

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (Tb) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, terutama *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (1). Penyebaran tuberkulosis lebih lanjut akan menimbulkan komplikasi setelah mencapai organ lain melalui pembuluh darah(4). Paru-paru adalah tempat masuk pada lebih dari 98% kasus (3).

TB masih menjadi masalah yang menonjol di Indonesia, bahkan Indonesia menduduki peringkat ketiga sebagai negara dengan jumlah kasus terbanyak di dunia (1). Lebih dari 4000 orang meninggal perhari karena penyakit yang disebabkan oleh TB di seluruh dunia. TB juga merupakan penyebab utama kesakitan dan kematian pada anak di negara berkembang (1,2).

Tingginya kasus TB di berbagai tempat diduga disebabkan oleh berbagai faktor, salah satunya adalah diagnosis yang tidak tepat. Diagnosis pasti TB terutama ditegakkan dengan ditemukannya MTB (MTB) pada pemeriksaan sputum, bilasan lambung atau cairan dan biopsi jaringan tubuh lainnya.

Kesulitan menegakkan diagnosis pasti pada anak diakibatkan oleh dua hal, yaitu sedikitnya jumlah kuman dan sulitnya pengambilan spesimen (sputum). Uji serologis tidak dapat ditentukan secara spesifik karena antibodi yang dibentuk MTB bermacam-macam dan tidak khas (8,5). Karena alasan tersebut, maka diagnosis TB terutama TB paru anak bergantung pada penemuan klinis dan radiologis, sedangkan keduanya seringkali tidak spesifik (1). Padahal, TB pada anak harus diobati secara adekuat sedini mungkin untuk menghindari komplikasi yang berat dan *reccurent infection* pada saat dewasa(4).

Perkembangan kajian biologi molekuler di bidang kedokteran berpengaruh kuat terhadap perkembangan teknologi diagnostik. Apabila dikaji secara seluler, metabolisme MTB selama infeksi terbukti dapat mempengaruhi komposisi metabolit dalam cairan tubuh, seperti plasma darah, cairan serebrospinal, dan urin

sehingga dapat membentuk profil metabolit yang khas (12). Metabolit merupakan produk akhir proses selular yang mencerminkan respon stres biologi tingkat sistem. Ilmu yang mempelajari komposisi normal metabolit dalam cairan tubuh disebut metabolomik, sedangkan komposisi tidak normal metabolit dalam cairan tubuh yang disebabkan karena berbagai stimulus biologi atau manipulasi genetik disebut metabonomik (1,4). Profil metabolit yang khas ini dapat diinterpretasi dengan strategi klasifikasi statistik komputerisasi hanya dalam hitungan menit. Analisis data yang kompleks ini didapatkan dengan menggunakan Spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) dan terbukti sangat spesifik untuk diagnosis(12).

Spektroskopi NMR berdasar pada kemampuan inti atom untuk bereaksi seperti magnet kecil dan dipengaruhi medan magnet luar. Salah Inti atom yang sering digunakan karena mudah ditemukan dan spesifisitasnya yang lebih tinggi adalah ^1H (hidrogen) (22). Ketika diiradiasi dengan sinyal frekuensi radio 600 MHz, inti dalam ^1H akan berubah dari tarik menarik dengan medan magnet menjadi tolak menolak. Energi frekuensi yang terjadi dapat diukur oleh spektroskopi NMR ^1H dan ditampilkan sebagai spektra NMR (13). Tampilan spektra NMR dapat dilihat dalam 2 dimensi (2D) untuk mendapatkan resolusi yang lebih tinggi (22).

Dari beberapa fakta di atas, didapatkan masalah TB terutama TB paru masih menonjol di Indonesia. Meskipun TB paru merupakan penyebab utama kesakitan dan kematian pada anak di negara berkembang, namun penegakan diagnosis secara cepat dan tepat masih sulit dilakukan. Mengingat selama perkembangan kompleks primer, basil tuberkel dibawa ke banyak jaringan tubuh melalui pembuluh darah dan limfe(3), maka spektroskopi NMR 2D ^1H 600 MHz berbasis metabonomik pada plasma darah diharapkan dapat menjadi solusi cerdas, inovatif, dan potensial sebagai alat diagnostik cepat dan spesifik TB paru pada anak.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah spektroskopi NMR 2D ^1H 600 MHz berbasis metabonomik pada plasma darah dapat menjadi alat diagnostik potensial TB paru pada anak yang cepat dan spesifik.

1.3 Tujuan Penulisan

Untuk mengetahui apakah spektroskopi NMR 2D ^1H 600 MHz berbasis metabonomik pada plasma darah dapat menjadi alat diagnostik potensial TB paru pada anak yang cepat dan spesifik.

1.4 Manfaat Penulisan

Penulisan karya ilmiah tentang spektroskopi NMR 2D ^1H 600 MHz berbasis metabonomik pada plasma darah sebagai alat diagnostik potensial TB paru pada anak yang cepat dan spesifik ini diharapkan dapat :

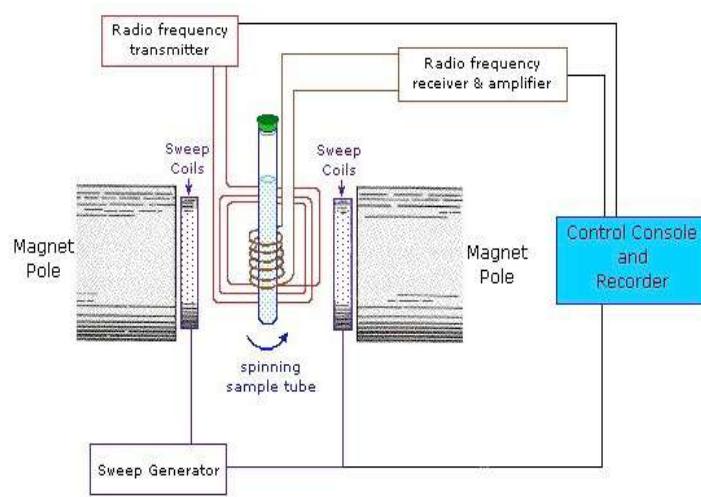
- 1.4.1 Memberikan informasi tentang spektroskopi NMR 2D ^1H 600 MHz berbasis metabonomik pada plasma darah
- 1.4.2 Menjadi dasar pengembangan alternatif diagnostik TB paru pada anak
- 1.4.3 Menjadi dasar teori bagi penelitian selanjutnya

BAB II

TELAAH PUSTAKA

2.1 *Nuclear Magnetic Resonance (NMR)*

Selama 50 tahun terakhir, NMR telah menjadi teknik yang paling menonjol dalam menentukan struktur dari senyawa organik. Teknik ini berdasar pada kemampuan inti atom untuk bereaksi seperti magnet kecil dan dipengaruhi medan magnet luar. Ketika diiradiasi dengan sinyal frekuensi radio, inti atom dalam molekul akan berubah dari tarik menarik dengan medan magnet menjadi tolak menolak. Peristiwa ini disebut ‘nuklir’ pada instrumen yang bekerja pada inti atom untuk menyerap gelombang radio. Energi frekuensi yang terjadi dapat diukur dan ditampilkan sebagai spektra NMR (19).



Gambar 1. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (19)

Dalam bidang medis, teknik ini digunakan untuk menentukan profil metabolit dari cairan tubuh ataupun urin berbasis metabolomik guna mendiagnosis berbagai penyakit ataupun toksik (19).

Ada beberapa macam NMR yang digunakan untuk mendiagnosis penyakit, seperti NMR ^{31}P , ^{19}F , ^{29}Si , dan ^{77}Se , ^{13}C , ^1H , namun yang paling sering digunakan adalah NMR ^1H karena inti atomnya lebih mudah didapatkan di alam dan spesifisitasnya lebih tinggi (22).

2.1.1 Prinsip Kerja Spektroskopi NMR

Untuk menggunakan NMR diperlukan pemahaman tentang prinsip fisika dan kimia yang tentunya merupakan dasar dari cara kerja alat ini.

2.1.1.1 Fisika

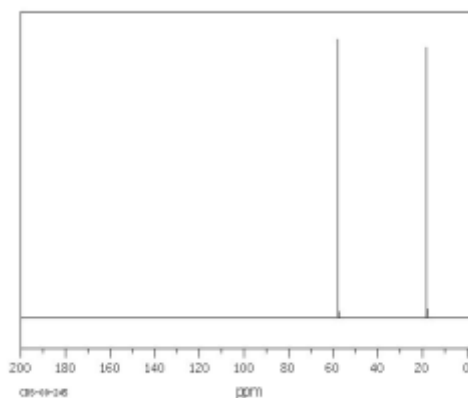
Untuk mendapatkan inti dari suatu molekul agar berpengaruh ke arah yang sama, medan magnet yang sangat kuat dihasilkan oleh elektromagnet superkonduksi yang memerlukan temperatur sangat rendah untuk bekerja. Kumbaran magnet dikelilingi oleh helium cair (4K, atau -269°C) yang terlindungi dari penguapan terlalu cepat oleh lapisan yang diselimuti nitrogen cair (-77°C) (19).

Pendingin ini keseluruhan diselimuti oleh baja dua lapis dengan ruang hampa di antara lapisan untuk memberikan insulasi seperti halnya termos. Terdapat sebuah lubang sempit pada bagian tengah magnet, di sanalah tabung sampel serta kumbaran frekuensi radio berada (19).

2.1.1.2 Kimia

Sebuah spektrum NMR memperlihatkan gambaran seri puncak vertikal/sinyal terdistribusi sepanjang spektrum x-axis. Masing-masing sinyal terhubung pada sebuah atom dalam molekul yang sedang diteliti. Posisi dari masing-masing sinyal pada spektrum memberikan informasi tentang lingkungan struktural lokal dari atom yang memproduksi sinyal(19).

Seperti contoh pada gambar 2, NMR spektrum ^{13}C dari etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), dua karbon pada etanol berada pada lingkungan struktural berbeda dan karenanya masing-masing karbon memproduksi sebuah sinyal pada spektrum NMR. Karbon tak terikat



Gambar 2. Contoh spektrum etanol(19)

pada oksigen karena sifat elektronegatif dari oksigen dan pergeseran sinyal ini bergerak ke arah kiri pada spektrum, sedangkan karbon hanya terikat pada hidrogen dan tampak di kanan pada spektrum (19).

2.1.2 Eksperimental

Langkah – langkah interpretasi metabolit plasma darah oleh spektroskopi NMR 2D ^1H 600 MHz berbasis metabonomik adalah :

2.1.2.1 Ekstraksi plasma darah

10 ml darah dikumpulkan dalam tabung sentrifugal terheparinisasi dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit. 3 plasma ml diambil dari supernatan (cairan yang tersisa dari bahan solid) dan diliofilisasi. Plasma yang telah diliofilisasi dimasukkan ke dalam gelas tabung sentrifugal dan dicampur dengan 2 ml CHCl_3 dan 2 ml MeOH. Kocok campuran dengan hati-hati hingga suspensi homogen (1-2 menit). Campuran kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit (19).

Supernatan yang telah dipisahkan dimasukkan ke dalam tabung bersih. Supernatan yang tersisa ini dicampur dalam 1 ml CHCl_3 dan 1 MeOH ml, dikocok dan disentrifugasi lagi. Supernatan yang telah dicampur ini ditambahkan 1 ml H_2O . Setelah dikocok dengan hati-hati, campuran disentrifugasi pada 4000 rpm selama 5 menit. Wujud H_2O di atas berupa pengumpulan H_2O di dalam tabung dengan residu padat. Untuk wujud $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, sebelumnya telah didinginkan selama 15 menit pada -20°C untuk memungkinkan pemisahan fase yang lebih baik. Air yang tersisa akan dipisahkan dan pelarut $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ diuapkan dalam *dry nitrogen*. Lipid dipekatkan dalam $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 0,6 ml (2: 1) dan dimasukkan ke dalam tabung NMR. Lipid sebaiknya disimpan dalam larutan karena kerentanannya terhadap oksidasi (19).

Residu padat dengan 1 ml air diaduk dengan hati-hati dan dikocok sampai suspensi homogen. Kemudian campuran disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit. Solusi cair ditaruh ke dalam labu liofilisasi. Residu padat diaduk sekali lagi dengan 1 ml H_2O , dikocok dan disentrifugasi. Fase

air yang dipadukan terliofilisasi. Fase air mengandung sejumlah besar metanol yang telah menguap dahulu (pendingin yang baik sangat disarankan). Wujud air yang mengandung sejumlah kecil etanol juga biasa digunakan sebagai stabilizer untuk CDCl_3 . Untuk memisahkan fase ini sepenuhnya, liofilisasi harus dilakukan minimal 24 jam. Fase larut dalam air dipekatkan dalam 0,6 D_2O ml dan dimasukkan ke dalam tabung NMR. Kemudian pH harus disesuaikan hingga diperoleh pH 7 menggunakan beberapa tetes NaOD dan DCl yang telah diencerkan (19).

2.1.2.2 Spektroskopi NMR

Ukur volume kontrol dan solusi yang telah diderivatisasi dicampur dengan 70 μl natrium 3-trimetilsilil (2,2,3,3-(2) H_4)-1-propionat/ D_2O (0,5% wt / vol) solusi secara terpisah, pH disesuaikan pada $7.05 \pm 0,03$, dan ditempatkan terpisah pada tabung 5-mm NMR. Semua percobaan yang dilakukan NMR dibawa dengan suhu 25°C pada spektrometer DRX 600-MHz (Bruker, Billerica, MA) dilengkapi dengan ^1H deteksi terinversi dan gradien triple-axis. Total dari 64 atau 128 transien dirata-rata dan 64.000 poin data diperoleh untuk setiap sampel. *Line broadening* sebesar 1,0 Hz dilakukan sebelum melakukan transformasi Fourier. Percobaan HSQC (*Heteronuclear Sequence Quantum Coherence*) 2D, yang merupakan pendekatan yang biasanya dilakukan pada spektroskopi NMR dilakukan untuk semua sampel dengan menggunakan inti nonsensitif ditingkatkan oleh *delay* polarisasi transfer 100 milidetik, sesuai dengan $^3\text{J}_{\text{CH}} = 5.0$ Hz, yang merupakan nilai rata-rata yang ditetapkan untuk standar asam amino terderivatisasi. Lebar spektra 600 Hz digunakan dalam ^1H . Sebanyak 64 induksi bebas yang meluruh dikumpulkan bersama t_1 menggunakan empat transien tiap kenaikan. Data fase sensitif diperoleh menggunakan mode echo-antiecho dengan GARP (*Globally Optimized Alternating-Phase Rectangular Pulse*) carbon decoupling pada saat akuisisi. Hasil data 2D adalah nol-terisi sampai 1.024 poin pada dimensi t_1 setelah prediksi linier selanjutnya untuk 128 poin dan Fourier tertransformasi setelah

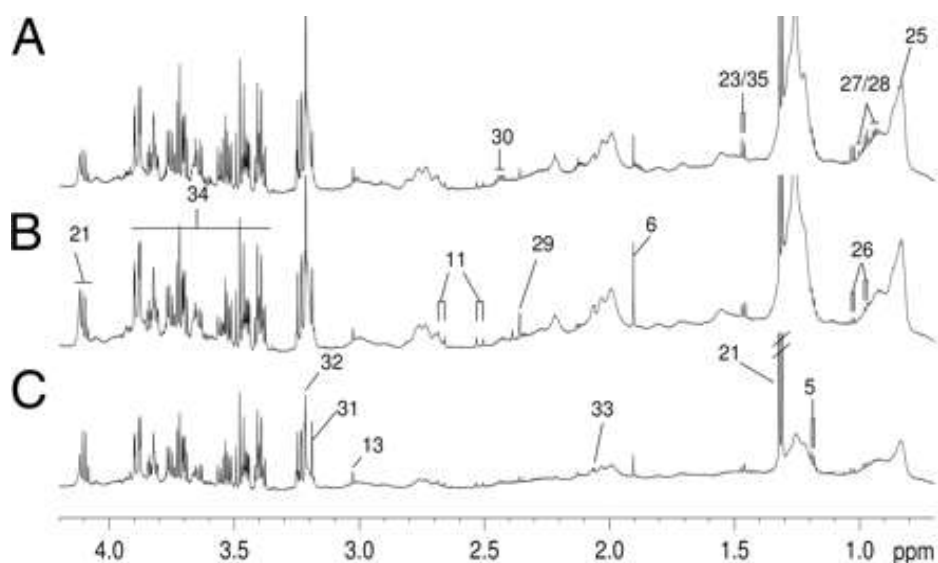
dimultiplikasi dengan *sine-bell* kuadrat fungsi window digeser pada $\pi/4$ sepanjang t_1 dan $\pi/2$ sepanjang dimensi t_2 . *Chemical shifts* dirujuk ke puncak glisin dalam spektrum HSQC 2D (24).

2.1.3 Telaah jurnal mengenai efektivitas dan spesifisitas spektroskopi NMR dalam beberapa penyakit infeksi dan kanker

Berikut ini adalah telaah jurnal mengenai efektivitas dan spesifisitas spektroskopi NMR dalam beberapa penyakit diantaranya Trypanosomiasis, kanker paru, dan meningitis.

2.1.3.1 Spektroskopi NMR pada kasus Trypanosomiasis

Representasi NMR 1D ^1H 600 MHz dari plasma darah dari tikus pada masa prainfeksi (A), 14 hari pascainfeksi (B), dan 28 hari pascainfeksi (C). *Keyword*: 5, d-3-hidroksibutirat; 6, asetat; 11, sitrat; 13, kreatin; 21, laktat; 23, alanin; 25, lipoprotein; 26, valin; 27/28, leusin and isoleusin; 29, oksaloasetat; 30, glutamin; 31, kolin; 32, fosfatidilkolin; 33, fragmen *O*-asetil-glikoprotein; 34, glukosa; 35, lisin (16) (lihat pada gambar 3)

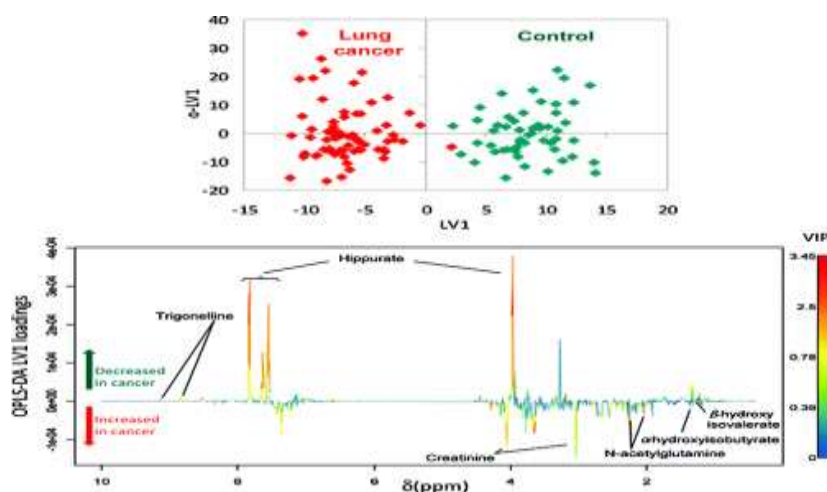


Gambar 3. Spektroskopi NMR pada kasus Trypanosomiasis (16)

2.1.3.2 Spektroskopi NMR pada kasus Kanker Paru

Pada studi kasus ini, NMR ^1H berbasis metabonomik telah dilakukan untuk menyelidiki adanya perubahan metabolik urine pada kanker paru, bertujuan untuk menilai potensi diagnostik dan melihat lebih dalam tentang metabolisme kanker paru dan efek sistemiknya. Sampel urin dari pasien kanker paru ($n = 71$) dan kelompok kontrol/org sehat ($n = 54$) dianalisis menggunakan NMR ^1H resolusi tinggi (500 MHz), dan profil spektra mereka merujuk pada statistik multivariat, *Principal Component Analysis (PCA)*, *Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA)*, dan *Orthogonal Projections to Latent Structures (OPLS)-DA*. Perbedaan yang sangat mencolok antara kelompok pasien dan control didapatkan melalui pemodelan profil urin multivariat. Berdasarkan *Monte Carlo Cross Validation*, model klasifikasi ini menunjukkan sensitivitas 93%, spesifisitas 94% dan tingkat klasifikasi keseluruhan 93.5% (17).

Berikut terdapat perbedaan pada tampilan spektrum 1D dan 2D, perbedaan itu terletak pada tampilan yang lebih rinci karena kegunaan dari spektroskopi NMR 2D adalah untuk menyebarkan resonansi yang tumpang tindih ke dalam dimensi dua. Spektroskopi NMR 2D dapat mengidentifikasi molekul yang lebih kecil lagi (22). Oleh karena itu, spektroskopi NMR 2D memberikan spesifisitas yang lebih tinggi. (lihat pada gambar 4)



Gambar 4. Spektroskopi NMR pada kanker paru (22)

2.1.3.3 Spektroskopi NMR pada kasus meningitis

Meningitis bakteri merupakan penyakit akut dengan kematian tinggi yang dapat dikurangi dengan pengobatan sedini mungkin. Identifikasi mikroorganisme kausatif oleh kultur sangat sensitif, tetapi lambat. Diperlukan cairan serebrospinal (CSF) dalam jumlah besar untuk memaksimalkan sensitivitas dan menegakkan diagnosis sementara. Spektroskopi NMR (NMR) secara cepat dapat menggolongkan profil biokimia CSF dari tikus normal dan hewan dengan meningitis pneumokokus atau kriptokokal(12).

Profil spektra yang dapat direproduksi dihasilkan dalam waktu kurang dari tiga menit, dan menunjukkan perbedaan dalam jumlah relatif glukosa, laktat, sitrat, residu asam amino, asetat dan poliol dalam tiga kelompok. Kontribusi dari metabolisme mikroba dan sel-sel inflamasi akhirnya terbukti. Strategi klasifikasi statistik komputerisasi didasarkan pada kedua metabolit besar dan kecil, sebagian pada metabolit tak dikenal. Analisis data terbukti sangat spesifik untuk diagnosis (spesifisitas 100% di akhir set validasi), dengan syarat tidak terjadi kontaminasi darah pada analisis; 6-8% dari sampel yang telah diklasifikasikan sebagai kelompok tak terdefinisi(12).

2.1.3 Petanda Metabonomik TB Paru yang dapat digunakan

Terdapat beberapa cairan tubuh yang dapat digunakan sebagai alternatif petanda metabonomik TB paru, yaitu urin, cairan serebrospinal, dan plasma darah.

2.1.4.1 Pemeriksaan Spektroskopi NMR Menggunakan Urin

Masalah utama dari penggunaan metabolit urin untuk analisis NMR adalah komposisinya yang sangat beragam, termasuk bahan – bahan kimia lain yang mengacau. Komposisi metabolit dan konsentrasi sangat bergantung pada nutrisi dari setiap orang. Oleh karena itu, sangat sulit untuk membuat perbandingannya secara definit (6).

2.1.4.2 Pemeriksaan Spektroskopi NMR Menggunakan Cairan Serebrospinal

Komponen metabolit yang larut dalam air berikut telah diidentifikasi dan ditemukan pada spektrum HSQC, CSF: *Acetate, N-Acetyl-glutamate, Alanine, Arginine, Aspartate, βine, Citrate, Creatine, Creatinine, Ethanolamine, Formate, Fructose, Glucose, Glutamine, Glycine, Histidine, α-Hydroxybutyrate, β-Hydroxybutyrate, 3-Hydroxy-Methyl-Glutarate, 3-Hydroxyisobutyrate, Inositol, scyllo-Inositol, 3-Hydroxy-Isovalerate, Isoleucine, Lactate, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, 1,2-Propanediol, Pyroglutamate, Succinate, Taurine, Threonine, TMAO, Tyrosine, Tryptophane, Valine*(6). Namun, untuk pengambilan CSF sulit dilakukan pada pasien anak-anak karena beberapa faktor seperti ketidaksetujuan orang tua dalam *inform consent* dan tingkat keberhasilan pungsi lumbal pada anak yang masih rendah, selain itu diagnosis baru dapat ditegakkan setelah satu minggu atau lebih (23).

2.1.4.3 Pemeriksaan Spektroskopi NMR Menggunakan Plasma Darah

Komposisi plasma darah dan CSF sangat mirip. Perbedaan yang paling mencolok adalah konsentrasi masing-masing metabolit. Plasma mengandung sejumlah besar lipoprotein, yang terdapat dalam CSF dengan konsentrasi yang sangat rendah. Kesulitan analisis NMR menggunakan plasma darah adalah karena adanya lipoprotein (*protein-bound lipid*) dan metabolit larut dalam air. Untuk alasan ini, dianjurkan untuk melakukan pemisahan lipid dan metabolit larut air sebelum melakukan analisis NMR (tercantum pada bagian eksperimental). Berbeda dengan urin, komposisi dan konsentrasi metabolit plasma dan CSF sangat stabil sehingga pemeriksaan NMR menggunakan plasma darah yang lebih memungkinkan untuk dilakukan (6).

Setiap variasi yang terdeteksi dengan pemeriksaan NMR menggunakan darah biasanya spesifik. Berikut senyawa larut air pada plasma darah yang ditemukan di spectrum HSQC: Asetat, Alanin, Aspartat,

βine, Sitrat, Kreatin, Kreatinin, Etanolamin, Format, Fruktosa, Glukosa, Glutamin, Glutamat, Glisin, Histidin, α-hidroksibutirat, β-hidroksibutirat, 3-hidroksi-metil-glutarat, 3-hidroksi-isovaleriat, Isoleusin, Laktat, Leusin, Lisin, Fenilalanin, Prolin, Piroglutamat, Suksinat, Taurin, Treonin, Tirosin, Triptofan, Valin (6).

2.2 Penyakit TB

1.2.1 Etiologi

Agen tuberkulosis, MTB, *Mycobacterium bovis*, dan *Mycobacterium africanum*, merupakan anggota ordo Actinomisetales dan famili Mikobakteriaseae. Basil tuberkel adalah batang lengkung, gram positif lemah, pleiomorfik, tidak bergerak, tidak membentuk spora, panjang sekitar 2-4 μm. Mereka dapat tampak sendiri – sendiri atau dalam kelompok pada spesimen klinis yang diwarnai atau media biakan. Mereka merupakan aerob wajib (obligat) yang tumbuh pada media sintesis yang mengandung gliserol sebagai sumber karbon dan garam amonium sebagai sumber nitrogen (3).

Mikobakteria ini tumbuh paling baik pada suhu 37-41 °C, menghasilkan niasin dan tidak ada pigmentasi. Dinding sel kaya lipid menimbulkan resistensi terhadap daya bakterisid antibodi dan komplemen. Tanda semua bakteri adalah ketahanannya terhadap asam, kapasitas membentuk kompleks mikolat stabil dengan pewarnaan arilmetan seperti kristal violet (3).

Fraksi protein basil tuberkulosis menyebabkan nekrosis jaringan sedangkan lemaknya menyebabkan sifat tahan asam dan merupakan faktor penyebab terjadinya fibrosis dan terbentuknya sel ephiteloid dan tuberkel. Basil tuberkulosis tidak membentuk toksin (baik endotoksin maupun eksotoksin) (4).

1.2.2 Epidemiologi

Tuberkulosis (TB) masih menjadi masalah yang menonjol di Indonesia. Bahkan Indonesia menduduki peringkat ketiga sebagai negara

dengan jumlah kasus terbanyak di dunia (1). Lebih dari 4000 orang meninggal perhari karena penyakit yang disebabkan oleh TB di seluruh dunia. TB juga merupakan penyebab utama kesakitan dan kematian pada anak di negara berkembang (1,2).

1.2.3 Patogenesis

Kompleks primer *tuberculosis* adalah infeksi lokal pada tempat masuk dan limfonodi regional yang mengalirkan darah tersebut. Paru-paru adalah tempat masuk pada lebih dari 98% kasus (3).

Basil tuberkel memperbanyak diri pada mulanya dalam alveoli dan duktus alveolaris. Sebagian basil tuberkel bertahan dalam makrofag yang dinonaktifkan, yang membawanya melalui vasa limfatika ke limfonodi regional. Bila infeksi primer ada di paru-paru, limfonodi hilus biasanya banyak dilibatkan, walaupun fokus lobus banyak dapat mengalirkannya ke dalam limfonodi paratrakea. Reaksi jaringan dalam parenkim paru-paru dan limfonodiintensif pada 2-12 minggu berikutnya karena terjadi hipersensitivitas jaringan (8, 3). Hipersensitivitas jaringan dalam masa pembentukan kompleks primer dapat diuji terhadap tuberkuloprotein yang dapat diketahui dari uji tuberkulin (4).

Selama perkembangan kompleks primer, basil tuberkel dibawa ke banyak jaringan tubuh melalui pembuluh darah dan limfe. Penyebaran *tuberculosis* terjadi jika jumlah basil yang bersirkulasi besar dan pertahanan tubuh hospes yang tidak adekuat(3). Penyebaran tuberkulosis lebih lanjut akan menimbulkan komplikasi setelah mencapai organ lain melalui pembuluh darah (4).

Waktu antara infeksi awal dan penyakit yang tampak secara klinis adalah sangat bervariasi. Tuberkulosis meningeal adalah manifestasi awal, sering terjadi dalam 2-6 bulan infeksi. Tuberkulosis (TB) paru yang terjadi lebih dari setahun sesudah infeksi primer biasanya disebabkan karena pertumbuhan kembali basili endogen yang menetap pada lesi sebagian

berkapsul. Bentuk yang paling sering adalah infiltrat atau kaverna di apeks lobus atas karena tekanan oksigen dan aliran darah yang besar (3).

1.2.4 Manifestasi Klinis

TB pada anak ditemukan tanpa gejala atau keluhan. Dengan melakukan uji tuberkulin secara rutin, dapat ditemukan penyakit TB pada anak. Gejala tuberkulosis primer dapat juga berupa panas yang naik turun selama 1-2 minggu dengan atau tanpa batuk pilek, selain itu terdapat gambaran klinis berupa anoreksia, berat badan menurun, bronkopneumonia, kadang dijumpai panas menyerupai tipe tifus abdominalis atau malaria yang disertai atau tanpa hepatosplenomegali (4).

Batuk non produktif dan dispnea ringan merupakan gejala yang paling lazim. Keluhan sistemik seperti demam, keringat malam, anoreksia, dan aktivitas berkurang juga jarang terjadi. Beberapa bayi mengalami kesukaran penambahan berat badan atau berkembang sindrom gagal tumbuh (3).

1.2.5 Diagnosis

Gejala klinis pada tuberkulosis anak tidak khas dan tidak jelas, tetapi jika terdapat panas yang naik turun selama 1-2 minggu dengan atau tanpa batuk pilek, selain itu terdapat gambaran klinis berupa anoreksia, berat badan menurun, bronkopneumonia, kadang dijumpai panas menyerupai tipe tifus abdominalis atau malaria yang disertai atau tanpa hepatosplenomegali(4).

Pembacaan uji tuberkulin dilakuakn 48-72 jam setelah penyuntikan dan diukur diameter melintang dari indurasi yang terjadi. Tuberkulin yang biasanya dipakai ialah *Old Tuberculin* (OT) dan *Purified Protein Derivate tuberculin* (PPD) (4).

Pemeriksaan bakteriologis dengan kultur untuk menemukan basil tuberkulosis jarang ditemukan pada anak. Pada umumnya basil tuberkulosis hanya dapat ditemukan 25-30% (4).

Konfirmasi yang paling spesifik tuberkulosis paru adalah isolasi MTB. Spesimen biakan yang paling baik biasanya asam lambung, namun walaupun asam lambung telah diambil dalam keadaan yang optimal, tiga aspirat lambung berturut-turut menghasilkan organisme kurang dari 50% pada kasus. Hasil dari bronkoskopi bahkan lebih rendah (3).

Diagnosis pasti TB ditegakkan dengan ditemukannya MTB pada pemeriksaan sputum, bilasan lambung atau cairan dan biopsi jaringan tubuh lainnya. Kesulitan menegakkan diagnosis pasti pada anak diakibatkan oleh dua hal, yaitu sedikitnya jumlah kuman dan sulitnya pengambilan spesimen (sputum). Karena alasan demikian, maka diagnosis TB anak bergantung pada penemuan klinis dan radiologis, sedangkan keduanya seringkali tidak spesifik (1)

1.2.6 Penatalaksanaan

Tuberkulosis pada anak harus diobati sedini mungkin dan setepat tepatnya untuk menghindari komplikasi yang berat dan *reccurent infection* pada dewasa (3).

Obat anti tuberculosis yang bersifat bakteriosid adalah isoniazid (H), rifampicin (R), pyrazinamide (P), streptomycin (S), sedangkan ethambutol (E) bersifat bakteriostatik.

1.2.7 Pencegahan

Berikut terdapat beberapa pencegahan TB yang dapat diterapkan, yakni vaksinasi BCG dan kemoprofilaksis

1.2.7.1 Vaksinasi BCG

Pemberian BCG meningkatkan daya tahan tubuh terhadap infeksi oleh basil tuberkulosis yang virulen. Imunitas timbul 6-8 minggu setelah pemberian BCG. Imunitas yang terjadi tidaklah lengkap sehingga masih mungkin terjadi superinfeksi meskipun biasanya tidak progresif dan menimbulkan komplikasi berat (4).

1.2.7.2 Kemoprofilaksis

Kemoprofilaksis yang dipakai biasanya dipakai INH dengan dosis 10 mg/kgbb/hari selama satu tahun. Kemoprofilaksis primer diberikan untuk mencegah terjadinya infeksi pada anak dengan kontak tuberkulosis. Kemoprofilaksis sekunder diberikan untuk mencegah berkembangnya infeksi menjadi penyakit (4).

1.2.8 Komplikasi

Sebagian besar komplikasi tuberkulosis primer terjadi dalam dua belas bulan setelah terjadinya penyakit. Komplikasi dapat berupa tuberkulosis meningitis, efusi pleura, tuberkulosis tulang, hematogen dalam kelenjar getih bening (superfisial).

2.3 *Mycobacterium tuberculosis*

Mikobakteria adalah bakteri aerob, berbentuk batang yang tidak membentuk spora. *Mycobacterium tuberculosis* menyebabkan tuberkulosis dan merupakan patogen yang sangat penting bagi manusia.

2.3.1 Morfologi dan Identifikasi

MTB berbentuk batang tipis lurus atau agak bengkok dengan ukuran 0,4x3 µm. Basil tuberkulosis sejati ditandai dengan “tahan asam” yaitu 95 % etil alkohol mengandung 3% asam hidroklorat (asam alkohol) dengan cepat dapat menghilangkan warna bakteri, kecuali mikobakterium. Sifat tahan asam ini bergantung pada integrasi selubung yang terbuat dari lilin. Pewarnaan Ziehl-Neelsen dipergunakan untuk identifikasi bakteri tahan asam (5).

MTB laju pertumbuhannya lebih lambat daripada kebanyakan bakteri, koloni tampak setelah lebih kurang 2 minggu bahkan kadang-kadang setelah 6-8 minggu. Suhu optimum 37°C, tidak tumbuh pada suhu 25°C atau lebih dari 40°C. Medium padat yang biasa dipergunakan adalah Lowenstein-Jensen. pH optimum 6,4-7,0 (5).

Mikobakterium tidak tahan panas, akan mati pada 6°C selama 15-20 menit. Biakan dapat mati jika terkena sinar matahari langsung selama 2 jam. Dalam dahak dapat bertahan 20-30 jam. Basil yang berada dalam percikan bahan dapat bertahan hidup 8-10 hari. Biakan basil ini dalam suhu kamar dapat hidup 6-8 bulan dan dapat disimpan dalam lemari dengan suhu 20°C selama 2 tahun. Mikobakteri tahan terhadap berbagai kemikalia dan disinfektan antara lain fenol 5%, asam sulfat 15%, asam sitrat 3% dan NaOH 4%. Basil ini dihancurkan oleh yodium *tinctur* dalam 5 menit, dengan alkohol 80 % akan hancur dalam 2-10 menit(5).

2.3.2 Patogenesis dan patologi

Basil tuberkel menyebar dalam tubuh hospes secara langsung melalui aliran limfatik dan aliran darah, serta melalui bronkus dan traktus gastrointestinal. Pada infeksi pertama, basil tuberkel selalu menyebarkan tempat awalnya melalui aliran limfatik menuju ke kelenjar getah bening regional, basil dapat mencapai sampai aliran darah, yang selanjutnya akan menyebarkan basil ke seluruh organ (penyebaran miller) (5).

Apabila mikobakterium masuk ke dalam jaringan, bakteri ini terutama berada intraselular di dalam monosit, sel retikuloendotelial, dan sel raksasa. Lokasinya yang intraselular adalah salah satu alasan yang membuat bakteri ini sulit ditangani dengan kemoterapi (5).

2.3.3 Komponen Basil Tuberkel

Komponen berikut ini terutama ditemukan pada dinding sel. Dinding sel mikobakterium dapat menginduksi hipersensitifitas tipe lambat dan beberapa resistensi terhadap infeksi lainnya.

Mikobakterium kaya akan lipid, yang terdiri dari asam mikolat (asam lemak rantai panjang C78-C90), lilin, dan fosfat. Di dalam sel, lipid banyak terikat dengan protein dan polisakarida. Muramil dipeptida (dari peptidoglikan) yang membuat kompleks dengan asam mikolat dapat menyebabkan granuloma, fosfolipid penginduksi nekrosis kaseosa. Lipid

dalam beberapa hal juga bertanggung jawab atas sifat tahan asamnya. Strain virulen basil tuberkel membentuk “*serpentine cords*” mikroskopi, pada bentuk ini basil tahan asam tersusun dalam untai paralel. Pembentukan *cord* bergantung pada virulensi. Faktor *cord* menghambat migrasi leukosit, menyebabkan granulomakronis, dan dapat berfungsi sebagai “*adjuvant imunologi*” (5).

Setiap tipe mikobakterium memiliki beberapa protein yang membangkitkan resistensi tuberkulin. Protein berikatan dengan wax fraction can, setelah injeksi, akan menginduksi sensitivitas tuberkulin dan merangsang pembentukan berbagai antibodi (5). Mikobakterium mengandung berbagai polisakarida yang dapat menginduksi hipersensitifitas tipe cepat (5).

2.4 Metabolisme *Mycobacterium tuberculosis* pada hospes

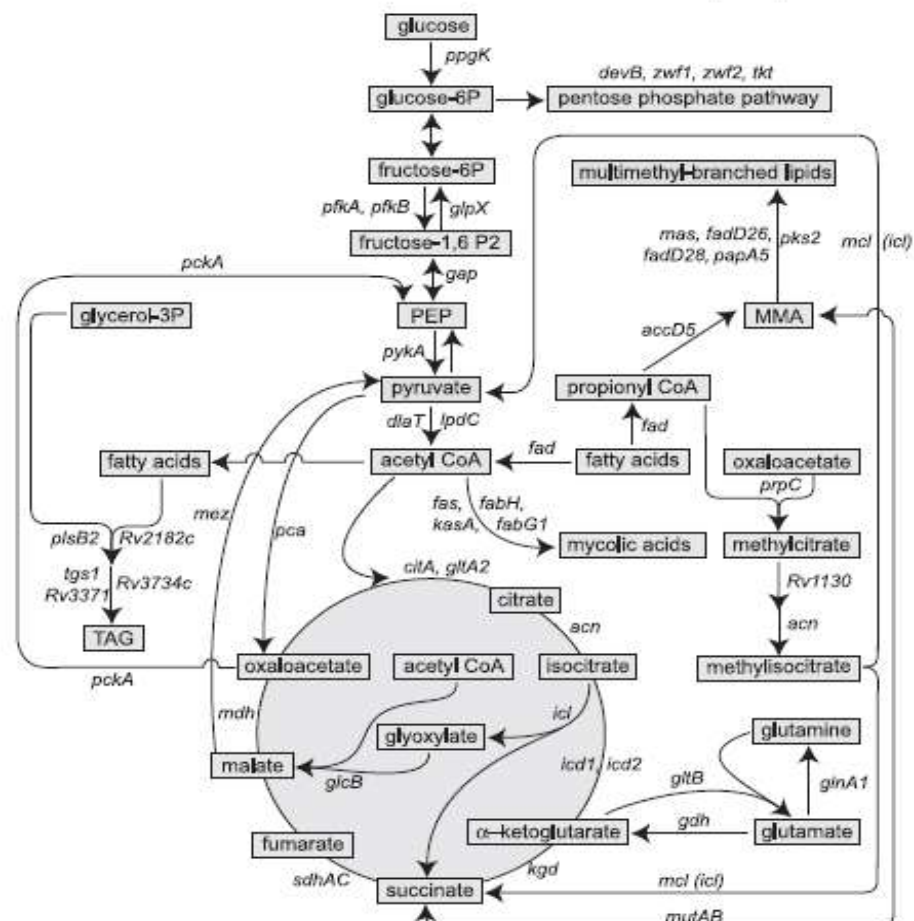
Mekanisme regulasi redoks selama aktivasi dan diferensiasi fagosit mononuclear, tahap kritis selular dalam imunitas bawaan, dan kejelasan microbial pada MTB belum sepenuhnya dipahami. Sebuah intermediet penting dalam *GSH (Gluthation)-based redox metabolism* adalah homosistein, yang dapat menghasilkan transmetilasi via *Methionine Synthase (MS)* atau transsulfurasi via *Cystathionine Beta-Synthase (CBS)*.

Ekspresi dari CBS dan MS dengan kuat terinduksi selama diferensiasi monosit dan masing-masing teregulasi pada fase transkripsi dan posttranskripsi. Perubahan pada ekspresi enzim masing-masing mendekati 150% pada S-adenosilmetionin (disertai dengan peningkatan metilasi fosfolipid) dan peningkatan serupa pada GSH. Aktivasi dengan lipopolisakarida atau infeksi *Mycobacterium smegmatis* mengurangi ekspresi kedua enzim untuk meningkatkan dan menurunkan konsentrasi S-adenosilmetionin secara signifikan sekitar 30% dari nilai kontrol sedangkan GSH dan sistein konsentrasinya meningkat masing-masing sekitar 100 dan 300% pada fagosit mononuklear (25).

MTB diprediksi dapat mengganti sumber karbon ke jalur alternatif selama menetap dalam tubuh manusia. Katabolisme asam lemak yang rumit dan berantai

cabang, asam amino berantai cabang, dan kolesterol menghasilkan propionilkoenzim A (CoA) sebagai terminal. Produk C3, metilmalonil memungkinkan adanya siklus glioksilat selama infeksi. Siklus glioksilat dan metilsitrat ini mendukung pertumbuhan MTB pada asam lemak heptadekanoat yang berkembang dalam valerat (26).

Sejalan dengan hipotesis bahwa glukosa mungkin tidak terdapat pada MTB *in vivo*, level *pckA* mRNA yang diteliti pada tikus yang diinduksi MTB pascainfeksi meningkat. Sebaliknya level *pcaM* RNA menunjukkan bahwa asam lemak adalah sumber karbon yang dominan digunakan oleh MTB selama infeksi(28). Kolesterol masuk dari makrofag ke MTB melalui Mce4 transport system(29).



Gambar 5. Jalur metabolisme sentral dan lemak pada MTB (30)

BAB III METODE PENULISAN

3.1 Sifat Penulisan

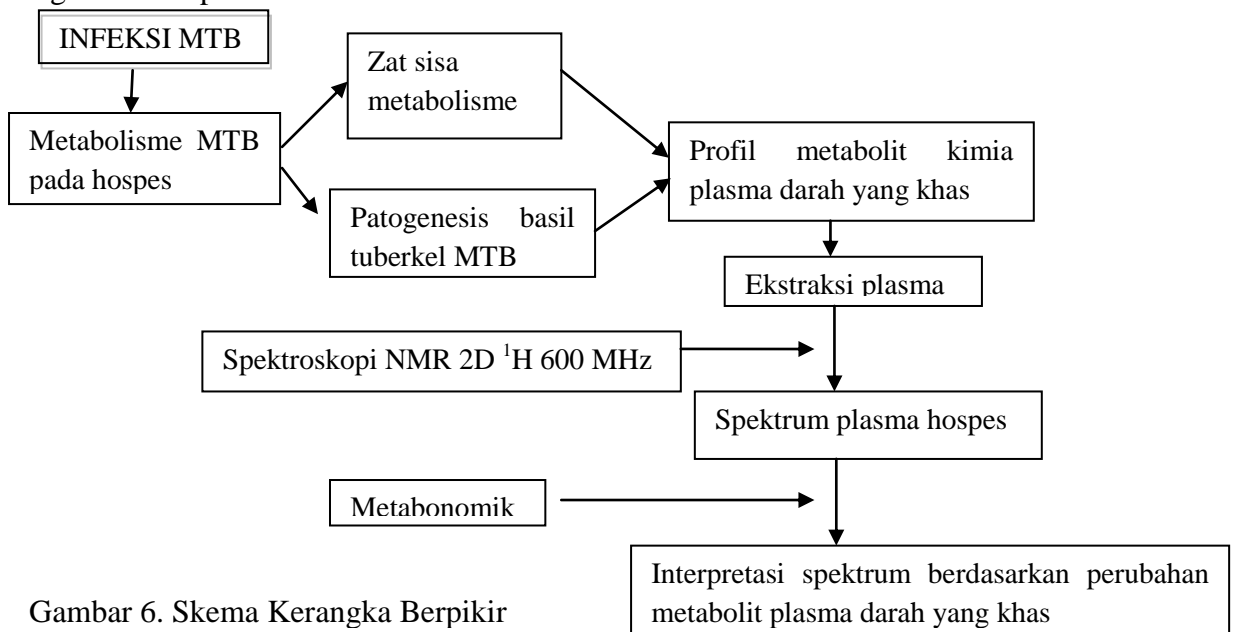
Karya tulis ini bersifat kajian pustaka yang menjelaskan mekanisme kerja spektroskopi NMR 2D ^1H 600 MHz berbasis metabonomik pada plasma darah sebagai alat diagnostik potensial TB paru pada anak yang cepat dan spesifik.

3.2 Metode Perumusan Masalah

Perumusan masalah ditentukan berdasarkan patogenesis infeksi MTB dan efek zat sisa metabolisme MTB yang dikeluarkan ke dalam plasma darah, sehingga menimbulkan profil metabolit kimia plasma darah yang khas pada pasien yang telah terinfeksi MTB. Ruang lingkup permasalahan terletak pada mekanisme kerja NMR 2D ^1H 600 MHz berlandaskan metabonomik sehingga dapat menjadi teknologi alternatif sebagai alat diagnostik potensial TB paru pada anak yang cepat dan spesifik

3.3 Kerangka Berpikir

Kerangka berpikir yang digunakan dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini digambarkan pada skema berikut:



Gambar 6. Skema Kerangka Berpikir

3.4 Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data dalam penulisan ini dilakukan dengan metode studi pustaka (*literature review*) berdasarkan permasalahan, baik melalui informasi digital maupun non digital, sumber pustaka tersebut berupa jurnal-jurnal kesehatan, buku ajar atau referensi pustaka, referensi penunjang, dan informasi internet.

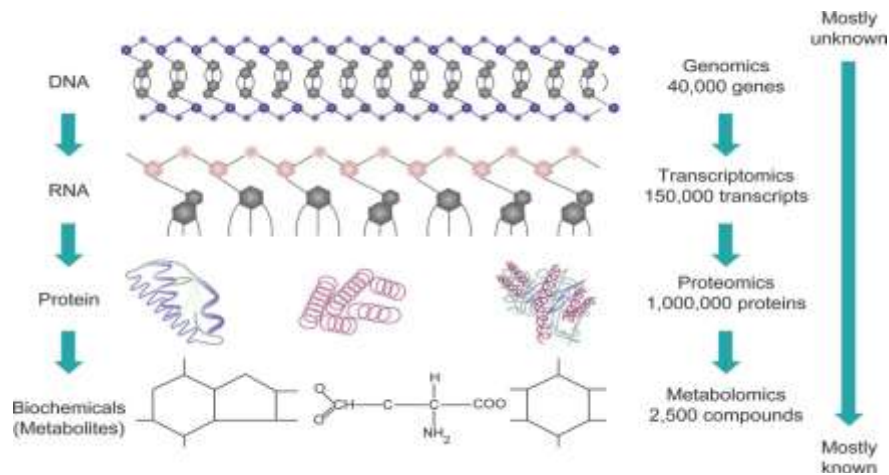
3.5 Metode Analisis dan Pemecahan Masalah

Metode analisis data pustaka dilakukan melalui dua pendekatan, yaitu: metode eksposisi, yaitu dengan memaparkan data dan fakta yang ada sehingga pada akhirnya dapat dicari korelasi antara data-data tersebut dan metode analitik, yaitu melalui proses analisis data atau informasi dengan memberikan argumentasi melalui berpikir logis dan yang selanjutnya diambil suatu kesimpulan.

BAB IV ANALISIS DAN SINTESIS

4.1. Kajian Diagnostik Molekuler pada Penyakit TB Paru Anak

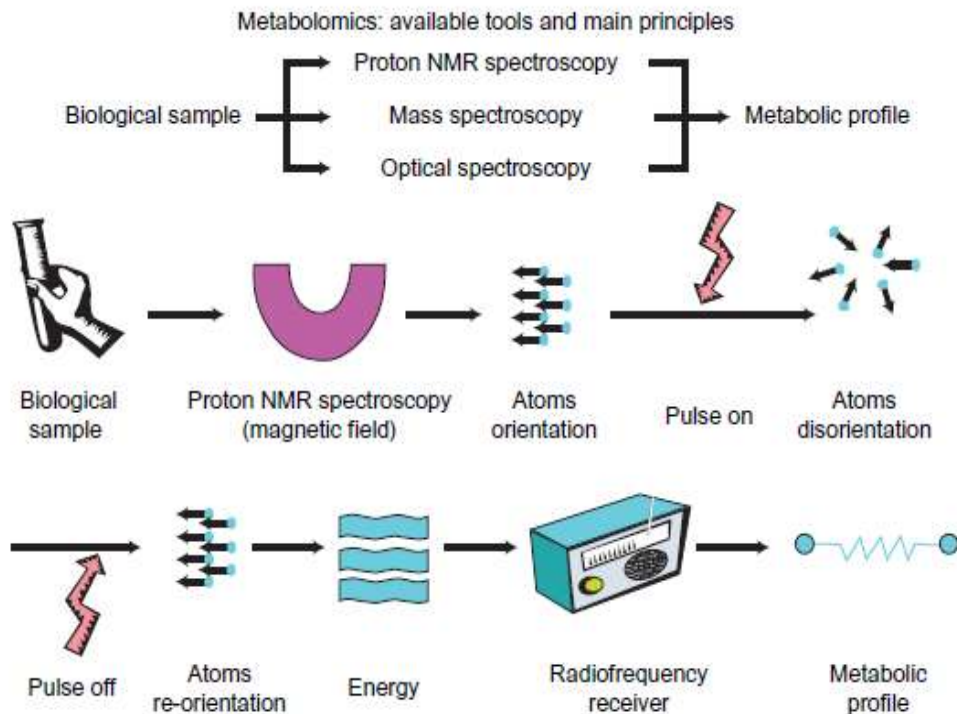
Dogma ini adalah suatu kerangka kerja untuk memahami tahap pengiriman informasi sekuensial antara informasi sekuensial-membawa biopolimer pada kebanyakan organisme. Ada tiga kelas besar biopolimer: DNA, RNA, dan protein, (lihat pada gambar 7). Dewasa ini, kajian biologi molekuler sangat berkembang pesat di kalangan klinisi, beberapa penerapannya seperti pemakaian teknologi berbasis DNA sebagai alat *screening* genetik dan teknologi diagnostik berbasis metabonomik seperti penggunaan spektroskopi NMR sebagai alat diagnostik TB paru pada anak.



Gambar 7. Dogma sentral biologi molekuler (18)

Sampel biologi yang digunakan dalam analisis spektroskopi NMR pada penyakit TB paru anak adalah cairan tubuh, hal ini dikarenakan selama infeksi metabolisme MTB terbukti dapat mempengaruhi komposisi metabolit dalam cairan tubuh, seperti plasma darah, cairan serebrospinal, dan urin sehingga dapat membentuk profil metabolit yang khas. Ilmu yang mempelajari komposisi tidak normal metabolit dalam cairan tubuh yang disebabkan karena berbagai stimulus biologi atau manipulasi genetik disebut metabonomik. Profil metabolit yang khas ini dapat diinterpretasi dengan strategi klasifikasi statistik komputerisasi hanya

dalam hitungan menit (lihat pada gambar 8). Analisis data yang kompleks ini didapatkan dengan menggunakan spektroskopi NMR dan terbukti sangat spesifik untuk diagnosis.



Gambar 8. Langkah-Langkah spektroskopi NMR dalam memberikan Interpretasi Profil Metabolit Plasma Darah (18)

4.2. Perbandingan Metode Diagnosis Molekuler Analisis Profil Metabolit pada TB Paru Anak

Sebelumnya telah dipaparkan bahwa TB paru pada anak masih menjadi masalah utama infeksi anak di Indonesia, namun sampai saat ini penegakan diagnosisnya masih sulit, walaupun ada cara diagnosis yang tepat seperti kultur jaringan atau tes tuberkulin, akan menghabiskan waktu yang sangat lama. Padahal pengobatan yang adekuat harus segera diberikan agar tidak terjadi komplikasi berat dan *reccurent infection* pada dewasa.

Oleh karena itu, teknologi diagnosis berbasis biologi molekuler terus diperluas dan dikaji lebih dalam. Salah satunya adalah metode analisis profil metabolit yang biayanya sangat hemat daripada metode deteksi biomarker yang

lain. Akhir – akhir ini, tiga teknik tersedia untuk menganalisis metabolisme sampel biologi, yakni spektroskopi NMR, spektroskopi massa dan spektroskopi optik. Spektroskopi massa menampilkan pemisahan komponen metabolit menggunakan gas kromatografi, namun spektroskopi NMR adalah teknologi yang paling sering digunakan pada penelitian profil metabolit karena dapat menghasilkan informasi rinci seperti struktur molekular dan konsentrasi dari molekular metabolit yang dinamis hanya dalam hitungan menit.

Dari semua metode spektroskopi, NMR merupakan satu-satunya alat yang menawarkan analisis dan interpretasi lengkap dari seluruh spektra yang diujikan. NMR dapat memberikan informasi yang akurat walaupun sampel yang digunakan hanya seberat satu miligram.

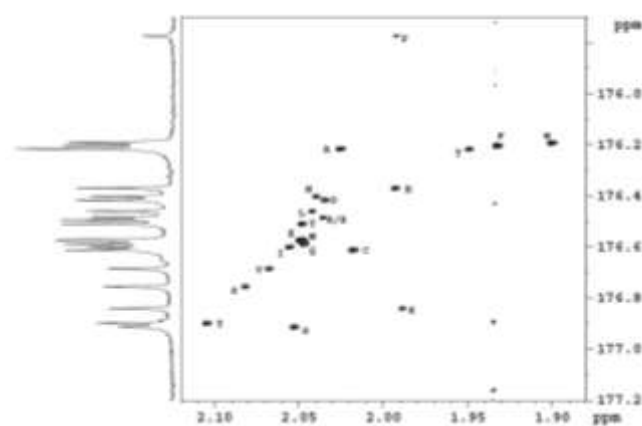
Walaupun teknik gelombang *echo* sering digunakan untuk menginterpretasi spektrum $^1\text{H-NMR}$ dari serum atau sampel plasma, teknik gelombang *echo* tidak dapat menganalisis metabolitnya secara kuantitatif. Prosedur standar untuk menganalisis plasma yang deproteinisasi adalah menggunakan spektroskopi NMR. Deteksi batasan berbagai metabolit berkisar antara 2 dan 40 $\mu\text{mol/L}$. Metode yang dianjurkan untuk menganalisis secara kuantitatif komponen metabolit, termasuk *betaine* dan *dimethylglycine* yang tidak dapat dihitung secara mudah oleh teknik lain yang serupa. Untuk laktat, tirosin, treonin, dan alanin, spektroskopi NMR dapat menampilkan hasil yang berkorelasi dengan baik dengan hasil yang telah ditampilkan. Sudah sangat jelas, bahwa teknologi diagnosis berbasis biologi molekular spektroskopi NMR memiliki potensi yang sangat besar sebagai alat diagnostik baru yang cepat dan tepat, khususnya dalam mendiagnosis TB paru pada anak.

Dengan menggunakan teknik diagnostik ini, rentetan pemeriksaan diagnostik lain yang memakan waktu yang lama dalam penegakan diagnosis TB paru pada anak tidak diperlukan lagi. Risiko radiasi sinar x pada anak juga dapat dihindari karena pemeriksaan radiologis tidak dilakukan, resolusinya juga sangat baik, dapat mendeteksi penyakit lebih cepat, *chemical shift mapping*, dan dinamisasi molekul-analisis *conformational*.

4.3. Kemampuan Aplikasi Spektroskopi NMR ^1H 600 MHz berbasis Metabonomik

Spektroskopi NMR merupakan sebuah terobosan baru dalam bidang teknologi diagnostik berbasis biologi molekuler. Dengan memanfaatkan kemampuan inti atom yang dapat bereaksi seperti magnet kecil dan dipengaruhi pula medan magnet dari luar, maka energi inti dalam molekul akan berubah ketika diiradiasi dengan sinyal frekuensi radio sebesar 600 MHz. Perubahan energi tersebut dapat diukur dan ditampilkan sebagai spektrum NMR. Interpretasi spektrum NMR ini dilakukan berdasarkan pemahaman metabonomik, yakni ilmu yang mempelajari perubahan metabolit abnormal cairan tubuh

Telah disebutkan dalam telaah pustaka bahwa derivatisasi sebuah sampel yang mengandung 20 asam amino dapat dideteksi menggunakan NMR 1D dan 2D. Derivatisasi menggunakan NMR 1D memiliki sensitivitas mendekati 100% dan pendekatan ini menghasilkan spektrum yang lebih sederhana pada NMR 1D, namun dengan menggunakan NMR 2D (lihat pada gambar 9) didapatkan sensitivitas yang lebih tinggi ketika dibandingkan dengan spektrum HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) asam amino immodifikasi.



Gambar 9. Derivatisasi sebuah sampel dengan NMR 2D (22)

NMR 2D HSQC memberikan resolusi spektrum dan sensitivitas yang mencukupi untuk mendapatkan spektra yang baik dari cairan tubuh. Pendekatan ini memberikan kemungkinan indentifikasi dan kuantifikasi asam amino dan

kelompok metabolit target lain dalam sampel tanpa pemisahan. Pendekatan ini sejalan dengan persyaratan metode skrining cepat lainnya yang menggunakan cairan tubuh seperti urin dan serum dalam mendiagnosis penyakit. Spektrogram urine/serum didapatkan dalam waktu 10 menit. Kegunaan dari spektroskopi NMR 2D adalah untuk menyebarkan resonansi yang tumpang tindih ke dalam dimensi dua karena spektroskopi NMR 2D dapat mengidentifikasi molekul yang lebih kecil daripada NMR 1D.

Ada dua macam spektroskopi NMR yang sering digunakan untuk mendiagnosis penyakit, yakni NMR ^1H (hidrogen) dan ^{13}C (karbon). Namun, spektroskopi NMR ^{13}C lebih tidak sensitif bila dibandingkan dengan ^1H , hal ini dikarenakan ketersediaan inti atom alamnya yang sangat sedikit (1,1 %) dan rasio giromagnetiknya yang juga sangat rendah. Oleh karena itu, spektroskopi NMR ^1H lebih sering digunakan. Frekuensi spektrometer yang digunakan dalam 2D spektroskopi NMR ^1H berkisar antara 500 MHz – 600 MHz. Lalu, tampilan *fingerprint* metabolik sampel muncul dalam tiga sampai lima belas menit kemudian dengan sensitivitas yang relatif tinggi. Kenaikan resolusi spektrum terdapat pada frekuensi gelombang yang lebih besar. Oleh karena itu, akan lebih baik bila menggunakan frekuensi gelombang yang lebih besar, yakni 600 MHz.

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya dalam telaah pustaka, sampel yang dapat digunakan dalam spektroskopi NMR adalah plasma darah, cairan serebrospinal, atau urin. Sebelumnya telah ditunjukkan perbandingan efektivitas antara plasma darah, cairan serebrospinal, dan urin dalam aplikasi spektroskopi NMR. Disebutkan bahwa plasma darah lebih efektif digunakan sebagai sampel dalam diagnostik TB paru pada anak karena komposisi metabolit dalam plasma darah sangat stabil dan tidak jauh berbeda dari cairan serebrospinal. Hal ini makin menguatkan, karena komposisi metabolit dalam urin yang tidak stabil berkaitan dengan asupan nutrisi setiap orang yang berbeda-beda dan pengambilan cairan serebrospinal pada anak akan sangat sulit dilakukan berkaitan dengan *informed consent*.

4.4 Analisis Profil Metabolit Khas pada Penderita TB

Seperti yang telah dipaparkan pada bagian telaah pustaka bahwa salah satu tanda adanya kehidupan MTB adalah kemampuan patogen untuk beralih ke respon replikatif atau non-replikatif dalam menanggapi imunitas hospes/sel inang yang terlibat pada jalur pusat dan lipid. Metabolisme menunjukkan adanya *re-routing* aliran karbon terkait dengan pertumbuhan bakteri pada paru. *Re-routing* karbon ditandai dengan peralihan dari jalur metabolisme yang menghasilkan energi dan prekursor biosintesis ke jalur penyimpanan sintesis senyawa.

Percobaan menggunakan cairan semen menunjukkan bahwa basil tuberkel, yang metabolismenya fleksibel, kebanyakan memanfaatkan asam lemak sebagai sumber karbon dan energi selama infeksi. Konsep pemanfaatan ini mungkin karena peningkatan ketersediaan lipid dalam sel inang yang terinfeksi. Pengamatan lain menunjukkan sumber karbon beralih dari gula dari asam lemak selama fase infeksi persisten. Selain itu, basil tuberkel diperoleh dari sputum penderita tuberkulosis yang kaya triasilgliserol (TAG) yang merupakan tempat penyimpanan lipid utama (28)

Ada dua aspek metabolisme karbon basil tuberkel, salah satunya adalah metabolisme jalur pusat, yang menyediakan energi, mengurangi tenaga dan prekursor biosintesis dan yang kedua adalah jalur biosintesis lipid utama, seperti komponen dinding sel mikobakteri, yang merupakan area keluar masuknya prekursor energi dan biosintesis dan TA. Dalam hal ini, siklus PropCoA dikonversi menjadi piruvat melalui tiga kegiatan enzimatik spesifik, sintesis metilsitrat (prpC), metilsitrat dehidratase (prpD) dan liase 2-metil-isositrat (ICL). (30).

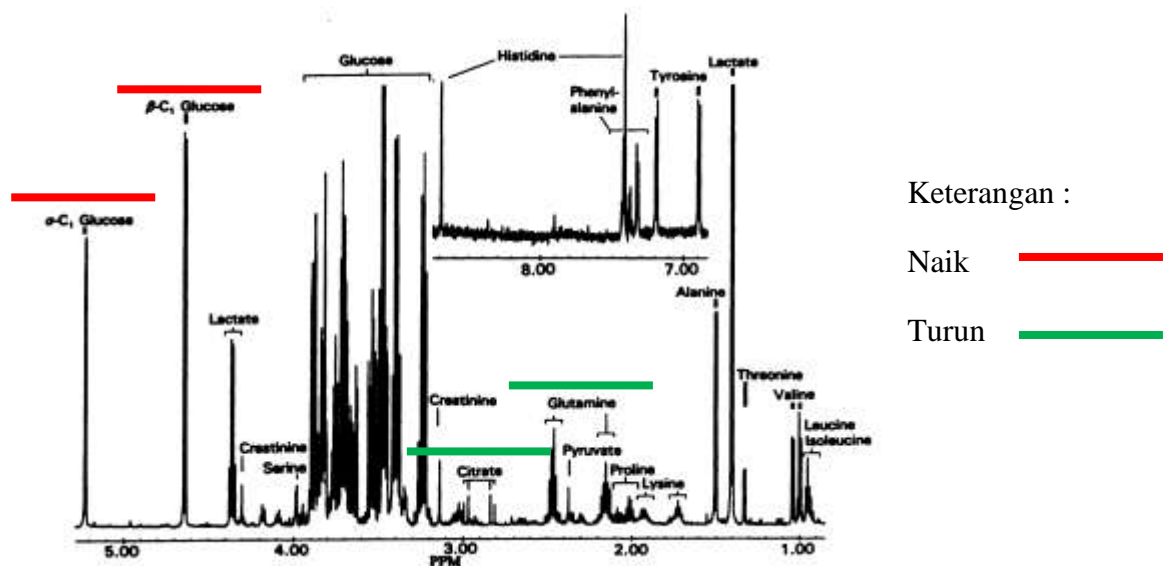
Fluks sepanjang pirau meningkat karena isositrat liase adalah enzim kunci dalam siklus TCA/transisi pirau glioksilat (Walsh dan Koshland, 1985). Dengan demikian, rasio poli-L-glutamat dan poli-L-glutamin pada dinding sel MTB meningkat. Karbon dari PropCoA diarahkan untuk pembentukan piruvat melalui siklus metilsitrat. Selain jalur di atas, piruvat terbentuk melalui *upregulation* bersama dari glikolitik fosfofruktokinase (pfkB) dan *downregulation* dari

glukoneogenik bisfosfatase fruktosa 1,6-(glpX), yang akan menghambat tahap akhir glukoneogenesis. Jadi, fluks karbon selama pertumbuhan MTB diperkirakan akan menuju ke produksi senyawa C3 fosfoenolpiruvat dan piruvat.

Perubahan pada ekspresi enzim dalam bakteri mendekati 150% pada S-adenosilmetionin (disertai dengan peningkatan metilasi fosfolipid) dan peningkatan serupa pada glutathionin (GSH). Aktivasi dengan lipopolisakarida atau infeksi Mikobakterium mengurangi ekspresi enzim untuk meningkatkan dan menurunkan konsentrasi S-adenosilmetionin secara signifikan sekitar 30% dari nilai kontrol sedangkan GSH dan sistein konsentrasinya meningkat masing-masing sekitar 100 dan 300% pada fagosit mononuklear.

Siklus glioksilat dan metilsitrat mendukung pertumbuhan MTB pada asam lemak heptadekanoat yang berkembang dalam valerat. Sejalan dengan hipotesis bahwa glukosa mungkin tidak terdapat pada MTB *in vivo*, level *pckA* mRNA yang diteliti pada tikus yang diinduksi MTB pascainfeksi meningkat. Sebaliknya level *pcaM* RNA menunjukkan bahwa asam lemak adalah sumber karbon yang dominan digunakan oleh MTB selama infeksi.

Berdasarkan analisis di atas, maka dapat disimpulkan kemungkinan profil metabolit khas dalam interpretasi spektra NMR penderita TB. (lihat gambar 10)



Gambar 10. Analisis kemungkinan spektra NMR TB Paru pada Anak (7)

BAB V

PENUTUP

5.1. Simpulan

- 5.1.1 Metabolisme MTB selama infeksi telah diamati dan ternyata basil tuberkel yang mengandung banyak komponen zat kimia di dalamnya bermetabolisme secara fleksibel selama infeksi terjadi
- 5.1.2 Perubahan metabolisme MTB, khususnya metabolisme basil tuberkel MTB terbukti dapat berpengaruh pada konsentrasi metabolit dalam cairan tubuh hospes sehingga menciptakan profil metabolit yang khas pada penderita TB, seperti peningkatan glukosa dan β -glukosa serta penurunan *citrate* dan glutamin.
- 5.1.3 Analisis data profil metabolit pada darah diinterpretasi menggunakan statistik komputerisasi dengan alat spektroskopi NMR dan telah terbukti pada berbagai penelitian terdahulu memiliki efektivitas dan spesivitas yang sangat tinggi dalam penegakan diagnosis penyakit.
- 5.1.4 Spektroskopi NMR 2D ^1H 600 MHz berbasis metabonomik dapat bekerja berdasar pada kemampuan inti atom ^1H untuk bereaksi seperti magnet kecil dan ketika diradiasi dengan sinyal frekuensi radio 600 MHz inti dalam ^1H akan berubah. Energi frekuensi yang terjadi dapat diukur dan ditampilkan sebagai spektrum NMR yang spesifik
- 5.1.5 Spektroskopi NMR (NMR) 2D ^1H 600 MHz berbasis metabonomik sangat berpotensi untuk diaplikasikan sebagai alat diagnostik cepat dan spesifik TB paru pada anak.

5.2. Saran

Karya tulis ini, mengenai potensi spektroskopi NMR 2D ^1H 600 MHz berbasis metabonomik sebagai alat diagnostik cepat dan spesifik TB paru pada anak, diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan alternatif diagnostik TB paru pada anak dan menjadi dasar teori bagi penelitian selanjutnya untuk

menentukan nilai kuantitatif setiap perubahan metabolit plasma darah pada penderita TB paru.

Sebagai penutup, penulis mengajak pemerintah, para pekerja kesehatan, pemerhati IPTEK, akademisi, pengusaha, dan seluruh komponen masyarakat Indonesia untuk mulai meningkatkan perhatiannya pada perkembangan diagnostik molekuler seperti teknologi spektroskopi NMR 2D ^1H 600 MHz berbasis metabonomik pada plasma darah. Teknologi ini diharapkan menjadi alternatif dalam upaya meningkatkan kualitas hidup dan pemanfaatan sumber daya manusia menuju peningkatan taraf kesehatan masyarakat Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kelompok Kerja TB Anak Depkes-IDAI. *Diagnosis dan Tatalaksana Tuberkulosis Anak*. Departemen Kesehatan RI, 2008.
2. Wright CA, Van der Burg M, Geiger D, Noordzij JG, Burgess SM, Marais BJ. *Diagnosing Mycobacterial Lymphadenitis In Children Using Fine Needle Aspiration Biopsy: Cytomorphology, ZN Staining and Autofluorescence-making more of less* [abstract]. [cited 2009 August 14] . Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452909>
3. Samik, Wahab dkk. 2000. *Ilmu Kesehatan Anak Nelson ed. 15 vol 2*. Jakarta: EGC. Hal. 1028-1031.
4. Staf Pengajar Ilmu Kesehatan Anak FKUI. 1997. *Buku Kuliah 2 Ilmu Kesehatan Anak*. Jakarta: Bagian Ilmu Kesehatan Anak FKUI. Hal. 573-584.
5. Brooks, Geo F., Janet S. Butel, Stephen A. Morse. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz*. Jakarta: EGC. Hal.325-332
6. Willker, Wieland and Dieter Leibfritz. 2006. *NMR applications of bodyfluid metabonomics*.
7. Clinical Chemistry, Vol 40, 1245-1250. *High-resolution 1H-NMR spectroscopy of blood plasma for metabolic studies*.
8. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2006. *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis*.
9. Udoh, M et al. 2009. *Pathogenesis and morphology of tuberculosis*. Benin Journal of Postgraduate Medicine. 2009; 11: 91-6.
10. Chocano-Bedoya P, Ronnenberg AG. *Vitamin D and tuberculosis*. Nutrition Reviews. 2009;67(5):289–93.
11. Supriyatno Hb. 1999. *Strategi Penanggulangan TB anak*. Simposium dan semiloka Tuberkulosis terintegrasi RSUP Persahabatan Jakarta.
12. U Himmelreich et al. *Rapid etiological classification of meningitis by NMR spectroscopy based on metabolite profiles andhospes response*. PLoS ONE (2009) 4:e5328

13. Free Radical Chemistry Biotechnology. 2000. *Teacher Notes on: NMR Spectroscopy*
14. Robertson DG. 2005. *Metabonomics in toxicology : a review*. Toxicol.sci.85 (2 : 809-822)
15. Laura K. Schnackenberg, Richard D. 2007. *Metabolomic biomarkers: their role in the critical path*.
16. Wang Yulan et al. 2008. *Global metabolic responses of mice to Trypanosoma brucei brucei infection*. PNAS April 22, 2008 vol. 105 no. 16 6127-6132
17. Carrola Joana et al. 2010. *Metabolic Signatures of Lung Cancer in Biofluids: NMR-Based Metabonomics of Urine* J. Proteome Res. 2010, 10 (1), pp 221–230
18. Whitehead, Tracy L. dan Thomas Kieber-Emmons. *Applying in vitro NMR spectroscopy and 1H NMR metabonomics to breast cancer characterization and detection* Progress in NMR Spectroscopy. 47 (2005) 165–174
19. Hove, Michiel ten dan Stevan Neubauer. *Evaluating metabolic changes in heart disease by magnetic resonance spectroscopy* Heart Metab. 2006; 32:18-21
20. Free Radical Chemistry Biotechnology. 2000. *Teacher Notes on: NMR Spectroscopy*.
21. Shanaiah et al. 2007. *Class selection of amino acid metabolites in body fluids using chemical derivatization and their enhanced ¹³C NMR*. PNAS July 10, 2007 vol. 104 no. 28 11540–11544 2D HSQC
22. Misra, Divya dan Usha Bajpai. *Metabolite Characterization in Serum Samples from Normal Healthy Human Subjects by ¹H and ¹³C NMR Spectroscopy*. Bull. Chem. Soc. Ethiop. 2009, 23(2), 211-221.
23. William J. Griffiths. *Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling*. 2006
24. Ellenby, Miles., Tegtmeyer, Ken., Lai, Susanna., and Braner, Dana. 2006. *Lumbar Puncture*. The New England Journal of Medicine. 12 : 355

25. Garg S, Vitvitsky V, Gendelman HE, Banerjee R. 2006. *Monocyte differentiation, activation, and mycobacterial killing are linked to transsulfuration-dependent redox metabolism.* J Biol Chem. 2006 Dec 15;281(50):38712-20
26. Savvi S, Warner DF, Kana BD, McKinney JD, Mizrahi V, Dawes SS. 2008. *Functional characterization of a vitamin B12-dependent methylmalonyl pathway in MTB: implications for propionate metabolism during growth on fatty acids.* J Bacteriol. 2008 Jun;190(11):3886-95.
27. Crick F (August 1970). *Central dogma of molecular biology.* Nature 227 (5258): 561–3.
28. Juliano Timm et al. 2003. *Differential expression of iron-, carbon-, and oxygenresponsive mycobacterial genes in the lungs of chronically infected mice and tuberculosis patients.* PNAS November 25, 2003 vol. 100 no. 24 14321–14326
29. Miner, Maurine D et al. 2009. *Role of cholesterol in MTB infection.* Indian Journal of Experimental Biology Vol. 47, June 2009, pp. 407-411
30. L. Shi et al. 2010. *Carbon flux rerouting during MTB growth arrest.* Molecular Microbiology (2010): 1-17