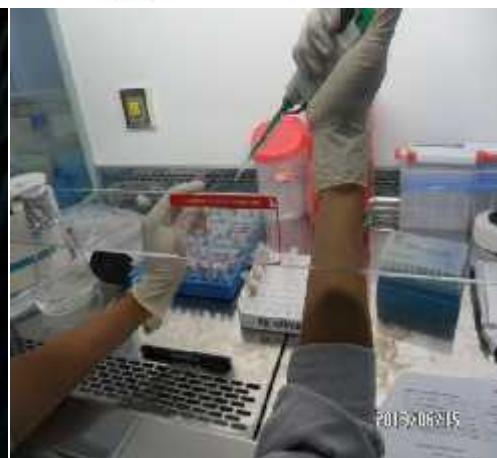
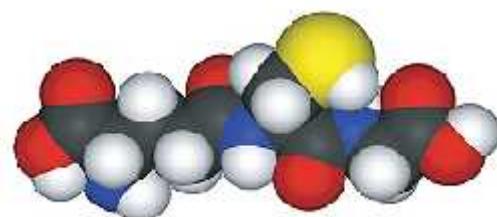
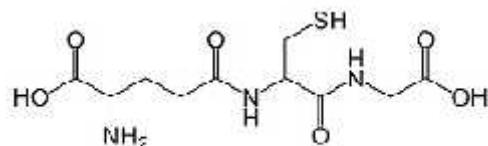


MONOGRAF

DASAR MOLEKULER GLUTATION DAN PERANNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN



Ari Yuniastuti

MONOGRAF

DASAR MOLEKULER GLUTATION DAN PERANNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN

Ari Yuniastuti

Diterbitkan oleh :



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
2016**

Hak Cipta © pada penulis dan dilindungi Undang-Undang
Penerbitan.

Hak Penerbitan pada FMIPA PRESS.

Dicetak oleh FMIPA Press.

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh isi buku ini dalam
bentuk apapun tanpa izin dari penulis.

BUKU MONOGRAF

**DASAR MOLEKULER GLUTATION DAN PERANNYA
SEBAGAI ANTIOKSIDAN**
ISBN : 978-602-1034-47-7

Penulis :

Dr. ARI YUNIASTUTI, M.Kes.

Penyunting:

Dr. Retno Sri Iswari, SU

Desain Cover dan lay out :

Yoris Adi Maretta



Penerbit:

FMIPA Unnes

Email: press.mipaunnes@gmail.com

PRAKATA



Assalamu Alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Syukur Alhamadulillahirobbilalamin. Puji syukur bagi Allah SWT, yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, atas izin Allah serta hanya atas Rahmat, Hidayah, Inayah dan Ridlo Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, penulis dapat menyelesaikan buku Monografi “Dasar Molekuler Glutation dan Perannya Sebagai Antioksidan”. Buku Monografi ini merupakan salah satu wujud tulisan yang berisi paparan teori, konsep dan hasil penelitian terkait sintesis, struktur dan mekanisme regulasi glutation yang dikaji secara molekuler dan perannya sebagai antioksidan pada berbagai penyakit.

Glutation (γ -glutamil sisteinil glisin) merupakan tripeptida yang terdiri dari glutamat, sisten dan glisin. Glutation umumnya disingkat GSH, karena adanya gugus sulfhidril (-SH) yang terdapat pada sistein senyawa tersebut, juga merupakan bagian molekul glutation yang berperan aktif. Sintesis glutation dikatalisa oleh enzim *glutamate-cystein ligase* (GCL) yang diekspresikan secara genetik oleh urutan gen yang membentuk suatu protein enzim, yaitu gen GCL. Ekspresi gen GCL menunjukkan aktivitas *enzim glutamate cystein ligase* untuk mensintesis glutation. Aktivitas *enzim glutamate cystein ligase* dapat terganggu karena adanya radikal bebas, akibatnya terjadi kegagalan sintesis GSH. Penderita penyakit TBC, diabetes, infark dan Jantung koroner memiliki kadar GSH rendah, disebabkan kegagalan sintesis GSH. Glutation merupakan salah satu antioksidan yang berperan dalam menangkal radikal bebas, sehingga penurunan kadar GSH dan peningkatan radikal

bebas menyebabkan stres oksidatif dan berimplikasi pada keparahan suatu penyakit.

Buku monograf ini disusun sebagai paparan hasil penelitian terkait antioksidan glutation. Buku Monograf ini terdiri atas delapan bab, yaitu 1) pendahuluan, 2) struktur dan biosintesis glutation, 3) Polimorfisme gen enzim *glutamate cystein ligase*, 4) glutation sebagai antioksidan pada pasein tuberkulosis paru, 5) Identifikasi gen gcl dan glutation secara molekuler pada pasien Tuberkulosis paru, 6) Analisis Glutation, 7) Hasil identifikasi gen Gcl pada pasien tuberkulos paru, dan 8) Penutup.

Harapan penulis buku ini dapat digunakan sebagai acuan dan tambahan ilmu pengetahuan bagi mahasiswa S1, S2 maupun S3, pengajar, peneliti ataupun pihak lain yang berminat mempelajari glutation, khususnya dasar molekuler glutation dan perannya sebagai antioksidan.

Penulisan dan penyusunan dalam buku monograf ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Pada kesempatan yang sangat berharga ini, Penulis dengan tulus menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada Dra Retno Sri Iswari selaku penyunting buku monograf, mas Yoris, pak Riza dan semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung. Semoga sumbangsih apapun wujudnya mendapat imbalan pahala yang berlimpah dari Allah Swt. Amin. Pendapat dan saran yang bersifat konstruktif dari pembaca, para ahli, dan teman sejawat sangat penulis harapkan.

Semoga tulisan ini bermanfaat bagi yang berminat.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Semarang, Juli 2016

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Rumusan Masalah	5
1.2 Tujuan	7
1.3 Metode Pemecahan Masalah	7
 BAB II STRUKTUR DAN BIOSINTESIS GLUTATION	9
2.1 Struktur dan Distribusi Biologi Glutation	9
2.2 Biosintesis Glutation	11
2.3 Degradasi Glutation	14
2.4 Regulasi dan manipulasi Sintesis Glutation	15
2.5 Homeostasis Glutation	17
2.6 Kontrol gen terhadap Sintesis Glutation	18
 BAB III POLIMORFISME GEN ENZIM <i>Glutamate Cysteine ligase</i>	21
3.1 Gen enzim <i>glutamate cysteine ligase</i> (GCL)	21
3.2 Polimorfisme Gen	23
3.3 Polimorfisme gen enzim GCL	29
 BAB IV GLUTATION SEBAGAI ANTIOKSIDAN PADA PASIEN TUBERKULOSIS PARU	31
4.1 Peran dan Fungsi Antioksidan Glutation	31
4.2 Glutation dan Infeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36
4.3 Mekanisme Kontrol Glutation terhadap Infeksi <i>M. tuberculosis</i>	37
 BAB V IDENTIFIKASI GEN GCL DAN GLUTATION SECARA MOLEKULER PADA PASIEN TUBERKULOSIS PARU	42
5.1 Preparasi Sampel	42
5.2 Cara Penyimpanan Sampel	42
5.3 Proses Pengambilan DNA dari Darah	43
5.4 Pemeriksaan gen <i>Glutamate cysteine ligase</i> (GCL)	44

BAB VI ANALISIS GLUTATION	
6.1 Preparasi Sampel	53
6.2 Metode ELISA (<i>Enzyme-Like Immunoabsorbent Assay</i>)	53
6.3 Analisis Kadar Glutation	55
BAB VII HASIL IDENTIFIKASI GEN GCL DAN GLUTATION PADA PASIEN TUBERKULOSIS PARU	57
BAB VII PENUTUP	68
DAFTAR PUSTAKA	70
GLOSSARIUM	92
INDEKS	96

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel	
7.1 Frekuensi Genotip gen <i>Glutamate cysteine logase</i>	54
7.2 Frekuensi Alel C dan T gen GCLC	55
7.3 Frekuensi Genotip Harapan dan Sesungguhnya	56

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar

2.1 Struktur Glutation	9
2.2 Struktur Glutation dengan Ikatan gamma karboksil	10
2.3 Sintesis Glutation Secara <i>In vitro</i>	12
2.4 Siklus Glutation pada Sel hati (hepatosit)	14
2.5 Regulasi Sintesis Glutation	18
3.1 Kromosom gen GCLC	21
3.2 Kromosom gen GCLM	21
4.1 Mekanisme Glutation Sebagai Antioksidan	33
4.2 Ilustrasi Peran NO, GSNO dan IFN- γ	36
4.3 Glutation dalam Pertahanan Tubuh dari Infeksi mycobacterium	37
4.4 Ilustrasi Penurunan Kadar Glutation	38
5.1 Metode Elektroforesis	47
5.2 Hasil Elektroforesis Produk PCR-RFLP gen GCLC pada Tuberkulosis Paru	49
5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR-RFLP gen GCLM pada Tuberkulosis Paru	49
7.1 Situs Polimorfisme pada Daerah Promoter Gwn GCLC	55
7.2 Elektroforegram hasil sekuensing GCLC homozigot C/C	56
7.3 Elektroforegram hasil sekuensing GCLC heterozigot C/T	57

BAB I

PENDAHULUAN

Glutation (γ -L-glutamil-L-cysteinyl-glisin) merupakan tripeptida yang terdiri atas asam amino glisin, asam glutamate dan sistein dengan ikatan gamma peptida yang menghubungkan antara gugus amida sistein (yang melekat dengan ikatan peptida pada glisin) dengan gugus karboksil pada rantai samping glutamat. Glutation umumnya disingkat GSH, karena adanya gugus sulfihidril (-SH) yang terdapat pada sistein senyawa tersebut, juga merupakan bagian molekul glutation yang berperan aktif.

Sintesis glutation melalui 2 tahap yang masing-masing dikatalisa oleh enzim yang berbeda. Tahap I pembentukan dipeptida γ -glutamylcystein dari glutamat dan sistein dikatalisa oleh enzim *glutamate-cystein ligase* (GCL). Tahap II sintesis glutation dari γ -glutamylcystein dan glisin dikatalisa oleh enzim *glutathione synthetase* (GSS). Secara ekstrasel, GSH dapat dihidrolisis oleh γ -L-glutamyl transpeptidase (GGT). Dimana GGT mentransfer gugus γ -glutamyl fungsional ke gugus H₂O selama hidrolisis untuk membentuk glutamat bebas. Enzim tersebut juga mentransfer gamma-glutamyl dari GSH ke asam amino dan peptida. Secara keseluruhan, produk dari hidrolisis GSH diambil oleh sel dalam bentuk asam amino atau dipeptida.

Glutation (GSH) ditemukan hampir di semua jaringan mamalia dan terutama sangat terkonsentrasi di hati. Glutation dalam tubuh terdapat dua bentuk yaitu dalam bentuk kekurangan thiol, merupakan bentuk glutation tereduksi atau biasa dikenal sebagai glutation (GSH) dan bentuk disulfida-teroksidasi (GSSG). Disulfida teroksidasi (GSSG) merupakan GSH yang aktif menangkap radikal bebas (Zhang *et al.*, 2005; Heisterkamp *et al.*, 2008). Glutation merupakan zat yang secara

alami sudah ada di dalam tubuh sejak lahir, terdapat di dalam maupun di luar sel tubuh. Glutation merupakan bentuk yang lebih utama, kebanyakan dalam konsentrasi milimolar dalam mayoritas sel.

Konsentrasi GSH pada hati dapat mencapai 5-10 mM. Sedangkan GSSG kurang dari 1% GSH. GSH disimpan dalam 3 tempat utama pada sel eukariotik, yaitu hampir 90% GSH seluler berada pada sitosol, 10% pada mitokondria dan sisanya berada pada retikulum endoplasma. Kadar glutation di dalam darah berada dalam rentangan 5-8 mM/l, dengan konsentrasi tertinggi di dalam hati, yang merupakan organ terpenting dalam fungsi detoksifikasi, lien, ginjal, paru, jantung, otak dan lambung. Kadar glutation dalam tubuh menjadi aspek penting yang harus diperhatikan karena terganggunya sintesis dan metabolisme GSH akan mengakibatkan fungsi glutation terganggu dan mengakibatkan munculnya berbagai penyakit dalam tubuh seperti liver, aging, cystic fibrosis, Parkinson..

Glutation berperan dalam pemeliharaan status tiol redoks sebuah sel, perlindungan terhadap kerusakan oksidatif, detoxifikasi endogen dan eksogen logam reaktif dan elektrofil, penyimpanan dan transportasi sistein, serta untuk protein dan sintesis DNA, regulasi siklus sel dan diferensiasi sel. Perubahan homeostasis GSH menunjukkan perkembangan sejumlah penyakit pada manusia.

Penelitian terbaru telah menemukan peran GSH dalam mengatur ekspresi gen, apoptosis, dan transportasi membran molekul endogen dan eksogen. Glutation juga memiliki beberapa kegunaan antara lain detoksifikasi, antioksidan dan pemeliharaan status tiol dan modulasi proliferasi sel. Glutation dideskripsikan sebagai agen pertahanan tubuh terhadap racun *xenobiotik*, yang berupa obat-obatan, polutan dan karsinogen. Sebagai prototipe dari antioksidan, glutation berperan dalam proteksi sel akibat efek dari kelebihan zat oksidan, baik secara langsung maupun sebagai kofaktor dari glutation peroksid.

Aktivitas enzim yang terlibat dalam metabolisme GSH dikendalikan pada tingkat transkripsi, translasi, dan pascatranslasi. Partisipasi GSH tidak hanya dalam pertahanan sistem antioksidan, tetapi juga di banyak proses metabolisme. Pengaturan aktivitas enzim yang mensintesis GSH sering dianggap sebagai cara untuk mencegah dan memperbaiki penyakit. Beberapa sistem sinyal seluler diketahui terlibat dengan aktivitas ini. Namun, kebanyakan pendekatan efisien yang digunakan adalah terkait dengan kemungkinan memanipulasi biosintesis GSH dan detoksifikasi tahap II yang dilakukan oleh enzim. Dalam memanipulasi biosintesis GSH, maka perhatian difokuskan pada enzim sebagai kunci utama sintesis GSH , yaitu GCLC, dan dalam detoksifikasi tahap II melibatkan peran enzim *Glutation-S transferase* (GSTs). Pengaturan enzim-enzim ini terutama di tingkat ekspresi dan beberapa mekanisme yang terlibat.

Enzim-enzim yang mensintesis glutation diekspresikan secara genetik oleh urutan gen yang membentuk protein enzim, yaitu *Glutamate cystein ligase* (GCL). Enzim *glutamate cystein ligase* terdiri atas sub unit katalitik yang disandi oleh gen *glutamate cystein ligase catalitic* (GCLC) dan sub unit modulator yang disandi oleh gen *glutamate cystein ligase modifier* (GCLM). Aktivitas enzim *glutamate cysteine ligase* adalah penentu utama sintesis GSH. Perubahan aktivitas GCL mempengaruhi regulasi di berbagai tahapan dan akan mempengaruhi ekspresi GCL sub unit katalitik atau keduanya GCLC dan GCLM.

Glutation (GSH) merupakan komponen kunci dalam regulasi homeostasis reduksi-oksidasi. Perubahan kadar GSH atau deregulasi status redoks sangat berhubungan dengan kejadian penyakit antara lain TB paru, kardiovaskular, neurodegenerative, kanker, penuaan, AIDS, cystic fibrosis, gangguan hati, diabetes mellitus, dan penyakit komplikasi yang terkait.

Penurunan kadar glutation pada penderita TB paru diduga menyebabkan gangguan regulasi fungsi sel imun, dan menyebabkan kegagalan menangkal *Reactive oxygen species/ROS* (Venketaraman *et al.*, 2005). Pasien TB paru dengan infeksi HIV mengalami penurunan kadar GSH secara signifikan dalam sel mononuklear darah perifer (PBMC) dan sel darah merah (RBC) (Venketaraman *et al.*, 2006; Venketaraman *et al.*, 2008).

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi (polimorfisme) gen pada enzim yang mensintesis glutation berpengaruh terhadap kadar glutation (Rahman, 2005; Njalson and Norgen, 2005). Variasi genetik pada gen *GCLC* dan *GCLM* berhubungan dengan rendahnya kadar GSH in vitro dan mengarah pada kerentanan terhadap penyakit tertentu (Yang *et al.*, 2004; Koide *et al.*, 2003; Custodio *et al.*, 2004).

Perbedaan ekspresi dan aktivitas enzim GCL kemungkinan karena pengaruh variasi dalam urutan asam-asam amino yang berhubungan dengan timbulnya suatu penyakit seperti : infark miokard (Koide *et al.*, 2003) *cystic fibrosis* (McKone *et al.*, 2006) disfungsi endotel (Nakamura *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2003; Zuo *et al.*, 2007), HIV/AIDS (Wang *et al.*, 2012), kanker (Walsh *et al.*, 2001), COPD (Hu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007) diabetes (Bekris *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2011) penyakit perlemakan hati (Oliviera *et al.*, 2010; Hashemi *et al.*, 2011), gangguan fungsi paru (Siedinski *et al.*, 2008; Breton *et al.*, 2010). Polimorfisme mengakibatkan ekspresi dan aktivitas enzim *GCL* secara signifikan berkurang dan fenotip menunjukkan keparahan penyakit. Rendahnya kadar GSH pada pasien TB paru berhubungan dengan adanya variasi gen *glutamate cysteine ligase* (GCL) pada individu penderita (Yuniastuti dan Dewi, 2012).

Penelitian terkait polimorfisme gen GCL pada pasien TB yang dilakukan oleh Yuniastuti dan Dewi (2012) menemukan bahwa terdapat polimorfisme gen *GCL* pada pasien TB paru di kota Semarang sebesar 30%. Pasien tuberkulosis dengan polimorfisme gen *GCL* diduga lebih rentan terhadap adanya stres oksidatif, sehingga memperparah penyakitnya. Bila seorang penderita tuberkulosis memiliki variasi gen *GCL* diduga kadar glutationnya rendah. Hal ini berbeda dengan penderita tuberkulosis dengan gen GCL normal, akibatnya kemampuan menangkap radikal bebas juga berbeda. Bila kemampuan antioksidan rendah dan terjadi peningkatan radikal, maka timbul stress oksidatif.

1.1 Rumusan Masalah

Kajian molekuler glutation tidak terlepas dari kajian molekuler enzim *glutamate cystein ligase* (*gcl*), yaitu enzim yang mensintesis glutation diekspresikan secara genetik oleh urutan gen yang membentuk protein enzim, yaitu *Glutamate cystein ligase* (GCL).

Polimorfisme gen enzim *gcl*, mengakibatkan ekspresi dan aktivitas enzim *Glutamate-cystein ligase* (GCL) secara signifikan berkurang, yang mana berpengaruh terhadap kadar glutation, dan berhubungan dengan rendahnya kadar glutation serta kerentanan terhadap stres oksidatif serta menunjukkan keparahan penyakit khususnya pada manusia.

Contoh kasus adalah pada hasil penelitian tentang **Polimorfisme gen *gcl* pada penderita tuberkulosis paru**. Adanya polimorfisme pada gen *gcl* mengakibatkan ekspresi dan aktivitas enzim *gcl* untuk memproduksi glutation menjadi berkurang, sehingga kadar glutation pada penderita tuberculosis paru (TB) menjadi rendah. Kadar glutation yang rendah disertai tingginya radikal bebas yang berasal dari konsumsi obat antituberkulosis menyebabkan pada pasien TB rentan mengalami stres oksidatif. Bila stres oksidatif meningkat, maka penyakit TB yang diderita semakin parah.

Bahkan diduga berpotensi terjadinya resistensi obat antituberkulosis (OAT) dan penyakit kanker paru.

Oleh karena itu perlu mengkaji dasar molekuler glutation melalui pemeriksaan polimorfisme gen *gcl* pada pasien TB. Pemeriksaan polimorfisme *gcl* ini diharapkan dapat sebagai suatu penanda dini (biomarker) untuk mengetahui apakah penderita TB memiliki kadar glutation yang rendah atau tidak, mengingat bila kadar glutation rendah maka kemampuan menscavenger radikal bebas juga rendah. Bila seorang penderita TB mendapat terapi obat antituberkulosis yang mana obat merupakan senyawa yang dapat menyebabkan timbulnya radikal bebas, sedangkan kadar glutation rendah maka bukan kesembuhan yang diperoleh melainkan keparahan penyakit TB bahkan kematian, meskipun penderita TB sudah mengkonsumsi OAT dengan teratur.

Penanda dini (biomarker) adanya stres oksidatif pada pasien TB yang mendapat terapi OAT belum pernah dilaporkan di Indonesia, maka dari kajian dasar molekuler glutation ini nantinya diharapkan dapat dikembangkan suatu biomarker yang merupakan respon dini tingkat molekuler, reaksi awal sebelum terjadi keparahan penyakit. Hal ini penting untuk membantu usaha penatalaksanaan penderita TB paru secara menyeluruh yang juga meliputi penegakan diagnosis sedini mungkin dimana pemberian terapi OAT yang sesuai secara dini akan dapat menurunkan insidensi terjadinya komplikasi yang berat dan kematian serta memungkinkan usaha kontrol penyebaran penyakit melalui identifikasi karier.

Belum pernah dilakukan pemeriksaan secara molekuler menggunakan serum darah dan dianalisis menggunakan metode PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism*) yaitu pemeriksaan polimorfisme gen *gcl* untuk melihat kerentanan penderita TB terhadap stress oksidatif yang merupakan faktor risiko resistensi OAT.

Berdasarkan hal tersebut, beberapa permasalahan yang perlu dipecahkan dalam kajian dasar molekuler glutation adalah melalui analisis polimorfisme gen *gcl* menggunakan metode PCR-RFLP pada kasus pasien tuberculosis paru, adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana struktur dan biosintesis glutation secara molekuler?
2. Bagaimana hasil identifikasi gen enzim penyusun glutation?
3. Bagaimana peran glutation sebagai antioksidan ?

1.2 Tujuan

Penulisan buku ini dimaksudkan untuk mengkaji beberapa hal terkait, antara lain :

1. Analisis struktru dan biosintesis glutation secara molekuler
2. Analisis hasil identifikasi gen enzim penyusun glutation
3. Analisis peran glutation sebagai antioksidan

1.3 Metode Pemecahan Masalah

Berdasarkan identifikasi masalah, maka metode pemecahan masalah yang akan dilakukan adalah melalui kajian pustaka yang terkait dengan peran gen *gcl* sebagai marker penyakit. Selain itu penulisan ini memaparkan tentang pengembangan teknik molekuler dari gen enzim penyusun Glutation sebagai penanda biologi (biomarker) yang dapat digunakan untuk deteksi adanya cekaman oksidatif akibat paparan obat anti tuberkulosis (OAT) pada kejadian penyakit infeksi karena bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Pengembangan teknik molekuler yang dimaksud adalah dengan mengidentifikasi polimorfisme gen *gcl* yang berperan sebagai penanda biologi terhadap kejadian cekaman oksidatif (stres oksidatif) pada penderita tuberkulosis.

Oleh karena itu, tulisan ini mengkaji secara teoritik dan hasil penelitian terkait polimorfisme gen *gcl* pada beberapa penyakit dan khususnya penyakit tuberkulosis. Hal-hal yang akan dikaji meliputi : 1) Struktur dan

Biosintesis Glutation; 2). Analisis Kadar Glutation menggunakan metode *Enzyme like Immunoassay* (ELISA); 3). Identifikasi Glutation secara molekuler melalui isolasi dan karakterisasi DNA gen *glutamate cystein Ligase* (*gcl*); 4) Identifikasi gen *gcl* pada pasien Tuberkulosis menggunakan PCR-RFLP; 5) Analisis Polimorfisme gen *gcl* dan 6) Peran glutation sebagai antioksidan

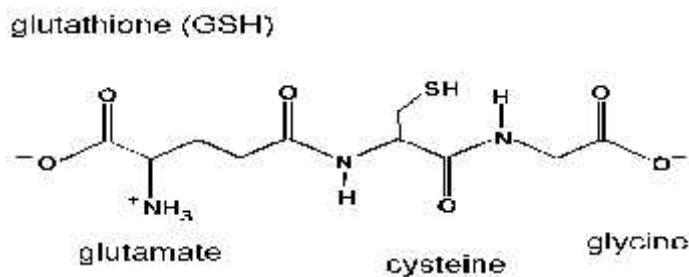
Penulisan ini diharapkan dapat menambah / melengkapi informasi tentang pemeriksaan laboratorium pada pasien TB khususnya, sebagai metode deteksi cekaman oksidatif yang cepat, tepat, mudah dilakukan dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Biomarker gen *gcl* sebagai alat deteksi sebelum terjadinya keparahan penyakit akibat cekaman oksidatif merupakan sumbangsih bioteknologi bagi pemerintah dalam menentukan kebijakan penatalaksanaan pengobatan penyakit infeksi. Informasi ini diharapkan nantinya dapat digunakan oleh pihak-pihak terkait utamanya Balai Kesehatan Paru Masyarakat (BKPM) dan Rumah Sakit Paru khususnya dalam deteksi dini cekaman oksidatif pada pasien TB untuk mencegah meningkatnya keparahan penyakit TB dan resistensi TB terhadap obat anti tuberklosis, sehingga mengurangi kejadian TB-MDR. Selain itu juga dapat digunakan sebagai deteksi penyakit-penyakit degeneratif, seperti aterosklerosis penyebab kejadian penyakit jantung koroner, diabetes mellitus yang menimbulkan keparahan penyakit komplikasi, penyebab kanker serta penyakit infeksi, seperti hepatitis B, flu burung yang berpotensi menimbulkan cekaman oksidatif.

BAB II

STRUKTUR DAN BIOSINTESIS GLUTATION

2.1. Struktur dan Distribusi Biologi Glutation

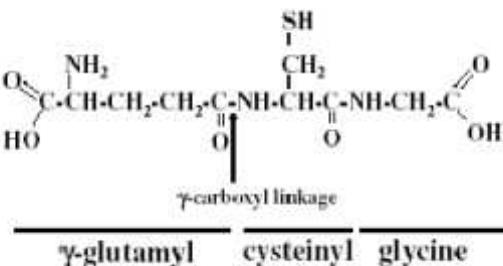
Glutation adalah sebuah tripeptida γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine, yang ditemukan pada semua jaringan mamalia dan terdapat pada konsentrasi tinggi khususnya pada hati. Ikatan peptida menghubungkan glutamat dari gugus γ -karboksil glutamate dan sistein membentuk GSH (gambar 2.1). Sintesis tersebut dikatalisa oleh enzim γ -lutamyltranspeptidase (GGT) yang mana hanya berada di permukaan eksternal jenis sel tertentu. Sebagai konsekuensinya, GSH tahan terhadap degradasi intraseluler dan hanya dimetabolis ekstraseluler oleh organ yang mengandung GGT. Ikatan antara glutamat dari gugus γ -karboksil dengan gugus amino sistein oleh ikatan peptida diduga menyebabkan stabilitas molekul GSH, karena memungkinkan adanya degradasi molekul melalui asam amino c spesifik (gambar 2.2).



Gambar 2.1. Struktur Glutation

Ikatan disulfida glutation di dalam sitoplasma akan dihidrolisis di posisi sistein sebagai donor elektronnya, sehingga glutation kekurangan gugus thiolnya. Selanjutnya, glutation diubah menjadi bentuk teroksidasi, yaitu *glutathione disulfida* (GSSG), disebut juga L- β -glutathione. Setelah teroksidasi, glutation dihidrolisis kembali oleh *glutation reduktase*, menggunakan NADPH sebagai donor elektron.

Rasio glutation tereduksi (GSH) dengan glutation teroksidasi (GSSG) merupakan indikator sensitif untuk stres oksidasi dalam sel dan sering digunakan sebagai ukuran toksitas seluler. Adapun struktur kimia glutation adalah C₁₀H₁₇N₃O₆S.



Gambar 2.2. Struktur Glutation dengan ikatan gamma-karboksil

Glutation (GSH) dengan enzim *glutathione peroksidase* (GPx) dapat mengkatalisis proses reduksi hidroperoksid lemak menjadi alkohol dan hidrogen peroksid menjadi air. Pada saat mengkatalisis proses tersebut ikatan disulfida dari GSH akan berikatan membentuk *Glutathione teroksidasi* (GSSG), dan enzim *glutathione reduktase* dapat mendaur ulang GSSG menjadi GSH kembali dengan cara mengoksidasi NADPH. Ketika sel terpapar oleh stres oksidasi maka akan terjadi penumpukan GSSG dan rasio GSH/GSSG akan menurun.

Dalam organisme seperti Halobacteria, glutation dapat diganti dengan senyawa lain seperti *belerang thiosulfate*. Contoh yang lainnya seperti *trypanothione* (*N¹, N⁸-bis (glutationyl)spermidine*), yaitu bahan campuran serupa dengan fungsi redoks glutation pada beberapa protozoa parasit. Didalam tumbuhan, konsentrasi glutation terakumulasi dalam milimolar di dalam sel, dengan kandungan sistein bebas yaitu 10 sampai 50 kali lipat.

Dalam beberapa tanaman, bentuk glutation ditemukan seperti halnya GSH pada mamalia. Pada glisin senyawa ini mengandung asam

amino C-terminal lain seperti serin, β -alanin, atau Glutamate. Dalam kacang-kacangan homoglutathione (γ -Glu-Cys- β -Ala) dapat ditemukan bersama GSH, dua homolognya disintesis oleh enzim yang berbeda dan dikodekan oleh gen yang berbeda. Sedangkan Jalur pembentukan *hydroxymethyl GSH* (γ -Glu-Cys-Ser) yang ditemukan dalam sereal seperti gandum belum begitu jelas mekanismenya. Hydroxymethyl GSH dapat dihasilkan dari modifikasi GSH yang dikatalisis oleh enzim transpeptidase seperti Karboksipeptidase. Sulfida dari bentuk homoglutathione dan γ -Glu-Cys-Ser direduksi oleh glutation reduktase.

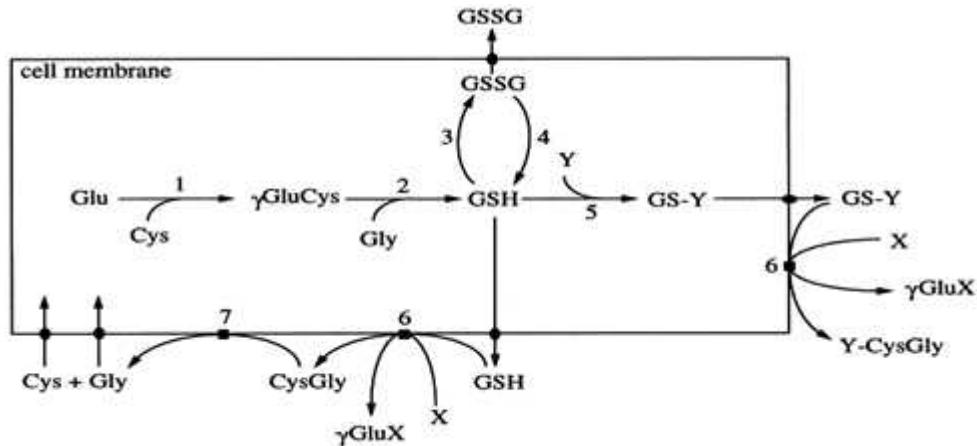
2.2 Biosintesis Glutation

GSH disintesis dalam sitosol di hampir semua sel. Sintesis GSH dari asam amino penyusunnya melibatkan dua ATP yang membutuhkan langkah-langkah enzimatik :

1. L - glutamat + L - sistein + ATP \rightarrow γ - glutamil - L - sistein + ADP + Pi
2. γ - glutamil - L - sistein + L - glisin + ATP \rightarrow GSH + ADP + Pi

Tahap awal sintesis GSH dimulai dari ikatan antara sistein dengan glutamate yang menghasilkan *γ -glutamylcysteine*. Reaksi ini dikatalisa oleh enzim *glutamate cysteine ligase* (GCL), juga dikenal sebagai *γ -glutamylcysteine synthetase*. yang mutlak memerlukan keberadaan Mg²⁺ atau Mn²⁺. GCL terdiri dari sub unit berat atau katalitik (GCLC, Mr ~ 73.000) dan modulator (GCLM, Mr~ 30.000), yang dikode oleh gen yang berbeda pada spesies yang berbeda, contohnya perbedaan gen GCL manusia dan lalat buah. Enzim GCL ini memerlukan ATP untuk hidrolisis dengan membentuk suatu ikatan amida antara gugus karboksil dari glutamat dan gugus amino dari sistein. Langkah berikutnya melibatkan enzim *glutation sintetase*, yang bertanggung jawab untuk menambahkan glisin pada dipeptida untuk memproduksi GSH (γ -glutamylcysteinylglycine) dan juga membutuhkan ATP untuk

hidrolisis (gambar 2.3). Adenosin trifosfat(ATP) adalah kosubstrat untuk kedua enzim tersebut.



Gambar 2.3. Sintesis Glutation secara in vivo oleh enzim

Keterangan gambar : X merupakan akseptor dari bagian g-glutamil ditransfer oleh GGT dari glutathione, Y substrat glutathione-S-transferase(s). (1) γ -Glutasintetase mylcysteine; (2) glutation sintetase; (3) glutation peroksidase (s); (4) glutation reduktase; (5) glutathione-S-transferase (s); (6) γ -Glutatranspeptidase myl; (7) ectopeptidase (s).

Mekanisme keluarnya GSH dari sel secara fisiologis penting karena pasokan GSH hepatosit ditemukan pula dalam plasma, yang digunakan sebagai sumber sistein untuk sintesis GSH pada sel lain. Proses ini membutuhkan dua enzim yang umum ditemukan pada permukaan sel. Enzim γ - glutamil transpeptidase berfungsi mentransfer glutamat untuk asam amino lainnya dan melepaskan ikatan sistein-glisin, yang pada gilirannya dapat dipecah oleh dipeptidase untuk menghasilkan sistein dan glisin. Sistein dan glisin serta asam amino γ -glutamil yang pindah ke sel lain oleh transporter asam amino tertentu akan digunakan untuk biosintesis GSH .

Meskipun GSH disintesis di setiap sel tubuh, tapi secara kuantitatif organ hati adalah tempat sintesis utama. Sebuah penelitian telah dilakukan untuk mengetahui konsentrasi GSH hati, menunjukkan

bahwa GSH disintesis intraseluler dari asam amino prekursor nya oleh adenosine 5'-triphosphate (ATP) - yang membutuhkan enzim γ -glutamylcysteine sintetase (γ GCS) dan GSH sintetase. Dalam sel >98% dalam bentuk tiol-reduksi (GSH), tetapi beberapa juga keberadaanya dalam *tiol-teroksidasi (GSSG)*, *thioeter*, *merkaptida* atau bentuk *thioester* lainnya (GSH konjugat). Glutation intraseluler dipertahankan dalam bentuk pengurangan H oleh NADPH dan membutuhkan enzim glutation reduktase.

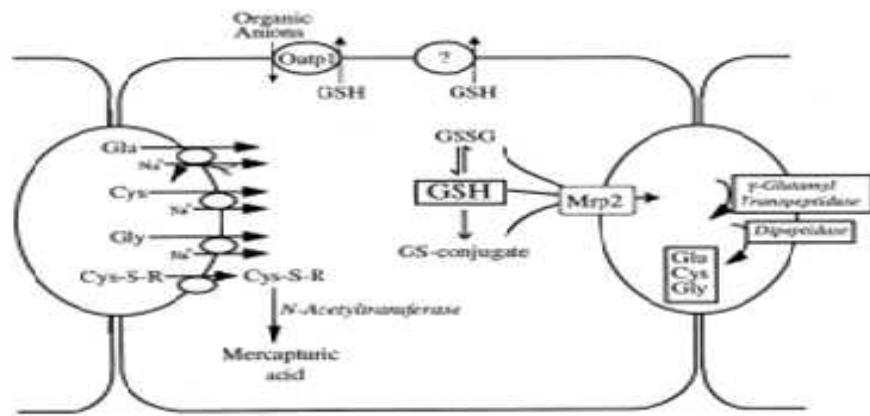
Setelah disintesis dalam sitosol, GSH dikirim ke kompartemen intraseluler lainnya, termasuk mitokondria dan retikulum endoplasma, serta ruang ekstraselular (plasma darah dan empedu) untuk dimanfaatkan oleh sel dan jaringan lain. Salah satu contohnya adalah kira-kira setengah dari GSH yang dihasilkan oleh hepatosit tikus diangkut melintasi membran canalicular ke empedu, dengan konsentrasi GSH bilier mencapai 8 - 10 mM. Sisa dari GSH dilepaskan melintasi membran sinusoidal ke plasma darah untuk pengiriman ke jaringan lain. Konsentrasi plasma GSH relatif rendah (sekitar ~0,01 mM), karena katabolisme cepat dari tripeptide dalam sirkulasi. Konsentrasi GSH dalam sel hati (~10 mM) merupakan hasil dari keseimbangan dinamis antara sintesis dan efflux nya ke dalam plasma dan empedu.

Bila tidak ada stres oksidasi atau bahan kimia elektrofilik, hampir semua glutation yang dikeluarkan oleh sel hati ke plasma darah dan empedu dalam bentuk tereduksi, yaitu GSH . Di sisi lain, ketika GSSG dengan berat molekul yang relatif tinggi atau *hidrofobik glutathione S-konjugasi* terbentuk dalam hepatosit, maka akan diekskresikan melintasi membran canalicular ke empedu.

2.3. Degradasi GSH

Berbeda dengan sintesis GSH yang terjadi intraseluler, penurunan konsentrasi GSH terjadi secara khusus di ruang ekstraselular, dan hanya dalam sel yang mengekspresikan enzim γ -glutamyl transpeptidase (juga disebut γ -glutamil transferase, atau γ -GT). Enzim γ -glutamyl transpeptidase, yang berlimpah pada permukaan apikal epitel transportasi, termasuk canalicular hati dan membran ductular empedu, merupakan satu-satunya enzim yang dapat memulai katabolisme GSH, glutation S-konjugasi, dan glutathione- kompleks dalam kondisi fisiologis. Dalam empedu, GSH, GSSG, dan GS konjugat terdegradasi oleh ectoenzymes katabolik γ -glutamil transpeptidase dan dipeptidase. Beberapa produk metabolisme yang dihasilkan diserap dari empedu kembali ke dalam sel hati pada membrane canalicular transport protein.

Gamma glutamil transpeptidase adalah enzim yang terikat pada membran plasma dengan situs aktif pada permukaan ekstraseluler membran, ekspor GSH melalui pembuluh darah ke dalam ruang ekstraselular awal , dan kemungkinan tahapannya telah diatur dalam semua sel mamalia. γ -glutamil transpeptidase menghilangkan gugus glutamil dari GSH dan GSH yang mengandung senyawa S, untuk memberikan sistein-glisin atau sistein-glisin_S-konjugasi. Senyawa ini merupakan substrat untuk dipeptidase, yang menghidrolisis ikatan peptida antara sistein dan glisin. Dipeptidase merupakan suatu ektoprotein, sehingga reaksi ini juga terjadi di ruang ekstraselular (gambar 2.4)



Gambar 2.4 Siklus GSH pada sel hati (hepatosit)

2.4 Regulasi dan Manipulasi Sintesis Glutation

Produksi glutation diregulasi melalui beberapa level, dengan melalui aktivitas γ -ECS dan keterbatasan konsentrasi sistein. Hal ini ditunjukkan dengan adanya overekspresi oleh dua enzim pada sintesis glutation dan enzim yang terlibat pada sintesis sistein. Walaupun faktor ini dianggap sebagai kontrol utama, regulasi ini tetap mungkin dapat terjadi pada level yang lain, tergantung adanya ketersediaan glisin dan ATP.

Meskipun perubahan secara keseluruhan dari jalur sintesis glutation ini relatif rendah dibandingkan metabolisme primer, namun keberagaman kontrol pada jalur ini akan memberi kesan bahwa jalur ini mengalami regulasi tinggi dan peka terhadap lingkungan redoks sel. Kerumitan ini juga dapat dimaksudkan untuk kondisi fungsi fisiologis yang berbeda pada sintesis glutation yang dimodifikasi.

Dalam beberapa kasus seperti adanya paparan logam berat, GSH sangat diperlukan sebagai antioksidan dan sintesisnya akan dipercepat. Hal ini kemungkinan akan diikuti dengan tidak adanya perubahan pada konsentrasi glutation atau konsentrasi glutation akan mengalami penurunan. Dalam kondisi stres yang berbeda karena adanya komponen oksidatif yang kuat, maka peningkatan sintesis akan terjadi

dengan terakumulasinya glutation, respon ini agak ditingkatkan dengan tujuan untuk mengimbangi perubahan dalam potensial redoks yang disebabkan oleh adanya peningkatan GSSG.

Meskipun banyak yang berperan dalam mengontrol sintesis glutation, sel tumbuhan dapat menampung peningkatan glutation secara keseluruhan. Studi menggunakan enzim γ -ECS dari bakteri *E. coli* yang diberikan pada kloroplas tembakau, menunjukkan peningkatan glutation pada daun hingga 4 kali lipat. Hal tersebut dapat dihasilkan lebih tinggi lagi apabila dilakukan penggabungan antara γ -ECS dan GSH-S. Pengaruh γ -ECS yang berlebih dalam tembakau menyebabkan pembentukan lesi dan akumulasi GSSG tinggi. Baru-baru ini, pengaruh enzim γ -ECS/GSH-S yang dihasilkan dari bakteri *Streptococcus thermophilus* dan diberika pada tembakau telah menunjukkan bahwa kadar glutathione dapat ditingkatkan hingga 20 kali lipat tanpa efek pada pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman memiliki sistem regulasi yang dapat menetralisir adanya tenan biotic dan lainnya.

Peningkatan glutation pada tanaman akibat pemberian enzim γ -ECS dikaitkan dengan resistensi untuk logam berat dan herbisida tertentu. Pemberian enzim γ -ECS dalam kloroplas tidak hanya meningkat glutation tetapi juga meningkatkan beberapa asam amino bebas lain seperti leusin, isoleusin, tirosin, dan lisin. Namun penyebab yang mendasari efek ini tetap belum jelas, meskipun menarik untuk dicatat bahwa beberapa enzim yang terlibat dalam sintesis atau metabolisme asam amino berhubungan dengan target potensial TRX melalui reaksi redoks proteomik.

2.5 Homeostasis Glutation

Konsentrasi GSH Intraselular pada umumnya berkisar antara 0,5 sampai 10 mM, sedangkan ekstraseluler pada hewan ada satu sampai tiga yang ukurannya lebih kecil. GSH biasanya paling banyak ditemukan pada sel hewan dan tumbuhan dengan massa molekul thiol yang kecil. Sebagian besar mikroorganisme juga memproses GSH pada konsentrasi tinggi, tetapi ada juga beberapa spesies dan mutan yang hidup justru kekurangan GSH.

Homeostasis glutation melibatkan mekanisme intra dan ekstraseluler. Glutation disintesis dalam dua jalur yaitu De Novo dan jalur sintesis salvage. Sintesis De Novo membutuhkan tiga asam amino dan energy dalam bentuk ATP. Glutamat mungkin ada dalam bagian dari perubahan satu asam amino γ -glutamil menjadi 5-oxoprolin, yang kemudian diubah menjadi glutamate. Dua molekul ATP digunakan untuk biosintesis satu molekul GSH. Sintesis salvage melibatkan salah satu pereduksi ; GSSG atau prekursornya yang dibentuk dari hidrolisis GSH atau konjugasinya oleh γ -L-glutamyl transpeptidase pada permukaan luar membrane plasma yang ditransport kembali kedalam sel sebagai asam amino atau dipeptida. Selanjutnya untuk detoksifikasi pada spesies reaktif dan elektrofi lseperti metilglioksal, GSH melibatkan proses glutationisasi protein dan beberapa proses lainnya, seperti biosintesis leukotrienes dan prostaglandins, dan reduksi ribonukleat.

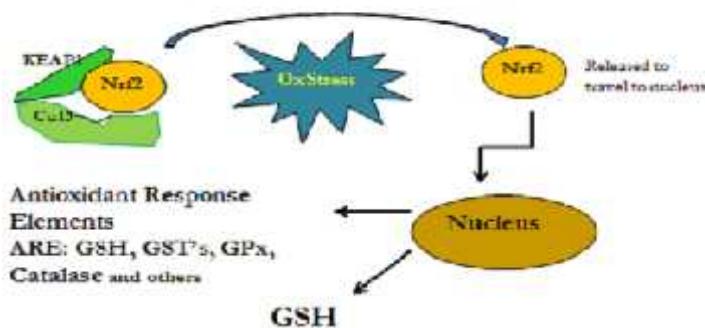
Tingkat keseimbangan GSH seluler dilengkapi oleh keseimbangan antara produksi dan konsumsi, baik oleh tekanan dari sel yang berupa pengurangan, oksidasi, atau pembentukan ikatan. Persediaan ATP untuk sintesis GSH dapat menjadi faktor pembatas untuk metabolisme GSH. Aktivitas Enzim dihambat oleh GSH yang terbentuk, sehingga produk yang dihasilkan, mengindikasikan bahwa biosintesis diatur melalui mekanisme kontrol *feedback* negatif.

2.6 Kontrol gen terhadap sintesis GSH

Biosintesis glutation, glutation peroksidase, glutation S-transferase dan pompa efflux glutation S-konjugasi berfungsi untuk memfasilitasi respon yang terkoordinasi terhadap tekanan oksidatif. Pengaturan respon ini difasilitasi oleh *antioxidant responsive elements* (ARE) yang terletak pada promotor dari banyak gen yang disebabkan oleh tekanan oksidatif dan kimia.

Penelitian mengenai mekanisme kekurangan glutation pada paru-paru anak-anak penderita ashma menunjukkan bahwa disregulasi pertahanan antioksidan glutation terjadi karena disfungsi faktor transkripsi yang menstimulasi ekspresi gen dari enzim yang berhubungan dengan pertahanan terhadap antioksidan dan produksi glutation dalam sel. Faktor transkripsi yang berupa *nuclear factor (erytiroid-derived)* (*Nrf2*) merupakan faktor transkripsi dengan dasar leusin motif zipper yang berperan pada pengaturan kunci regulasi redox. *Nuclear factor (erytiroid-derived)* (*Nrf2*) diekspresikan oleh sebagian besar tipe sel, yang terjadi di sitosol oleh protein inhibitor, *Kelch-like ECH-associated protein* (*Keap 1*). Adanya peningkatan tekanan oksidatif, *Nrf2* dilepaskan dan ditranslokasikan ke nukleus, dimana *Keap1* mengikat dan mengaktifkan ARE dan meregulasi beberapa gen yang terkait dengan sintesis glutation dan pertahanan terhadap antioksidan (gambar 2.5)

Nrf2, the Oxidant 'Thermostat' of the Cell: The 'Oxidant-stat'



Gambar 2.5 Regulasi sintesis Glutation

Tekanan oksidatif yang berlebih menyebabkan terjadinya modifikasi posttranslasional Nrf2. Tanpa fungsi Nrf2, gen yang membentuk GCL dan GS tidak terekspresi sehingga GSH tidak terbentuk. Efek merusak dari modifikasi Nrf2 pada paru-paru, sebagai contoh, dapat meningkatkan kerentanan jaringan yang terpengaruh tekanan oksidatif dari oksigen pada lingkungan, seperti halnya kerjasama antara fungsi sel epitelial dan fagosit, seperti leukosit granulosit dan monosit/makrofag. Pentingnya fungsi Nrf2 ditunjukkan pada model hewan dimana peningkatan regulasi Nrf2 akan melindungi terhadap *dietary carcinogen diethylnitrosamine* (DENA) yang menyebabkan karsinogenesis hati.

Gen untuk pembentukan enzim pada sintesis GSH di turunkan oleh gen *glutamate cystein ligase catalytic* (GCLC), gen *glutamate cystein ligase modulator* (GCLM), gen *glutathione cysteine synthetase* (GSS), dan gen *gamma glutamate trasferase-1* (GGT1). Penurunan regulasi dari gen GCLC dalam sintesis GSH yang berhubungan dengan peningkatan formasi dari sitokin inflamasi yang disebut transforming growth faktor- β (TGF- β). Penurunan kadar GSH akan merangsang produksi TGF- β dan ketika GSH berada konsentrasi normal, produksi TGF- β akan menurun.

Tingkat dan bentuk molekul glutation adalah kunci penentu dari respon seluler terhadap stres oksidatif dan interaksi dengan glutathione S-transferase (GST) yang akan mempengaruhi tingkat glutation. Fungsi GSTs dengan konjugasi GSH berkurang dan katalis serangan terhadap senyawa asing atau produk stres oksidatif , umumnya membentuk bahan yang kurang reaktif yang dapat segera diekskresikan. Ada tiga jenis GSTs pada mamalia : sitosol , mitokondria dan protein terkait membran. GSTs sitosolik mewakili keluarga terbesar dan dibagi menjadi tujuh kelas berdasarkan urutan asam amino mereka (mu, pi, theta, alpha, sigma, omega dan zeta).

BAB III

POLIMORFISME GEN ENZIM Glutamate Cysteine Ligase

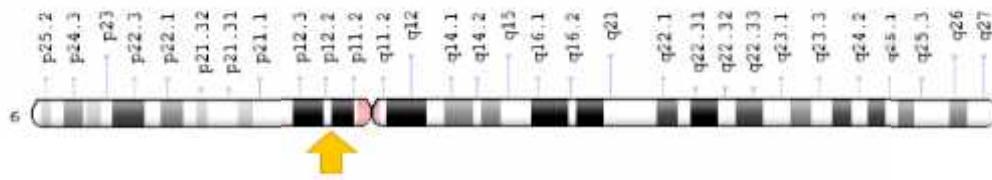
3.1 Gen enzim *Glutamate Cysteine Ligase* (GCL)

Glutation (*-glutamil sisteinil glisin*) merupakan tripeptida yang terdiri dari glutamat, sistein dan glisin. Sintesis glutation melalui 2 tahap yang masing-masing dikatalisa oleh enzim yang berbeda. Tahap I pembentukan dipeptida *-glutamylcystein* dari glutamat dan sistein dikatalisa oleh enzim *glutamate-cystein ligase* (GCL). Tahap II sintesis glutation dari *-glutamylcystein* dan glisin dikatalisa oleh enzim *glutathione synthetase* (GSS) (Biolo *et al.*, 2007). Glutation dalam tubuh ada dua bentuk yaitu glutation tereduksi atau biasa dikenal sebagai glutation (GSH) dan teroksidasi (GSSG) merupakan hasil produk aktivitas GSH dalam menangkap radikal bebas (Zhang *et al.*, 2005; Hanigan, 1998; Heisterkamp *et al.*, 2008).

Dalam organisme tingkat rendah kebanyakan enzim *glutamate cysteine ligase* (GCL) adalah polipeptida tunggal. Sedangkan pada eukariotik kebanyakan enzim GCL merupakan kompleks heterodimer yang terdiri dari produk dua gen yang berbeda, yaitu terdiri atas subunit katalitik yang disandi oleh dua subunit gen yang berbeda dan pada kromosom yang berbeda pula, yaitu gen *gclc* dan sub unit modifier yang disandi oleh gen *gclm*. *Glutamate cysteine ligase* (GCL) merupakan kompleks enzim yang berperan dalam mengkatalisis langkah pertama dalam sintesis glutathione (GSH) de novo. *Glutamate cysteine ligase* subunit katalitik (GCLC) berperan dalam sintesis gamma-glutamylcysteine, dan terdapat interaksi antara GCLC dengan GCLM dimana GCLM berperan meningkatkan katalitik, yaitu dengan menurunkan afinitas konstanta nilai Kim (18,3-1,2 mM) menggunakan glutamate sebagai substrat dan memodulasi inhibisi umpan balik negatif dalam proses pembentukan glutathione (1,8-8,2 mM). Dengan kata lain, bahwa dalam

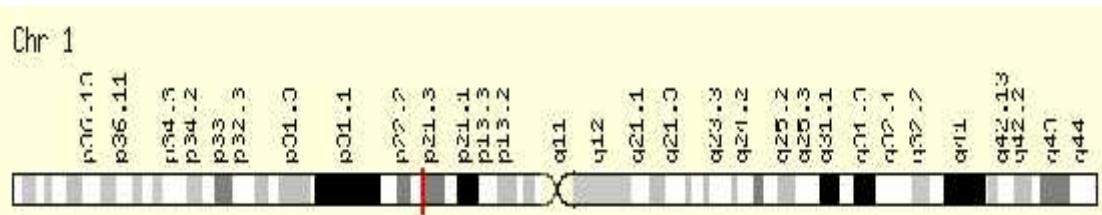
kondisi fisiologis, GCLC tidak akan berfungsi dengan baik tanpa ada interaksi dengan GCLM

Glutamate cysteine ligase subunit katalitik (GCLC) memiliki berat molekul lebih besar dibanding subunit modifier/modulasi (mengandung 637 asam amino, sekitar 73 kDa) dan memiliki situs aktif dimana bertanggung jawab terhadap *ATP-dependent* yang membentuk ikatan gugus amino sistein dan gugus -karboksil dari glutamat. *Glutamate cysteine ligase* subunit katalitik disandi oleh gen *gclc*. Gen *gclc* manusia terletak pada kromosom 1p12.2, terdiri dari 7 ekson membentang lebih dari 22kb.



Gambar 3.1. Kromosom gen GCLC

Glutamate cysteine ligase subunit modifier (GCLM) disandi oleh gen *gclm*, memiliki ukuran lebih kecil dibanding gen *gclc* (274 asam amino, sekitar 31 kDa), tidak memiliki sifat katalitik dan berinteraksi langsung dengan enzim GCL karena berperan untuk meningkatkan efisiensi katalitik enzim GCLC. Interaksi dengan GCLC memiliki efek dalam meningkatkan efisiensi holoenzyme dalam kondisi fisiologis. Gen *gclm* manusia terletak pada kromosom 1p21.3, terdiri dari 7 ekson membentang lebih dari 22kb.



Gambar 3.2. Kromosom gen GCLM

Gen GCLC dan GLM manusia telah diklon dan ditugaskan untuk kromosom 6 dan kromosom 1 masing-masing. Baru-baru ini, gen tikus

orthologue untuk Gclm dan Gclc juga telah dikloning dan terletak pada kromosom 9D-E dan kromosom 3H1-3 masing-masing.

3.2 Polimorfisme Gen

Manusia menunjukkan hal yang istimewa berupa variasi genetik. Variasi ini ditunjukkan dari variasi tekanan darah, tinggi badan, warna kulit dan spektrum variasi genetik penyakit. Semua variasi genetik yang alamiah dari proses ini dikenal sebagai mutasi yang didefinisikan perubahan dari *sequenzing* DNA. Perbedaan sekuensing menentukan alel, dan lokasi gen pada kromosom disebut lokus. Bila individu mempunyai alel yang sama pada pasangan kromosom individu tersebut disebut homosigot dan bila allelnya berbeda pada *sequenzing* DNA maka individu tersebut disebut heterosigot.

Alel ditemukan berada pada lokus dan mempengaruhi genotip dari lokus tersebut. Beberapa lokus kemungkinan keberadaannya secara individual, dan bila lokus mempunyai dua atau lebih alel yang keberadaannya secara berulang lebih dari 1% populasi maka lokus itu disebut polimorfik, dan lokus yang polimorfik sering disebut polimorfisme (Jorde dkk., 2006).

Keanekaragaman urutan basa (polimorfisme) pada DNA bukan pengkode adalah sangat sering terdapat pada seluruh genom. Apabila polimorfisme tadi mengenai sisi pemutus enzim restriksi, maka akan diperoleh fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda-beda setelah digesti DNA oleh endonuklease restriksi. Alel yang berbeda-beda yang dihasilkan disebut polimorfisme panjang fragmen restriksi (*restriction fragment length polymorphism*) (RLFP).

Polimorfisme gen DNA dikategorikan menjadi 4 klas berbeda yaitu: *single nucleotide polymorphism, mikrosatelit, minisalelit, Indel.*

Single nucleotide polymorphism (SNPs),

Single nucleotide polymorphism atau SNPs merupakan perubahan genetik atau variasi yang kecil dan dapat ditemukan pada *sequenzing* DNA manusia, mempunyai kode genetik yang spesifik dengan 4 nukleotida, yaitu: A (*adenine*), C (*cytosine*), T (*thymine*), dan G (*guanine*). Variasi SNPs ditemukan apabila satu nukleotida seperti A diganti dengan salah satu dari tiga nukleotida (C atau G atau T). Sebagai contoh SNPs adalah segmen DNA, AAGGTTA menjadi ATGGTTA, dan kejadian SNPs pada populasi manusia lebih dari 1% dan hanya 3-5% dari code *sequenzing* DNA manusia menghasilkan protein, sebagian besar SNPs berada di luar code *sequenzing*, SNPs yang berada pada code *sequenzing* menjadi perhatian khusus peneliti karena dia mempengaruhi fungsi protein. Walaupun kebanyakan SNPs tidak berpengaruh pada perubahan fisik. SNPs sebagai faktor predisposisi penyakit dan respon penyakit terhadap obat dapat dideteksi.

DNA polimorfisme khususnya SNPs dapat digunakan untuk membantu dalam memahami dan menjelaskan mengapa individu berbeda kemampuannya dalam menerima suatu obat, demikian juga menjelaskan mengapa individu mempunyai pengalaman efek samping yang berbeda pada obat. Selanjutnya SNPs tidak hanya digunakan untuk proses deteksi obat tetapi untuk pencegahan dan pengobatan yang praktis. Para peneliti menemukan kebanyakan SNPs tidak berhubungan dengan penyakit tertentu. SNPs merupakan marker biologi untuk terjadinya penyakit pada genom manusia tertentu, sebab SNPs biasanya terletak dekat dengan gen yang menyebabkan penyakit, ada kalanya SNPs secara aktual menyebabkan penyakit, dan selanjutnya dapat digunakan serta diteliti sebagai penyakit yang disebabkan oleh gen (SNPs NCBI, 2007).

Single nucleotide polymorphism bersifat sederhana, prevalensinya banyak dan umumnya merupakan bagian dari polimorfisme DNA yang tumbuh dari substitusi pasang basa tunggal. Perubahan pasang basa, yang dapat dirangsang oleh mutan kimia atau kerusakan replikasi DNA,

berhubungan dengan SNPs dan jumlahnya sangat banyak dari total variasi. Kebanyakan SNPs hanya mempunyai 2 allel dan rasio kedua allel pada populasi berkisar antara 1: 100 sampai 50 : 50.

Single nucleotide polymorphism dapat diidentifikasi dengan melakukan skuensing pada regio yang sama dari genom pada beberapa individu. Walaupun SNPs sudah mempunyai kode skuensing, namun SNPs masih berhubungan dengan gen yang berhubungan langsung dengan fenotip, dan sebagian besar SNPs ditemukan locusnya anonim. Ditemukan lokus anonimus artinya tidak berhubungan secara langsung dengan fenotip. Beberapa kelainan pada gen yang lain berhubungan dengan perubahan fenotip secara signifikan yang merupakan marker DNA. Lokus DNA yang spesifik dengan variasi yang teridentifikasi pada penelitian medis dapat digunakan sebagai marker untuk identifikasi dan *follow up* perbedaan fenotip pada kelompok masyarakat (Hartwell *et al.*, 2008).

Single nucleotide polymorphism bisa digunakan sebagai marker untuk mengenal adanya mutasi alel pada gen yang tidak sempurna atau cacat pada individu dengan kelainan genetik dan sebagian diantaranya diwariskan pada keluarga yang lain sebagai karier. Dengan analisis DNA individu yang palsu dan yang ada hubungannya dengan keluarga bisa dipisahkan mana alel yang normal dan mana yang mutasi (Hickey *et al.*, 2007).

Dilesi, duplikasi dan insersi pada lokus yang tidak diulang (Indel)

Perubahan DNA pada katagori yang luas menghasilkan kejadian mutasi yang luas atau tidak berulangnya lokus DNA oleh delesi, duplikasi atau insersi satu atau lebih *base-pair*. Mutasi ini umumnya disebut *indels*, besarnya berkisar antara satu atau lebih *base-pair* sampai multipel megabase-pair. Dilesi yang kecil dan duplikasi dari sebagian kecil base-pair sampai kilo *base-pair* yang sangat panjang sering meningkat dari ketidaksamaan penyilangan antara tempat non homolog selama rekombinasi miotik. Bahan dilesi yang hilang dari satu homolog akan ditambahkan dengan duplikasi yang lainnya. Insersi yang kecil besarnya berkisar dari

ratusan sampai ribuan base-pair dapat juga disebabkan oleh pemindahan elemen yang terintegrasi secara random ke dalam genom.

Single nucleotide polymorphism, mikrosatelite, minisatelite dan indels yang tidak berulang pada penyiapan lokus merupakan dasar mendeteksi perbedaan genotif diantara individu. Satu perbandingan sekuensing DNA atau penelitian analitik mempunyai identifikasi DNA yang bervariasi atau kumpulan dari variasi. Ini merupakan teknik pertama untuk mendeteksi langsung polimorfisme DNA (Hartwell *et al.*, 2008).

Single nucleotide polymorphism dari polimorfisme DNA ditegaskan oleh beberapa bagian dari *sequenzing* DNA, yang menghasilkan semua cara deteksi didasarkan pada kemampuan mendeteksi variasi nukleotida. Dapat dikategorikan tiga katagori DNA Polimorfisme yaitu mikrosatelite, minisatelite dan delesi / duplikasi/ insersi semuanya merupakan variasi secara atual ukuran dari lokus.

Alel yang besarnya berbeda dari satu alel lainnya dapat secara langsung dan dengan mudah dikenal dengan elektroporesis gel. Apabila perbedaan besarnya antara allel lebih kecil dari 1 kb, penentuan genotip dapat dengan mudah dan cepat dapat diikuti. Pengrajaannya mulai dengan menggunakan sepasang primer tambahan untuk *sequenzing* pada salah satu pinggiran dari polimorfisme sebenarnya diperjelas dengan PCR pada lokus dari DNA secara individual. Kemudian produksi PCR dilakukan ekektroporesis gel untuk memisahkan fragmen DNA menurut besarnya. Setelah diberikan ethidium bromide allel menunjukkan gerombolan yang spesifik. Semua kemungkinan genotip yang *homozygote* dan *heterozygote* dapat dikenal dengan jalan ini. Peneliti tunggal dapat menggunakan protokol ini untuk ratusan genotip dari sampel pada satu hari, tanpa peralatan khusus. Protokol ini juga dapat dipertanggungjawabkan menggunakan fluresensi primer tagged dan elektroporesis pada peralatan yang sama yang digunakan untuk sekuensing DNA secara otomatis. Sekarang fokus perhatian pada katagori khusus dari mikrosatelite dan

minisatelit yang mana keduanya ditentukan sebagai polimorfisme yang berbeda pada jumlah dan pengulangan elemen (Hartwell dkk., 2008).

Polimorfisme genetik adalah salah satu faktor penting yang mempengaruhi perbedaan etnik dalam respon terhadap suatu obat. Polimorfisme genetik ditafsirkan sebagai keadaan yang mana lebih dari satu alel bersaing pada satu lokus gen, biasanya akibat satu atau lebih proses mutasi yang terjadi pada alel. Alel yang mengalami mutasi tadi, secara dominan, ko-dominan atau resesif, mengkode satu protein yang tidak memiliki aktivitas atau mempunyai perubahan aktivitas. Keadaan ini menyebabkan ada sekurang-kurangnya dua fenotip dalam suatu populasi yang mana fenotip yang paling kecil berlaku pada frekuensi sekurang-kurangnya 1% dalam suatu populasi.

Variasi antar individu dalam hal respon terhadap obat dan terjadinya efek obat yang tidak diinginkan (*adverse drug reactions*, ADRs) merupakan masalah kesehatan yang besar. Adanya ADR ini merupakan penyebab terbesar ketidak-patuhan pasien terhadap pengobatan maupun kegagalan pengobatan, terutama pada penyakit-penyakit kronis. Salah satu faktor yang berkontribusi terhadap fenomena ini adalah faktor genetik. Karena itu, kemampuan untuk memahami kemungkinan penyebab variasi respon ini melalui studi farmakogenetik/genomik sangat perlu sebagai prediktor untuk meningkatkan respon terhadap obat, mencegah terjadinya ADR, yang pada gilirannya akan dapat mengurangi biaya kesehatan dan beban sosial akibat adanya ADR atau ketidakefektifan pengobatan. Di sisi lain, dibidang farmasi, informasi ini sangat penting untuk mengetahui obat-obat mana yang paling sesuai dikembangkan untuk profil farmakogenetik orang Indonesia.

Fakta awal bahwa faktor genetik memainkan peran dalam variasi respon terhadap obat didasarkan pada adanya perbedaan fenotip enzim pemetabolisme obat pada individu yang mengalami adverse drug reaction. Berkurangnya aktivitas enzim pemetabolisme fase II di hati ternyata

berkorelasi signifikan dengan terjadinya toksisitas saraf obat TBC isoniazid pada beberapa orang yang mengalaminya. Fakta lebih baru menunjukkan bahwa berkurangnya aktivitas enzim pemetabolisme fase II tersebut disebabkan karena adanya polimorfisme pada enzim N-acetyl transferase 2 (NAT2). Contoh lain adalah penyakit Lupus yang disebabkan karena prokainamid, yang ternyata dijumpai pada individu yang mengalami mutasi pada enzim sitokrom 450 subtipe CYP2D6. Contoh ini membuka tantangan di bidang farmakologi yang disebut farmakogenetik, yang berfokus pada pencarian faktor genetik yang bertanggung-jawab terhadap variabilitas respon individu terhadap obat.

Polimorfisme pada gen yang mengkode protein yang terlibat dalam proses absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi obat, maupun terhadap respon terhadap obat, sangat berpengaruh signifikan respon *in vivo* suatu individu terhadap obat. Salah satu contoh adalah dalam pengobatan dengan isoniazid, terdapat perbedaan respon dari beberapa individu berupa perbedaan dalam kecepatan proses asetilasinya terhadap obat tersebut. Profil asetilasi terhadap isoniazid yang merupakan obat anti tuberkulosis ini digolongkan dalam inaktivator cepat dan lambat. Individu yang tergolong dalam inaktivator lambat ternyata aktivitas enzim *N-acetyltransferase*-nya sangat lambat. Perbedaan tersebut ternyata disebabkan oleh adanya variasi genetik dari gen yang menyandi ekspresi dari enzim *N-acetyltransferase*. Bagi individu yang mempunyai kelainan yang disebabkan oleh autosomal recessive allele, berupa variasi polimorfik maka aktivitas enzim *N-acetyltransferase* menjadi lambat. Aktivitas enzim *Nacetyltransferase* ini sangat bervariasi untuk setiap suku atau ras. Bagi orang barat (Amerika dan Eropa) 50% dari penduduknya ternyata tergolong inaktivator lambat, sedangkan untuk orang Jepang sebagian besar tergolong inaktivator cepat.

Telaah genetik untuk mempelajari hubungan antara variasi polimorfisme di dalam struktur gen dengan efeknya dalam klinik terus dikembangkan. Diharapkan melalui pendekatan ini dapat ditingkatkan

pemahaman kita dalam penemuan kandidat gen yang dapat dikembangkan sebagai target obat. Sebagai contoh, varian dari allele enzim *thiopurine methyltransferase* (TPMT), ternyata erat kaitannya dengan terjadinya reaksi obat yang tidak diinginkan (*adverse drug reactions*, ADR). Sedangkan varian dari target obat lain yaitu enzim *5 lipoxygenase* (ALOX5), yang erat hubungannya dengan fenotipe penyakit asma, juga dapat mempengaruhi respon pengobatan dan varian dari gen apolipoprotein E (APOE) erat kaitannya dengan inhibisi terhadap enzim kolinesterase pada penderita Alzheimer.

Polimorfisme genetik dapat menyebabkan fenotip berbeda antara individu meskipun berada dalam lingkungan klinis serupa. Memahami peran polimorfisme genetik merupakan kunci yang dapat digunakan dalam uji diagnostik klinis dan terapeutik (Le *et al.*, 2010).

3.3 Polimorfisme gen enzim *Glutamate Cysteine Ligase*

Polimorfisme gen (variasi gen) pada enzim yang mensintesis glutation berpengaruh terhadap kadar glutation (Rahman, 2005; Njalson and Norgen, 2005). Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa polimorfisme genetik pada gen *gclc* dan *gclm* berhubungan dengan rendahnya kadar GSH in vitro dan mengarah pada kerentanan terhadap penyakit tertentu (Yang *et al.*, 2004; Koide *et al.*, 2003; Custodio *et al.*, 2004). Perbedaan ekspresi dan aktivitas enzim *gcl* kemungkinan karena pengaruh polimorfisme dalam urutan asam-asam amino yang berhubungan dengan timbulnya suatu penyakit. Polimorfisme mengakibatkan ekspresi dan aktivitas enzim *gcl* secara signifikan berkurang dan fenotip menunjukkan keparahan penyakit.

Polimorfisme gen *gcl* adalah variasi yang terjadi pada gen *gcl* yaitu pada daerah promoter -129 dimana terdapat perbedaan antara individu yang satu dengan individu yang lain pada urutan gen *gcl*.

Beberapa individu memiliki alel gen pada -129 promoter adalah C, sedangkan individu lain memiliki alel gen T. Hasil penelitian menunjukkan bahwa individu dengan alel T pada daerah promoter -129 (-129/T) memiliki aktivitas lebih rendah dalam mengontrol pengobatan. Polimorfisme -129T dapat menekan peningkatan ekspresi gen GCLC dalam menanggapi stres oksidatif, sehingga kemungkinan dapat melemahkan produksi GSH intraseluler dalam menanggapi stres oksidatif, akibatnya mengarah kepada terjadinya peningkatan kerentanan terhadap oksidan.

Asosiasi GLCLC alel 2 dengan peningkatan kepekaan terhadap sejumlah agen menunjukkan bahwa alel 2 adalah terganggu pada kemampuannya untuk mengarahkan ekspresi dari katalitik GCL subunit dalam menanggapi paparan kemoterapi tertentu agen. Ini akan menjadi penting untuk secara khusus menentukan bagaimana GLCLC genotipe memengaruhi induksi GLCLC dan / atau GCL Kegiatan dalam sel terkena narkoba atau stres oksidatif. Polimorfisme -129C>T dan -3506A>G, terletak di daerah promoter gen GCLC telah dikaitkan dengan penurunan produksi GSH.

BAB IV

GLUTATION SEBAGAI ANTIOKSIDAN PADA PASIEN TUBERKULOSIS PARU

4.1 Peran dan Fungsi Antioksidan Glutation

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menetralisisr ROS, berupa radikal bebas. Antioksidan mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas. Tubuh dapat menghasilkan antioksidan berupa enzim yang aktif bila didukung oleh nutrisi pendukung atau mineral yang disebut kofaktor. Tubuh menghasilkan Antioksidan seperti superoksid dismutase, katalase dan glutation (Yunanto *et al.*, 2009).

Glutation (GSH) merupakan salah satu antioksidan yang penting di dalam menetralisis radikal bebas. Glutation merupakan zat yang secara alami sudah ada di dalam tubuh sejak lahir, terdapat di dalam maupun di luar sel tubuh. Kadar glutation di dalam darah berada dalam rentangan 5-8 mM/l, dengan konsentrasi tertinggi di dalam hati, yang merupakan organ terpenting dalam fungsi detoksifikasi, juga terdapat pada lien, ginjal, paru, jantung, otak dan lambung (Sugiyanto 2008), atau 2-20 μ mol/L dalam plasma (Wu *et al.*, 2004). Kadar glutation dalam tubuh menjadi aspek penting yang harus diperhatikan karena terganggunya sintesis dan metabolisme GSH akan mengakibatkan fungsi glutation terganggu dan mengakibatkan munculnya berbagai penyakit seperti liver, aging, cystic fibrosis, Parkinson dll.

Beberap fungsi penting GSH antara lain 1). detoksifikasi elektrofil, 2). pemusnahan radikal bebas, 3). mempertahankan status tiol dari protein, 4). Menyediakan cadangan sistein, 5). memodulasi proses seluler seperti sintesis DNA, proses yang berhubungan dengan mikrotubular dan fungsi imun (Kaplowitz *et al.*, 1985; Meister and

Anderson, 1983; DeLeve and Kaplowitz, 1990; Suthanthiran *et al.*, 1990). Selain itu, GSH juga mengatur keseimbangan *Nitric oxide* (NO), memodulasi aktivitas protein melalui modifikasi pasca translasi (protein S-glutathionylation) (Pompella *et al.*, 2003), memodulasi aktivitas reseptor neurotransmitter (Oja *et al.*, 2000). Dengan demikian GSH merupakan molekul multifungsi dengan aneka ragam fungsinya yang berpengaruh terhadap proses seluler. Hati memainkan peran utama dalam keseimbangan GSH antar organ seperti GSH plasma dan kadar sistein yang ditentukan oleh penurunan GSH sinusoid hati (Kaplowitz *et al.*, 1985).

Sistem antioksidan GSH adalah sistem proteksi endogen yang utama, karena GSH langsung terlibat dan berpartisipasi aktif dalam penghancuran senyawa reaktif oksigen (ROS) dan juga mempertahankan bentuk reduced (aktif) dari vitamin C dan E. Glutation sebagai antioksidan intraseluler (antioksidan dari sel tubuh sendiri), juga disebut sebagai master antioksidan karena GSH mengatur kerja antioksidan lainnya. Sebagai contoh, ketika vitamin C dan E mengambil radikal bebas mereka akan memberikannya kepada glutation untuk kemudian kembali mengambil yang lainnya. Glutation menetralkan radikal bebas tersebut dan dibuang melalui urin. Daya kerja GSH dalam melindungi sel tubuh dari radikal bebas jauh lebih baik dari antioksidan lain seperti vitamin C dan E. Glutation akan menjaga rantai DNA dan RNA pada inti sel agar tidak mengalami penguraian dan melindungi inti sel dari radikal bebas, GSH mengikat zat yang tidak diinginkan dan membawanya keluar melalui urin dan empedu (Sugiyanto 2008).

Keberadaan GSH dalam sel umumnya berfungsi sebagai antioksidan yaitu melindungi sel dari pengaruh toksik ROS dan RNS. berperan sebagai scavenger hidroksil ($\bullet\text{OH}$) dan superoksida ($\bullet\text{O}_2$), juga berperan dalam pemeliharaan kelangsungan hidup sel, replikasi

DNA dan proses thiolasi protein, katalisis enzim, transpor transduksi membran, aksi reseptor, metabolism antara dan maturasi sel (De Rose, 2000, Zhang *et al*, 2005; Heisterkamp *et al*, 2008), regulasi fungsi sel imun yaitu regulasi antigen presenting cells (APC) (Peterson *et al.*, 1998) serta regulasi T helper 1 (Th1) dan T helper 2 (Th2) (Connell dan Venketaraman, 2009).

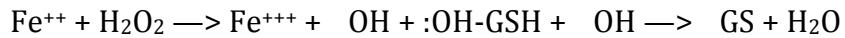
Glutation berperan sangat penting dalam melindungi sel, berfungsi dalam pembentukan, pembelahan, proliferasi dan mempertahankan sel limfosit T yang merupakan mekanisme terdepan pertahanan terhadap infeksi. Seperti sel pada umumnya, proliferasi, pertumbuhan dan diferensiasi sel imun sangat tergantung glutation. Baik limfosit T dan limfosit B memerlukan kadar glutation intraseluler yang adekuat agar dapat berdiferensiasi. Glutation dibutuhkan oleh sel T untuk berproliferasi sebagai respon terhadap stimulasi mitogen, untuk mengaktivasi sel T killer, dan fungsi sel T spesifik lainnya, termasuk sintesis DNA untuk replikasi sel dan untuk metabolisme IL-2 yang penting untuk respon mitogenik (Venketeraman *et al*, 2003; Venketeraman *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2005; Dayaram *et al*, 2006; Heisterkamp *et al*, 2008).

Kemampuan sel limfosit untuk menghambat perusakan karena oksidasi dapat diukur dari kemampuan sel untuk memulihkan kembali GSH intraseluler. Dengan demikian sel ini dapat memberikan respon yang lebih baik terhadap rangsang antigen. Penelitian yang baru dilakukan menunjukkan bahwa apabila lebih banyak GSH yang tersedia dalam sel T helper CD4 yaitu sel yang menjadi sasaran virus HIV, maka akan lebih lama penderita dapat bertahan hidup (Deneke and Fanburg 1989; Griffith, 1999). Ketika limfosit berproliferasi dalam proses pengembangan respon, maka terdapat peningkatan kebutuhan GSH. Hal ini penting untuk produksi antibodi maupun sel T helper dan limfosit T

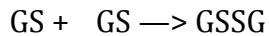
yang sifatnya sitolitik (membunuh sel). Limfosit untuk menetralkan kerusakan oksidasi tergantung cadangan GSH intraseluler yang dapat merepson lebih baik terhadap stimulus antigen (Venketeraman *et al*, 2005; Dayaram *et al*, 2006; Heisterkamp *et al*, 2008).

Glutation berperan utama dalam pemeliharaan keseimbangan redoks seluler. Glutation akan menangkap peroksid yang membahayakan sel. Semua organisme aerob secara fisiologis pasti mengalami stres oksidatif dari proses respirasi mitokondria. Senyawa intermediate yang terbentuk seperti *superoxide* (O_2^-) and *hydrogen peroxide* (H_2O_2), dapat menyebabkan produksi oksigen radikal yang bersifat racun dan dapat menyebabkan peroksidasi lipid dan cedera sel. Untuk mencegah hal ini, diproduksi hydrogen peroksid secara endogen yang direduksi oleh GSH yang keberadaanya tergantung pada selenium dikenal sebagai *GSH peroxidase*. Dalam prosesnya, GSH dioksidasi menjadi GSSG, yang selanjutnya mengalami reduksi menjadi GSH kembali dikatalisa oleh enzim *GSSG reduktase* yang memerlukan NADPH, dalam siklus redoks. Peroksid organik dapat direduksi oleh *GSH peroxidase* and *GSH S-transferase*. Hidrogen peroksid dapat juga direduksi oleh *katalase*, yang hanya terdapat di dalam peroksisom. Di dalam mitokondria, GSH sangat penting sebab di sini tidak ada *katalase*. Memang, GSH mitokondria sangat penting dalam mempertahankan keadaan fisiologis dan patologis yang disebabkan oleh stres oksidatif (Garcia-Ruiz and Fernández-Checa, 2006). Keparahan stres oksidatif dapat menyebabkan berkurangnya GSSG menjadi GSH di dalam sel dan menyebabkan akumulasi GSSG. Untuk melindungi sel dari ketidakseimbangan redoks, GSSG bisa secara aktif dapat dikeluarkan dari sel atau bereaksi dengan gugus sulfhidril yang membentuk disulfide campuran. Jadi, keparahan stres oksidatif menyebabkan penurunan GSH seluler (Lu ,1999).

Mekanisme kerja dari GSH didalam proses penangkapan radikal bebas yaitu dalam segi kemampuananya mereduksi hidroksil radikal (OH) yang berasal dari reaksi Fenton.



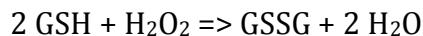
dan glutathione yang teroksidasi bersifat radikal akan saling menetralisir



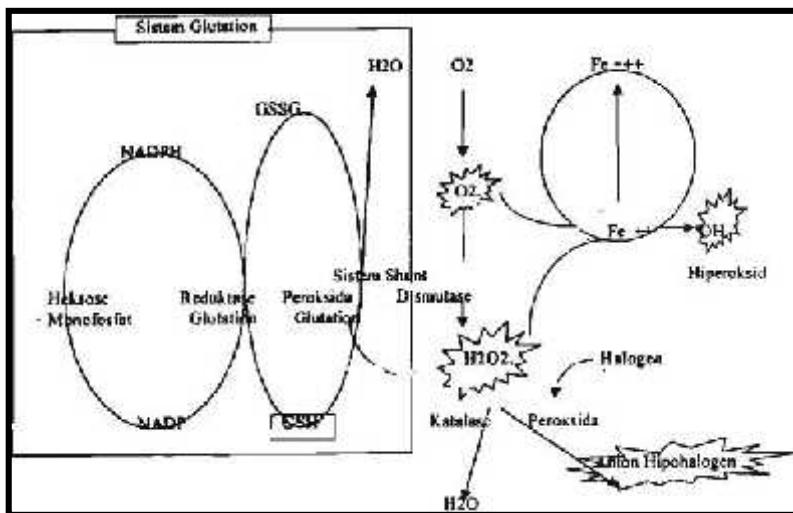
atau dapat juga dikatakan dengan rumus yang berbeda, yaitu



Disamping itu enzym Glutathione peroxidase menetralisir Hidrogen Peroksid (H₂O₂) dengan cara mengambil hydrogen untuk membentuk 2 H₂O dan satu GSSG, sedangkan enzyme glutathione reduktase akan menjadikan GSSG, dengan menggunakan enzyme NADPH sebagai sumber hydrogen, menjadi GSH kembali.



Dengan kata lain glutathione di sini mencegah hidroksil radikal yang dapat merubah molekul lemak menjadi lemak radikal (L) atau peroksid lemak (LOO) melalui dua sisi yaitu mencegah terbentuknya hidroksil radikal (OH) bereaksi dengan molekul lemak atau mencegah terbentuknya hidroksil radikal dengan merubah Hidrogen Peroksid (H₂O₂) menjadi molekul air (Gambar 4.1)



Gambar 4.1 Mekanisme fungsi glutation sebagai antioksidan

4.2 Glutation dan Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Glutation (GSH) adalah senyawa antioksidan utama yang digunakan oleh sel manusia dalam pemeliharaan keseimbangan redoks selular. Secara khusus, GSH intraseluler penting untuk kontrol infeksi terhadap *Mycobacterium tuberculosis* oleh sel-sel sistem kekebalan tubuh. Mikobakteri mengaktifkan makrofag mengakibatkan terjadinya ledakan radikal bebas (*Respiratory burst*). Mikobakteri intraselular patogen tumbuh dan bereplikasi dalam makrofag. Setelah proses fagositosis, kelangsungan hidup mikobakteri bergantung pada kemampuan mereka untuk menghindar dari kerusakan oleh makrofag.

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri patogen yang hidup intraseluler dan tumbuh di dalam fagosom, dimana terlindung dari sistem imun efektor seperti antibody dan limfosit T. Meskipun literatur pada tahun 1950an menunjukkan bahwa kadar GSH pasien TB lebih rendah, hal tersebut baru terbukti dari hasil penelitian Venketaraman dan rekannya yang mempelajari secara mendalam efek GSH terhadap infeksi *M. tuberculosis*. Menggunakan sel makrofag tikus, peneliti menunjukkan bahwa IFN- γ dan endotoksin meningkatkan

produksi *Nitric oxide* (NO) dan aktivitas bakterisida, yang secara paralel menunjukkan penurunan kadar GSH yang bereaksi dengan NO untuk membentuk *S-nitrosoglutathione* (GSNO).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa strain *M. Tuberculosis* sensitif terhadap antioksidan glutation (Venketaraman *et al.*, 2003; Venketaraman *et al.*, 2005; Dayaram *et al.*, 2006). Glutation dapat mempengaruhi proliferasi sel, mencegah peroksidasi lipid tak jenuh dengan menetralisir ROS, sebuah proses yang penting pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Connell dan Venketeraman, 2009).

4.3. Mekanisme kontrol glutation terhadap infeksi *M. tiberculosis*

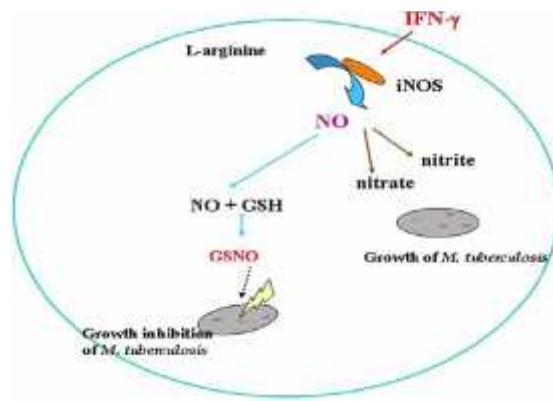
Glutation berperan penting dalam membatasi pertumbuhan mycobacterium intraseluler di makrofag. *M.TuberkulosisH37Rv* sensitif terhadap GSH pada konsentrasi fisiologis (5mm). Glutation memiliki aktivitas antimikroba secara langsung. Namun, mekanisme aksi antimiko bacterial GSH tidak pasti. Salah satu kemungkinan adalah bahwa kehadiran GSH dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan ketidakseimbangan bakteri yang mengandung tiol, yaitu mycothiol (alternatif untuk mengatur pengurangan atau oksidasi).

Penelitian Seres *et al* (2000) melaporkan bahwa proses *respiratory burst* pada fagositosis menginduksi peningkatan kebutuhan sistein, sistin dan glutation baik secara sendiri-sendiri maupun kombinasinya. Hasil penelitian tersebut mengindikasikan bahwa aktivasi monosit pada peristiwa *respiratory burst* atau adanya paparan H₂O₂ pada sel menyebabkan penurunan sistein, tetapi tidak berefek pada sistin, sehingga menginduksi peningkatan kebutuhan glutation. Penurunan uptake tiol total selama *respiratory burst* disebabkan oleh penurunan uptake sistein. Transport sistein dan sistin esensial untuk

sintesis glutation di dalam limfosit, makroifag dan sel yang lain. Terdapat hubungan antara aktivasi makrofag pada *respiratory burst* dengan uptake glutation

Bila kadar glutation dalam serum rendah menyebabkan penurunan mobilisasi Ca^{2+} dan kegagalan fosforilasi tirosin pada beberapa protein, termasuk pembentukan reseptor sel imun seperti CD3 (Chew dan Park, 2004), sehingga regulasi fungsi sel imun tubuh terganggu. Stres oksidatif dapat menyebabkan deplesi GSH. Stres oksidatif dapat disebabkan oleh radiasi ultra violet, toksin, limbah kimia dan logam berat, infeksi virus dan bakteri, inflamasi dan luka bakar.

Meskipun NO dianggap sebagai molekul efektor utama yang terlibat dalam pengendalian infeksi *M. tuberculosis* dan memiliki aktivitas biologis pendek karena mampu medetoksifikasi dengan cepat sebagai nitrat dan nitrit. Nitrat dan nitrit memiliki efek antimikroba. Nitric Oxide (NO) juga bereaksi dengan GSH untuk membentuk GSNO. GSNO merupakan donor NO, maka dapat melepaskan NO, yang menyebabkan kematian *M. tuberculosis* (Gambar 4.2).

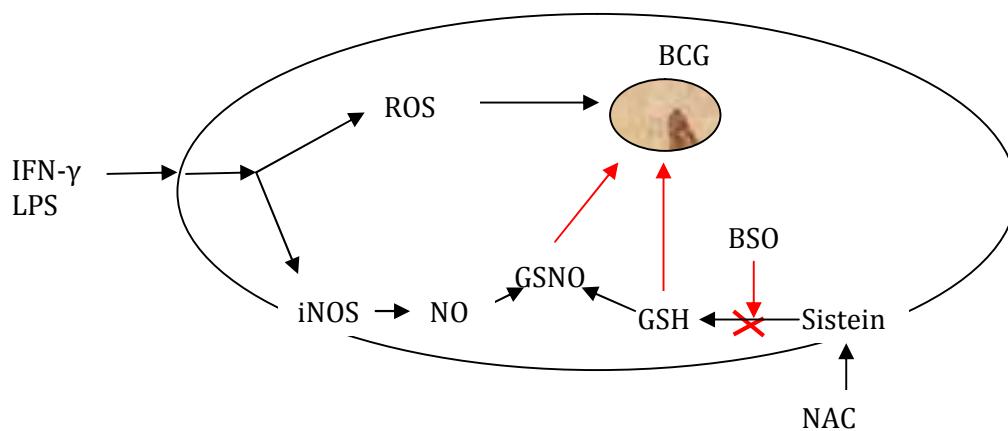


Gambar 4. 2 Ilustrasi peran NO, GSNO, dan IFN- γ pada tikus percobaan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. (Dimodifikasi dari Connell dan Venketaraman, *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 2009)

Kestabilan NO meningkat ketika berupa kompleks dengan GSH. Konsentrasi GSNO intraseluler dalam sistem murine akan lebih tinggi daripada konsentrasi ekstraseluler akibat rendahnya tingkat GSH dalam cairan ekstraselular (Connel and Venketaraman, 2009).

Penelitian eksperimental menunjukkan penurunan GSH dengan BSO menghambat aktivitas mikrobakteri dalam makrofag yang mana sebagai precursor NAC intraseluler meningkat dalam membunuh mikrobakteri dalam makrofag manusia, dimana dalam kondisi normal sangat tidak efektif dalam membunuh mikrobakteri (Gambar 4.3)

Nitric Oxide juga bereaksi dengan GSH untuk membentuk GSNO, sebuah Donor NO, maka GSNO dapat melepaskan NO, dan menyebabkan kematian *M.tuberkulosis*. Kestabilan NO meningkat bila dalam kompleks dengan GSH. Hingga saat ini belum ada demonstrasi yang menunjukkan keberhasilan produksi NO secara in vitro pada makrofag manusia. Tingkat GSNO dalam tubuh manusia tidak dapat terdeteksi. Oleh karena itu tidak adanya antisipasi efek sitotoksik dari GSNO pada sel manusia.



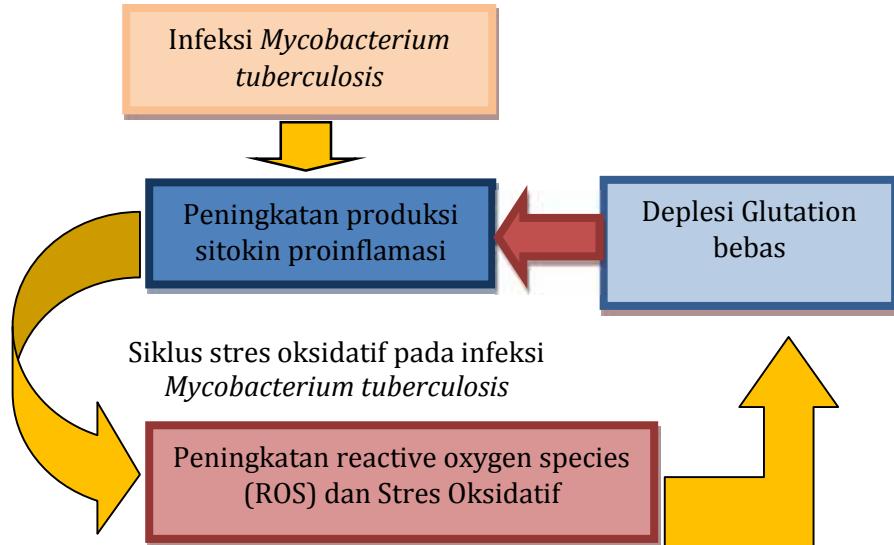
Gambar 4.3 Glutation dalam Pertahanan tubuh dari infeksi *mycobacterium* (Dimodifikasi dari Connel dan Venketaraman, *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 2009)

Keterangan : IFN-g, interferon-gamma; LPS, lipopolisakarida; ROS, reactive oxygen species; iNOS, inducible nitric oxide synthase; GSNO, S-nitrosoglutathione; GSH, glutation; BCG, bacillus Calmette-Guérin; BSO, buthionine sulfoximine; NAC, N-acetyl-cysteine.

Sensitivitas *M. tuberculosis* terhadap GSNO adalah karena efek microbicidal NO yang dilepaskan dari kompleks GSNO. GSNO merupakan salah satu bentuk aktif yang paling penting dari NO sebagai agen antimikroba. Berdasarkan hasil penelitian Venketaraman *et al* (2003) menunjukkan bahwa penghambatan pertumbuhan strain H37Rv dalam makrofag murine dimediasi sebagian oleh GSH dan GSNO yang dihasilkan oleh makrofag selama stres oksidatif atau stres nitrosatif. GSH dan GSNO berperan penting dalam mengatur pembunuhan strain H37Rv intraseluler dalam makrofag J744.1 *in vitro*

GSH memainkan peran penting dalam membatasi pertumbuhan BCG intraseluler dalam makrofag yang berasal dari NOS2 knock-out C57BL6 tikus dan HMDM (Venketaraman *et al.*, 2003). Dengan kata lain, GSH memiliki aktivitas antimikroba langsung berbeda dari perannya sebagai pembawa *Nitric oxide* (NO) (Venketaraman *et al.*, 2003). Ini merupakan perbedaan penting, karena peran NO dalam imunitas mikobakteri manusia tidak pasti. Hasil ini terungkap sebuah kebaruan dan mekanisme pertahanan bawaan yang berpotensi penting diadopsi oleh makrofag manusia untuk mengendalikan infeksi *M. tuberculosis* (Venketaraman *et al.*, 2003; Venketaraman *et al.*, 2005; Dayaram *et al.*, 2006). *M. Tuberculosis* strain H37Rv sensitif terhadap GSH pada konsentrasi fisiologis (5mM) bila ditanam secara *in vitro* (Venketaraman *et al.*, 2005). Dengan kata lain, GSH memiliki aktivitas antimikroba langsung

(Venketaraman *et al.*, 2003). Ilustrasi penurunan glutation disajikan pada gambar 4.4.



Gambar 4.4. Ilustrasi penurunan kadar Glutation

Jalur trans-sulfuration, yang mengubah metionin menjadi sistein dan memiliki peran penting dalam menjaga sistein dan kadar GSH, sangat penting untuk membunuh mikobakteri dan tidak hanya peningkatan enzim pada jalur trans-sulfuration dalam monosit manusia sebagai respon terhadap mikobakteria, tetapi mereka juga menghambat propraglisin menurunkan kadar GSH dan menghambat pembersihan mikobakteri dan fusi fagolisosom, sedangkan NAC mengalami peningkatan.

Mycobacterium menghasilkan mycothiol dalam jumlah millimolar. Menurut Hipotesis Spallholz. "GSH secara struktural mirip dengan antibiotik diproduksi dijamur *Penicillium* dalam genus dan *C. epheliasporium*. "Potensi konversi seperti penicillin berupa turunan *glutacillin laktam* GSH. Dengan kata lain GSH adalah prekursor untuk GSNO, dan GSNO dapat mewakili salah satu bentuk aktif yang paling penting dari oksida nitrat (NO) sebagai agen antimikroba.

BAB V

IDENTIFIKASI GEN GCL DAN GLUTATION SECARA MOLEKULER PADA PASIEN TUBERKULOSIS PARU

5.1 Preparasi Sampel

Pada pasien tuberkulosis paru yang terpilih secara *consecutive* dilakukan *informed consent* selanjutnya petugas puskesmas yang terlatih mengambil darah venanya sebanyak 6 ml, kemudian dibagi dua, 3ml dimasukkan ke dalam botol yang sudah berisi EDTA (antikoagulan) dan 3 ml lagi dimasukkan ke dalam botol yang tidak berisi EDTA. Darah berisi EDTA dan tidak berisi EDTA dibawa ke laboratorium Biokimia jurusan Biologi Universitas Negeri Semarang pada suhu 4°C dan diserahkan kepada petugas laboratorium Biokimia Jurusan Biologi UNNES yang sudah terlatih dan ditunjuk membantu pemelitian ini. Darah yang tanpa antikoagulan di laboratorium Biokimia Jurusan Biologi UNNES oleh petugas yang ditunjuk langsung di *sentrifuge* pada suhu 4°C untuk mendapatkan serum, kemudian serumnya dibagi dua dimasukkan ke botol masing-masing, serum untuk pemeriksaan kadar glutation disimpan pada suhu -80°C (Freezer).

Darah yang mengandung EDTA langsung diproses oleh petugas yang sudah terlatih dan ditunjuk untuk mendapatkan DNA kemudian DNA disimpan pada suhu -80°C (Freezer).

5.2 Cara penyimpanan sampel

Sampel darah untuk pemeriksaan Glutation disimpan di laboratorium Biokimia Jurusan Biologi UNNES dalam bentuk serum pada suhu -80°C. Sedangkan sampel darah untuk pemeriksaan gen glutamate cystein ligase (gcl) disimpan di laboratorium Biokimia Jurusan Biologi UNNES dalam bentuk DNA pada suhu - 80°C. Setelah

sampel dianggap cukup sampel DNA diamplifikasi untuk memperbanyak dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan primer.

5.3 Proses pengambilan DNA dari darah

Darah sebanyak sebanyak 3 ml + EDTA. yang telah disimpan pada suhu 4°C diambil untuk isolasi DNA. Mula-mula dilakukan pemisahan sel darah merah dan sel darah putih (leukosit), mengingat sel darah merah tidak memiliki inti maka yang kita gunakan untuk identifikasi DNA adalah sel darah putih (leukosit). Sampel darah sebanyak 200 uL divortex kemudian setelah divortex ditambah 800 uL PBS 1x untuk memecah dinding darah agar diperoleh sel darah merah dan asel darah putih. Kemudian divortex kembali selama 30 detik selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada suhu -4°C. Setelah inkubasi disentrifuge 10.000 rpm selama 10 menit (suhu ruang) untuk memisahkan antara sel darah merah dan sel darah putih, yaitu mengendapkan sel yang berinti atau sel leukosit berupa pellet yang mengendap di bawah. Supernatan (merupakan debris sel darah merah) yang timbul, dibuang.

Leukosit memiliki membran yang menyelubungi dan intinya berada di dalam sel, sehingga membran yang menyelubungi leukosit dirusak dengan cara menambah 500 uL PBS 1x selanjunya divortex selama 15 detik dan disentrifuge 4000 rpm selama 5 menit, supernatan yang terjadi dibuang, kemudian ditambah 500 uL PBS 1x selanjunya divortex selama 15 detik dan disentrifuge 4000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk kembali dibuang, kemudian ditambah 500 uL PBS 1x selanjunya divortex selama 15 detik dan disentrifuge 4000 rpm selama 5 menit. Selanjunya semua supernatan dibuang, sisa terbentuk pellet putih di dasar tabung selanjutnya diinkubasi pada suhu -20°C semalam.

Setelah diinkubasi, campuran kemudian divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Campuran dicuci kembali sebanyak 3 kali dengan PBS pH 7,4 1000 µl dan disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Setelah itu, supernatan dibuang dan ditambahkan 50 µl chelex 20% dalam dd H₂O pH 10,50 serta 100 µl ddH₂O, kemudian vortex hingga homogen dan diinkubasi dalam air mendidih selama 10 menit. Selanjutnya, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit (suhu ruang). Kemudian ukur kandungan dan kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer dan dicek dengan panjang gelombang 260nm. DNA berada pada bagian supernatan (*DNA containing water*) dipindahkan ke dalam tabung steril sebanyak 200 µl dan disimpan pada suhu -20°C.

5.4 Pemeriksaan gen *glutamate cysteine ligase (gcl)*

Pemeriksaan gen GCL menggunakan metode PCR-RFLP. *Polymerase Chain Reaction (PCR)* merupakan suatu proses sintesis enzimatis untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro* (Fatchiyah *et al.* 2011).

5.4.1 Konsep PCR

PCR merupakan teknik amplifikasi DNA yang diinginkan secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida dengan bantuan enzim *polymerase*. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP, dCTP, dGTP dan dTTP. Amplifikasi sekuen DNA target dapat memperoleh 10⁶-10⁹kali jumlah DNA target awal. Amplifikasi ini dapat menghasilkan lebih dari satu juta kali salinan DNA.

Konsep teknologi PCR mensyaratkan bagian tertentu dari sekuen DNA yang dilipatgandakan harus diketahui terlebih dahulu sebelum proses pelipatgandaan tersebut dilakukan. Reaksi pelipatgandaan suatu

fragmen DNA dimulai dengan melakukan denaturasi DNA *template* (cetakan) sehingga rantai DNA yang berantai ganda (*double stranded*) akan terpisah menjadi rantai tunggal (*single stranded*). Denaturasi DNA dilakukan dilakukan dengan menggunakan suhu (95°C) selama 1–2 menit, kemudian suhu diturunkan menjadi 55°C sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada *cetakan* yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. *Primer* akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen *primer*. Suhu optimal untuk penempelan primer ± 55 °C. Amplifikasi akan lebih efisien jika dilakukan pada suhu yang lebih rendah 37°C, tetapi biasanya akan terjadi *mispriming* yaitu penempelan primer pada tempat yang salah. Pada suhu yang lebih tinggi (55°C), spesifitas reaksi amplifikasi akan meningkat, tetapi secara keseluruhan efisiensinya akan menurun.

Menurut Handoyo & Rudiretna (2001) komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR secara umum adalah *DNA template*, sepasang primer, dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*), *buffer PCR*, magnesium klorida (MgCl₂) dan enzim polimerase DNA.

a. **Template DNA**

Fungsi DNA *templatedi* dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. DNA *template* ini dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA. DNA *template* diperoleh dengan melakukan isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid. Konsentrasi DNA *template* harus dioptimasi. Jika konsentrasinya terlalu rendah, maka primer tidak dapat menemukan target. Sebaliknya bila konsentrasi template DNA terlalu tinggi akan meningkatkan kemungkinan salah target (*mispriming*). Selain itu kemurnian template DNA juga penting, karena dapat mempengaruhi hasil reaksi.

b. Primer (Oligonukleotida)

Primer yang digunakan dalam PCR ada dua yaitu oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat, dan oligonukleotida yang kedua identik dengan sekuen pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain.

Menurut Suryanto (2003), primer biasanya terdiri dari 10-20 nukleotida. Semakin panjang primer, maka harus spesifik daerah yang diamplifikasi. Jika suatu kelompok organisme memang berkerabat dekat, maka primer dapat digunakan untuk mengamplifikasi daerah tertentu yang sama dalam genom kelompok tersebut.

c. dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*)

dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (*deoksiadenosin trifosfat*), dTTP (*deoksitimidin trifosfat*), dCTP (*deoksicitidin trifosfat*) dan GTP (*deoxiguanosin trifosfat*). Pada proses PCR dNTPs bertindak sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. Pada proses ekstensi dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA *template*. Konsentrasi optimal dNTP untuk proses PCR harus ditentukan.

d. Buffer PCR dan MgCl

Reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Oleh karena itu untuk melakukan proses PCR diperlukan buffer PCR. Fungsi buffer di sini adalah untuk menjaga pH medium. Selain buffer PCR diperlukan juga adanya ion Mg²⁺ yang berasal dari MgCl. MgCl bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. MgCl berperan meningkatkan interaksi primer dengan template DNA yang membentuk kompleks terlarut dengan dNTP untuk membuat substrat yang akan dikenali oleh enzim taq DNA Polymerase. Konsentrasi Ion Mg²⁺ yang terlalu tinggi akan

menyebabkan denaturasi rantai DNA menjadi sulit. Konsentrasi di atas 10 mM akan mengakibatkan sifat enzimatik Taq DNA menjadi tidak efektif.

e. DNA Polymerase (*Taq* Polymerase)

Enzim Taq DNA polymerase adalah suatu enzim yang bersifat thermostabil yang diisolasi dari *Thermus aquaticus*. DNA polymerase adalah enzim yang mengkatalisis polimerasi DNA. Jumlah polimerase DNA yang digunakan tergantung pada panjang fragmenDNA yang akan diamplifikasi. Untuk panjang fragmen DNA kurang dari dua kilobasa diperlukan 1,25 – 2 unit per 50 uL campuran reaksi, sedangkan untuk panjang fragmen DNA lebih besar dari dua kilobasa diperlukan 3 – 5 unit per 50 uL campuran reaksi.

Pada saat PCR kita melihat DNA bening selanjutnya dicampur dengan loading dye untuk pemurnian, fungsinya memberatkan DNA dan sejauh mana dia sudah bergerak dalam gel. DNA bermuatan (-) pada saat *ranning* dijalankan dipakai etidium bromide yang berikatan dengan DNA supaya DNA dapat dilihat berwarna putih di bawah sinar ultraviolet kemudian di foto (Setianingsih, 2010). DNA tampak seperti bayangan putih, kemudian hasil PCR dipurifikasi (dimurnikan) kemudian baru dikirim ke PT. Genetika Science Indonesias Jl. Duri Raya No. 5D Jakarta Barat, 11510, Indonesia. untuk dilakukan *sequenzing*.

Salah satu jenis PCR adalah *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP); metode ini digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan analisis model derifat dari perbedaan DNA (Yusuf 2010).

5.4.2 Metode *Polymerase Chain Reaction Fragment length Polymorphism* (PCR-RFLP)

Metode analisis *Polymerase Chain Reaction Fragment length Polymorphism* (PCR-RFLP) adalah salah satu teknik pertama yang secara luas digunakan untuk mendeteksi variasi pada tingkat sekuen DNA. Deteksi RFLP dilakukan berdasarkan adanya kemungkinan untuk membandingkan profil pita-pita yang dihasilkan setelah dilakukan pemotongan oleh enzim restriksi terhadap DNA target atau dari individu yang berbeda. Bebagai mutasi yang terjadi pada suatu organisme mempengaruhi molekul DNA dengan berbagai cara serta menghasilkan fragmen-fragmen dengan panjang yang berbeda. Perbedaan panjang fragmen ini dapat dilihat setelah dilakukan elektroforesis pada gel, hibridisasi dan visualisasi.

Aplikasi teknik RFLP biasa digunakan untuk mendeteksi diversitas genetik, hubungan kekerabatan, sejarah domestika, asal dan evolusi suatu spesies, aliran gen (*genetic drift*) dan seleksi, pemetaan seluruh genom, pengamanan gen-gen target yang akan diekspresikan (*tagging gen*), mengisolasi gen-gen yang berguna dari spesies liar, serta mengkonstruksi pustaka DNA .

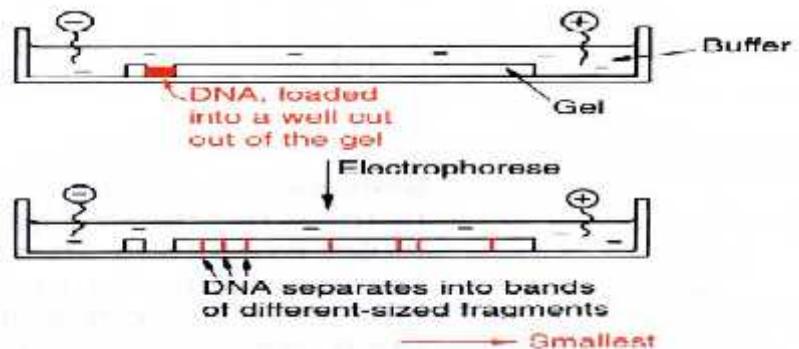
Pada penelitian ini, digunakan sepasang primer oligonukleotida untuk deteksi polimorfisme titik. Komposisi campuran dengan volume total 25 µl yang digunakan saat melakukan PCR adalah PCR mix *GoTaq* (Promega, USA) yang terdiri dari 12,5 µl ddH₂O, 3 µl DNA cetakan (*template*), serta primer oligonukleotida Forward : 5'-TCGTCCCAAGTCTCACAGTC-'3' dan Reverse : 5'-CGCCCTCCCCGCTGCTCCTC-3' masing-masing 1µl. Reaksi denaturasi awal berlangsung pada suhu 95°C selama 10 menit dan 30 siklus denaturasi lanjutan pada suhu 95°C selama 45 detik untuk memisahkan DNA rantai ganda menjadi dua rantai tunggal. Reaksi

annealing, di mana primer menyatu dengan kedua rantai tunggal DNA, berlangsung pada suhu 58°C selama 1 menit. Reaksi polimerisasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Reaksi ekstensi, yaitu sintesis DNA melalui perpanjangan primer mengikuti urutan nukleotida DNA rantai tunggal pasangannya, umumnya berlangsung pada suhu 72°C selama 10 menit. Kemudian dilanjutkan dengan pemotongan urutan gen DNA menggunakan enzim restriksi *Tsp45I* yang memotong pada basa sitosin (C) atau Guanin (G), yaitu pada situs 5'....- GTSAC...3' dengan sisi komplementer 3'... CASTG ...5'.

5.43 Visualisasi Produk PCR-RFLP dengan Eletroforesis

Polimorfisme protein dapat diketahui dengan cara biokimia yaitu melalui metode elektroforesis. Metode deteksi polimorfisme protein dengan teknik elektroforesis dapat digunakan untuk mengetahui varian genetik dalam populasi.

Elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan molekul yang menggunakan medan listrik (elektro) sebagai penggerak molekul dan matriks penyangga berpori (foresis) (Fatchiyah *et al.* 2011).



Gambar 5.1. Metode Elektroforesis (Yusuf 2010)

Elektroforesis gel merupakan suatu teknik yang dapat mengidentifikasi bermacam-macam bahan kimia maupun fisika suatu protein, contoh protein yang dapat dibaca diperoleh dari ekstrak suatu jaringan seperti darah yang pergerakannya ditentukan oleh suatu perubahan elektrik pada kandungan

protein tersebut. Menurut Brewer (1993), elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan partikel-partikel atau komponen sesuai dengan muatan listriknya. Lebih lanjut dijelaskan bahwa komponen yang digunakan adalah protein atau asam polinukleotida yang berasal dari darah dan larutan biologi atau ekstrak suatu jaringan, dimana perubahan ion tergantung pada pH larutan yang akan dianalisis.

Teknik elektroforesis menurut Stenesh (1983) dapat dibagi menjadi dua, yaitu elektroforesis larutan dan elektroforesis daerah (zona elektroforesis), pada elektroforesis larutan dengan larutan penyanga (buffer) yang mengandung makromolekul ditempatkan di dalam suatu sel tertutup dan dialiri arus listrik. Kecepatan migrasi dari makromolekulnya diukur dengan cara melihat terjadinya pemisahan dari molekul yang terlihat sebagai pita di dalam pelarut.

Kecepatan migrasi DNA ditentukan oleh beberapa faktor di antaranya (Muladno 2010):

1. Ukuran molekul DNA

Migrasi molekul DNA berukuran besar lebih lambat daripada migrasi molekul berukuran kecil.

2. Konsentrasi agarosa

Migrasi molekul DNA pada gel berkonsentrasi lebih rendah lebih cepat daripada migrasi molekul DNA yang sama pada gel berkonsentrasi tinggi. Oleh karena itu, penentuan konsentrasi agarosa dalam membuat gel harus memperhatikan ukuran molekul DNA yang akan dianalisis.

3. Konformasi DNA

Konformasi atau bentuk rangkaian molekul DNA berukuran sama akan bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda.

4. Voltase yang digunakan

Kecepatan migrasi DNA sebanding dengan tingginya voltase yang digunakan. Akan tetapi apabila penggunaan voltase dinaikkan, mobilitas

molekul DNA meningkat secara tajam. Ini mengakibatkan pemisahan molekul DNA di dalam gel menurun dengan meningkatnya voltase yang digunakan. Penggunaan voltase yang ideal untuk mendapatkan separasi molekul DNA berukuran lebih besar 2 kb adalah tidak lebih dari 5 Volt per cm.

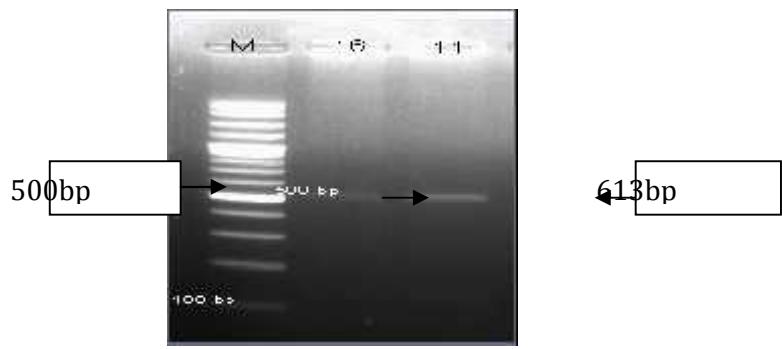
5. *Etidium bromida*

Keberadaan *etidium bromida* di dalam gel mengakibatkan pengurangan tingkat kecepatan migrasi molekul DNA linear sebesar 15%.

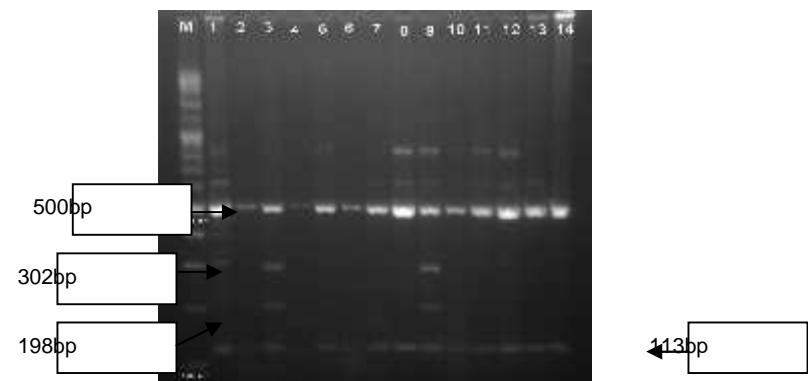
6. Komposisi larutan *buffer*

Larutan yang tidak memiliki kekuatan ion, maka aliran listrik akan sangat minimal dan migrasi DNA sangat lambat. Larutan *buffer* berkekuatan ion tinggi akan meningkatkan panas, sehingga aliran listrik menjadi sangat maksimal, ada kemungkinan gel akan meleleh dan DNA dapat mengalami denaturasi.

Kualitas DNA hasil amplifikasi dengan teknik PCR-FLP divisualisasikan dengan menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa (konsentrasi 4%). Elektroforesis dilakukan pada tegangan listrik 80 volt. Selanjutnya, hasil elektroforesis dideteksi dengan menggunakan Gel Doc 1000 (*Biorad, USA*) untuk divisualisasi dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 300 nm dan direkam. Gambaran alel mutan homozigot ditunjukkan dengan terpotongnya fragmen DNA menjadi 2 pita, yaitu pada 500bp dan 113bp seperti yang terlihat pada gambar 5.2. Sedangkan gambaran alel mutan heterozigot ditunjukkan dengan terpotongnya fragmen DNA menjadi 3 pita pada 500 bp, 302 bp, serta adanya pita 198 bp (gambar 5.3). Untuk gambaran alel *wild type*, tidak terpotongnya fragmen DNA sama sekali (613 bp).



Gambar 5.2. Hasil elektroforesis produk PCR gen GCLC pada tuberkulosis paru



Gambar 5.3. Hasil elektroforesis produk PCR-RFLP gen GCLC

BAB VI

ANALISIS KADAR GLUTATION

6.1 Preparasi Sampel

Pengambilan sampel darah masing-masing 3 cc dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus yang berisi EDTA untuk diambil plasma darahnya. Selanjutkan dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan plasma darah dan serum darah dengan sel darah. Tabung sampel+EDTA disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan plasma

Pengenceran *Diluent Solution* sebanyak 5X untuk mendapatkan 10 ml *diluent sol 1x*= 2 ml *Diluent sol.* + 8 ml Aquades. Pengemceran dilakukan pada tabung eppendorf. Tabung diisi 5 μ l Sampel + 495 μ l *Diluent 1X* = 1/100 *dilution* kemudian disentrifugasi.

Pembuatan larutan standar melalui tahapan :

Siapkan 8 tabung eppendorf

- Standard 7 = 8 μ L Human Pre-Calibrator + 677 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 6 = 300 μ L standard 7 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 5 = 300 μ L standard 6 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 4 = 300 μ L standard 5 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 3 = 300 μ L standard 6 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 2 = 300 μ L standard 3 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 1 = 300 μ L standard 2 + 300 μ L Diluent 1X → sentrifugasi.
- Standard 0 = 600 μ L Diluent 1X.

6.2 Metode ELISA

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) atau nama lainnya *enzyme immunoassay (EIA)* merupakan teknik biokimia yang banyak

digunakan di bidang imunologi untuk mendeteksi adanya antibody atau antigen pada suatu sampel. Beberapa jenis teknik ELISA, yaitu (1) Indirect ELISA; (2) Direct ELISA; (3) ELISA Sandwich; (4) ELISA Multiplex dan (5) ELISA Biotin Streptavidin. Dalam penggunaan sehari-hari ELISA bisa digunakan untuk melabel suatu antigen atau mengetahui antibody yang ada dalam tubuh. Apabila kita ingin mengetahui antigen apa yang ada di dalam tubuh, maka yang diendapkan adalah antibodinya, begitu pula sebaliknya, untuk mendeteksi kadar suatu protein, maka dapat digunakan teknik ELISA *sandwich assay* dengan mengedapkan antibody pada *well plate*.

Fungsi dari test ELISA yaitu bukan hanya untuk mengetahui keberadaan suatu antigen dengan antibodi tetapi juga untuk mengukur kadar antigen atau antibodi tersebut dengan menggunakan alat spektrofotometer. Spektrofotometer adalah sebuah alat yang dapat mengukur jumlah dari cahaya yang menembus sumuran dari microplate. Kompleks antigen-antibodi yang terjadi pada *well microplate* dan setelah pemberian substrat, enzim yang terikat pada antibody ke dua pada kompleks antigen-antibodi yang terbentuk akan memberikan perubahan warna pada cairan tersebut, sehingga akan memberikan *optical density* yang berbeda. *Optical density* dapat dinyatakan meningkat atau menurun berdasarkan pengenceran material standart, sehingga akan menghasilkan kurva dose-response yangnantinya akan digunakan untuk mengestimasi kadar protein tersebut.

Di dalam plasma darah ada 3 fraksi protein yaitu: - Albumin; Globulin dan Fibrinogen. Serum darah adalah plasma tanpa fibrinogen, sel dan factor koagulasi lainnya. Konsentrasi serum protein dapat digunakan untuk mengukur status protein. Penggunaan pengukuran status protein ini didasarkan pada asumsi bahwa penurunan serum

protein disebabkan oleh penurunan produksi dalam hati. Penentuan serum protein dalam tubuh meliputi: albumin, transferrin, prealbumin (yang dikenal juga dengan *trasthyeritin* dan *thyroxine-binding prealbumin-TBPA*), retinol binding protein (RBP), *insulin-Like growth factor-1* dan *fibronectin*. Prealbumin merupakan protein tetramerik yang terdiri dari 4 rantai polipeptida identik yang dapat dijadikan sebagai penanda evaluasi nutrisi pada pasien dengan berbagai penyakit(Petunjuk kit). Prealbumin (transthyretin/TTR) adalah termasuk dalam fraksi globulin yang mentransport hormon tiroksin dan metabolitnya. Kontrol sintesa prealbumin di hati terjadi ketika dihasilkannya sitokin fase akut seperti IL-6 yang kemudia menstimulasi protein fase akut seperti C Reactive Protein (CRP), serum amyloidA, -antitrypsin dan mengakibatkan tejadinya *downregulation* sintesis protein prealbumin.

Pemeriksaan Elisa dapat dilakukan untuk mendiagnosis pasien dengan malnutrisi dan pemantauan pasien dengan resiko kurang nutrisi atau pasien dengan risiko defisiensi protein. Penurunan konsentrasi prealbumin dapat timbul akibat respon fase akut yang terjadi pada kondisi penyakit kronis contohnya kanker, hipertiroid, penyakit hati, infeksi, inflamasi dan gangguan pencernaan, atau pemberian IL-6, estrogen, atau pada keadaan kelaparan serta adanya penyakit pada hati.

6.3 Analisis Kadar Glutation

Kadar GSH plasma diukur secara biokimia dengan menggunakan Sigma GSH Assay Kit. Sebanyak 200 μ L plasma dicampurkan dengan 200 μ L sulfosalicylic acid 5%. Campuran tersebut lalu divorteks dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu 2–8 °C. Selanjutnya, campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 10 menit.

Kemudian, sebanyak 10 μ L supernatan diambil dan dicampur dengan 150 μ L *Working Mixture* dalam 96 well plate.

Campuran tersebut selanjutnya dinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang kemudian ditambahkan 50 μ L larutan NADPH. Kemudian serapannya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm. Kadar GSH kemudian ditetapkan dengan menggunakan kurva standar GSH.

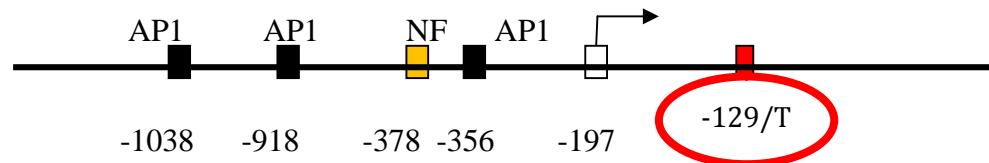
BAB VII

HASIL IDENTIKASI GEN *Glutamate-Cystein Ligase* (GCL) PADA PASEIN TUBERKULOSIS PARU

Serangkaian kegiatan penelitian telah dilakukan untuk mengetahui gambaran variasi (polimorfisme) gen enzim *Glutamate-Cystein Ligase* (GCL) yaitu suatu enzim yang mengkatalisis sintesis Glutation. Enzim *Glutamate-Cysteine Ligase* (GCL) memiliki dua komponen heterodimer yaitu sub unit katalitik (GCLC) dan sub unit Modulator (GCLM) yang masing-masing disandi oleh gen GCLC dan GCLM. Gen GCLC merupakan gen yang mengekspresikan aktivitas enzim *glutamate cysteine ligase* yaitu enzim yang berperan aktif menentukan kadar glutation (GSH) seluler, sedangkan gen GCLM membantu memodulasi gen GCLC.

Variasi genetik enzim GCL pasien TB paru perlu diketahui untuk melihat adanya sifat genetik yang berbeda pada individu dalam kondisi yang sama-sama terinfeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* tetapi memberikan respon perubahan BTA yang berbeda setelah terapi OAT.

Pada daerah -129 promoter gen GCLC ditemukan adanya perbedaan basa nukleotida dibandingkan dengan gen GCL normal. Urutan basa pada daerah promoter GCLC sesuai Gen Bank adalah GTGAC, karena berubah menjadi GTCAC maka pada posisi ini dipotong oleh enzim restriksi *Tsp45I*. Gambaran situs polimorfik pada daerah promoter gen GCLC disajikan pada gambar 7.1.



Gambar 7.1. Situs polimorfik pada daerah promoter gen GCLC
(modifikasi dari Oxford Biolab, 2008)

Genotip -129C/C pasien TB paru ditemukan pada sebanyak 66 orang pasien (64,1%) dan genotip -129C/T sebanyak 37 orang (35,9%) dan tidak ditemukan genotip -129T/T pada gen GCLCnya dari keseluruhan pasien 103 orang (Tabel 7.1)

Tabel 7.1. Frekuensi Genotip Gen GCLC

Frekuensi Genotip	Gen GCLC		Nilai p (Chi Square test)
	Frek	(%)	
C/C Homozigot	66	64.1	0.000
C/T Heterozigot	37	35.9	
Total	103	100	
Nilai $p < 0,05$			

Hasil Uji *Chi square* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara genotip C/C dengan genotip C/T gen GCLC dengan nilai kemaknaan $p=0,000$ ($p<0,05$). Selanjutnya untuk mengetahui proporsi atau prosentase alel C atau T pada lokus gen GCLC dilakukan perhitungan frekuensi alel (tabel 7.2). Hasil perhitungan frekuensi alel dapat digunakan untuk menentukan sifat lokus alel tersebut berada. Suatu lokus dikatakan bersifat polimorfik jika frekuensi alel yang

terbesar sama atau kurang dari 0,95. sebaliknya suatu lokus dikatakan bersifat monomorfik jika frekuensi alelnya yang terbesar melebihi 0,95.

Tabel 7.2 Frekuensi Alel C dan T gen GCLC

Indikator	Genotip			Frekuensi gen	
	CC	CT	TT	Total	
Jumlah Individu	66	37	0	103	
Jumlah gen C	132	37	0	169	$169/206 = 0,82$
Jumlah gen T	0	37	0	37	$37/206 = 0,18$
Jumlah gen Total	132	74	0	206	

Hasil perhitungan frekuensi alel C pada penelitian ini adalah sebesar 82% dan alel T sebesar 18% dengan demikian lokus bersifat polimorfik. Proporsi lokus polimorfik pada suatu populasi seringkali digunakan sebagai salah satu indeks keragaman genetik. Dengan kata lain alel C berperan sebesar 82% terhadap aktivitas gen GCLC selebihnya adalah peran dari alel T sebesar 18%. Selanjutnya dilakukan prediksi frekuensi genotip harapan dari frekuensi genotip sesungguhnya (tabel 7.3). Mengingat dalam suatu populasi yang bereproduksi secara seksual, tiap anggota populasi diharapkan akan melakukan perkawinan secara acak. Dengan perkawinan semacam ini tiap genotip atau fenotip memiliki peluang yang sama untuk saling bertemu dan selanjutnya diteruskan pada generasi berikutnya dengan peluang yang sama. Namun demikian, kondisi semacam ini tidak selamanya dapat dipenuhi. Oleh karena itu dilakukan perhitungan antara frekuensi gen harapan dan frekuensi gen sesungguhnya untuk melihat bahwa frekuensi gen yang

dihitung dengan cara tersebut di atas dapat dibandingkan dengan proporsi frekuensi gen yang diharapkan.

Tabel 7.3 Frekuensi genotip harapan dan sesungguhnya

Genotip	Frekuensi genotip harapan	Harapan	Sesungguhnya
CC	$p^2 = (0,82)^2 = 0,67 \times 103$	69,26	66
CT	$2pq = 2(0,82) (0,18) = 0,295 \times 103$	30,38	37

Frekuensi genotip harapan sudah sesuai dengan frekuensi genotip sesungguhnya.

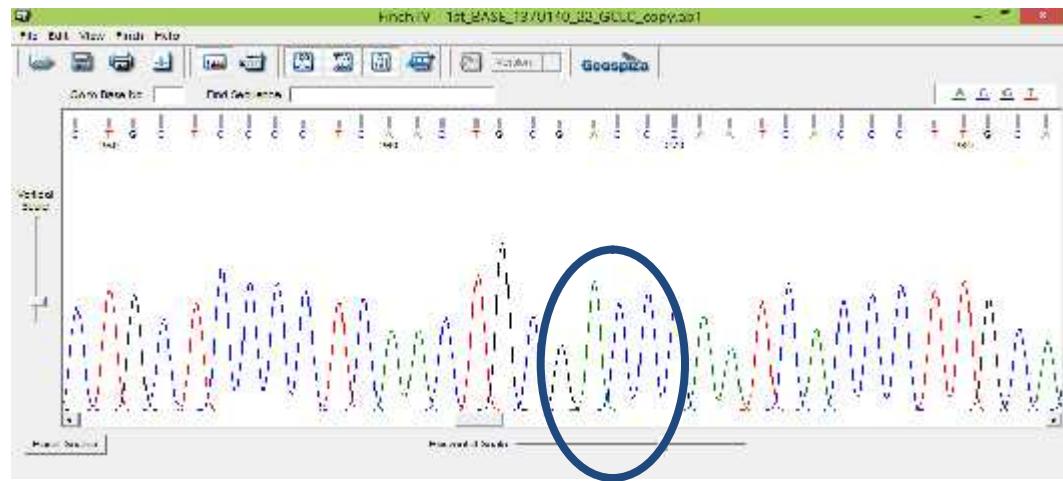
Beberapa produk PCR sampel TB paru telah dilakukan pemeriksaan sekruensing DNA untuk mengkonfirmasi hasil yang telah diperoleh dari pemeriksaan PCR-RFLP. Sebanyak 6 sampel TB paru yang mewakili gen C/C dan C/T dikirim ke laboratorium PT. Genetika Science Indonesias Jl. Duri Raya No. 5D Jakarta Barat, 11510, Indonesia.

Pemeriksaan sekruensing dilakukan untuk mengetahui lebih mendalam perubahan nukleotida yang terjadi pada daerah promoter gen GCLC, berdasarkan gen yang dikonfirmasi dari National Center for Biotechnology Information (NCBI Bethesda, MS, USA).

Hasil sekruensing didapatkan dalam bentuk elektroforegram. Pada elektroforegram terdapat beberapa kurva dengan empat warna berbeda. Warna biru menunjukkan basa sitosin (C), warna hitam basa guanine (G), warna hijau basa adenin (A) dan warna merah basa Timin (T). Pembacaan elektroforegram didasarkan pada warna kurva yang membentuk puncak tertinggi. Jika terdapat satu kurva, maka diasumsikan bahwa pada posisi tersebut terdapat pasangan alel homozigot. Jika terdapat dua puncak kurva yang memiliki tinggi relatif

sama, maka pada posisi tersebut diasumsikan pasangan alel heterozigot. Gambaran hasil sekuensing DNA disajikan pada gambar 7.2 dan 7.3.

Homozigot C/C

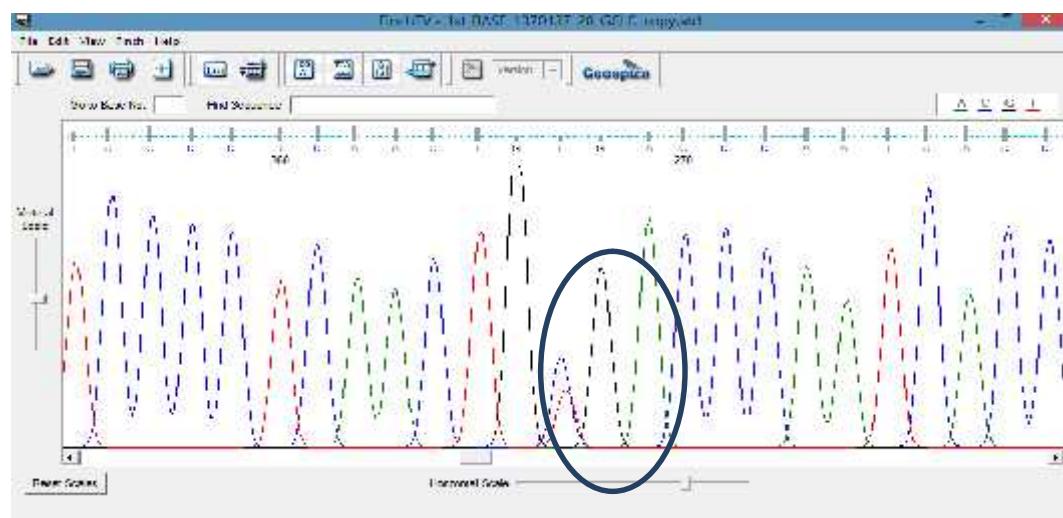


Gambar 7.2. Elektroforegram hasil sekuensing gen GCLC homozigot C/C

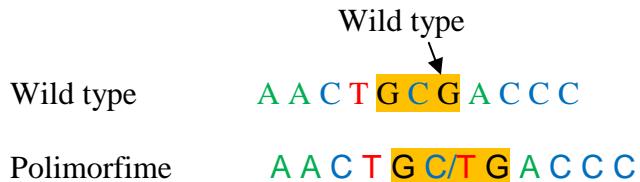
Genotip Wild type

A A C T G C G A C C C

Heterozigot C/T



Gambar V.5 Elektroforegram hasil sekuensing gen GCLC heterozigot C/T



Hasil PCR-RFLP yang telah dilakukan sudah sesuai dengan hasil yang didapat melalui pemeriksaan sekuensing beberapa sampel yang mewakili sampel TB paru. Berdasarkan data hasil penelitian, perhitungan frekuensi alel dan gambaran sekuensing gen menunjukkan bahwa penelitian ini cukup polymorfik.

Pada penelitian ini ditemukan rerata kadar glutation awal pada sampel pasien TB paru dengan genotip C/C sebesar $(0,0589 \pm 0,0402)$ mM dan pada sampel pasien TB paru dengan genotip C/T sebesar $(0,0326 \pm 0,0192)$ mM, meskipun rerata kadar glutation awal secara umum di bawah normal (kadar glutation normal dalam darah 5-8mM). Hal ini menunjukkan bahwa sampel pasien TB paru dengan genotip C/C memiliki kadar glutation lebih tinggi daripada sampel pasien TB paru dengan genotip C/T. Hasil uji statistik *Mann Whitney* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara kadar glutation sampel pasien TB paru dengan genotip C/C dibanding dengan sampel pasien TB paru dengan genotip C/T. Dengan demikian genotip C/T menyebabkan kadar glutation lebih rendah dibanding sampel pasien TB paru dengan genotip C/C.

Adapun rerata kadar glutation akhir sampel pasien TB paru dengan genotip C/C adalah sebesar $(0,0654 \pm 0,00389)$ mM dan rerata kadar glutation akhir sampel pasien TB paru dengan genotip C/T adalah sebesar $(0,0260 \pm 0,0221)$. Rerata kadar glutation akhir dibanding rerata kadar glutation awal pada pasien TB paru dengan genotip C/C mengalami peningkatan, sedangkan rerata kadar glutation akhir pada sampel pasien TB paru dengan genotip C/T mengalami

penurunan dibanding rerata kadar glutation awal. Berdasarkan uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan signifikan rerata kadar glutation akhir pasien TB paru dengan genotip C/C dengan rerata kadar glutation akhir sampel pasien TB paru dengan genotip C/T. Hal ini dapat diasumsikan bahwa sampel pasien TB paru dengan gen C/T tidak memberikan perbaikan terhadap kadar glutation.

Pada penelitian ini ditemukan adanya suatu polimorfisme -129/T pada gen GCLC sampel pasien TB paru. Responden dengan polimorfisme ini diduga memiliki kerentanan terhadap stres oksidatif yang menyebabkan rendahnya kadar glutation, sehingga adanya infeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada individu ini bila terapi obat kurang tepat dan adekuat menimbulkan keparahan penyakit TB.

Adanya polimorfisme -129/T pada gen GCLC pasien TB paru kemungkinan akan memberikan respon yang berbeda terhadap stres oksidatif dan terapi OAT dibanding dengan pasien dengan gen GCLC tanpa polimorfisme. Bila terjadi polimorfisme pada pasien TB paru maka kemungkinan yang terjadi antara lain kerentanan pasien TB paru terhadap stres oksidatif yang bermanifestasi pada keparahan penyakit TB paru seperti fibrosis paru dan kanker paru. tuberkulosis. Polimorfisme gen GCLC mempengaruhi respon pasien TB terhadap OAT, hal ini ditunjukkan dengan respon kesembuhan sputum BTA. Pada pasien dengan polimorfisme menunjukkan bahwa penurunan BTA positif menjadi negatif kurang signifikan dibanding pasien TB paru tanpa polimorfisme

Polimorfisme -129/T menekan peningkatan ekspresi gen GCLC dalam merespon stres oksidatif, dan hal tersebut kemungkinan melemahkan aktivitas enzim untuk mensintesis GSH intraseluler sebagai respon terhadap stres oksidatif. Liu *et al* (2007) melaporkan bahwa Polimorfisme -129/T pada daerah promoter gen GCLC

menginduksi respon yang berbeda terhadap oksidan dan menurunkan produksi glutation. Hal ini menyebabkan rendahnya kapasitas antioksidan pada sel paru dan menyebabkan peningkatan kerentanan terhadap cedera oksidan pada *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD). Peningkatan ekspresi GCLC menyebabkan peningkatan kadar GSH.

Polimorfisme genetik pada gen yang mengkode enzim GCLC menyebabkan gangguan sintesis glutation, sehingga merupakan predisposisi seseorang pada peningkatan cedera selular terhadap pengaturan stres oksidatif, dan berakibat peningkatan keparahan penyakit serta memperburuk keluaran klinis (Le *et al.*, 2010).

Wang *et al* (2012) melaporkan bahwa polimorfisme gen GCLC secara signifikan berhubungan dengan menurunnya ekspresi mRNA gen GCLC yang berhubungan dengan hipersensitivitas terhadap sulfamethoxazole (SMX), yaitu antibiotik yang digunakan untuk pencegahan penyakit infeksi yang berhubungan dengan HIV/AIDS. Polimorfisme gen GCLC kemungkinan berhubungan dengan reaksi idiosinkratik obat yang disebabkan oleh pemberian obat-obatan.

Polimorfisme pada promoter gen GCLC merupakan faktor risiko penyakit skizofrenia (Tosic *et al*, 2006; Gysin *et al*, 2007), stroke (Baum *et al*, 2007), penyalahgunaan narkoba (Hashimoto *et al.*, 2008), metabolisme karbon disulfida (Jonsson *et al.*, 2007), diabetes mellitus (Bekris *et al.*, 2007), dan asma (Polonikov *et al.*, 2007).

Polimorfisme GCLC terkait pula dengan patogenesis penyakit berilium kronis (Bekris *et al.*, 2006). Selain itu, sejumlah studi menunjukkan bahwa polimorfisme pada promoter gen GCLC mempengaruhi risiko penyakit kardiovaskular (Koide *et al*, 2003; Campolo *et al*, 2007; Muehlhause *et al*, 2007).

Penelitian oleh Sieldinski *et al* (2011) terhadap genotip GCL menyimpulkan bahwa terdapat perbedaan dalam penyebaran alel GCL berdasarkan etnis dan populasi yang mempunyai proporsi tinggi alel GCL juga kemungkinan mempunyai peningkatan predisposisi terhadap atau mengenai insidensi beberapa penyakit metabolisme kronik, penyakit degeneratif, inflamasi dan penyakit autoimun. Polimorfisme genetik pada gen yang mengkode subunit katalitik terkait dengan rendahnya kadar GSH *in vitro* dan berhubungan dengan kerentanan dan keparahan terhadap penyakit tertentu (Yang *et al.*, 2004)

Sub unit katalitik (GCLC) merupakan penentu utama dari aktivitas seluler GCL, mengatur pada tingkat transkripsi dan pasca-transkripsi dalam menanggapi stres oksidatif (Griffith, 1999; Griffith dan Mulcahy, 1999; Rahman dan MacNee, 2000; Mulcahy, 2000). Sub unit katalitik (GCLC) sering terinduksi dalam menanggapi adanya stres oksidatif namun dalam memediasi mekanisme transkripsi dan pasca transkripsi terdapat perbedaan tergantung tingkat induksinya (Liu *et al*, 1998). Sementara itu peristiwa transkripsi selalu menyebabkan peningkatan protein yang telah diterjemahkan.

Ketika sel terpapar oleh oksidan, timbul peristiwa stres oksidatif (cekaman oksidatif) dan penurunan GSH, selanjutnya terjadi peningkatan regulasi oleh aktivasi elemen respon stres oksidatif terhadap ekspresi gen GCL pada daerah promoter, sehingga menyebabkan sintesis GSH yang berperan sebagai pelindung/mekanisme penyesuaian terhadap stres oksidatif (Chao *et al.*, 1999; Rahman and MacNee, 1999; Mulcahy *et al.*, 1997; Galloway *et al.*, 1997). Namun, bila terdapat polimorfisme pada gen GCL maka aktivitas GCL mengalami gangguan sehingga respon terhadap stres oksidatif menurun, sintesis terhadap GSH menurun dan akibatnya kadar GSH tubuh mengalami penurunan.

Produksi GSH berhubungan dengan ekspresi gen GCLC, dimana merupakan regulasi utama dalam transkripsi GSH (Hamilton *et al.*, 2007). Polimorfisme genetik dalam pengkodean gen subunit katalitik (GCLC) dari enzim GCL dapat menyebabkan cacat pada sintesis glutation (Le *et al.*, 2012). Polimorfisme 129C/T yang terletak di daerah promoter gen GCLC telah dikaitkan dengan berkurangnya produksi GSH (Liu *et al.*, 2007; Koide *et al.*, 2003).

Perubahan aktivitas enzim GCL bertanggung jawab atas perubahan GSH sel dalam berbagai kondisi. Stres oksidatif yang disebabkan oleh berbagai agen dan resistensi obat terhadap kultur sel tumor merupakan dua kondisi yang berhubungan dengan peningkatan kadar GSH sel, aktivitas GCL, mRNA GCLC dan transkripsi gen GCLC (Liu *et al*, 1997).

Kadar GSH plasma secara signifikan lebih rendah pada subyek dengan alel T dibanding mereka yang tanpa alel T, kemungkinan dapat menurunkan produksi GSH intraseluler dan melemahkan respon terhadap stres oksidatif, *et al.*, 2003; Custodio *et al.*, 2004).

Walsh *et al* (2001) menyatakan bahwa trinukleotide yang berulang pada suatu polimorfisme (GAG) di wilayah 5'-untranslated (5'-UTR) dari mRNA GCLC manusia secara fungsional penting. Adanya pengurangan dalam jumlah pengulangan (GAG) akan mempengaruhi kadar GSH dan menyebabkan seorang penderita menjadi resisten terhadap obat tumor. Sliedinski *et al* (2008) menyatakan bahwa alel TNR pada ulangan 8 GAG dan 9 GAS meningkatkan sensitivitas sel paru terhadap asap rokok akibat penurunan fungsi GCL dan rendahnya kadar GSH pada cairan epitel paru.

Regulasi gen GCLC merupakan salah satu faktor utama yang menentukan kadar GSH. Beberapa studi telah menunjukkan bahwa pengaturan transkripsi dan pascatranskripsi gen GCLC dipengaruhi

oleh agen-agen seperti obat-obatan, diet antioksidan, dll (Lu *et al.*, 2000)

Dengan demikian, polimorfisme pada -129T kemungkinan menekan ekspresi gen GCLC untuk merespon adanya stres oksidatif. Bila ekspresi gen GCLC tertekan/terhambat, maka respon terhadap stres oksidatif melemah. Akibat melemahnya respon terhadap stres oksidatif maka produksi produksi GSH intraseluler mengalami penurunan, sehingga menyebabkan peningkatan kerentanan terhadap induksi oksidan yang menyebabkan kerusakan jaringan.

Berbagai penelitian gen GCL pada penyakit yang terkait beberapa polimorfisme nukleotida tunggal telah teridentifikasi di dalam promoter gen GCL manusia. Hal ini juga dihubungkan dengan peningkatan kerentanan terhadap berbagai penyakit akibat stress oksidatif.

Faktor-faktor risiko penyakit tuberkulosis seperti kondisi rumah, berdasarkan hasil uji statistik *Spearman Correlation* menunjukkan bahwa keadaan rumah tidak berhubungan dengan polimorfisme gen GCL. Hal ini berarti bahwa kejadian polimorfisme gen GCL tidak disebabkan oleh kondisi rumah yang tidak sehat mapun sehat. Polimorfisme terjadi karena adanya perubahan frekuensi gen. Perubahan frekuensi gen faktor utamanya adalah mutasi. Mutasi ini menghasilkan gen baru yang selanjutnya akan dipengaruhi oleh faktor-faktor lain seperti seleksi alam, migrasi dan *drift genetic*, akan tetap ada atau hilang pada populasi berikutnya.

BAB VIII

PENUTUP

Proses identifikasi gen *glutamate cystein ligase* (gcl) pada pasien tuberkulosis paru adalah melalui isolasi dan purifikasi DNA gen gcl dan analisis menggunakan metode PCR-RFLP dan analisis elektroforesis serta sekuensing hasil PCR-RFLP. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ditemukan variasi pada promoter gen GCLC di posisi -129T pada penderita tuberkulosis paru. Pada penelitian ini, promoter gen GCLC menunjukkan target *band* terdeteksi positif pada sampel pasien tuberkulosis paru yaitu pada 613 bp. Frekuensi polimorfisme genotip C/T gen GCLC adalah sebesar 35,97%. Kadar glutation sampel pasien TB paru tanpa polimorfisme (genotip C/C) mengalami peningkatan sebesar 11%, sedangkan kadar glutation sampel pasien TB paru dengan polimorfisme (genotip C/T) mengalami penurunan sebesar 32%. Terdapat hubungan antara polimorfisme gen GCL dengan kadar Glutation

Berdasarkan hasil penelitian ini dan beberapa kajian penelitian sebelumnya, maka dapat dijelaskan bahwa polimorfisme gen GCL merupakan faktor risiko terhadap kerentanan stres oksidatif dan keparahan TB paru. Bila terjadi polimorfisme gen GCL maka terjadi penurunan kadar glutation. Manakala kadar glutation ini rendah maka terjadi peningkatan stres oksidatif. Rendahnya kadar glutation menyebabkan respon terhadap OAT lebih lambat, ditunjukkan dengan masih adanya konversi sputum BTA akhir positif (+) pada pasien TB paru dengan polimorfisme gen GCL.

Oleh karena itu, dalam penatalaksanaan pasien TB paru yang memiliki polimorfisme gen GCL perlu penanganan lebih intensif, melalui pemberian obat antituberkulosis yang adekuat, disertai dengan

pemberian antioksidan eksogen yang sesuai, dan pemberian suplemen yang mengandung glutation seperti flavonoid khususnya jenis quercetin dari ekstrak bawang bombay (*onion*), kaemferol dan apigenin meningkatkan konsentrasi glutation (GSH) melalui aktivasi ekspresi GCLC promoter. Flavonoid dan polypenol juga dapat meningkatkan produksi Glutathion melalui pengaruhnya terhadap ekspresi substrat yang diperlukan untuk sintesa glutation seperti CT cystine antiporter, *gamma-glutamylcysteine synthetase (glutamate cysteine liagse)* and *glutathione synthase*. Ekstrak bawang onion dan quercetin, dapat meningkatkan konsentrasi intraseluler glutation sampai kira-kira 50 %nya. Hal ini diharapkan dapat mengurangi kerentanan pasien TB paru terhadap stres oksidatif, mecegah keparahan TB paru dan mencegah berulangnya kembali pasien terinfeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan diharapkan kesembuhan pasien Tb paru secara permanen

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A, and Pober, J.S. 2011. Cellular and Molecular Immunology. Second ed. WB Saunders Co : Philadelphia. p: 327.
- Ahi, R.S., Deepak, A., Singh, R. 2010. Oxidative Stress and Ascorbic Acid Levels in Cavitary Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Clinical And Diagnostic Research* 4:3437-3441.
- 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. 2011-12-24
- Akerboom, T.P., Bilizer, M.M., Sies, H. 1982. The relationship of biliary GSSG efflux and intracellular GSSG content in perfused rat liver. *J Biol Chem* 257:4248-4252.
- Antczak, A., Montuschi, P., Kharitonov, S.A., Gorski, P., Barnes, P.J. 2002. Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostanone in aspirin-induced asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166:301-306.
- Baraldi, E., Ghigo, L., Piovan, V. 2003a. Increased exhaled 8-isoprostanone in childhood asthma. *Chest* 124:25-31.
- Baraldi, E., Carraro, S., Alinovi, R., Pesci, A., Ghigo, L., Bodini, A., Piacentini, G., Zucchetto, F., Zanconato, S. 2003b. Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostanone in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Thorax* 58:505-509.
- Barmawi. 2004. *Tuberkulosis : Ancaman Kegawatan Dunia Aspek Imunologi dan Terapi*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Basaraba, R.J. 2008. Experimental tuberculosis: the role of comparative pathology in the discovery of improved tuberculosis treatment strategies. *Tuberculosis (Edinb)* 88 Suppl 1: S35-47
- Bekris, L.M., Viernes, H.M., Farin, F.M., Maier, L.A., Kavanagh, T.J., Takaro, T.K. 2006. Chronic beryllium disease and glutathione biosynthesis genes. *J. Occup. Environ. Med;*48(6):599-606

- Bekris, L.M., Shephard, C., Janer, M., Graham, J., McNeney, B., Shin, J., Zarghami, M., Griffith, W., Farin, F., Kavanagh, T.J., Lernmark, A. 2007. Glutamate cysteine ligase catalytic subunit promoter polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset and GAD65 autoantibody levels. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 115(4):221–228.
- Benndrof, R.A., Schwehelm, Z., Gnann, A., Taheri, R., Komli *et al.* 2008. Isoprostanate Inhibit Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Endothelial Cell Migration, Tube Formation, and Cardiac Vessel Sprouting in vitro, as well as Angiogenesis in vivo via Activation of The Tjromoboxane A(2) Receptor; A potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis. *Circ. Resp.* 103(9):1037-1046.
- Biernacki, W.A., Kharitonov, S.A., Barnes, P.J. 2003. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostanate in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 58, 294–298
- Biolo, G., Antonione, R., De Cicco M. 2007. Glutathione metabolism in sepsis. *Crit Care Med.* 35(9 Suppl):S591–S595
- Biswas, S., Rahman, I. 2008. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol. Aspects Med.*
- Breton, C.V., Muhammad, T.S., Hita, V., James, G.W and Frank, O.G. 2010. Genetic Variation in The Glutathione Synthesis Pathway, air Pollution, and Children's Lung Function Growth. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 183:243-248.
- Bulatovic, V.M., Wengenack, N.L., Uhl, R.J., Hall, L., Roberts, G.D., Cockerill, F.R., Rusnak, F. 2002. Oxidative Stress Increases Susceptibility of Mycobacterium Tuberculosis to Isoniazid. *Antimicrobial Agents Chemoterapy*. 46:2765-2771.
- Campolo, J., Penco, S., Bianchi, E., Colombo, L., Parolini, M., Caruso, R., Sedda, V., Patrosso, M.C., Cighetti, G., Marocchi, A., Parodi, O. 2007. Glutamate-cysteine ligase polymorphism, hypertension, and male sex are associated with cardiovascular events. Biochemical and genetic characterization of Italian subpopulation. *Am. Heart J.* 154(6):1123–1129.

- Carpagnano, G.E., Kharitonov, S.A., Resta, O., Foschino-Barbaro, M.P., Gramiccioni, E., Barnes, P.J. 2002. Increased 8-Isoprostanate and Interleukin-6 in Breath Condensate of Obstructive Sleep Apnea Patients. *Chest* 122, 1162–1167.
- Carpenter, C.T., Price, P.V., Christman, B.W. 1998. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 114, 1653–1659.
- Chen, Y., Shertzer, H.G., Schneider, S.N., Nebert, D.W., Dalton, T.P. 2005. Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *J. Biol. Chem* 280(40):33766–33774.
- Chew, B.P and Park, J.S. 2004. Caretenoid Action on The Immune Response. *J. Nutr* 134;257S-261S
- Chowdhury, A., Santra, A., Kundu, S., Mukherjee, A., Pandit, A., Chauduri, S., and Dhali, G.K. 2001. Induction of Oxidative Stress in Antitubercular drug-induced hepatotoxicity. *Indian J. Gastroenterol.* 20(3): 97-100.
- Connell, N.D and Venketaraman. V. 2009. Control of *Mycobacterium tuberculosis* infection by Glutathione Recent Patients on Anti-Infective. *Drug Discovery* 4:214-226
- Cracowski, J.L., Cracoski, C., Bessard, G., Pepin, J.L., Bessard, J., Scwебel, C., Stanke-Labesque, F., Pison, C. 2001. Increased Lipid Peroxidation in Patients with Pulmonary Hypertension. Am. J. respire. *Crit Care Med.* 164:1038-1042.
- Custodio, H.M., Broberg, K., Wennberg, M., Jansson, J.H., Vessby, B., Hallmans, G., Stegmayr, B., and Skerfving, S. 2004. Polymorphisms ini glutathione-related genes affect methylmercury retention. *Arch. Environment. Health* 59: 588-595.
- Dahlan, M.S. 2011. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan : Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat dilengkapi aplikasi dengan menggunakan SPSS.* Salemba Medika : Jakarta.
- Dasgupta, A., Das, S., Sarkar, P.K. 2007. Thyroid hormone promotes glutathione synthesis in astrocytes by up regulation of glutamate

- cysteine ligase through differential stimulation of its catalytic and modulator subunit mRNAs. *Free Radic. Biol. Med* 42(5):617–626.
- Dayaram, Y.K., Talaue, M.T., Connell, N.D., Venketaraman, V. 2006. Characterization of a glutathione metabolic mutant of *Mycobacterium tuberculosis* and its resistance to glutathione and Nitrosoglutathione. *J Bacteriology* 188: 1364–72
- Davis, A.S., Vergne, I., Master, S.S., Kyei, M.B., Chua, J., Deretic, V. 2007. Mechanism of Inducible Nitric Oxide Synthase Exclusion from Mycobacterial Phagosomes. *PLoS Pathog* 3(12): e186. doi:10.1371/journal.ppat.0030186
- Deneke, S.M., Fanburg, B.L. 1989. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 257(4 Pt 1): L163-173.
- DeLeve, L., Kaplowitz, N. 1990. Importance and regulation of hepatic GSH. *Sem Liver Dis* 10:251–266.
- De Rosa, S.C., Zaretsky, M.D., Dubs, J.G., et al. 2000. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest*; 30: 915–929.
- Departemen Kesehatan. 2008. *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Jakarta.
- Dröge, W. 2002. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 82: 47-95.
- Dworski, R., Murray, J.J., Roberts, L.J., Oates, J.A., Morrow, J.D., Fischer, L., Sheller, J.R. 1999. Allergen induced synthesis of F2isoprostanes in atopic asthma. *Am. J. Respir Crot. Care med.* 160:1947-1951.
- Ehrt, S., and Schnappinger, D. 2009. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell. Microbiol.* 11, 1170–1178.
- Erlina, B. 2010. Tuberkulosis Multi Drug Resistance (TB-MDR). *Majalah Kedokteran Indonesia* 60(12): 535-536.
- Fatchiya, Arumintyas EL., Widjarti S., Rahayu., S. 2011. Biologi Molekuler; Prinsip Dasar Analisis. PT Penerbit Erlangga. Jakarta.

- Franklin, C.C., Rosenfled-Franklin, M.E., White, C., Kavanagh, T.J., Fausto, N. 2003. TGF β 1-induced suppression of glutathione antioxidant defenses in hepatocytes: caspase-dependent posttranslational and caspase-independent transcriptional regulatory mechanisms. *FASEB J.* 2003;17(10):1096-1097.
- Franklin, C.C., Backos, D.S., 2008. Functional roles and regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol. Aspects Med.*
- Franklin, C.C., Backos, D.S., Mohar, I., White, C.C., Forman, H.J., Kavanagh, T.J. 2009. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med.* 30:86-98.
- Garcia-Ruiz, C., Fernández-Checa, J.C. 2006. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J Gastroenterol Hepatol* 21:S3-6.
- Garcia-Ruiz, C., Fernández-Checa, J.C. 2007. Redox regulation of hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol* 22:S38-42.
- Garg, S., Vitvitsky, V., Gendelman, H.E., Banerjee, R. 2006 Monocyte differentiation, activation, and mycobacterial killing are linked to transsulfuration-dependent redox metabolism. *J Biol Chem.* 281(50): 38712-38720
- Galloway, D.C., Blake, D.G., Shepherd, A.G., McLellan, L.I. 1997. Regulation of human γ -glutamylcysteine synthetase: co-ordinate induction of the catalytic and regulatory subunits in HepG2 cells. *Biochem J* 328:99-104.
- Ghezzi, P., Simplicio, P. 2007. Glutathionylation pathways in drug response. *Curr Opin Pharmacol.* 7(4):398-403.
- Ghezzi, P. 2005a. Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 6):1378-1381.
- Ghezzi, P. 2005b. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res.* 39(6):573-580.
- Ghezzi, P. 2011. Role of Glutathione in Immunity and Inflammation in The Lung. *International Journal of General Medicine* 4:105-113.

- Griffith, O.W. 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic ATTN: Biol Med* 9-10: 922-935.
- Griffith, O.W., Mulcahy, R.T. 1999. The enzymes of glutathione synthesis: γ -glutamylcysteine synthetase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol* 73:209-267.
- Guerra, C., Devin, M., Andrea, s., Steven, K., Meshare, F., Dennis, G., Michelle, T., Frederick, G., Fadi, T.K and Venketaraman, V. 2011. Glutathione and Adaptive Immune Response Against Mycobacterium tuberculosis Infection in Healthy and HIV Infected Individual. *PLoSOne* 6(12):e28378.
- Gupta, K.B., Rajesh, G., Atulya, A., Manish, V., Suman, V. 2012. Tuberculosis and Nutrition. *Lung India* 20(1): 9-16.
- Gysin, R., Kraftsik, R., Sandell, J., Bovet, P., Chappuis, C., Conus, P., Deppen, P., Preisig, M., Ruiz, V., Steullet, P., Tosic, M., Werge, T., Cuenod, M., Do, K.Q. 2007. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 : 16621-16626.
- Hadzic, T., Li, L., Cheng, N., Walsh, S.A., Spitz, D.R., Knudson, C.M. 2005. The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion. *J Immunol.* 175(12):7965-7972.
- Hamilton, D., Wu, J.H., Batist, G. 2007. Structure based identification of novel human γ -glutamylcysteine synthetase inhibitors. *Mol. Pharmacol* 71(4):1140-1147.
- Handayani, S..2002. Respon Imunitas Seluler Pada Infeksi Tuberkulosis Paru. *Cermin Dunia Kedokteran* 137:34-37.
- Hanigan, M.H. 1998. Γ -glutamyl transpeptidase, a glutathionase : Its Expression and Function in Carcinogenesis. *Chemico Biological Interaction* 111-112:333-342.
- Hasehemi, M., Hoseini, H., Yaghmaei, P., Moazeni-Roodi, A., Bahari, A., Hashemzehi, N., Shafieipour, S. 2011. Association of polymorphisms in glutamatecysteine ligase catalytic subunit and

microsomal triglyceride transfer protein genes with nonalcoholic fatty liver disease. *DNA Cell Biol* 30:569–575

Hashmi, M.A., Bilal, A., Syed, I.A.S and Muhammad, I.U.K. 2012. Antioxidant Capacity and Lipid Peroxidation Product in Pulmonary Tuberculosis. *Al Ameen J Med Sci* 5 (3):313-319

Hashimoto, K., Takasaki, W., Yamoto, T., Manabe, S., Sato, I., Tsuda, S. 2008. Effect of glutathione (GSH) depletion on DNA damage and blood chemistry in aged and young rats. *J Toxicol Sci* 33:421–9.

Heisterkamp, N., Groffen, J., Warburton, D and Snedon, T.P. 2008. The Human gamma-glutamyltransferase gene family. *Human Genetic* 123(4):321-332

Hu, R.C., Tan, S.X., Dai, A.G. 2006. The relationship between the polymorphism of glutamate cysteine ligase modulatory subunit gene and the susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 29(2):100-3

Imran. 2010. Peran Polimorfisme -455G/A dan -148C/T Gen Fibrinogen β terhadap kejadian Hiperfibrinogenemia dan Stroke Iskemia Usia Dini. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Padjajaran. Bandung.

Jack, C.I, Jackson, M.J., Hin, C.R. 1994. Circulating markers of Free Radical Activity in Patients With Pulmonary Tuberculosis. *Tuber Lung Dis.* 75:132-137.

Jackson, A.A., Gibson, N.R., Lu, Y., Jahoor, F. 2004. Synthesis of erythrocyte glutathione in healthy adults consuming the safe amount of dietary protein. *Am J Clin Nutr.* 80(1):101–107

Janicka. M., Agata Kot-Wasik, Jacek Kot and Jacek Namieśnik. 2010. Isoprostanes-Biomarkers of Lipid Peroxidation: Their Utility in Evaluating Oxidative Stress and Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 4631-4659

Jardine, H., MacNee, W., Donaldson, K., Rahman, I. 2002. Molecular Mechanism of Transforming Growth Factor (TGF)- β -1-induced Glutathione Depletion in Alveolar Epithelial Cells. *Chemistry* 277(24):21158-21166.

- Johnkennedy, N., Anyadoh, S.O., Nwosu, N., Emmanuel, C. 2011. The antioxidant status and lipid peroxidation product of newly diagnosed and 6 weeks follow-up patients with pulmonary tuberculosis in Owerri, Imo state, Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*:292-294.
- Jumraini. 2011. Hubungan antara Polimorfisme Gen Bcl1 dan Promoter -148C/T β Fibtinogen dengan Kadar Fibrinogrn Plasma Penderita Stroke Iskemik Akut. Disertasi. Program Pascasarjana. Universitas Hasnuddin. Makassar.
- Kanaya, A.M., Christina, L.W., Pamela, S., Tamara, H., Steven, R., et al. 2011. F₂isoprostanes and Adiposity in Older Adults. *Obesity (Sliver spring)* 19(4):861-867.
- Kaplowitz, N., Aw, T.Y., Ookhtens, M. 1985. The regulation of hepatic GSH. *Ann Rev Pharm Toxicol* 25:714-744.
- Kaufmann, S.H.E. 2004. New Issues in Tuberculosis. *Annals of The Rheumatic Diseases* 63:50-56.
- Kaur, K., Jai, K., Gurdeep, K.B, and Rajinderjit, S.A. 2005. Oxidants Stress And Antioxidant in Pulmonary Tuberculosis. diakses tanggal 30 Juli 2011.
- Kaviarasan, S., Sekaran, M., Rajes, Q., and Ikram, S.I. 2009. F2-Isoprostanes as Novel Biomarkers for Type 2 Diabetes: a Review. *J. Clin. Biochem. Nutr* 45: 1-8
- Kemenkes. 2011. Profil Kesehatan Indonesia 2011. Kementrian Kesehatan. Jakarta.
- Kinnula, V.L., Ilmutes, H., Myllarnieni, M., Sovijarvi, A and Rytila, P. 2007. 8-isoprostane as a marker of oxidative stress in nonsymtomatic cigarette smokers and CPOD. *Eur Respir J.* 29:51-55.
- Klebanoff, S.J. 2005. Myeloperoxidase : friend or foe. *Journal Leukocyte Biology* 77;598-625.
- Koide, S., 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. *J. Am. Coll. Cardiol* 41(4):539–545.

Kumar, A., Aisha, F., Ioni, G., Vikram, S., Mary, H and Adrie, J.C.S. 2011. Redox Homeostasis in Mycobacteria : The Key to Tuberculosis Control ? *Expert Review in Molecular Medicine* 13:39-49.

Krzywanski, D.M., Dickinson, D.A., Iles, K.E., Wigley, A.F., Franklin, C.C., Liu, R.M., Kavanagh, T.J., Forman, H.J. 2004. Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys* 423(1):116–125.

Kwiatkowska, S., Piasecka, G., Zieba, M., Piotmoski, W., Nowak, D. 1999. Increased Serum Concentration of Conjugated malondialdehyda in patients with pulmonary tuberculosis. *Respir Med.* 93:272-276.

Lamsal, M., Narayan, G., Narendra, B., Bishamber, D.T., Shymal, K.B. and Nirmal, B. 2007. Evaluation of Lipid Peroxidation Product, Nitrite And Antioxidant Levels In Newly Diagnosed And Two Months Follow-Up Patients With Pulmonary Tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38(4):695-703

Lee, J.I., Kang, J., Stipanuk, M.H. 2006. Differential regulation of glutamate-cysteine ligase subunit expression and increased holoenzyme formation in response to cysteine deprivation. *Biochem. J*;393(Pt 1): 181–190.

Lin Su W, Wann-Cherng Perng, Ching-Hui Huang,Cheng-Yu Yang, Chin-Pyng Wu, and Jenn-Han Chen. 2010. Association of Reduced Tumor Necrosis Factor Alpha, Gamma Interferon, and Interleukin-1. (IL-1.) but Increased IL-10 Expression with Improved Chest Radiography in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 17(2) :223-231

Liu S, B Li, Y. Zhou, N Zhong and P Ran 2007. Genetic Analysis of CC16, OGG1 and GCLC Polymorphisms and Susceptibility to COPD. *Respirology* 12:29-33.

Lorraine BW, Joshua PF, Addison KM and L Jackson R II. 2011. Plasma Biomarkers of Oxidant Stress and Development of Organ Failure in Severe Sepsis. *Shock* 36(1): 12–17

- Lucidi, V. Ciabattoni, G. Bella, S. Barnes, P.J. Montuschi, P. 2008. Exhaled 8-isoprostan e and prostaglandin E2 in patients with stable and unstable cystic fibrosis. *Free Radical Bio. Med.* 45, 913–919.
- Lushchak, V.I. 2012. Glutathione Homeostasis and Functional : Potential Targets for Medical Intervention. *Journal of Amino Acids*. DOI:10.1155/2012/736837.
- Lu SC. 2008. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.*
- 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 Polymorphism in Pulmonary Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Cerc. Med.* 167:970-975
- Maertzdorf J, Repsilber D, Parida SK, Stanley K, Roberst T, Black G, Walzl G, Kaufmann SHE. 2011. Human gene expression profiles of susceptibility and resistance in tuberculosis. *Genes and Immunity*. 12, 15–22
- Malmezat T, Breuille D, Capitan P, Mirand PP, Obled C. 2000. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J Nutr.* 130(5):1239–1246.
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. 1983. *Annu Rev Biochem* 52: 711–760.
- McKone EF, Shao J, Frangolias DD, Keener CL, Shephard CA, Farin FM, Tonelli MR, Pare PD, Sandford AJ, Aitken ML, Kavanagh TJ. 2006. Variants in the glutamate-cysteine-ligase gene are associated with cystic fibrosis lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 174(4):415–419.
- Meister A. 1992. Biosynthesis and function of glutathione, an essential biofactor. *J. Nutrit. Sci. Vitaminol. Spec No:* 1–6
- McNamee LA, Harmsen AG. 2006. Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute

to increased susceptibility to a secondary Streptococcus pneumonia infection. *Infect Immun* 74(12):6707-6721

Milne GL; Hirsch, D; Carlucio, F; Hampl, H; siems, W. 2005. F2 isoprostane as Markers Of Oxidative Stress In vivo:an over view: *Departement of medicine, Vanderbilt University School of Medicine USA*, (online). Vol 1. No 10. ([www.google.com/diakses_30 September 2011](http://www.google.com/diakses_30_September_2011))

Milne GL, Stephanie CS, Erik SM and Jason DM. 2007. Quantification of F2 -isoprostanes as a biomarker of oxidative stress. *Clinical Pharmacology* 1-12.

Milne GL, Huiyong Y, Klarissa DH, Sean SD, and L. Jackson R. 2011. Isoprostane Generation and Function. *Chem Rev*111(10): 5973-5996

Montuschi, P., Ciabattoni, G., Paredi, P., Pantelidis, P., Du Brois, D.M., Kharitonov, S.A., Bornes, P.J. 1998. 8-isoprostanes as a biomarker of Oxidative Stress in interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit Care. Med.* 158:1524-1527.

Montuschi, P., Kharitonov, S.A., Ciabattoni, G., Corradi, M., Van rensen, L., Geddes, D.M., Hodson, M.E., Bornes, P.J. 2000. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of Oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 55:205-209.

Montuschi P, Peter B and L. Jackson R. 2007. Insights into Oxidative Stress: The Isoprostanes. *Current Medicinal Chemistry* 14: 703-717

Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ 2nd. 2004. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 18:1791-800

Mohod, K., Archana, D, and Smith, K. 2011. Status of Oxidants and Antioxidants in Pulmonary Tuberculosis With Varying Bacillary Load. *Journal of Experimental Science.* 2(6):35-37.

Moinova HR, Mulcahy RT. 1999. Up-regulation of the human γ -glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element. *Biochem Biophys Res Commun* 261:661-668.

Morris, D., Carlos, G., Clare, D., Hyoung, O. 2012. Unveiling The Mechanism for Decreased Glutathione in Individuals with HIV Infection. *Clinical and Developmental Immunology*. Page:1-10. DOI:10.1155/2012/734125 2010

Morrow, J.D., Frei, B., Longmire, A.W., Gaziano, M., Lynch, S.M., Shyr, Y., Strauss, W.E., Oates, J.A., Roberst, L.J. 1995. Increase in Circulating Products of Lipid Peroxidation (F2-isoprostane) in Smokers. *N. Eng. J. Med.* 332:1198-1203.

Morrow JD, Roberts LJ II. 1999. Mass spectrometric quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods Enzymol* 300:3-12.

Morrow, J.D and Roberts, LJ II. 2002. The Isoprostane Their Roles as an Index of Oxidant Stress Status in Human Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166.

Morrow JD. 2005. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:279-86

Muh Nasrum Massi, Sitti Rafiah, Rusdina Bte Ladju, Gaby Maulida Nurdin, Andi Zulkifli, and Yuniaستuti, A. 2016. The role of gene polymorphisms of glutamate-cysteine ligase catalytic (GCLC) enzyme against antioxidants and oxidative stress status of Individual who had contacted infectious tuberculosis . Malaysian Journal of Microbiologi 12(4): 322-326.

Munir SM, Arifin N dan Dianiati KS 2010. Pengamatan Pasien Tuberkulosis Paru dengan Multidrug Resistant (TB-MDR) di Poliklinik Paru RSUP Persahabatan. *J. Respir. Indo* 30(2):92-103.

Nakamura S, Kugiyama K, Sugiyama S, Miyamoto S, Koide S, Fukushima H, Honda O, Yoshimura M, Ogawa H. 2002. Polymorphism in the 5'-flanking region of human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with myocardial infarction. *Circulation* 105(25):2968-2973.

Nakamura S, Sugiyama S, Fujioka D, Kawabata K, Ogawa H, Kugiyama K. 2003. Polymorphism in glutamatecysteine ligase modifier subunit gene is associated with impairment of nitric oxide-mediated coronary vasomotor function. *Circulation*;108(12):1425-1427.

- Nichenametla SN, Lazarus P, Richie JP Jr. 2011. A GAG trinucleotide-repeat polymorphism in the gene for glutathione biosynthetic enzyme, GCLC, affects gene expression through translation. *FASEB J* 25:2180–2187.
- Nichenametla SN, Ellison I, Calcagnotto A, Lazarus P, Muscat JE, Richie JP. 2008. Functional significance of the GAG trinucleotide-repeat polymorphism in the gene for the catalytic subunit of gammaglutamylcysteine ligase. *Free Radic. Biol. Med* 2008;45(5):645–650.
- Njalson, R and Norgen, S. 2005. Physiological and Pathological Aspects of Glutathione Metabolism. *Acta Paediatr.* 94(2):132-137.
- Notoatmodjo, S. 2008. Ilmu Kesehatan Masyarakat. PT. Rinneka Cipta. Jakarta.
- Nwanjo HU and GO Oze. 2007. Oxidative Imbalance and Non-Enzymic Antioxidant Status in Pulmonary Tuberculosis Infected Subjects: Carcinogenic Potential. *Pakistan Journal of Nutrition* 6 (6): 590-592
- Oja SS, Janaky R, Varga V, Saranasaari P. 2000. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochem Int* 37:299–306.
- Oliveira CP, Stefano JT, Cavaleiro AM, Zanella Fortes MA, Vieira SM, Rodrigues Lima VM, Santos TE, Santos VN, de Azevedo Salgado AL, Parise ER, Ferreira Alves VA, Carrilho FJ, Correa-Giannella ML: 2010. Association of polymorphisms of glutamate-cystein ligase and microsomal triglyceride transfer protein genes in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 25:357–361.
- Pakassi TA, Karyadi E, Dolmans WMV, Van der Meer JWM, Van der Velden K. 2009. Malnutrition and socio-demographic factors associated with pulmonary tuberculosis in Timor and Rote Islands, Indonesia. *Int J Tuberc Lung Dis* 13(6):755–759
- Parameswaran GI, Murphy TF. 2007. Infections in chronic lung diseases. *Infect Dis Clin North Am.* 21(3):673–695.

Parchwani D, Singh SP, Digisha P. 2011. Total Antioxidant Status and Lipid Peroxides in patient With Pulmonary Tuberculosis. *National Journal of Community Medicine* 2(2):225-228.

Patragnani, P; tacconelli, S.2005. *Isoprostanes and other Marker of Peroxidation in Atherosclerosis*. Departemen of Medicine and center of Excellen on aging, G. d' annunzio University, chieti. Italy, (online). Vol 2867 no.112. (www.google.com/diakses 30 September 2012)

Pauwels, E.K., Erba, P.A, and Kostkiewicz, M. 2007. Antioxidants : A tale of two stories. *Drug News Perspect.* 20(9):579-585.

Pawar, B.D., Adinath, N., Archana, S.K. 2011, Effect of Micronutrients supplementation on Oxidative Stress and Antioxidant in Pulmonary Tuberculosis. *Bimedical Research* 22(4):455-459.

Psathakis, K.; Papatheodorou, G.; Plataki, M. 2004. 8-Isoprostanate, a marker of oxidative stress, is increased in the expired breath condensate of patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest* 125, 1005-1011.

Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. 1998. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Nat Acad Sci USA*; 95(6):3071-3076

Pieratelli R, Banci L, Eady NAJ, Bodigull J, Jones JN and Moods MCE. 2004. Enzyme-catalyzed mechanissm of isoniazid activation in class I and class II peroxidases. *Journal Biology Chemistry* 279:39000-39009

Plit, M.L., Theron, A.J., Fickl, H., Van Rensburg, C.E, pendel, S., Anderson, R. 1998. Influence Of Antimicrobial Chemoterapy And Smoking Status On The Plasma Concentration Of Vitamin C, Vitamin E, Beta-Carotene, Acute Phase Reactans, Iron And Lipid Petroxides In Patients With Pulmonary Tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2:590-596.

Polonikov, A.V., Ivanov, V.P., Solodilova, M.A., Khoroshaya, I.V. Kozhkhov., M.A. And Panilov, V.I. 2007. The Relationship between Polymorphisms in The Glutamate Cysteine Ligase Gene and Asthma Suscpetibility. *Respiratory Medicine* 101;2422-2424.

- Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 66:1499–1503.
- Poot M, Teubert H, Rabinovitch PS, Kavanagh TJ. 1995. De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J Cell Physiol*. 163:555–560. [PubMed: 7539813]
- Pratico D., Basili, S., Vieri, M., Cordova, C., Visli, F., Fitz Gerald, G.A. 1998. Chronic Obstructive Pulmonary Disease is association With an Increase in Urinary Levels of Isoprostane F2 Alpha-III, an Index of Oxidative Stress. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158:1708-1717.
- Rahman, I. 2005. Regulation of Glutathione in Inflammation and Chronic Lung Disease. *Mutation Research and Molecular Mechanism of Mutagenesis* 579:1-2:58-80.
- Rahman I, MacNee W. 1999. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Pathol*. 277:L1067–L1088.
- Rahman I, MacNee W. 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir.J*;16(3):534–554.
- Ramesh, Sudha K, Amareeshwara M, Sameer and Rakesh M. 2011. Study Of Protein Oxidation and Antioxidant Status in Pulmonary Tuberculosis Patients. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2(3) :104-109
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R, and MC Prabhakar. 2004. Role of Free Radicals And Antioxidants in Tuberculosis Patients. *Indian J. Tuberc.* 51:213-218.
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R, and MC Prabhakar. 2009. Oxidative metabolic changes in pleural fluid of tuberculosis patients. *Bangladesh J Pharmacol* 4: 69-72.
- Reis DS, Souza MA, Mineo JR, Espindola FS. 2001. Myosin and iNOS expression in enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN- γ . *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34(2):221-226

- Roberts LJ, Morrow JD. 2000. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med.* 28:505-13.
- Saraswathy S.D and Devi, C.S.S. 2012. Antitubercular drugs induced hepatic oxidative stress and ultrastructural changes in rats. *BMC Infectious Disease*;12(suppl1)
- Schluger, N.W. and Rom, W.N. 1998. The Host Immune Response to Tuberculosis. *Am.J.Respir.Crit.Care.Med* 157:679-691.
- Sekhar, R.V., Sanjeet, G.P., Anuradha, P., Marvin, R., Ashok, B., George E.T and Farook, J. 2011. Deficient Synthesis of Glutathione Underlies Oxidative Stress in Aging and can be Corrected by Dietary Cysteine and Glycine Supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* 94:847-853.
- Seres T, Knickelbein RG, Warshaw JB and Jonhnson RB Jr. 2000. The Phagocytosis-Associated Respiratory Burst in Human Monocyte Is Asspciated with Increased Uptake of Glutathione. *J Immunol.* 165:3333-3340
- Sierra-Rivera E, Summar ML, Dasouki M, Krishnamani MRS, Phillips JA, Freeman ML. 1995. Assignment of the gene (GLCLC) that encodes the heavy subunit of γ -glutamylcysteine synthetase to human chromosome 6. *Cytogenet. Cell Genet.* 70(3-4):278-279.
- Siedlinski M, DS Postma, CC van Dieman, Annock B, Henriette AS and HM Brezen. 2008. Lung Function Loss, Smoking, Vitamin C intake and polymorphisms of the Glutamate-cysteine Ligase. *Am. J. Respir. Crit Care Med* 178:13-19
- Singh, R., Manjunatha, U., Helena, I., Bushoff, M, and Hwan-ha, Y. 2008. PA-824 Kills non-replicating M. Tuberculosis intracellular NO releas. *Science* 322 (5906) :1392-5
- Singh, RA., Deepak A., Singh, R. 2010. Oxidative Stress and Ascorbic Acid Levels ini Cavitary Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 4: 3437-3441.
- Sharma S, Rathored J, Ghosh B and Sharna SK. 2010. Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians *BMC Infectious Diseases*;10:165

- Singh RA, Deepak A, Singh R. 2010. Oxidative Stress And Ascorbic Acid Levels In Cavitary Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 4:3437-3441
- Soemantri, S., Senewe, F.P., Tjandrarini, D.H, Day, R., BAsri, C., Manissero, D et al. 2007. Threefold Reduction In The Prevalence of Tuberculosis Over 25 Years in Indonesia and Risk Factor. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 11(4):398-404
- Soewasti, S.S., Lubis, A dan Atmosukarto, K. 2000. Hubungan Kondisi Perumahan dengan Penularan Penyakit ISPA dan TB Paru. *Media Litbang Kesehatan*, Volume X (2): 27-30
- Spallholz, J. E. 1987. Glutathione: is it an evolutionary vestige of the penicillins? *Med. Hypoth.* 23:253-257
- Staal FJ. 1998. Glutathione and HIV infection: reduced reduced, or increased oxidized? *Eur J Clin Invest* 28: 194–6.
- Stein, C. M. 2011. Genetic epidemiology of tuberculosis susceptibility: impact of study design. *PLoS Pathog.* 7, e1001189.
- Sugiyanta. 2008. Peran glutation sebagai master antioksidan. *Biomedis*;1(1):48-53.
- Suresh, D.R., Vamseedhar, A., Krishneppa, P. and Hamsaveena. 2010. Immunological Correlation of Oxidative Stress Markers in Tuberculosis Patiens. *Int. J. Biol. Med. Res.*:1(4):185-187.
- Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK, Meister A. 1990. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3343–3347.
- Sutrisna, B. 2002.mPermasalah TB paru di Indonesia : Aspek Epidemiologi.
- Taha, D.A, and Imad, A.J.T. 2010. Antioxidant status, C-Reactive Protein and Status in Patient with Pulmonary tuberculosis. *SQU MED.J.* 10 (3):361-369.

- Thimmulappa RK, Lee H, Rangasamy T, Reddy SP, Yamamoto M, Kensler TW, Biswal S. 2006. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest* 116:984–995.
- Tipnis SR, Blake DG, Shepherd AG, McLellan LI. 2009. Overexpression of the regulatory subunit of γ -glutamylcysteine synthetase in HeLa cells increases γ -glutamylcysteine synthetase activity and confers drug resistance. *Biochem. J.* 337:559–566.
- Teixeira HC, Abramo C, Munk ME 2007. Immunological Diagnosis of Tuberculosis : Problems and Strategies for Success. *J. Bras Pneumol* 33(3):323-334
- Tosic M, Werge T, Cuenod M, Do KQ. 2007. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 104:16621–16626.
- Tostman A, Boeree MJ, Aarnouts RE, de Lange WC, Van der Ven AJAM and Dekhuijen R. 2007. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review Journal of Gastroenterology and Hepatology; 23:192–202
- Townsend, D. M., Tew, K. D., and Tapiero, H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 57, 145–155
- Tsuchiya K, Mulcahy RT, Reid LL, Disteche CM, Kavanagh TJ. 1995. Mapping of the glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene (GLCLC) to human chromosome 6p12 and mouse chromosome 9DE and of the regulatory subunit gene (GLCLR) to human chromosome 1p21-p22 and mouse chromosome 3H1-3. *Genomics* 30(3):630–632.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. 1999. Melatonin induces γ -glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Rad Biol Med* 27:838–847.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 39 (1): 44-84

- Venketaraman V, Dayaram YK, Amin AG, Ngo R, Green RM, Talaue MT, Mann J, Connell ND. 2003. Role of glutathione in macrophage control of Mycobacteria. *Infect Immunity* 71(4): 1864–71
- Venketaraman V, Dayaram YK, Talaue MT, Connell ND. 2005. Glutathione and Nitrosoglutathione in macrophage defense against M. tuberculosis. *Infect Immunity* 73: 1886–9
- Venketaraman V, Rodgers T, Linares R, Reilly N, Swaminathan S, Hom D, Millman AC, Wallis R and Connell ND. 2006 Glutathione and growth inhibition *Mycobacterium tuberculosis* in healthy and HIV infected subjects. *AIDS Research and Therapy* 3(5):1-12.
- Vieira SM, Maria BM, Tatiana M, Ana ML, Maria AF, Márcia Nm, Márcia Q, Sérgio AD , Márcio FV, Mirela JA, Luis HC, Maria CP, Elizabeth JP, Daniel GN and Maria LCG. 2011. Association of genetic variants in the promoter region of genes encoding p22phox (CYBA) and glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and renal disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *BMC Medical Genetics* 12(129):1-6
- Voetsch, B., R.C. Jin et al. 2008. Role of Promoter Polymorphisms in The Plasma Glutathione Peroxidase (GPx-3) gene as a rsik factor for Cerebral Venous Thrombosit. *Stroke* 39(2):303-307.
- Voskuil MI, Iona L. Bartek, Kevin V and Gary KS. 2011. The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. *Frontier in Microbiology* 2(105):1-12
- Walsh AC, Feulner JA, Reilly A. 2001. Evidence for functionally significant polymorphism of human glutamate cysteine ligase catalytic subunit: association with glutathione levels and drug resistance in the National Cancer Institute tumor cell line panel. *Toxicol. Sci*;61(2):218–223.
- Walsh AC, Li W, Rosen DR, Lawrence DA. 1996. Genetic mapping of GLCLC, the human gene encoding the catalytic subunit of γ -glutamyl-cysteine synthetase, to chromosome band 6p12 and characterization of a polymorphic trinucleotide repeat within its 5' untranslated region. *Cytogenet. Cell Genet*;75(1):14–16.
- Walters DM, Cho HY, Kleeberger SR. 2008. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 10:321–332.

- Walubo, A., Smith, P.J, and Folb, P.I. 1995. Oxidative stress during antituberculous therapy in young and elderly patients.
- Wang D, Amanda C, Audrey AP, Susan LK and Michael FP. 2012. Polymorphisms in Glutamat-cysteine Ligase Catalytic sub unit (GCLC) is associated with sulfamethoxazole-induced hypersensitivity in HIV/AIDS patient. *BMC Medical Genomic* 5;32-40
- Wayan, B.S. 2011. Polimorfisme Gen insl3 dan Igr8, Kadar Hormon Insl3 dan Estradiol sebagai faktor Risiko Kriptorkismus pada Anak. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Udayana. Denpasar.
- Widiati, S dan Kusnanto, H. 2001. Planet Kota Kesehatan Kita Laporan Komisi WHO mengenai Kesehatan dan Lingkungan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- 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.
- Wiid, I., T. Seaman, E.G. Hoal, AJS Benade and Paul DVH. 2004. Total Antioxidant Levels Are Low During Active TB and Rise With Anti-Tuberculosis Therapy. *IUBMB Life*:56(2):101-106.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr*;134(3):489-492.
- World Health Organization 2010. *Global Tuberculosis Programme : Global Tuberculosis Control*. WHO Report.
- World Health Organization. 2011. Global Tuberculosis Control 2011. Geneva.
- Yang Y, Chen Y, Johansson E, Schneider SN, Shertzer HG, Nebert DW, Dalton TP. 2007. Interaction between the catalytic and modifier subunits of glutamate-cysteine ligase. *Biochem. Pharmacol*;74(2): 372-381.
- Yang, P., Bamlet, W. R., Ebbert, J. O., Taylor, W. R., and de Andrade, M. 2004. Glutathione pathway genes and lung cancer risk in young and old populations. *Carcinogenesis* 25, 1935-1944

- Yang Y, Dieter MZ, Chen Y, Shertzer HG, Nebert DW, Dalton TP. 2002. Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(−/−) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *J. Biol. Chem*;277(51):49446–49452.
- Young, IS. 2005. Oxidative Stress and Vascular Disease : Insight from Isoprostane Measurment. *Clin Chem* 51(1):14-15.
- 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.
- Yuniastuti**, A dan Dewi M. 2012. Pengembangan Biomarker Enzimatis Untuk Deteksi Cekaman Oksidatif akibat Paparan Obat Anti Tuberkulosis Pada Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Universitas Negeri Semarang. In Press.
- Yuniastuti**, A dan R Susanti. 2013. Analisis Sekuen gen Antioksidan Glutation Sebagai Deteksi Kerentanan Pasien Tuberkulosis Terhadap Stres Oksidatif Akibat Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Universitas Negeri Semarang. In Press.
- Yuniastuti**, A dan R Susanti. 2013. Analisis sekuen gen Glutation Peroksidase (GPx1) sebagai deteksi Stres Oksidatif akibat infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. *Sainteknol* 11(2) : 103-112.
- Yuniastuti** A dan Dewi, M. 2015. Polymorphisms Of *Glutamate Cysteine Ligase* Gene is an Oxidative Stress Biomarker at Pulmonary Tuberculosis Patients . Proceedings The 5th Annual Basic Science International Conference. February 11-12 2015. Malang. Indonesia
- Yuniastuti**, A. 2015. Poimorfisme gen Glutamate Cysteine Logase (GCL) terhadap Penyakit Degeneraitf (Studi Meta Analisis). Annual Scienetific Meeting. 28 Maret 2015. Fakulast Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Yuniastuti**, A dan R Susanti. 2015. Polimorfisme gen Glutathione-S-Transferase Theta-1 dan Mu-1 Pada Pasien Tuberkulosis Paru.

Seminar Nasional dan Gelar Produk Penelitian dan PPM. 20-21 April 2015. Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta.

Zanconato, S.; Carraro, S.; Corradi, M.; Alinovi, R.; Pasquale, M.F.; Piacentini, G.; Zucchello, F.; Baraldi, E. 2004. Leukotrienes and 8-isoprostanone in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 257-263.

Zhang H, Forman HJ and Choi J. 2005. γ -glutamyltrnas peptidase in glutathione biosynthesis. *Methods in Enzymology* 401:468-483.

GLOSSARIUM

Glutation (GSH) : (*γ-glutamil sisteinil glisin*) merupakan tripeptida yang terdiri dari glutamat, sisten dan glisin

enzim glutamate cystein ligase : Enzim yang mengkatalisis sintesis glutation (GSH)

apopotosis : mekanisme biologi yang merupakan salah satu jenis kematian sel terprogram. Apoptosis digunakan oleh organisme multisel untuk membuang sel yang sudah tidak diperlukan oleh tubuh.

proliferasi : fase sel saat mengalami pengulangan siklus sel tanpa hambatan. Proliferasi berbeda dengan mitosis. Istilah proliferasi sering digunakan pada hepatosit dalam konteks penggantian massa parenkima hati yang hilang akibat proses detoksifikasi, radang atau imunitas, dan digunakan pada sel B dan sel T pada saat kedua jenis sel ini distimulasi oleh ekspresi molekul antigen

detoksifikasi : lintasan metabolisme yang mengurangi kadar racun di dalam tubuh, dengan penyerapan, distribusi, biotransformasi dan ekskresi molekul toksin.^[1]

antioksidan : molekul yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi molekul lain. senyawa yang melindungi sel melawan radikal bebas, seperti oksigen singlet, superokksida, radikal peroksil, radikal hidroksil dan peroxynitrite.

Oksidasi : reaksi kimia yang dapat menghasilkan radikal bebas, sehingga memicu reaksi berantai yang dapat merusak

sel. Antioksidan seperti tiol atau asam askorbat (vitamin C) mengakhiri reaksi berantai ini.

xenobiotik : Xenos yang artinya asing, yaitu zat asing yang masuk dalam tubuh manusia. Contoh: obat-obatan, insektisida, zat kimia tambahan pada makanan (pemanis, pewarna, pengawet) dan zat karsinogen lainnya.

karsinogen : zat yang menyebabkan penyakit kanker. Zat-zat karsinogen menyebabkan kanker dengan mengubah asam deoksiribonukleat (DNA) dalam sel-sel tubuh, dan hal ini mengganggu proses-proses biologis.

Reactive oxygen species/ROS : radikal bebas yang berupa oksigen dan turunannya yang sangat reaktif. Radikal bebas tersebut dapat menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap molekul protein, DNA, lemak membran sel, dan komponen sel atau jaringan yang lain

Biomarker : **Zat**, struktur, atau proses yang bisa diukur dalam tubuh atau produk-produk serta pengaruhnya atau memprediksikan kejadian dampak atau penyakit. Biomarker bisa dikelompokkan sebagai penanda keterpaparan, penanda efek, dan penanda kerentanan

Stres oksidatif : keadaan di mana jumlah radikal bebas di dalam tubuh melebihi kapasitas tubuh untuk menetralkannya. Akibatnya intensitas proses oksidasi sel-sel tubuh normal menjadi semakin tinggi dan menimbulkan kerusakan yang lebih banyak.

Polimorfisme : Keanekaragaman urutan basa pada DNA. ketika dua atau beberapa fenotip yang berbeda ada dalam populasi suatu spesies - atau, dalam kata lain, kemunculan lebih dari satu bentuk. Agar dapat disebut sebagai polimorfisme, bentuk-bentuk tersebut harus berada dalam habitat yang sama pada

waktu yang sama dan tergolong dalam populasi panmiktik (perkawinan acak).

Single nucleotide polymorphism : (SNPs) merupakan perubahan genetik atau variasi yang dapat ditemukan pada sequencing DNA manusia

PCR merupakan teknik amplifikasi DNA yang diinginkan secara in vitro pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida dengan bantuan enzim *polymerase*.

Primer oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat, dan oligonukleotida yang kedua identik dengan sekuen pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain.

Enzim Taq DNA polymerase adalah suatu enzim yang bersifat thermostabil yang diisolasi dari *Thermus aquaticus*.DNA polymerase adalah enzim yang mengkatalisis polimerasi DNA

Polymerase Chain Reaction Fragment length Polymorphism (PCR-RFLP) adalah adalah salah satu teknik pertama yang secara luas digunakan untuk mendekripsi variasi pada tingkat sekuen DNA

Elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan molekul yang menggunakan medan listrik (elektro) sebagai penggerak molekul dan matriks penyangga berpori (foresis)

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) atau nama lainnya *enzyme immunoassay (EIA)* merupakan teknik biokimia yang banyak digunakan di bidang imunologi untuk

mendeteksi adanya antibody atau antigen pada suatu sampel

Promoter gen : Promoter inti (bahasa Inggris: *core promoter*, *RNA polymerase II core promoter*) adalah area pada gen sel eukariota yang disebut pulau CpG, yang terdiri dari kotak TATA, INR, kotak GC, kotak CCAAT BRE, MTE, DCE dan DPE. Promoter inti merupakan tempat awal terjadinya proses transkripsi oleh RNA polimerase II dan tempat proses transkripsi tersebut dikendalikan. Hingga saat ini, hanya kotak TATA dan INR yang dapat mengarahkan proses inisiasi transkripsi oleh RNA polimerase II dengan akurat. Promoter ini dapat menginisiasi dua jenis transkripsi

Primer : Primer adalah sepasang DNA utas tunggal atau oligonukleotida pendek yang menginisiasi sekaligus membatasi reaksi pemanjangan rantai atau polimerisasi DNA.

EDTA : Asam Etilen Diamin Tetraasetat *Ethylenediaminetetraacetic acid*, disingkat EDTA) adalah asam kompleks, berupa asam karboksilat poliamino yang biasa digunakan sebagai agensia pengkelat atau ligan beberapa ion atau unsur logam, terutama Fe^{3+} dan Ca^{2+} .

INDEKS

- Alel, viii, 32, 35, 36, 67
antioksidan, iv, v, 11, 12, 14, 16, 17,
24, 27, 39, 40, 41, 44, 45, 72, 75,
78, 95, 101
asam amino, 10, 13, 18, 20, 21, 22,
25, 26, 29, 31, 38
Biosintesis, vi, 17, 20, 27
enzim, iv, v, vi, 10, 12, 13, 14, 16,
18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27,
28, 30, 31, 32, 36, 37, 38, 39, 41,
43, 50, 54, 56, 57, 58, 64, 65, 66,
72, 73, 74, 75, 100, 103
fenotip, 13, 34, 36, 38, 68, 102
gen, iv, v, vi, viii, ix, 11, 12, 13, 14,
15, 16, 17, 20, 27, 28, 30, 31, 32,
33, 34, 36, 37, 38, 39, 52, 53, 57,
58, 61, 62, 65, 66, 67, 68, 69, 70,
71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 99,
100, 103
glisin, iv, 10, 19, 20, 21, 23, 24, 30,
100
glutamate, iv, v, vi, 10, 12, 13, 14,
17, 18, 20, 26, 28, 30, 52, 53, 66,
77, 78, 82, 83, 85, 87, 89, 90, 91,
92, 97, 98, 99, 100
- Glutamate cysteine ligase*, vi, 30, 31,
80, 81
glutation, iv, v, 10, 11, 12, 13, 14,
15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,
24, 25, 26, 27, 29, 30, 38, 40, 41,
42, 44, 45, 46, 48, 49, 51, 66, 71,
72, 73, 74, 77, 78, 95, 100
gugus amina, 10
hidrolisis, 10, 20, 26
Kromosom, ix, 31
lokus, 32, 34, 35, 36, 67, 68
nukleotida, 33, 35, 53, 55, 58, 66,
69, 76
Polimorfisme, v, vi, ix, 13, 14, 17, 32,
35, 36, 37, 38, 39, 58, 72, 73, 74,
76, 85, 86, 98, 100
polipeptida, 30
radikal bebas, iv, 10, 14, 15, 30, 39,
40, 41, 43, 45, 101, 102
reaksi redoks, 25
sistein, iv, 10, 11, 18, 19, 20, 21, 23,
24, 30, 31, 40, 46, 50
stres oksidatif, v, 14, 15, 16, 29, 39,
42, 48, 49, 72, 73, 74, 75, 77, 78