

Polimorfisme Gen *Glutamylcysteine Ligase Catalytic* (GCLC) Sebagai Deteksi Kerentanan Pasien Tuberkulosis Terhadap Stres Oksidatif Akibat Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Andi Zulkifli AS^{1*}, Muh. Nasrum Massi², Rosana Agus³

¹*Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar*

²*Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar 90245 Indonesia*

³*Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar 90245 Indonesia*

**E-mail: zul.kifli@stifa.ac.id; kifly.bioma@gmail.com*

Abstract

The important genetic factor about susceptibility of oxidative stress in Pulmonary Tuberculosis (PTB) has not been determined. The aim of this study was to analyse the association between polymorphism glutamatecysteine ligase catalytic subunit (GCLC) genes with susceptibility of oxidative stress in PTB in Makassar population of Indonesian. The Methods use is a case-control study was performed on 25 paired subjects with or without PTB, These subjects were selected from result of BTA stain from sputum subjects. The following polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP of -129C/T in the GCLC gene. Genotype frequencies and allelic frequencies were analysed. The Results was found There were significant differences in the distribution of genotype frequencies for polymorphism -129C/T in GCLC gene between PTB and non-PTB subjects. The distribution of the allelic frequencies of these genes also showed significant difference between the two groups. Conclusions is The genetic polymorphisms in GCLC -129C/T are associated with susceptibility of Oxidative stress on PTP subject.

Keywords: GCLC; polymorphysm; tuberculosis

PENDAHULUAN

Penyakit tuberkulosis (TB) disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, merupakan penyakit infeksi penyebab kematian manusia terbesar di dunia. WHO memperkirakan pada tahun 2007 ada 9.27 juta kasus TB baru di dunia (139 per 100,000 orang). Diperkirakan dari 9.27 juta kasus terdapat 44% atau 4.1 juta kasus (61 per 100,000 orang) merupakan BTA positif (WHO, 2009).

Di Indonesia perkiraan insidensi TB tahun 2007 berdasarkan pemeriksaan sputum (basil tahan asam/BTA positif) adalah 228 per 100,000 orang. Perkiraan prevalensi TB adalah 244 per 100,000 orang dan kematian akibat TB adalah 39 per 100,000 orang/tahun (WHO, 2009). Menurut laporan Dinas Kesehatan di Sulawesi Selatan terdapat 7.676 kasus lama dengan Basil Tahan Asam (BTA) positif. Sedangkan penderita baru dengan BTA positif 3.652 penderita. Hasil survei kesehatan rumah tangga oleh Departemen Kesehatan, menunjukkan bahwa 34% kematian disebabkan oleh penyakit infeksi dan parasit, di antaranya 11.45% disebabkan oleh TB paru (Depkes, 2002).

Tantangan utama dalam pengendalian TB adalah diagnosis dan penatalaksanaan infeksi TB laten serta upaya pencegahan. Penduduk dengan TB laten, 10% diantaranya akan menjadi TB aktif. Selama ini para ahli menduga terdapat gangguan sistem imun pada penderita TB (Maderuelo *et al.*, 2003; Widjaya *et al.*, 2010) Akibat klinis infeksi *M. tuberculosis* (Mtb) lebih dipengaruhi oleh sistem imunitas seluler daripada imunitas humoral. Pertahanan tubuh terhadap infeksi *Mtb* menyebabkan ketidakseimbangan reduksi-oksidasi (redoks), dikenal sebagai stres oksidatif. Stres Oksidatif pada TB paru terjadi karena produksi ROS oleh sistem imun tubuh untuk melisis *Mycobacterium tuberculosis* mengalami peningkatan (Jack *et al.*, 1994). Peningkatan ROS menyebabkan peningkatan penggunaan antioksidan endogen (*superoksida dismutase*, *katalase* dan *glutation*) untuk menetralkan ROS. Sedangkan antioksidan eksogen (vitamin C dan E) yang berasal dari asupan makanan jumlahnya rendah, sehingga pada pasien TB paru konsentrasi antioksidan mengalami penurunan (Madebo *et al.*, 2003; Almira *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2005; Akiibinu *et al.*, 2007; Akiibinu *et al.*, 2008; Akiibinu *et al.*, 2011).

Antioksidan adalah sistem perlindungan yang kompleks dan komprehensif yang dimiliki tubuh untuk mengatasi stres oksidatif. Stres oksidatif menyebabkan kerusakan berbagai komponen sel seperti DNA, protein, karbohidrat, lemak dan makromolekul lainnya (Pauwels *et al.*, 2007). Fragmentasi protein dan lipid peroksidasi, disfungsi membran sel dan enzim, gangguan fungsi membran sel, penurunan fluiditas, inaktivasi ikatan antara reseptor dengan membran dan peningkatan permeabilitas ion (Singh *et al.*, 2008). Kerusakan molekul tersebut, selanjutnya berdampak pada kematian sel, inaktivasi enzim, mutasi juga dapat menyebabkan terjadinya kerusakan fungsi imun, penuaan dan dapat memicu terjadinya penyakit-penyakit seperti kanker, jantung koroner, arthritis, alzheimer's, parkinson dan lainnya (Yunanto *et al.*, 2009). Peningkatan ROS pada pasien TB paru merupakan proses yang berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit (Mohod *et al.*, 2011).

Gamma-Glutamylcysteine Synthetase (GCLC) adalah salah satu antioksidan yang berperan penting dalam pemeliharaan kelangsungan hidup sel, replikasi DNA, sintesis protein, katalisis enzim, transpor transduksi membran, aksi reseptor, metabolisme antara dan maturasi sel serta regulasi fungsi sel imun (Rosa *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005). Bila kadar glutathione dalam serum rendah menyebabkan penurunan mobilisasi Ca^{2+} dan kegagalan fosforilasi tirosin pada beberapa protein, termasuk pembentukan reseptor sel imun seperti CD3 (Chew *et al.*, 2004), sehingga regulasi fungsi sel imun tubuh terganggu. Sintesis GCLC diekspresikan secara genetik oleh urutan gen yang membentuk protein enzim. Bila ekspresi gen berubah akibat polimorfisme maka sintesis GSH tersebut terganggu, sehingga tidak terbentuk GSH baru. Akibat rendahnya GCS maka terjadi keparahan penyakit tuberkulosis paru. Berdasarkan penjelasan di atas, maka pada penelitian ini perlu dilakukan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain penelitian observasional dengan pendekatan *case-control*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-Oktober 2012, di Laboratorium Mikrobiologi dan Biologi Molekuler Rumah Sakit Universitas Hasanuddin.

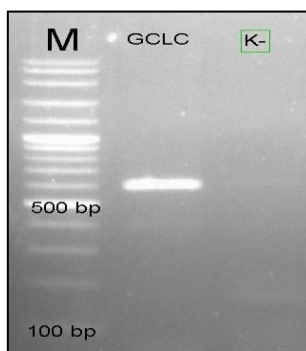
Penelitian ini melakukan pengambilan sampel darah sebanyak 3 mL pada 25 orang penderita TB dengan BTA positif dan 25 orang sampel normal sebagai kelompok kontrol. Sampel darah pasien TB diambil di beberapa rumah sakit umum dan rumah sakit paru di Makassar dengan kriteria pasien tersebut hasil pemeriksaan BTA positif. Sedangkan untuk sampel normal diambil dari staf laboratorium dan perawat di rumah sakit yang sehat tanpa ada gejala infeksi ataupun sakit.

Selanjutnya darah yang diperoleh dilakukan ekstraksi DNA dengan menggunakan metode fenol kloroform, hasil ekstraksi selanjutnya dilakukan proses amplifikasi DNA dengan menggunakan teknik PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Hasil dari proses amplifikasi DNA diperoleh target DNA sepanjang 613 bp, selanjutnya dilakukan pemotongan dengan menggunakan

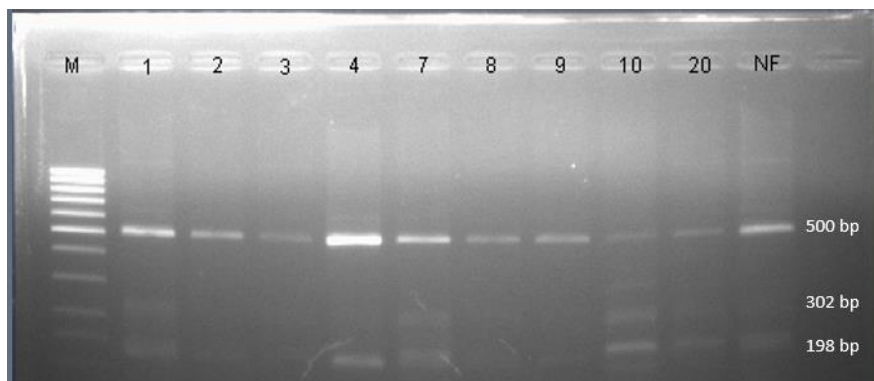
enzim Tsp45I untuk melihat adanya polimorfisme dari gen GCLC, yaitu untuk alel C/C akan diperoleh band sepanjang 500 bp dan 113 bp, untuk alel C/T akan diperoleh band sepanjang 500 bp, 302 bp, 198 bp, 113 bp, sedangkan untuk alel T/T diperoleh band sepanjang 302 bp, 198 bp, dan 113 bp (Koide *et al.*, 2003). Hasil yang genotipe yang diperoleh dari masing-masing sampel, kemudian dilakukan analisis distribusi frekuensi alel dan uji Chi-Square dengan menggunakan program SPSS 17.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan diperoleh hasil amplifikasi gen GCLC sepanjang 613 bp pada semua sampel penelitian, pada hasil analisis RFLP gen GCLC pada semua sampel hanya ditemukan dua alel yaitu alel C/C dan C/T.



Gambar 1. Elektroforesis Hasil Amplifikasi Gen GCLC Sepanjang 613 bp. M=Marker; GCLC= Gen GCLC yang teramplifikasi, K-=Tanpa amplifikasi gen GCLC



Gambar 2. Elektroforesis Hasil Amplifikasi Hasil RFLP gen GCLC. M=Marker, Sampel 1-10 dan 20=Sampel Pasien TB, dan NF=Sampel Normal

Distribusi alel penderita TB ditemukan sebanyak 13 pasien atau sekitar 52% dengan alel C/C dan 12 pasien atau sekitar 48% dengan alel C/T, Sedangkan pada sampel normal yang merupakan kelompok kontrol ditemukan 24 orang atau sekitar 96% dengan alel C/C dan 1 orang atau sekitar 4% dengan alel C/T. Berdasarkan hasil uji statistik dengan menggunakan Chi-Square antara kelompok sampel dan genotip hasil restriksi ditemukan $P = 0.000$ ($P < 0.005$) hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara genotipe kelompok penderita TB dan genotipe kelompok normal.

Tabel 1. Distribusi Genotipe Gen GCLC Pada Sampel Penderita TB dan Sampel Normal

Genotipe	Penderita TB		Sampel Normal	
	Frekuensi	Persentase	Frequency	Persentase
C/C	13	52.0	24	96.0
C/T	12	48.0	1	4.0
Total	25	100.0	25	100.0

Pada penelitian ini diperoleh perbedaan yang bermakna antara distribusi alel C/C dan C/T antara penderita TB dan kelompok kontrol. Pada hasil amplifikasi gen glutamate-cysteine ligase catalytic (GCLC) diperoleh sepanjang 613. Gen GCLC pada manusia normal terletak pada kromosom 6 lengan P locus 12.1 yang tersusun dari 54693 bp. Gen GCLC adalah gen yang mengkode subunit katalitik pada pembentukan Glutathione (GSH) (Koide *et al.*, 2003). Glutathione (GSH) merupakan tripeptida yang terdiri atas asam amino glisin, asam glutamate dan sistein. Glutathione umumnya disingkat GSH, karena adanya gugus sulfhidril (-SH) yang terdapat pada sistein senyawa tersebut. Glutathione terdapat dalam semua sel, yang memiliki peranan penting dalam pengaturan keseimbangan reaksi redoks dalam sel dan melindungi sel dari kerusakan yang diakibatkan oleh stress oksidatif (Koide *et al.*, 2003). Dalam penelitian ini untuk melihat adanya polimorfisme gen GCLC, dilakukan dengan metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) yaitu dilakukan amplifikasi pada daerah promotor dan sebagian exon 1 dari gen GCLC, alasan memilih daerah tersebut karena apabila terjadi mutasi pada daerah promotor menyebabkan enzim RNA polymerase tidak dapat melekat pada DNA dan menyebabkan transkripsi dan ekspresi enzim GCLC akan menurun, hal ini dibuktikan oleh (Sailendra *et al.*, 2011) yang menyatakan bahwa adanya pengulangan GAG pada UTR (Unit Transkripsi Region) gen GCLC dapat memberikan efek pada ekspresi gen melalui mekanisme translasi.

Hasil restriksi dari gen GCLC, enzim restriksi yang digunakan adalah Tsp45I, enzim ini memiliki situs pemotongan pada basa nitrogen 5' GT S AC 3' S dapat berupa asam amino Guanin (G) maupun Sitosin (C). Pada sampel 2, 3, 4, 8, 9, NF terlihat 2 band yang dengan panjang 500 bp dan 113 bp ini menunjukkan sampel tersebut merupakan alel C/C yang merupakan genotipe normal. Sedangkan pada sampel 1, 7, 10, 20 terlihat 4 band dengan panjang 500 bp, 113 bp, 198 bp, 302 bp, ini menunjukkan sampel tersebut merupakan alel C/T. Penelitian ini menunjukkan 48% penderita TB mengalami polimorfisme pada gen GCLC yaitu -129 C/T hal ini menunjukkan bahwa kerentanan mengalami stress oksidatif pada penderita tuberculosis sangat tinggi, sedangkan pada orang normal hanya ditemukan 4% yang mengalami polimorfisme, hal ini dapat terjadi karena subjek tersebut pernah mengalami infeksi atau penyakit dan mengalami stres oksidatif yang lama sehingga pada gen GCLC-nya dapat mengalami polimorfisme. Akibat yang akan terjadi bila terdapat polimorfisme pada daerah promotor gen GCLC adalah akan terinduksinya peningkatan kadar oksidan (ROI & RNI) dalam sel akibat infeksi (Mohod *et al.*, 2011) dan menurunkan produksi dari GSH, sehingga dalam keadaan ini antioksidan dalam sel akan menurun dan akan meningkatkan kerusakan sel akibat kadar oksidan yang tinggi (Liu *et al.*, 2007). Meskipun proses tadi merupakan bagian penting pertahanan tubuh terhadap bakteri seperti misalnya *M. tuberculosis*, namun peningkatan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat memicu kejadian stres oksidatif (Pierattelli *et al.*, 2004) yaitu keadaan ketidakseimbangan sistem redoks antara oksidatif dengan antioksidan sehingga menyebabkan kerusakan jaringan, seperti halnya kerusakan jaringan paru.

Selain itu akibat yang ditimbulkan oleh stres oksidatif dapat memberikan kerentanan penyakit TB pasien akan bertambah parah, hal ini didukung oleh pernyataan Jack *et al.* (1994) dan Reddy *et al.* (2004) yang menyatakan radikal bebas yang tinggi akan berimplikasi pada perkembangan fibrosis

jaringan paru pada penderita tuberculosis dalam waktu yang lama. Stress oksidatif juga akan berpeluang meningkatkan mutasi pada DNA hal ini sesuai dengan penelitian Sullivan *et al.* (2008) yang melakukan penelitian tentang efek stress oksidatif terhadap laju mutasi pada *M.tuberculosis*, dan mendapatkan hasil bahwa *M.tuberculosis* yang tidak mengalami gangguan stress oksidatif tidak mengalami peningkatan mutasi dibandingkan dengan *M.tuberculosis* yang mengalami gangguan stress oksidatif. Selain itu kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang tinggi berhubungan dengan pembentukan kanker hal ini disebabkan ROS memiliki potensi karsinogenik karena *Reactive Oxygen Species* (ROS) memfasilitasi terjadinya mutasi, pembentukan tumor, dan perkembangan tumor, serta akibat peningkatan kadar ROS akan berimplikasi terhadap penyakit diabetes melitus hal ini dapat terjadi akibat perubahan prooksidatif dari glutation dalam darah, tingginya kadar gula dalam darah akan menaikkan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang akan mengganggu kerja insulin dalam tubuh (Gospodaryov *et al.*, 2002).

Dari hasil penelitian ini dapat pula diketahui bahwa tidak semua penderita TB mengalami polimorfisme, tetapi ada sekitar 52% penderita TB yang memiliki gen GCLC yang normal, sehingga adanya polimorfisme pada gen GCLC dapat dijadikan penanda atau *biomarker* terjadinya infeksi yang telah lama oleh *Mycobacterium tuberculosis* (TB Laten) namun penelitian ini tidak dapat membuktikan secara pasti tentang pemanfaatan polimorfisme gen GCLC sebagai biomarker TB laten disebabkan karena kriteria pengambilan sampel penelitian ini tidak membatasi pada lamanya telah menderita TB pada objek penelitian yang akan diperiksa. Penelitian sebelumnya oleh Akibiinu (2011) menemukan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan terhadap tingginya kadar oksidan pada penderita TB dibandingkan dengan kontrol normal, dan terdapat perbedaan yang signifikan terhadap penurunan kadar antioksidan pada penderita TB dan kontrol normal.

KESIMPULAN

Penderita TB sebanyak 13 orang atau sekitar 52% dengan genotipe C/C dan 12 orang atau sekitar 48% dengan genotipe C/T, sedangkan pada sampel normal diperoleh 24 orang atau sekitar 96% dengan genotipe C/C dan 1 orang atau sekitar 4% dengan genotipe C/T. Terdapat perbedaan yang bermakna antara polimorfisme C/T gen GCLC pada penderita tuberculosis dan orang normal sehingga pada penderita TB sebagian besar akan mengalami stress oksidatif yang disebabkan oleh infeksi TB, pemberian OAT dan karena adanya polimorfisme gen GCLC.

DAFTAR PUSTAKA

- Akiibinu, M. O., Arinola, O. G., Ogunlewe, J. O., and Onih, F. A., 2007. *Non Enzymatic-Antioxidant and Nutritional Profiles in Newly Diagnosed Pulmonary Tuberculosis Patients in Nigeria*. African Journal of Biomedical Research. 10: 223-228.
- Akiibinu, M. O., Ogunyemi, O. E., Arinola, O. G., Adenaike, A. F, and Adegoke, O. D., 2008. *Assessment of Antioxidants and Nutritional Status of Pulmonary Tuberculosis Patients in Nigeria*. Eur. J. Gen. Med. 5(4): 208-211.
- Akiibino, M. O., Ogunyemi, E. O., and Shoyebo, E. O., 2011. *Levels of Oxidative Metabolites, Antioxidants and Neopterin in Nigerian Pulmonary Tuberculosis Patients*. Eur. J. Gen. Med. 8(3): 213-218.
- Almirall, J., Bolibar, I., Toran, P., Pera, G., Boquet, X., Balanzó, X., and Sauca, G., 2004. *Contribution of C-Reactive Protein to the Diagnosis and Assessment of Severity of Community-Acquired Pneumonia*. American College of Chest Physicians.
- Chew, B. P., and Park, J. S., 2004. *Caretenoid Action on The Immune Response*. J. Nutr.134: 257S-261S.

- Departemen Kesehatan RI, 2002. *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis*. Cetakan ke-8, 1-36. Jakarta.
- Gospodaryov, D., and Lushchak, V., 2002. *Oxidative Stress: Cause and Consequence of Diseases*. Precarpathian National University, Ukraine.
- Rosa, S. C. D, Zaretsky, M. D., and Dubs, J. G., 2000. *N-acetylcysteine Replenishes Glutathion in HIV Infection*. Eur. J. Clin. Invest. 30: 915-929.
- Jack, C. I., Jackson, M. J., Hind, C.R., 1994. *Circulating Markers Of Free Radical Activity In Patients With Pulmonary Tuberculosis*. Tuber Lung Disc. 75: 132-137.
- Kaur, K., Jai, K., Gurdeep, K. B., and Rajinderjit, S. A., 2005. *Oxidants Stress And Antioxidant in Pulmonary Tuberculosis*. Diakses tanggal 30 Juli 2011.
- Koide, S. I., Kugiyama, K., Sugiyama, S., Nakamura, S., Fukushima, H., Honda, O., Yoshimura, M., Ogawa, H., 2003. *Association of Polymorphism in Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit Gene With Coronary Vasomotor Dysfunction and Myocardial Infarction*. Journal of the American College of Cardiology.
- Liu, S., Bing, L. I., Zhou, Y., Zhong, N., and Ran, P., 2007. *Genetic analysis of CC16, OGG1 and GCLC polymorphisms and susceptibility to COPD*. Journal compilation Asian Pacific Society of Respirology.
- Madebo, T., Bernt, L., Pal, A., and Roef, K. B. 2003. *Circulating Antioxidants and Lipid Peroxidation Products in Treated Tuberculosis Patients in Ethiopia*. Am J. Clin. Nutr. 78: 117-122.
- Maderuelo, D. L., Fransisco, A., Rocio, S., Alicia, G., Rosa, C., Rosario, M., Juan, J, and Carmen, M., 2003. *Interferon- γ and Interleukin-10 Gene Polymorphisme in Pulmonary Tuberculosis*. Am. J. Respir. Crit. Cerc. Med. 167: 970-975.
- Mohod, K., Dhok, A., and Kumar, S., 2011. *Status of Oxidants and Antioxidants in Pulmonary Tuberculosis with Varying Bacillary Load*. Journal of Experimental Sciences 2011, 2(6): 35-37.
- Pauwels, E. K., Erba, P. A., and Kostkiewicz, M., 2007. *Antioxidants: A Tale of Two Stories*. Drug News Persoect. 20(9):579-585.
- Pierattelli, R., Banci, L., Eady, N. A. J., Bodiguel, J., Jones, J. N., Moody, P. C. E., Raven, E. L., Jamart-Gre'goire, B., and Brown, K. A., 2004. *Enzyme-Catalyzed Mechanism of Isoniazid Activation in Class I and Class III Peroxidases*. The Journal Of Biological Chemistry.
- Reddy, Y. N., Murthy, S. V., Krishna, D. R., and Prabhakar, M. C., 2004. *Role of Free Radicals and Antioxidants In Tuberculosis Patients*. Indian J Tuberc 2004.
- Sailendra, N., Nichenametla, Lazarus, P., and John P. Richie, Jr., 2011. *A GAG Trinucleotide-Repeat Polymorphism in the Gene for Glutathione Biosynthetic Enzyme, GCLC, Affects Gene Expression Through Translation*. The FASEB Journal _ www.fasebj.org.
- Sullivan, D. M. O., McHugh, T. D., and Gillespie, S. H., 2008. *The Effect of Oxidative Stress on The Mutation Rate of Mycobacterium tuberculosis With Impaired Catalase/Peroxidase Function*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 62: 709–712.
- Singh, R., Manjunatha, U., Helena, I., Bushoff, M., and Hwan-ha, Y., 2008. *PA-824 Kills Non-Replicating M. tuberculosis Intracelular NO Releas*. Science. 322(5906):1392-5.
- WHO, 2009. *Global Tuberculosis Control; WHO Report*. WHO Press, Switzerland.
- Widjaja, J. T., Diana, K. J., dan Rina, L. R., 2010. *Analisis Kadar Interferon Gamma Pada Penderita Tuberkulosis Paru dan Orang Sehat*. J. Respir Indo. 30(2):119-124.
- Yunanto, A., Bambang, S., dan Eko, S., 2009. *KapitaSelekta Biokimia : Peran Radikal Bebas pada Intoksikasi dan Patobiologi Penyakit*. Penerbit Pustaka Banua: Banjarmasin. p: 243-249.
- Zhang, H., Forman, H. J., and Choi, J., 2005. **G*-Glutamyltrnas Peptidase In Glutathione Biosynthesis*. Methods in Enzymology. 401:468-483.