

LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN HASIL PENELITIAN

Judul Penelitian : **Analisa Perbandingan kadar IL-1 β pada PASIEN TUBERCULOSIS (TBC) PARU AKTIF dan KONTAK SERUMAH**

Peneliti:

Nama Lengkap : dr. Pitut Aprilia Savitri, MKK
NIDN : 20.774/0302047003
Prodi : Kedokteran
Alamat Email : pitut_a@yahoo.com

Tangerang Selatan, 6 Agustus 2023

Mengetahui,
Ketua UPT Penelitian dan
Pengabdian Masyarakat FKK UMJ



Rike Syahniar, S.K.M., M.Biomed.
NIDN: 0316019102

Dekan



Dr. dr. Muhammad Fachri, Sp.P., FAPSR., FISR
NIDN: 0308097905



LAPORAN AKHIR PENELITIAN

HIBAH $\{\text{penyelenggara}\}$, Universitas Muhammadiyah Jakarta
Tahun Usulan $\{2022\}$, Tahun Pelaksanaan $\{2022-2023\}$

1. Judul *)

Analisa Perbandingan kadar IL-1 β pada PASIEN TUBERCULOSIS (TBC) PARU AKTIF dan KONTAK SERUMAH

2. Topik *)

Kadar interleukin sebagai biomarker pasien tbc

3. Bidang Ilmu *)

Kedokteran

4. Identitas Peneliti *)

Peran	Nama	Sinta ID / NIM	Fakultas	Bidang Studi
Ketua Pengusul	Pitut Aprilia Savitri	20.774/0302047003	Kedokteran dan Kesehatan	Kedokteran

5. Pengesahan Usulan Proposal *)

Tanggal Pengajuan	Tanggal Persetujuan	Pimpinan Pemberi Persetujuan	Jabatan	Lembaga/Fakultas
$\{\text{tanggal_pengajuan_prop1}\}$	$\{\text{tanggal_prop_disetujui1}\}$	$\{\text{nama_ketua}\}$	$\{\text{jbt_ketua}\}$	$\{\text{nama_lbg}\}$

Tanggal Pengajuan	Tanggal Persetujuan	Pimpinan Pemberi Persetujuan	Jabatan	Lembaga/Fakultas
$\{\text{tanggal_pengajuan_prop2}\}$	$\{\text{tanggal_prop_disetujui2}\}$	$\{\text{nama_dekan}\}$	$\{\text{jbt_dekan}\}$	$\{\text{nama_fakultas}\}$

6. Riwayat Penelitian Ketua Pengusul *)

Riwayat penelitian

Relationship between expression mRNA gene Treg, Treg, CD4+, and CD8+ protein levels with TST in tuberculosis children: A nested case-control (2021) (Anggota peneliti)

Manifestasi Klinik dan Proses Diagnostik Anak dengan Sindrom Hiper Ig E 2021 (anggota peneliti)

Manifestasi Klinik dan Proses Diagnostik Anak dengan Sindrom Hiper Ig E 2022 (anggota peneliti)

Analisis Faktor Risiko Stres dan Ketahanan terhadap Stres Pada Lansia 2022 (anggota peneliti)

Ringkasan Penelitian Sitokin pro-inflamasi IL-1 β adalah mediator utama peradangan dan memainkan peran penting dalam resistensi pejamu terhadap infeksi Mycobacterium tuberculosis. Sampai saat ini, sebagian besar penelitian telah meneliti mekanisme sekresi IL-1 β menggunakan strain laboratorium M. tuberculosis dan temuan tersebut mungkin tidak memiliki aplikasi luas untuk strain klinis kontemporer. Makrofag, sel inang utama untuk mikobakteri, merespons infeksi M. tuberculosis dengan mengatur berbagai sitokin termasuk TNF- α , IL-6 dan IL-1 β . Model Murine dari tuberkulosis memberikan bukti kuat tentang pentingnya pensinyalan IL-1 β dalam resistensi pejamu terhadap infeksi M. tuberculosis. Tikus knock-out reseptor IL-1 (IL-1R) dan IL-1 β lebih rentan terhadap infeksi M. tuberculosis, menunjukkan beban bakteri yang tinggi di paru-paru dan peningkatan kematian pada awal infeksi. (Juffermans *et al.*, 2000)

data dilakukan dengan menggunakan ANOVA. Berdasarkan hasil pemeriksaan Kadar IL-1 β pada tuberkulosis aktif, dan tuberkulosis laten, Dari hasil penelitian terdapat adanya perbedaan Kadar IL-1 β pada kelompok TB aktif, TB laten, dan sehat. Kadar IL-1 β secara signifikan lebih tinggi pada kelompok kasus TB aktif dibanding TB laten dan sehat Peningkatan kadar IL-1 β ditemukan signifikan pada kasus TB aktif dibandingkan dengan TB laten Namun perbedaan kadar IL-1 β pada kelompok TB laten dan sehat *menunjukkan hasil yang* tidak bermakna

Kata Kunci *Kadar IL-1 β , TBC aktif, TBC Laten, Kontak serumah*

*Note : *) jangan diisi/dirubah*

Latar Belakang Penelitian WHO memperkirakan bahwa hampir sepertiga dunia populasi dengan hasil *Mycobacterium tuberculosis* purified turunan protein positif. TB laten adalah sumber penyakit yang disebabkan oleh reaktivasi, terutama di negara berkembang dengan jumlah kasus TB yang besar dan tingkat kejadian TB yang tinggi. Risiko reaktivasi TB di antara orang-orang TB laten yang imunokompeten diperkirakan 10% seseorang dengan TB laten, resiko menjadi TB aktif lebih tinggi apabila terjadi perubahan secara klinis, epidemiologis atau gambaran radiologis. Diagnosis dan penatalaksanaan TB laten merupakan salah satu tantangan pemberantasan TB karena tidak ada bukti klinis dan mikrobiologis (Munoz, Stagg and Abubakar, 2015) Studi telah mengungkapkan bahwa miRNA memainkan peran penting dalam beragam proses seperti diferensiasi sel, proliferasi sel, dan perkembangan organ (Ambros, V. 2004; Stefani et al.,2008). Lebih penting lagi, di luar peran mereka dalam proses fisiologis, penelitian ekstensif telah mengeksplorasi keterlibatan miRNA dalam berbagai patologi, termasuk penyakit menular. Misalnya, keluarga let-7 diidentifikasi sebagai denominator umum dari mikroRNA yang diatur Salmonella dalam makrofag dan sel epitel, dan represi let-7 mengurangi sitokin IL-6 dan IL-10 mRNA (Pereira, C. P., E. B. Bachli, and G. Schoedon. 2009). miRNA-155 sangat penting untuk kontrol yang dimediasi sel T dari infeksi *Helicobacter pylori* dan untuk induksi gastritis kronis dan kolitis (Oertli, M., et al. 2011). Data ini menunjukkan bahwa beberapa spesies miRNA memainkan peran penting dalam penyakit menular.

Penelitian ini menggunakan desain kasus kontrol yang melibatkan 27 orang penderita tuberkulosis aktif, 24 orang kontak serumah dengan tes IGRA positif, dan 27 orang kontrol sehat. kadar IL-1 β dengan menggunakan *ELISA test* pada pasien Tuberculosis (TBC) paru aktif dan kontak serumah

Tinjauan Pustaka

Pengertian TBC dan Etiologi TBC

Tuberkulosis biasanya menular dari manusia ke manusia lain lewat udara melalui percik renik atau *droplet nucleus* (<5 microns) yang keluar ketika seorang yang terinfeksi TBC paru atau TBC laring batuk, bersin, atau bicara. Percik renik juga dapat dikeluarkan saat pasien TBC paru melalui prosedur pemeriksaan yang menghasilkan produk aerosol seperti saat dilakukannya induksi sputum, bronkoskopi dan juga saat dilakukannya manipulasi terhadap lesi atau pengolahan jaringan di laboratorium. Percik renik, yang merupakan partikel k dapat menampung 1-5 basilli, dan bersifat sangat infeksius, dan dapat bertahan di dalam udara sampai 4 jam. Karena ukurannya yang sangat kecil, percik renik ini memiliki kemampuan mencapai ruang alveolar dalam paru, dimana bakteri kemudian melakukan replikasi. (Panduan tatalaksana TBC Nasional 2020)

Patogenesis TB

Infeksi diawali karena seseorang menghirup basil *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri menyebar melalui jalan napas menuju alveoli lalu berkembang biak dan terlihat bertumpuk. Perkembangan *Mycobacterium tuberculosis* juga dapat menjangkau sampai ke area lain dari paru (lobus atas). Basil juga menyebar melalui system limfe dan aliran darah ke bagian tubuh lain (ginjal, tulang dan korteks serebri) dan area lain dari paru (lobus atas). Selanjutnya system kekebalan tubuh memberikan respons dengan melakukan

*Note : *) jangan diisi/dirubah*

Sitokin pro-inflamasi IL-1 β adalah mediator utama peradangan dan memainkan peran penting dalam resistensi pejamu terhadap infeksi Mycobacterium tuberculosis. Sampai saat ini, sebagian besar penelitian telah meneliti mekanisme sekresi IL-1 β menggunakan strain laboratorium M. tuberculosis dan temuan tersebut mungkin tidak memiliki aplikasi luas untuk strain klinis kontemporer. Makrofag, sel inang utama untuk mikobakteri, merespons infeksi M. tuberculosis dengan mengatur berbagai sitokin termasuk TNF- α , IL-6 dan IL-1 β . Model Murine dari tuberkulosis memberikan bukti kuat tentang pentingnya pensinyalan IL-1 β dalam resistensi pejamu terhadap infeksi M. tuberculosis. Tikus knock-out reseptor IL-1 (IL-1R) dan IL-1 β lebih rentan terhadap infeksi M. tuberculosis, menunjukkan beban bakteri yang tinggi di paru-paru dan peningkatan kematian pada awal infeksi. (Juffermans *et al.*, 2000)

Proses yang terlibat dalam transkripsi, pemrosesan, dan pelepasan IL-1 β dari makrofag dikontrol dengan ketat. Kontrol ekspresi gen dimediasi oleh sejumlah proses termasuk regulasi negatif IL-1 β oleh interferon tipe I, yang diinduksi oleh M. tuberculosis (Novikov, A *et al.*, 2011). Keterlibatan *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) dengan *pattern recognition receptors* (PRRs)) seperti *toll-like receptor* (TLRs) bertindak sebagai sinyal primer yang mengarah ke sintesis 31-kDa pro-IL-1 β yang tidak aktif dalam makrofag (Takeuchi *et al.*, 2010) Pensinyalan primer melalui TLR tidak cukup untuk merangsang pelepasan IL-1 β aktif. Sinyal bahaya mikroba tambahan diperlukan untuk pemrosesan dan pelepasan bentuk dewasa IL-1 β . Pembelahan pro-IL-1 β menjadi protein 17 kDa IL-1 β yang aktif secara biologis membutuhkan aktivasi inflammasome, kompleks multi-protein yang merangsang aktivasi caspase-1 untuk mempromosikan pemrosesan dan sekresi sitokin pro-inflamasi. Inflammasome menyediakan platform untuk konversi prekursor caspase-1 menjadi bentuk aktifnya sebagai respons terhadap pensinyalan melalui reseptor domain oligomerisasi nukleotida (NOD) dan pola molekul terkait bahaya seperti ATP (Franchi *et al.*, 2009). Caspase-1 teraktivasi membelah pro-IL-1 β menjadi bentuk dewasa 17 kDa yang aktif secara biologis yang kemudian dengan cepat dikeluarkan dari sel melalui mekanisme yang tidak sepenuhnya dipahami. Sebuah studi baru-baru ini secara elegan menunjukkan bahwa oksida nitrat yang diproduksi oleh makrofag yang distimulasi IFN- γ mengatur pemrosesan pro-IL-1 β dengan secara langsung bekerja pada inflammasome (Mishra *et al.*, 2013). Pada tipe sel lain seperti sel dendritik, mikobakteri dilaporkan mengaktifkan caspase-8 tergantung inflammasome (Gringhuis *et*

Note : *) jangan diisi/dirubah

al., 2013). Kontrol pemrosesan dan sekresi IL-1 β tampaknya merupakan proses kompleks yang bergantung pada banyak sensor dan efektor.

Metode

Darah vena subyek penelitian (pasien Tb aktif dan kontak serumah) diambil sebanyak 3-5 cc dan dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Tabung sampel darah selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, lalu dipisahkan bagian plasmanya (lapisan atas). Sampel plasma tersebut disimpan pada suhu -20⁰C sampai seluruh sampel terkumpul.

Pemeriksaan IL-1 β , dilakukan dengan menggunakan Human IL-1 β , Elisa Kit Bioassay Technology lab Cat.no. E0082Hu. Pemeriksaan IL6 menggunakan Human IL6 Kit Bioassay Technology lab Cat.no. E0105Hu. Kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 450 nm menggunakan ELISA reader. Sebelum memulai sampel yang terkumpul dan kit ELISA dikeluarkan dan diletakkan pada suhu ruang (22 \pm 5⁰ C) selama 1 jam (60 menit). Tahap awal teknik ini dimulai dengan memasukkan sampel kedalam microwell sebanyak 40 μ l. dimasukkan standar diluent 50 μ l pada tabung terakhir. selanjutnya dilakukan pembuatan larutan standar (S1-S5) dengan cara menyiapkan 5 tabung eppendorf masing-masing dilabel S1, S2, S3, S4, dan S5 lalu dimasukkan 120 μ l standart diluent. Diambil sebanyak 120 μ l larutan standart yang tersedia dalam kit ELISA lalu dimasukkan kedalam tabung S1. Homogenkan dengan menggunakan pipet, lalu diambil 120 μ l campuran tersebut dan dimasukkan kedalam tabung S2. Hal yang sama dilakukan sampai dengan tabung S5. Setelah larutan standar dibuat dimasukkan ada microwell barisan pertama (A1, B1, C1, D1 & E1) sebanyak 50 μ l.

Selanjutnya tambahkan 10 μ l Beotinylated Antibody pada semua mikrowell sampel, Lalu di tambahkan 50 μ l streptavidin-HRP kesemua microwell, lalu tutup dan diinkubasi 37⁰C selama 1 jam. Cuci microwell dengan washing buffer 300 μ l sebanyak 5 kali Kemudian tambahkan 50 μ l substrat A dan 50 μ l substrat B, lalu tutup mikrowell dan diinkubasi 37⁰C selama 10 menit (hindarkan dari cahaya).

*Note : *) jangan diisi/dirubah*

Tambahkan 50 µl stop solution kedalam setiap microwell dan diamkan selama 5 menit pada suhu ruang lalu ukur absorbansi pada panjang gelombang 450 nm menggunakan ELISA reader.

Perhitungan Nilai konsentrasi IL-1 β , IL-6 dan DRAM2 dengan membuat sebuah kurva standar dengan memplot nilai absorbansi hasil pembacaan ELISA reader pada masing-masing standar (S1-S5) pada vertikal (Y) axis terhadap konsentrasi pada horisontal (X) axis dan gambar kurva yang sesuai melalui titik-titik pada grafik. Perhitungan ini dapat terbaik dilakukan dengan software curve-fitting berbasis komputer dan paling garis yang paling cocok dapat ditentukan dengan analisis regresi.

E. Analisis Data

Hasil dianalisis menggunakan SPSS Statistics version 23.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA). Analisis varian ANOVA dengan membandingkan ekspresi miRNA pada kelompok TB paru aktif, TB paru laten dan sehat. Data disajikan menggunakan mean \pm SD dan diuji dengan Kruskal-Wallis test, nilai p kurang dari atau sama dengan 0,05 dianggap signifikan dalam semua analisis (Ndzi et al., 2019).

F. Kurva Receiver operating characteristics (ROC)

Kurva ROC digunakan untuk memperkirakan kinerja diagnostik miRNA yang diekspresikan secara signifikan. Area under curva ROC (AUC) adalah ukuran kemampuan parameter untuk membedakan antara dua kelompok (Ndzi et al., 2019). Penilaian terhadap kemampuan suatu test dilakukan dengan menggunakan luas area under the curve (AUC). AUC meliputi keseluruhan area di bawah curva yang terbentuk dari semua koordinat sensitifitas dan 1-spesifisitas. Nilai AUC berkisar dari 0 – 1, semakin luas AUC maka semakin baik kemampuan suatu test untuk mendeteksi suatu penyakit. Kemampuan suatu test dinyatakan baik jika $AUC \geq 0,7$ (Putra et al., 2016)

Hasil Penelitian Berdasarkan hasil pemeriksaan Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan Kadar IL-1 β pada pasien tuberkulosis paru aktif dan tuberkulosis laten serta sehat menggunakan metode ELISA. Data dianalisis lebih lanjut menggunakan Kruskal-Wallis test didapatkan perbedaan yang signifikan antara ketiga kelompok. Dari hasil penelitian juga terdapat adanya perbedaan Kadar IL-1 β

*Note : *) jangan diisi/dirubah*

pada kelompok TBC aktif, TBC laten, dan sehat. Kadar IL-1 β secara signifikan lebih tinggi pada kelompok TBC aktif dibanding TBC laten dan sehat. Peningkatan kadar IL-1 β ditemukan signifikan pada kasus TBC aktif dibandingkan dengan TBC laten Namun perbedaan kadar IL-1 β pada kelompok TBC laten dan sehat menunjukkan hasil yang tidak bermakna .

Kesimpulan kadar IL-1 β tidak dapat digunakan sebagai biomarker untuk diagnosis penyakit tuberkulosis karena tidak dapat membedakan tuberkulosis aktif dengan tuberkulosis laten

• **Daftar Pustaka**

- WHO *Global Tuberculosis Report 2021*; Geneva, 2021;
- Penn-Nicholson, A.; Mbandi, S.K.; Thompson, E.; Mendelsohn, S.C.; Suliman, S.; Chegou, N.N.; Malherbe, S.T.; Darboe, F.; Erasmus, M.; Hanekom, W.A.; et al. RISK6, a 6- gene transcriptomic signature of TB disease risk, diagnosis and treatment response. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–21, doi:10.1038/s41598-020-65043-8.
- Zhou, M.; Yu, G.; Yang, X.; Zhu, C.; Zhang, Z.; Zhan, X. Circulating microRNAs as biomarkers for the early diagnosis of childhood tuberculosis infection. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13*, 4620–4626, doi:10.3892/mmr.2016.5097.
- Sinigaglia, A.; Peta, E.; Riccetti, S.; Venkateswaran, S.; Manganelli, R.; Barzon, L. Tuberculosis-Associated MicroRNAs: From Pathogenesis to Disease Biomarkers. *Cells* **2020**, *9*, 1–23, doi:10.3390/cells9102160.