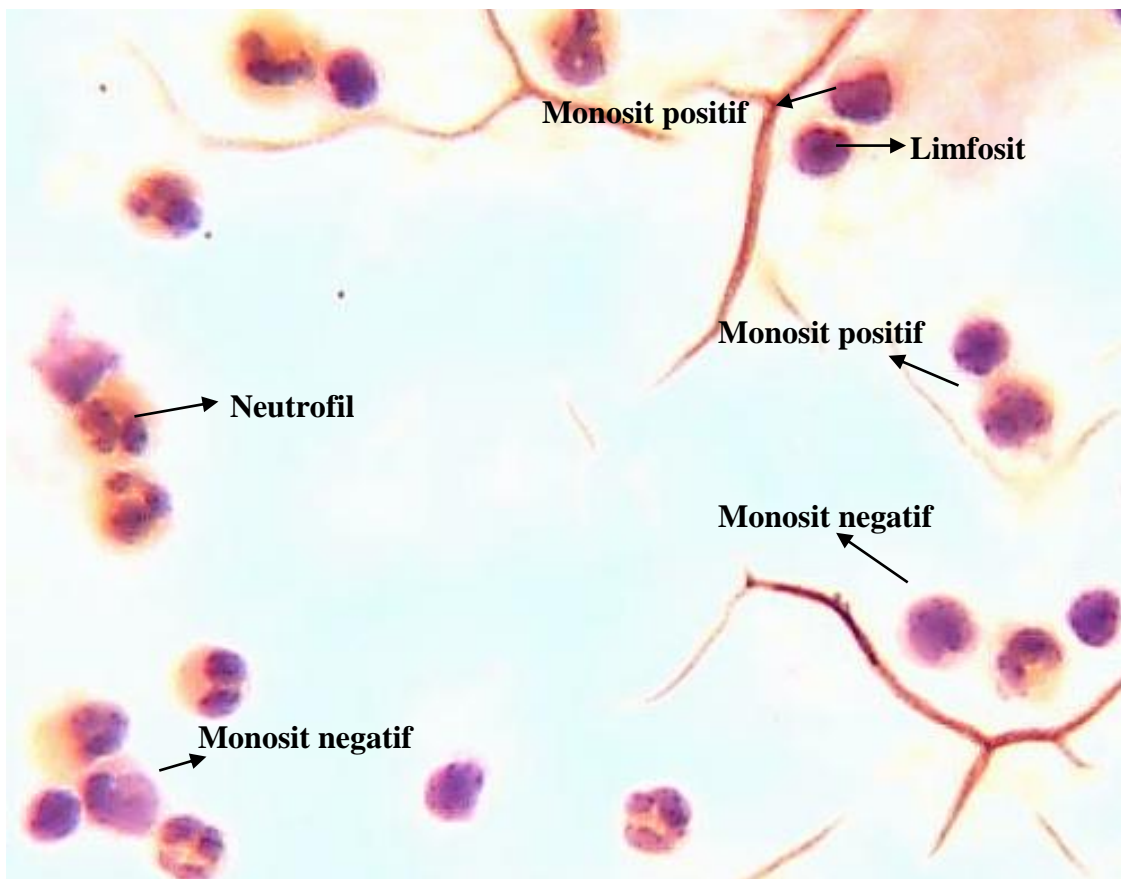
5.2.14 Hasil Uji Imunositokimia pada PBMC dari kelompok Perawat dan Penderita TB Paru

Uji imunositokimia dilakukan pada 43 sampel preparat PBMC perawat dan 69 sampel preparat PBMC penderita TB paru untuk mendeteksi ekspresi protein *NRAMP1* dalam sitoplasma monosit. Uji imunositokimia menggunakan Kit komersial yang telah dilakukan uji sensitifitas dan spesifisitas, sehingga pemakai hanya menurut petunjuk yang telah diberikan oleh pabrik. Antibodi *NRAMP1* dibeli dari *Santa Cruz Biotechnology, Inc Europe* dihasilkan melalui proses pemurnian ikatan antibodi poliklonal kambing terhadap *mapping peptide NRAMP1* manusia yang berasal dari *mapping* kromosom 2q35 manusia. Uji imunositokimia tidak disarankan oleh pabrik untuk melakukan titrasi papan catur, karena konsentrasi pengenceran antibodi *NRAMP1* yang optimal sudah didapat terhadap beberapa macam uji, seperti *Western Blotting* disarankan pada pengenceran 1/200 (1/100-1/1000), Imunositokimia disarankan pada pengenceran 1/50 (1/50-1/500).

Pada penelitian ini dipakai pengenceran 1/50. Kit *Ultra Vision Detection System Anti-polyvalent, HRP/DAB (Ready to use)* mendeteksi antigen

NRAMP1. Pada penelitian ini sebelum dilakukan reaksi enzimatik, slide yang mengandung PBMC direndam dengan buffer permeabilitas dingin yaitu larutan Igepal CA-630 0,5% untuk memperbesar pori membran sel monosit agar dapat dilalui oleh antibodi NRAMP1 sehingga terjadi ikatan antigen-antibodi NRAMP1 dalam sitoplasma monosit, selanjutnya PBMC dibasahi dengan larutan H₂O₂ 0,3% selama 10 menit untuk menghindari terjadi efek pengecatan latar belakang nonspesifik dari aktivitas *endogenous peroxidase*, hal ini dimaksudkan agar terhindar dari hasil pengecatan yang positif palsu atau negatif palsu.

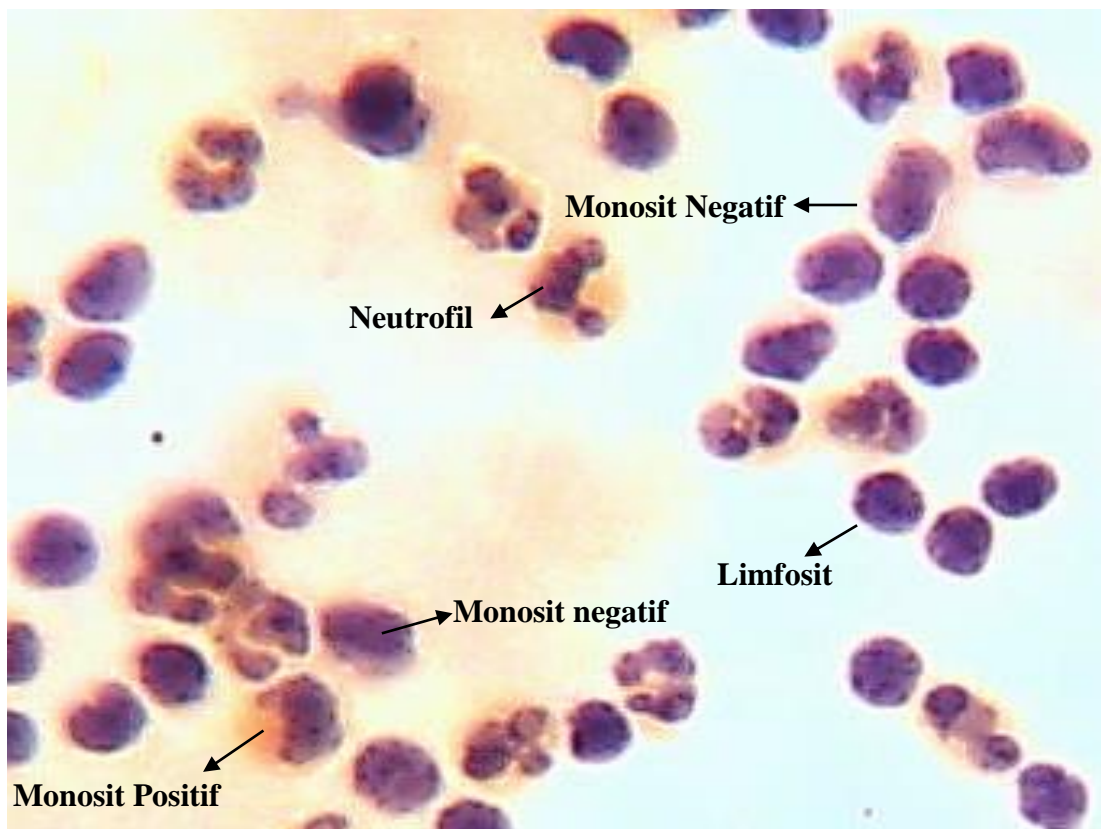
1. Hasil uji Imunositokimia pada PBMC kelompok perawat



Gambar 5.17 Hasil Imunositokimia perawat dengan metode DAB *Indirect Enzyme Immuno Assay*. Pada sitoplasma monosit positif terlihat protein NRAMP1 dengan warna kuning kecoklatan, sedangkan pada monosit negatif sitoplasma tidak berwarna.

Interpretasi hasil pengecatan imunositokimia akan didapatkan jumlah monosit positif dalam 20 lapangan pandang dengan perbesaran 40X menggunakan USB PC Camera 301P, kemudian di persentase monosit positif per monosit total (monosit positif + monosit negatif). Didapat hasil monosit positif dalam persen.

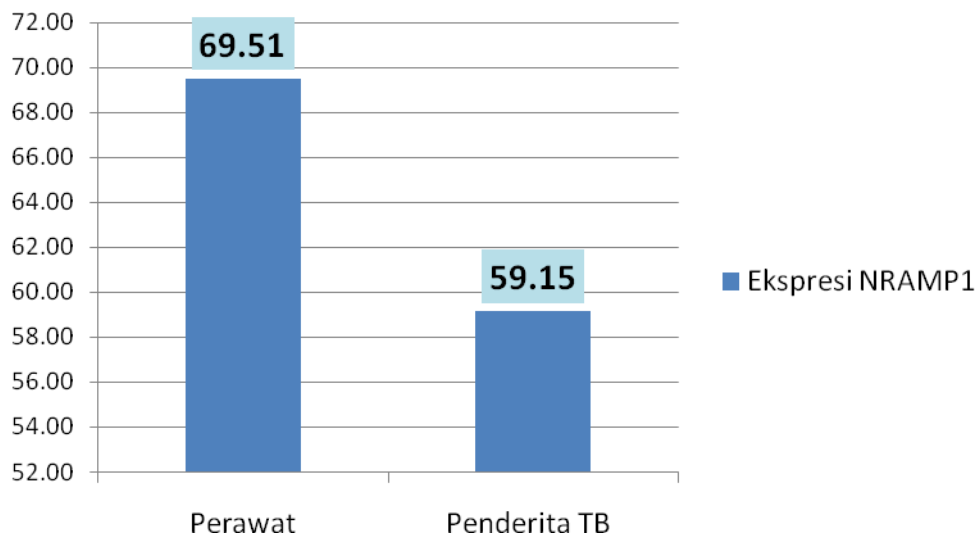
2. Hasil uji Imunositokimia pada PBMC pada kelompok penderita TB Paru



Gambar 5.18 Hasil Imunositokimia penderita TB paru dengan metode DAB *Indirect Enzyme Immuno Assay*. Pada sitoplasma monosit positif terlihat protein NRAMP1 dengan warna kuning kecoklatan, sedangkan pada monosit negatif sitoplasma tidak berwarna.

Interpretasi hasil pengecatan imunositokimia akan didapatkan jumlah monosit positif dalam 20 lapangan pandang dengan perbesaran 40X menggunakan USB PC Camera 301P, kemudian di persentase monosit positif per monosit total (monosit positif + monosit negatif). Didapat nilai monosit positif dalam persen.

5.2.15 Hasil *independent T test* menganalisis perbedaan ekspresi protein NRAMP1 antara kelompok perawat dan penderita TB paru



Gambar 5.19 Diagram *column* diskripsi ekspresi protein NRAMP1 rata-rata antara kelompok penderita TB paru dan perawat.

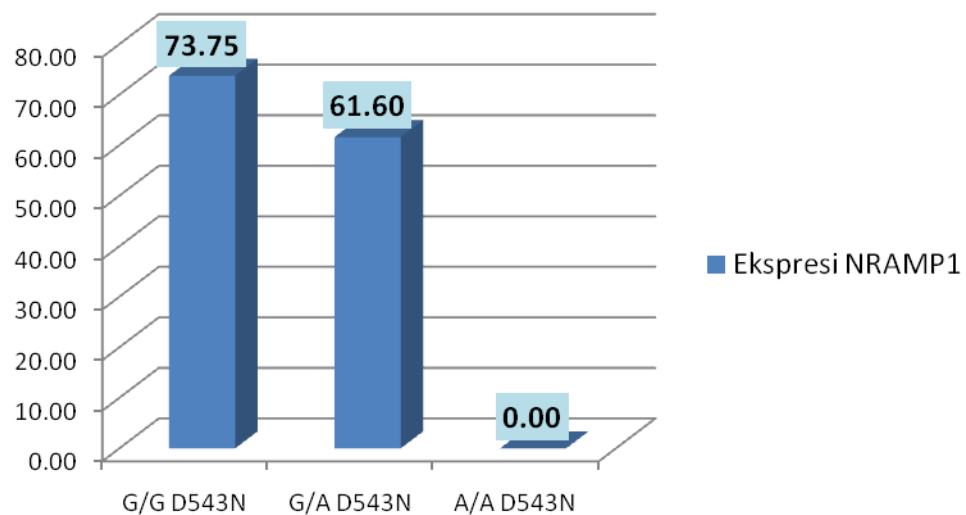
Berdasar gambaran rata-rata ekspresi protein NRAMP1 antara perawat dan penderita TB paru. Pada perawat rata-rata 69,51%, dan pada penderita TB paru rata-rata 59,15%.

Tabel 5.6 *Independent T test* menganalisis perbedaan ekspresi protein NRAMP1 antara kelompok perawat dan penderita TB paru

Ekspresi NRAMP1	Perawat (n=43)	Penderita TB (n=69)	<i>F hitung</i>	<i>P value</i>
NRAMP1	69,51%	59,15%	14,668	0,002

Hasil analisis perbedaan rata-rata ekspresi protein NRAMP1 antara kelompok perawat dan penderita TB paru didapat nilai F hitung 14,668 dan probabilitas 0,002 ($p < 0,05$), sehingga terdapat perbedaan secara bermakna.

5.2.16 Hasil *One Way Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen NRAMP1 pada kelompok perawat



Gambar 5.20 Diagram *column* diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen NRAMP1 pada kelompok perawat.

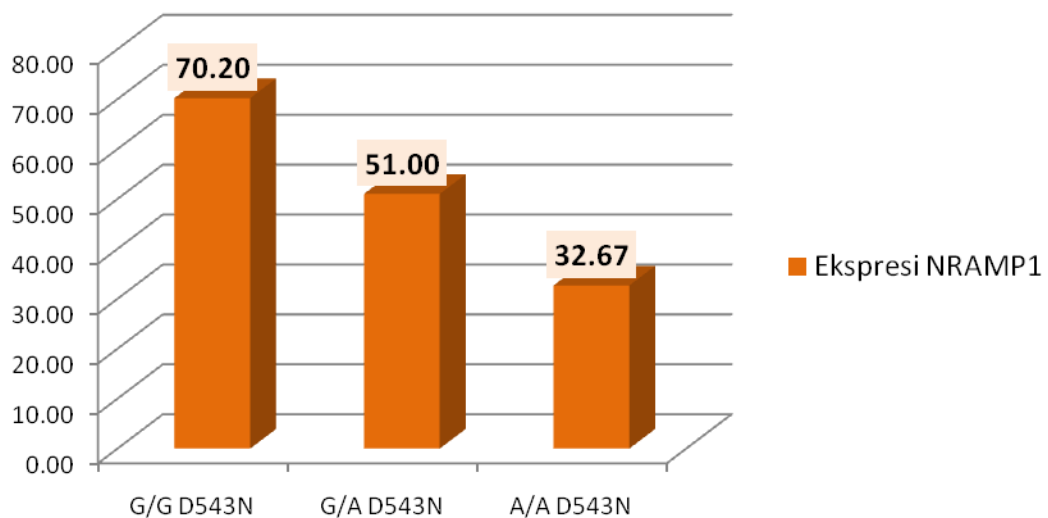
Berdasar gambaran rata-rata ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G (73,75%), varian G/A (61,60%), dan varian A/A (0%) dari genotip D543N gen NRAMP1 pada kelompok perawat.

Tabel 5.7 *OneWay Anova* menganalisis perbedaan ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen NRAMP1 pada perawat

Ekspresi NRAMP1	Varian G/G D543N	Varian G/A D543N	Varian A/A D543N	F hitung	P value
NRAMP1	73,75%	61,60%	0%	11,341	0,002

Hasil analisis perbedaan ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* pada kelompok perawat terdapat perbedaan secara bermakna dengan *F* hitung 11,341 dan $p=0,002$ ($p<0,05$).

5.2.17 Hasil *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB Paru



Gambar 5.21 Diagram *column* diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.

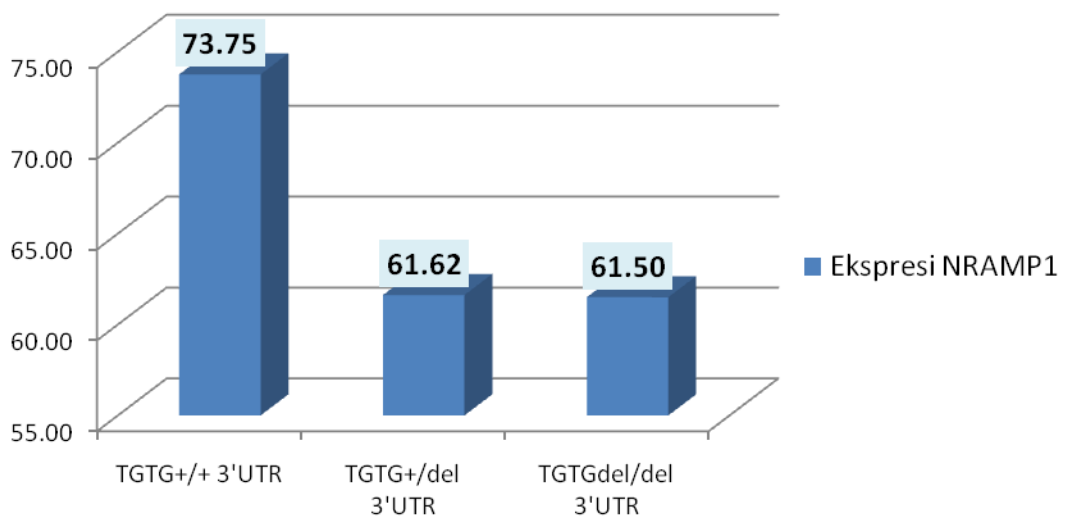
Berdasar gambaran rata-rata ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G adalah 70,20%, varian G/A adalah 51,00%, dan varian A/A adalah 32,67% dari genotip D543N gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.

Tabel 5.8 *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* pada penderita TB paru

Ekspresi NRAMP1	Varian G/G	Varian G/A	Varian A/A	<i>F</i> hitung	<i>P</i> value
NRAMP1	70,20%	51,00%	32,67%	16,532	0,000

Hasil analisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru didapat nilai F hitung adalah 16,532 dan probabilitas 0,000 ($p < 0,05$), sehingga terdapat perbedaan secara bermakna.

5.2.18 Hasil *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada kelompok perawat



Gambar 5.22 Diagram *column* diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.

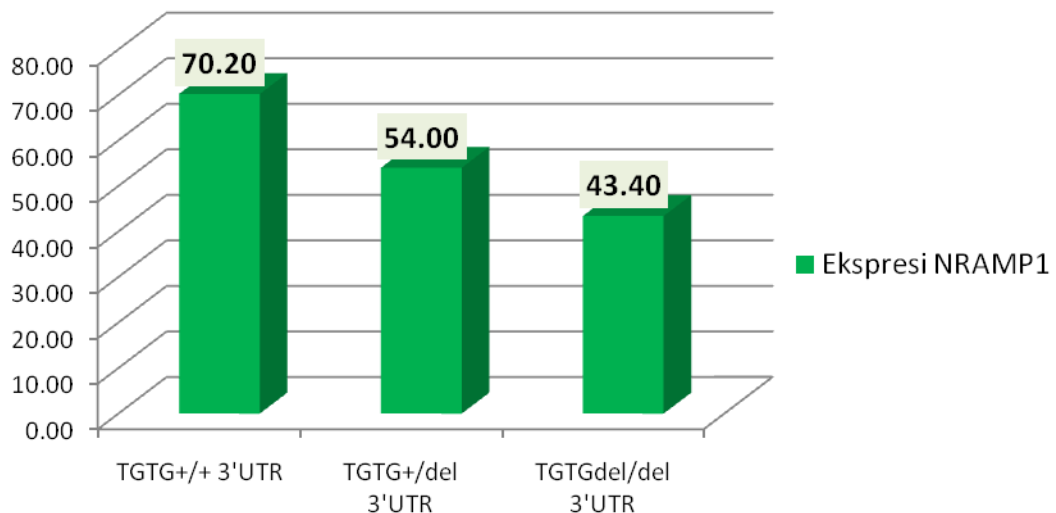
Berdasar gambaran rata-rata ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/+ adalah 73,75%, dan varian TGTG+/del adalah 61,62%, dan varian TGTGdel/del adalah 61,50% dari genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.

Tabel 5.9 *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada perawat

Ekspresi NRAMP1	Varian TGTG+/,	Varian TGTG+/del	Varian TGTGdel/del	<i>F</i> hitung	<i>P</i> value
NRAMP1	73,75%	61,62%	61,5%	5,532	0,008

Hasil analisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada kelompok perawat terdapat perbedaan secara bermakna, didapat nilai *F* hitung adalah 5,532 dan nilai $p=0,008$ ($p<0,05$).

5.2.19 Hasil *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru



Gambar 5.23 Diagram *column* diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.

Berdasar gambaran rata-rata ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, adalah 70,20%, dan varian TGTG+/del adalah 54,00%, serta

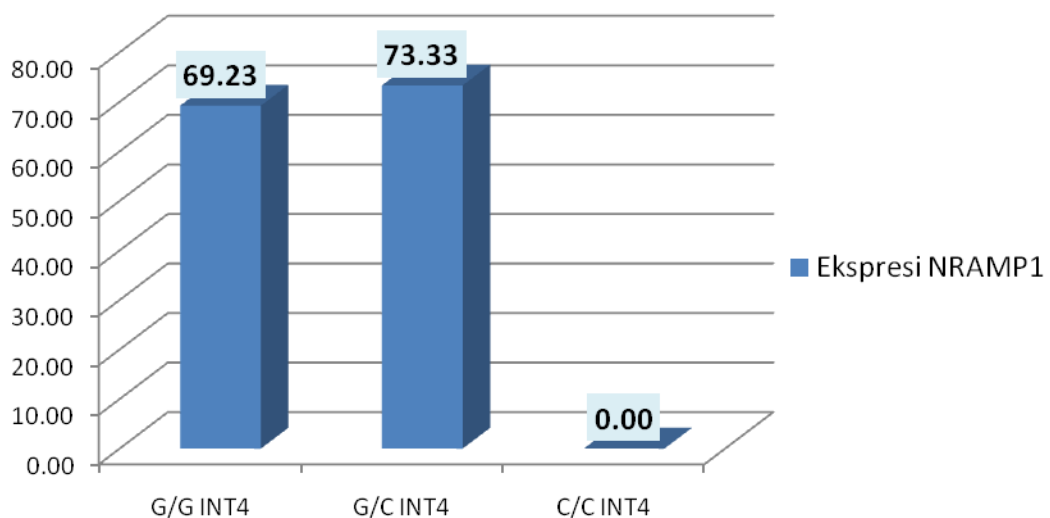
TGTGdel/del adalah 43,40% dari genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru.

Tabel 5.10 *OneWay Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada penderita TB paru

Ekspresi NRAMP1	Varian TGTG+/,	Varian TGTG+/del	Varian TGTGdel/del	<i>F</i> hitung	<i>P</i> value
NRAMP1	70,20%	54,00%	43,40%	14,828	0,000

Hasil analisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada penderita TB paru terdapat perbedaan secara bermakna, dengan nilai *F* hitung 14,828 dan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$).

5.2.20 Hasil *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada perawat



Gambar 5.24 Diagram *column* diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.

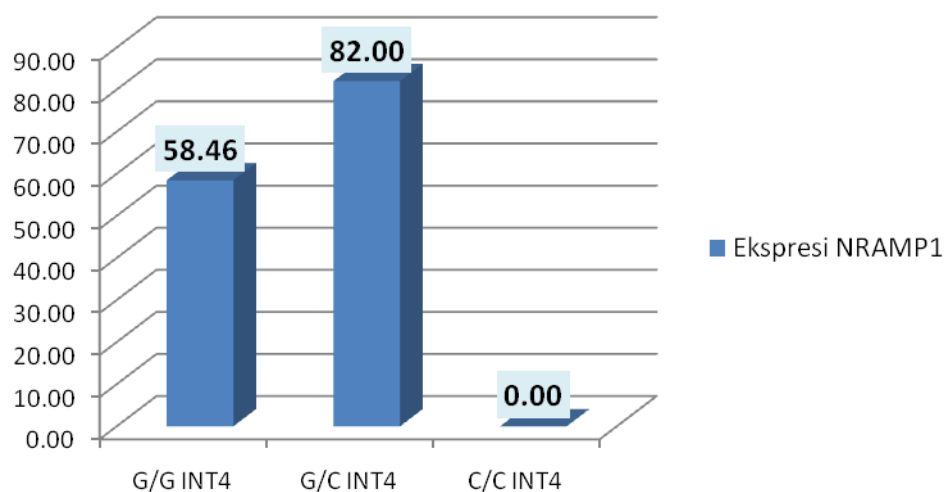
Berdasar gambaran rata-rata ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G adalah 69,23%, varian G/C adalah 73,33% dan varian C/C adalah 0% dari genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.

Tabel 5.11 *OneWay Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada perawat

Ekspresi NRAMP1	Varian G/G INT4	Varian G/C INT4	Varian C/C INT4	F hitung	P value
NRAMP1	69,23%	73,33%	0%	0,292	0,592

Hasil analisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat tidak terdapat perbedaan secara bermakna dengan nilai F hitung adalah 0,292 dan nilai $p=0,592$ ($p>0,05$).

5.2.21 Hasil *Oneway Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada penderita TB paru



Gambar 5.25 Diagram *column* diskripsi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada perawat.

Berdasar gambaran rata-rata ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G adalah 58,46%, varian G/C adalah 82,00%, dan varian C/C adalah 0%, dari genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat.

Tabel 5.12 *OneWay Anova* menganalisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada penderita TB paru

Ekspresi NRAMP1	Varian G/G INT4	Varian G/C INT4	Varian C/C INT4	<i>F</i> hitung	<i>P</i> value
NRAMP1	58,46%	82,00%	0%	2,410	0,125

Hasil analisis perbedaan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru tidak terdapat perbedaan secara bermakna dengan nilai *F* hitung 2,410 dan nilai $p=0,125$ ($p>0,05$).

5.2.22 Hasil analisis univariat /Anova interaksi dua faktor menganalisis interaksi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat

Berdasar tabel di bawah, untuk diketahui apakah model dapat menjelaskan hasil interaksi? Hal ini dapat diketahui dengan membandingkan *corrected model/corrected total* = $1755,001 / 6654,744 \times 100\% = 26,37\%$ yang dapat dijelaskan oleh model hasil output di atas. Oleh karena sebanyak 73,63% tidak dapat dijelaskan oleh model, maka hasil model di atas tidak memadai untuk menjelaskan ada interaksi dari masing-masing varian genotip

gen *NRAMP1* untuk mempengaruhi ekspresi protein *NRAMP1* pada kelompok perawat.

Tabel 5.13 Analisis Univariat menganalisis interaksi antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat

Protein <i>NRAMP1</i> Berinteraksi dengan	Type III Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig
Corrected Model	1755.001	4	438.750	3.403	0.018
Intercept	58896.065	1	58896.065	456.769	0.000
G/G D543N	0	0	.		
G/A D543N	0	0	.		
A/A D543N	0	0			
TGTG+/, 3'UTR	0	0			
TGTG+/del 3'UTR	312.500	1	312.500	2.424	0.128
TGTGdel/del 3'UTR	147.780	1	147.780	1.146	0.291
G/G INT4	0	0			
G/C INT4	0	0			
Error	4899.744	38	128.941		
Total	214425.000	43			
Corrected Total	6654.744	42			

5.2.23 Hasil analisis univariat /Anova interaksi dua faktor menganalisis interaksi antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru

Berdasar tabel di bawah, untuk diketahui apakah model dapat menjelaskan hasil interaksi ? Hal ini dapat diketahui dengan membandingkan $\text{corrected model/corrected total} = 10888,975 / 30984,551 \times 100\% = 35,14\%$ yang dapat dijelaskan oleh model. Sisanya 64,86% tidak dapat dijelaskan oleh model, maka hasil model di atas tidak memadai untuk menjelaskan ada

interaksi dari masing-masing varian genotip gen *NRAMP1* mempengaruhi ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok penderita TB paru.

Tabel 5.14 Analisis Univariat menganalisis interaksi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB paru

Protein NRAMP1 Berinteraksi dengan	Type III Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig
Corrected Model	10888.975	4	2722.244	8.670	0.000
Intercept	82790.139	1	82790.139	263.668	0.000
G/G D543N	0	0	.		
G/A D543N	0	0	.		
A/A D543N	0	0			
TGTG+/- 3'UTR	0	0			
TGTG+/del 3'UTR	0	0			
TGTGdel/del 3'UTR	0	0			
G/G INT4	0	0			
G/C INT4	0	0			
Error	20095.576	64	313.993		
Total	272355.000	69			
Corrected Total	30984.551	68			

5.2.24 Hasil analisis korelasi *Spearman* menganalisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat

Tabel 5.15 Analisis Korelasi *Spearman* menganalisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat

	NRAMP1	G/G D543N	G/A D543N	A/A D543N	TGTG+/- 3'UTR	TGTG+/- 3'UTR	TGTG-/- 3'UTR	G/G INT4	G/C INT4	C/C INT4
NRAMP1 Sig.(p)	1,000	0.425** (0,004)	-0.425** (0,004)	-	0.425** (0,004)	-0.448** (0,003)	-0.125 (0,425)	-0,092 (0,557)	0,092 (0,557)	-

1. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G genotip D543N di dapat +0,425** dengan nilai $p=0,004$, maka varian G/G D543N akan meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$), secara bermakna ($p<0,05$) pada perawat.
2. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/A genotip D543N di dapat -0,425** dengan nilai $p=0,004$, maka varian G/A D543N akan menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) secara bermakna ($p<0,05$) pada perawat.
3. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian A/A genotip D543N tidak ada pada perawat.
4. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/+ genotip 3'UTR didapat +0,425** dengan nilai $p=0,004$, maka varian TGTG+/+ genotip 3'UTR akan meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) secara bermakna ($p<0,05$) pada perawat.
5. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/del genotip 3'UTR didapat -0,448** dengan nilai $p=0,004$, maka varian TGTG+/del genotip 3'UTR akan menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) secara bermakna ($p<0,05$) pada perawat.
6. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTGdel/del genotip 3'UTR di dapat -0,125 dengan nilai $p=0,425$, maka varian TGTGdel/del akan menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$), namun tidak bermakna ($p>0,05$) pada perawat.
7. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G genotip INT4 di dapat -0,092 dengan nilai $p=0,557$, maka varian G/G INT4 menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$), namun tidak bermakna ($p>0,05$) pada perawat.

8. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/C genotip INT4 di dapat +0,092 dengan $p=0,557$, maka varian G/C INT4 meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) dan tidak bermakna ($p>0,05$) pada perawat.
9. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian C/C genotip INT4 tidak ada pada perawat.

5.2.25 Hasil analisis korelasi *Spearman* menganalisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen NRAMP1 pada kelompok penderita TB paru

Tabel 5.16 Analisis korelasi *Spearman* menganalisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, dan C/C genotip INT4 gen NRAMP1 pada kelompok penderita TB paru

	NRAMP1	G/G D543N	G/A D543N	A/A D543N	TGTG+/ 3'UTR	TGTG+/- 3'UTR	TGTG-/ 3'UTR	G/G INT4	G/C INT4	C/C INT4
NRAMP1 Sig.	1,000	+0.519** (0,000)	-0.335** (0,005)	-0.336** (0,005)	+0.591** (0,000)	-0,091 (0,455)	-0,490** (0,000)	-0,245* (0,042)	+0,245* (0,042)	-

1. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G genotip D543N di dapat +0,519** dengan nilai $p=0,000$, maka varian G/G D543N akan meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 kuat ($\geq 0,5$) secara bermakna ($p<0,05$) pada penderita TB paru.
2. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/A genotip D543N di dapat -0,335** dengan nilai $p=0,005$, maka varian

- G/A D543N akan menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) secara bermakna ($p<0,05$) pada penderita TB paru.
3. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian A/A genotip D543N di dapat $-0,336^{**}$ dengan nilai $p=0,005$, maka varian A/A D543N akan menurunkan ekspresi protein NRAMP1 ($<0,5$) secara bermakna ($p<0,05$) pada penderita TB paru.
 4. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/+ genotip 3'UTR didapat $+0,519^{**}$ dengan nilai $p=0,000$, maka varian TGTG+/+ 3'UTR akan meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 kuat ($>0,5$) secara bermakna ($p<0,05$) pada penderita TB paru.
 5. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/del genotip 3'UTR di dapat $-0,091$ dengan nilai $p=0,445$, maka varian TGTG+/del 3'UTR akan menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) dan tidak bermakna ($p>0,05$) pada penderita TB paru.
 6. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTGdel/del genotip 3'UTR di dapat $-0,490^{**}$ dengan nilai $p=0,000$, maka varian TGTGdel/del 3'UTR akan menurunkan ekspresi protein NRAMP1 kuat ($\geq 0,5$) secara bermakna ($p<0,05$) pada penderita TB paru.
 7. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G genotip INT4 di dapat $-0,245^*$ dengan nilai $p=0,042$, maka varian G/G INT4 akan menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) secara bermakna ($p<0,05$) pada penderita TB paru.

8. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/C genotip INT4 di dapat +0,245* dengan nilai $p=0,042$, maka varian G/C INT4 akan meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) secara bermakna ($p<0,05$) pada penderita TB paru.
9. Hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian C/C genotip INT4 tidak ada pada penderita TB paru.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Sampel Penelitian

Pada penelitian ini, sampel perawat dipilih perawat yang telah bekerja lebih dari 2 tahun dimaksudkan agar perawat telah terinfeksi dengan *M.tuberculosis*, dan menimbulkan imunitas kebal dengan membentuk integritas granuloma terkendali, yang diketahui dengan hasil PPD positif >10mm. Total perawat yang diteliti sebanyak 75 orang di Ruang laki dan perempuan RSUD Dr. Soetomo, Surabaya di mana 17 orang perawat (22,67%) memberikan hasil PPD negatif (<10mm). Pada penderita TB paru dipilih penderita baru yang datang di Poli Dot Rawat Jalan RS. Karang Tembok, dimaksudkan untuk mendapatkan kondisi *primary infection, reinfection, dan reactivation infection*. Pada tahap ini kondisi integritas dari granuloma tidak terkendali, sehingga pecah menjadi *caseous lesion*.

Usia perawat dan penderita TB paru ditentukan sekitar 18-50 tahun, hal ini untuk menghindari pengaruh perubahan supresi respon imun (Gyetko, 1993; Weigle, 1993). Pada usia muda <18 tahun, respon imun belum berjalan optimal dan pada usia lanjut, pembentukan, aktivasi, dan ekspansi klonal sel T mengalami kemunduran (Pauwel, 1997). Pada penelitian ini usia antara 25-45 tahun merupakan distribusi terbanyak, baik pada perawat sebanyak 60,50% (26/43), maupun pada penderita 65,20% (45/69), sehingga diharapkan respon imun yang diperlihatkan keduanya dapat dipertanggungjawabkan, dan setelah dilakukan uji "*Chi Square*" distribusi dari usia kelompok penderita TB paru dan kelompok perawat adalah homogen dengan $p=0.05$ ($p>0,05$).

Pengaruh jenis kelamin dalam sampel penelitian yang diambil melalui darah tidak mempunyai efek yang bermakna terhadap respon imun (*The BAL Cooperative Group Steering Committee*, 1990), sehingga pengaruh jenis kelamin tidak mempengaruhi ekspresi protein NRAMP1 pada makrofag pria maupun wanita. Pada penelitian ini distribusi jenis kelamin pada kedua kelompok penelitian adalah homogen dengan $p=0.174$ ($p>0,05$).

Khusus pada perawat dilakukan uji TB-Dot untuk menghindari infeksi TB ekstrapulmonal dan uji Faeces lengkap untuk menghindari infeksi parasit cacing di mana infeksi cacing dapat dimasukkan ke dalam kelompok atopi yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Penyakit infeksi cacing dapat meningkatkan respon imun sel Th2 yang dapat meningkatkan kadar IL-4 dalam serum. Pengaruh respon imun ke sel Th2 dapat mempengaruhi ekspresi protein NRAMP1 yang berperan meningkatkan respon imun sel Th1. Peran protein NRAMP1 sebagai protein transport ion logam bervalensi dua (terutama Fe^{2+}) dengan membawa ion logam tersebut kedalam makrofag agar terjadi proses fagositosis dan mengaktifkan makrofag untuk merangsang ke sel Th1, apabila respon ke sel Th1 ditekan oleh IL-4 akibat infeksi cacing, maka hal ini dapat mempengaruhi ekspresi NRAMP1 dalam makrofag.

Pemeriksaan kadar Hemoglobin merupakan faktor yang dikendalikan, sehingga apabila rendah dapat mempengaruhi peran protein NRAMP1. Kadar Hemoglobin pada perawat dalam batas normal 11-17 g/dl, sedangkan pada penderita TB paru kadar Hemoglobin yang masih diperkenankan minimal 10g/dl (kadar Hemoglobin 10g/dl pada penderita TB paru masih dianggap normal, karena belum diperlukan tindakan medis). Pemeriksaan kadar gula darah acak, HIV, BUN, Creatinine, baik pada perawat maupun pada penderita

TB paru normal, karena apabila ada kelainan pada salah satu dari tes ini dapat mengganggu dan menurunkan respon imun seluler. Di mana kelainan faal ginjal mengakibatkan kehilangan banyak protein dari individu, sedangkan pada penyakit *Diabetes Melitus* (DM) dan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) dapat menyebabkan *immune compromised host*. Sel Th1 berperan penting terhadap infeksi *M. tuberculosis*, karena sel Th1 akan menghasilkan IFN- γ , IL-2 dan limfokin yang berfungsi meningkatkan aktivitas mikrobisidal pada makrofag serta menimbulkan reaksi hipersensitifitas tipe lambat (Schwander, 1996).

6.2 Hasil Penentuan Varian Genotip Gen *NRAMP1* dengan metode PCR-RFLP

Amplifikasi DNA target D543N/3'UTR, INT4 membutuhkan primer spesifik (sekuen oligonukelotida khusus) untuk daerah tersebut. Primer biasanya terdiri dari 10-20 nukleotida dan dirancang berdasarkan daerah konservatif dalam genom tersebut. Makin panjang primer, semakin harus spesifik daerah yang diamplifikasi.

Pada penelitian ini diteliti genotip D543N/3'UTR dan INT4 gen *NRAMP1* dengan primer khusus untuk genotip D543N /3'UTR dan INT4 untuk melihat ada perbedaan *genotyping* dari varian genotip D543N, 3'UTR dan INT4 gen *NRAMP1*. Beberapa faktor seperti konsentrasi sampel DNA, ukuran panjang primer, komposisi basa primer, konsentrasi ion Mg, dan suhu hibridisasi primer harus dikontrol dengan hati-hati agar dapat diperoleh pita DNA yang utuh dan baik.

Keberhasilan teknik ini lebih didasarkan kepada kesesuaian primer dan efisiensi dan optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasi daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Optimasi PCR juga diperlukan untuk menghasilkan karakter yang diinginkan. Optimasi ini menyangkut suhu denaturasi dan *annealing* DNA dalam mesin PCR. Suhu denaturasi yang rendah dapat menyebabkan belum terbukanya DNA utas ganda sehingga tidak dimungkinkan terjadinya polimerisasi DNA baru. Proses penempelan primer pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom yang bukan sisi homolognya, akibatnya dapat teramplifikasi banyak daerah tidak spesifik dalam genom tersebut. Suhu penempelan (*annealing*) ini ditentukan berdasarkan primer yang digunakan yang dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer. Suhu penempelan ini sebaiknya sekitar 5°C di bawah suhu leleh. Secara umum suhu leleh (*Temperature Melting = T_m*) dihitung dengan rumus $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)^{\circ}C$.

Pada penelitian ini diperoleh hasil optimasi PCR sebagai berikut, suhu tahapan denaturasi 95°C selama 5 menit dan suhu denaturasi dalam pelipatgandaan 95°C selama 30 detik, suhu *annealing* hasil optimasi untuk primer D543N dan INT4 pada suhu 60°C selama 30 detik, suhu elongasi 72°C selama 3 menit, dan digandakan sebanyak 35 siklus berulang serta *final extension* selama 7 menit pada suhu 72°C, dimaksudkan agar rantai DNA kembali menjadi *double stranded*.

Hasil *genotyping* PCR-*restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) dengan prinsip menggunakan primer spesifik. Polimorfisme untuk melihat genom organisme digunakan suatu enzim pemotong tertentu (*restriction enzyme*). Karena sifatnya yang spesifik, maka enzim ini akan memotong situs tertentu yang dikenal. Situs enzim pemotong dari genom suatu kelompok organisme yang kemudian berubah karena mutasi atau berpindah karena *genetic rearrangement* dapat menyebabkan situs tersebut tidak lagi dikenali oleh enzim, atau enzim restriksi akan memotong daerah lain yang berbeda. Proses ini menyebabkan pembentukan fragmen-fragmen DNA yang berbeda ukuran yang menyebabkan terjadi perbedaan antara individu satu dengan individu lain. Penggunaan teknik PCR-RFLP telah pula mampu mengungkapkan keanekaragaman genetik yang tidak dapat dikulturkan di laboratorium.

Pemilihan DNA gen *NRAMP1* untuk tujuan identifikasi individu didasarkan pada:

1. secara fungsional dan evolusioner memiliki sifat homolog dari berbagai individu yang berbeda
2. molekul dengan struktur dan sekuen nukleotida sangat konservatif
3. sangat banyak terdapat di dalam fagosit
4. cukup besar untuk memungkinkan dilakukan uji statistik perbedaan antara individu satu dengan yang lain (Suryanto, 2003).

6.2.1 Hasil penentuan varian genotip D543N gen *NRAMP1*

Dari hasil penentuan varian genotip D543N gen *NRAMP1* dengan metode PCR-RFLP, dijumpai distribusi frekuensi varian G/G genotip D543N, lebih tinggi terjadi pada individu sehat di China (Zhang) 81,3% (74/91), China (Liu) 96% (231/240), Korea 85,4% (164/192), dan di Indonesia 65,1% (28/43). Distribusi frekuensi varian G/A genotip D543N, lebih tinggi terjadi pada penderita TB paru di China (Zhang) 29,1% (37/127), China (Liu) 9% (11/120), Korea 22,4% (43/192) dan Indonesia 40,6% (28/69). Distribusi frekuensi varian A/A genotip D543N, lebih tinggi terjadi pada penderita TB paru di China (Zhang) 0,7% (1/127), Korea 1,6% (3/192), Cambodia 3,4% (12/358), dan Indonesia 8,7% (6/69).

Di Cambodia varian G/G genotip D543N lebih tinggi terjadi pada penderita TB paru 64,2% (228/358), demikian pula dengan varian G/A di Cambodia lebih tinggi terjadi pada individu sehat 46,2% (49/106). Perbedaan frekuensi varian A/A genotip D543N di ke-empat Negara (China (Zhang) 0,7% (1/127), Cambodia 3,4% (12/358), Korea 1,6% (3/192), dan Indonesia 8,7% (6/69) hasil lebih banyak terjadi pada penderita TB Paru dan jarang terjadi pada individu sehat, kecuali di Korea terjadi 1 kasus di antara 192 kasus (0,5%). Hal ini dapat disimpulkan bahwa varian A/A genotip D543N dapat menjadi parameter kerentanan terhadap infeksi *M. tuberculosis*.

6.2.2 Hasil penentuan varian genotip 3'UTR gen *NRAMP1*

Dari hasil penentuan varian genotip 3'UTR gen *NRAMP1* dengan metode PCR-RFLP, dijumpai distribusi frekuensi varian TGTG+/+ genotip 3'UTR, lebih tinggi terjadi pada individu sehat di China (Liu) 74% (178/240),

Korea 85,4% (164/190) dan Indonesia 65,1% (28/43), sedangkan di Cambodia lebih tinggi terjadi pada penderita TB paru 32,4% (228/358). Distribusi frekuensi varian TGTG+/del genotip 3'UTR, lebih tinggi terjadi pada penderita TB paru di China (Liu) 36% (44/120), Korea 22,4% (43/192), sedangkan di Cambodia lebih tinggi terjadi pada individu sehat 46,2% (49/106).

Distribusi frekuensi varian TGTGdel/del genotip 3'UTR, lebih tinggi terjadi pada penderita TB paru di Korea 1,6% (3/192), Cambodia 3,4% (12/358), dan Indonesia 29,0% (20/69), kecuali di China (Liu) lebih tinggi terjadi pada individu sehat sebanyak 3% (6/240). Hal ini dapat disimpulkan bahwa varian TGTGdel/del genotip 3'UTR dapat menjadi parameter kerentanan terhadap infeksi *M. tuberculosis*.

6.2.3 Hasil penentuan varian genotip INT4 gen *NRAMP1*

Dari hasil penentuan varian genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan metode PCR-RFLP, dijumpai distribusi frekuensi varian G/G genotip INT4, lebih tinggi terjadi pada individu sehat di China (Zhang) 83,5% (76/91) dan di Indonesia lebih tinggi terjadi pada penderita TB paru 97,1% (67/69).

Distribusi frekuensi varian G/C genotip INT4, lebih tinggi terjadi pada penderita TB paru di China (Zhang) 25,9% (33/127) dan di Indonesia lebih tinggi terjadi pada individu sehat/perawat 7,0% (3/43). Distribusi frekuensi varian C/C genotip INT4, lebih tinggi terjadi pada penderita TB paru di China (Zhang) 0,7% (1/127) dan di Indonesia tidak ditemukan baik pada perawat maupun pada penderita TB paru.

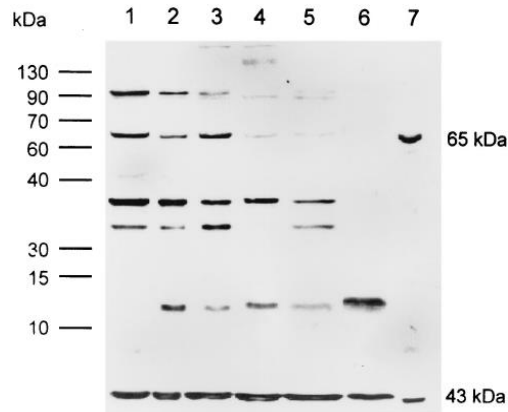
Hasil distribusi varian genotip D543N, 3'UTR, dan INT4 antara China, Cambodia, Korea, dan Indonesia ternyata terdapat perbedaan. Apakah perbedaan ini disebabkan karena kriteria individu sehat yang dipergunakan sebagai sampel penelitian berbeda?, di mana di China individu sehat berasal dari individu yang mendonorkan darah di Huashan Hospital, dengan kriteria individu tersebut tidak terinfeksi atau terinfeksi tetapi tidak sakit. Individu sehat yang dipergunakan di Cambodia adalah penderita selain penderita TB paru dengan PPD(+)>10mm yang datang ke Rumah Sakit yang sama dengan pengambilan sampel penderita TB paru. Individu sehat yang dipergunakan di Korea sama dengan di China yaitu individu yang datang mendonorkan darah ke Rumah Sakit yang sama dengan pengambilan sampel penderita TB paru, sedangkan individu sehat yang digunakan pada penelitian ini adalah perawat yang telah merawat penderita TB Paru ≥ 2 tahun dengan hasil uji PPD(+)>10mm, adalah individu yang telah terinfeksi dan memiliki kekebalan terhadap infeksi *M.tuberculosis*.

6.3 Hasil penentuan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat dan penderita TB paru

Hasil penelitian ini dijumpai bahwa ekspresi protein NRAMP1 dengan uji imonositokimia antara perawat dan penderita TB paru terdapat perbedaan yang bermakna dengan $p=0.002$ ($p<0.05$), hal ini sesuai dengan kerangka konseptual, bahwa ekspresi protein NRAMP1 meningkat pada makrofag perawat daripada makrofag penderita TB paru.

Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Ciro Estrada Chávez di Mexico pada tahun 2001 dengan uji *Western Blot* pada jaringan granuloma

TB sapi dan *peripheral blood cells* (PBC) sapi. Hasil penelitian Estrada menunjukkan bahwa ekspresi protein NRAMP1 sapi nampak berlimpah pada sapi yang mengalami granuloma dibanding ekspresi protein NRAMP1 pada *caseous necrosis* sapi yang terlihat sedikit dan hampir tidak ada, seperti pada gambar 6.1.



Gambar 6.1 Uji *Western blotting* dari granuloma tuberkulosis sapi untuk mendeteksi adanya protein NRAMP1. Di sini berat molekul protein NRAMP1 sebesar 65 kDa.

Hasil uji *Western Blot* pada jaringan granuloma TB dan *peripheral blood cells* (PBC) sapi menunjukkan bahwa ekspresi protein NRAMP1 sapi pada:

1. Jalur 1 and 2: jaringan granuloma tuberkulosis, ekspresi NRAMP1 tinggi.
2. Jalur 3, jaringan nekrosis granuloma tuberkulosis, ekspresi NRAMP1 tinggi.
3. Jalur 4: jaringan *caseous necrosis* granuloma tuberkulosis, ekspresi NRAMP1 rendah.
4. Jalur 5: jaringan distal granuloma tuberkulosis, ekspresi NRAMP1 rendah.
5. Jalur 6, PBC sapi tidak terinfeksi *M.bovis*, ekspresi NRAMP1 rendah.
6. Jalur 7, PBC sapi dengan NRAMP1 positif pada BM 65 kDa.
7. Pita 43-kDa adalah actin sebagai Kontrol (Estrada, 2001).

Hasil penelitian ekspresi protein NRAMP1 sapi dengan uji *Western Blot* bila dianalogkan dengan hasil penelitian NRAMP1 pada manusia dengan uji imunositokimia, didapat ada kesamaan di mana ekspresi NRAMP1 meningkat pada perawat yang mengalami granuloma dan hipersensitivitas tipe lambat yang diketahui dengan hasil PPD(+)>10mm.

Menurut Ulrichs (2004), pada individu sehat yang memberikan hasil PPD positif >10mm mengindikasikan terjadi proses *delayed-type-hypersensitivity* (DTH). Reaksi DTH sebenarnya bersifat temporer dan akan lenyap bila antigen yang diaktifkan oleh monosit hilang, namun bila reaksi serupa berlangsung terus menerus di lokasi dengan *mycobacterial persistence* sebagai akibat mikobakteria tetap hidup dan tidak segera dihancurkan, maka antigenik yang terkumpul akan membentuk reaksi granulomatous di lokasi bakteri hidup tersebut. Pada hasil penelitian ini ekspresi protein NRAMP1 pada perawat yang merawat penderita TB paru ≥ 2 tahun dengan hasil PPD(+) >10mm memberikan hasil rata-rata ekspresi protein NRAMP1 sebesar 69,51%, lebih tinggi daripada rata-rata ekspresi protein NRAMP1 pada penderita TB paru sebesar 59,15%, dan bila dilakukan uji *Independent T test* terdapat perbedaan yang sangat bermakna dengan $p=0,002$ ($p<0,05$).

Pada penelitian Govani 1996, varian resisten/kebal diganti dengan varian rentan pada tikus dengan penggantian adenin ke guanin pada posisi basa 596 dari gen, menghasilkan penggantian dari glisin ke asam aspartat pada posisi asam amino 169 di daerah transmembrane-4 dari protein menjadi gen rentan (*Nramp1^{D169}*). Dikarenakan *Nramp1^{D169}* ini tidak stabil dan cepat rusak, maka tikus dengan varian homozigot ini menjadi peka terhadap infeksi.

Hal ini serupa dengan hasil penelitian Vidal (1995) pada tikus dengan varian resisten fungsional yang mengalami delesi melalui rekombinan homologus, tikus ini menjadi peka terhadap infeksi.

Pada penelitian pada tikus di atas, gen rentan yang terjadi pada tikus karena memiliki varian genotip homozigot. Hal ini dapat disamakan dengan hasil penelitian ini di mana frekuensi varian homozigot A/A genotip D543N sebesar 8,75% (6/69) dan varian TGTGdel/del genotip 3'UTR sebesar 29% (20/69) lebih banyak terjadi pada kelompok penderita TB paru, dan menurunkan ekspresi protein NRAMP1 yang kuat sebesar 32,67% pada varian A/A genotip D543N dan 43,40% pada varian TGTGdel/del genotip 3'UTR pada kelompok penderita TB paru, sehingga dapat disimpulkan bahwa pada individu yang memiliki varian genotip *NRAMP1* demikian dapat menyebabkan kerentanan terhadap infeksi *M. tuberculosis*. Pada penelitian ini tidak didapatkan varian genotip gen *NRAMP1* yang kebal terhadap *M. tuberculosis*.

6.4 Hasil analisis perbedaan antara varian genotip D543N, 3'UTR, dan INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru

Hasil analisis varian genotip D543N gen *NRAMP1* dan ekspresi protein NRAMP1 didapat rata-rata ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat dengan varian G/G adalah 73,75%, varian G/A adalah 61,60%, dan varian A/A adalah 0% dengan $p=0,002$ ($p<0,05$). Demikian pula hasil pada kelompok penderita TB paru dengan varian G/G adalah 70,20%, varian G/A adalah

51,00%, dan varian A/A adalah 32,67% dengan $p=0,000$ ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi protein NRAMP1 terhadap varian G/G, G/A, dan A/A genotip D543N yang terdapat pada perawat dan penderita TB paru terdapat perbedaan yang bermakna. Jadi ekspresi protein NRAMP1 pada perawat dan penderita TB paru yang meningkat atau menurun sangat dipengaruhi oleh varian G/G, G/A, dan A/A genotip D543N gen *NRAMP1*.

Hasil analisis varian genotip 3'UTR gen *NRAMP1* dan ekspresi protein NRAMP1 didapat pada kelompok perawat dengan varian TGTG+/+ adalah 73,75%, varian TGTG+/del adalah 61,62%, dan varian TGTGdel/del adalah 61,50% dengan nilai $p=0,008$ ($p<0,05$). Sedangkan hasil pada kelompok penderita TB paru dengan varian TGTG+/+ adalah 70,20%, varian TGTG+/del adalah 54,00%, dan varian TGTGdel/del adalah 43,40% dengan nilai $p=0,000$. Hal ini menunjukkan bahwa varian TGTG+/+, TGTG+/del, dan TGTGdel/del genotip 3'UTR sangat mempengaruhi ekspresi protein NRAMP1 pada perawat dan penderita TB paru secara bermakna ($p<0,05$). Jadi ekspresi protein NRAMP1 yang meningkat atau menurun pada perawat dan penderita TB paru sangat dipengaruhi oleh varian TGTG+/+, TGTG+/del, dan TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1*.

Hasil analisis perbedaan antara varian genotip INT4 gen *NRAMP1* dan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat dengan varian G/G adalah 69,23%, varian G/C adalah 73,33%, dan varian C/C adalah 0%, dengan $p=0,592$ ($p>0,05$). Demikian pula hasil analisis perbedaan pada kelompok penderita TB paru dengan varian G/G adalah 58,46%, varian G/C adalah 82,00%, dan varian C/C adalah 0%, dengan $p=0,125$ ($p>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi protein NRAMP1 terhadap varian G/G, G/C,

C/C genotip INT4 baik pada perawat maupun pada penderita TB paru tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Jadi ekspresi protein NRAMP1 yang meningkat atau menurun pada perawat maupun pada penderita TB paru tidak dipengaruhi oleh varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1*.

6.5 Hasil uji Anova interaksi dua faktor antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; dan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru

Hasil analisis univariat/Anova interaksi dua faktor menganalisis interaksi varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat. Berdasarkan hasil analisis output pada model, sebanyak 73,63% tidak dapat dijelaskan oleh model, berarti tidak ada interaksi dari masing-masing varian genotip gen *NRAMP1* yang dapat mempengaruhi ekspresi protein NRAMP1. Jadi varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* berdiri sendiri-sendiri dalam mengekspresikan protein NRAMP1 pada kelompok perawat.

Demikian pula hasil analisis univariat/Anova interaksi dua faktor menganalisis interaksi antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C

genotip INT4 gen *NRAMP1* dengan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok penderita TB paru. Berdasar hasil analisis output pada model, sebanyak 64,86% tidak dapat dijelaskan oleh model, maka tidak ada interaksi dari masing-masing varian genotip gen NRAMP1 yang dapat mempengaruhi ekspresi protein NRAMP1. Jadi varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* berdiri sendiri-sendiri dalam mengekspresi protein NRAMP1 pada kelompok penderita TB paru.

6.6 Hasil analisis korelasi *Spearman* antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; dan varian G/G, G/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok Perawat dan kelompok penderita TB paru

6.6.1 Hasil analisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* pada kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru

Berdasarkan hasil korelasi *Spearman*, hubungan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok perawat pada varian G/G adalah +0,425**; varian G/A adalah -0,425**; sedangkan varian A/A tidak ada pada perawat. Kesimpulan yang dapat diambil untuk varian G/G genotip D543N meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 lemah (<0,5) dan bermakna p=0,004

($p < 0,05$). Varian G/A genotip D543N menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($< 0,5$) dan bermakna $p = 0,004$ ($p < 0,05$).

Pada kelompok penderita TB paru, varian G/G genotip D543N adalah $+0,519^{**}$; varian G/A adalah $-0,335^{**}$; dan varian A/A adalah $-0,336$, sehingga dapat disimpulkan pada kelompok penderita TB paru untuk varian G/G genotip D543N meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 kuat ($\geq 0,5$) dan bermakna $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Varian G/A genotip D543N menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($< 0,5$) dan bermakna $p = 0,005$ ($p < 0,05$). Varian A/A genotip D543N menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($< 0,5$) dan bermakna $p = 0,005$ ($p < 0,05$).

Jadi pada varian G/G genotip D543N gen *NRAMP1* dapat meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 tinggi, baik pada perawat dan penderita TB paru, sedangkan varian G/A dan varian A/A genotip D543N gen *NRAMP1* menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah dan bila dipahami bahwa varian A/A genotip D543N terjadi ditandai dengan adanya perubahan *nonconservative single-base* penggantian pada kodon 543, di mana penggantian itu menyebabkan perubahan asam aspartat menjadi asparagin. Namun karena varian A/A genotip D543N angka kejadian pada penderita TB paru masih rendah hanya 6 orang di antara 69 orang penderita TB paru, sehingga varian A/A genotip D543N gen *NRAMP1*, tidak dapat dijadikan sebagai petanda kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis paru.

6.6.2 Hasil analisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru

Berdasarkan hasil korelasi *Spearman* pada kelompok perawat di dapat hubungan ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/+ genotip 3'UTR adalah +0,425**; varian TGTG+/del genotip 3'UTR adalah -0,448**; dan varian TGTGdel/del genotip 3'UTR adalah -0,125. Kesimpulan yang dapat diambil untuk varian TGTG+/+ genotip 3'UTR meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) dan bermakna $p=0,004$ ($p<0,05$). Varian TGTG+/del genotip 3'UTR menurunkan ekspresi protein NRAMP1 kuat ($\geq 0,5$) dan bermakna $p=0,003$ ($p<0,05$). Varian TGTGdel/del genotip 3'UTR menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) dan tidak bermakna $p=0,425$ ($p>0,05$).

Hasil korelasi *Spearman* pada kelompok penderita TB paru untuk varian TGTG+/+ genotip 3'UTR adalah +0,519**; varian TGTG+/del genotip 3'UTR adalah -0,091; dan TGTGdel/del genotip 3'UTR adalah -0,490**, sehingga dapat disimpulkan pada kelompok penderita TB paru untuk varian TGTG+/+ genotip 3'UTR meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 kuat ($\geq 0,5$) dan bermakna $p=0,000$ ($p<0,05$). Varian TGTG+/del genotip 3'UTR menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) dan tidak bermakna $p=0,445$ ($p>0,05$). Varian TGTGdel/del genotip 3'UTR menurunkan ekspresi protein NRAMP1 kuat ($\geq 0,5$) dan bermakna $p=0,000$ ($p<0,05$).

Jadi varian TGTG+/+ genotip 3'UTR gen *NRAMP1* dapat meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 tinggi, baik pada perawat dan penderita TB paru, sedangkan pada varian TGTG+/del dan TGTGdel/del genotip 3'UTR, dapat menurunkan ekspresi protein NRAMP1 baik pada perawat dan penderita TB paru dan bila dipahami bahwa varian TGTGdel/del genotip 3'UTR terjadi ditandai dengan adanya deleksi empat basa TGTG pada

kodon 543 di exon 15, di mana mutasi itu menyebabkan penurunan ekspresi protein NRAMP1 secara bermakna, sehingga varian TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* dapat dijadikan sebagai petanda kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis paru.

Namun yang masih perlu dijelaskan adalah mengapa varian TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* dapat mempengaruhi translasi mRNA *NRAMP1*, sehingga menghasilkan kadar protein NRAMP1 yang jauh lebih rendah dibanding keadaan normal (pada varian TGTG+/+ genotip 3'UTR gen *NRAMP1*).

Bila diperhatikan, mayoritas mRNA eukaryota mengandung "ekor poli-A" (*polyA-tail*) berupa rangkaian nukleotida A (adenine) sepanjang sekitar 250 nukleotida. Adanya ekor poli-A ini dapat membedakan jenis mRNA dari jenis RNA lain seperti tRNA dan rRNA.

Penambahan ekor poli-A ini dikatalisis oleh enzim khusus yang disebut poli-A polimerase (PAP), dan dilaksanakan pasca transkripsi di saat mRNA masih dalam bentuk pra-mRNA, yaitu bentuk di mana intron belum dihilangkan melalui proses putus-sambung (*splicing*). Penambahan ekor poli-A ternyata memerlukan urutan nukleotida khusus di daerah 3'UTR, yaitu urutan AATAA yang diikuti 23-24 nukleotida ke arah hilir (*down stream*, ke arah ujung 3') oleh urutan lain yang mengandung banyak nukleotida G dan T, sehingga disebut "urutan kaya GT" (*GT-rich sequences*) (Weaver 2002).

Mutasi pada ke dua urutan tersebut memberikan hasil yang berbeda. Mutasi pada urutan AATAA akan menghasilkan mRNA tanpa ekor poli-A, sedangkan mutasi pada urutan kaya GT akan menghasilkan mRNA dengan ekor poli-A yang pendek, yaitu hanya sekitar 10 nukleotida (Weaver, 2002).

Dalam sitoplasma mRNA akan didegradasi oleh enzim 3'eksonuklease yang dimulai dari ujung 3' ekor poli-A. Selama ekor poli-A belum habis terdegradasi, mRNA masih utuh, sehingga masih bisa menghasilkan protein. Namun pada suatu saat ekor poli-A habis terdegradasi, dan secara bersamaan eksonuklease akan merusak mRNA dan menghentikan produksi protein. Dengan demikian panjang ekor poli-A akan mempengaruhi seberapa lama mRNA akan menghasilkan protein. Bila ekor poli-A utuh (250 nukleotida), maka produksi protein akan cukup banyak sebelum mRNA terdegradasi. Sebaliknya, apabila ekor poli-A pendek, protein yang dihasilkan akan jauh lebih sedikit.

Dalam kasus polimorfisme gen *NRAMP1* yang ditemukan pada varian TGTGdel/del genotip 3'UTR. Delesi 4 nukleotida ini (TGTG) terjadi di daerah kaya GT 3'UTR. Hal ini akan menyebabkan urutan kaya GT tak berfungsi, sehingga akan menghasilkan mRNA dengan ekor poli-A yang sangat pendek, yaitu hanya 10 nukleotida (perlu diingat: urutan AATAA masih utuh dan berfungsi). Karena varian TGTGdel/del genotip 3'UTR hanya menghasilkan mRNA dengan ekor poli-A yang amat pendek, maka pada polimorfisme ini mRNA akan cepat terdegradasi, sehingga protein NRAMP1 yang akan dihasilkan hanya sedikit.

Keadaan yang sejenis, juga dijumpai pada penyakit Thalassemia β dimana adanya mutasi pada 3'UTR mengakibatkan protein globin β β tak terbentuk, sehingga terjadi suatu keadaan yang disebut Thalassemia β^0 (β zero) (Suryohudoyo, 2000).

6.6.3 Hasil analisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok perawat dan kelompok penderita TB paru

Berdasarkan hasil korelasi *Spearman* di dapat hubungan ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G genotip INT4 adalah -0,092; varian G/C adalah 0,092, sedangkan varian C/C tidak ada pada perawat. Kesimpulan yang dapat diambil untuk varian G/G genotip INT4 adalah akan menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) dan tidak bermakna $p=0,557$ ($p>0,05$). Varian G/C genotip INT4 meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) dan tidak bermakna $p=0,557$ ($p>0,05$).

Hasil korelasi *Spearman* pada kelompok penderita TB paru untuk varian G/G genotip INT4 adalah -0,245*; varian G/C adalah +0,245*; dan varian C/C tidak ada pada kelompok penderita TB paru, sehingga dapat disimpulkan untuk varian G/G genotip INT4 menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) dan bermakna $p=0,042$ ($p<0,05$). Varian G/C genotip INT4 meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 lemah ($<0,5$) dan bermakna $p=0,042$ ($p<0,05$).

Jadi pada varian G/G genotip INT4 gen *NRAMP1* dapat menurunkan ekspresi protein NRAMP1 lemah, baik pada perawat dan penderita TB paru, sedangkan varian G/C genotip INT4 gen *NRAMP1* meningkatkan ekspresi protein NRAMP1 lemah baik pada perawat dan penderita TB paru. Hal ini bila dipahami, bahwa terjadi genotip INT4 ditandai dengan adanya penggantian nukleotida tunggal di dalam urutan kodon 469+14G/C pada intron, yang artinya penggantian tersebut terjadi pada kodon 469+14 di mana basa

Guanine berganti menjadi basa *Cytosine* pada daerah intron. Pengertian intron dari suatu gen dinyatakan merupakan daerah yang tidak memiliki urutan nukleotida yang dapat disalin menjadi protein, sehingga genotip INT4 yang tidak mempengaruhi ekspresi protein NRAMP1 di sitoplasma makrofag alveolar paru ternyata benar adanya. Sehingga varian genotip INT4 tidak dapat disimpulkan sebagai varian gen *NRAMP1* sebagai penyebab kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis paru.

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Tidak terdapat perbedaan distribusi frekuensi pada varian G/G, G/A, A/A genotip D543N antara kelompok penderita TB paru dan perawat; terdapat perbedaan distribusi frekuensi pada varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* antara kelompok penderita TB paru dan perawat; tidak terdapat perbedaan pada varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* antara kelompok penderita TB paru dan perawat.
2. Terdapat perbedaan rata-rata ekspresi protein *NRAMP1* pada kelompok perawat yang lebih tinggi daripada kelompok penderita TB paru.
3. Terdapat perbedaan ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; namun tidak terdapat perbedaan pada varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada perawat.
4. Terdapat perbedaan ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N dan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; namun tidak terdapat perbedaan dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada penderita TB paru.
5. Tidak terdapat interaksi antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C genotip INT4 gen

NRAMP1, karena sebanyak 73,63% tidak dapat dijelaskan oleh model pada perawat.

6. Tidak terdapat interaksi antara ekspresi protein *NRAMP1* dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N; varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR; varian G/G, G/C genotip INT4 gen *NRAMP1*, karena sebanyak 64,86% tidak dapat dijelaskan oleh model pada penderita TB paru.
7. Terdapat hubungan bermakna antara ekspresi protein *NRAMP1* meningkat lemah pada varian G/G genotip D543N dan varian TGTG+/+ genotip 3'UTR; menurun lemah pada varian G/A genotip D543N dan varian TGTG+/del genotip 3'UTR, namun tidak ada hubungan bermakna pada varian TGTGdel/del genotip 3'UTR, varian G/G genotip INT4, dan varian G/C genotip INT4, sedangkan varian A/A genotip D543N dan varian C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* tidak ada pada perawat.
8. Terdapat hubungan bermakna antara ekspresi protein *NRAMP1* meningkat kuat pada varian G/G genotip D543N, varian TGTG+/+ genotip 3'UTR, dan lemah pada varian G/C genotip INT4, namun menurun lemah pada varian G/A, A/A genotip D543N, dan varian G/G genotip INT4, tapi menurun kuat pada varian TGTGdel/del genotip 3'UTR, sedangkan tidak terdapat hubungan bermakna pada varian TGTG+/del genotip 3'UTR pada penderita TB paru.

Sehingga disimpulkan,

Distribusi frekuensi varian TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* lebih banyak terjadi pada penderita TB paru daripada perawat. Ekspresi protein NRAMP1 menurun kuat pada varian TGTGdel/del genotip 3'UTR pada penderita TB paru secara bermakna. Varian TGTGdel/del genotip 3'UTR adalah varian genotip 3'UTR gen *NRAMP1* yang mengalami delesi TGTG. Delesi TGTG pada daerah 3'UTR dapat menyebabkan gangguan pada proses translasi yang disandikan oleh mRNA menjadi protein NRAMP1 di sitoplasma makrofag alveolar paru. Gangguan proses translasi disebabkan adanya *polyadenylation signal*, sehingga mengakibatkan terjadi kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis paru.

7.2 Saran

Temuan ini perlu dilanjutkan dengan,

1. Menganalisis susunan DNA varian TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* sebagai *gold standard*, sehingga dapat dilakukan studi banding dengan hasil PCR-RFLP.
2. Membuat *probe* (gen marker) dari varian TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* sebagai petanda diagnostik untuk mengidentifikasi adanya kerentanan terhadap penyakit tuberkulosis paru, sehingga yang bersangkutan dapat diberikan vaksinasi lanjutan setelah BCG.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman A, and Pober JS., 1994. Cellular and Molecular Immunology. Second ed. Philadelphia: WB Saunders Co.; p: 327.
- Abel L, Sánchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, Skamene E, et al ,1998. Susceptibility to leprosy is linked to the human *NRAMP1* gene. *J Infect Dis* 177:133–145 [[PubMed](#)].
- Aditama Y, 2000, Priyanti. Tuberkulosis; diagnosis, terapi dan masalahnya. Lab Mikrobiologi RSUP Jakarta.
- Barnes,P., R. L. Modlin, and J. J. Ellner. 1994. T-cell responses and cytokines. *In* B. Bloom, editor. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. ASM PAveolitic in Active Pulmonary Tuberculosis. *J of Infect Dis.* 1996; 173ress, Washington, DC. 417-435.
- Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KPWJ, Whittle HC, Hill AVS, 1998. Variation in the *NRAMP1* gene is associated with susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 338: 640–644
- Blackwell JM, Goswani T, Carlton AWE, Dean S, Natalie P, Jacqueline KW, Susan S, E Nancy M, Christopher SP, Hiba M, and Muntaser I, 2001. *SLC11A1* (Formerly *NRAMP1*) and disease resistance. *Cellular Microbiology.* Vol.3 Issue 12 Page 773
- Brennan PJ and Draper P.,1994. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*. Dalam: Bloom BR. Penyunting Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control.Washington DC: ASM Press. pp: 271-80.
- Buschman E. and Emil Skamene, 2001. From *Bcg/Lsh/Ity* to *Nramp1*: Three Decades of Search and Research. Vol. 29, Issue 4, Part 2, 471-473
- Buu NT, Cellier M, Gros P, Schurr E ,1995. Identification of a highly polymorphic length variant in the 3'UTR of *NRAMP1*. *Immunogenetics* 42:428–429 [[PubMed](#)].
- Camstock GW, 1978. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proplit study. *Am Rev Resp Dis*; 117:621
- Cellier M, Govoni G, Vidal S, et al, 1994. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med*; 180:1741
- Cervino ACL, Lakiss S, Sow O, Hill AVS, 2000. Allelic association between the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in Guinea-Conakry. *Ann Human Genet* 64:507–512.

- Chan J, Kauffmann HE., 1994. Immune Mechanisms of Protection. Dalam Bloom BR. *Penyunting Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Washington DC: ASM Press.; pp: 389-416.
- Dannenber AM. 1994, Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis: an Interplay of Tissue-damaging and Macrophage-Activating Immune Response-Dual mechanism That Control Bacillary Multiplication. Dalam Bloom BR. *Penyunting Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Washington DC: ASM Press.; pp: 437-50.
- Delgado JC, Baena A, Thim S, and Goldfeld AE, 2002. Ethnic-Specific Genetic Associations with Pulmonary Tuberculosis. *The Journal of Infectious Disease* : 186:1463-8
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2002. *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberculosis*. Depkes RI, Jakarta.
- Estrada-Chavez C, Pereira-Suarez AL, Meraz MA, Arriaga C, Garcia-Carranca A, Sanchez-Rodriguez C, Mancilla R, 2001. High-level expression of NRAMP1 in peripheral blood cells and tuberculous granulomas from Mycobacterium bovis-infected bovines. *Infect Immun* 69:7165–7168
- Gao PS, Fujishima S, Mao XQ, Remus N, Kanda M, Enomoto T, *et al*, 2000. Genetic variants of *NRAMP1* and active tuberculosis in Japanese populations. International Tuberculosis Genetics Team. *Clin Genet* 58: 74–76
- Grosset J, 1990. Bacteriologic basis of short-course chemotherapy for tuberculosis. *Clin Chest. Med.* 1:231-241
- Grosset J, Truffpt-Pernot, Cambau E, 2000. Bacteriology of tuberculosis. In: (Reichmann LB and Hershfield ES, eds.) *Tuberculosis – A comprehensive international approach*. 2nd edition. Marcel Dekker, Inc, pp 157-185
- Gyatko MR and Toews GB, 1993. Immunology of the aging lung. *Clin.Chest Med.* 14: 379-391
- Kaufmann, S. H., and I. E. Flesch, 1988. The role of T cell-macrophage interactions in tuberculosis. *Springer. Semin. Immunopathol.* 10: 337-358 [[Medline](#)].
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U. & Andrews, N. C., 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**, 285–297.
- Hirsh CS et all. ,1996. Apoptosis and T Cell Hyporesponsiveness in Pulmonary Tuberculosis. *J of Infect Dis.*; 173: 1267-72.

- Kaplan, 2002. J. Mechanisms of cellular iron acquisition: another iron in the fire. *Cell* **111**, 603–606
- Kim JH, Lee SY, Lee SH, Sin C, Shim JJ, In KH, Yoo SH, Kang KH, 2003. NRAMP1 genetic polymorphisms as a risk factor of tuberculous pleurisy. *INT J TUBERC LUNG* 7(4): 370-375
- Kresno, SB., 1998. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi ketiga. Fak Kedokteran UI. pp: 89-92
- Liu J, Fujiwara TM, Buu NT, et al. ,1995. Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene. *Am J Hum Genet*; 56:845–853
- Liu W, Cao WC, Zhang CY, et al. ,2004. VDR and *NRMAP1* gene polymorphisms in susceptibility to pulmonary tuberculosis among the Chinese Han population: a case-control study. *Int J Tuberc Lung Dis*; 8:428–434
- Mertaniasih NM, 2005. *Diagnosis Tuberkulosis Masa Kini dan akan datang, peran pada Klinik dan Program Pengendalian*. Simposium TB *TDC UNAIR*
- Muladno, 2002. *Seputar teknologi rekayasa genetika*. Pustaka Wrausaha Muda dan USESE Foundation, Bogor.
- NBII site is developed and maintained by the Consolidated Safety Services, Inc. Biological Disciplines [<http://www.nbio.gov>, 9/9/2005]
- NCBI Bacterial Genomes ftp site [<http://www.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/>]
- [Online 'Mendelian Inheritance in Man' \(OMIM\) 105830](#)
- Orme I, Cooper A. 1999, Cytokine/Chemokine Cascades in Immunity to Tuberculosis. *J Immunol Today*.; 179: 945-53.
- P2M PLP. 1997, *Pedoman Penyakit Tuberkulosis dan Penanggulangannya*. DepKes RI.
- Pauwel G and Solana R, 1997. Immunosenescence. *Immunol. Today*. 18: 514-516
- Ratgono A, Kushandoyo S, Adhor D, Muktyo W., Sriwaras, A. Djaeli, Ansarul F, 2005. *Program Penanggulangan Tuberkulosis Di Jawa Timur*. Simposium TB. Tropical Disease Center (TDC) UNAIR
- Ratnawati P. 2000, Tuberkulosis Paru pada Orang Tua. *J Respirologi Kedokteran*. ; 20 (1): 38-43.

- Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, 1995. Pocked companion to pathologic basis of disease, S/E by WB Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania
- Ryu S, Park YK, Bai GH, Kim SJ, Park SN, Kang S, 2000. 3'UTR polymorphisms in the *NRAMP1* gene are associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 577–580
- Ryan JL., 1997. Bacterial Diseases, dalam: Stites DP, Terr AI and Parsow TG. Penyunting Medical Immunology. 9th ed. London: Prentice Hall Inc. pp: 691-92.
- Schaible UE, Sturgill-Koszycki, S, Schlesinger, PH & Russell, DG,1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J. Immunol.* **160**, 1290–1296
- Schaible, U., Collins, H. & Kaufmann, SHE. , 1999. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv. Immunol.* **71**, 267–377
- Schaible, U. E., Collins, H. L., Priem, F. & Kaufmann, S. H. E. , 2002. Correction of the iron overload defect in β -2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *J. Exp. Med.* **196**, 1507–1513
- Schwander SK et al., 1996. T Lymphocytic and Immature Macrophage Alveolitic in 126772.
- Shaw MA, Collins A, Peacock CS, Miller EN, Black GF, Sibthorpe D, et al, 1997. Evidence that genetic susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* in a Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes *NRAMP1* and *TNFA*. *Tuberc Lung Dis* 78: 35–45
- Slayer AA, Whitt DD. Bacterial Pathogenesis: a Molecular Approach. Washington DC: ASM Press. 1994; pp: 307-19.
- Soborg C, Andersen AB, Madsen HO, et al. ,2002. Natural resistance-associated macrophage protein 1 polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *J Infect Dis.* 186:517–521
- Sudre P., tem Dam G, Kochi A.,1992. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull WHO* ; 70:149-159
- Suryanto, 2003. Melihat keanekaragaman organism melalui beberapa teknik genetika molekuler.
- Suryohudoyo P, 2000. Kapita Selekt Kedokteran Molekuler, 17-30, CV SAGUNG SETO Jakarta.

- The BAL Cooperative Group Steering Committee, 1990. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individual, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups, *Am Rev Respir Dis*. 141: S169-S202
- Ulrichs ES, Kaufmann SHE, 2004. Cell-Mediated Immune response. In: Tuberculosis. Rom WN, Garay SM, 2nd edition. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 251-334
- Vidal S, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P, 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell*; 73:469
- Vidal S, Tremblay M, Govoni G, et al, 1995. The *Ity / Lsh / Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J Exp Med*; 182:655–66
- Weigle WO, 1993. The effect of aging on cytokine release and associated immunologic functions. *Immunol. Allergy Clin, North, amer*. 13: 551-569
- Weaver RF, 2002. *Molecular Biology*, 474-490, Mc Graw-Hill, New York, USA
- WHO Report, 2002. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing, *WHOCDSTB* ; 295 : 21
- WHO Report, 2007. Global Tuberculosis Control.
- Zhang WH, Shao L, Weng X, Hu Z, Jin A, Chen S, Pang M, and Chen ZW, 2005. Variants of the Natural Resistance-Associated Macrophage Protein1 Gene (*NRAMP1*) are associated with Severe Forms of Pulmonary Tuberculosis. *Clinical Infection Disease*;40:1232-1223.

LAMPIRAN 1. Hasil Isolasi Perawat dan Penderita TB paru**A. Hasil Isolasi Perawat**

NO	KODE	SEX	UMUR (18- 55)	BT A (-)	KULT UR (-)	RON TG (N)	HB (11- 17)	GDA <200	BUN (4,6- 23)	CREAT (<1,5)	HIV (-)	FL (-)	PPD (>10)
1	P2	P	37	(-)	(-)	N	15,2	90	9	0,65	(-)	(-)	10X12
2	P6	P	39	(-)	(-)	N	12,1	110	6	0,89	(-)	(-)	12x12
3	P8	P	50	(-)	(-)	N	16,0	78	10	0,92	(-)	(-)	15x10
4	P9	P	38	(-)	(-)	N	16,1	93	13	1,04	(-)	(-)	12x13
5	P11	P	53	(-)	(-)	N	11,6	79	14	0,98	(-)	(-)	14x14
6	P13	P	49	(-)	(-)	N	11,9	77	10	0,86	(-)	(-)	18x14
7	P14	L	38	(-)	(-)	N	12,6	100	10	0,98	(-)	(-)	21x23
8	P15	L	39	(-)	(-)	N	13,4	116	12	1,00	(-)	(-)	18x18
9	P16	L	37	(-)	(-)	N	12,8	110	11	0,78	(-)	(-)	28x18
10	P17	L	44	(-)	(-)	N	11,3	86	12	0,77	(-)	(-)	22x18
11	P18	P	34	(-)	(-)	N	12,5	79	16	1,03	(-)	(-)	15x15
12	P22	P	23	(-)	(-)	N	13,4	85	11	0,78	(-)	(-)	20x16
13	P23	P	51	(-)	(-)	N	13,9	78	12	1,00	(-)	(-)	33x27
14	P24	P	20	(-)	(-)	N	15,7	77	9	0,95	(-)	(-)	18x14
15	P26	P	46	(-)	(-)	N	12,6	86	11	0,85	(-)	(-)	39x35
16	P28	L	48	(-)	(-)	N	13,8	81	9	0,81	(-)	(-)	28x22
17	P32	L	28	(-)	(-)	N	16,1	82	13	1,08	(-)	(-)	21x18
18	P35	P	37	(-)	(-)	N	12,1	98	10	0,90	(-)	(-)	30x27
19	P36	P	42	(-)	(-)	N	13,3	84	8	0,75	(-)	(-)	27x27
20	P37	L	41	(-)	(-)	N	15,8	102	12	1,04	(-)	(-)	24x20
21	P39	P	54	(-)	(-)	N	10,8	97	13	1,00	(-)	(-)	12x12
22	P40	P	46	(-)	(-)	N	11,6	81	11	0,78	(-)	(-)	20x15
23	P42	P	45	(-)	(-)	N	15,7	90	8	0,66	(-)	(-)	53x48
24	P43	P	53	(-)	(-)	N	13,5	87	22	1,20	(-)	(-)	18x20
25	P45	L	35	(-)	(-)	N	14,8	99	9	1,11	(-)	(-)	36x28
26	P46	P	43	(-)	(-)	N	11,3	89	19	1,16	(-)	(-)	20x15
27	P47	L	42	(-)	(-)	N	13,5	91	16	1,07	(-)	(-)	22x18
28	P48	P	25	(-)	(-)	N	11,3	91	15	1,08	(-)	(-)	35x35
29	P54	P	53	(-)	(-)	N	13,2	91	15	1,00	(-)	(-)	12x15
30	P56	P	20	(-)	(-)	N	12,3	80	12	1,07	(-)	(-)	10x11
31	P57	L	31	(-)	(-)	N	15,1	86	11	1,00	(-)	(-)	26x21
32	P58	L	34	(-)	(-)	N	16,7	108	9	0,90	(-)	(-)	15x20
33	P60	P	37	(-)	(-)	N	15,5	86	10	0,95	(-)	(-)	18x22
34	P61	L	41	(-)	(-)	N	14,2	87	10	0,92	(-)	(-)	20x22
35	P62	P	40	(-)	(-)	N	14,4	102	9	0,98	(-)	(-)	15x25
36	P65	P	33	(-)	(-)	N	11,5	78	10	0,95	(-)	(-)	10x15
37	P66	P	48	(-)	(-)	N	14,3	89	14	0,89	(-)	(-)	28x34
38	P68	L	29	(-)	(-)	N	16,1	97	12	0,79	(-)	(-)	10x12
39	P69	L	30	(-)	(-)	N	13,5	88	10,8	1,20	(-)	(-)	10x12
40	P70	P	48	(-)	(-)	N	11,9	86	10,7	1,01	(-)	(-)	10x12
41	P71	L	37	(-)	(-)	N	17,6	97	10	1,08	(-)	(-)	8x10
42	P74	L	52	(-)	(-)	N	15,8	88	13	1,10	(-)	(-)	18x18
43	P75	L	30	(-)	(-)	N	13,6	80	8,2	1,33	(-)	(-)	9x11

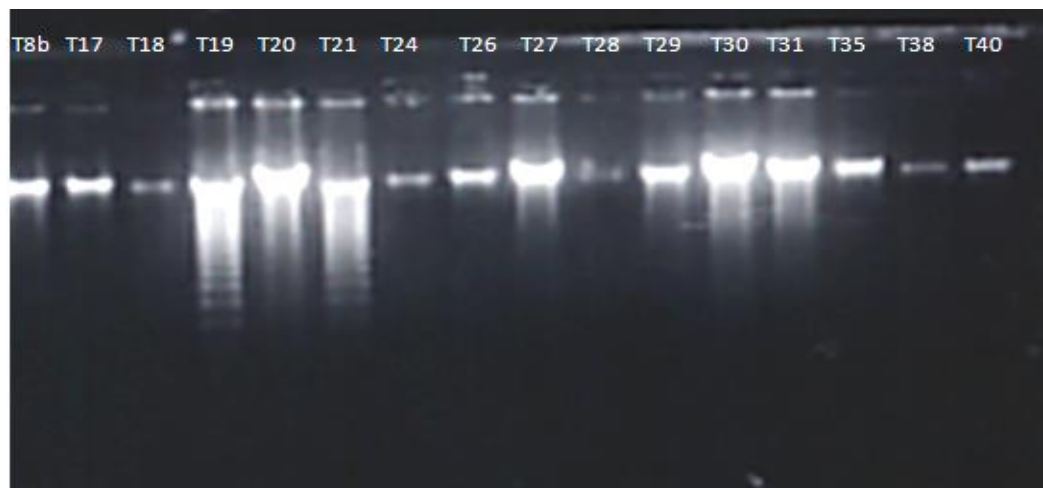
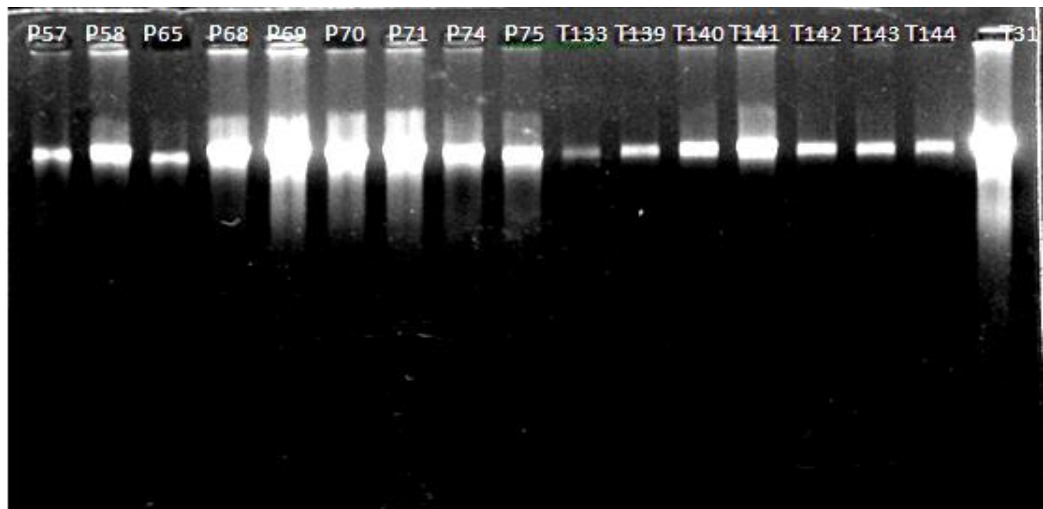
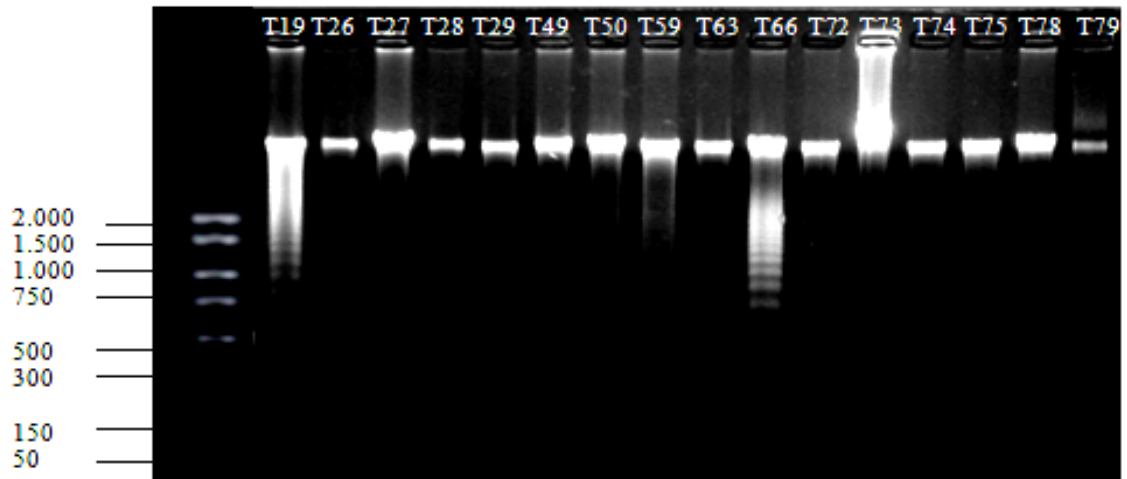
B. Hasil Isolasi Penderita TB paru

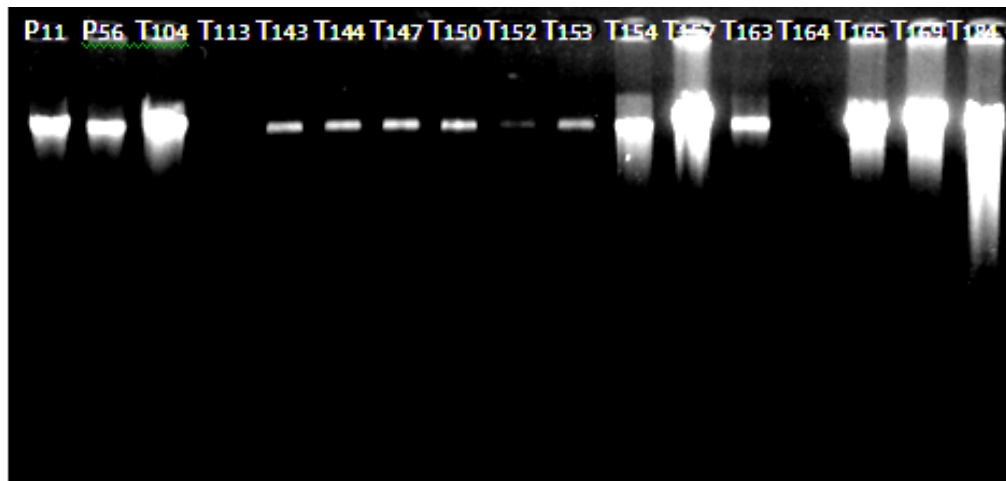
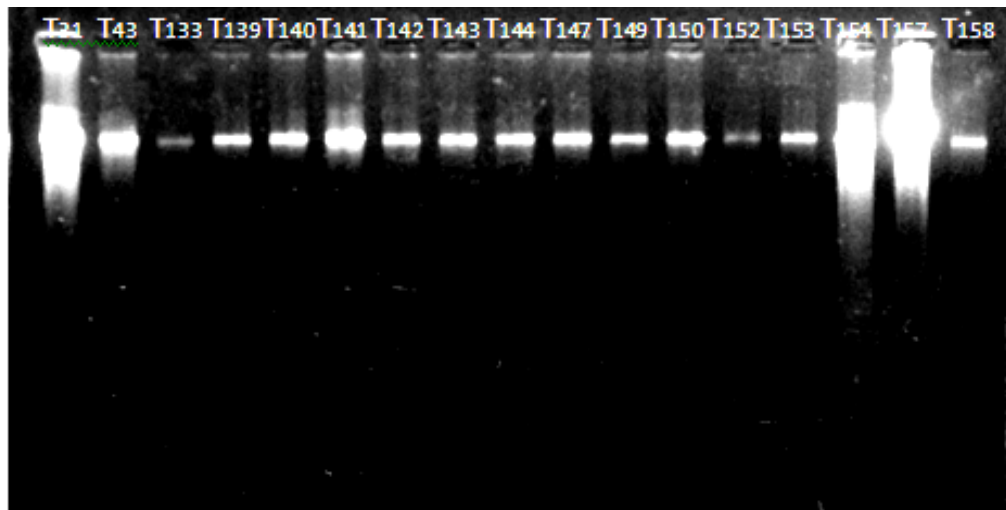
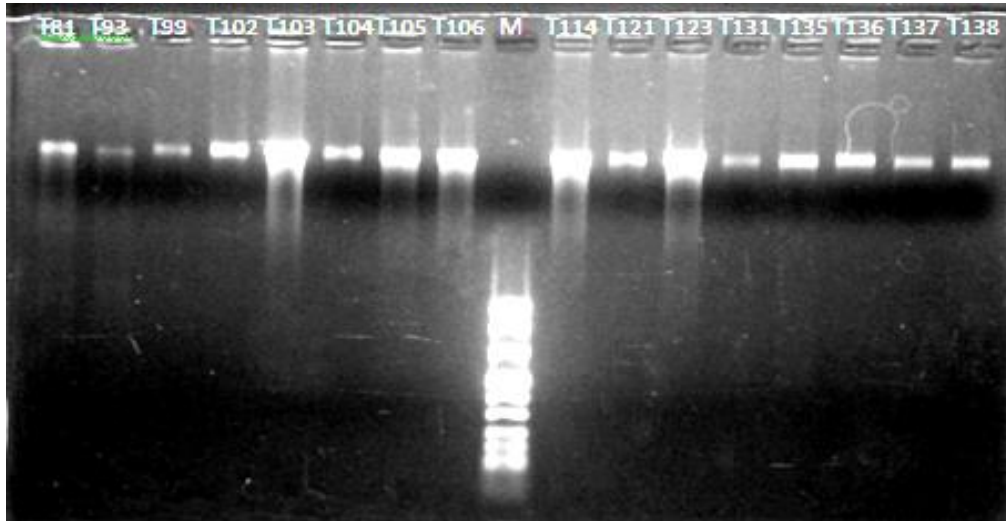
NO	KODE	SEX	UMUR (18- 50)	BTA (+)	KULTUR (TB) (+)	RONT (TB) (+)	HB (10-17)	GDA (<200)	BUN (4,6-23)	CREA (<1,5)	HIV (-)
1	T19	P	21	Pos 2	(+)	(+)	12,2	172	6,0	0,80	(-)
2	T26	P	35	Pos 1	(+)	(+)	12,0	127	9,4	0,89	(-)
3	T27	L	35	Pos 1	(+)	(+)	14,1	111	8,4	0,78	(-)
4	T28	P	18	Pos 3	(+)	(+)	9,9	105	5,6	0,61	(-)
5	T29	P	49	Pos 2	(+)	(+)	14,6	87	15,1	0,79	(-)
6	T30	P	32	Pos 1	(+)	(+)	11,6	150	9,8	0,78	(-)
7	T31	P	21	Pos 3	(+)	(+)	10,6	104	10,7	0,91	(-)
8	T35	L	24	Pos 3	(+)	(+)	13,5	79	9,3	0,81	(-)
9	T43	L	48	Pos 2	(+)	(+)	13,5	117	11,6	0,50	(-)
10	T45	L	25	Pos 3	(+)	(+)	11,3	144	6,7	0,86	(-)
11	T49	P	26	Pos 1	(+)	(+)	11,3	113	6,9	0,88	(-)
12	T50	L	25	Pos 2	(+)	(+)	12,3	96	6,6	0,71	(-)
13	T59	L	52	Pos 2	(+)	(+)	11,3	125	18,0	1,08	(-)
14	T63	L	34	Pos 1	(+)	(+)	11,2	183	12,8	1,00	(-)
15	T66	L	27	Pos 1	(+)	(+)	9,9	70	9,3	1,03	(-)
16	T72	P	31	Pos 2	(+)	(+)	15,9	121	12,0	0,79	(-)
17	T74	L	27	Pos 2	(+)	(+)	10,8	83	10,0	0,85	(-)
18	T76	L	32	Pos 2	(+)	(+)	15,0	181	11,0	1,01	(-)
19	T78	L	35	Pos 2	(+)	(+)	15,1	54	8,4	0,83	(-)
20	T79	L	45	Pos 2	(+)	(+)	13,4	76	7,0	0,85	(-)
21	T81	L	25	Pos 2	(+)	(+)	14,4	98	11,5	0,77	(-)
22	T93	L	26	Pos 3	(+)	(+)	12,6	112	8,5	1,35	(-)
23	T99	P	44	Pos 2	(+)	(+)	10,5	94	12,0	0,7	(-)
24	T103	P	28	Pos 2	(+)	(+)	13,0	67	14,0	0,95	(-)
25	T104	P	21	Pos 1	(+)	(+)	12,0	130	14,0	1,0	(-)
26	T105	L	40	Pos 2	(+)	(+)	14,3	45	20,0	1,14	(-)
27	T106	P	18	Pos 2	(+)	(+)	12,7	90	8,0	0,82	(-)
28	T114	L	36	Pos 2	(+)	(+)	14,0	80	9,0	0,88	(-)
29	T121	P	27	Pos 3	(+)	(+)	9,9	98	7,0	0,7	(-)
30	T123	L	28	Pos 2	(+)	(+)	15,9	77	12,0	0,90	(-)
31	T124	L	25	Pos 2	(+)	(+)	15,3	96	11,2	0,71	(-)
32	T126	P	53	Pos 2	(+)	(+)	16,1	87	9,7	0,76	(-)
33	T131	P	25	Pos 2	(+)	(+)	9,9	79	8,1	0,7	(-)
34	T133	L	40	Pos2	(+)	(+)	17,3	88	10,3	1,05	(-)
35	T134	P	47	Pos2	(+)	(+)	12,6	94	12,5	0,72	(-)
36	T135	P	21	Pos2	(+)	(+)	9,9	99	9,3	0,64	(-)
37	T136	L	30	Pos3	(+)	(+)	10,7	79	6,1	0,69	(-)
38	T137	P	45	Pos3	(+)	(+)	11,0	88	6,1	0,89	(-)
39	T138	L	42	Pos3	(+)	(+)	12,9	84	8,5	0,80	(-)
40	T139	P	19	Pos2	(+)	(+)	10,9	99	5,7	0,59	(-)
41	T140	P	20	Pos3	(+)	(+)	12,1	105	6,3	0,73	(-)
42	T141	P	25	Pos3	(+)	(+)	9,9	92	5,8	0,67	(-)
43	T142	P	19	Pos3	(+)	(+)	9,9	121	7,2	0,65	(-)
44	T143	P	28	Pos3	(+)	(+)	9,9	84	8,4	0,66	(-)
45	T144	L	28	Pos2	(+)	(+)	10,3	106	9,6	0,63	(-)
46	T146	P	38	Pos2	(+)	(+)	12,1	103	9,6	0,64	(-)
47	T147	L	30	Pos3	(+)	(+)	12,0	94	7,2	1,18	(-)
48	T149	L	31	Pos 2	(+)	(+)	16,8	71	11,9	0,94	(-)
49	T151	P	19	Pos 2	(+)	(+)	10,7	83	7,2	0,69	(-)
50	T152	P	36	Pos3	(+)	(+)	12,3	113	7,6	0,79	(-)
51	T153	L	25	Pos3	(+)	(+)	11,4	82	3,2	0,77	(-)
52	T154	L	40	Pos3	(+)	(+)	10,6	120	9,7	0,95	(-)
53	T155	P	29	Pos2	(+)	(+)	11,2	84	4,1	0,71	(-)
54	T156	L	44	Pos3	(+)	(+)	12,3	137	9,9	0,71	(-)
55	T159	L	45	Pos2	(+)	(+)	11,3	135	7,5	0,80	(-)

56	T160	P	22	Pos3	(+)	(+)	11,9	100	7,4	0,65	(-)
57	T161	L	31	Pos3	(+)	(+)	11,0	110	9,0	0,89	(-)
58	T164	L	24	Pos3	(+)	(+)	12,9	91	7,5	0,76	(-)
59	T167	L	49	Pos3	(+)	(+)	11,8	88	10,6	0,76	(-)
60	T172	P	25	Pos2	(+)	(+)	12,4	83	6,1	0,68	(-)
61	T173	L	19	Pos2	(+)	(+)	15,5	85	10	0,90	(-)
62	T174	L	47	Pos2	(+)	(+)	13,8	121	8,7	0,78	(-)
63	T175	P	46	Pos3	(+)	(+)	12,3	71	8,6	0,83	(-)
64	T176	L	35	Pos3	(+)	(+)	13,3	85	8,9	1,00	(-)
65	T177	L	48	Pos2	(+)	(+)	13,8	173	5,4	0,82	(-)
66	T179	L	37	Pos2	(+)	(+)	11,0	68	6,8	0,80	(-)
67	T180	P	37	Pos2	(+)	(+)	11,0	100	4,7	0,85	(-)
68	T181	P	26	Pos2	(+)	(+)	13,0	103	5,1	0,52	(-)
69	T182	P	25	Pos2	(+)	(+)	9,9	116	7,0	0,78	(-)
70	T183	P	27	Pos2	(+)	(+)	9,9	158	4,1	0,62	(-)
71	T184	L	27	Pos2	(+)	(+)	15,6	57	8,0	0,82	(-)
72	T186	p	35	Pos2	(+)	(+)	11,3	77	15,7	0,78	(-)

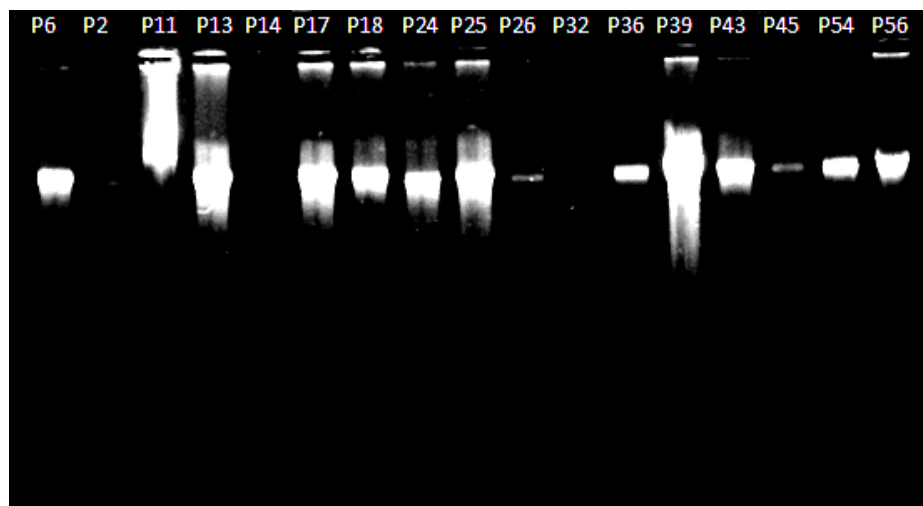
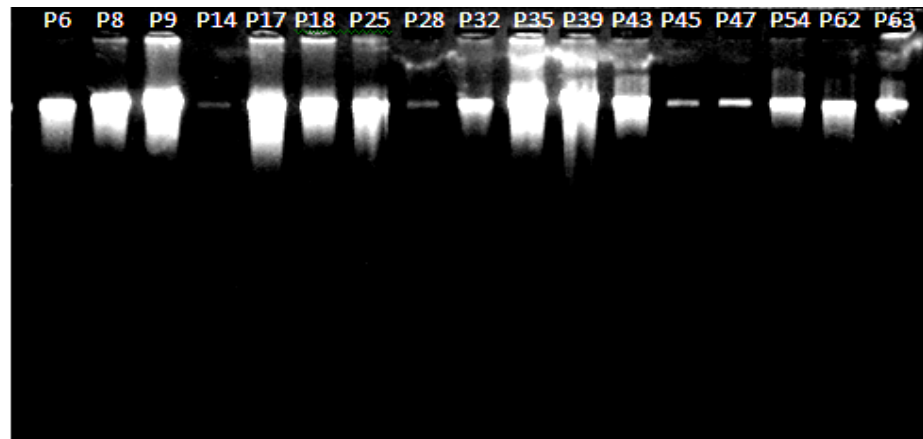
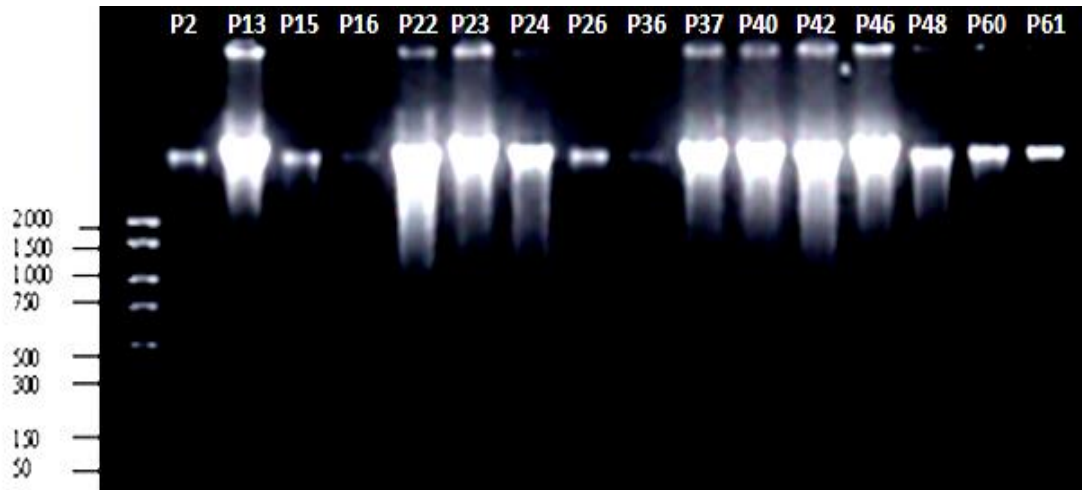
LAMPIRAN 2. Hasil Ekstraksi DNA Perawat dan Penderita TB paru

A. Hasil Ekstraksi 69 sampel DNA dari PBMC Penderita TB Paru



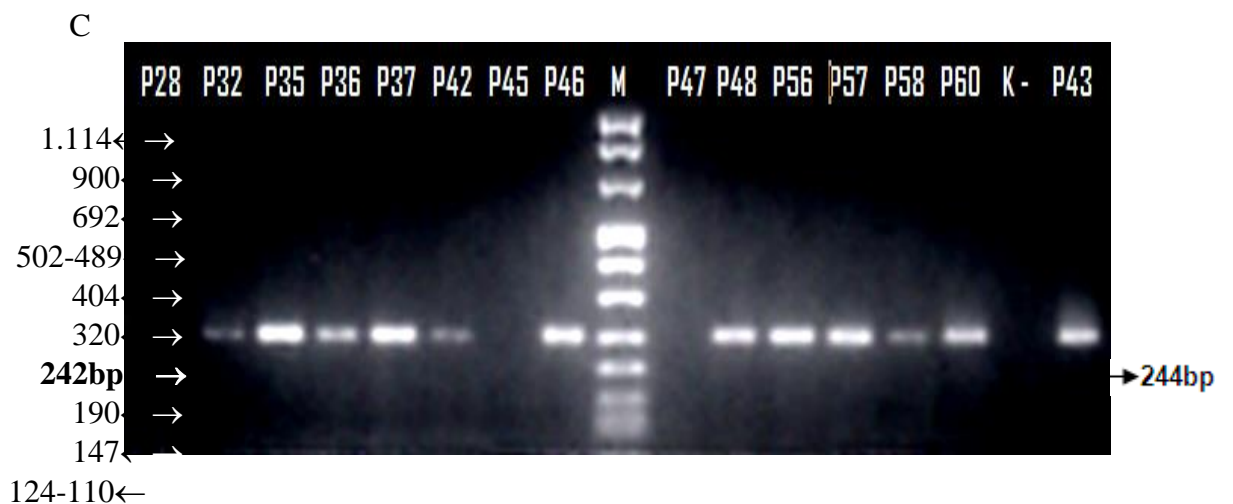
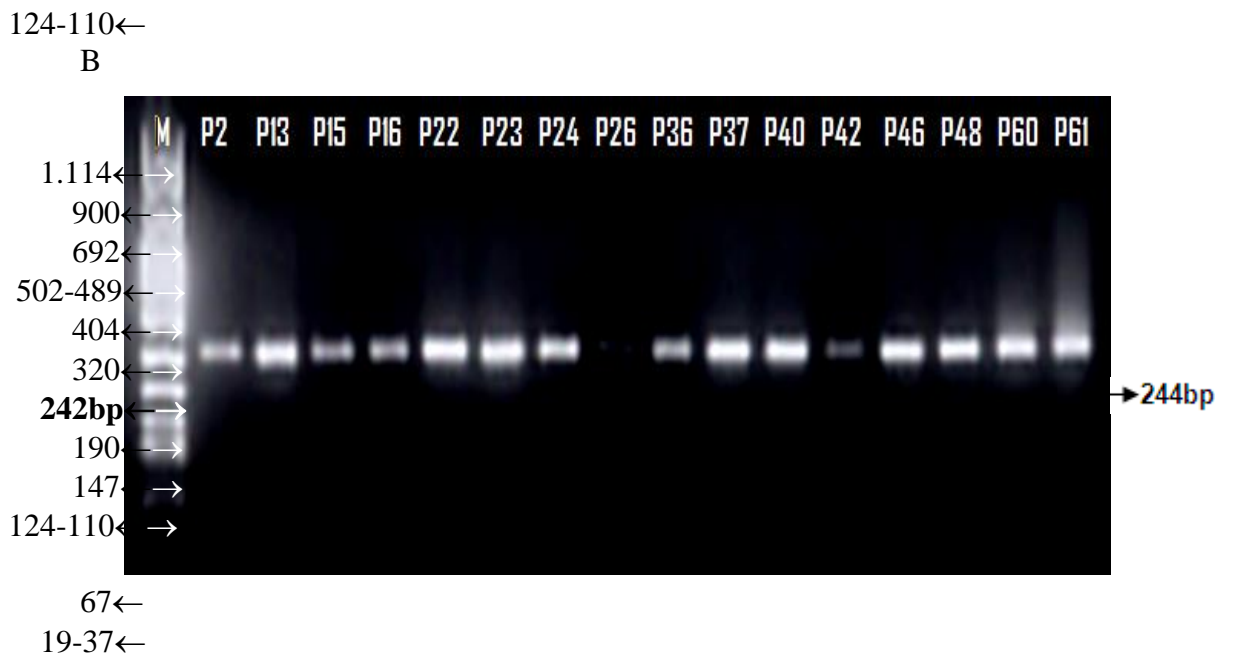
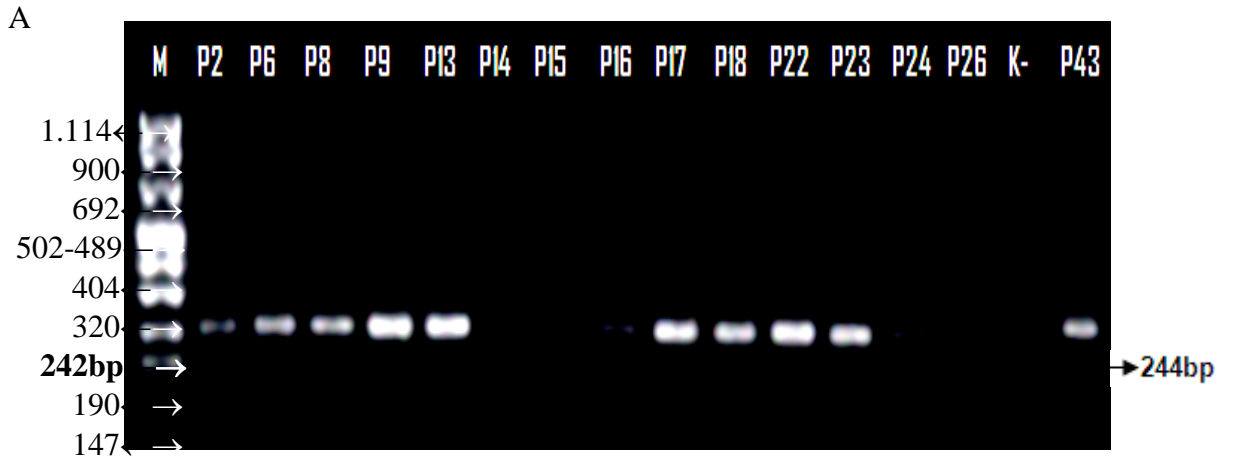


B. Hasil Ekstraksi 43 sampel DNA dari PBMC Perawat

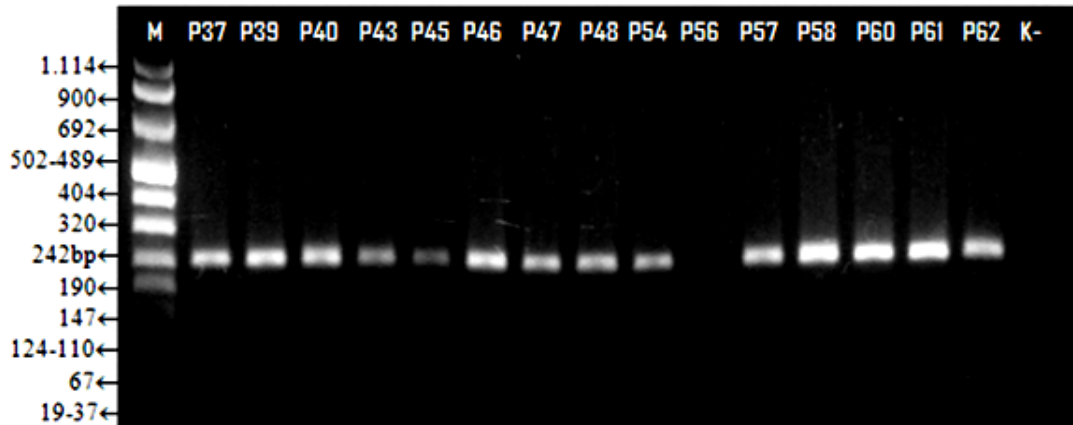


LAMPIRAN 3. Hasil Amplifikasi DNA Perawat dan Penderita TB paru dengan PCR pada regio D543N/3'UTR

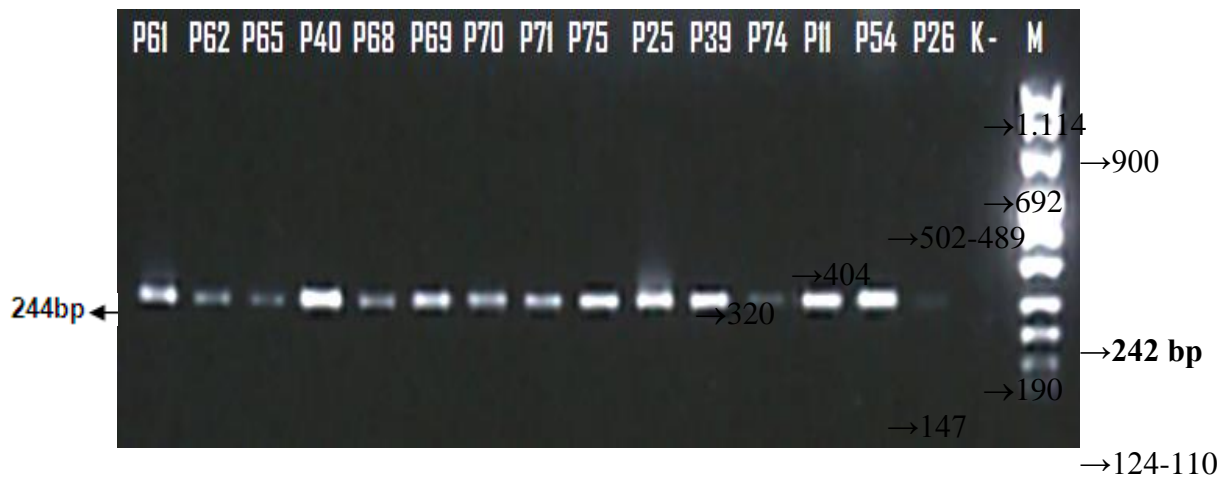
1. Hasil amplifikasi DNA genotip D543N/3'UTR dengan PCR dari hasil ekstraksi DNA perawat



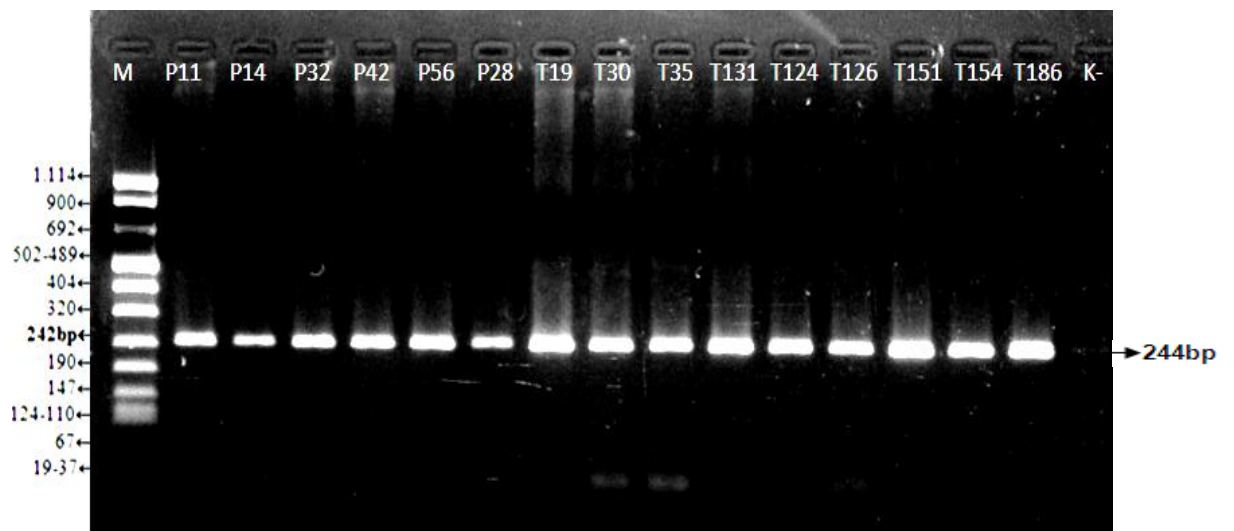
D



E

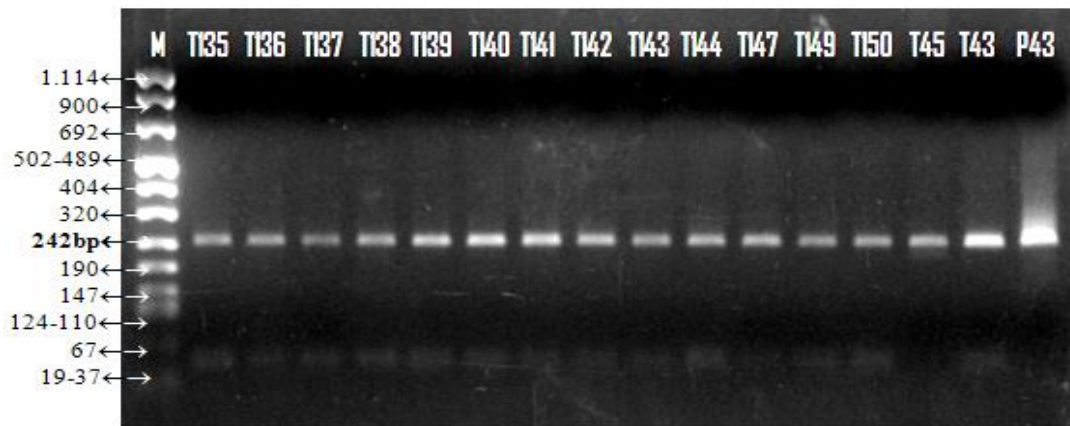
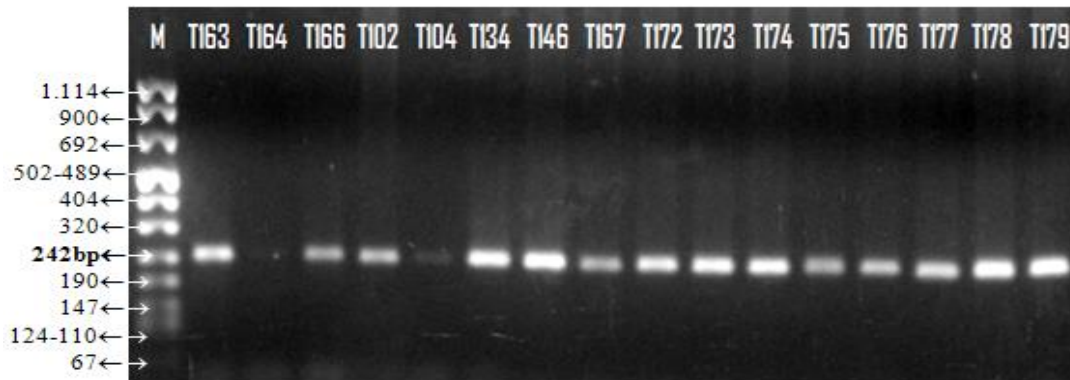


F

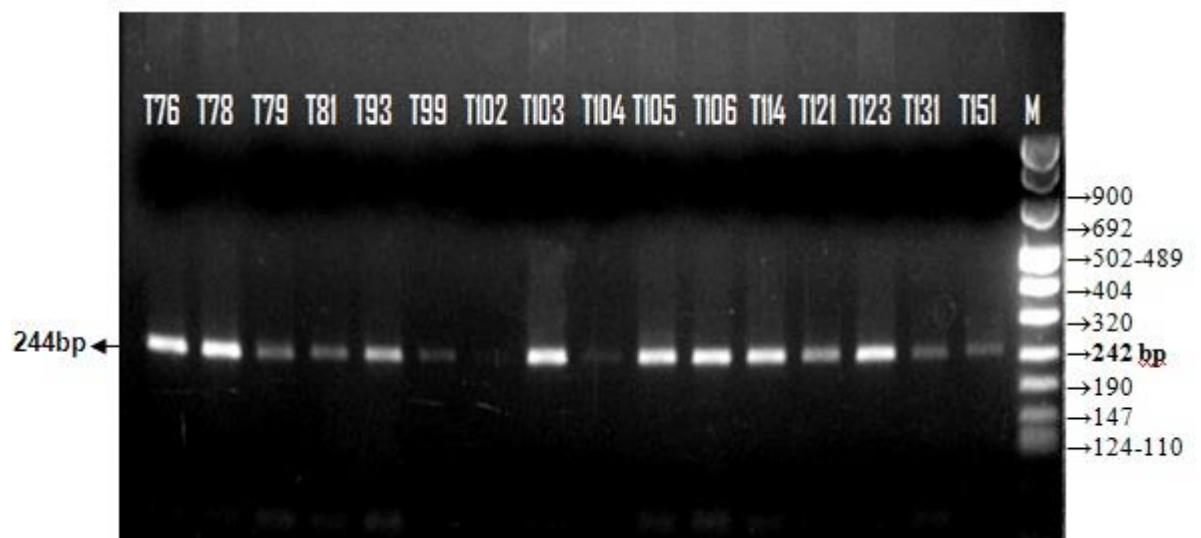


2. Hasil amplifikasi DNA genotip D543N/3'UTR dengan PCR dari hasil ekstraksi DNA Penderita TB Paru

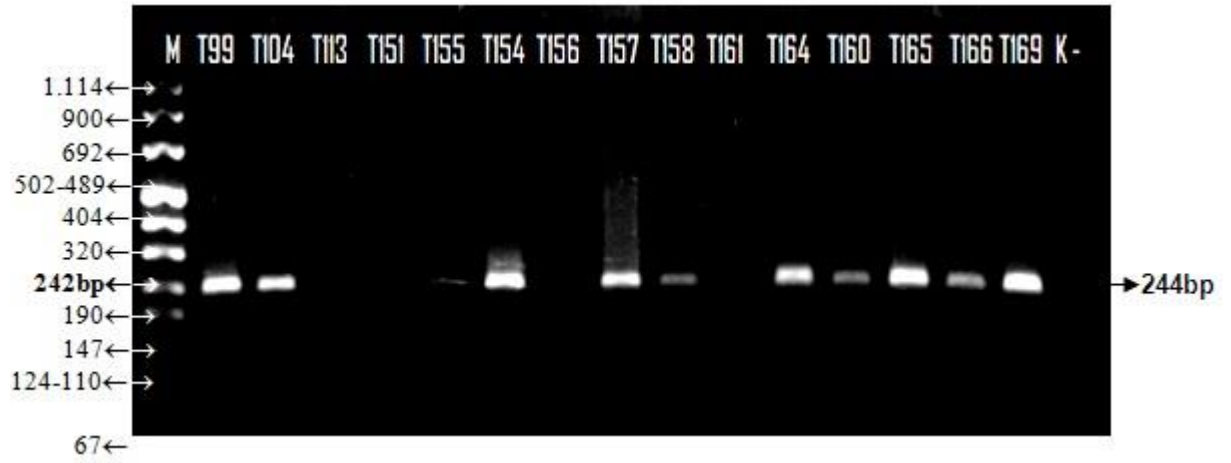
A



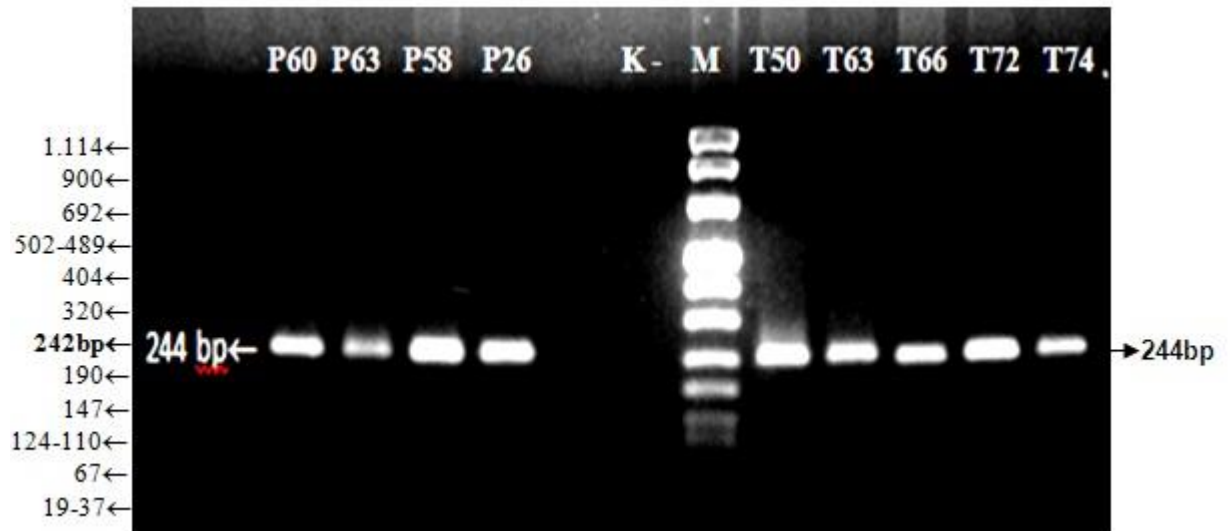
B



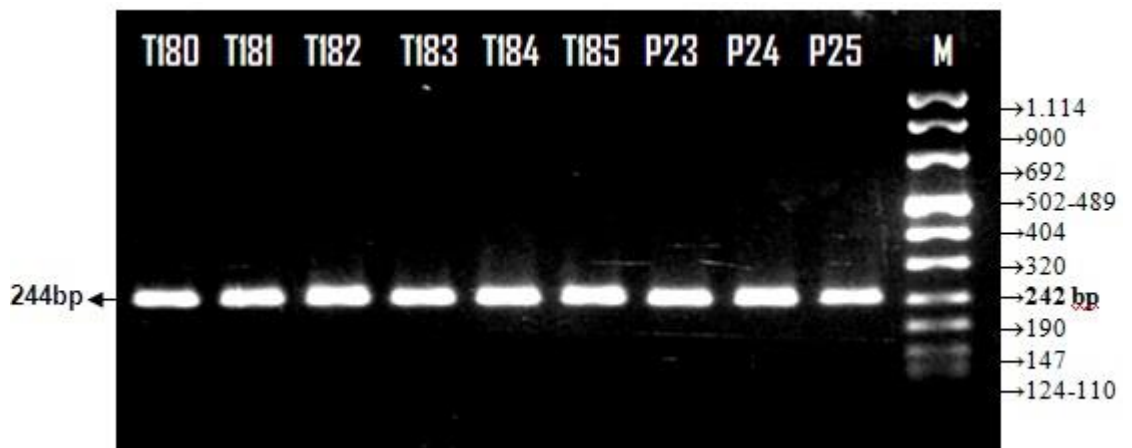
C



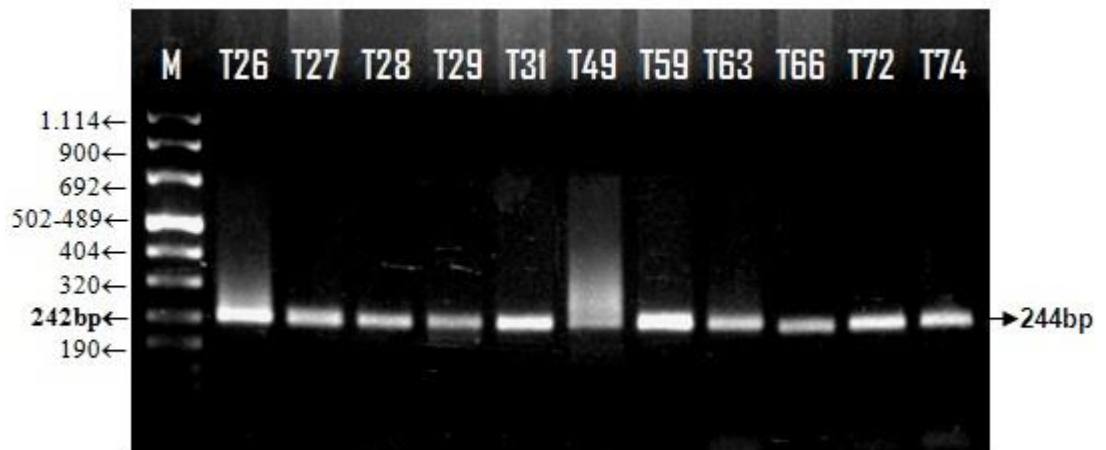
D



E



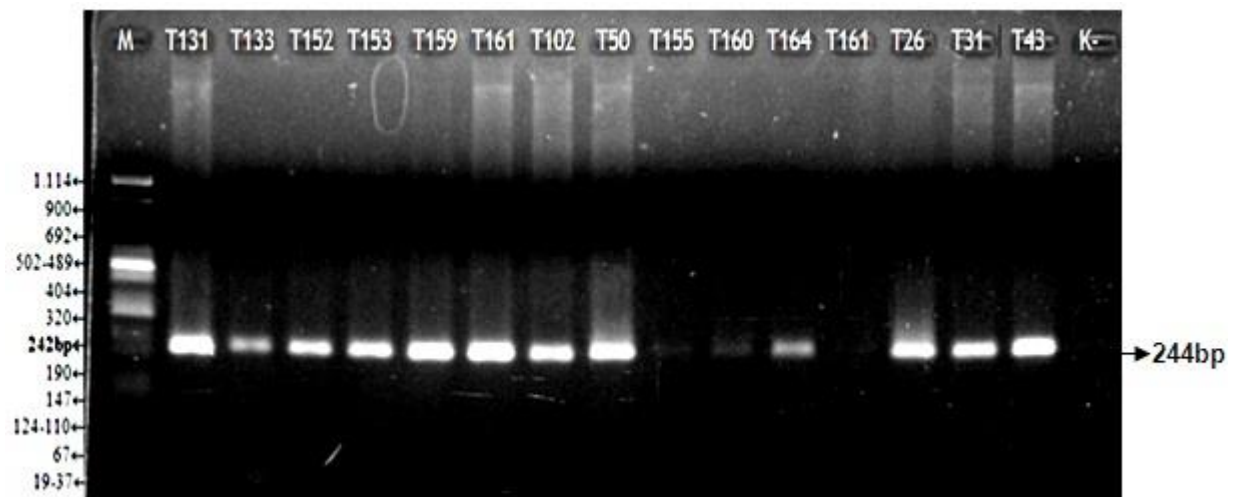
F



G



H

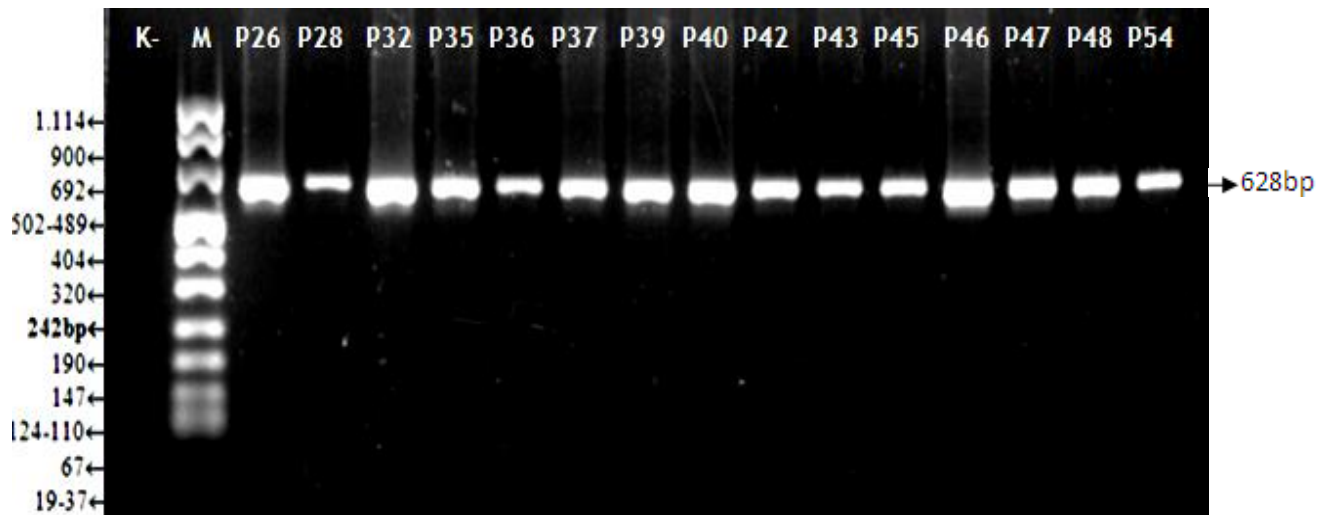


LAMPIRAN 4. Hasil Amplifikasi DNA regio INT4 dengan PCR dari hasil Ekstraksi DNA Perawat dan Penderita TB paru

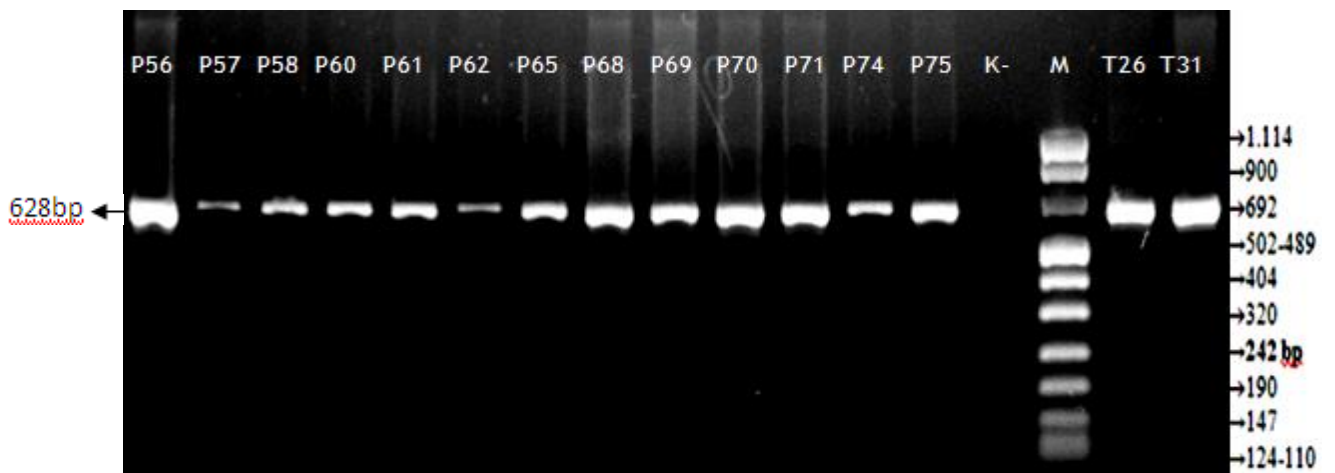
A



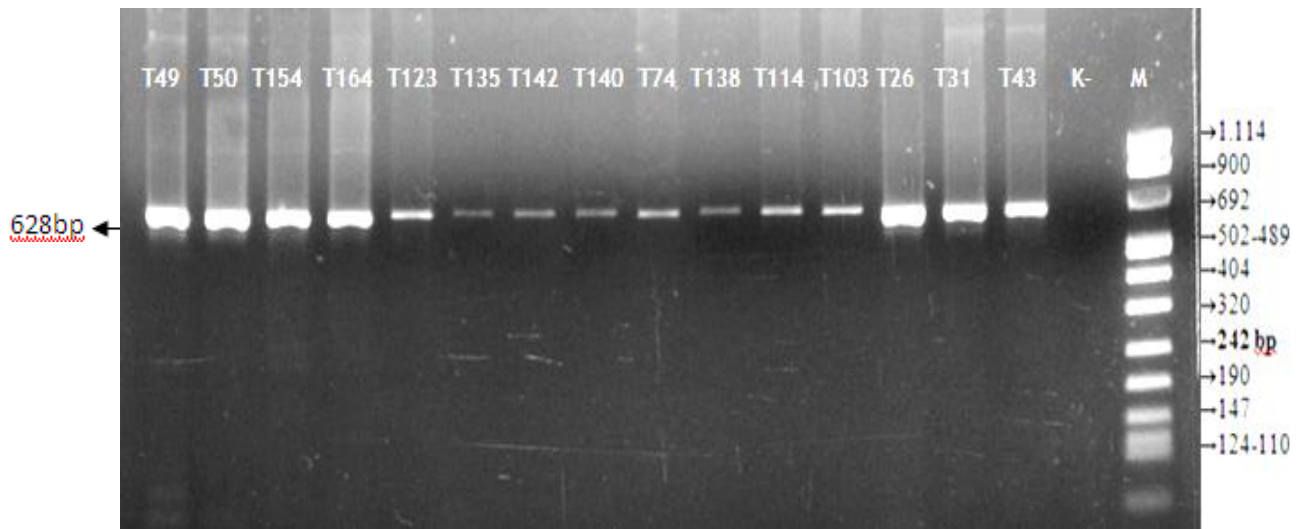
B



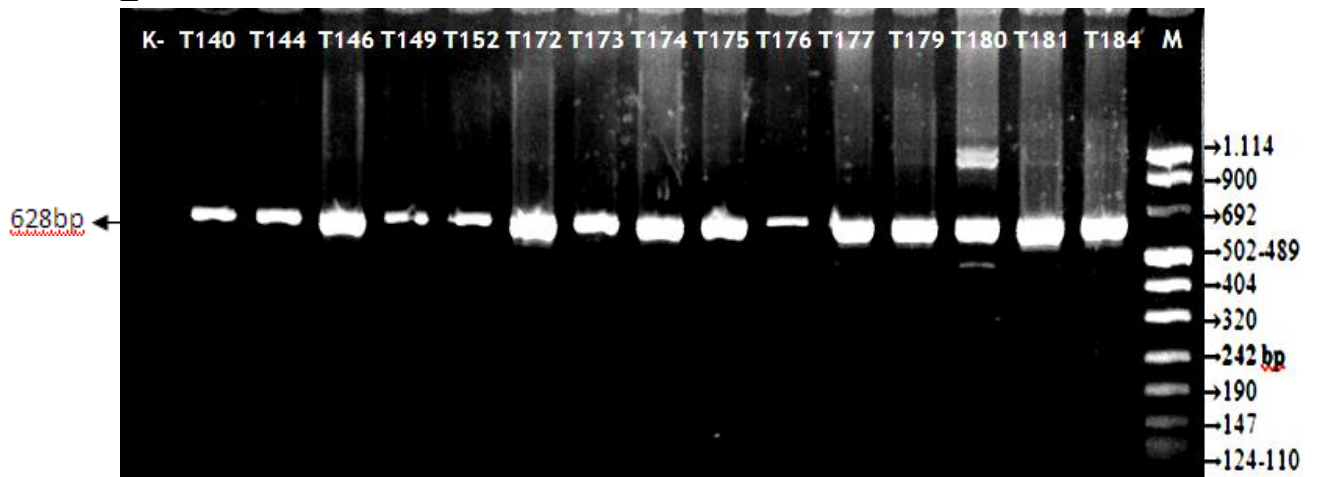
C



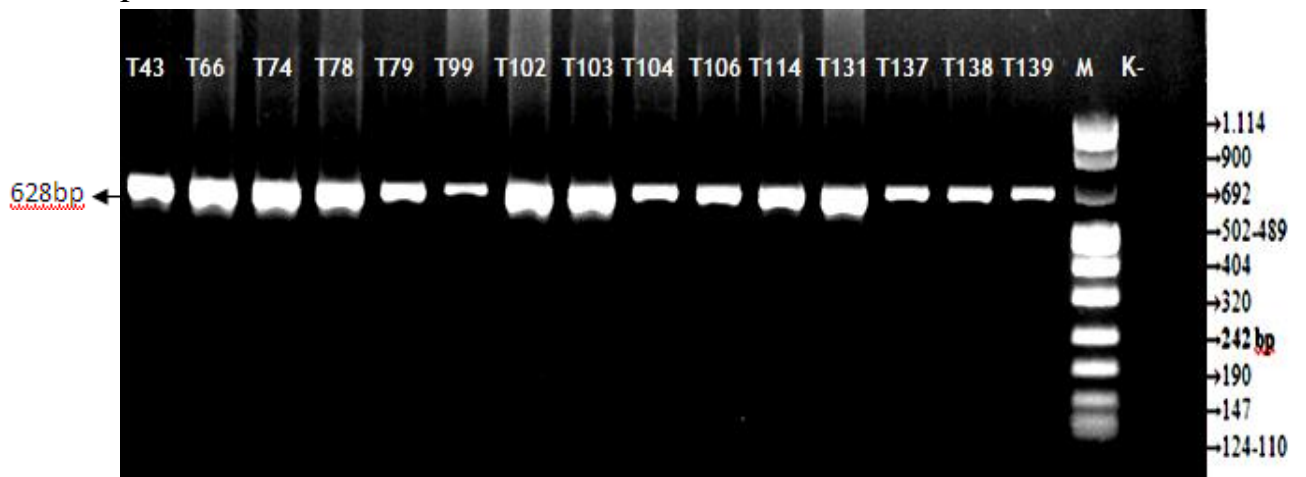
D



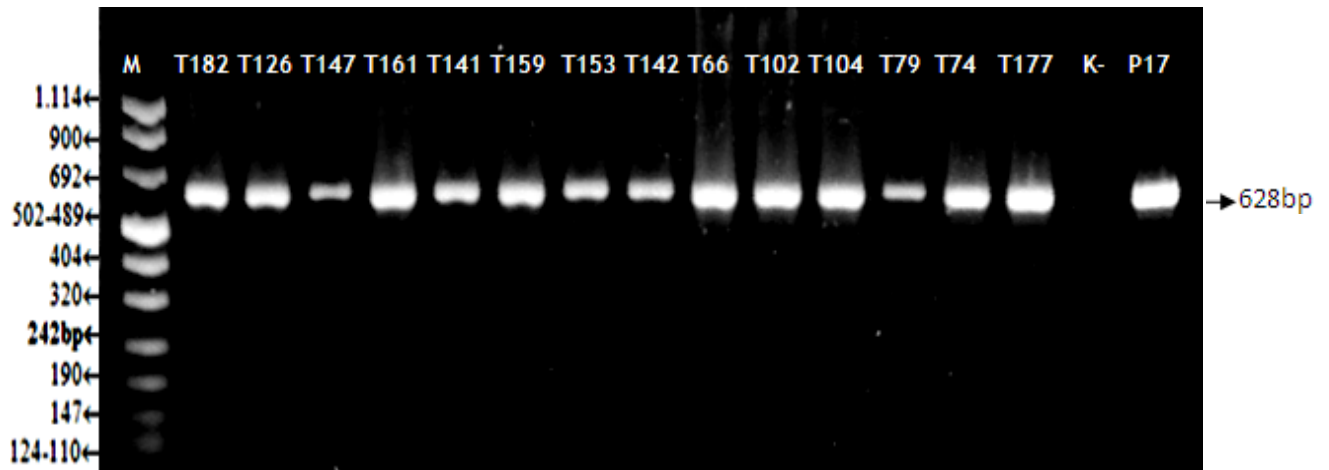
E



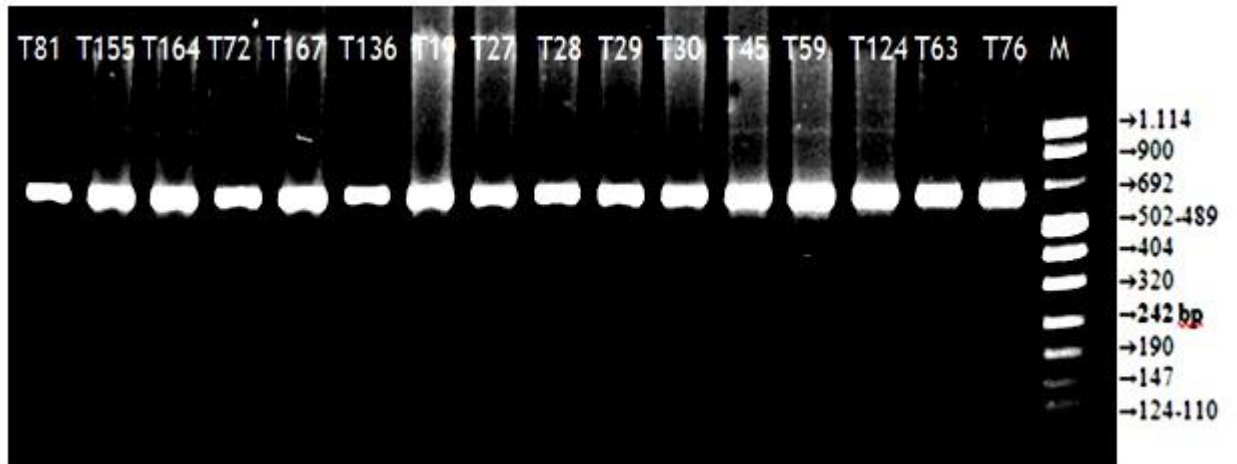
F



G



H

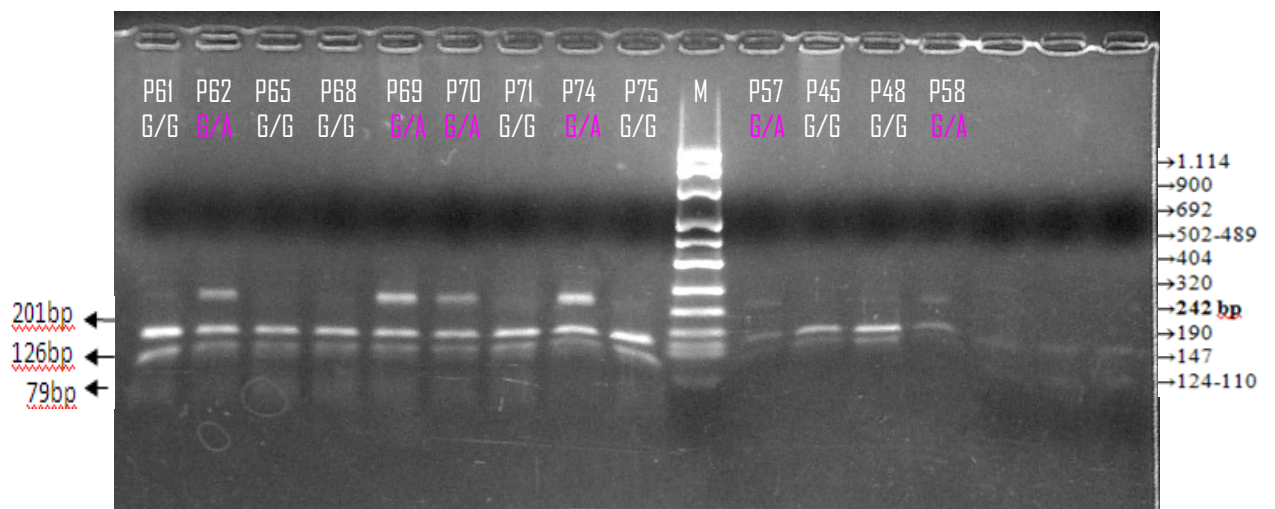
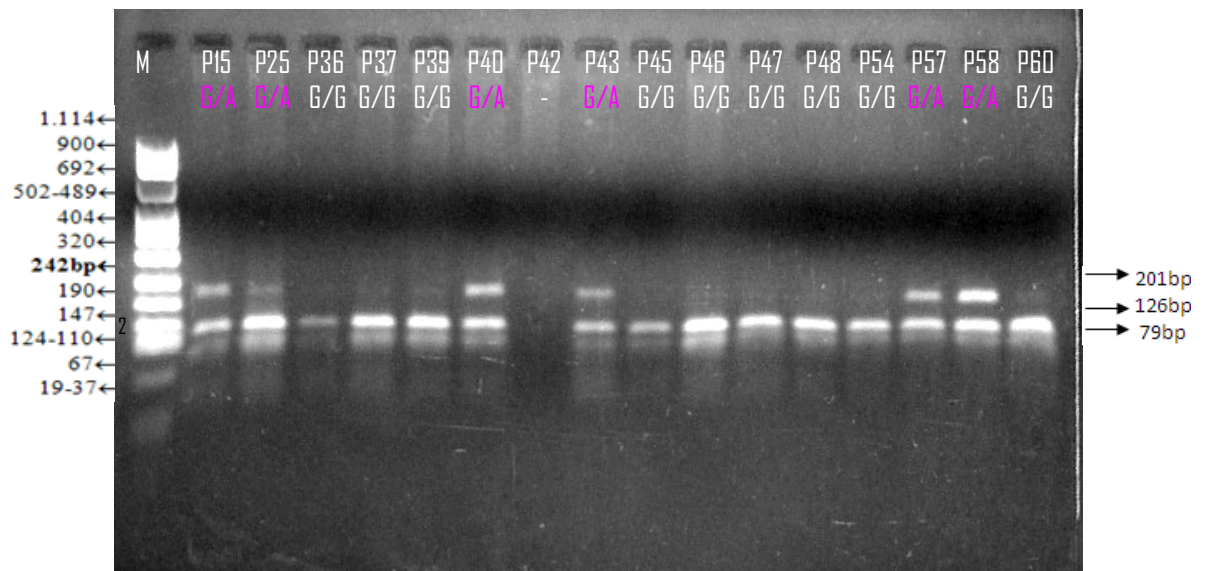
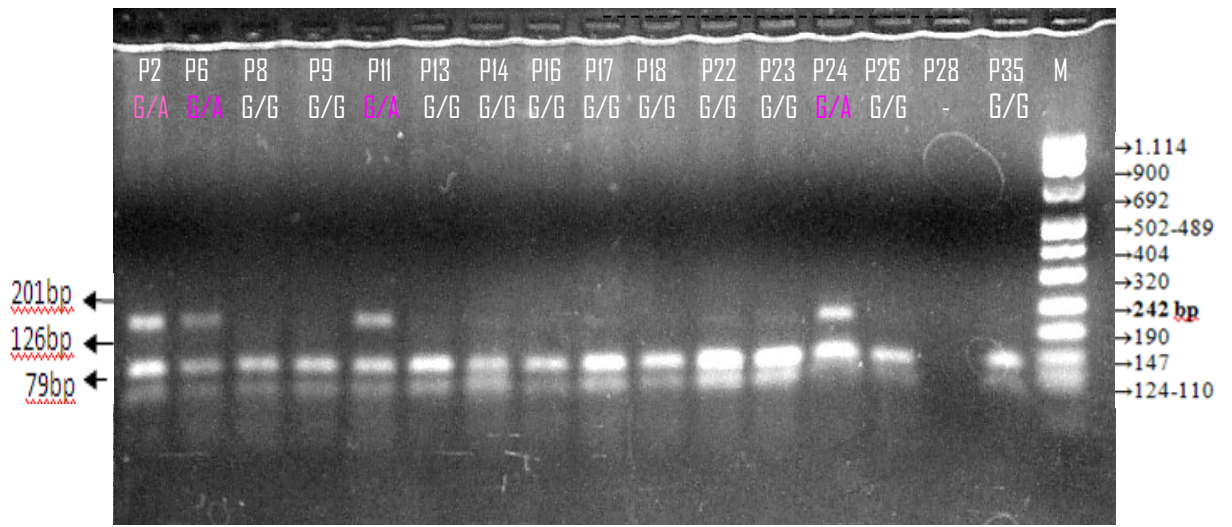


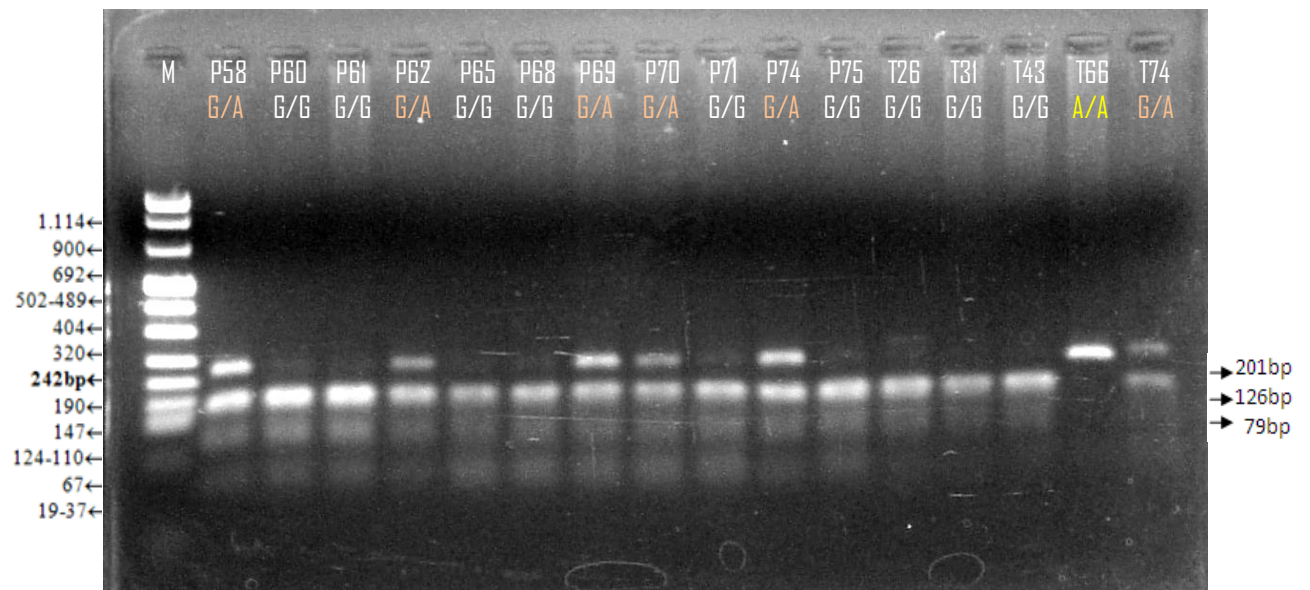
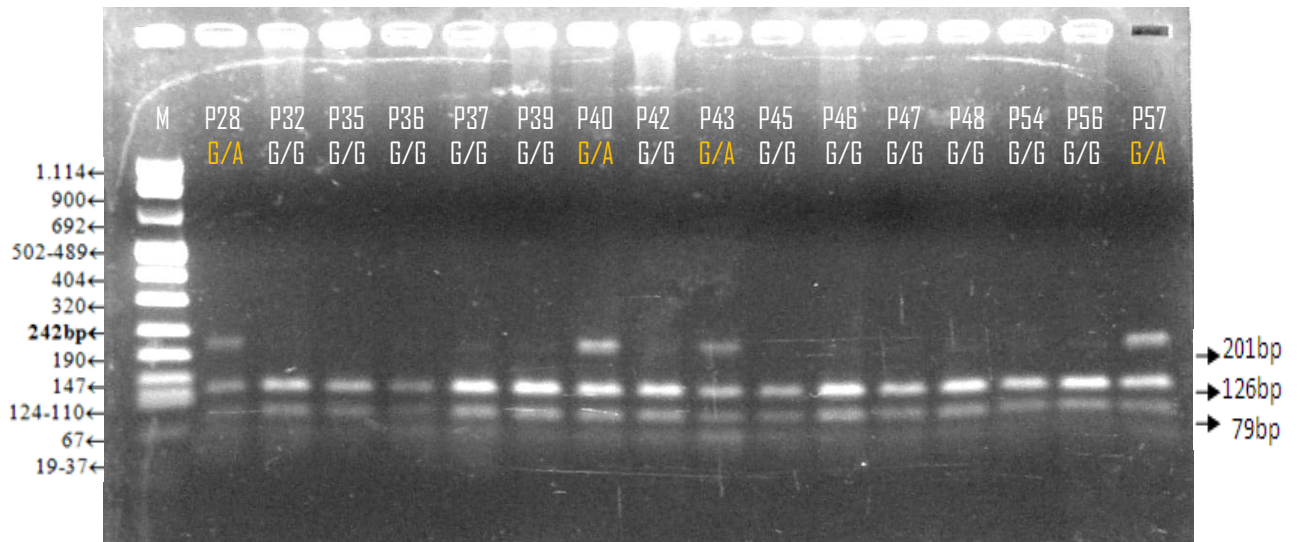
I



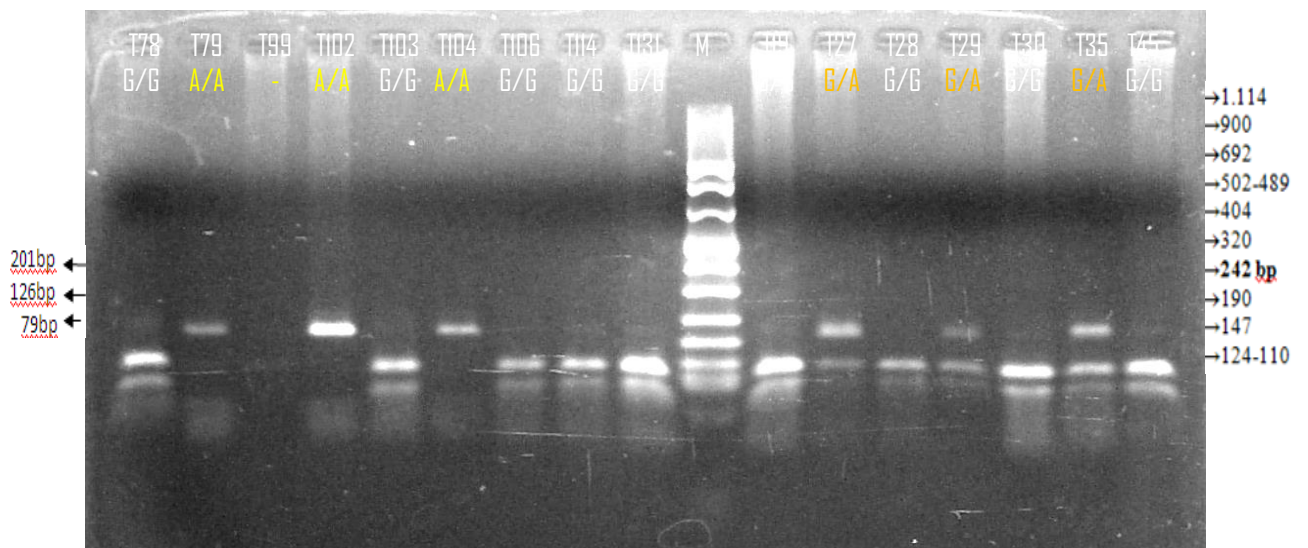
LAMPIRAN 5. Hasil RFLP dari amplicon regio D543N dengan RE *Ava*II pada DNA Perawat dan Penderita TB paru

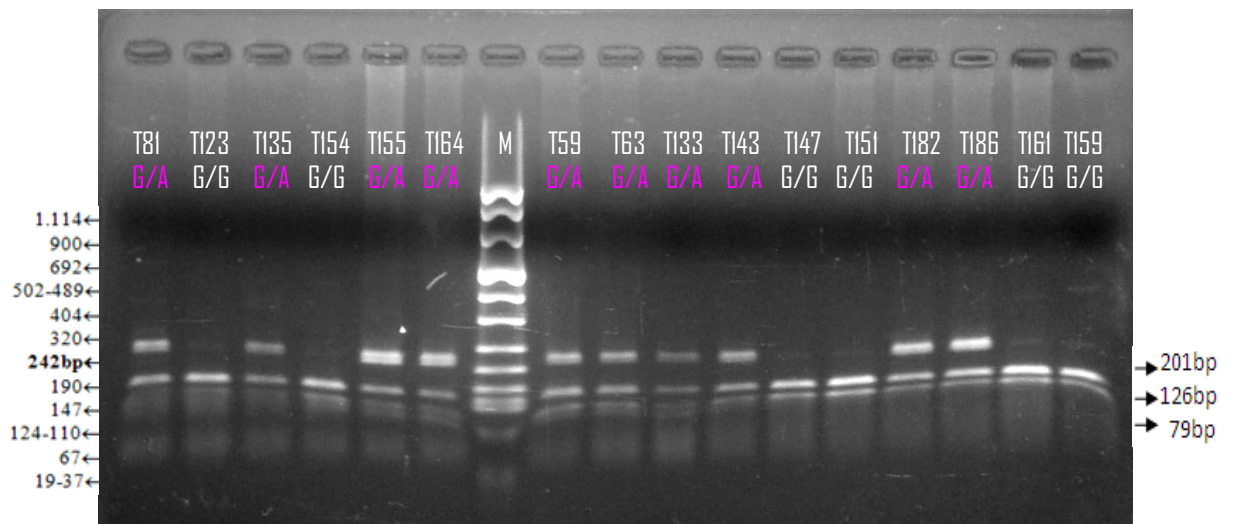
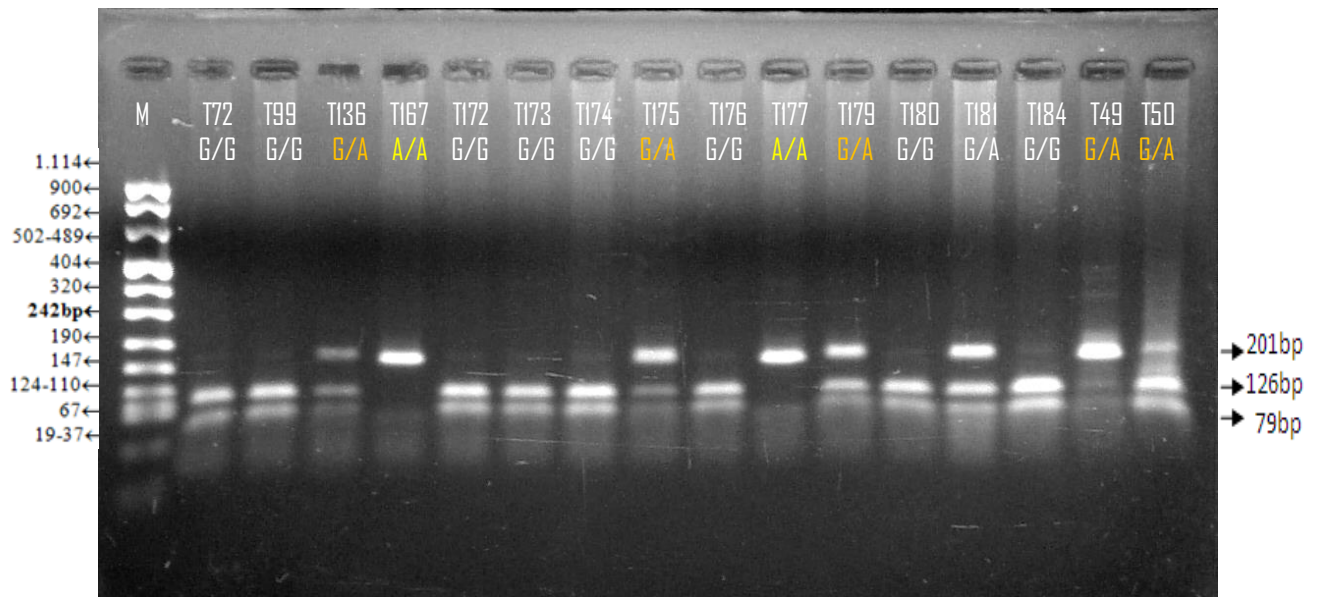
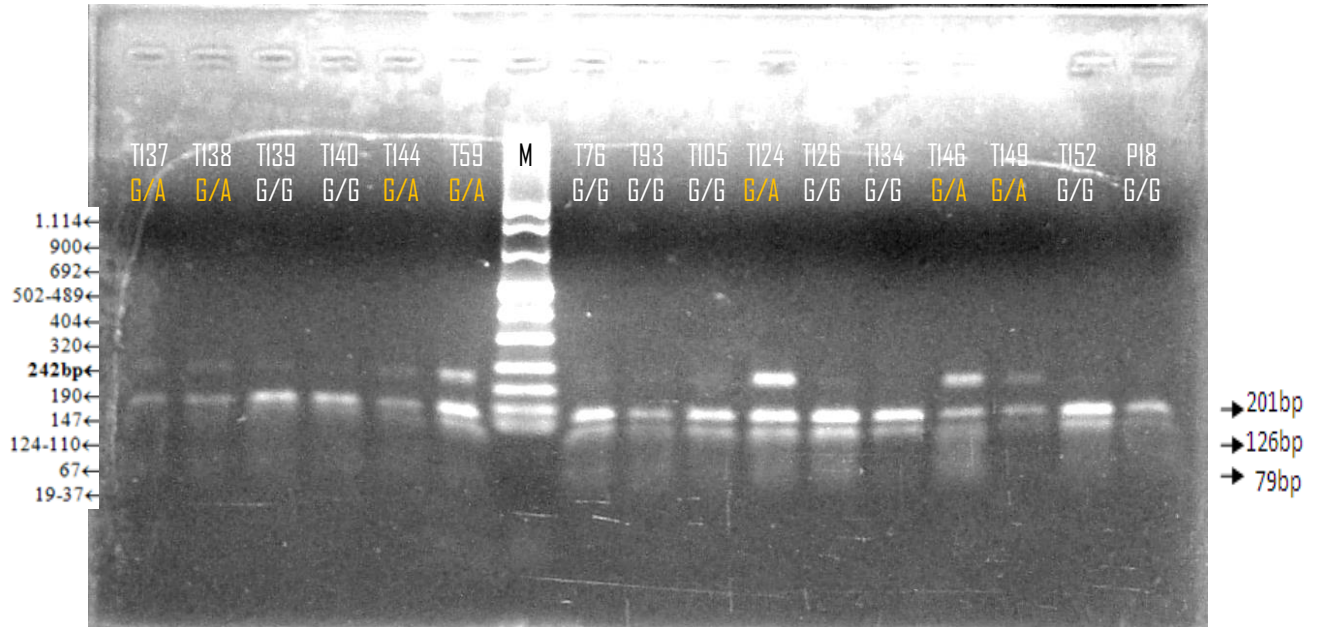
A. Gambaran Hasil RFLP dari amplicon DNA regio D543N Perawat

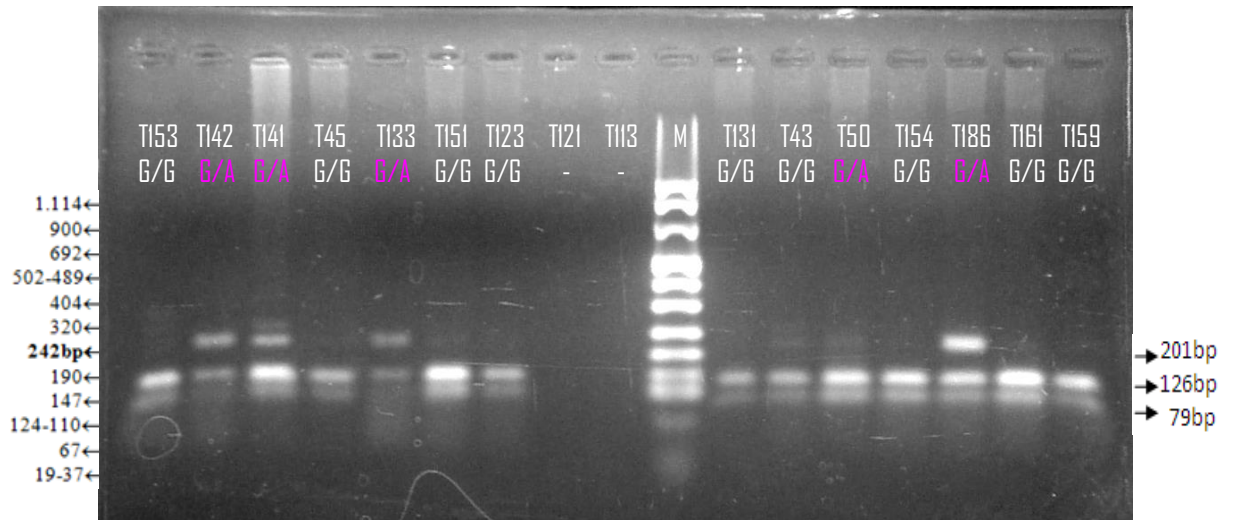




B. Gambaran Hasil RFLP dari amplicon DNA regio D543N Penderita TB Paru

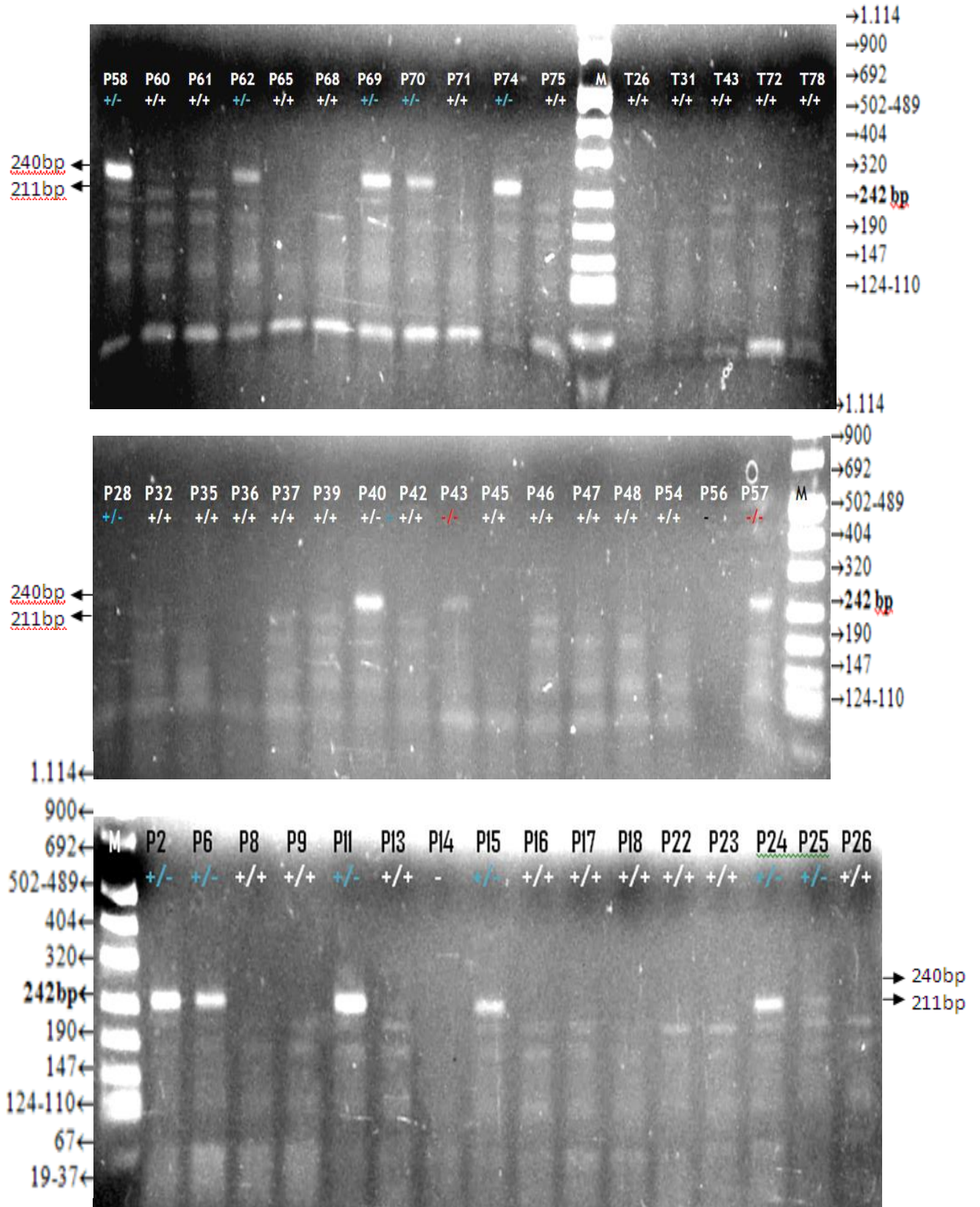


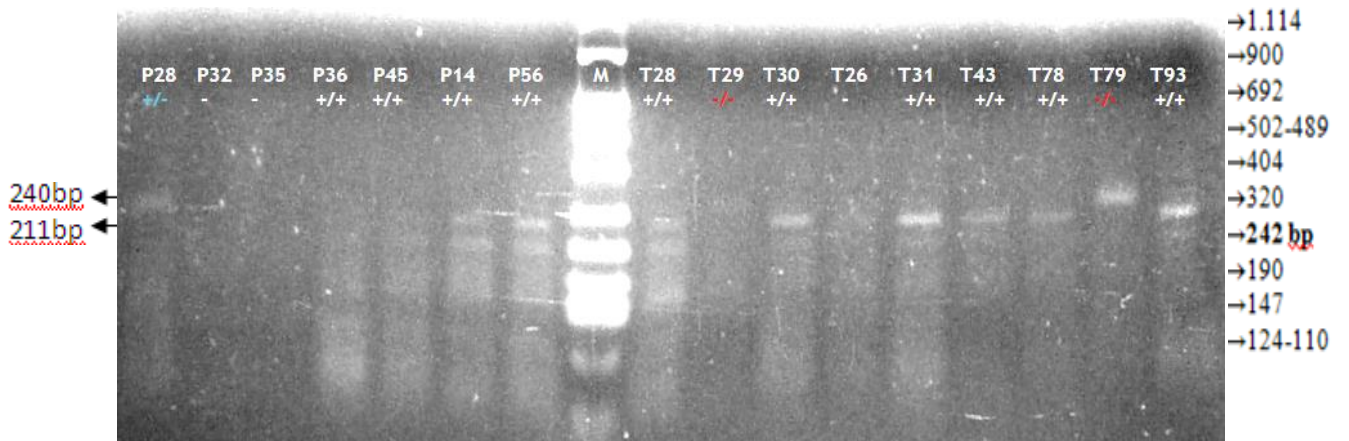




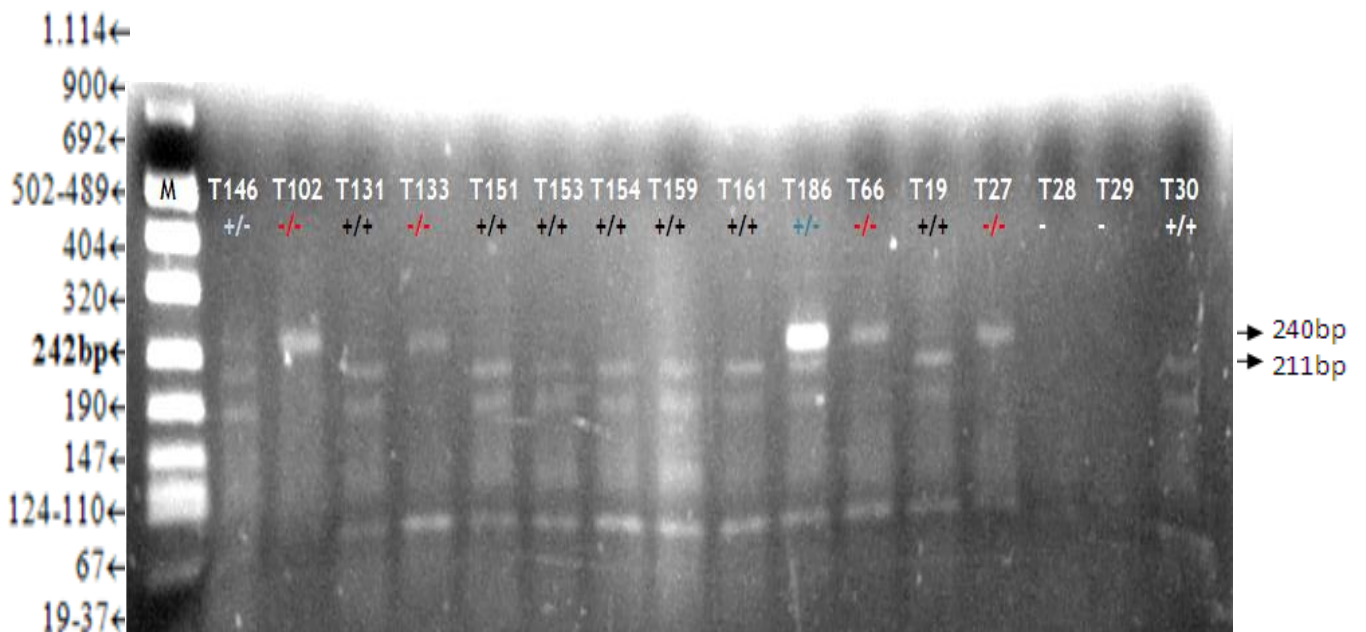
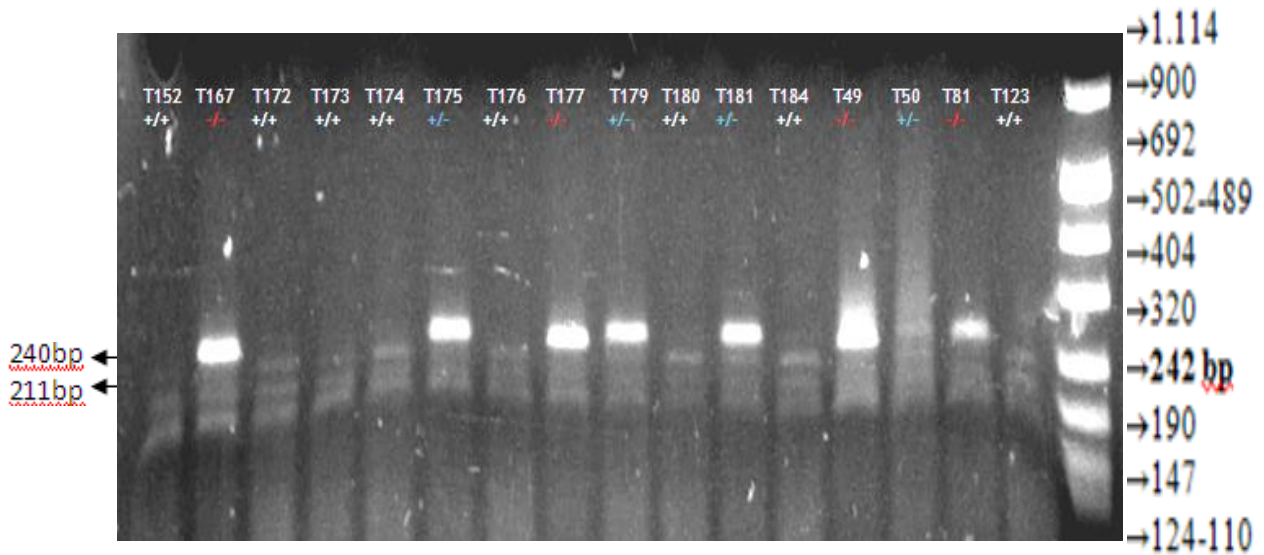
LAMPIRAN 6. Hasil RFLP dari amplicon DNA regio 3'UTR dengan RE FokI pada Perawat dan Penderita TB paru

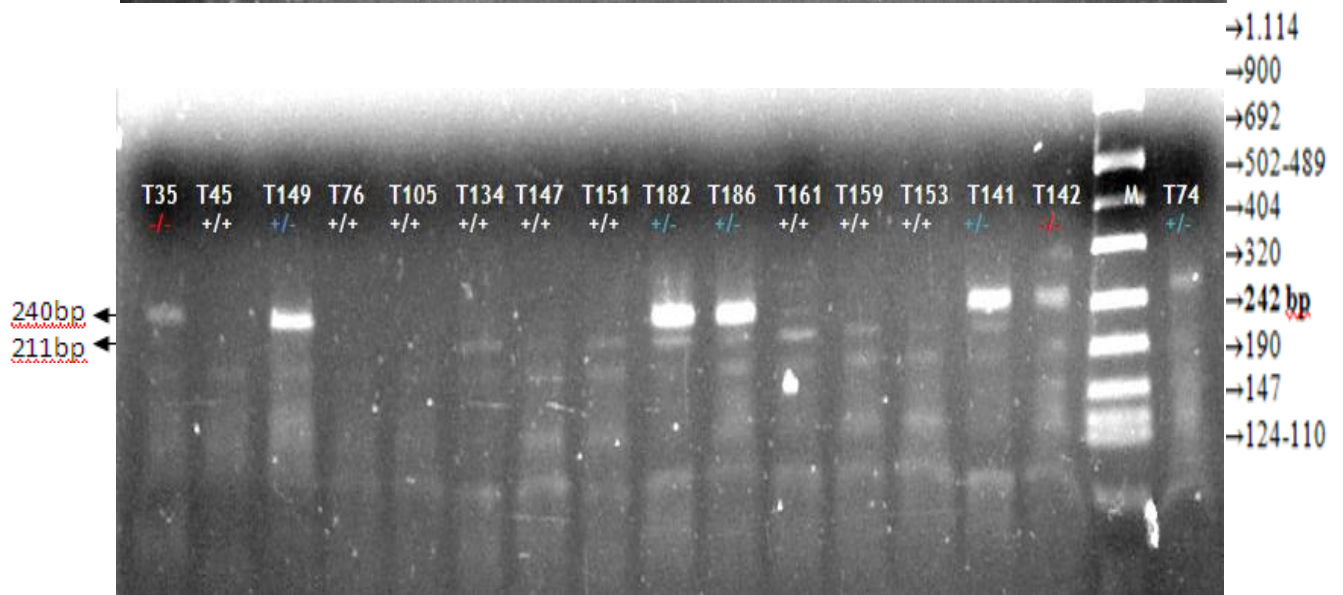
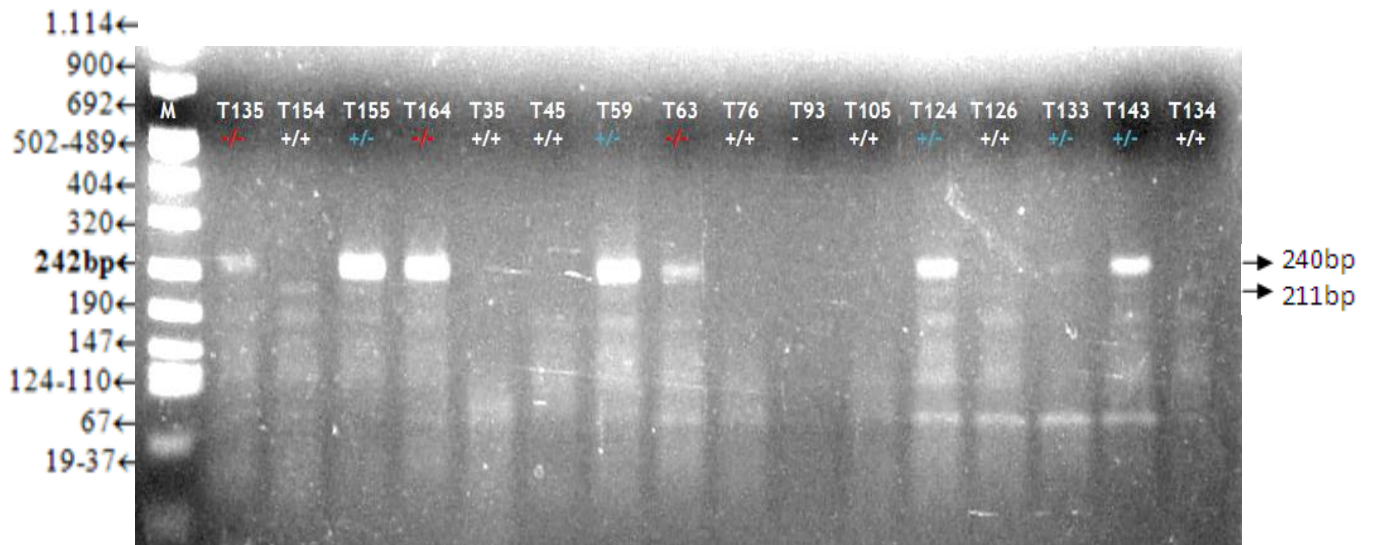
A. Gambaran Hasil RFLP dari amplicon DNA regio 3'UTR Perawat



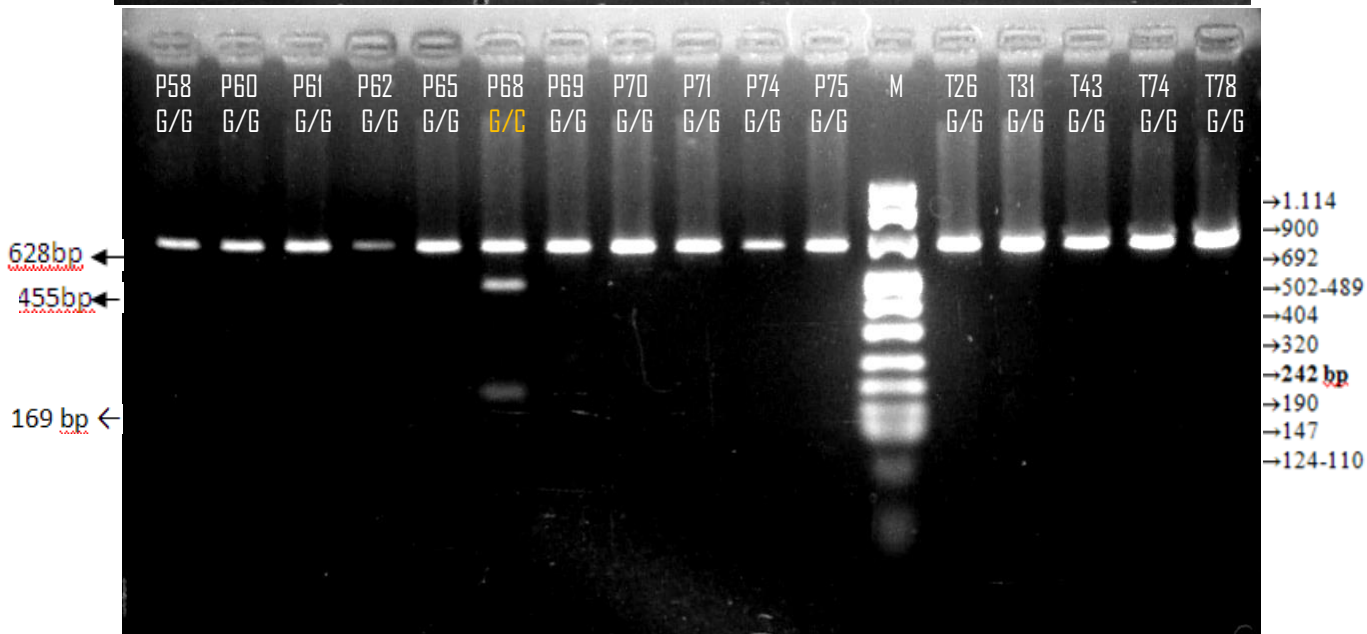
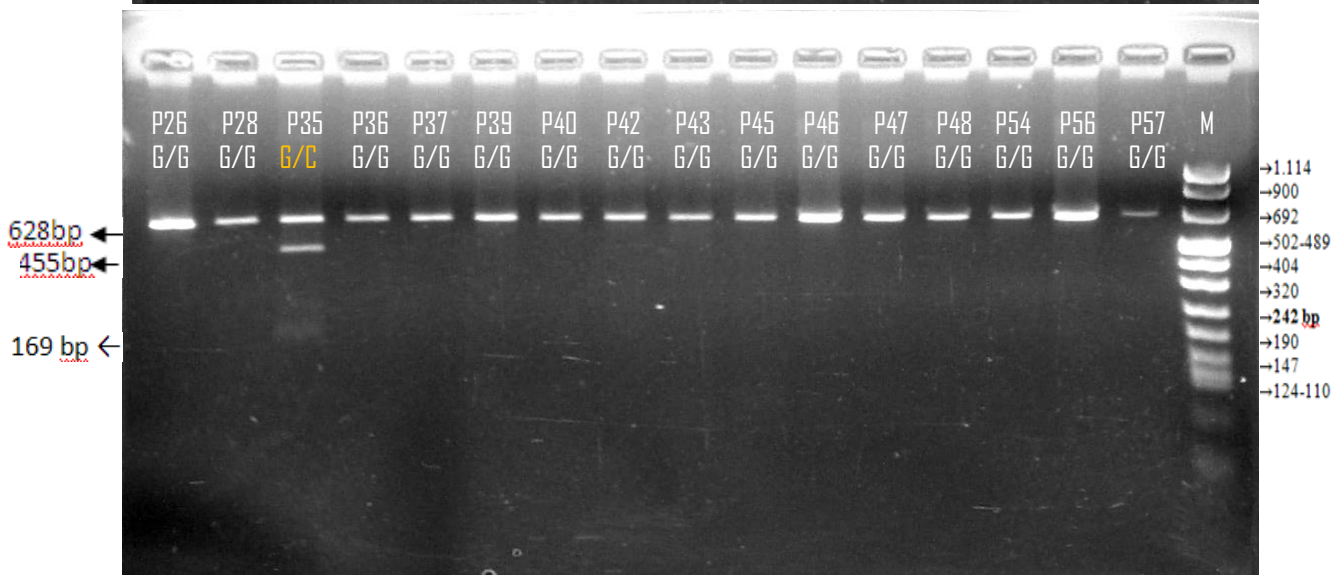
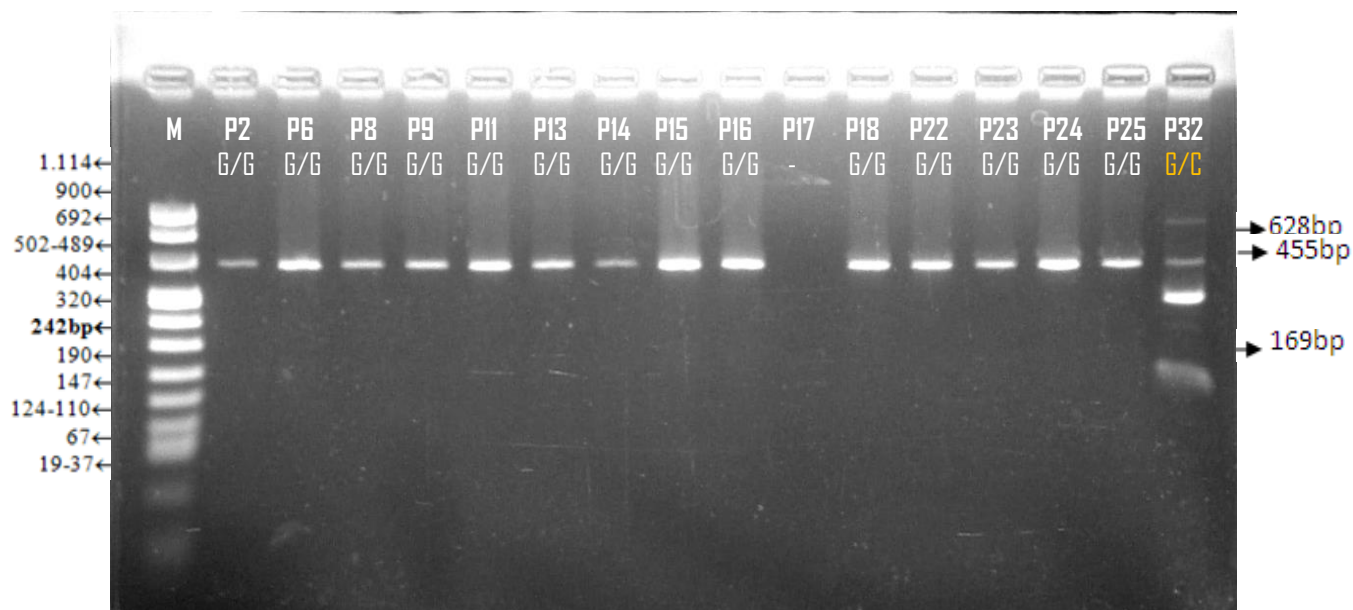


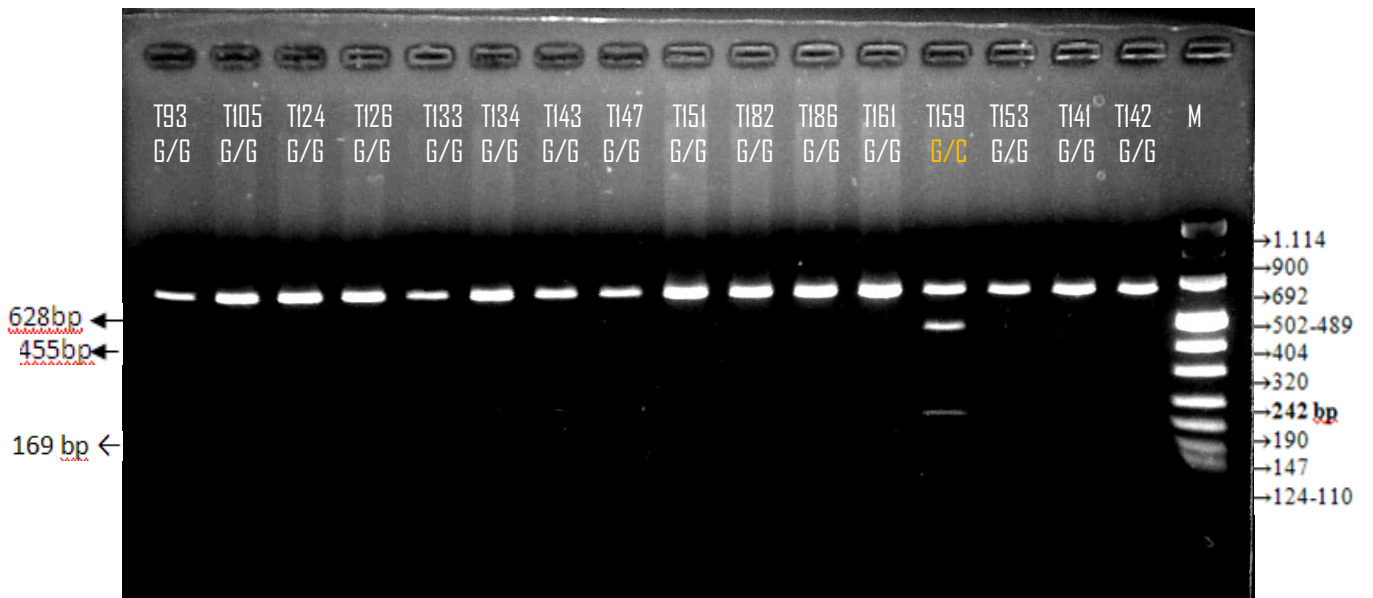
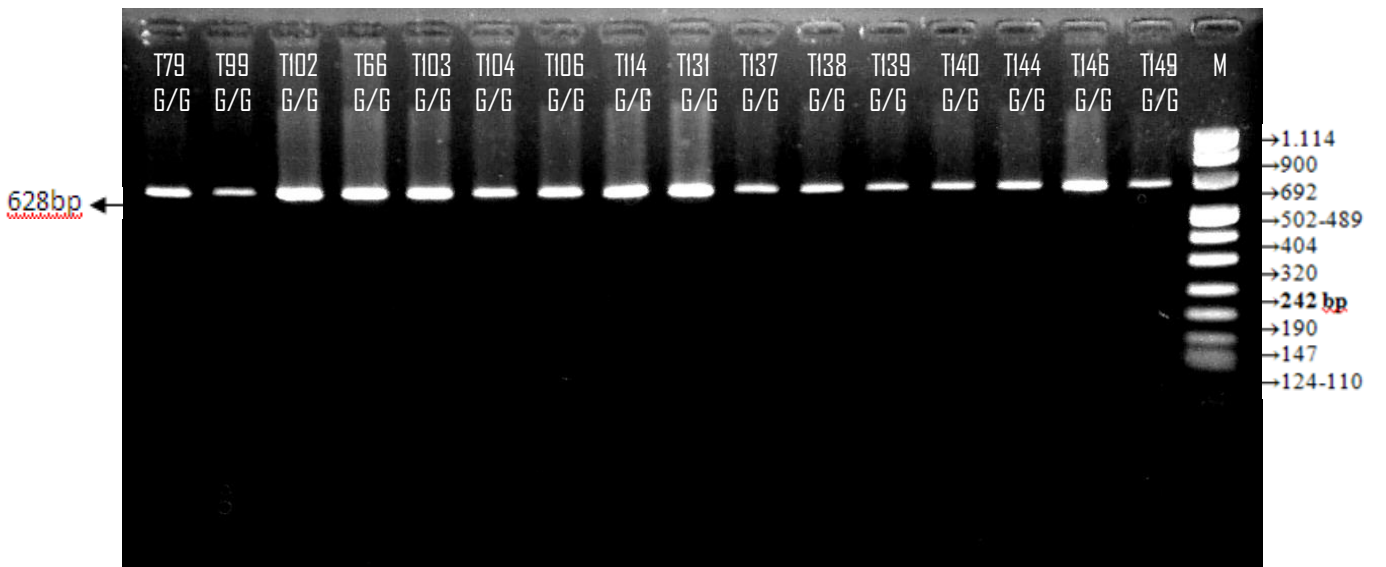
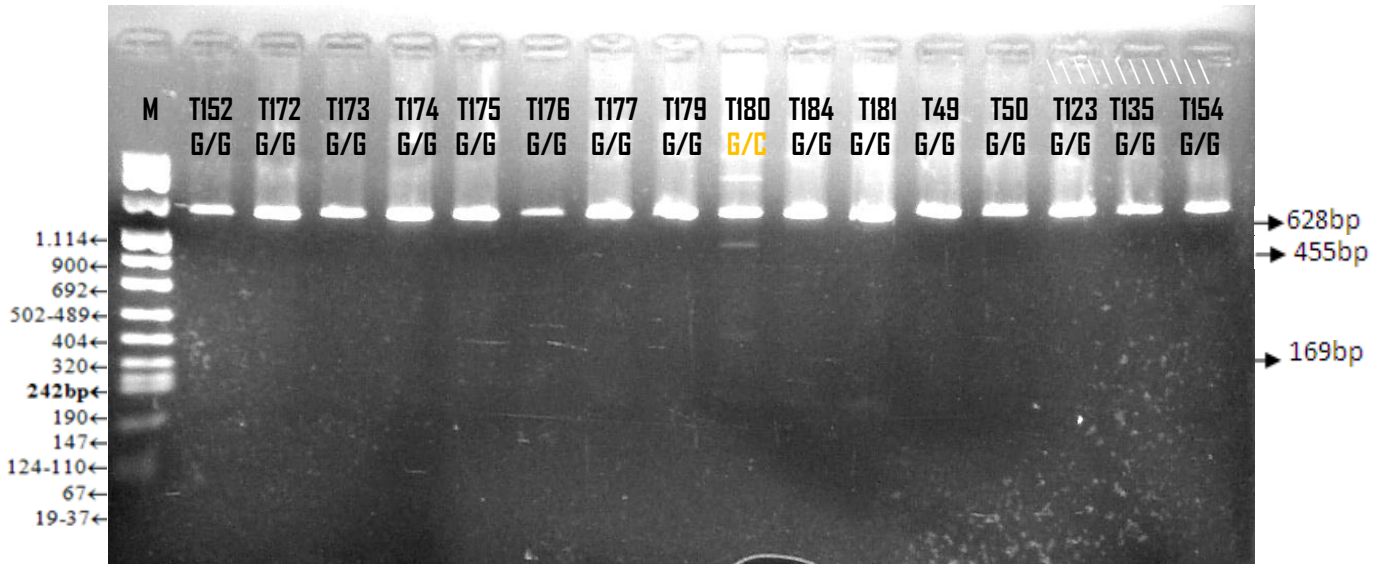
B. Gambaran Hasil RFLP dari amplicon DNA regio 3'UTR Penderita TB Paru

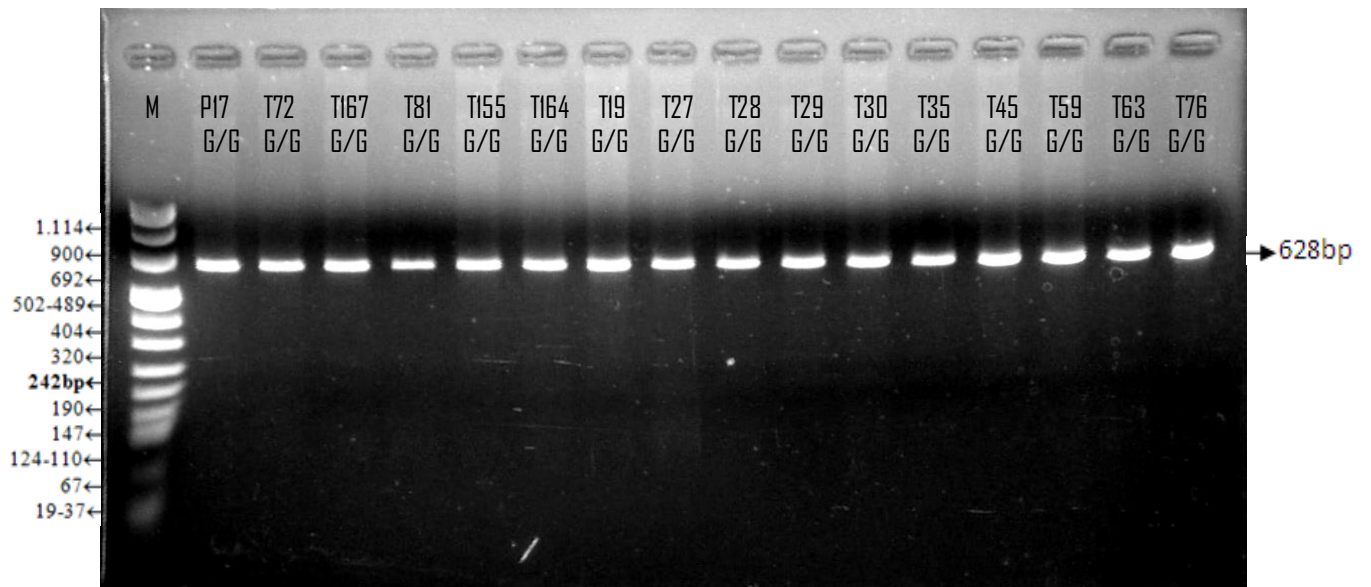




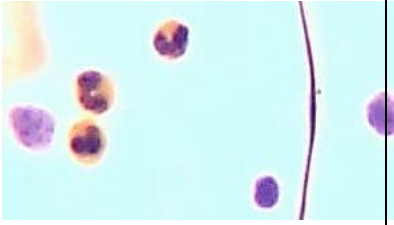
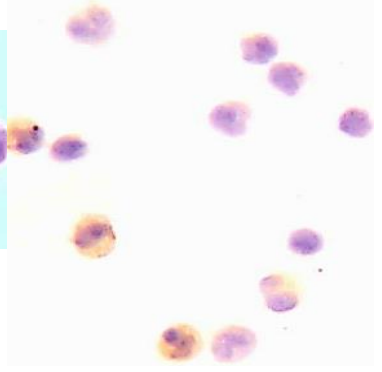
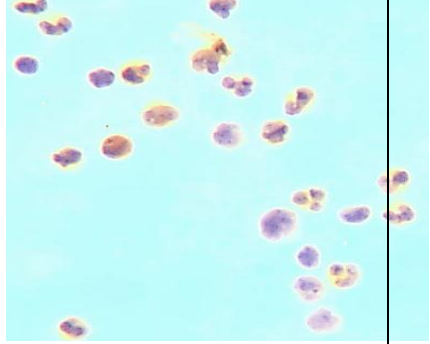
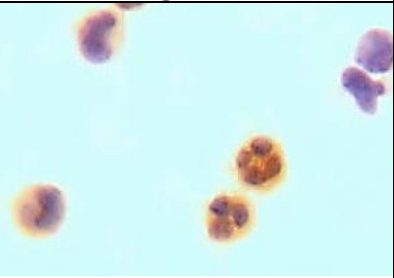
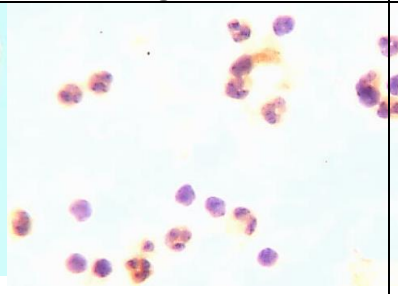
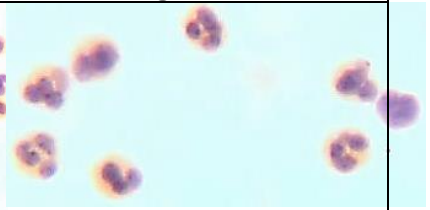
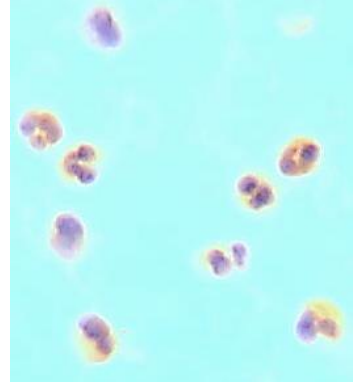
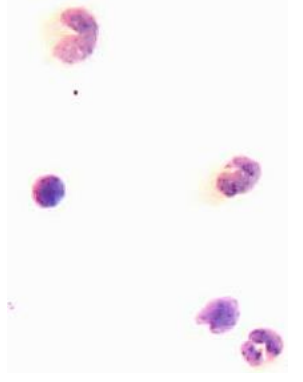
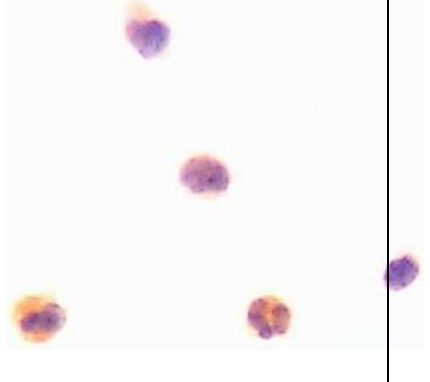
LAMPIRAN 7. Hasil RFLP dari amplikon DNA regio INT4 dengan RE Apa/ pada Perawat dan Penderita TB paru

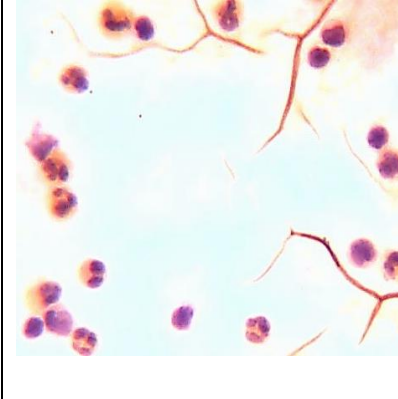
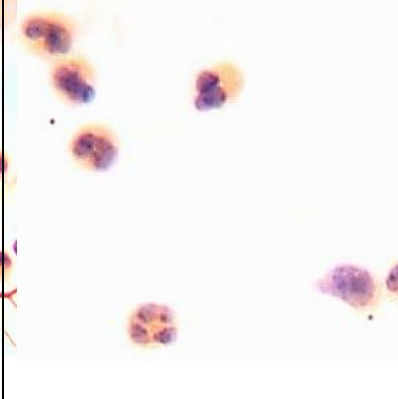
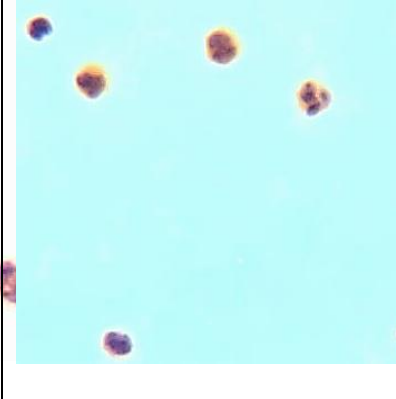
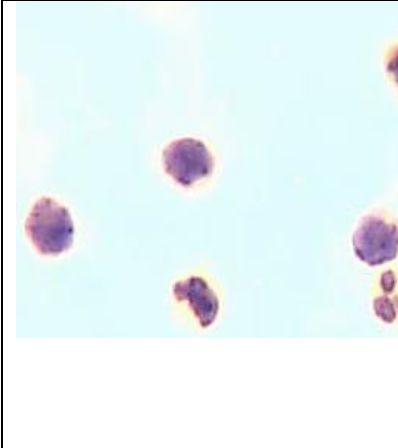
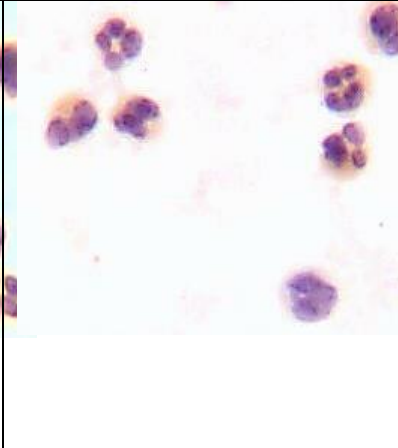
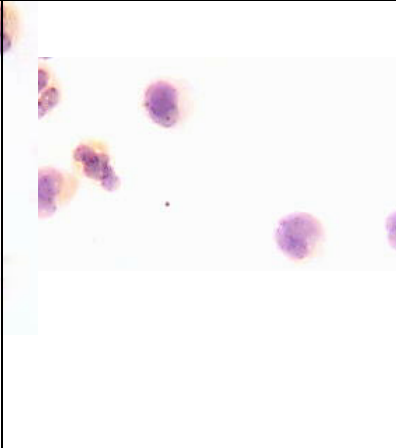
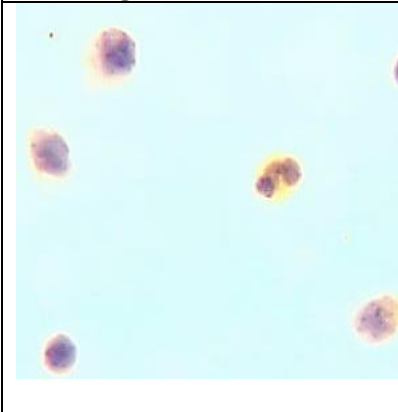
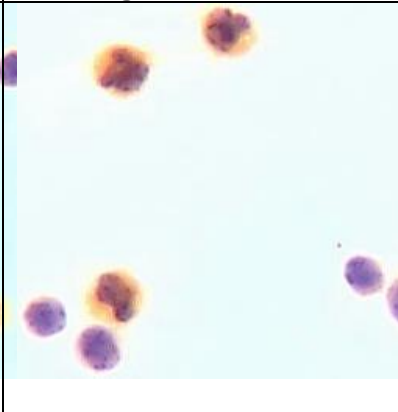
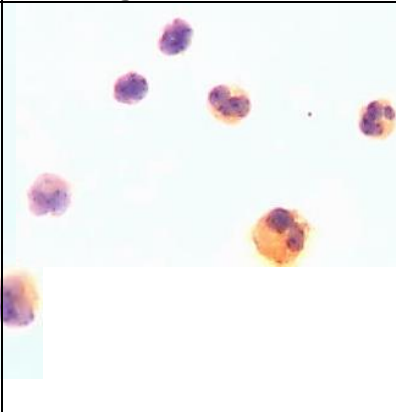



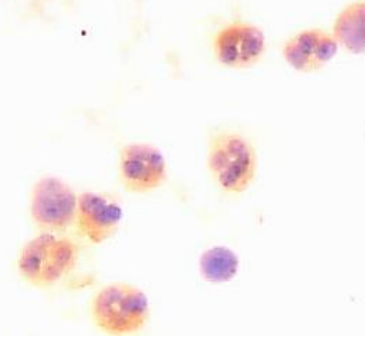
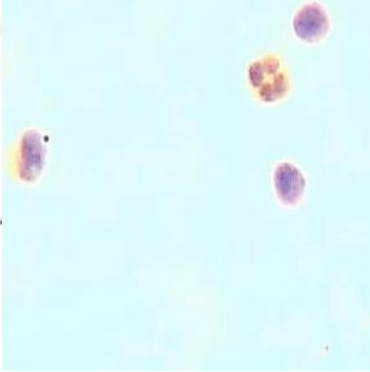

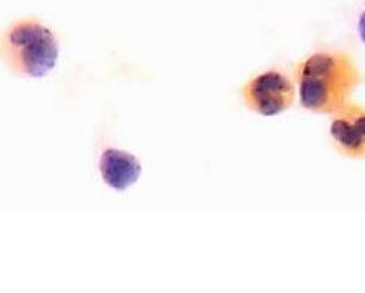
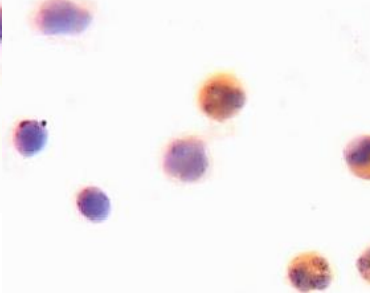
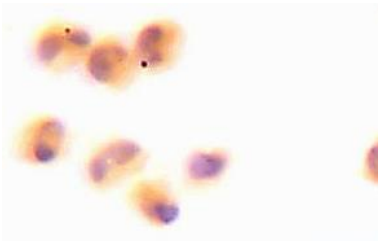
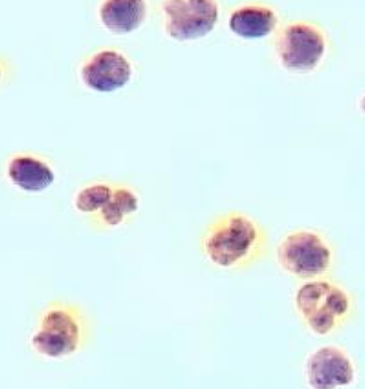
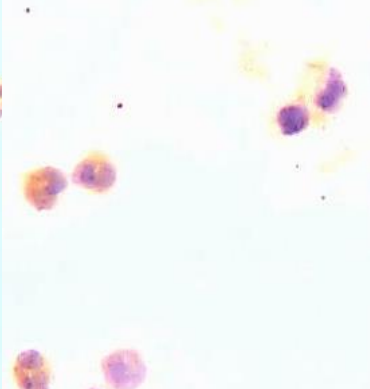


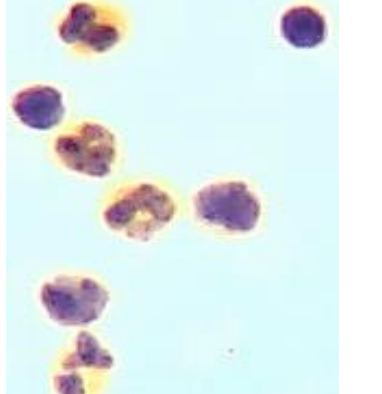
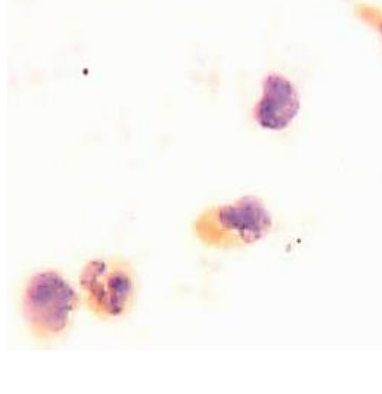
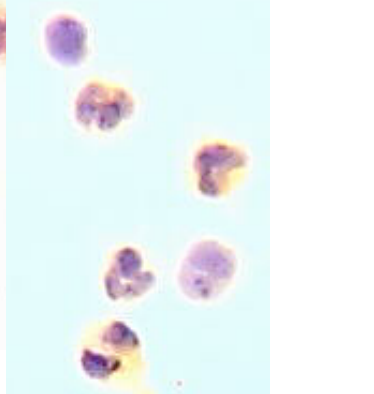
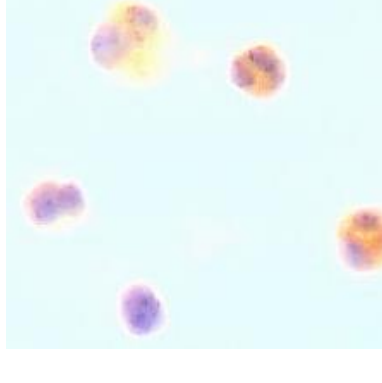
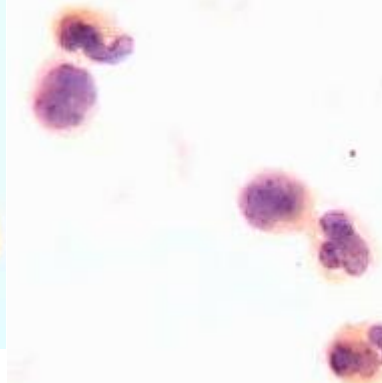
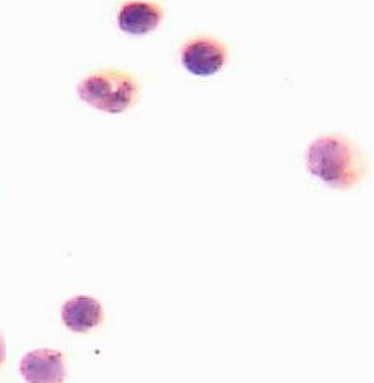
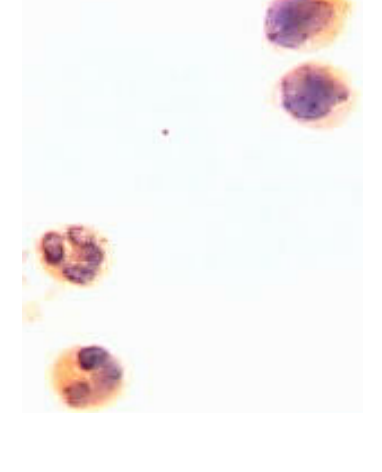
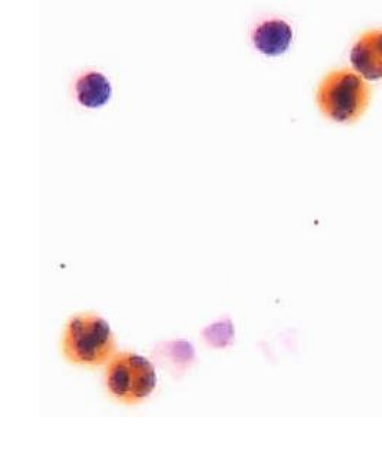
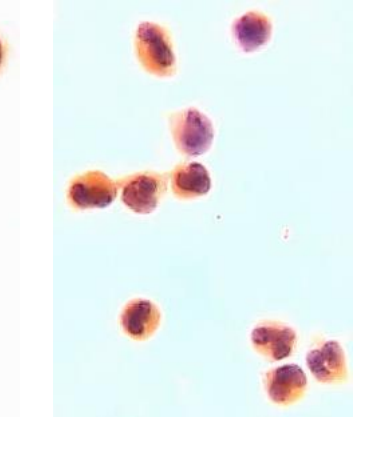


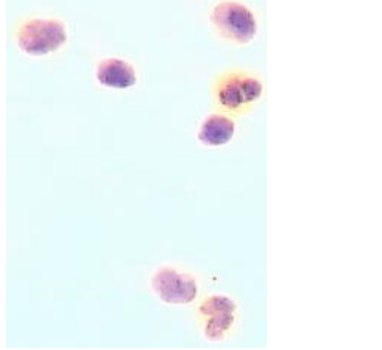
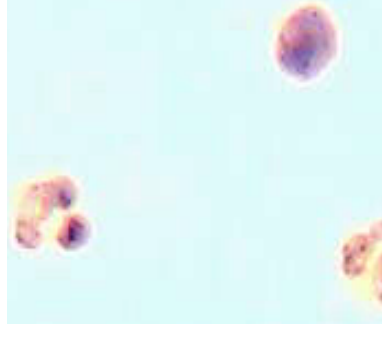
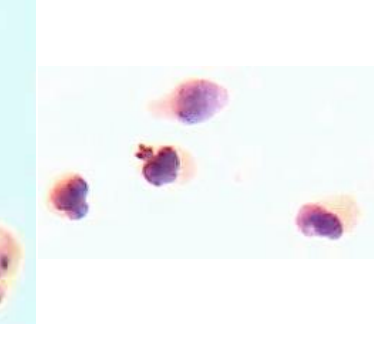
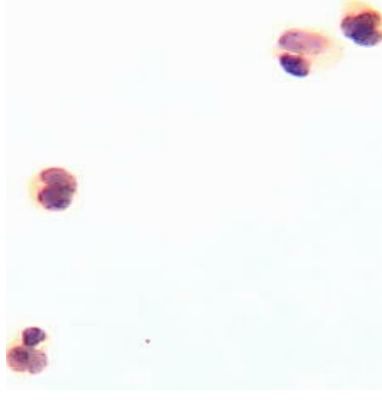
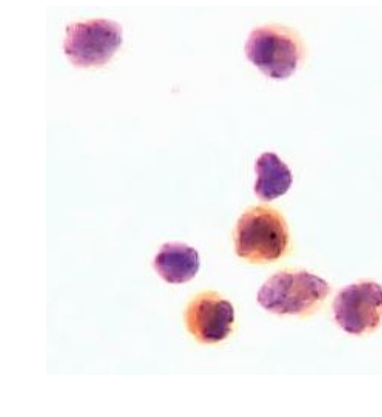
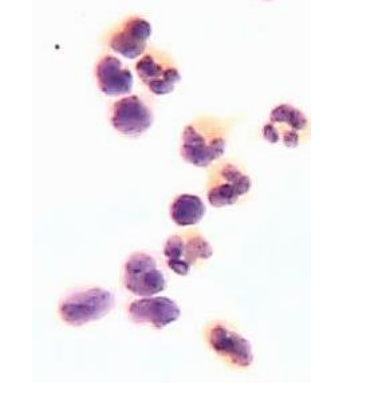
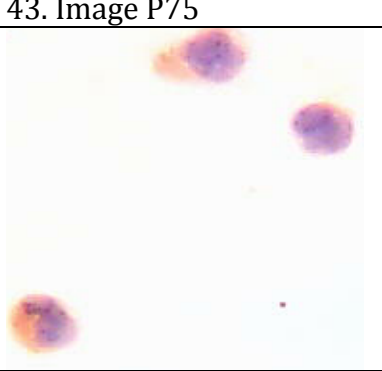
LAMPIRAN 8. Hasil Imunositokimia mendeteksi protein NRAMP1 Perawat dengan USB PC Camera 301P perbesaran 40x / 20 lap.pandang

1. Image P2	2. Image P6	3. Image P8
		
Monosit (+) : 60/84=70% D543N: G/A , 3UTR: +/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 45/100=45% D543N: G/A , 3UTR: +/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 80/108=74% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G
4. Image P11	5. Image P9	6. Image P13
		
Monosit (+) : 35/46=76% D543N: G/A , 3UTR: +/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 45/68=66% D543N: G/G , 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 64/76=84% D543N: G/G , 3UTR: +/+ INT4 : G/G
7. Image P14	8. Image P15	9. Image P16
		
Monosit (+) : 48/61=79% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 36/57=63% D543N: G/A , 3UTR: +/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 24/31=78% D543N: G/G , 3UTR: +/+ INT4 : G/G

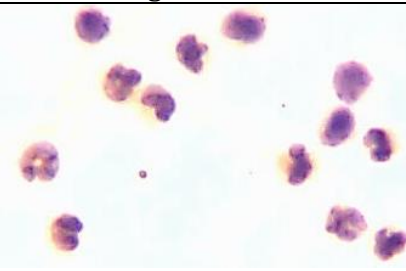
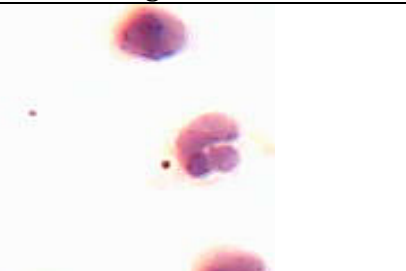
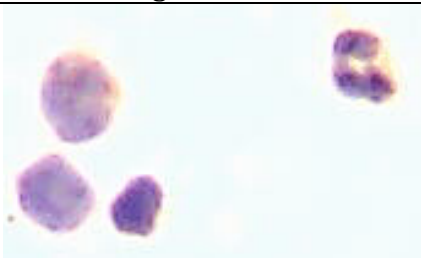
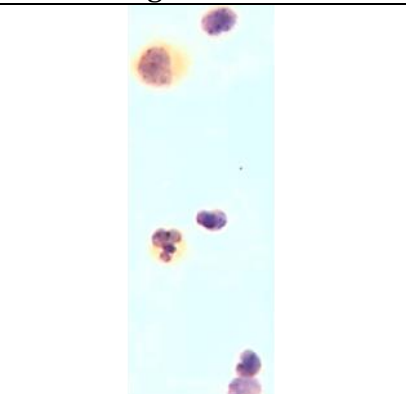
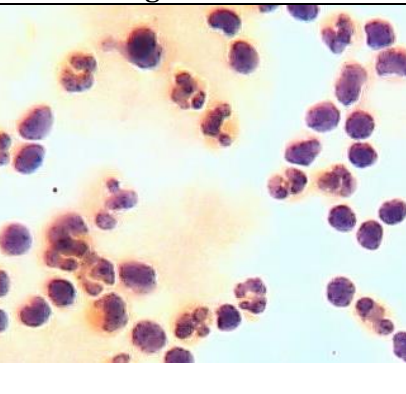
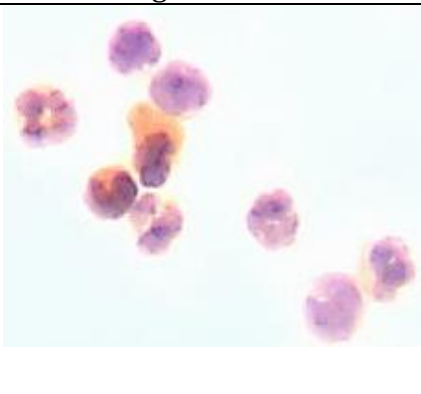
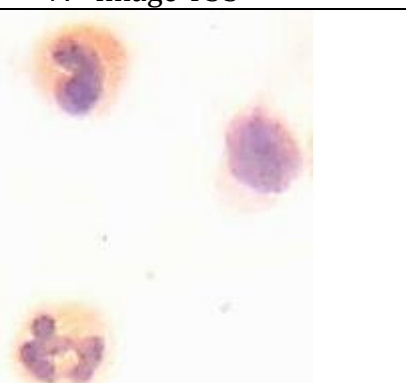
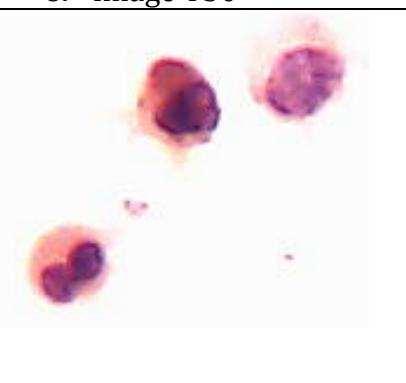
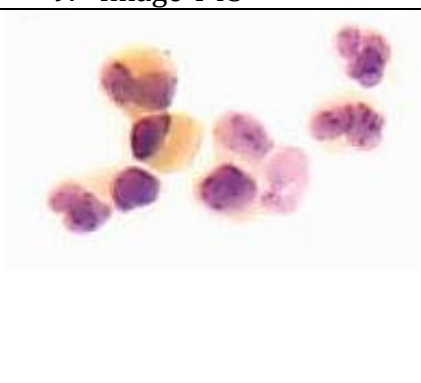
10. Image P17	11. Image P18	12. Image P22
		
<p>Monosit (+) : 144/192=75% D543N: G/G , 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 42/59=71% D543N: G/G , 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 64/64=100% D543N: G/G , 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>
13. Image P23	14. Image P24	15. Image P25
		
<p>Monosit (+) : 45/60=75% D543N: G/G , 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 42/65=65% D543N: G/A , 3UTR: +/- INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 24/44=55% D543N: G/A , 3UTR: +/- INT4 : G/G</p>
16. Image P26	17. Image P28	18. Image P32
		
<p>Monosit (+) : 45/60=75% D543N: G/G , 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 48/89=54% D543N: G/A , 3UTR: +/- INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 42/56=75% D543N: G/G , 3UTR: +/+ INT4 : G/C</p>


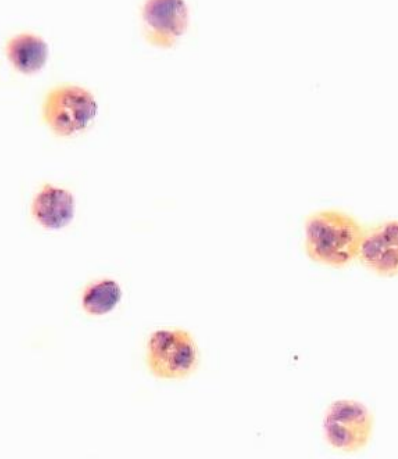
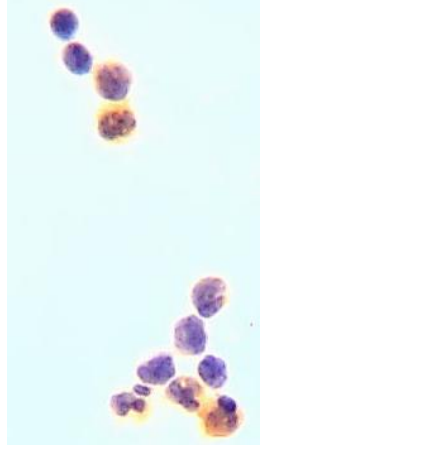
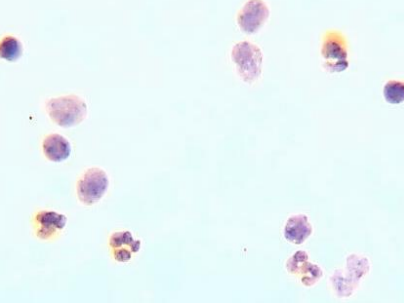
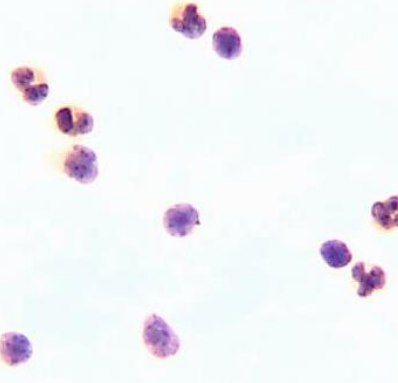
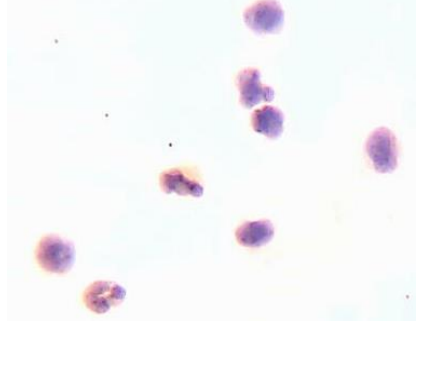
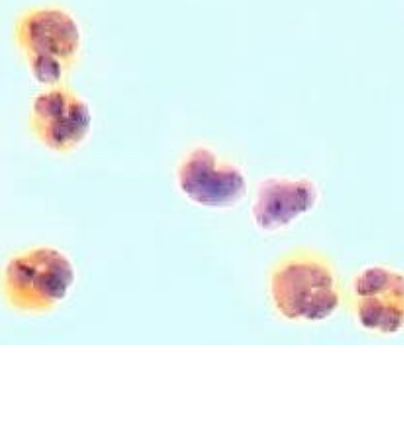

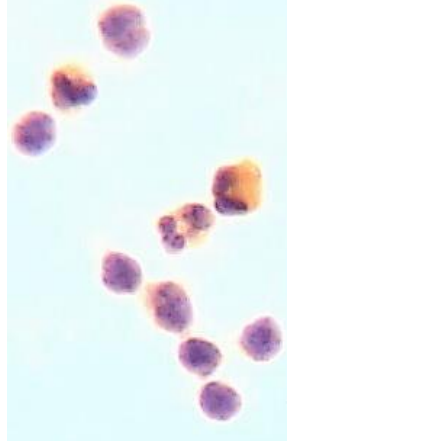
19. Image P35	20. Image P36	21. Image P37
		
Monosit (+) : 24/32=74% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/C	Monosit (+) : 45/51=88% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 27/40=68% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G
22. Image P39	23. Image P40	24. Image P42
		
Monosit (+) : 64/74=86% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 28/67=42% D543N: G/A, 3UTR: +/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 47/80=59% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G
25. Image p43	26. Image P45	27. Image P46
		
Monosit (+) : 48/65=74% D543N: G/A, 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 45/75=60% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 34/56=61% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G

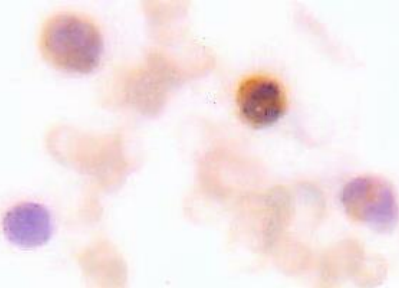
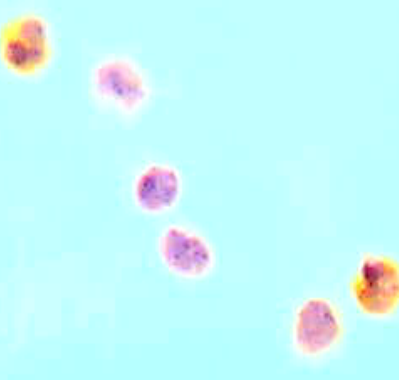
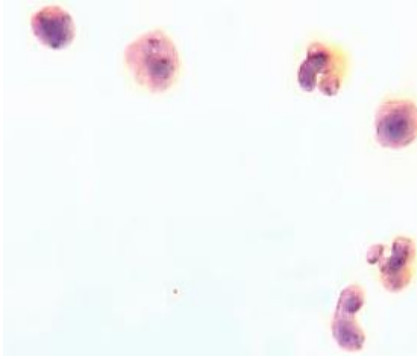

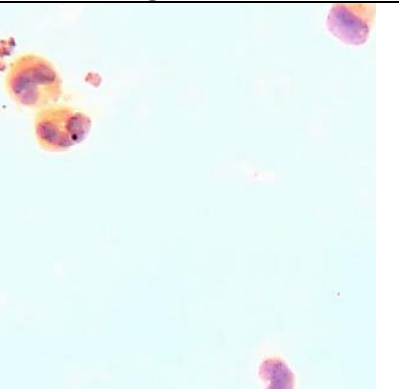

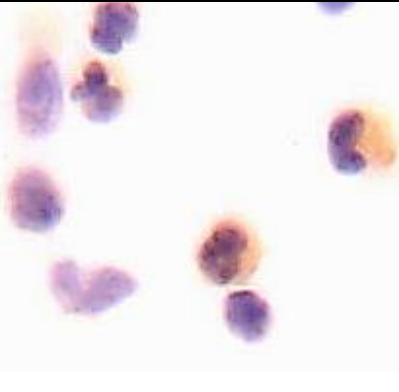
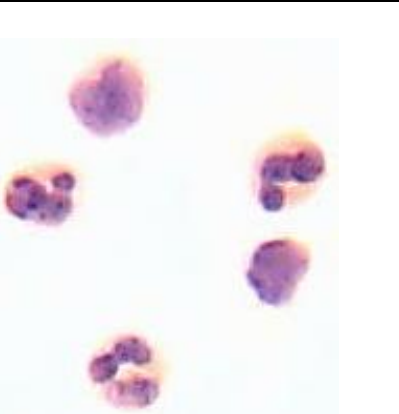
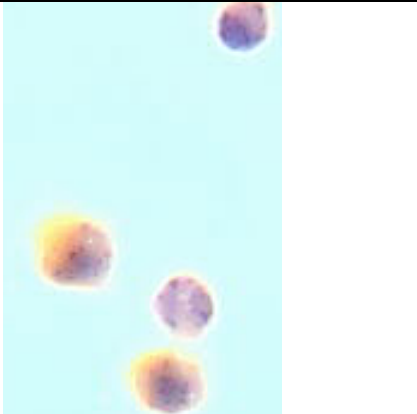
28. Image P47	29. Image P48	30. Image P54
		
Monosit (+) : 38/55=69% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 24/29=82% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 26/40=65% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G
31. Image P56	32. Image P57	33. Image P58
		
Monosit (+) : 36/55=66% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 28/57=49% D543N: G/A, 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 21/49=43% D543N: G/A, 3UTR: +/- INT4 : G/G
34. Image P60	35. Image P61	36. Image P62
		
Monosit (+) : 22/25=88% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 27/32=84% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 64/83=77% D543N: G/A, 3UTR: +/- INT4 : G/G

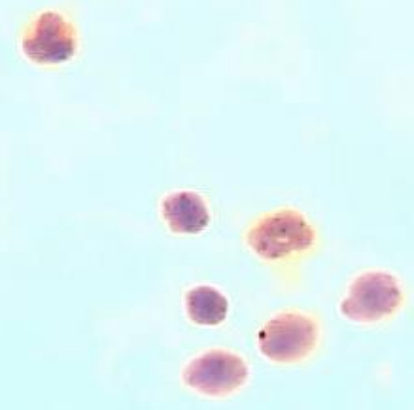
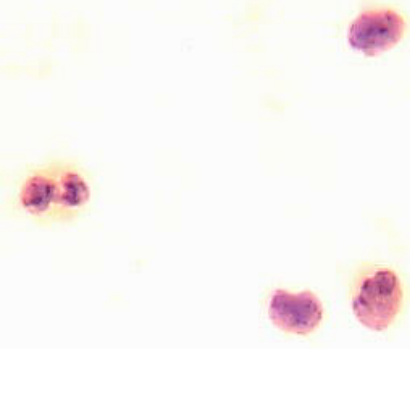

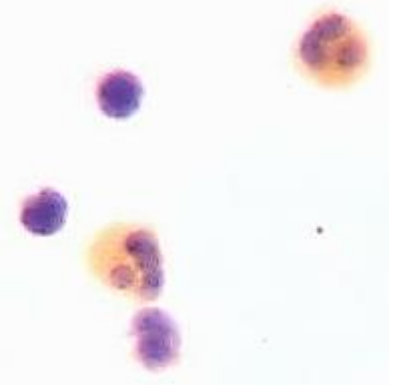
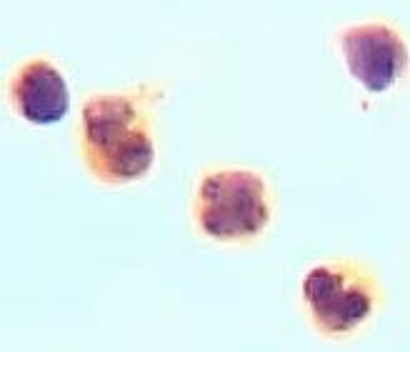
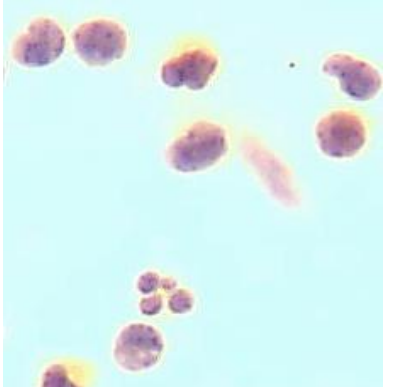
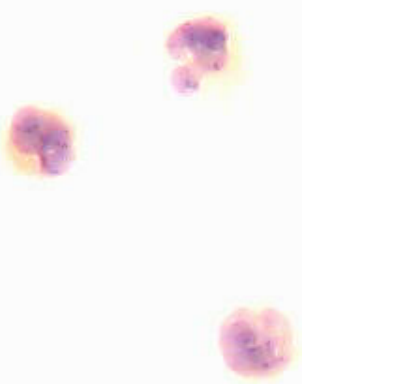
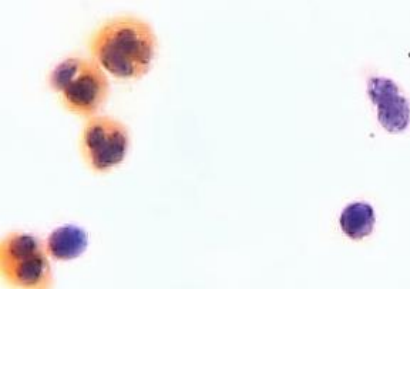
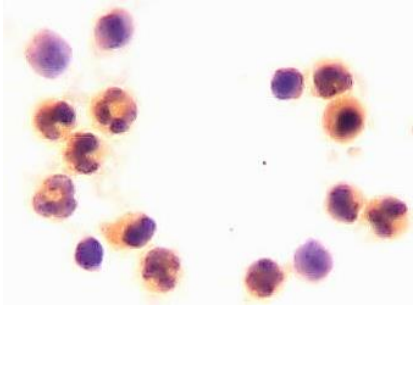
37. Image P65	38. Image P68	39. Image P69
		
<p>Monosit (+) : 28/56=50% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 25/35=71% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/C</p>	<p>Monosit (+) : 31/44=70% D543N: G/A, 3UTR: +/- INT4 : G/G</p>
40. Image P70	41. Image P71	42. Image P74
		
<p>Monosit (+) : 26/38=68% D543N: G/A, 3UTR: +/- INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 35/47=75% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 43/59=73% D543N: G/A, 3UTR: +/- INT4 : G/G</p>
43. Image P75	44. Image	45. Image
		
<p>Monosit (+) : 24/36=67% D543N: G/G, 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>		

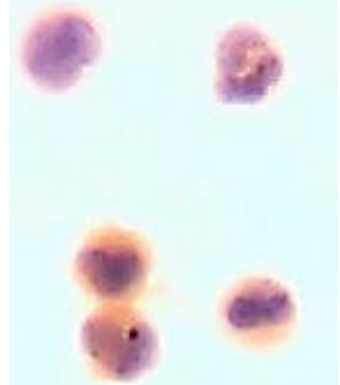
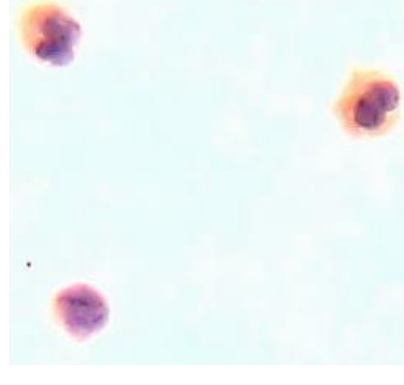
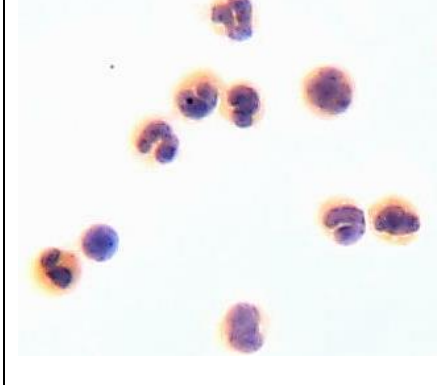
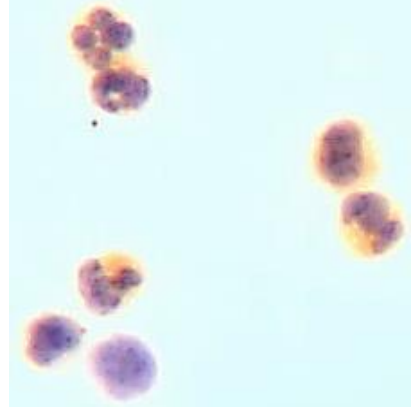
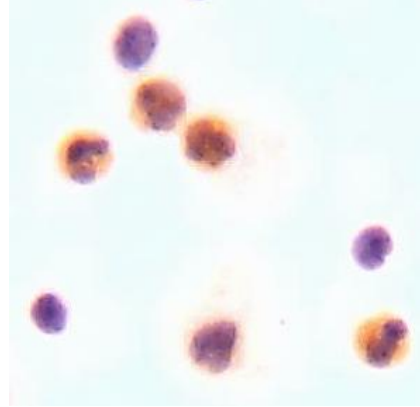
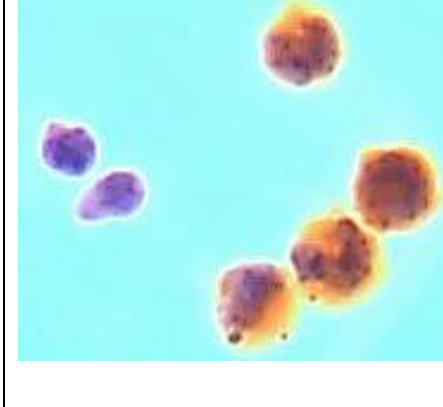
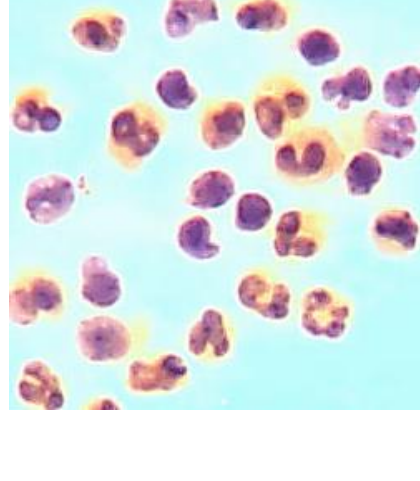
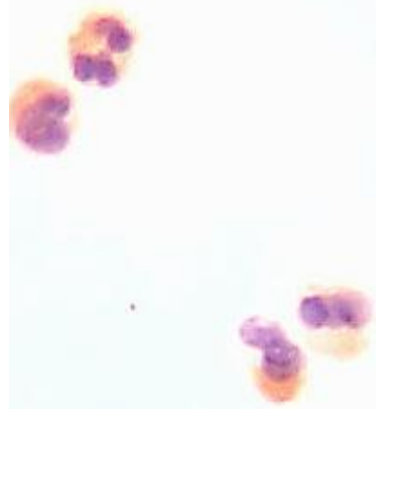
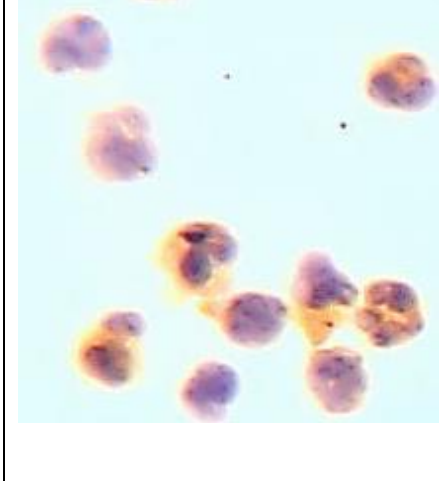
LAMPIRAN 9. Hasil Imunositokimia mendeteksi protein NRAMP1 Penderita TB paru dengan USB PC Camera 301P perbesaran 40x / 20 lap.pandang

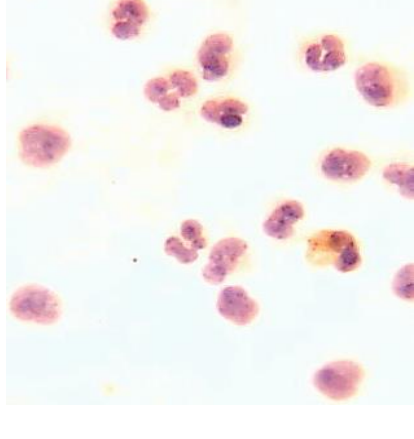
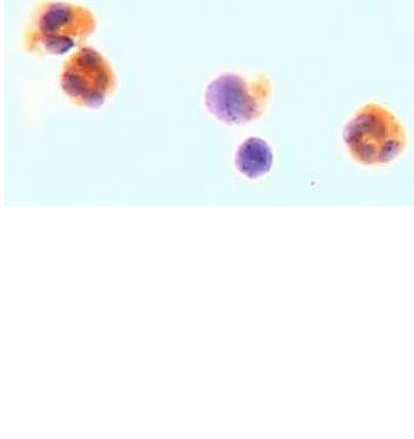
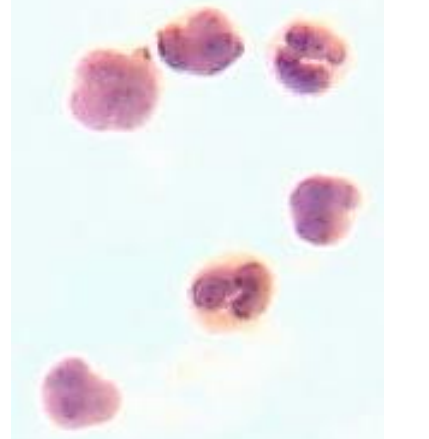
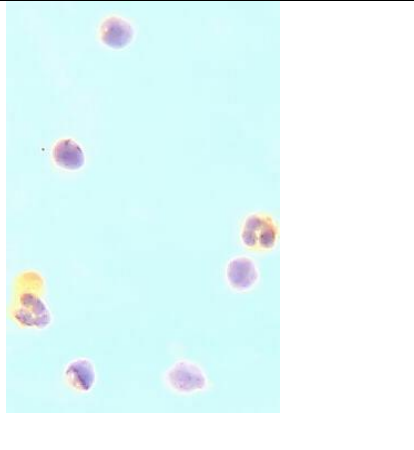
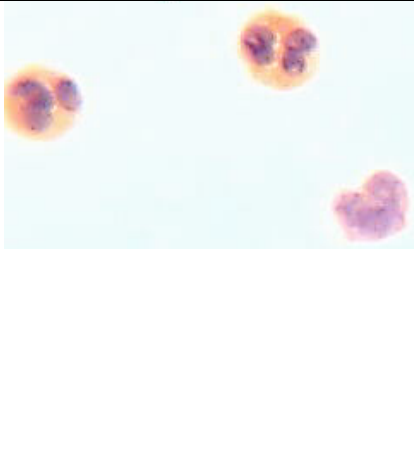
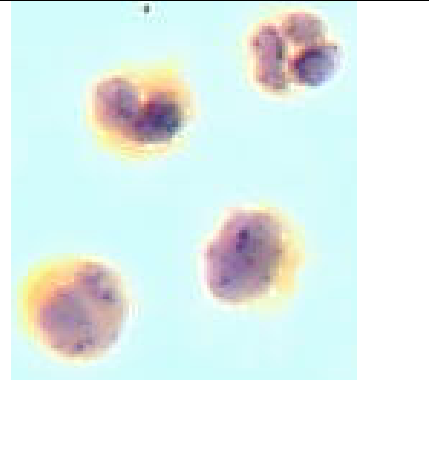
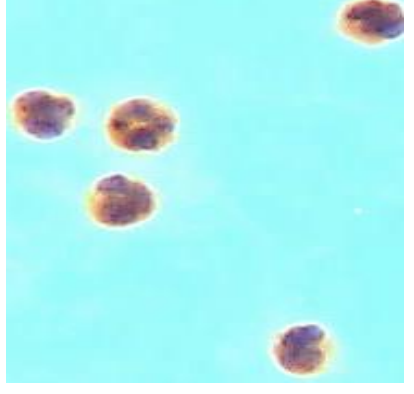
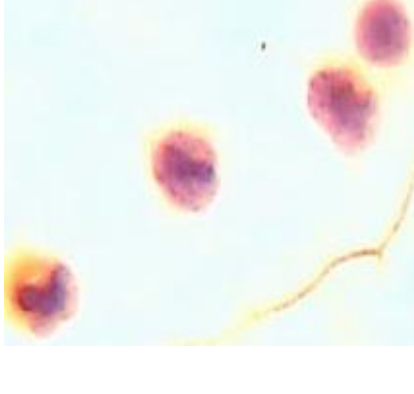
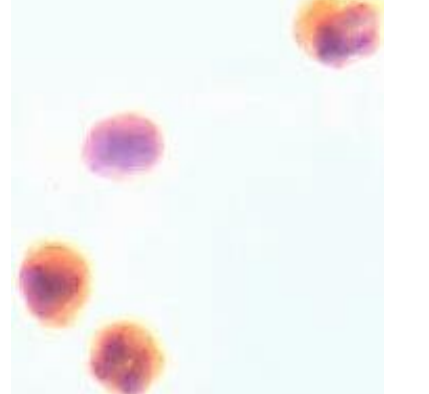
<p>1. Image T19</p> 	<p>2. Image T26</p> 	<p>3. Image T27</p> 
<p>Monosit (+) : 45/67=67% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 22/28=78% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 10/40=25% D543N: G/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G</p>
<p>4. Image T28</p> 	<p>5. Image T29</p> 	<p>6. Image T31</p> 
<p>Monosit (+) : 25/32=76% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 24/77=31% D543N: G/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 37/55=67% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>
<p>7. Image T35</p> 	<p>8. Image T30</p> 	<p>9. Image T45</p> 
<p>Monosit (+) : 24/41=59% D543N: G/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 20/30=67% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 36/46=78% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>

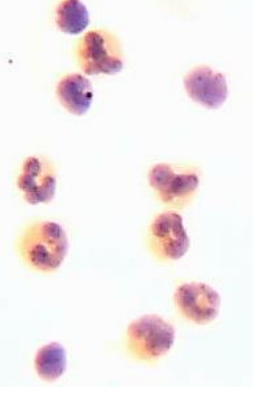
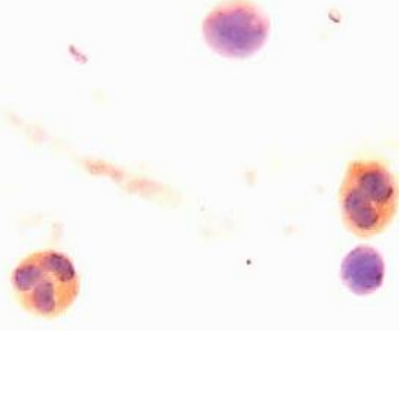
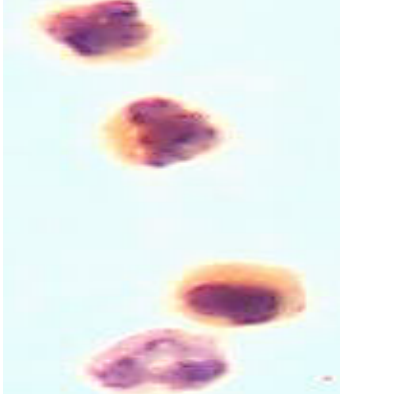

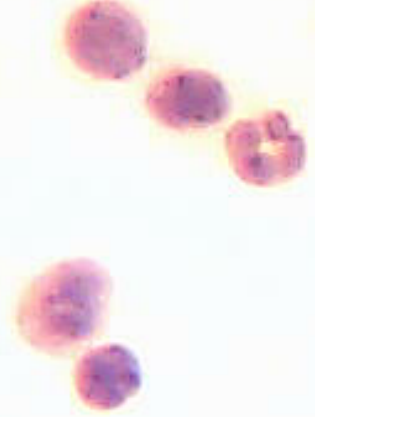
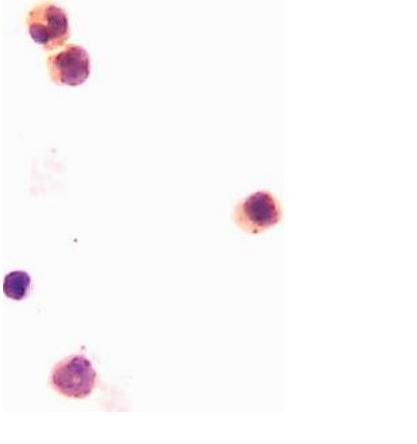
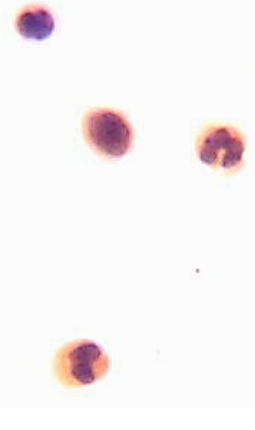
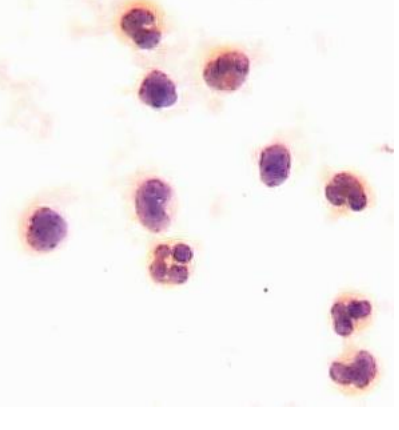
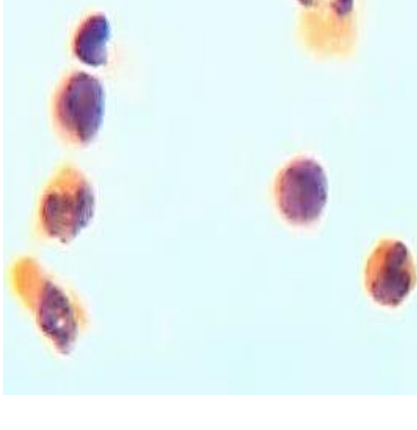
10. Image T43	11. Image T49	12. Image T50
		
Monosit (+) : 26/43=60% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 38/51=75% D543N: G/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 42/88=48% D543N: G/A ; 3UTR: +/- INT4 : G/G
13. Image T59	14. Image T63	15. Image T66
		
Monosit (+) : 37/142=26% D543N: G/A; 3UTR: +/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 36/102=35% D543N: G/A ; 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 12/92=13% D543N: A/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G
16. Image T72	17. Image T74	18. Image T78
		
Monosit (+) : 48/72=67% D543N: G/G ; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 24/34=70% D543N: G/A; 3UTR: +/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 36/51=71% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G

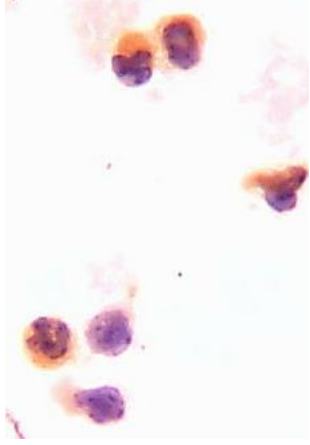
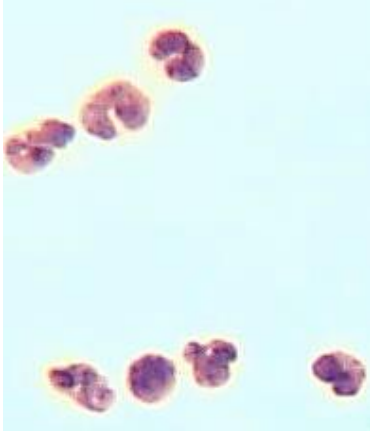
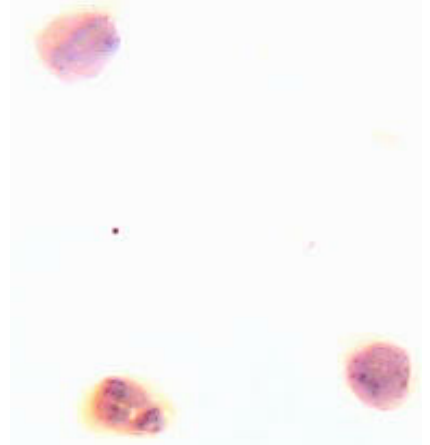
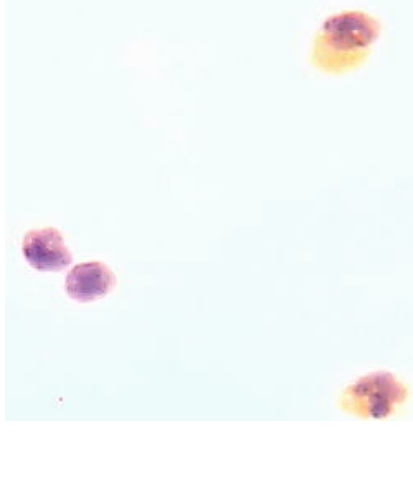
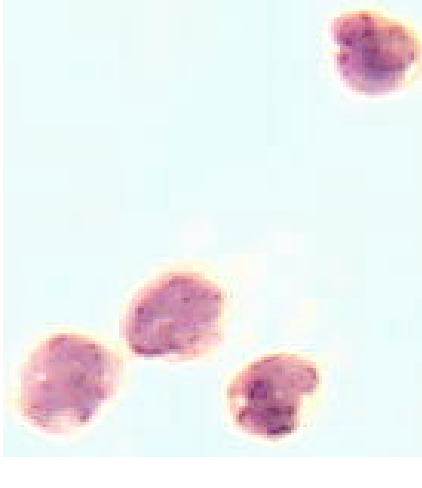
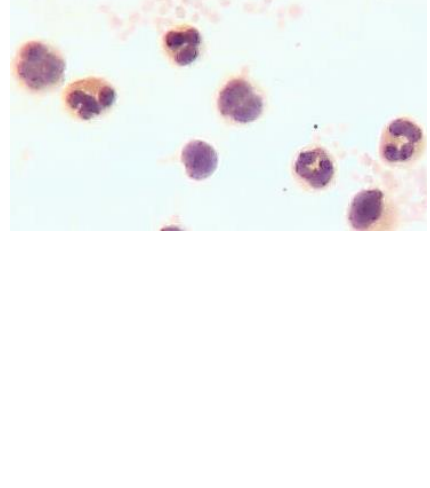
19. Image T76	20. Image T79	21. Image T81
		
Monosit (+) : 27/50=54% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 32/71=45% D543N: A/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 25/60=42% D543N: G/A ; 3UTR: -/- INT4 : G/G
22. Image T93	23. Image T99	24. Image T102
		
Monosit (+) : 32/50=64% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 37/52=71% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 0/50=0% D543N: A/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G
25. Image T103	26. Image T105	27. Image T106
		
Monosit (+) : 38/95=40% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 28/46=61% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 33/42=79% D543N: G/G ; 3UTR: +/+ INT4 : G/G

<p>28. Image T104</p> 	<p>29. Image T126</p> 	<p>30. Image T114</p> 
<p>Monosit (+) : 31/63=49% D543N: A/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 38/46=83% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 50/50=100% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>
<p>31. Image T123</p> 	<p>32. Image T131</p> 	<p>33. Image T133</p> 
<p>Monosit (+) : 43/67=64% D543N: G/G ; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 49/73=67% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 36/124=29% D543N: G/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G</p>
<p>34. Image T135</p> 	<p>35. Image T136</p> 	<p>36. Image T137</p> 
<p>Monosit (+) : 37/65=57% D543N: G/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 46/74=62% D543N: G/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 96/133=72% D543N: G/A ; 3UTR: -/- INT4 : G/G</p>

37. Image T138	38. Image T139	39. Image T140
		
Monosit (+) : 34/90=38% D543N: G/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 45/60=75% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 63/70=90% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G
40. Image T141	41. Image T142	42. Image T143
		
Monosit (+) : 54/72=75% D543N: G/A; 3UTR: +/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 36/77=47% D543N: G/A ; 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 39/66=59% D543N: G/A ; 3UTR: +/- INT4 : G/G
43. Image T144	44. Image T146	45. Image T147
		
Monosit (+) : 98/204=48% D543N: G/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 41/76=54% D543N: G/A; 3UTR: +/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 58/81=72% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G

46. Image T124	47. Image T149	48. Image T151
		
Monosit (+) : 32/133=24% D543N: G/A ; 3UTR: +/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 45/55=82% D543N: G/A ; 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 29/74=39% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G
49. Image T152	50. Image T153	51. Image T154
		
Monosit (+) : 35/88=40% D543N: G/G ; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 21/34=62% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 45/58=78% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G
52. Image T155	53. Image T159	54. Image T161
		
Monosit (+) : 52/55=95% D543N: G/A; 3UTR: +/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 36/45=80% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/C	Monosit (+) : 48/56=86% D543N: G/G ; 3UTR: +/+ INT4 : G/G

55. Image T164	56. Image T167	57. Image T172
		
Monosit (+) : 47/90=52% D543N: G/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 28/56=50% D543N: A/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 45/63=71% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G
58. Image T173	59. Image T174	60. Image T175
		
Monosit (+) : 39/50=78% D543N: G/G ; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 31/46=67% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 45/56=80% D543N: G/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G
61. Image T176	62. Image T177	63. Image T179
		
Monosit (+) : 51/72=71% D543N: G/G ; 3UTR: +/+ INT4 : G/G	Monosit (+) : 42/108=39% D543N: A/A; 3UTR: -/- INT4 : G/G	Monosit (+) : 62/83=75% D543N: G/A; 3UTR: +/- INT4 : G/G

<p>64. Image T180</p> 	<p>65. Image T181</p> 	<p>66. Image T182</p> 
<p>Monosit (+) : 54/64=84% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/C</p>	<p>Monosit (+) : 25/89=28% D543N: G/A; 3UTR: +/- INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 21/78=27% D543N: G/A; 3UTR: +/- INT4 : G/G</p>
<p>67. Image T184</p>	<p>68. Image T186</p>	<p>69. Image T134</p>
		
<p>Monosit (+) : 45/60=75% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 9/69=13% D543N: G/A; 3UTR: +/- INT4 : G/G</p>	<p>Monosit (+) : 68/91=75% D543N: G/G; 3UTR: +/+ INT4 : G/G</p>

LAMPIRAN 10. Tabulasi Hasil Penelitian PCR-RFLP dan Imunositokimia

NO	KODE	SEX	UMUR	VARIAN GEN NRAMP1			IMUNOSITOKIMIA		KES (%)
				D543N	3UTR	INT4	Pembaca I	Pembaca II	
1	P2	P	37	G/A	+/-	G/G	80%	60%	70
2	P6	P	39	G/A	+/-	G/G	50%	40%	45
3	P8	P	50	G/G	+/+	G/G	75%	73%	74
4	P9	P	38	G/G	+/+	G/G	67%	64%	66
5	P11	P	53	G/A	+/-	G/G	75%	77%	76
6	P13	P	49	G/G	+/+	G/G	88%	80%	84
7	P14	L	38	G/G	+/+	G/G	78%	80%	79
8	P15	L	39	G/A	+/-	G/G	50%	75%	63
9	P16	L	37	G/G	+/+	G/G	80%	75%	78
0	P17	L	44	G/G	+/+	G/G	70%	80%	75
11	P18	P	34	G/G	+/+	G/G	75%	67%	71
12	P22	P	23	G/G	+/+	G/G	100%	100%	100
13	P23	P	51	G/G	+/+	G/G	100%	50%	75
14	P24	P	20	G/A	+/-	G/G	55%	75%	65
15	P25	L	53	G/A	+/-	G/G	60%	50%	55
16	P26	P	46	G/G	+/+	G/G	75%	75%	75
17	P28	L	48	G/A	+/-	G/G	50%	57%	54
18	P32	L	28	G/G	+/+	G/C	67%	83%	75
19	P35	P	37	G/G	+/+	G/C	80%	67%	74
20	P36	P	42	G/G	+/+	G/G	90%	86%	88
21	P37	L	41	G/G	+/+	G/G	75%	60%	68
22	P39	P	54	G/G	+/+	G/G	83%	88%	86
23	P40	P	46	G/A	+/-	G/G	67%	17%	42
24	P42	P	45	G/G	+/+	G/G	67%	50%	59
25	P43	P	53	G/A	-/-	G/G	80%	67%	74
26	P45	L	35	G/G	+/+	G/G	63%	56%	60
27	P46	P	43	G/G	+/+	G/G	50%	71%	61
28	P47	L	42	G/G	+/+	G/G	71%	67%	69
29	P48	P	25	G/G	+/+	G/G	83%	80%	82
30	P54	P	53	G/G	+/+	G/G	80%	50%	65
31	P56	P	20	G/G	+/+	G/G	60%	71%	66
32	P57	L	31	G/A	-/-	G/G	40%	57%	49
33	P58	L	34	G/A	+/-	G/G	60%	25%	43
34	P60	P	37	G/G	+/+	G/G	75%	100%	88
35	P61	L	41	G/G	+/+	G/G	67%	100%	84
36	P62	P	40	G/A	+/-	G/G	80%	73%	77
37	P65	P	33	G/G	+/+	G/G	60%	40%	50
38	P68	L	29	G/G	+/+	G/C	75%	67%	71
39	P69	L	30	G/A	+/-	G/G	80%	60%	70
40	P70	P	48	G/A	+/-	G/G	75%	50%	68
41	P71	L	37	G/G	+/+	G/G	67%	83%	75
42	P74	L	52	G/A	+/-	G/G	63%	83%	73

43	P75	L	30	G/G	+/+	G/G	67%	67%	67
44	T19	P	21	G/G	+/+	G/G	67%	%	67
45	T26	P	35	G/G	+/+	G/G	78%	%	78
46	T27	L	35	G/A	-/-	G/G	25%	%	25
47	T28	P	18	G/G	+/+	G/G	76%	%	76
48	T29	P	49	G/A	-/-	G/G	31%	%	31
49	T30	P	32	G/G	+/+	G/G	67%	%	67
50	T31	P	21	G/G	+/+	G/G	67%	%	67
51	T35	L	24	G/A	-/-	G/G	67%	50%	59
52	T43	L	48	G/G	+/+	G/G	60%	%	60
53	T45	L	25	G/G	+/+	G/G	78%	%	78
54	T49	P	26	G/A	-/-	G/G	83%	67%	75
55	T50	L	25	G/A	+/-	G/G	46%	50%	48
56	T59	L	34	G/A	+/-	G/G	27%	25%	26
57	T63	L	34	G/A	-/-	G/G	45%	25%	35
58	T66	L	27	A/A	-/-	G/G	25%	0%	13
59	T72	P	31	G/G	+/+	G/G	63%	71%	67
60	T74	L	27	G/A	+/-	G/G	80%	60%	70
61	T76	L	32	G/G	+/+	G/G	75%	33%	54
62	T78	L	35	G/G	+/+	G/G	67%	75%	71
63	T79	L	45	A/A	-/-	G/G	57%	33%	45
64	T81	L	25	G/A	-/-	G/G	50%	33%	42
65	T93	L	26	G/G	+/+	G/G	67%	60%	64
66	T99	P	44	G/G	+/+	G/G	67%	75%	71
67	T102	L	21	A/A	-/-	G/G	0%	0%	0
68	T103	P	28	G/G	+/+	G/G	50%	29%	40
69	T104	P	21	A/A	-/-	G/G	67%	40%	49
70	T105	L	40	G/G	+/+	G/G	71%	50%	61
71	T106	P	18	G/G	+/+	G/G	83%	75%	79
72	T114	L	36	G/G	+/+	G/G	100%	100%	100
73	T123	L	28	G/G	+/+	G/G	67%	60%	64
74	T124	L	25	G/A	+/-	G/G	48%	0%	24
75	T126	P	53	G/G	+/+	G/G	83%	%	83
76	T131	P	25	G/G	+/+	G/G	67%	%	67
77	T133	L	40	G/A	+/-	G/G	14%	44%	29
78	T134	P	57	G/G	+/+	G/G	75%	75%	75
79	T135	P	21	G/A	-/-	G/G	57%	%	57
80	T136	L	32	G/A	-/-	G/G	57%	67%	62
81	T137	P	45	G/A	-/-	G/G	69%	75%	72
82	T138	L	42	G/A	-/-	G/G	0%	75%	38
83	T139	P	19	G/G	+/+	G/G	83%	67%	75
84	T140	P	20	G/G	+/+	G/G	90%	%	90
85	T141	P	25	G/A	+/-	G/G	79%	71%	75
86	T142	P	19	G/A	-/-	G/G	50%	44%	47
87	T143	P	28	G/A	+/-	G/G	50%	67%	59
88	T144	L	28	G/A	-/-	G/G	62%	33%	48
89	T146	P	38	G/A	+/-	G/G	75%	33%	54
90	T147	L	30	G/G	+/+	G/G	73%	70%	72

91	T149	L	31	G/A	+/-	G/G	75%	89%	82
92	T151	L	27	G/G	+/+	G/G	44%	33%	39
93	T152	P	36	G/G	+/+	G/G	29%	50%	40
94	T153	L	25	G/G	+/+	G/G	57%	67%	62
95	T154	L	40	G/G	+/+	G/G	56%	100%	78
96	T155	P	29	G/A	+/-	G/G	90%	100%	95
97	T159	L	45	G/G	+/+	G/C	60%	100%	80
98	T161	L	31	G/G	+/+	G/G	71%	100%	86
99	T164	L	24	G/A	-/-	G/G	64%	40%	52
100	T167	L	49	A/A	-/-	G/G	50%	50%	50
101	T172	P	25	G/G	+/+	G/G	67%	75%	71
102	T173	L	19	G/G	+/+	G/G	80%	75%	78
103	T174	L	47	G/G	+/+	G/G	67%	67%	67
104	T175	P	46	G/A	-/-	G/G	60%	100%	80
105	T176	L	35	G/G	+/+	G/G	75%	67%	71
106	T177	L	48	A/A	-/-	G/G	10%	67%	39
107	T179	L	37	G/A	+/-	G/G	67%	83%	75
108	T180	P	35	G/G	+/+	G/C	67%	100%	84
109	T181	P	26	G/A	+/-	G/G	25%	30%	28
110	T182	P	25	G/A	+/-	G/G	20%	33%	27
111	T184	L	27	G/G	+/+	G/G	100%	50%	75
112	T186	P	35	G/A	+/-	G/G	25%	0%	13

Lampiran 11. Analisis Statistik dengan SPSS 13.0 for Windows

1. Uji *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi usia antara kelompok Penderita TB paru dan Perawat

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
KEL * SEX	112	100.0%	0	.0%	112	100.0%

KEL * SEX Crosstabulation

			SEX		Total
			Laki-laki	Perempuan	
KEL	Perawat	Count	18	25	43
		% within KEL	41.9%	58.1%	100.0%
	Pasien	Count	38	31	69
		% within KEL	55.1%	44.9%	100.0%
Total		Count	56	56	112
		% within KEL	50.0%	50.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.850(b)	1	.174		
Continuity Correction(a)	1.359	1	.244		
Likelihood Ratio	1.856	1	.173		
Fisher's Exact Test				.244	.122
N of Valid Cases	112				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 21.50.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for KEL (Perawat / Pasien)	.587	.272	1.268
For cohort SEX = Laki-laki	.760	.504	1.147
For cohort SEX = Perempuan	1.294	.899	1.862
N of Valid Cases	112		

2. Uji *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi jenis kelamin antara kelompok Penderita TB paru dan Perawat.

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
KEL * Usia	112	100.0%	0	.0%	112	100.0%

KEL * Usia Crosstabulation

			Usia			Total
			usia <25	24 < usia <45	usia >44	
KEL	Perawat	Count	3	26	14	43
		% within KEL	7.0%	60.5%	32.6%	100.0%
	Pasien	Count	13	45	11	69
		% within KEL	18.8%	65.2%	15.9%	100.0%
Total		Count	16	71	25	112
		% within KEL	14.3%	63.4%	22.3%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5.981(a)	2	.050
Likelihood Ratio	6.155	2	.046
Linear-by-Linear Association	5.922	1	.015
N of Valid Cases	112		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6.14.

3. Uji *Chi-Square* menganalisis perbedaan distribusi varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* antara kelompok penderita TB paru dan Perawat

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
KEL * d543n	112	100.0%	0	.0%	112	100.0%

KEL * d543n Crosstabulation

			d543n			Total
			g/g	g/a	a/a	
KEL	Perawat	Count	28	15	0	43
		% within KEL	65.1%	34.9%	.0%	100.0%
		% within d543n	44.4%	34.9%	.0%	38.4%
	Pasien	Count	35	28	6	69
		% within KEL	50.7%	40.6%	8.7%	100.0%
		% within d543n	55.6%	65.1%	100.0%	61.6%
Total	Count		63	43	6	112
	% within KEL		56.3%	38.4%	5.4%	100.0%
	% within d543n		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	4.938(a)	2	.085	.093		
Likelihood Ratio	6.998	2	.030	.044		
Fisher's Exact Test	4.829			.098		
Linear-by-Linear Association	3.919(b)	1	.048	.052	.033	.018
N of Valid Cases	112					

a 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.30.

b The standardized statistic is 1.980.

4. Uji *Chi-Square* menganalisis perbedaan varian TGTG+/, TGTG+/del, dan TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* antara kelompok penderita TB paru dan Perawat

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
KEL * utr3a	112	100.0%	0	.0%	112	100.0%

KEL * utr3a Crosstabulation

			utr3a			Total
			+/+	+/-	-/-	
KEL	Perawat	Count	28	13	2	43
		% within KEL	65.1%	30.2%	4.7%	100.0%
		% within utr3a	44.4%	48.1%	9.1%	38.4%
	Pasien	Count	35	14	20	69
		% within KEL	50.7%	20.3%	29.0%	100.0%
		% within utr3a	55.6%	51.9%	90.9%	61.6%
Total	Count		63	27	22	112
	% within KEL		56.3%	24.1%	19.6%	100.0%
	% within utr3a		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	10.048(a)	2	.007	.006		
Likelihood Ratio	11.820	2	.003	.003		
Fisher's Exact Test	10.971			.004		
Linear-by-Linear Association	6.301(b)	1	.012	.014	.007	.004
N of Valid Cases	112					

a 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8.45.

b The standardized statistic is 2.510.

5. Uji Chi-Square menganalisis perbedaan antara varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen NRAMP1 antara kelompok penderita TB paru dan Perawat

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
KEL * int4	112	100.0%	0	.0%	112	100.0%

KEL * int4 Crosstabulation

		int4		Total	
		g/g	g/c		
KEL	Perawat	Count	40	3	43
		% within KEL	93.0%	7.0%	100.0%
	Pasien	Count	67	2	69
		% within KEL	97.1%	2.9%	100.0%
Total		Count	107	5	112
		% within KEL	95.5%	4.5%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.033(b)	1	.309		
Continuity Correction(a)	.298	1	.585		
Likelihood Ratio	.998	1	.318		
Fisher's Exact Test				.370	.286
N of Valid Cases	112				

a Computed only for a 2x2 table

b 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.92.

6. Uji *Independent T* menganalisis perbedaan rata-rata ekspresi protein NRAMP1 antara kelompok Penderita TB paru dan Perawat

T-Test

Group Statistics

	KEL	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
nramp1	Perawat	43	69.5116	12.58755	1.91958
	Pasien	69	59.1449	21.34608	2.56977

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
nramp1	Equal variances assumed	14.668	.000	2.884	110	.005	10.36670	3.59397	3.24429	17.48911
	Equal variances not assumed			3.232	109.739	.002	10.36670	3.20757	4.00988	16.72352

7. Uji *OneWay Anova* menganalisis perbedaan rata-rata ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen NRAMP1 pada kelompok perawat

Oneway

Descriptives

nramp1

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
g/g	28	73.7500	10.58169	1.99975	69.6468	77.8532	50.00	100.00
g/a	15	61.6000	12.50600	3.22903	54.6744	68.5256	42.00	77.00
Total	43	69.5116	12.58755	1.91958	65.6378	73.3855	42.00	100.00

ANOVA

nramp1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1441.894	1	1441.894	11.341	.002
Within Groups	5212.850	41	127.143		
Total	6654.744	42			

8. Uji Oneway Anova menganalisis perbedaan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N gen *NRAMP1* dan ekspresi protein NRAMP1 pada kelompok Penderita TB paru

Oneway

Descriptives

nramp1

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
g/g	35	70.2000	13.13236	2.21977	65.6889	74.7111	39.00	100.00
g/a	28	51.0000	21.57330	4.07697	42.6347	59.3653	13.00	95.00
a/a	6	32.6667	21.03965	8.58940	10.5869	54.7464	.00	50.00
Total	69	59.1449	21.34608	2.56977	54.0170	64.2728	.00	100.00

ANOVA

nramp1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10341.617	2	5170.809	16.532	.000
Within Groups	20642.933	66	312.772		
Total	30984.551	68			

9. Uji Oneway Anova menganalisis perbedaan rata-rata ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada kelompok perawat

Oneway

Descriptives

nramp1	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
+/+	28	73.7500	10.58169	1.99975	69.6468	77.8532	50.00	100.00
+/-	13	61.6154	12.50692	3.46880	54.0575	69.1732	42.00	77.00
-/-	2	61.5000	17.67767	12.50000	-97.3276	220.3276	49.00	74.00
Total	43	69.5116	12.58755	1.91958	65.6378	73.3855	42.00	100.00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1441.917	2	720.959	5.532	.008
Within Groups	5212.827	40	130.321		
Total	6654.744	42			

10. Uji *Oneway Anova* menganalisis perbedaan rata-rata ekspresi protein NRAMP1 dengan varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR gen *NRAMP1* pada penderita TB paru

Oneway

Descriptives

nramp1	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
+/+	35	70.2000	13.13236	2.21977	65.6889	74.7111	39.00	100.00
+/-	14	54.0000	26.47205	7.07495	38.7155	69.2845	13.00	95.00
-/-	20	43.4000	18.36014	4.10545	34.8072	51.9928	.00	75.00
Total	69	59.1449	21.34608	2.56977	54.0170	64.2728	.00	100.00

ANOVA

nramp1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9606.151	2	4803.075	14.828	.000
Within Groups	21378.400	66	323.915		
Total	30984.551	68			

11. Uji *Oneway Anova* menganalisis perbedaan rata-rata ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen *NRAMP1* pada kelompok Perawat

Oneway

Descriptives

nramp1

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
g/g	40	69.2250	13.00786	2.05672	65.0649	73.3851	42.00	100.00
g/c	3	73.3333	2.08167	1.20185	68.1622	78.5045	71.00	75.00
Total	43	69.5116	12.58755	1.91958	65.6378	73.3855	42.00	100.00

ANOVA

nramp1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	47.103	1	47.103	.292	.592
Within Groups	6607.642	41	161.162		
Total	6654.744	42			

12. Uji *Oneway Anova* menganalisis perbedaan rata-rata ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen NRAMP1 pada kelompok Penderita TB paru

Oneway

Descriptives

nramp1

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
g/g	67	58.4627	21.28474	2.60035	53.2709	63.6544	.00	100.00
g/c	2	82.0000	2.82843	2.00000	56.5876	107.4124	80.00	84.00
Total	69	59.1449	21.34608	2.56977	54.0170	64.2728	.00	100.00

ANOVA

nramp1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1075.894	1	1075.894	2.410	.125
Within Groups	29908.657	67	446.398		
Total	30984.551	68			

13. Analisis Univariat / uji anova interaksi dua factor menganalisis interaksi antara varian G/G, G/A, A/A genotip D543N, varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del, varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen NRAMP1 dengan ekspresi protein NRAMP1 pada perawat

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		N
gg	.00	15
	1.00	28
ga	.00	28
	1.00	15
aa	.00	43
	1.00	15
upp	.00	15
	1.00	28
upn	.00	29
	1.00	14
unn	.00	41
	1.00	2
igg	.00	3
	1.00	40
igc	.00	40
	1.00	3

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: nramp1

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1755.001(a)	4	438.750	3.403	.018
Intercept	58896.065	1	58896.065	456.769	.000
gg	.000	0	.	.	.
ga	.000	0	.	.	.
aa	.000	0	.	.	.
upp	.000	0	.	.	.
upn	312.500	1	312.500	2.424	.128
unn	147.780	1	147.780	1.146	.291
igg	.000	0	.	.	.
igc	.000	0	.	.	.
gg * ga	.000	0	.	.	.
gg * aa	.000	0	.	.	.
ga * aa	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa	.000	0	.	.	.
gg * upp	.000	0	.	.	.
ga * upp	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp	.000	0	.	.	.
aa * upp	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upp	.000	0	.	.	.
gg * upn	.000	0	.	.	.
ga * upn	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn	.000	0	.	.	.
aa * upn	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upn	.000	0	.	.	.
upp * upn	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * upn	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * upn	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * upn	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upp * upn	.000	0	.	.	.
gg * unn	.000	0	.	.	.
ga * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * unn	.000	0	.	.	.
aa * unn	.000	0	.	.	.
gg * aa * unn	.000	0	.	.	.
ga * aa * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * unn	.000	0	.	.	.
upp * unn	.000	0	.	.	.
gg * upp * unn	.000	0	.	.	.
ga * upp * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * unn	.000	0	.	.	.
aa * upp * unn	.000	0	.	.	.

gg * aa * upp * unn	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upp * unn	.000	0	.	.	.
upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * upn * unn	.000	0	.	.	.
ga * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * unn	.000	0	.	.	.
aa * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * unn	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upn * unn	.000	0	.	.	.
upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * igg	.000	0	.	.	.
ga * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * igg	.000	0	.	.	.
aa * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * igg	.000	0	.	.	.
upp * igg	.000	0	.	.	.
gg * upp * igg	.000	0	.	.	.
ga * upp * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * igg	.000	0	.	.	.
aa * upp * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upp * igg	.000	0	.	.	.
upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * upn * igg	.000	0	.	.	.
ga * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * igg	.000	0	.	.	.
aa * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upn * igg	.000	0	.	.	.
upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * unn * igg	.000	0	.	.	.

gg * ga * unn * igg	.000	0	.	.	.
aa * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * unn * igg	.000	0	.	.	.
upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
aa * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
aa * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
upp * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * igc	.000	0	.	.	.
ga * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * igc	.000	0	.	.	.
aa * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * igc	.000	0	.	.	.
upp * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upp * igc	.000	0	.	.	.
upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * upn * igc	.000	0	.	.	.
ga * upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * igc	.000	0	.	.	.
aa * upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upn * igc	.000	0	.	.	.
upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.

gg * aa * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * unn * igc	.000	0	.	.	.
aa * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * unn * igc	.000	0	.	.	.
upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
aa * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
upp * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * igg * igc	.000	0	.	.	.
upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
upp * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.

gg * upp * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
upp * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
upn * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * upn * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * upn * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * upn * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
upp * upn * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
Error	4899.744	38	128.941		
Total	214425.000	43			
Corrected Total	6654.744	42			

a R Squared = .264 (Adjusted R Squared = .186)

14. Analisis Univariat / uji anova interaksi dua factor menganalisis interaksi antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N, varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del, varian G/G, G/C genotip INT4 gen NRAMP1 pada Penderita TB paru

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		N
gg	.00	34
	1.00	35
ga	.00	41
	1.00	28
aa	.00	63
	1.00	6
upp	.00	34
	1.00	35
upn	.00	55
	1.00	14
unn	.00	49
	1.00	20
igg	.00	2
	1.00	67
igc	.00	67
	1.00	2

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: nramp1

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10888.975(a)	4	2722.244	8.670	.000
Intercept	82790.139	1	82790.139	263.668	.000
gg	.000	0	.	.	.
ga	.000	0	.	.	.
aa	.000	0	.	.	.
upp	.000	0	.	.	.
upn	.000	0	.	.	.
unn	.000	0	.	.	.
igg	.000	0	.	.	.
igc	.000	0	.	.	.
gg * ga	.000	0	.	.	.
gg * aa	.000	0	.	.	.
ga * aa	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa	.000	0	.	.	.
gg * upp	.000	0	.	.	.
ga * upp	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp	.000	0	.	.	.
aa * upp	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upp	.000	0	.	.	.
gg * upn	.000	0	.	.	.
ga * upn	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn	.000	0	.	.	.
aa * upn	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upn	.000	0	.	.	.
upp * upn	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * upn	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * upn	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * upn	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upp * upn	.000	0	.	.	.
gg * unn	.000	0	.	.	.
ga * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * unn	.000	0	.	.	.
aa * unn	.000	0	.	.	.
gg * aa * unn	.000	0	.	.	.
ga * aa * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * unn	.000	0	.	.	.
upp * unn	.000	0	.	.	.
gg * upp * unn	.000	0	.	.	.
ga * upp * unn	.000	0	.	.	.

gg * ga * upp * unn	.000	0	.	.	.
aa * upp * unn	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * unn	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upp * unn	.000	0	.	.	.
upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * upn * unn	.000	0	.	.	.
ga * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * unn	.000	0	.	.	.
aa * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * unn	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upn * unn	.000	0	.	.	.
upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * upn * unn	.000	0	.	.	.
gg * igg	.000	0	.	.	.
ga * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * igg	.000	0	.	.	.
aa * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * igg	.000	0	.	.	.
upp * igg	.000	0	.	.	.
gg * upp * igg	.000	0	.	.	.
ga * upp * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * igg	.000	0	.	.	.
aa * upp * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upp * igg	.000	0	.	.	.
upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * upn * igg	.000	0	.	.	.
ga * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * igg	.000	0	.	.	.
aa * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upn * igg	.000	0	.	.	.
upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * upn * igg	.000	0	.	.	.
unn * igg	.000	0	.	.	.

gg * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * unn * igg	.000	0	.	.	.
aa * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * unn * igg	.000	0	.	.	.
upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
aa * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * unn * igg	.000	0	.	.	.
upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
aa * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
upp * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * unn * igg	.000	0	.	.	.
gg * igc	.000	0	.	.	.
ga * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * igc	.000	0	.	.	.
aa * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * igc	.000	0	.	.	.
upp * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upp * igc	.000	0	.	.	.
upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * upn * igc	.000	0	.	.	.
ga * upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * igc	.000	0	.	.	.
aa * upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * upn * igc	.000	0	.	.	.
upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.

gg * ga * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * upn * igc	.000	0	.	.	.
unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * unn * igc	.000	0	.	.	.
aa * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * unn * igc	.000	0	.	.	.
upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * unn * igc	.000	0	.	.	.
upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
aa * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
upp * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * unn * igc	.000	0	.	.	.
igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * aa * igg * igc	.000	0	.	.	.
upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * upp * igg * igc	.000	0	.	.	.
upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.

ga * aa * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
upp * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * upn * igg * igc	.000	0	.	.	.
unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * ga * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * aa * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * aa * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
upp * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * upp * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * upp * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * upp * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
upn * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
gg * upn * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
ga * upn * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
aa * upn * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
upp * upn * unn * igg * igc	.000	0	.	.	.
Error	20095.576	64	313.993		
Total	272355.000	69			
Corrected Total	30984.551	68			

a R Squared = .351 (Adjusted R Squared = .311)

15. Uji Korelasi Spearman menganalisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N, varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR, varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 pada Perawat

Nonparametric Correlations Spearman's rho

		nramp1	gg	ga	aa	upp	upn	unn	igg	igc
nramp1	Correlation Coefficient	1.000	.425(**)	-.425(**)	.	.425(**)	-.448(**)	-.125	-.092	.092
	Sig. (2-tailed)	.	.004	.004	.	.004	.003	.425	.557	.557
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43
gg	Correlation Coefficient	.425(**)	1.000	-1.000(**)	.	1.000(**)	.949(**)	.302(*)	-.200	.200
	Sig. (2-tailed)	.004	.	.000	.	.	.000	.049	.197	.197
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43
ga	Correlation Coefficient	-.425(**)	1.000(**)	1.000	.	-1.000(**)	.949(**)	.302(*)	.200	-.200
	Sig. (2-tailed)	.004	.000	.	.	.000	.000	.049	.197	.197
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43
aa	Correlation Coefficient	.	.	.	1.000
	Sig. (2-tailed)
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43
upp	Correlation Coefficient	.425(**)	1.000(**)	-1.000(**)	.	1.000	.949(**)	.302(*)	-.200	.200
	Sig. (2-tailed)	.004	.	.000	.	.	.000	.049	.197	.197
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43
upn	Correlation Coefficient	-.448(**)	-.949(**)	.949(**)	.	1.000	1.000	.082	.190	-.190
	Sig. (2-tailed)	.003	.000	.000	.	.000	.	.600	.222	.222
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43
unn	Correlation Coefficient	-.125	-.302(*)	.302(*)	.	-.302(*)	.082	1.000	.060	-.060
	Sig. (2-tailed)	.425	.049	.049	.	.049	.600	.	.700	.700
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43
igg	Correlation Coefficient	-.092	-.200	.200	.	-.200	.190	.060	1.000	1.000(**)
	Sig. (2-tailed)	.557	.197	.197	.	.197	.222	.700	.	.000
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43
igc	Correlation Coefficient	.092	.200	-.200	.	.200	-.190	-.060	1.000(**)	1.000
	Sig. (2-tailed)	.557	.197	.197	.	.197	.222	.700	.000	.
	N	43	43	43	43	43	43	43	43	43

16. Uji Korelasi Spearman menganalisis hubungan antara ekspresi protein NRAMP1 dengan varian G/G, G/A, A/A genotip D543N, varian TGTG+/, TGTG+/del, TGTGdel/del genotip 3'UTR, varian G/G, G/C, C/C genotip INT4 gen NRAMP1 pada Penderita TB paru

Nonparametric Correlations Spearman's rho

		nramp1	gg	ga	aa	upp	upn	unn	igg	igc
nramp1	Correlation Coefficient	1.000	.519(**)	-.335(**)	-.336(**)	.519(**)	-.091	-.490(**)	-.245(*)	.245(*)
	Sig. (2-tailed)	.	.000	.005	.005	.000	.455	.000	.042	.042
	N	69	69	69	69	69	69	69	69	69
gg	Correlation Coefficient	.519(**)	1.000	-.838(**)	-.313(**)	1.000(**)	-.512(**)	-.648(**)	-.170	.170
	Sig. (2-tailed)	.000	.	.000	.009	.	.000	.000	.162	.162
	N	69	69	69	69	69	69	69	69	69
ga	Correlation Coefficient	-.335(**)	-.838(**)	1.000	-.255(*)	-.838(**)	.611(**)	.383(**)	.143	-.143
	Sig. (2-tailed)	.005	.000	.	.034	.000	.000	.001	.242	.242
	N	69	69	69	69	69	69	69	69	69
aa	Correlation Coefficient	-.336(**)	-.313(**)	-.255(*)	1.000	-.313(**)	-.156	.483(**)	.053	-.053
	Sig. (2-tailed)	.005	.009	.034	.	.009	.201	.000	.663	.663
	N	69	69	69	69	69	69	69	69	69
upp	Correlation Coefficient	.519(**)	1.000(**)	-.838(**)	-.313(**)	1.000	-.512(**)	-.648(**)	-.170	.170
	Sig. (2-tailed)	.000	.	.000	.009	.	.000	.000	.162	.162
	N	69	69	69	69	69	69	69	69	69
upn	Correlation Coefficient	-.091	-.512(**)	.611(**)	-.156	-.512(**)	1.000	-.322(**)	.087	-.087
	Sig. (2-tailed)	.455	.000	.000	.201	.000	.	.007	.476	.476
	N	69	69	69	69	69	69	69	69	69
unn	Correlation Coefficient	-.490(**)	-.648(**)	.383(**)	.483(**)	-.648(**)	-.322(**)	1.000	.110	-.110
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.001	.000	.000	.007	.	.367	.367
	N	69	69	69	69	69	69	69	69	69
igg	Correlation Coefficient	-.245(*)	-.170	.143	.053	-.170	.087	.110	1.000	-1.000(**)
	Sig. (2-tailed)	.042	.162	.242	.663	.162	.476	.367	.	.000
	N	69	69	69	69	69	69	69	69	69
igc	Correlation Coefficient	.245(*)	.170	-.143	-.053	.170	-.087	-.110	1.000(**)	1.000
	Sig. (2-tailed)	.042	.162	.242	.663	.162	.476	.367	.000	.
	N	69	69	69	69	69	69	69	69	69

Lampiran 12. Lembar Informasi

LEMBAR INFORMASI

Judul Penelitian : “ Varian Genotip Gen *NRAMP1* dan Ekspresi Protein *NRAMP1* pada Perawat dan Penderita Tuberkulosis Paru”

Peneliti : Rahayu Anggraini, SKM, M.Si

Alamat : Lab. Patologi Klinik FK Unair / RSUD Dr.

Soetomo

Tujuan Penelitian

Mengungkap molekuler patogenesis TB melalui peran varian genotip Gen *NRAMP1* dan ekspresi protein *NRAMP1* pada Tuberkulosis Paru.

Latar Belakang Penelitian

Tuberkulosis (TB) masih menduduki peringkat pertama sebagai penyebab kematian dari penyakit infeksi, dengan perkiraan 8-9 juta kasus baru terjadi di dunia setiap tahun. Sejumlah besar kasus baru TB terjadi di Negara berkembang terutama di Asia, seperti China, Indonesia, Bangladesh, dan Pakistan. Jumlah mencapai lebih dari setengah jumlah penderita TB di dunia (Corbett EL, 2003). Studi epidemiologi menunjukkan <10% dari orang yang terinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) akan berkembang menjadi TB Paru aktif (Ferebee, 1969). Hanya sejumlah kecil dari penderita ini yang mempunyai faktor risiko penyakit *Diabetes mellitus* (DM) dan *Human immunodeficiency virus* (HIV), sedangkan lainnya dipengaruhi faktor genetik dan lingkungan, di mana kedua faktor ini berkontribusi menimbulkan penyakit TB. Berpijak pada landasan ini, identifikasi faktor genetik untuk mengetahui kerentanan dan kekebalan terhadap basil Mtb dapat meningkatkan kontrol global dalam memerangi penyebaran TB.

Berdasarkan permasalahan tersebut, maka perlu kiranya ditentukan ekspresi protein *NRAMP1* dan varian genotip gen *NRAMP1* pada kelompok penderita TB Paru aktif dan kelompok perawat yang merawat penderita TB Paru ≥ 2 tahun. Usaha ini diharapkan dapat mengungkap dasar patogenesis TB yang berguna sebagai indikator diagnosis varian genotip gen *NRAMP1* yang rentan atau kebal terhadap infeksi basil Mtb. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dipakai sebagai strategi pencegahan penyakit TB khususnya dalam memilih target utama yang masih memerlukan vaksinasi anti-TB.

Prosedur Penelitian

Untuk keperluan ini dibutuhkan sejumlah darah yang diambil melalui vena sebanyak 5 cc, sejumlah dahak/sputum, faeces, dan foto Thorax.

Pernyataan Persetujuan

Keikutsertaan dalam penelitian ini bersifat sukarela dan tanpa paksaan. Atas kesediaan saudara untuk ikut berpartisipasi dalam penelitian ini, diucapkan banyak terima kasih.

Lampiran 13. Lembar PERNYATAAN PERSETUJUAN

PERNYATAAN PERSETUJUAN (*Informed Consent*)

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama :
Tempat & Tgl lahir :
Jenis kelamin :
No. Register :
Alamat :

Tujuan penelitian untuk mengungkap molekuler patogenesis TB melalui peran varian genotip Gen *NRAMP1* dan ekspresi protein NRAMP1 pada Perawat dan Penderita Tuberkulosis Paru.

Prosedur yang akan dilakukan adalah mengambil darah melalui vena sebanyak 5ml, sampel dahak dan faeces juga foto Thorax dari penderita TB Paru dan perawat yang merawat penderita TB Paru ≥ 2 tahun di RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan RS Paru Karang Tembok Surabaya.

Sebagai penutup, saya telah membaca atau dibacakan dan dijelaskan tentang isi lembar informasi yang dilampirkan. Saya telah diberi kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan telah dijawab dengan memuaskan.

Dengan ini saya menyatakan "bersedia" ikut berpartisipasi sebagai subyek penelitian. Saya juga mempunyai hak untuk mengundurkan diri bila dirasa penelitian ini mempengaruhi perawatan medik yang sedang saya jalani.

Surabaya,2006
Subyek Penelitian,

Peneliti,

()

(Rahayu Anggraini, SKM, MSi)

LAMPIRAN 14. Lembar Biaya Kontak

PROSEDUR UJI SARING SAMPEL PENELITIAN:

“VARIAN GENOTIP GEN *NRAMP1* dan EKSPRESI PROTEIN *NRAMP1* PADA PERAWAT DAN PENDERITA TUBERKULOSIS PARU”

Peneliti : Rahayu Anggraini, SKM, M.Si

TAHAP I

Penandatanganan "*Informed Consent*" serta wawancara pada penderita TB Paru dan Perawat yang telah merawat penderita TB Paru ≥ 2 tahun. Untuk mengetahui,

- tidak menderita DM
- tidak menderita penyakit ginjal
- tidak menderita anemia
- tidak menderita HIV

Khusus pada Perawat dilakukan uji PPD

TAHAP II

Apabila pada tahap I telah memenuhi syarat, dan pada Perawat uji PPD dinyatakan positif ($> 10\text{mm}$), maka dilanjutkan dengan dilakukan,

- Pengambilan darah EDTA untuk P_x Hb
- Pengambilan darah untuk P_x Faal Ginjal, Glucose, HIV
- Uji Foto Thorax
- Uji Kultur dahak dan pengecatan BTA

Khusus untuk perawat, pada tahap I diberikan dana kompensasi sebesar Rp 25.000,- dan apabila dinyatakan memenuhi syarat akan dilanjutkan ke tahap II, juga diberikan dana kompensasi sebesar Rp 25.000,- sedangkan untuk Penderita TB Paru, sebagai biaya perjalanan bagi perawat yang menolong mengambil sampel darah dan dahak diberikan dana kompensasi sebesar Rp 20.000,-.

Demikian, semoga maklum. Atas keikutsertaan dan kesediaan saudara untuk berpartisipasi dalam penelitian ini, diucapkan banyak terima kasih.

Surabaya, 1 Mei 2006
Peneliti.

LAMPIRAN 15. Surat Keterangan *Ethical Clearance*



PEMERINTAH PROPINSI JAWA TIMUR
RUMAH SAKIT UMUM Dr. SOETOMO
 Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 6 - 8 Telp. (031) 5501011 - 5501012
SURABAYA

9 0 DEC 2005

Nomor: 070/1149/304 J.XII/2005
 Sifat: 2 (dua) lembar keterangan
 Lamp: Kaitikan Etik
 Hal: Ethical Clearance a.n. Rahayu Anggrain, SKM, M.Si

Kepada Yth:
 Ketua SMF/Bag. Patologi
 Klinik FKUA/RSU Dr. Soetomo
 S.U.R.A.B.A.Y.A.

Memorandum lanjut permohonan Ketua SMF/Bag. Patologi Klinik FKUA/RSU Dr. Soetomo Surabaya tanggal 16 Desember 2005 nomor perihal permohonan izin untuk penelitian, dengan ini diberitahukan bahwa Panitia Etik Penelitian Kesehatan RSU Kesehatan RSU Dr. Soetomo Surabaya telah mempelajari dengan seksama rancangan penelitian dengan judul

" Varian Genotip DS43N Gen NRAMP1 dan Ekspresi Protein NRAMP1 pada Tuberculosis Paru "

dengan ini diberitahukan bahwa rancangan penelitian diatas oleh Panitia Etik Penelitian Kesehatan RSU Dr. Soetomo Surabaya dinyatakan **LAIK, ETIS** dan kami menyetujui kepada yang bersangkutan (Peneliti Utama) untuk melakukan/melaksanakan penelitian dengan syarat

1. ~~Tidak ada~~ biaya tambahan yang dibebankan kepada pasien maupun pihak RSU Dr. Soetomo Surabaya
2. Sebelum pelaksanaan penelitian, yang bersangkutan (Peneliti Utama) harap menghubungi Bid. LITBANG RSU Dr. Soetomo Surabaya
3. 2 (dua) lembar sertifikat kaitikan etik dimaksud dapat diambil di Bidang LITBANG RSU Dr. Soetomo Surabaya
 - 1 (satu) lembar sertifikat untuk peneliti utama, sedangkan 1 (satu) lembar sertifikat sebagai turunannya untuk Ketua SMF/Bag. Patologi Klinik FKUA/RSU Dr. Soetomo Surabaya
4. Setelah selesai penelitian, harap kepada yang bersangkutan untuk mengirimkan 2 (dua) ikhteslap hasil penelitiannya kepada Bidang LITBANG RSU Dr. Soetomo Surabaya

Atas perhatian Ketua SMF / Bag. Patologi Klinik FKUA / RSU Dr. Soetomo Surabaya, kami sampaikan terimakasih.

Tembusan : Kepada Yth:
 - Dekan FK UNAIR Surabaya
 - Ketua Pan. Etik Penelitian Kesehatan RSU Dr. Soetomo
 - Kepala Bid. LITBANG RSU Dr. Soetomo Surabaya
 - Rahayu Anggrain, SKM, M.Si, Staf pada SMF/Bag. Patologi
 Klinik FK UNAIR/RSU Dr. Soetomo S.U.R.A.B.A.Y.A.

A.n. Direktur
 Wakil Pendidikan & Penelitian,

 Dr. Juna Martono, SpJl
 NIP. 140 090 934

PEMERINTAH PROPINSI JAWA TIMUR
RUMAH SAKIT UMUM Dr. SOETOMO
" BIDANG PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN "
JL. KARANGMENJANGAN NO. 12 TELP. 550 1071 – 73, 5501164, FAX. 5501116
SURABAYA

Surabaya, 14/04/2006

Nomor : 070/ 14 /304/Litb/2006
Sifat :
Lampiran : 1 (satu) lembar
Perihal : Sertifikat Kelaikan Etik

Kepada Yth :
Ketua SMF/Bag Pathologi Klinik
FKUA / RSU Dr. Soetomo,
SURABAYA

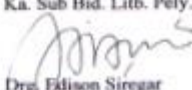
Bersama ini kami sampaikan surat kelaikan etik kepada :

N a m a : Rahayu Anggraini,SKM,M,Si
Institusi : SMF/Bag.I, Pathologi Klinik FKUA
RSU Dr. Soetomo Surabaya
Judul : " Varian Genotip D543N Gen NRAMPI dan Ekspresi
Protein NRAMPI pada Tuberculosis Paru "

Biaya penelitian RS :

Atas perhatiannya kami sampaikan terima kasih.

A.n. Kepala Bidang Litbang
Ka. Sub Bid. Litb. Pely. Medik,


Drg. Edison Siregar
Penata Tk.1
NIP. 140 255 690



PANITIA ETIK PENELITIAN KESEHATAN
RSU Dr. SOETOMO SURABAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 57/Panik.KEB/2005

PANITIA KELAIKAN ETIK RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL:

" Varian Genotip D543N Gen *NRAMP1* dan Ekspresi Protein *NRAMP1* pada Tuberculosis Paru "

PENELITI UTAMA : Rahayu Anggraini, SKM, M.Si

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN : RSUD Dr. Soetomo Surabaya

DINYATAKAN LAIK ETIK.

SURABAYA, 22 Mei 2005

KETUA I

Dr. H.R. Harjadi, dr., SpOG-K

LAMPIRAN 16. Surat Ijin Penelitian di RSUD Dr. Soetomo



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
PROGRAM PASCASARJANA

Jl. Dharmawangsa Dalam Selatan Surabaya-60286 Telp. (031) 5023715, 5020170, Fax. (031) 5030076
E-mail : pasca@pasca.unair.ac.id URL Address : http://www.pasca.unair.ac.id

Nomor **453**/J03.4/PP/2006

21 Februari 2006

Lamp

Hal Izin melaksanakan penelitian

- Yth. 1. RSUD Dr. Soetomo, SMF Paru
2. Ketua TDC Universitas Airlangga
3. Kepala Gramik Fakultas Kedokteran Unair

Guna penulisan penelitian untuk Disertasi peserta Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran angkatan tahun 2003/2004 Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Nama Rahayu Angraini, SKM, M.Si
Nim 090315212 / D
Judul " VARIAN GENOTIP NRAMP1 DAN EKSPRESI PROTEIN NRAMP1 PADA TUBERKULOSIS PARU " (Suatu Kajian Biologi Molekuler)

Promotor Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS
Ko-Promotor I Dr. Ni Made Mertaniasih, dr, MS, Sp. MK
Ko-Promotor II Dr. I Ketut Sudiana, Drs, M.Si

Maka dengan ini kami mohon perkenan Saudara untuk memberikan izin kepada yang bersangkutan untuk melaksanakan penelitian di Instansi Saudara.

Demikian dan atas bantuan Saudara kami sampaikan terima kasih.





DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN
BAGIAN ILMU PENYAKIT PARU

Telg: : FDKK UNAIR
Kode Pos : 60286

Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 6 - 8 Surabaya Telp. 031 - 5501656 - 5501661 Fax. 1656

No. : D59/J03.1.17/P.Um/2006.
Lamp : -
Hal : Ijin melaksanakan Penelitian

Surabaya, 1 Maret 2006

Kepada Yth :
Direktur
Minat As. Dir.Bidang Akademik
Program Pasca Sarjana Unair
Surabaya.

Menunjuk surat Saudara Nomor : 453 / JO3.4 / PP / 2006 tertanggal 21 Februari 2006 perihal tersebut pada pokok surat, maka kami tidak keberatan mahasiswa Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang bernama :

Rahayu Anggraini,SKM,MSi NIM.090315212/D

Untuk melakukan penelitian dimaksud. Untuk itu sebelum melakukan penelitian yang bersangkutan harap menghadap Ketua Bakor III Ilmu Penyakit Paru. Atas perhatiannya kami ucapkan terimakasih.



Tembusan :

1. Ketua Bakor III
2. Pertinggal.

LAMPIRAN 17. Surat Ijin Penelitian di RS Karang Tembok



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
PROGRAM PASCASARJANA**

Jl. Dharmawangsa Dalam Selatan Surabaya-60286 T(031)5023715, 5020170, Fax. (031)5030076
E-mail: pascap@pasca.unair.ac.id URL Address: http://www.pasca.unair.ac.id

Nomor : 102 /J03.4/PP/2006

16 Januari 2006

Lamp :

Hal : Izin Melaksanakan Penelitian

- Yth. 1. Rumah Sakit Paru Karang Tembok Surabaya
2. Rumah Sakit Paru Batu Malang
3. Rumah Sakit Paru Jember

Guna penulisan penelitian Disertasi peserta Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran angkatan tahun 2003/2004 Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Nama : Rahayu Anggraini,SKM,M.Si

Nim : 090315212 - D

Judul : " VARIAN GENOTIP NRAMP1 DAN EKSPRESI PROTEIN NRAMP1 PADA TUBERKULOSIS PARU " (Suatu Kajian Biologi Molekuler)

Promotor : Prof..Dr.Suhartono Taat Putra,dr,M.S

Ko-Promotor I : Dr.Ni Made Mertaniasih,dr,MS,Sp.MK

Ko-Promotor II : Dr.I Ketut Sudiana,Drs,M.Si

Maka dengan ini kami mohon perkenan Saudara untuk memberi izin kepada yang bersangkutan untuk melaksanakan penelitian di Insatnsi Saudara

Demikian dan atas bantuan Saudara kami sampaikan terima kasih





**PEMERINTAH PROPINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN PROPINSI UNIT BALAI PENGOBATAN DAN
PEMBERANTASAN PENYAKIT PARU / RS. KARANG TEMBOK
Jl. Karang Tembok No. 39 Telp. 3713836 Fax. 3728890 Surabaya**

Surabaya, 12 Juli 2007


No. : 070/246-07/41.17/2.007
Lamp :
Hal : Ijin melaksanakan Penelitian

Kepada Yth.
Asisten Direktur Bidang Akademik
Program Pascasarjana Unair
Surabaya

Berdasarkan surat saudara dengan nomor : 102 / JO3.A/ PP/ 2006 tertanggal
16 Januari 2006 perihal tersebut pada pokok surat, maka kami tidak keberatan
pada mahasiswa Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang bernama :

Rahayu Anggraini, SKM., M.Si NIM: 090315212/D

Untuk melakukan penelitian dimaksud di RS Paru Karang Tembok Surabaya.
Demikian terima kasih.

a.n. Kepala BP4/ RS Karang Tembok
Kepala Tata Usaha

Drs. Ec. Nugrotono, SH, MM
Penata Tk. I
NIP. 510 066 259