

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Infeksi Respiratori Akut bagian Bawah

Infeksi respiratori akut bagian bawah adalah penyakit infeksi yang mengenai sistem respiratori mulai dari laring ke bawah yang terdiri dari epiglottitis, *croup* (laringitis, trakeitis, dan bronkitis), bronkiolitis, dan pneumonia. Kelompok penyakit ini cukup sering terjadi pada balita. Dua penyakit IRA-B terbanyak adalah bronkiolitis dan pneumonia.

2.1.1 Bronkiolitis

Bronkiolitis adalah inflamasi bronkiolus terminalis yang umumnya disebabkan oleh virus dengan karakteristik adanya mengi (Ali dkk., 2012). Penyakit ini umumnya mengenai anak usia di bawah 2 tahun dengan puncak pada usia dua sampai delapan bulan. Sekitar 69% terjadi pada bayi (usia di bawah satu tahun) dan sekitar 95% terjadi pada usia di bawah 2 tahun (Wright dkk., 2002). Bronkiolitis lebih sering mengenai jenis kelamin laki-laki daripada perempuan dengan rasio antara 1,25-1,50:1 (Wright dkk., 2002; DeNicola dkk., 2013). Penyakit ini terjadi sepanjang tahun dengan puncak pada musim dingin, musim gugur atau musim hujan (Watts dan Goodman, 2011; Ali dkk., 2012). Penularan terutama melalui kontak langsung dengan sekresi nasal, dan relatif aman bila jarak dengan penderita lebih dari 6 kaki. Masa inkubasi bronkiolitis yang disebabkan oleh RSV berkisar antara 4-6 hari (Wright dkk., 2002). Cuci tangan setelah kontak

dengan penderita merupakan hal yang sangat penting untuk mencegah penularan (Watts dan Goodman, 2011).

Gejala bronkiolitis dimulai dari gejala-gejala IRA-A seperti pilek encer, hidung tersumbat, demam sumer-sumer (kecuali ada infeksi sekunder oleh bakteri), kemudian dalam 2-3 hari disusul oleh gejala-gejala IRA-B seperti batuk, takipne, sesak napas, mengi, minum berkurang, apne, dan sianosis. Mengi merupakan mengi yang pertama kali dialami oleh penderita. Pada pemeriksaan fisik dapat dijumpai napas cuping hidung, sianosis sentral, retraksi dinding dada, hiperinflasi dada, *expiratory effort*, ekspirasi memanjang, terdengar *crackles* pada akhir inspirasi/ekspirasi, dan mengi (Zorc dan Hall, 2010; Watts dan Goodman, 2011; Ali dkk., 2012).

Pada pemeriksaan penunjang foto *Rontgen* dada dapat ditemukan hiperaerasi paru, penebalan peribronkial, infiltrat interstisial, atau *patchy atelectasis* (Watts dan Goodman, 2011; Ali dkk., 2012). Sekitar 10% foto *Rontgen* dada terlihat normal. Tidak ada korelasi antara beratnya klinis dengan temuan pada foto *Rontgen* dada. Hasil pemeriksaan darah tepi, tidak khas. Pemeriksaan *pulse oxymetri* dapat membantu menentukan derajat hipoksia dan respon terhadap terapi oksigen. Analisis gas darah dipakai untuk menilai beratnya gawat napas serta adanya ancaman gagal napas (Wright dkk., 2002).

Terdapat beberapa faktor risiko terjadinya bronkiolitis antara lain adanya BKB (Watts dan Goodman, 2011; Ali dkk., 2012), jenis kelamin laki-laki Wright dkk., 2002; Watts dan Goodman, 2011; DeNicola dkk., 2013), usia lebih muda,

tidak mendapat ASI, paparan asap rokok, hunian yang padat, dan dititip di TPA (Watts dan Goodman, 2011).

Diagnosis bronkiolitis ditegakkan secara klinis yaitu ditemukan adanya manifestasi klinis IRA-A seperti pilek, bersin, batuk, demam sumer-sumer, disusul dengan manifestasi klinis IRA-B seperti takipne, napas cuping hidung, retraksi dinding dada, fase ekspirasi memanjang, *overdistensi* dinding dada, merintih, terdengar mengi, serta kadang-kadang hati teraba karena terdorong oleh diafragma ke bawah. Pemeriksaan penunjang dapat mengkonfirmasi diagnosis dan memprediksi perjalanan penyakit (Zain, 2008; Watts dan Goodman, 2011; Ali dkk., 2012).

Penatalaksanaan bronkiolitis bersifat suportif berupa oksigenasi dan nutrisi/hidrasi yang adekuat (Watts dan Goodman, 2011; Ali dkk., 2012) serta nebulisasi salin hipertonik (Zhang dkk., 2008), dan memantau terjadinya komplikasi. Pemberian bronkodilator dan kortikosteroid masih kontroversi (Zorc dan Hall, 2010; Watts dan Goodman, 2011; Ali dkk., 2012).

2.1.2 Pneumonia

Pneumonia adalah inflamasi parenkim paru yang dihubungkan dengan konsolidasi ruang alveoli. Dua penyebab terbanyak adalah virus dan bakteri (Sandora dan Sectish, 2011; Crowe, 2012; Marostica dan Stein, 2012; Rudan dkk., 2013). Ada beberapa faktor risiko pneumonia antara lain BBLR, ASI tidak eksklusif, hunian yang padat, polusi udara di dalam umah, status imunisasi, malnutrisi, defisiensi imun (Jackson dkk., 2013), umur, BKB, PJB, musim,

terpapar asap rokok atau asap kayu api, dititip di TPA (Crowe, 2012), asma (Sectish dan Prober, 2004; Carroll dkk., 2007), palsy serebral (Sectish dan Prober, 2004), dan defisiensi vitamin A (Mayo-Wilson dkk., 2011).

Manifestasi klinik pneumonia berupa gejala/tanda IRA-A yang dalam beberapa hari disusul dengan gejala/tanda IRA-B. Berdasarkan berat penyakit, Organisasi Kesehatan Sedunia membagi pneumonia menjadi 3 yaitu (Bryce dkk., 2005):

- a. Pneumonia (ringan), bila dijumpai batuk atau sesak napas dan napas cepat (takipne) dan pada auskultasi terdengar adanya *rales/crackles*, suara napas menurun, atau suara napas bronkial. Seorang anak dikatakan napas cepat bila frekuensi napas: [1] usia < 2 bulan: ≥ 60 kali/menit, [2] usia 2-12 bulan: ≥ 50 kali/menit, [3] usia 1-5 tahun: ≥ 40 kali/menit.
- b. Pneumonia berat, bila dijumpai gejala/tanda pneumonia ringan disertai salah satu dari berikut seperti retraksi, merintih, atau napas cuping hidung (NCH).
- c. Pneumonia sangat berat, bila dijumpai gejala/tanda pneumonia berat disertai salah satu dari berikut seperti sianosis sentral, tidak bisa minum, muntah, kejang-kejang, letargi, kesadaran menurun, atau adanya anggukan kepala.

Penatalaksanaan pneumonia berat dan sangat berat adalah rawat inap dengan perawatan suportif (pemberian oksigen dan nutrisi enteral/parenteral), pemberian antibiotik secara empiris berdasarkan kelompok usia, serta pada kasus-

kasus tertentu diperlukan tindakan bedah (Sandora dan Sectish, 2011; Marostica dan Stein, 2012).

2.2 Peranan Faktor Inang, Penyebab, dan Lingkungan Terhadap Kejadian IRA-B (Bronkiolitis dan Pneumonia)

Seperti umumnya dalam hal terjadinya suatu penyakit, terjadinya IRA-B tidak lepas dari peranan faktor inang, penyebab, dan lingkungan.

2.2.1 Peranan faktor inang terhadap kejadian IRA-B

Beberapa faktor inang yang berperan terhadap kejadian IRA-B antara lain:

2.2.1.1 Vitamin D dalam tubuh

Vitamin D adalah sebuah hormon seko-steroid yang penting untuk mineralisasi tulang dan homeostasis kalsium (Finklea dkk., 2011). Vitamin D pada awalnya teridentifikasi sebagai penyembuh penyakit riketsia, sebuah penyakit gangguan pertumbuhan tulang yang disebabkan oleh adanya gangguan ambilan kalsium dari diet (Misra dkk., 2008; White, 2008). Vitamin D dapat diperoleh melalui dua jalur yang tidak berhubungan satu dengan lainnya yaitu diet dengan jumlah <10% dari total vitamin D dan sisanya berasal dari paparan sinar matahari pada kulit (Norris, 2001). Sebagian besar vitamin D yang ada di dalam tubuh kita berasal dari proses fotosintesis melalui paparan sinar matahari yang mengandung sinar ultraviolet B (UV-B) (White, 2008).

Diet yang merupakan sumber vitamin D antara lain ikan berminyak (*oily fish*) seperti ikan salmon, ikan air tawar, sarden, minyak ikan (*cod liver oil*), hati

dan daging (tetapi kaya kolesterol), serta kuning telur. Metode yang digunakan untuk memasak dapat mempengaruhi kadar vitamin D, misalnya ikan digoreng (*frying fish*) menurunkan kadar vitamin D hampir 50%, tetapi membakar (*baking*) tidak mempengaruhi kadar vitamin D ikan. *Farm-raised fish* mempunyai kadar vitamin D yang lebih tinggi daripada *free-living fish*. Diet yang bersumber dari tumbuh-tumbuhan merupakan sumber vitamin D₂ (ergokalsiferol), sedangkan diet yang bersumber dari binatang atau vitamin D yang disintesis di kulit merupakan vitamin D₃ (kolekalsiferol) (Misra dkk., 2008). Potensi vitamin D₃ sekitar tiga kali potensi vitamin D₂ (Armas dkk., 2004).

2.2.1.1.1 Metabolisme vitamin D

Vitamin D merupakan vitamin yang terlibat dalam metabolisme tulang dan kalsium. Provitamin D (7-dehidrokolesterol) ada pada *lipid bilayer* membran plasma dari keratinosit epidermis dan fibroblas dermal. Kadar tertinggi 7-dehidrokolesterol terletak pada stratum basale dan stratum spinosum epidermis (Norman, 1998). Paparan sinar UV-B dengan panjang gelombang 290-315 nm akan mengkonversi 7-dehidrokolesterol menjadi previtamin D₃ yang dengan segera dikonversi menjadi vitamin D₃ melalui *heat-dependet process*. Bila terjadi paparan sinar matahari yang berlebihan, previtamin D₃ dan vitamin D akan terdegradasi menjadi fotoproduk yang tidak aktif (Holick, 2007).

Vitamin D₂ dan D₃ dari diet digabung dalam kilomikron dan ditransportasi melalui sistem limfatik ke sirkulasi vena. Vitamin D (D₂ dan/atau D₃) yang dibuat di kulit atau yang bersumber dari diet akan disimpan dan kemudian

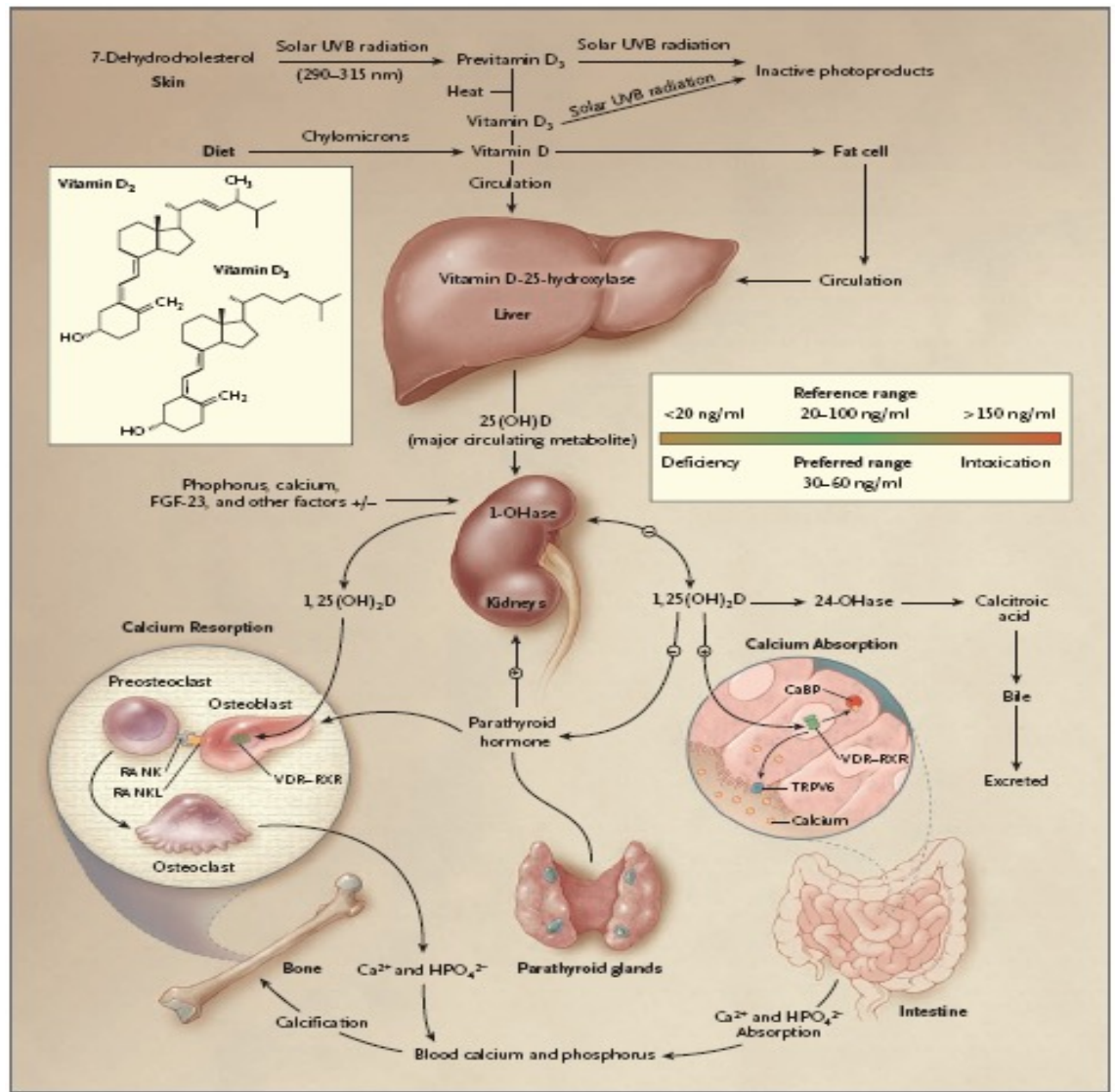
dilepaskan dari sel-sel lemak. Vitamin D di sirkulasi berikatan dengan *vitamin D-binding protein (DBP)* kemudian dibawa ke hati untuk dikonversi oleh enzim vitamin D-25-hidroksilase (25-OHase atau CYP27A1 /CYP2R1) menjadi 25-hidroksivitamin D [25(OH)D atau kalsidiol]. Ini merupakan bentuk vitamin D utama yang ada di sirkulasi dan digunakan oleh klinisi untuk menentukan status vitamin D. Walaupun potensi 25(OH)D sebesar 2-5 kali potensi vitamin D, zat ini bukanlah bentuk yang aktif secara biologis dan harus dikonversi di ginjal oleh enzim 25-hidroksivitamin D-1 α -hidroksilase (1-OHase atau CYP27B1) menjadi bentuk aktif yaitu 1,25-dihidroksivitamin D [1,25(OH)₂D atau kalsitriol]. *Fibroblast growth factor-23 (FGF-23)* yang disekresi oleh tulang), fosfor, kalsium, dan faktor-faktor lainnya dalam serum dapat meningkatkan (+) atau menurunkan (-) produksi 1,25(OH)₂D oleh ginjal. Kalsitriol atau 1,25(OH)₂D menurunkan sintesisnya melalui umpan balik negatif (*negative feedback*), dan menurunkan sintesis serta sekresi hormon paratiroid oleh kelenjar paratiroid (Holick, 2007).

Hormon paratiroid dan *FGF-23* mengontrol secara ketat enzim 1-OHase (Baeke dkk., 2010). Kalsitriol [1,25(OH)₂D] meningkatkan ekspresi dari 25-hidroksivitamin D-24-hidroksilase (24-OHase) untuk mengkatabolisme 1,25(OH)₂D menjadi bentuk yang tidak aktif secara biologik dan larut dalam air yaitu 24,25(OH)₂D atau asam kalkitroik (*calcitroic acid*) yang diekskresi ke empedu (Holick, 2007). Jadi kadar 1,25(OH)₂D secara ketat diatur oleh umpan balik negatif ke ginjal seperti penghambatan 1-OHase oleh 1,25(OH)₂D, *FGF-23*, fosfor, dan kalsium kadar tinggi serta stimulasi enzim 24-OHase atau CYP24A1

untuk mengkatabolisme 1,25(OH)₂D. Kadar 1,25(OH)₂D di sirkulasi terutama ditentukan oleh aktivitas 1-OHase ginjal (Baeke dkk., 2010).

Kalsitriol [1,25(OH)₂D] meningkatkan absorpsi kalsium di usus halus dengan berinteraksi dengan kompleks *vitamin D receptor-retinoid acid X-receptor (VDR-RXR)* untuk meningkatkan ekspresi *epithelial calcium channel [transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6 (TRPV6)]*, dan *calbindin 9K, a calcium-binding protein (CaBP)*. Kalsitriol atau 1,25(OH)₂D dikenal reseptornya di osteoblas menyebabkan peningkatan ekspresi *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)*. RANK merupakan reseptor RANKL pada preosteoklas mengikat RANKL, menginduksi preosteoklas menjadi osteoklas matur. Osteoklas matur mengeluarkan kalsium dan fosfor dari tulang, memelihara kadar kalsium dan fosfor di dalam darah. Kadar kalsium dan fosfor yang adekuat meningkatkan mineralisasi skeletal (Holick, 2007). Secara skematis sintesis dan metabolisme vitamin D dalam metabolisme tulang, kalsium, dan fosfor diperlihatkan pada Gambar 2.1.

Kalsidiol atau 25(OH)D merupakan bentuk utama vitamin yang ada di sirkulasi, serta kadarnya merupakan indikator terbaik untuk status vitamin D total dalam tubuh (Deluca dkk., 2011; Holick dkk., 2011; Heaney, 2012). Waktu paruh 25(OH)D sekitar 2-3 minggu, sedangkan bentuk metabolit aktifnya [1,25(OH)₂D] mempunyai waktu paruh hanya 3-4 jam (Misra dkk., 2008; Holick dkk., 2011).



Gambar 2.1
Sintesis dan Metabolisme Vitamin D dalam Metabolisme Tulang,
Kalsium, dan Fosfor (Holick, 2007)

Tidak seperti 25(OH)D, kadar 1,25(OH)2D bukanlah merupakan indikator yang baik untuk cadangan vitamin D karena: [1] penurunan kadar kalsium yang tidak kentara pada defisiensi vitamin D menyebabkan peningkatan hormon paratiroid yang menginduksi peningkatan aktivitas enzim 1-OHase yang mengakibatkan kadar 1,25(OH)2D normal atau meningkat, [2] normalnya

bersirkulasi pada kadar yang jauh lebih kecil dari 25(OH)D (Misra dkk., 2008; Holick, dkk., 2011). Kadar 25(OH)D <50 nmol/L (20 ng/mL) menandakan defisiensi vitamin D (Holick dkk., 2011; Ross dkk., 2011; Thacher dan Clarke, 2011; Ojaimi dkk., 2013), kadar 25(OH)D antara 51-74 nmol/L (21-29 ng/mL) menandakan insufisiensi, dan kadar 25(OH)D 75-250 nmol/L (30-100 ng/mL) menandakan kadar vitamin D yang cukup (Holick dkk., 2005; Holick, 2007; Holick dkk., 2011; Ross dkk., 2011).

Intoksikasi vitamin D tidak terjadi sampai kadar 25(OH)D >375 nmol/L atau 150 ng/mL (Vieth, 1999; Heaney dkk., 2003; Vieth, 2006; Holick, 2007; Joines, 2008; Khan dan Fabian, 2010; Zittermann dkk., 2013). Asupan jangka panjang kolekalsiferol 10.000 IU/hari dikatakan aman (Vieth, 2007). Toksisitas vitamin D dapat terjadi karena asupan oral yang berlebihan, tetapi tidak terjadi karena paparan sinar matahari yang berkepanjangan pada kulit (Webb dkk., 2006; Holick, 2007; Springbett dkk., 2010).

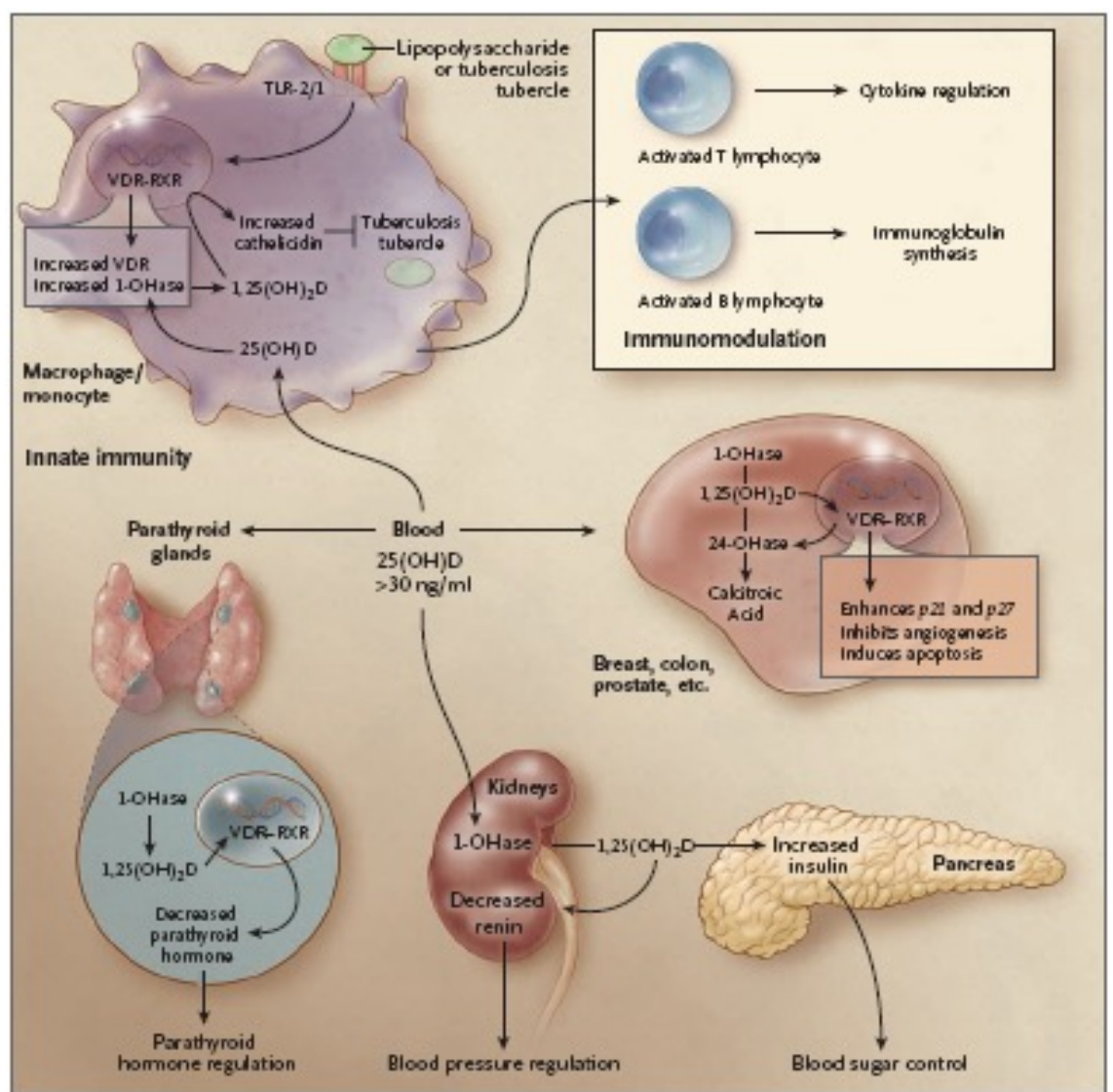
Selain berfungsi dalam metabolisme tulang dan kalsium, belakangan ini vitamin D diduga mempunyai fungsi non-skeletal. Bila makrofag atau monosit distimulasi melalui *toll-like receptor 2/1 (TLR 2/1)*-nya oleh sebuah *agent* infeksius misalnya Mikobakterium tuberkulosis atau lipopolisakaridanya, sinyalnya akan meningkatkan ekspresi *VDR* dan 1-OHase. Kadar 25(OH)D 30 ng/mL (75 nmol/L) atau lebih besar memberikan substrat yang adekuat dari 1-OHase untuk mengkonversi 25(OH)D menjadi 1,25(OH)₂D. Kalsitriol [1,25(OH)₂D] diangkut ke nukleus, meningkatkan ekspresi katelisin, sebuah peptida yang meningkatkan pertahanan tubuh alamiah dan menyebabkan destruksi

agent infeksius seperti *M. tuberculosis*. Mungkin juga bahwa 1,25(OH)₂D yang diproduksi di monosit atau makrofag dilepas untuk bekerja secara lokal pada *activated T lymphocytes* yang mengatur sintesis sitokin, dan *activated B lymphocytes* yang mengatur sintesis imunoglobulin (Holick, 2007).

Produk lokal 1,25(OH)₂D di payudara, kolon, prostat, dan jaringan lainnya mengatur bermacam-macam gen yang mengontrol proliferasi termasuk *p21* dan *p27* maupun gen-gen yang menghambat angiogenesis dan menginduksi diferensiasi dan apoptosis. Segera setelah 1,25(OH)₂D menyelesaikan tugas dalam memelihara proliferasi dan diferensiasi sel normal, 1,25(OH)₂D akan menginduksi ekspresi enzim 25-hidroksivitamin D-24 hidroksilase (24-OHase atau CYP24A1) yang meningkatkan katabolisme 1,25(OH)₂D menjadi bentuk tidak aktif secara biologis yang larut dalam air yaitu asam kalkitroik (*calcitroic acid*). Jadi, produk lokal 1,25(OH)₂D tidak masuk ke sirkulasi dan tidak mempunyai pengaruh pada metabolisme kalsium. Kelenjar paratiroid mempunyai aktivitas 1-OHase, dan produk lokal 1,25(OH)₂D menghambat ekspresi dan sintesis hormon paratiroid (Holick, 2007). Kalsitriol atau 1,25(OH)₂D yang diproduksi di ginjal masuk ke sirkulasi dan dapat menekan produksi renin pada ginjal dan menstimulasi sekresi insulin pada sel-sel beta pankreas (Holick, 2007; Herr dkk., 2011). Secara skematis metabolisme 25(OH)D menjadi 1,25(OH)₂D untuk fungsi non-skeletal terlihat pada Gambar 2.2.

Secara langsung maupun tidak langsung, 1,25(OH)₂D mengontrol lebih dari 200 gen termasuk gen yang bertanggung jawab terhadap regulasi proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel, serta angiogenesis (Holick, 2006; Holick dan

Garabedian, 2006). Beberapa peneliti melaporkan bahwa 1,25(OH)₂D dapat menghambat pertumbuhan sel-sel kanker (Nagpal dkk., 2005), menginduksi maturasi sel kanker, menginduksi apoptosis, menurunkan angiogenesis (Mantel dkk., 2000; Nagpal dkk., 2005), menghambat produksi renin di ginjal, dan mempunyai aktivitas imunomodulator pada monosit, dan mengaktifasi limfosit T dan B (Adorini, 2002; Mathieu dan Adorini, 2002; Cantorna dkk., 2004).



Gambar 2.2
Metabolisme 25(OH)D Menjadi 1,25(OH)₂D untuk Fungsi Non-skeletal
(Holick, 2007)

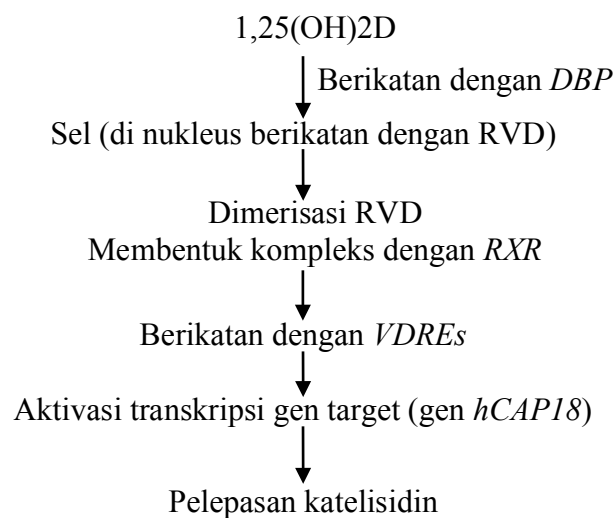
Proses hidroksilasi oleh enzim 1-OHase terjadi juga di tempat lain selain ginjal seperti makrofag alveolar, kelenjar limfe, plasenta, kolon, payudara, osteoblast, makrofag teraktivasi (*activated macrophages*), keratinosit (Misra dkk., 2008), otak, prostat (Holick dan Chen, 2008; Nowson dkk., 2012), dan sel dendritik (Baeke dkk., 2010). Adanya enzim ini menyebabkan tempat-tempat tersebut mampu membentuk 1,25(OH)₂D sendiri tanpa tergantung ginjal.

2.2.1.1.2 Melanin dan sintesis vitamin D

Melanin adalah zat yang mengatur warna kulit, disintesis dari tirosin oleh enzim tirosinase, dan merupakan pelindung alami terhadap paparan sinar matahari (*sunscreen*). Setelah terpapar sinar UV-B, granula-granula melanin akan dibawa dari melanosit di epidermis ke sel-sel epidermis yang berbatasan, migrasi ke permukaan sel, menyebabkan warna kulit lebih gelap (*darkening of the skin*). Waktu yang dibutuhkan sel untuk migrasi dari stratum basale ke stratum korneum sekitar 2 minggu, begitu juga waktu yang diperlukan sel-sel stratum korneum untuk mengelupas yaitu sekitar 2 minggu. Melanin mengatur seberapa banyak sinar UV-B dapat penetrasi mencapai stratum basale dan stratum spinosum yang merupakan dua tempat di epidermis dengan kadar 7-dehidrokolesterol tertinggi (Norman, 1998). Melanin kadar tinggi (terdapat pada orang berkulit gelap) dapat menurunkan sintesis vitamin D dengan mencegah sinar UV-B mencapai stratum basale dan stratum spinosum (Glimcher dkk., 1978). Melanin akan mengabsorpsi radiasi sinar UV (Springbett dkk., 2010)

2.2.1.1.3 Mekanisme kerja molekuler dari vitamin D

Bentuk aktif vitamin D adalah kalsitriol atau 1,25(OH)₂D. Kalsitriol atau 1,25 (OH)₂D berinteraksi dengan *vitamin D binding protein (VDBP)* yang memfasilitasi transfer molekul. Kalsitriol atau 1,25(OH)₂D masuk ke dalam sel, berikatan dengan RVD nukleus, mengakibatkan dimerisasi RVD dan membentuk sebuah kompleks dengan reseptor retinoid X (*retinoic X receptor=RXR*). Kompleks reseptor ini kemudian berikatan dengan *vitamin D response element (VDRE)*, selanjutnya mengaktivasi transkripsi gen target (Chishimba dkk., 2010). Untuk IRA-B, gen target yang diaktivasi transkripsinya adalah gen *hCAP18* untuk menstimulasi pelepasan katelisin. Secara skematis mekanisme kerja molekuler vitamin D terlihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3
Mekanisme Kerja Molekular Vitamin D

2.2.1.1.4 Insufisiensi/defisiensi vitamin D dan penyakit infeksi

Defisiensi vitamin D adalah keadaan bila kadar 25(OH)D di sirkulasi kurang dari 20 ng/mL (50 nmol/L) (Bischoff-Ferrari dkk., 2006; Holick, 2007; Holick dkk., 2011; Ross dkk., 2011; Thacher dan Clarke, 2011; Ojaimi dkk., 2013), sedangkan insufisiensi vitamin D adalah keadaan bila kadar 25(OH)D di sirkulasi antara 21-29 ng/mL, dan dikatakan cukup bila kadar 25(OH)D antara 30-100 ng/mL (Holick dkk., 2005). Intoksikasi vitamin D terjadi bila kadar 25(OH)D mencapai 150 ng/mL (375 nmol/L) atau lebih, dan ini berhubungan dengan hiperkalsemia (bila kronik dapat menyebabkan batu saluran kemih di ginjal atau kandung kemih, dan menyebabkan gagal ginjal) (Holick, 2007).

Insufisiensi/defisiensi vitamin D lebih sering terjadi daripada intoksikasi vitamin D. Defisiensi vitamin D dapat disebabkan oleh beberapa keadaan antara lain: [1] sintesis vitamin D menurun karena pigmentasi kulit (melanin), adanya *sunscreen*, tempat teduh, kulit tertutup pakaian; [2] geografi seperti garis lintang, musim dingin, polusi udara, lapisan awan, dan tempat ketinggian; [3] kurangnya asupan vitamin D; [4] kurangnya simpanan vitamin D pada ibu yang bayinya mendapat ASI eksklusif; [5] malabsorpsi seperti pada penyakit *Crohn*, penyakit *Whipple*, fibrosis kistik, penyakit *Celiac*, penyakit bilier, dan penyakit hati; [6] sintesis menurun atau degradasi 25(OH)D meningkat seperti pada pemakaian obat antikonvulsi, glukokortikoid, rifampim, isoniazid, penyakit hati kronis, *highly active antiretroviral therapy (HAART)*; [7] penyakit lain seperti gagal ginjal, sindrom nefrotik, dan obesitas (Holick dan Chen, 2008; Misra dkk., 2008).

Beberapa penelitian epidemiologi telah mengaitkan defisiensi vitamin D dengan peningkatan risiko penyakit-penyakit infeksi. Hubungan antara insufisiensi vitamin D dan penyakit-penyakit infeksi kembali ke awal abad ke-19 yaitu radiasi sinar matahari bermanfaat untuk pasien tuberkulosis (TB). Hubungan antara defisiensi vitamin D dengan kepekaan terhadap TB telah dijelaskan sekitar 30 tahun yang lalu (Davies dkk., 1985; Grange dkk., 1985). Selain itu, 1,25(OH)₂D ternyata menghambat pertumbuhan *M. tuberkulosis* pada makrofag manusia yang dibiakkan (Rook dkk., 1986). Penelitian berikutnya pada populasi imigran asal Gujarat-Asia di London mendapatkan ada hubungan antara penyakit TB aktif dengan defisiensi 25(OH)D (Wilkinson dkk., 2000). Selanjutnya, penelitian uji klinis terandomisasi tersamar ganda oleh Martineau dkk. (2007) melaporkan bahwa dosis tunggal vitamin D₃ sebesar 100.000 U (2,5 mg) ternyata meningkatkan imunitas antimikobakterial pada donor sehat dengan tes tuberkulin positif.

Berdasarkan hasil penelitian pada penderita TB, beberapa penelitian melaporkan bahwa vitamin D juga bermanfaat untuk melawan infeksi bakteri atau virus termasuk IRA. Hubungan vitamin D dengan IRA berawal dari penelitian oleh Lubani dkk. (1989) di Kuwait yang melaporkan bahwa sekitar 43% anak yang menderita riketsia mengalami pneumonia. Penelitian selanjutnya oleh Muhe dkk. (1997) di Etiopia melaporkan bahwa anak usia di bawah 5 tahun yang menderita riketsia mempunyai risiko 13 kali menderita pneumonia. Begitu juga dengan penelitian oleh Banajeh dkk. (1997) di Yaman yang mendapatkan sebesar 50% anak yang rawat inap oleh karena IRA-B juga menderita riketsia.

Berdasarkan hasil penelitian ini timbullah upaya beberapa peneliti untuk meneliti lebih jauh hubungan antara vitamin D dengan penyakit infeksi pada sistem respiratori seperti yang terlihat pada Tabel 2.1.

Penelitian-penelitian pada Tabel 2.1 dilakukan berdasarkan dugaan bahwa vitamin D berperan dalam sistem imun alamiah (*innate immunity*) melalui peningkatan peptida-peptida antimikrobial yaitu katelisidin dan β -defensin-2 (White, 2008; Bartley, 2010; Bruce dkk., 2010), disamping adanya dugaan peranan polimorfisme gen RVD terhadap kejadian IRA-B (White, 2008.),

2.2.1.1.5 Vitamin D dan sistem imun alamiah

Bukti awal yang menduga bahwa vitamin D merupakan stimulan imunitas alamiah berasal dari laporan pengobatan TB dengan minyak ikan (*cod liver oil*) (Grad, 2004). Kalsitriol meningkatkan efek antimikrobial dari makrofag dan monosit yang penting untuk melawan patogen seperti *M. tuberculosis*. Kompleks kalsitriol, RVD, dan reseptor retinoid X dapat meningkatkan kapabilitas kemotaksis dan fagositik sel-sel imun alamiah (Baeke dkk., 2010), secara langsung mengaktifasi transkripsi peptida antimikrobial seperti defensin dan katelisidin (*hCAP18*) (Wang dkk., 2004; Gombart dkk., 2005; White, 2012). Monosit yang terpapar *M. tuberculosis* menginduksi enzim 1α -hidroksilase (1-OHase atau CYP27B1) dan RVD setelah mengenal patogen melalui *TLR*, menyebabkan modulasi langsung ekspresi gen menyokong produksi katelisidin (Liu dkk., 2006).

Tabel 2.1 Hasil Beberapa Penelitian yang Mencari Hubungan antara Vitamin D dengan IRA-B

No.	Peneliti	Desain dan tempat	Subjek/Sampel	Hasil	Kelemahan penelitian
1	Wayse dkk., 2004	Kasus-kontrol, di India	Kasus: balita penderita IRA-B berat. Kontrol: balita sehat berasal dari daerah kasus	Kadar 25(OH)D >22,5 nmol/L mengurangi risiko IRA-B berat [RO = 0,09 (IK95% 0,03 sampai 0,240)]	-
2	Belderbos dkk., 2011	Kohort, Belanda	di Neonatus, lalu diikuti selama 12 bulan	Kadar 25(OH)D tali pusat >50 nmol/L merupakan faktor risiko IRA-B berat oleh karena RSV dibanding kadar 25(OH)D ≥ 75 nmol/L [RO=6 (IK95% 1,6 sampai 24,9)]	Tidak diukurnya kadar 25(OH)D saat subjek menderita IRA-B
3	Leis dkk., 2012	Kasus-kontrol, di Kanada	Balita penderita pneumonia atau bronkiolitis	Masukan vitamin D <80 IU/kg/hari merupakan faktor risiko pneumonia/bronkiolitis dibanding asupan vitamin D ≥ 80 IU/kg/hari [Ro=4,9 (IK95% 1,5 sampai 16,4)]. Analisis <i>post-hoc</i> , masukan vitamin D <80 IU/kg/hari merupakan faktor risiko pneumonia [RO=7,9 (IK95% 1,8 sampai 35,5)] tetapi tidak untuk bronkiolitis [RO=1,7 (IK95% 0,7 sampai 4,0)].	Sampel pada kontrol dipilih secara <i>convenient</i> serta tidak berasal dari area yang sama dengan kasus, adanya analisis <i>post-hoc</i> .
4	Camargo dkk., 2012	Eksperimental, di Mongolia	Anak-anak SD kelas 3 dan kelas 4	Preventif dengan vitamin D mengurangi risiko IRA pada anak-anak yang mengalami defisiensi vitamin D [rate ratio=0,50 (IK95% 0,28 sampai 0,88)]	-

Di samping sinyal (*signaling*) dari TLR, ekspresi CYP27B1 dapat juga oleh sitokin lain seperti IFN- γ dan IL-4 (Edfeldt dkk., 2010). Katelisin yang dipecah dari LL-37 menyebabkan destabilisasi membran mikrobial, meningkatkan jumlahnya dalam respon terhadap infeksi pada manusia dan bekerja melawan bakteri, virus, dan jamur (Ramanathan dkk., 2002).

Sebuah penelitian potong lintang mendapatkan bahwa kadar 25(OH)D secara bermakna lebih rendah pada pasien-pasien sepsis yang kritis dan ini berhubungan dengan menurunnya kadar katelisin (Jeng dkk., 2009). Rendahnya kadar 25(OH)D serum juga dihubungkan dengan IRA-A (Laaksi dkk., 2007; Cannell dkk., 2008; Ginde dkk., 2009b), termasuk influenza (Cannell dkk., 2006).

Sebuah uji klinis acak tersamar ganda gagal mendapatkan penurunan kejadian IRA-A dengan pemberian vitamin D3 100.000 IU/bulan pada orang dewasa sehat yang ternyata mempunyai kadar 25(OH)D pada data dasar sebesar 29 ng/mL (Murdoch dkk., 2012). Sebaliknya dengan hasil penelitian uji klinis tersamar ganda dengan pemberian susu yang difortifikasi pada anak-anak Mongolia yang mengalami defisiensi vitamin D dengan kadar 25(OH)D pada data dasar sebesar 7 ng/mL (Camargo dkk., 2012).

Vitamin D3 atau vitamin D2 dimetabolisme di hati untuk membentuk 25(OH)D. Sel-sel target seperti monosit/makrofag dan sel dendritik mengekspresikan enzim CYP27B1 dan *VDR*, kemudian menggunakan 25(OH)D untuk respon intrakrin melalui konversi lokal untuk membentuk 1,25(OH)₂D. Pada monosit/makrofag, ini memunculkan respon antibakterial terhadap infeksi.

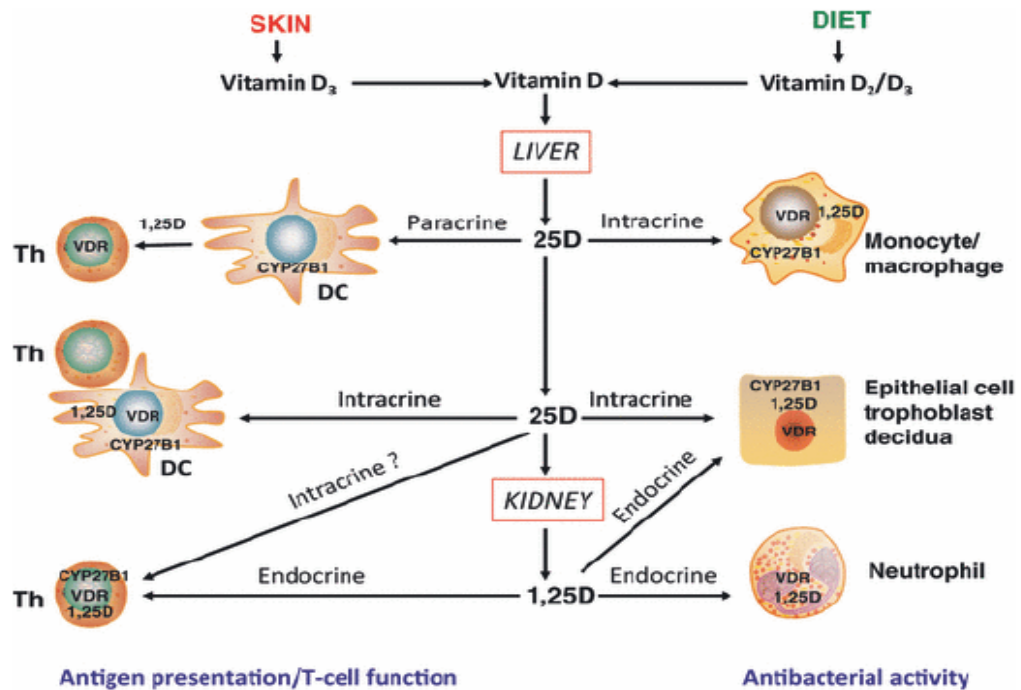
Pada sel-sel dendritik, sintesis intrakrin dari 1,25(OH)₂D menghambat maturasi sel dendritik, dengan demikian memodulasi fungsi sel *T helper* (*Th*).

Respon sel *Th* terhadap 25(OH)D bisa juga dimediasi dengan cara parakrin (*paracrine fashion*), dengan munculnya 1,25(OH)₂D yang dihasilkan oleh sel dendritik [*DC-generated 1,25(OH)₂D*]. Efek imun intrakrin dari 25(OH)D terjadi juga pada sel-sel epitel yang mengekspresikan CYP27B1/*VDR*, akan tetapi sel-sel lain seperti neutrofil tidak tampak mengekspresikan CYP27B1, oleh karena itu mungkin dipengaruhi oleh kadar 1,25(OH)₂D di sirkulasi yang disintesis di ginjal. Sel *Th* yang mengekspresikan *VDR* juga target potensial bagi 1,25(OH)₂D sistemik walaupun mekanisme intrakrin masih diusulkan. Dengan cara yang sama, sel-sel epitel, trofoblas, dan desidua semuanya dapat berespon dengan cara intrakrin terhadap 25(OH)D, tetapi dapat juga berespon terhadap 1,25(OH)₂D sistemik untuk memunculkan respon antibakterial (Hewison, 2012). Secara skematis mekanisme vitamin D dalam respon imun alamiah maupun didapat diperlihatkan pada Gambar 2.4.

2.2.1.2 Gen reseptor vitamin D

2.2.1.2.1 Karakteristik gen reseptor vitamin D

Reseptor vitamin D ditemukan pada tahun 1969 (Norman, 2006). Gen RVD terletak pada lengan panjang kromosom 12 (Gambar 2.5) yang terdiri dari sebuah struktur kompleks ekson dan intron (Genetics Home Reference, 2014), terletak pada PAC 1057120, di hilir dari gen *collagen type II alpha I (COL2A1)*.

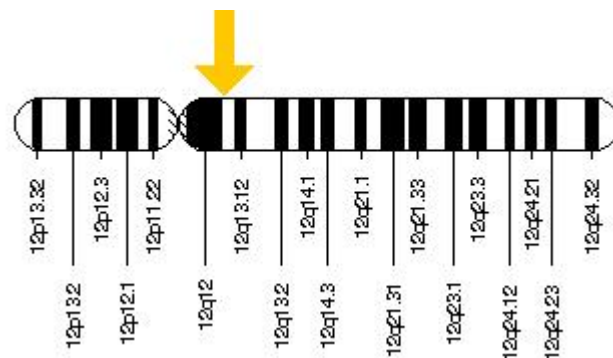


Gambar 2.4

Mekanisme Vitamin D dalam Respon Imun Alamiah dan Didapat (Hewison, 2012)

Catatan:

25D= 25(OH)D; 1,25D=1,25(OH)2D; VDR=RVD; DC=dendritic cell



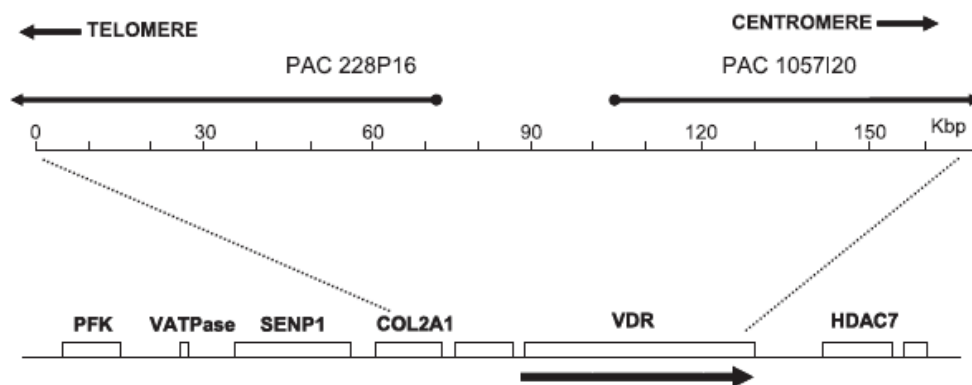
Gambar 2.5

Lokasi Gen RVD pada Lengan Panjang Kromosom 12 pada Posisi 13.11, pada Pasangan Basa 47, 841, 536 sampai Pasangan Basa 47, 905, 030 (Genetics Home Reference, 2014)

Pada pemetaan genetik, baik gen RVD maupun COL2A1 dipetakan sekitar posisi 63 cM, di antara petanda D12S85 dan D12S368. Reseptor vitamin D dan

COL2A1 terletak pada *PAC clones* terpisah yaitu pada P1057120 dan P228P16. Terdapat kesenjangan (*gap*) sekuens antara *COL2A1* dan RVD. Telah diidentifikasi juga gen-gen lain seperti *phosphofruktokinase (PFK)*, *vacuolar ATPase (VATase)*, *sentrin/SUMO specific protease (SENPI)*, dan *histone deacetylase (HDAC7)* (Gambar 2.6) (Uitterlinden dkk., 2004).

Gen RVD terdiri dari *promotor* (1a-1f), ekson 2-9 yang menyandi enam domain (A-F) dari panjang total protein RVD, dan *regulatory regions* seperti yang terlihat pada Gambar 2.7 (Deeb dkk., 2007). Selain itu ada juga penulis (Uitterlinden dkk., 2004) yang menyebut bahwa gen RVD terdiri dari 9 ekson (termasuk area promotor 1a-1f sebagai ekson 1) dengan DNA genomik sepanjang 100 kb (Gambar 2.8).

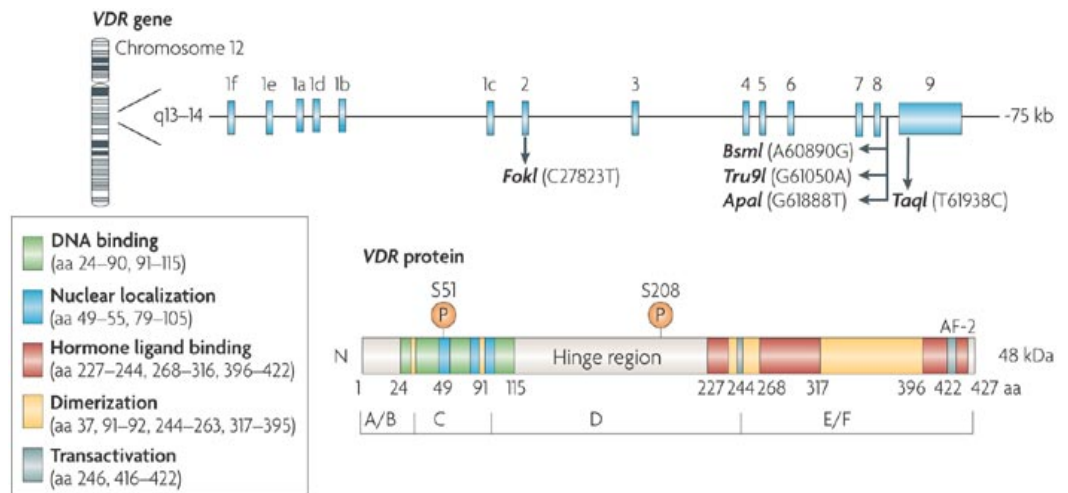


Gambar 2.6

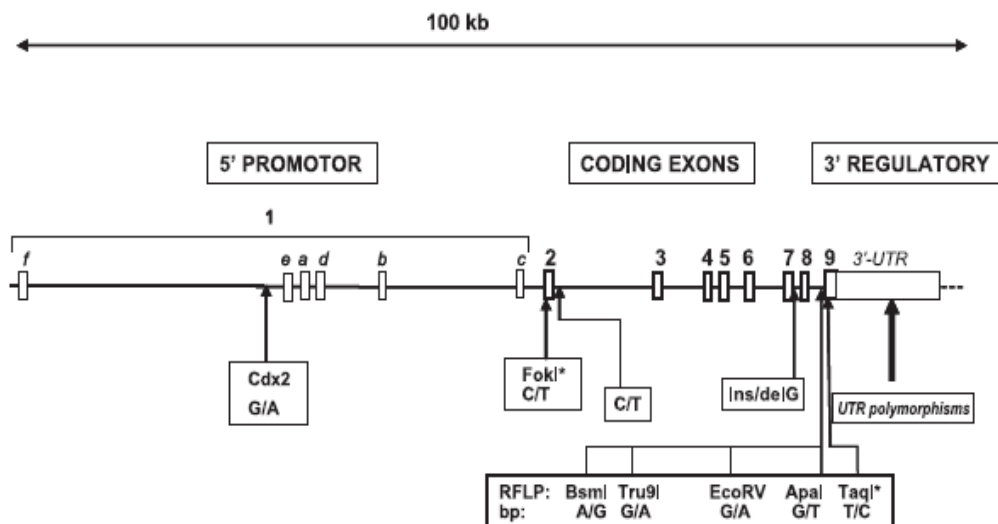
Struktur Genomik RVD pada Kromosom 12q13.1 (Uitterlinden dkk., 2004)

Catatan:

- PFK*: *phosphofruktokinase*
- VATPase*: *vacuolar ATPase*
- SENPI*: *sentrin/SUMO specific protease*,
- COL2A1*: *collagen type II alpha 1*,
- VDR*: *vitamin D receptor*,
- HDAC7*: *histone deacetylase*,



Gambar 2.7
Gen RVD Terdiri Dari *Promotor* (1a-1f), Ekson 2-9, yang Menyandi Enam Domain (A-F), dan *Regulatory Regions* (Deeb dkk., 2007)



Gambar 2.8
Struktur Intron-Ekstron Gen RVD dan Posisi Polimorfisme (Uitterlinden dkk., 2004)

Catatan:

UTR: untranslated region

Reseptor vitamin D yang terletak di nukleus (biru) memberi sinyal langsung ke dalam nukleus sepanjang saluran mikrotubulus sampai *nuclear pores*. Pada saat 1,25 (OH)₂D berikatan dengan *hormone-ligand binding domain*

(merah), RVD distabilisasi oleh fosforilasi dari serin 51 dalam *DNA-binding domain* (hijau) oleh protein kinase C dan serin 208 pada *the hinge region* oleh *casein kinase II*. Reseptor vitamin D berhubungan dengan *retinoic acid receptor (RXR)* melalui *dimerization domains* (kuning). Kompleks 1,25(OH)₂D-RVD-RXR berikatan dengan *vitamin D response elements (VDREs)* melalui *DNA-binding domain* pada promoter-promoter dari gen-gen target. Perubahan konformasional dalam RVD mengakibatkan disosiasi dari ko-represor, *silencing mediator for retinoid and thyroid (SMRT)*, dan memungkinkan interaksi dari *VDR activation function 2 (AF2) transactivation domain* (abu-abu) dengan *stimulatory coactivators* seperti *steroid receptor coactivators (SRCs)*, *vitamin D receptor-interacting proteins complex* dan *nuclear coactivator-62 kDa-Ski-interacting protein (NCoA62-SKIP)* yang memediasi aktivasi transkripsional (Deeb dkk., 2007).

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) non-sinonimus (*FokI*) dan sinonimus (*BsmI*, *ApaI*, *TaqI*, dan *Tru9I*) telah diidentifikasi pada RVD. Polimorfisme *FokI* pada *translation initiation codon* menghasilkan sebuah RVD yang lebih kecil yang berinteraksi dengan *transcription factor 2B (TF2B)* lebih efisien dan mempunyai aktivitas transkripsional lebih besar dari panjang total RVD. Walaupun efek fungsional *SNPs* tersebut masih belum diketahui, *SNPs* telah dilaporkan berhubungan dengan beberapa penyakit. Detail polimorfisme gen RVD yang telah diketahui diperlihatkan pada Gambar 2.7 di atas (Deeb dkk., 2007) maupun Gambar 2.8 (Uitterlinden dkk., 2004).

Reseptor vitamin D ada pada lebih dari 30 jaringan antara lain pada usus halus, usus besar, osteoblast, limfosit T dan B yang teraktivasi, sel-sel β islet, dan organ-organ tubuh seperti otak, jantung, kulit, gonad, prostat, payudara, dan sel-sel mononuklear (Misra dkk., 2008).

2.2.1.2.2 Nomenklatur reseptor vitamin D

Nomenklatur dari RVD dapat dilihat pada Tabel 2.2, sedangkan kondisi *PCR-RFLP* dari *SNP-RVD* dapat dilihat pada Tabel 2.3 (Flugge dkk., 2007).

Tabel 2.2
BbAtTt Nomenklatur RVD (sekuens rujukan AY342401)
(Flugge dkk., 2007)

<i>SNP</i>	Lokalisasi	Posisi	NCBI	<i>Base change</i>	Nomenklatur	Tempat restriksi	Genotip
<i>Cdx-2</i>	Intron 1e	23005	rs2238136	G/A	CC	AA	mut
					Cc	GA	ht
					cc	GG	wt
<i>FokI</i>	Ekson 2	27823	rs2228570	C/T	FF	CC	wt
					Ff	CT	ht
					ff	TT	mut
<i>BsmI</i>	Intron 8	60890	rs1544410	G/A	BB	AA	mut
					Bb	GA	ht
					bb	GG	wt
<i>Tru9I</i>	Intron 8	61050	rs757343	G/A	UU	GG	Wt
					Uu	GA	ht
					uu	AA	mut
<i>Apal</i>	Intron 8	61888	rs7975232	G/T	AA	TT	mut
					Aa	GT	ht
					aa	GG	wt
<i>TaqI</i>	Ekson 9	61968	rs731236	T/C	TT	TT	Wt
					Tt	TC	ht
					tt	CC	mut

Catatan:

wt=homozygote wild type, *ht*=heterozygote mutated,
mut=homozygote mutated, *SNP*=single nucleotide polymorphisms
NCBI=official nomenclature, position in base pairs, GI 32891816

Tabel 2.3
Kondisi *PCR-RFLP* dari *SNP*- RVD (Flugge dkk., 2007)

<i>SNP</i>	<i>Forward primer/reverse primer</i>	<i>Annealing temperatura</i>	<i>Amplicon (bp)</i>	<i>Restriction enzyme</i>
Cdx-2	5'-CAG CAT GCC TGT CCT CAG C-3' (F) 5'-CCA GTA CTG CCA GCT CCC A-3'	61°C	250	Bpu10I
FokI	5'-ACT CTG GCT CTG ACC GTG-3' (F) 5'-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC-3'	61°C	250	FokI
BsmI	5'-CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3' (F) 5'-CAC TTC GAG CAC AAG GGG CGT TAG C-3'	67°C	1932	Mva 12691
Tru9I	5'-TGA GGT TTC TTG CGG GCA GGG TA-3' (F) 5'-CAG GGC CGC CCC TCT TTG GA-3'	61°C	212	MseI
ApaI	5'-CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3' (F) 5'-CAC TTC GAG CAC AAG GGG CGT TAG C-3'	67°C	1932	Bsp120I
TaqI	5'-CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3' (F) 5'-CAC TTC GAG CAC AAG GGG CGT TAG C-3'	67°C	1932	TaqI

Catatan:

F=forward primer, *bp*=base pairs, *sequence derived from AY342401*

2.2.1.2.3 Nama lain gen reseptor vitamin D

Nama lain dari gen RVD adalah reseptor 1,25-dihidroksivitamin D3 atau NR1H1 (*nuclear receptor subfamily 1 group 1 member 1*), atau reseptor vitamin D3 (Genetics Home Reference, 2014).

2.2.1.2.4 Fungsi normal gen reseptor vitamin D

Gen RVD menginstruksikan untuk membuat sebuah protein yang disebut RVD yang memungkinkan tubuh berespon secara tepat terhadap vitamin D. Vitamin D dapat diperoleh dari makanan/diet atau dibuat dalam tubuh dengan

bantuan sinar matahari. Vitamin D terlibat dalam memelihara keseimbangan beberapa mineral tubuh seperti kalsium dan fosfat, yang esensial untuk pembentukan tulang dan gigi. Salah satu peranan utama vitamin D adalah mengontrol absorpsi kalsium dan fosfat di saluran cerna ke aliran darah. Vitamin D juga terlibat dalam beberapa proses yang tidak berhubungan dengan pembentukan tulang.

Reseptor vitamin D berikatan dengan bentuk aktif vitamin D [1,25(OH)₂D atau kalsitriol]. Interaksi ini memungkinkan RVD bersekutu dengan protein lain yang disebut *retinoid X receptor (RXR)*. Protein kompleks ini kemudian berikatan dengan area khusus DNA yang disebut *vitamin D response elements*, dan mengatur aktivitas *vitamin D-responsive genes*. Reseptor vitamin D membantu mengontrol absorpsi fosfat dan kalsium serta proses lainnya. Walaupun mekanisme belum sepenuhnya diketahui, RVD juga terlibat pada pertumbuhan rambut tetapi proses ini tidak memerlukan ikatan dengan 1,25(OH)₂D (Genetics Home Reference, 2014).

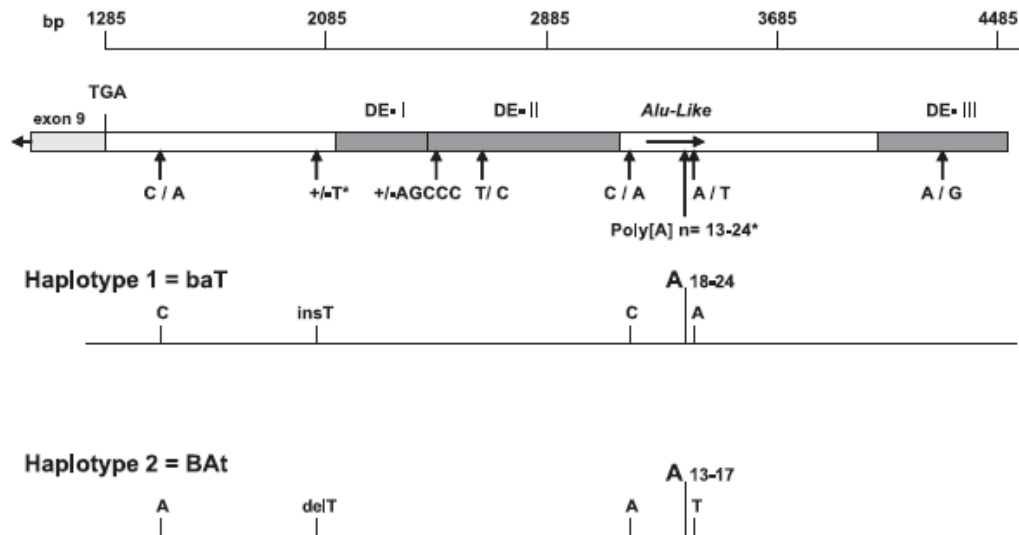
2.2.1.2.5 Polimorfisme gen reseptor vitamin D

Gen RVD ternyata sangat polimorfik pada beberapa etnis. Seperti yang terlihat pada Gambar 2.7 ataupun Gambar 2.8, polimorfisme yang telah diidentifikasi antara lain *ApaI* pada intron VIII (Faraco dkk., 1989), *EcoRV* dan *BsmI* pada intron VIII (Morrison dkk., 1992), *TaqI* pada ekson IX (Morrison dkk., 1994), *Tru9I* pada intron VIII (Ye dkk., 2000), dan *the poly(A)* (Ingles dkk., 1997b) yang ditemukan pada 3' akhir dari gen RVD. Di samping itu ditemukan

juga *FokI RFLP* (Baker dkk., 1988) dengan polimorfisme yang terjadi karena perubahan timin/sitosin (T/C) (Arai dkk., 1997) dengan dasar perubahan dari kodon ATG ke kodon ACG pada *first potential start site* (Saijo dkk., 1991). Polimorfisme ini juga disebut sebagai *start codon polymorphism (SCP)*, ditentukan menggunakan *FokI restriction enzyme* pada sebuah tes *RFLP* (Arai dkk., 1997). Ada dua varian protein yaitu protein RVD versi panjang (alela "T" atau alela "f"), merujuk pada bentuk M1, yaitu metionin pada posisi pertama) dan sebuah protein yang diperpendek tiga asam amino (alela "C" dideteksi sebagai alela "F", merujuk pada bentuk M4, yaitu metionin pada posisi keempat) (Arai dkk., 1997). Alela "f" dari polimorfisme *FokI* memperlihatkan aktivitas transkripsional yang kurang dibanding alela "F" (Arai dk., 1997; Jurutka dkk., 2000).

Morrison dkk. (1994) mencari polimorfisme tambahan dan kemungkinan variasi fungsional pada 3,2 kb gen *3' untranslated region (UTR)* untuk menjelaskan hubungan dari perbedaan *bone mineral density (BMD)* dengan (menurut dugaan non-fungsional) *BsmI RFLP*. Ketika mereka mensekuensing dua subjek homozigot untuk haplotip yang paling sering (*BsmI – ApaI – TaqI*) yaitu BAt – BAt dan baT - baT, mereka melaporkan 13 polimorfisme dalam 3,2 kb, sesuai dengan yang diharapkan 1 dalam 300 kb menjadi varian. Di antara perbedaan sekuens mereka melaporkan sebuah *polyA-tract* dengan residu-A yang jumlahnya bervariasi dengan alela yang panjangnya bervariasi antara 12 dan 18 adenosin.

Durrin dkk. (1999) memperluas pendekatan ini dengan mensekuensing 3'UTR pada lima subjek homozigot untuk haplotip baT dan tiga subjek homozigot untuk haplotip BAAt dan total mengidentifikasi tujuh polimorfisme (Gambar 2.9), darinya, empat adalah sering dan tiga adalah jarang dari delapan subjek yang mereka analisis. Hanya dua polimorfisme ditemukan pada dua analisis sekuens oleh Durrin dkk., dan Morrison dkk. Bila mempertimbangkan metode yang digunakan dan jumlah subjek yang dianalisis, dikatakan bahwa polimorfisme yang dilaporkan oleh Durin dkk. tidak mengandung kesalahan sekuens dan kelihatannya lebih akurat. Walaupun begitu, jumlah subjek yang dianalisis masih terbatas dan sangat diseleksi, sehingga sampai sekarang mungkin ada polimorfisme yang tidak ditemukan pada 3,2 kb UTR.



Gambar 2.9

Struktur dan Posisi Polimorfisme pada 3'UTR dari Gen RVD. TGA Mengindikasikan *Stop Codon* pada Ekson 9 Tempat Mulainya 3'UTR. DE I-III Menunjukkan *Destablising Element*. Di Bawahnya adalah Dua Haplotip *BsmI* – *ApaI* – *TaqI* Terbanyak yakni Haplotip 1 (=baT) dan Haplotip 2 (=BAAt) dan Alela-Alela dari Polimorfisme 3'UTR yang Dikaitkan Berdasarkan Delapan Subjek yang Dianalisis. Tanda * Mengindikasikan Polimorfisme yang Diidentifikasi pada Kedua Subjek (Uitterlinden dkk., 2004)

Pendekatan serupa diikuti oleh Brown dkk. (2000) yang menganalisis *the coding region* dari gen RVD pada 59 tumor paratiroid untuk mendapatkan mutasi. Terlepas dari polimorfisme *TaqI* dan *FokI* yang dilaporkan sebelumnya, mereka melaporkan tidak ada polimorfisme pada *the coding region* dan mendapatkan dua polimorfisme intron dekat ekson 2 dan ekson 8 (Gambar 2.8).

Polimorfisme RVD yang lain yang didapat melalui analisis sekuens dari area target adalah polimorfisme *Cdx2*. Arai dkk. (2001) melaporkan variasi sekuens guanin (G) ke adenin (A) di antara wanita Jepang pada promotor RVD 1a ketika mencari karakteristik gen RVD pada area promotor ini. Polimorfisme G ke A adalah sebuah tempat ikatan untuk sebuah *intestinal-specific transcription factor*, yang disebut *Cdx2* (Yamamoto dkk., 1999). Alela A berikatan dengan faktor transkripsi *Cdx2* dengan afinitas yang lebih besar dan menghasilkan aktivitas transkripsi lebih besar sehingga ekspresi RVD-nya lebih tinggi pada intestinal, dengan demikian akan meningkatkan BMD melalui absorpsi kalsium yang lebih baik (Arai dkk., 2001). Akhir-akhir ini diperlihatkan polimorfisme *Cdx2* ada pada promotor RVD 1e (Gambar 2.8), ada pada orang-orang Kaukasia maupun kelompok ras lainnya dan telah dikembangkan sebuah perhitungan genotip-spesifik alela (*an allele-specific genotyping assay*) untuknya (Fang dkk. 2003).

Polimorfisme *poly(A)* terjadi pada regio 3'UTR dari gen RVD yang ditandai oleh sebuah *variable number of tandem repeat (VNTR)* (Ingles dkk., 1997b). Dua polimorfisme yaitu *A-1012G* dan *Tru9I* kurang diteliti. Polimorfisme *A-1012G* terdiri dari penggantian A dengan G (*substitution of A for G*) (Halsall

dkk., 2004), sedangkan *Tru9I* adalah sebuah polimorfisme G (alela U) ke A (alela u) (Gong dkk., 2005). Mayoritas polimorfisme didapatkan pada area *regulatory* daripada *coding exon*. Karena variasi pada sekuens protein dapat mengakibatkan efek fungsional drastis, seperti perubahan pada afinitas untuk *ligand* atau ikatan dengan DNA, rupanya lebih mungkin bahwa variasi polimorfik dan varian populasi akan tetap pada area gen yang mengatur tingkat ekspresi, seperti *the 5' promoter area* dan *the 3'UTR region*.

Setelah kita tahu polimorfisme mana ada pada area kandidat gen, adalah penting memahami bagaimana mereka berhubungan satu dengan lainnya, yakni pada *genetic sense* maupun pada *biologically functional sense*. Secara genetik, kita perlu memahami alela yang mana dikaitkan satu sama lain dengan mempelajari *the linkage disequilibrium (LD)* di antara polimorfisme. Secara fungsional, kita harus menentukan berapa sering kombinasi alela sepanjang gen kandidat tersebut bisa memperbesar atau mengurangi beberapa efek fungsi gen (Uitterlinden dkk., 2004).

2.2.1.2.5.1 Polimorfisme *Cdx2*

Polimorfisme G ke A terletak pada tempat ikatan *Cdx2* pada *promoter region 1e* (Gambar 2.8). Tempat ini memegang peranan penting untuk transkripsi spesifik-intestinal dari gen *RVD*. Intestinal adalah tempat predominan untuk absorpsi kalsium, tempat *Cdx2* diperkirakan mempengaruhi *vitamin D regulation of calcium absorption*. Alela "A" telah diperlihatkan lebih aktif daripada alela "G" dengan mengikat faktor transkripsi *Cdx2* lebih kuat dan mempunyai aktivitas

transkripsional lebih banyak (Arai dkk., 2001). Jadi alela “A” diperkirakan menyebabkan meningkatnya ekspresi RVD di intestin, dan dengan demikian dapat meningkatkan transkripsi dari *calcium transport proteins* (seperti *calbindin 9K* dan *-28K*, *TRPV5*, *TRPV6*), selanjutnya meningkatkan absorpsi kalsium di intestin, kemudian meningkatkan *BMD*.

Walaupun peningkatan *BMD* telah diperlihatkan pada wanita Jepang yang membawa alela “A” (Arai dkk., 2001), hal ini tidak ditemukan pada wanita Kaukasia (Fang dkk., 2003). Sekalipun begitu, alela “A” dari polimorfisme ini memang didapat berhubungan dengan menurunnya risiko fraktur (seperti diharapkan dari peningkatan *BMD*) pada penelitian besar pada wanita Kaukasia tetapi tidak tergantung *BMD* (Fang dkk., 2003). Walaupun fungsi polimorfisme ini telah diperlihatkan meyakinkan, mekanisme pasti alela “A” mengurangi risiko fraktur masih belum jelas dan memerlukan penelitian lebih lanjut.

2.2.1.2.5.2 Polimorfisme *FokI*

Dari perspektif genetik, *FokI RFLP* dipertimbangkan sebagai sebuah petanda independen pada gen RVD karena tidak ada *LD* dengan polimorfisme-polimorfisme lainnya pada RVD dan area *LD* di sekitar polimorfisme ini rupanya sangat kecil. Oleh karena itu, *LD* dengan polimorfisme-polimorfisme lainnya bukanlah penjelasan yang mungkin untuk hubungan yang terpantau dengan polimorfisme ini, oleh sebab itu penelitian-penelitian fungsional hendaknya difokuskan pada polimorfisme itu sendiri.

Arai dkk. (1997), memperoleh bukti secara fungsional dari polimorfisme *FokI*. Hasil dari penelitian aktivasi transkripsional pada *transfected HeLa cells* menggunakan sebuah *reporter construct* di bawah *control a short portion of the rat 214-hydroxylase gene promoter region (-291 - +9)* berisi *VDRE*, memberi kesan bahwa *short 424 amino acid VDR protein variant* (cocok dengan alela “C” atau alela “F” besar) menjadi lebih aktif daripada *the long 427 aa variant*, dengan perbedaan 1,7 kali antara kedua varian.

Gross dkk. (1998) tidak dapat mengkonfirmasi hasil tersebut. Mereka juga menganalisis perbedaan alela *FokI* dalam karakteristik aktivasi transkripsi dari protein RVD, tetapi sekarang pada sel-sel *COS7* dan menggunakan *24-hydroxylase* promoter tikus, walaupun berisi daerah promoter yang sedikit lebih luas (-1399 - +76). Sebagai tambahan, mereka menganalisis *VDREs* dari gen osteokalsin manusia dan gen osteopontin tikus tetapi tidak melihat perbedaan alela *FokI* pada sistem tersebut. Sekalipun begitu, peneliti mencatat bahwa mungkin susah mengobservasi efek yang relatif kecil dari polimorfisme ini pada sistem tersebut. Lagi pula, perbedaan kecil pada tipe sel, area promoter, dan spesifisitas gen dari *VDRE* penting untuk mengetahui perbedaan alela.

Jurutka dkk. (2000) memperlihatkan 424 aa varian RVD berinteraksi lebih efisien dengan faktor transkripsi TFIIB, menggunakan *reporter constructs* berisi 1100 bp dari sebuah promoter osteokalsin tikus pada sel-sel *COS7*, *HeLa*, dan *ROS2/3*. Penulis menyimpulkan bahwa 424 aa varian RVD pendek menggambarkan sebuah protein RVD poten yang lebih transkripsional. Dugaan ini dikuatkan oleh penulis yang sama pada analisis dari 20 *fibroblast cell lines*

dari genotip RVD *FokI* endogen yang berbeda menggunakan sebuah *reporter constructs* berisi empat kopi gen osteokalsin tikus (Jurutka dkk., 2000).

Colin dkk. (2000) mengkonfirmasi aktivitas yang lebih tinggi dari 424 aa varian RVD pendek *while using a different readout of functionality*. Selain itu diuji juga kapasitas hambatan pertumbuhan dari vitamin D pada *peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)* dari genotip yang berbeda untuk *FokI RFLP* pada sel-sel yang diperoleh dari 72 wanita posmenopause. Mereka mendapatkan bahwa *PBMCs* membawa alela “F” (sesuai dengan 424 aa varian pendek) mempunyai *ED50* lebih rendah dan jadi mempunyai varian RVD lebih aktif dalam menghambat (*PHA-induced*) pertumbuhan sel.

Berdasarkan hasil penelitian di atas disimpulkan bahwa polimorfisme *FokI* rupanya fungsional dan varian RVD 424 aa sedikit lebih aktif daripada varian 427 aa dalam kapasitas transaktivasinya sebagai sebuah faktor transkripsi. Mungkin ada sebuah efek yang spesifik-gen (*gene-specific effect*) pada beberapa area promoter dari gen target vitamin D yang mungkin lebih sensitif terhadap perbedaan aktivitas yang tergantung genotip RVD (*VDR genotype-dependent difference in activity*), sementara yang lainnya bisa tidak. Bersama dengan interaksi yang spesifik tipe-sel dengan faktor-faktor ko-transkripsi, ini bisa mengakibatkan sebuah ekspresi spesifik tipe-sel dan spesifik-organ dari perbedaan yang tergantung genotip.

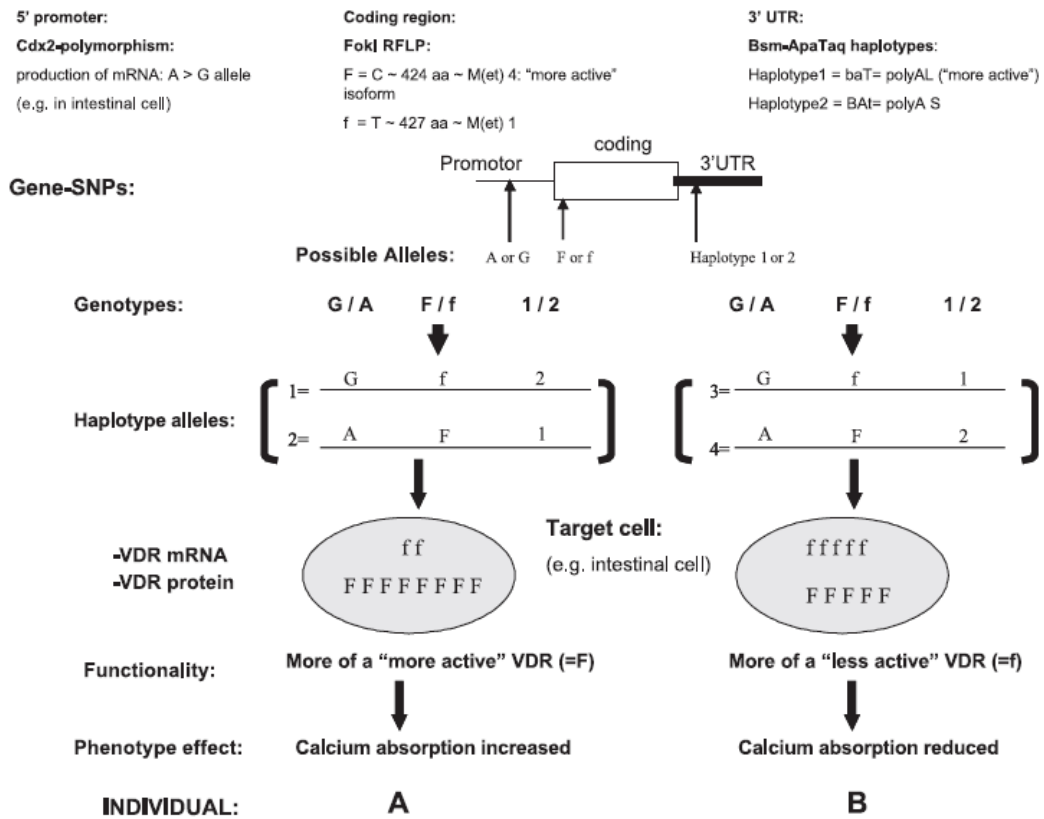
2.2.1.2.5.3 Polimorfisme *Bsm* – *Apa* – *Taq*, dan 3'UTR

Kebanyakan usaha untuk mengidentifikasi varian sekuens fungsional pada gen RVD telah difokuskan pada 3' *regulatory region* karena ini erat dengan petanda anonim yang banyak digunakan dalam penelitian-penelitian yang berhubungan (Gambar 2.8 dan 2.9). Walaupun *Bsm*1, *Apa*1, dan *Taq*1 RFLPs terletak dekat *the 3' end of the gene*, LD meluas ke dalam *the 3' regulatory region* yang berisi UTR. Kita telah melihat bahwa *the 3'UTR* dari gen RVD berisi beberapa polimorfisme dan melalui kekutan LD bisa menjelaskan hubungan yang terpantau dengan *Bsm* – *Apa* dan/atau *Taq* RFLPs. *The 3'UTR* dari gen diketahui terlibat dalam regulasi ekspresi, terutama melalui regulasi stabilitas mRNA, termasuk reseptor steroid yang berisi *extensive 3'UTR* seperti reseptor alfa glukokortikoid (Decker dan Parker, 1995). Untuk yang belakangan, polimorfisme reseptor pada *the 3'UTR* telah dijelaskan sehingga disebut *AUUUA-motifs* yang mempengaruhi stabilitas mRNA (Schaaf dan Cidlowski, 2002).

Whitfield dkk. (2001) memperlihatkan kemaknaan fungsional dari *the translation initiation codon polymorphism* (dideteksi sebagai *Fok*1 RFLP) dan *the poly(A) stretch* pada *the 3'UTR*. Dalam sebuah serial dari 20 *fibroblast cell lines* dari genotip RVD yang berbeda, dilakukan pengukuran efisiensi transkripsi relatif dari protein RVD endogen yang dibedakan dari genotip pada *Fok*1 RFLP (alela F dan f) dan *poly(A) stretch* dengan alela panjang (L) dan pendek (S). Protein RVD endogen kemudian bekerja sebagai faktor transkripsi untuk *1,25-dihydroxyvitamin D3-responsive reporter gene* (berisi VDRE gen osteokalsin tikus) yang *transfected* dalam sel. Penelitian ini memberikan bukti apa yang

dinamakan aktivitas RVD tinggi (dari genotip “FL”) dan rendah (dari genotip “fS”). Kemungkinan penjelasannya adalah perbedaan dalam aktivitas translasional (daripada stabilitas *mRNA*) dari varian *mRNA-3'UTR* yang berbeda. Penelitian lanjutan diperlukan untuk membuktikan asumsi tersebut. Penelitian ini juga mengilustrasikan pentingnya analisis polimorfisme multipel pada gen RVD dalam hubungan satu dengan lainnya (seperti diilustrasikan pada Gambar 2.10).

Pada tingkat lainnya, respon oleh genotip RVD telah dianalisis seperti perbedaan pada petanda serum (Tabel 2.4). Reseptor vitamin D kemudian diperkirakan bekerja pada gen responsif vitamin D, misalnya melalui *gene-specific VDREs*, yang mengakibatkan beberapa protein/fragmen protein dieskresi ke dalam sirkulasi. Tujuh belas penelitian tersebut termasuk beberapa petanda serum yang berbeda diperkirakan menjadi *vitamin D-specific*, seperti osteokalsin dan *parathyroid hormone (PTH)*. Osteokalsin telah dianalisis karena ini adalah sebuah *highly vitamin D-responsive gene* dan sering diukur dalam praktik klinis untuk memantau metabolisme tulang (untuk aktivitas pembentukan tulang). Walaupun 7 dari 17 penelitian tidak dapat mendeteksi perbedaan tingkat osteokalsin serum yang tergantung gen (atau petanda tulang lainnya), 8 penelitian melaporkan individu dengan haplotip BAt mempunyai tingkat osteokalsin lebih tinggi daripada haplotip baT, sementara 3 dari 17 penelitian memantau kecenderungan sebaliknya.



Gambar 2.10

Pentingnya *Gene-Wide Haplotypes* pada Gen RVD. Tiga *SNPs* Berbatasan pada Bagian yang Berbeda dari Gen RVD Diperlihatkan untuk Dua Individu A dan B.

Subjek A dan B Mempunyai Genotip Identik yakni Mereka Keduanya Heterozigot untuk Tiga *SNPs* Tersebut, tetapi Mereka Mempunyai Kombinasi Haplotip yang Berbeda: 1 + 2 untuk Subjek A, dan 3 + 4 untuk Subjek B. Area Promoter Mengatur Produksi *mRNA*, sementara 3' *UTR* Dilibatkan pada Stabilitas/Degradasi *mRNA*, dan Interaksi/Efek Kombinasinya Mengatur *Net Availability* dari *mRNA* untuk Translasi ke Dalam Protein RVD. Pada Kasus Ini, Contoh Diperlihatkan untuk Polimorfisme Promoter *Cdx2* yang Mempunyai Dua Alela A dan G, darinya Alela A adalah Varian yang Lebih Aktif pada Sel-Sel Intestinal. Untuk 3' *UTR*, Dipresentasikan Dua Varian Berbeda, Haplotip 1 dan Haplotip 2, Terdiri Dari Haplotip dari *Bsm – Apa – Taq RFLPs*. Haplotip 1 Diduga Lebih Aktif/Kurang *Unstable* Mengakibatkan Lebih Banyak Protein RVD Diproduksi. Protein RVD Dapat Terjadi pada Dua Varian: "f kecil" (Kurang Aktif, M1, 427 aa) dan "F besar" (Lebih Aktif, M4, 424 aa), dan Keduanya (A dan B) adalah Heterozigot untuk Polimorfisme Ini. Hasil dari Kombinasi Haplotip Ini adalah Bahwa Individu A Kurang Mempunyai Protein RVD Berisiko, yakni Varian f kecil, M1, Panjang 427 aa, daripada Individu B pada Sel Target. Ini Tidak Dapat Diprediksi dengan Analisis *SNPs* Tunggal dan/atau Hanya Melihat Genotip dari *SNPs* Individu, tetapi Hanya Terbukti pada Analisis *Gene-Wide Haplotypes* (Uitterlinden dkk., 2004)

Pola serupa dapat dibedakan bila kita menganalisis penelitian-penelitian yang menentukan respon *in vivo* terhadap pengobatan dengan genotip RVD (Tabel 2.5). Penelitian-penelitian tersebut termasuk analisis respon terhadap pengobatan dengan kalsitriol, kalsium, kortikosteroid, *hormone replacement therapy (HRT)*, dan etidronat dan responnya kebanyakan mengukur perubahan pada *BMD*. Empat dari 9 penelitian melaporkan respon untuk BA_T menjadi lebih baik daripada untuk ba_T. Tiga dari sembilan memperlihatkan efek berlawanan sementara 3 memperlihatkan tidak ada efek. Faktor-faktor yang menyulitkan untuk menginterpretasi penelitian-penelitian tersebut adalah perbedaan *endpoint* yang diukur dan perbedaan polimorfisme pada penelitian-penelitian kecil umumnya sangat mungkin kurang kuat memperlihatkan efek tersembunyi (*subtle effects*) (Uitterlinden dkk., 2004).

Jadi, bila kita melihat Tabel 2.4 dan 2.5, gambarannya masih sulit, tetapi rupanya ada kecendrungan haplotip BA_T (bertalian dengan alela *VNTR polyA* pendek) pada 3'UTR memperlihatkan respon sedikit lebih baik daripada haplotip ba_T (bertalian dengan alela *VNTR polyA* panjang). Bersama dengan penelitian *in vitro*, ada beberapa argumen menyatakan bahwa haplotip 2 (BA_T) umumnya memberi respon lebih baik daripada haplotip 1 (ba_T). Hal ini mungkin karena stabilitas *mRNA* dan waktu paruh sedikit lebih baik. Ini secara teoritis mengakibatkan lebih tingginya jumlah RVD yang ada pada sel-sel target dan dengan demikian memberikan sel target ini sebuah respon yang lebih baik terhadap vitamin D.

Tabel 2.4
Efek Fungsional Polimorfisme RVD Berdasarkan Beberapa Penelitian In Vivo^a
(Dikutip dari Uitterlinden dkk., 2004)

Polimorfisme	Petanda	Efek alela: kadar serum
Bsm, Apa, EcoRV	Osteokalsin (n = 91)	BA(t)>ba(T)
Bsm	Kalsitriol (n = 117)	B(At)>b(aT)
Bsm	Osteokalsin, ICTP (n =23)	B(aT)>B(At)
Bsm	Osteokalsin, kalsitriol (n = 154)	ND
Bsm Apa Taq	Osteokalsin, 25(OH), dll (n = 189)	B(At)>b(aT): NS trend ^b
Bsm	1,25(OH)2D (n = 229)	ND
Bsm	Osteokalsin, kalsitriol, ICTP (n = 21)	B(At)>b(aT)
Bsm Apa taq	Osteokalsin, BAP, 1,25(OH)2D (n =159, Jepang)	BAt>baT
Bsm Apa Taq	Osteokalsin, BAP, PICP, NTX (n =268, Cina)	ND
Bsm	Osteokalsin, kalsitriol (n = 38)	ND
Bsm	Osteokalsin, AlkPhosp, PICP (n =50)	B(At)>b(aT): NS trend
Bsm Apa Taq	Osteokalsin, kalsitriol, PTH (n = 103)	BAt>baT: NS trend untuk PTH, kalsitriol baT>BA: NS trend untuk osteokalsin
Bsm	Osteokalsin, kalsitriol	ND
Bsm	Osteokalsin, 25(OH), BAP (n = 200)	ND
Bsm, Fok1	Osteokalsin, PTH 25 (OH) (n = 372; n = 261)	ND
Bsm	Osteokalsin, PTH (n + 72, pria muda)	B(At)>b(aT)
Bsm Apa Taq	Ostokalsin, PTH, 1,25(OH)2D (n = 39 pria Afrika, n = 44 pria Kaukasia)	(b)a(T)>(B)A(t) untuk PICP

Catatan:

^a Penelitian menggunakan satu atau semua polimorfisme 3'
Huruf dalam tanda kurung merujuk pada polimorfisme yang tidak benar-benar diuji pada penelitian tetapi pendapat penulis berdasarkan struktur haplotip pada area 3'. Semua subjek adalah ras Kaukasia kecuali kalau disebutkan.

^bNS trend = nonsignificant trend; ND = no difference

Tabel 2.5
Efek Fungsional dari Polimorfisme RVD: Penelitian-Penelitian In Vivo Berupa Respon terhadap Pengobatan (Dikutip dari Uitterlinden dkk., 2004)

Polimorfisme	Pengobatan	Respon	
		<i>Serum markers</i>	<i>BMD</i>
<i>Bsm</i>	Kalsitriol, 7 hari (n=21)	b(a)T	-
<i>Bsm Apa Taq</i>	1 alfa OH-D3, 12 bulan (n=115)	-	baT>Bat
<i>Bsm</i>	Kalsitriol, 2th, (n=81)	ND	B(A)t>b(aT)
<i>Bsm</i>	Kalsium, 2 th, (n=229)	-	B(At)>b(aT)
<i>Bsm</i>	HRT, 3,5 th, (n=108)	-	B(aT)>B(At)
<i>Apa Taq</i>	HRT, 1 th, (n=82)	-	(ba)T>(BA)t
<i>Bsm Taq</i>	Kortikosteroid, > 1th, (n=263)	-	ND
<i>Bsm</i>	Etidronat, 1 th, (n=24)	-	B(At)>b(aT)
<i>FokI</i>	HRT, 1 th, (n=82)	-	ND

Catatan:

ND= no difference

Selain itu, sangat penting untuk menganalisis semua polimorfisme RVD yang diketahui dan hubungannya dalam eksperimen karena mereka akan berinteraksi dengan yang lainnya untuk menentukan ekspresi dan aktivitas RVD (Gambar 2.10). Ini telah diperlihatkan oleh Whitfield dkk. (2001) dan berikutnya diilustrasikan pada Gambar 2.10, yang “disorot” adalah interaksi dari *promoter-coding*, dan polimorfisme *3'UTR*. Pada sel aktif normal, beberapa polimorfisme promoter akan *join forces* dengan beberapa polimorfisme *UTR* dalam mengatur jumlah *mRNA* RVD yang tersedia dalam beberapa sel target. Mereka menentukan ekspresi varian-varian *FokI*, F dan f, yang merupakan (berbeda secara fungsional) protein-protein RVD yang bekerja, sebagai contoh, pada *VDREs* untuk mengaktifasi beberapa gen responsif vitamin D menjadi diekspresi. Pada contoh tersebut, subjek A dan B mempunyai genotip identik pada tiga polimorfisme (polimorfisme *Cdx2*, *FokI*, dan *Bsm – Apa – Taq 3' UTR*) tetapi hanya berbeda dalam kombinasi khusus alelanya pada kromosom (misalnya haplotip mereka). Ini

akhirnya mengakibatkan berkurangnya “aktivitas tinggi” protein RVD (misalnya mempunyai alela “F”) diekspresikan pada sel-sel dari subjek B, yang kemudian diharapkan memperlihatkan respon yang lebih rendah terhadap vitamin D. Kasus ini melibatkan varian promotor *Cdx2* dan perbedaan antara subjek diharapkan pada tingkat absorpsi kalsium pada sel-sel intestinal. Bila hanya satu polimorfisme akan diuji pada percobaan biologik sel, ini tidak akan terdeteksi (kecuali kalau kelompok genotip sangat besar akan dianalisis untuk mendeteksi perbedaan tersembunyi dari individu). Jadi, tidak mengontrol kompleksitas yang mendasari polimorfisme RVD, yakni dengan tidak menganalisis polimorfisme multipel dan haplotipnya, dapat juga membantu menjelaskan hasil yang bertentangan dari percobaan-percobaan fungsional *in vitro* dan *in vivo*.

2.2.1.2.6 *Linkage disequilibrium* dan haplotip

Linkage disequilibrium menggambarkan hubungan (atau kejadian yang bersamaan/*co-occurrence*) alela dari polimorfisme yang berbatasan satu sama lainnya (Wall dan Prichard, 2003). Ini berarti bahwa satu polimorfisme dapat memprediksi *the other adjacent linked one* atau adanya satu tipe polimorfisme bisa dipakai sebagai indikasi adanya polimorfisme lain yang berkaitan dengannya. Ini nyata karena sangat sedikit terjadi gabungan kembali di antara mereka selama evolusi (Khan dkk., 2014). *Linkage disequilibrium* ada pada kasus *TaqI* dan *poly(A)* karena keduanya terjadi dengan rasio serupa pada kelompok etnis yang berbeda (Tabel 2.5), yang mendapatkan alela T *TaqI* pada orang Asia adalah 8%, pada orang Kaukasia 43%, dan orang Afrika 31%. Hasil serupa didapat untuk

alela S *poly(A)* dengan hasil 12% untuk orang Asia, 41% orang Kaukasia, dan 29% orang Afrika (Uitterlinden dkk., 2004).

Linkage disequilibrium tingkat tinggi pada beberapa area akan serupa dengan sejumlah terbatas dari haplotip pada area tersebut. Haplotip memblok alela terkait dari polimorfisme yang berbatasan yang mana panjang dari blok tersebut serupa dengan kekuatan *LD* sepanjang area. Gabriel dkk. (2002) menganalisis polimorfisme sepanjang area 51 autosomal pada genom manusia, terbukti bahwa blok haplotip tersebut ada pada genom manusia. Ukuran blok haplotip dapat bervariasi antara 5 sampai >50 kb dengan rerata sekitar 10-20 kb. Itu berarti bahwa alela haplotip sering dapat ditemukan yang mencakup variasi polimorfik pada area tersebut. Ini juga berarti bahwa secara relatif sedikit polimorfisme yang harus *digenotyping* untuk menemukan varian pada beberapa area.

Linkage disequilibrium dan struktur haplotip dari beberapa gen kandidat adalah penting untuk menganalisis hubungan, untuk memahami bagaimana variasi polimorfik pada gen tersebut dapat menyumbang risiko penyakit dan varian populasi dari beberapa fenotip yang menarik perhatian (*phenotypes of interest*). Bila beberapa alela dari sebuah polimorfisme ditemukan berhubungan dengan-sebut-risiko untuk fraktur, hubungan ini bisa dijelaskan dengan efek dari alela khusus ini, tetapi juga-karena *LD* dan struktur haplotip-oleh satu atau lebih alela lainnya yang terjadi dikaitkan dengan alela ini dalam haplotip. Sekali kita tahu haplotip mana membawa alela yang berisiko ini, kita dapat menentukan dengan

analisis biologikal sel dan analisis fungsional biologikal molekul, varian mana pada alela haplotip tersebut benar-benar menyebabkan efek.

Berdasarkan beberapa polimorfisme yang diketahui seperti diperlihatkan pada Gambar 2.7 atau 2.8, beberapa studi telah menganalisis perluasan *LD* sepanjang gen *RVD*. Karena analisis tersebut digunakan hanya untuk sejumlah kecil polimorfisme, informasi akurat tentang *LD* dan haplotip menjadi sangat terbatas. Walaupun demikian, *LD* kuat pada 3' akhir dari gen telah terpantau awal pada *BsmI*-, *ApaI*-, *EcoRV*-, dan *TaqI*-*RFLP* (Morrison dkk., 1994).

Berdasarkan informasi di atas dilakukanlah langkah berikutnya untuk menjelaskan haplotip molekular dari *RFLP* tersebut (Uitterlinden dkk., 1996). Mereka mengidentifikasi lima alela haplotip pada sebuah populasi Kaukasia dalam jumlah besar, darinya haplotip 1 (baT; 48%) dan 2 (BAAt: 40%) adalah yang tersering dan sesuai/cocok dengan satu yang telah diidentifikasi oleh Morrison dkk., 1994. Sejalan dengan ini, *LD* kuat juga didapat di antara *BsmI* *RFLP* dan *the polyA variable number of tandem repeat (VNTR)* pada *the 3' UTR* (Ingles dkk., 1997a). Polimorfisme yang belakangan paling tidak mempunyai 12 alela yang berbeda (dalam 627 subjek yang dianalisis oleh Ingles dkk., 1997a pada lima kelompok etnis), tetapi distribusi ukuran alela dari *polyA VNTR* secara esensial mengikuti distribusi bimodal. Pola ini dapat digolongkan sebagai bi-alela dan bahwa subjek dapat diklasifikasikan mempunyai alela dengan *short or long polyA stretches*.

Ingles dkk. (1997a) melaporkan kaitan yang kuat antara alela "b" dengan sebuah *long polyA stretch* dan alela "B" dengan sebuah *short polyA stretch*.

Gabungan hasil Morrison dkk. (1994), Uitterlinden dkk. (1996), dan Durin dkk. (1999), menyimpulkan bahwa *Bsm – Apa – Taq* haplotip 1 (baT) dikaitkan dengan sejumlah besar dari “A”s pada *the polyA VNTR* (n=18-24) sementara haplotip 2 (BA_T) dikaitkan dengan sejumlah kecil dari A’s (n=13-17) (Gambar 2.9). Beberapa penelitian memperlihatkan bahwa tidak ada pertalian polimorfisme *FokI* dengan polimorfisme RVD lainnya.

2.2.1.2.7 Variasi etnis polimorfisme gen reseptor vitamin D

Ras Kaukasia merupakan etnis terbanyak dilakukan identifikasi polimorfisme RVD, sedangkan etnis lainnya masih kurang. Untuk ras Asia, polimorfisme gen RVD yang banyak dijumpai adalah *Apa1*, *Fok1*, dan *Cdx2*. Lima puluh satu persen etnis Asia, 34% etnis Kaukasia, dan 24% etnis Afrika mempunyai gen RVD *Fok1* (Tabel 2.6)(Uitterlinden dkk., 2004).

Pada umumnya semua polimorfisme dimulai dari mutasi yang terjadi mungkin karena kerusakan DNA, dan kemudian mereka tumbuh frekuensinya pada populasi dan menjadi polimorfisme sejati. Jadi perbedaan frekuensi alela antara kelompok etnis sangat mungkin akibat dari proses evolusioner dan perilaku genetik populasi. Pakem yang sama benar untuk *LD* antara polimorfisme dan struktur haplotip. Terlihat pola kompleks antara kelompok etnis yang tidak dapat diperoleh dari perbedaan frekuensi dari polimorfisme-polimorfisme gabungan individu. Ini mungkin karena eksistensi dari kumpulan alela yang berbeda bersama membentuk haplotip sepanjang 3’ akhir dari gen RVD.

Tabel 2.6
Sebaran Polimorfisme RVD Berdasarkan Tiga Etnis
(Uitterlinden dkk., 2004)

Polimorfisme RVD	Alela minor	Kelompok etnis (%)		
		Kaukasia	Asia	Afrika
Polimorfisme individu				
<i>Cdx2</i>	A	19	43	74
<i>Fok1</i>	f-T	34	51	24
<i>Bsm1</i>	B	42	7	36
<i>Apal</i>	A	44	74	31
<i>Taq1</i>	T	43	8	31
<i>PolyA</i>	Short n=13-17	41	12	29
Haplotip <i>Bsm-Apa-Taq</i>				
	baT: haplotip 1	43	75	26
	BAt: haplotip 2	39	7	16
	bAT: haplotip 3	11	17	59

Polimorfisme fungsional individu bisa mempunyai efek fungsional sama pada kelompok etnis yang berbeda karena peranan fisiologi sistem endokrin vitamin D tidak akan jauh berbeda antara kelompok etnis. Frekuensi alela antara kelompok etnis berkorelasi dengan perbedaan insiden penyakit atau fenotip antara kelompok. Untuk polimorfisme-polimorfisme nonfungsional atau anonim, situasinya berbeda karena di sini kita mengandalkan LD yang dideteksi dari polimorfisme untuk menjelaskannya dengan penyakit. Selain itu, seperti yang diperlihatkan oleh haplotip *Bsm - Apa - Taq* pada Tabel 2.6, frekuensi petanda haplotip tersebut (terdiri dari polimorfisme nonfungsional yang merupakan petanda alela fungsional di tempat lain) sangat berbeda antara kelompok etnis. Alela-alela khusus yang akan dikaitkan dengan haplotip-haplotip individu mungkin sangat berbeda. Sebagai contoh, haplotip 1 didapat berhubungan dengan etnis Kaukasia dan juga Afrika, ini bisa karena berkaitan dengan alela fungsional yang sangat berbeda. Secara alternatif, jika sebuah hubungan dari petanda haplotip terlihat pada Kaukasia tetapi tidak, misalnya pada

Asia, ini dapat dijelaskan karena LD antara petanda dan alela fungsional berbeda antara kelompok. Sukar memahami sepenuhnya konsekuensi variasi alela karena etnis, juga karena faktor lingkungan yang sangat berbeda antara kelompok etnis seperti misalnya diet dan latihan. Tambahan pula, ada latar belakang genetik yang sangat berbeda (yaitu, sisa dari genom dan variasi genetik) antara kelompok etnis di mana polimorfisme RVD tersebut berinteraksi satu dengan lainnya dan dengan varian genetik lain dari gen-gen yang lain (Uitterlinden dkk., 2004).

2.2.1.2.8 Kondisi-kondisi kesehatan yang berhubungan dengan perubahan gen reseptor vitamin D

Beberapa kondisi kesehatan yang berhubungan dengan perubahan gen RVD antara lain: riketsia (Genetic Home Reference, 2014), osteoporosis (Mohammadi dkk., 2014), TB (Wilkinson dkk., 2000; Roth dkk., 2004; Kang dkk., 2011), lepra (Roy dkk., 1999; Fitness dkk., 2002; Fitness dkk., 2004), IRA-B (Roth dkk., 2008b), HIV (Barber dkk., 2001; De la Torr dkk., 2008), kanker payudara (Barroso dkk., 2008), melanoma maligna (Barosso dkk., 2008; Zeljic dkk., 2014), kanker sel skuamosa (Bikle dkk., 2005), kanker prostat (Bai dkk., 2009), kanker kolorektal (Flugge dkk., 2007), hipertensi esensial (Swapna dkk., 2011), diabetes melitus tipe 2 (Bid dkk., 2009; Mackawy dan Badawi, 2014), fisiologi paratiroid (Meir dkk., 2009), sistem imun (van Etten dkk., 2007), dan penyakit degeneratif (Chen dkk., 2012; Colombini dkk., 2014).

2.2.1.3 Katelisin

Peptida antimikrobia (PAM) merupakan molekul efektor dari sistem imun alamiah yang memegang peranan sentral dalam pertahanan sebagai antimikrobia. Katelisin merupakan salah satu jenis PAM (Zanetti, 2004), merupakan peptida molekul kecil (terdiri dari 12-100 asam amino) yang mempunyai aktivitas antimikrobia spektrum luas, diperkirakan mempunyai fungsi dalam sistem imun alamiah, sebagai pertahanan pertama melawan mikroorganisme (Nizet dan Gallo, 2003).

Manusia dan tikus mempunyai satu katelisin, sedangkan sapi dan babi mempunyai beberapa katelisin (Ramanathan dkk., 2002). Katelisin manusia dan tikus disandi oleh gen yang serupa dan mempunyai struktur α -heliks, spektrum antimikrobia, serta distribusi di jaringan yang serupa sehingga katelisin tikus sering dipakai sebagai analisis *in vivo* katelisin manusia (Pestonjamas dkk., 2001).

Katelisin pada manusia disebut *human cathelicidin anti-microbial protein (hCAP)* yang terdiri dari sebuah domain C-terminal aktif yang terdiri dari 37 asam amino sehingga disebut juga LL-37 yang mencerminkan panjang dari residu 37 asam amino dengan residu 2 leusin (Larrick dkk., 1995; Zanetti, 2004). *Human cathelicidin anti-microbial protein* mempunyai massa molekul 18 kDa sehingga disebut juga *hCAP18* (Larrick dkk., 1995; Tomasinsig dan Zanetti, 2005). Studi *in vitro* telah mengkonfirmasi peranan antiinfeksi dari *hCAP18* maupun hubungannya yang erat dengan metabolisme vitamin D dan mekanisme lainnya dari imunitas alamiah (Zanetti, 2004).

2.2.1.3.1 Struktur molekular *hCAP18*

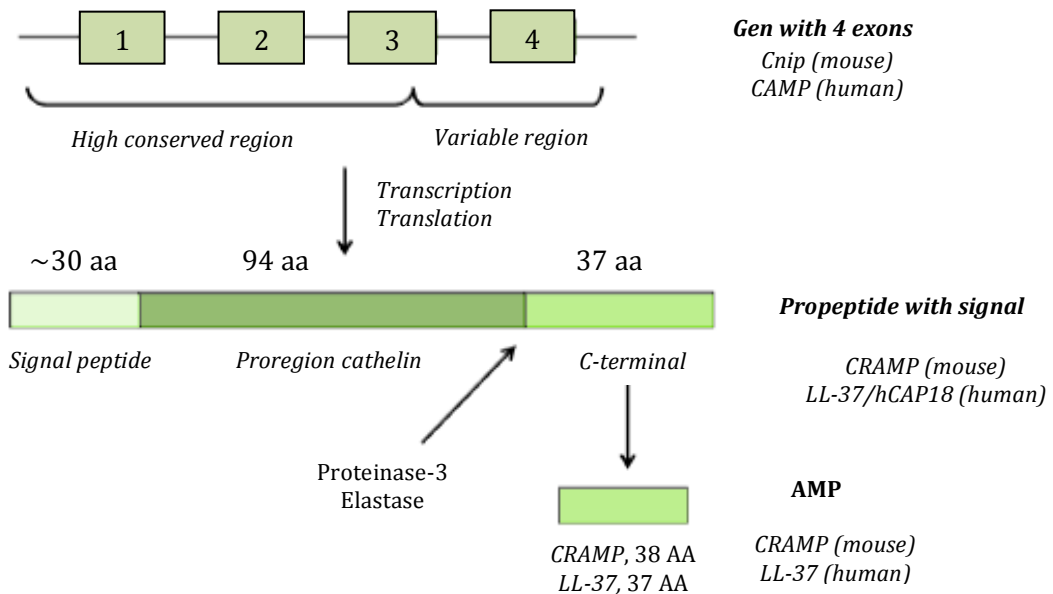
Human cathelicidin anti-microbial protein mempunyai massa molekul 18 kDa sehingga disebut juga *hCAP18* (Larrick dkk., 1995; Tomasinsig dan Zanetti, 2005) dengan struktur α -helikal dengan 2 jembatan disulfida terletak di antara 2 molekul sistein (C85-C96 dan C107-C124) (Tomasinsig dan Zanetti, 2005). Molekul *hCAP18* berisi domain N-terminal tidak aktif (yang merupakan lokasi katelin) dan C-terminal PAM (LL-37) (Gallo dan Nizet, 2008). Katelin adalah domain tidak aktif dari ketelisin, diaktivasi oleh kerja serin protease untuk memunculkan domain multifungsional yang sangat spesifik (Zanetti, 2004). Katelin merupakan sebuah protein dari *procine neutrophils* yang menghambat *protease cathepsin L* (karenanya disebut *cath-e-L-in*) (Gennaro dan Zanetti, 2000).

Setelah aktivasi *hCAP18*, LL-37 dilepas ke plasma, selanjutnya aktivitas antimikrobal diperankan oleh struktur α -helikal. Komposisi ionik, pH atau kadar garam di lingkungannya memengaruhi struktur α -helikal mengganggu aktivitas antibakterial dari LL-37. Pada pH plasma yang lebih tinggi, struktur α -helikal akan terpelihara dan menjamin aktivitas mikrobial peptida. Pada keadaan dengan $\text{pH} < 7,2$, peptida sebagian besar membuka dan tidak aktif. *Human cathelicidin antimicrobial protein* mempunyai struktur amfilik dengan fragmen hidrofobik dan hidrofilik yang memungkinkan interaksinya baik di lingkungan encer (*aqueous*) maupun membran lipid (Gallo dan Nizet, 2008).

2.2.1.3.2 Struktur genetik *hCAP18*

Struktur genetik *hCAP18* dengan panjang 2 kb terdiri dari 4 ekson dan 3 intron seperti yang terlihat pada Gambar 2.11 (Zanetti dkk., 1995). Ekson 1-3 menyandi sinyal peptida dan domain katelin, sedangkan ekson ke-4 menunjukkan tempat yang dibelah dan muncul peptida aktif LL-37 (Zanetti dkk., 2000; Scott dkk., 2002). Proteolitik memecah molekul prekursor tidak aktif untuk melepaskan PAM C-terminal matur dari prodomain katelin yang dikerjakan oleh elastase (Panyutich dkk., 1997) atau proteinase-3 (Sorensen dkk., 2001) pada saat degranulasi dari neutrofil yang teraktivasi (*activated neutrophils*).

Gen *cathelicidin anti-microbial peptide (CAMP)* terletak pada kromosom 3 (3p21) dekat gen-gen lainnya yang mempunyai fungsi sama seperti gen untuk *macrophage colony stimulating factor 1* (sebuah sitokin antivirus), gen untuk *hepatocyte growth factor like protein* (sebuah faktor multifungsional yang diperlukan dalam reparasi jaringan dan angiogenesis), gen untuk *collagen VII alpha-1 polypeptide* (sebuah protein yang bertanggung jawab untuk integritas jaringan), dan gen gen untuk *natural killer-tumour recognition* (sebuah molekul yang terlibat dalam aktivitas limfosit *T-killer*). Berdasarkan sebuah studi, *hCAP18 up-regulates* 49 gen, mengontrol ekspresi beberapa kemokin atau reseptor kemokin (*CXCR-4, CCR2*) dan beberapa sitokin (IL-8) (Scott dkk., 2002). Transkripsi *CAMP* ditingkatkan selama infeksi bakteri, virus, jamur atau protozoa. Kalsitriol [1,25(OH)₂D] adalah penginduksi transkripsi katelisinid mRNA yang sangat kuat (Jeng dkk., 2009).



Gambar 2.11

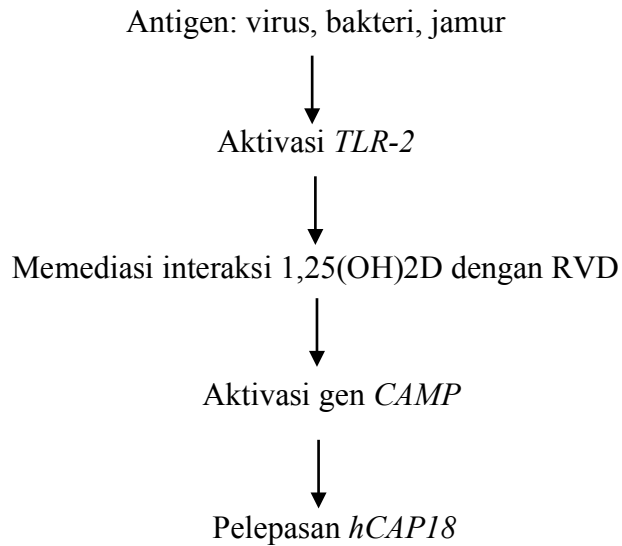
Struktur dasar katelisinidin LL-37/hCAP 18 untuk manusia dan CRAMP tikus. Manusia dan tikus mengekspresikan katelisinidin tunggal yang disandi oleh gen dan struktur alfa-heliks serupa. Katelisinidin disintesis sebagai sebuah protein prekursor tidak aktif dengan sebuah *amino-terminal signal sequence*, sebuah domain katelin sentral, dan sebuah domain PAM karboksi-terminal tidak aktif (Zanetti dkk., 1995)

2.2.1.3.3 Sintesis dan regulasi pelepasan hCAP18

Human cathelicidin anti-microbial protein 18 disintesis oleh sejumlah sel seperti sel-sel polimorfonuklear (PMN), monosit, limfosit, mastosit, dan sel-sel epitel seperti keratinosit atau sel-sel saluran cerna, saluran respiratori, dan endotelium genitalia. Pada orang sehat, kadar plasma hCAP18 antara 50-80ng/mL. *Human cathelicidin anti-microbial protein 18* disintesis dan disimpan sebagai sebuah preproprotein. Adanya rangsangan antigen, prekursor secara enzimatik membelah peptida terminal LL-37 yang merupakan domain aktif secara biologis, kemudian LL-37 dilepas ke plasma, ruangan ekstraselular atau ke saliva, susu, sekresi sudaripera, cairan seminal, dan amnion. *Human cathelicidin anti-*

microbial protein 18 mempunyai peran penting dalam pertahanan alamiah yang cepat melalui sintesis pada sel-sel pengawal (*sentinel cells*) seperti sel-sel epitel dan endotel, maupun pelepasan yang cepat ke dalam plasma oleh sel-sel darah setelah stimulasi spesifik.

Vitamin D memediasi sintesis *hCAP18* melalui ekspresi RVD. Molekul-molekul mikrobial seperti asam lipoteikoat, peptidoglikan, dan lipopolisakarida atipikal dari spesies *Leptospira* dan *Porphyromona gingivalis*, lipomanan dari famili mikobakteria, sejumlah antigen virus dan jamur, mengaktivasi *toll-like receptors 2 (TLR-2)*, kemudian reseptor ini akan mencetuskan respon yang dimediasi oleh vitamin D berupa interaksi antara 1,25(OH)₂D dengan RVD. Interaksi ini akan mengaktivasi gen *CAMP* untuk mengekspresikan *hCAP18*. Peningkatan atau penurunan ekspresi RVD akan mengubah kadar *hCAP18*. Pada keadaan adanya rangsangan oleh infeksi, kadar vitamin D juga meningkatkan ekspresi *TLR-2*, memungkinkan peningkatan respon terhadap aktivasi *TLR*. Beberapa polimorfisme gen yang menyandi *TLR-2* atau RVD berperan terhadap terjadinya sepsis yang serius yang disebabkan oleh bakteri Gram positif atau infeksi oleh mikobakterium. Bukti ini menempatkan vitamin D sebagai faktor terpenting dalam regulasi *hCAP18* dan dapat menjelaskan kerja antimikrobia yang dihubungkan dengan vitamin D (Gombart dkk., 2005; Peric dkk., 2008). Secara skematis sintesis *hCAP18* terlihat pada Gambar 2.12.



Gambar 2.12
Proses Sintesis *hCAP18*

2.2.1.3.4 Mekanisme kerja *hCAP18*

Human cathelicidin anti-microbial protein 18 mempunyai kerja yang multipel. Beberapa studi melaporkan kerja *hCAP18* adalah sebagai berikut: aktivitas antimikrobia (Travis dkk., 2000), aktivitas kemotaktik PMN, monosit, limfosit, dan mastosit (De Yang dkk., 2000), pelepasan histamin oleh sel mast (Niyonsaba dkk., 2002), stimulasi ekspresi gen (Scot dkk., 2002), aktivitas antitoksik dengan berikatan dengan lipopolisakarida yang merupakan endotoksin basil Gram negatif (Scott dkk., 2002), angiogenesis (Koczulla dkk., 2003), aktivasi sel-sel epitel selama trauma dan reepitelisasi kulit selama infeksi kulit (Heilborn dkk., 2003), dan regulasi diferensiasi sel dendritik (Davidson dkk., 2004).

2.2.1.3.5 Mekanisme kerja anti-infeksi *hCAP18*

Sebagai antimikrobal melawan virus, bakteri, dan jamur, kerja *hCAP18* cepat dan tidak selektif. *Human cathelicidin anti-microbial protein 18* memperlihatkan efek yang berbeda pada kadar yang berbeda. Untuk bakteri Gram positif, efek antibakterial terlihat pada kadar $0,75\mu\text{M}$, sedangkan untuk Gram negatif pada kadar $>5\mu\text{M}$, dan untuk aktivitas kemotaktik pada kadar $10\mu\text{M}$. Kadar $>15\mu\text{M}$ bersifat sitotoksik dan perlu secara cepat di-non-aktifkan dengan berikatan dengan lipoprotein plasma (apolipoprotein A). Efek antibakteri *hCAP18* berhubungan dengan keadaan lingkungan fisik dan kimiawi, dan juga ditingkatkan oleh imunomodulator dan aktivitas yang berhubungan dengan kemotaktik (Zaiou dan Gallo, 2002).

Penelitian tentang katelisinidin pada dewasa oleh Gombart dkk. (2009) melaporkan bahwa katelisinidin kadar rendah di sirkulasi berhubungan dengan lebih tingginya angka kematian akibat penyakit infeksi [RO=3,7 (IK95% 1,2 sampai 11,2)]. Penelitian lain dengan desain kohort yang dilakukan pada orang dewasa penderita pneumonia, sampel dipilih secara *convenient*, dilakukan pada musim dingin, melaporkan bahwa baik katelisinidin maupun β -defensin-2 tidak bisa memprediksi kematian. Sebaliknya dengan vitamin D, kadar 25(OH)D <30 nmol/L meningkatkan risiko kematian dibanding kadar 25(OH)D >50 nmol/L dengan RO=12,7 (IK95% 2,2 sampai 73,3) (Leow dkk., 2011). Hasil ini tidak konsisten dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Gombart dkk. (2009). Penelitian ini mempunyai kelemahan yaitu pengambilan sampel secara *convenient*.

Peneliti lain mendapatkan adanya korelasi positif antara kadar katelisinidin dengan kadar vitamin D di sirkulasi pada dewasa sehat (Dixon dkk., 2012).

2.2.1.3.5.1 Peranan *hCAP18* pada infeksi virus

Human cathelicidin anti-microbial protein 18 langsung berinteraksi dengan reseptor virus (Tamamura dkk., 1996), membran lipid, *envelope* virus, dan *DNA virus* (Jenssen dkk., 2006), selanjutnya *immune modulating action*-nya disertai oleh *up-regulating action* dari interferon dan kemokin (Bowdish dkk., 2005). Mekanisme tersebut mencegah masuknya sel virus dan sintesis virus yang bersamaan dengan lisisnya sel yang terinfeksi. Kerja antivirus sulit dinilai pada percobaan karena sulitnya menyelidiki/mengeksplorasi *complex immune modulating action* yang diperankan oleh *hCAP18* pada pertahanan antivirus.

Mekanisme spesifik *hCAP18* dalam hal aktivitas antivirus melawan *RSV* masih belum jelas. *Human cathelicidin anti-microbial protein 18* mempunyai aktivitas antivirus melawan infeksi *RSV* dengan cara langsung memengaruhi partikel *RSV* dan/atau bekerja pada sel epitel dengan mengurangi kepekaan epitel terhadap infeksi *RSV*. Di samping itu, *hCAP18* mempunyai efek proteksi terhadap efek sitopatik dari *RSV* dan menghambat penyebaran partikel-partikel infeksius yang baru terbentuk (Currie dkk., 2013).

Untuk virus influenza, *hCAP18* bekerja langsung pada virion virus influenza, menekan inflamasi berlebihan dengan mengurangi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β dan GM-CSF (Barlow dkk., 2011). Selain itu, *hCAP18* akan merusak membran virus influenza (Tripathi dkk., 2013).

Human cathelicidin anti-microbial protein 18 dan PAM lainnya menghambat replikasi *HIV* (Nakashima dkk., 1993; Cole, 2003; Wang dkk., 2004). Sintesis *hCAP18* secara eksperimen juga dibuktikan pada keratinosit yang sebelumnya terinfeksi virus vaksinia (Howell dkk., 2004), sel yang terinfeksi lentivirus (Steinstraesser dkk., 2005), atau virus herpes simpleks (Howell dkk., 2006). Kadar *hCAP18* dan defensin yang tinggi dilaporkan tinggi pada infeksi *human papillomavirus* seperti *condyloma acuminata* dan veruka vulgaris, dua infeksi dengan risiko keganasan yang tinggi (Buck dkk., 2006). Masih diperlukan penelitian tambahan untuk memahami kerja *hCAP18* pada infeksi virus lainnya.

2.2.1.3.5.2 Peranan *hCAP18* pada infeksi bakteri

Sebagai antimikrobia, *hCAP18* memerlukan *minimum inhibitory concentration* (MIC) antara 1-50 μ m, tergantung pada spesies yang diuji. Kerja melawan bakteri Gram positif lebih baik daripada melawan bakteri Gram negatif. *Minimum inhibitory concentration* bervariasi, untuk Streptokokus grup A adalah 16 μ M, Streptokokus grup B sebesar 32 μ M, dan Streptokokus grup C sebesar 16 μ M (Dorschner dkk., 2001); sedangkan hasil tes *in vitro* terhadap bakteri Gram negatif hasilnya sebagai berikut ini: *P. aeruginosa* sebesar 12,5 μ M, *E. coli* sebesar 25 μ M, dan *K. pneumoniae* sebesar 50 μ M. Beberapa spesies yang sangat resisten seperti *S. aureus*, *P. aeruginosa*, dan *E. coli*, (Travis dkk., 2000), *S. epidermidis* dan *E. faecalis* (Smeianov dkk., 2000) ternyata sensitif terhadap *hCAP18*. Beberapa *agent* patogen yang sensitif terhadap *hCAP18* pada percobaan *in vitro* diperlihatkan pada Tabel 2.7, sedangkan fungsi katelisinidin dalam pertahanan

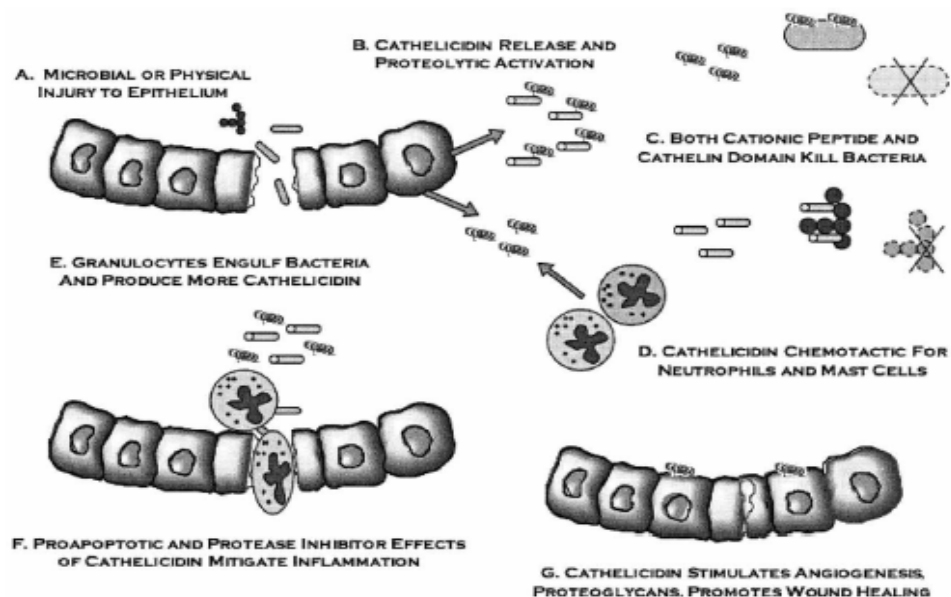
alamiah melawan infeksi bakteri diperlihatkan pada Gambar 2.13. *Human cathelicidin anti-microbial protein 18* dapat berikatan dengan asam lipoteikoat maupun lipoarabinomanan, mencegah aktivasi makrofag pada infeksi stafilokokus dan tuberkulosis (Scott dkk., 2002). Pada kasus-kasus tertentu, beberapa enzim proteolitik dari bakteri yang resisten dapat merusak *hCAP18* maupun PAM lainnya (Schmidtchen dkk., 2002).

Tabel 2.7

Beberapa Agent Patogen yang Sensitif terhadap Kerja *hCAP18* (Alexandra, 2009)

Bakteri	Virus	Jamur, protozoa, dan Klamidia
<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Shigella</i> genus, <i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> , Streptokokus grup A, B, dan C, <i>L. monositogenes</i> , <i>Enterococcus species</i> , Aktinobasilus, <i>Capnocytophagia</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Prevotella</i> , <i>H. pilori</i> , <i>N. meningitidis</i>	<i>HIV</i> , <i>Herpes simpleks virus</i> , <i>Human papilloma virus</i> , <i>Vaccinia virus</i> , <i>Lentiviruses</i> , <i>Adenoviruses</i>	<i>C. albicans</i> , <i>T. cruzi</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>C. Pneumoniae</i>

Selain efek bakterisidal dengan merusak membran bakteri, *hCAP18* juga dapat menetralkan LPS yang diproduksi oleh bakteri Gram negatif, proteksi terhadap syok endotoksik melalui tiga mekanisme (Golec, 2007): [1] menghambat reseptor sel-sel dendritik *TLR-4*, jadi mencegah aktivasinya dan respon terhadap LPS, [2] memblok pelepasan *TNF- α* pada tingkat limfosit *CD14*, dan [3] memblok senyawa lainnya pada proses inflamasi seperti *nitric oxide*, *tissue factor*, *PGE2*, kemokin, dll.



Gambar 2.13

Fungsi Biologik yang Multipel dari Katelisinidin yang Berfungsi Sebagai Pertahanan Alamiah pada Permukaan Epitel Inang Melawan Infeksi Bakteri (Nizet dan Gallo, 2003)

Netralisasi LPS diharapkan pada konsentrasi minimum 12,5µg/mL. Peranan antibakterial *hCAMP18* dibuktikan pada tikus yang dikosongkan gen *CAMP*-nya (*knockout mice*) ternyata tikus tersebut sering menderita infeksi pada kutaneus (Nizet dkk., 2001), saluran cerna (Imura dkk., 2005), saluran kemih (Chromek dkk., 2006), sepsis, meningitis (Bergman dkk., 2006), dan keratokongjungtivitis (Huang dkk., 2007). Perubahan kadar *hCAMP18* telah terpantau pada beberapa penyakit kulit seperti psoriasis, *rosacea*, dan dermatitis atopik (Ong dkk., 2002; Schaubert dan Galo, 2007), serta infeksi saluran respiratori dan saluran kemih (Chromek dkk., 2006; Ginde dkk., 2009a).

Bila *hCAMP18* dan defensin tidak ada secara kongenital maka akan terjadi sindrom Kosmann (neutropenia kongenital berat). Ini ditransmisikan secara autosomal resesif dan terdiri dari defisiensi mielosit matur untuk mengekspresikan

hCAP18 dan defensin (Putsep dkk., 2002). Pada kasus-kasus tersebut jumlah normal PMN tidak cukup untuk mencegah infeksi berat berulang dan periodontitis (Zanetti, 2005).

2.2.1.3.5.3 Peranan *hCAP18* pada infeksi mikobakterium

Sel-sel epitel dan makrofag alveoli bertindak sebagai pertahanan pertama pada infeksi tuberkulosis. Infeksi mikobakterium pada sel-sel tersebut akan menginduksi PAM termasuk *hCAP18* yang memiliki peranan mikobakterisidal secara langsung dengan menembus membran sel mikobakteria. Sintesis *hCAP18* pada infeksi *M. tuberculosis* dibuktikan pada percobaan pada beberapa tipe sel (sel epitel, neutrofil, makrofag alveoli, dan *monocyte-derived macrophages*) (Rivas-Santiago dkk., 2008).

2.2.1.3.5.4 Peranan *hCAP18* pada infeksi jamur

Human cathelicidin anti-microbial protein 18 diinduksi pada keratinosit selama infeksi dermatofita seperti *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum* atau infeksi jamur invasif (*C. albicans*). Hanya sedikit penelitian yang meneliti peranan *hCAP18* pada infeksi jamur. Karena itu, kebanyakan infeksi kulit superfisial dihubungkan dengan adanya *hCAP18* pada keratinosit dan sekresi sudoral (Lopez-Garcia dkk., 2005).

2.2.1.4 Umur

Umur balita merupakan faktor risiko pneumonia atau bronkiolitis. Hal ini berkaitan dengan respon imun yang belum berkembang sempurna pada usia balita bahkan sampai usia tujuh tahun (Jaspan dkk., 2006). Selain itu bayi yang lahir kurang bulan berisiko mengalami defisiensi vitamin D (Misra dkk., 2008).

2.2.1.5 Jenis kelamin

Jenis kelamin berhubungan dengan bronkiolitis dan didapatkan bahwa jenis kelamin laki-laki memiliki angka kejadian yang lebih tinggi dibanding perempuan dengan rasio 1,25-1,50:1 (Wright dkk., 2002; DeNicola dkk., 2013). Hal ini dikaitkan dengan diameter saluran respiratorius yang relatif lebih kecil pada anak laki-laki pada usia-usia awal dibanding anak perempuan sehingga bila pada anak laki-laki terjadi penebalan dinding saluran respiratorius yang sama dengan anak perempuan akan menyebabkan penyempitan saluran respiratorius yang lebih nyata pada anak laki-laki yang akhirnya akan mengakibatkan penyakit ini lebih manifes secara klinis (Falagas dkk., 2007).

2.2.1.6 Status nutrisi

Status nutrisi ditetapkan berdasarkan perhitungan BB aktual dengan BB ideal, yang menurut Waterlow diklasifikasi sbb (Waterlow, 1972): [1] Gizi buruk bila nilainya <70%, [2] Gizi kurang bila nilainya 70-90%, [3] Gizi cukup bila nilainya 90-110%, [4] Gizi lebih bila nilainya >110-120%, dan obesitas bila nilainya >120%.

Anak yang menderita malnutrisi akan mengalami defisiensi imun sehingga mudah menderita penyakit termasuk pneumonia/bronkiolitis. Demikian juga sebaliknya, anak yang menderita pneumonia/bronkiolitis bisa mengalami kehilangan nutrien sehingga terjadi gangguan imunitas (Neidzwiecki dan Rath, 2014). Pada obesitas, defisiensi vitamin D terjadi karena vitamin D diasingkan pada jaringan lemak akibat adanya ikatan yang ketat antara vitamin D dengan jaringan lemak (Kim, 2013).

2.2.1.7 Palsi serebral

Pada penderita palsi serebral terjadi gangguan klirens mukosilia saluran respiratori sehingga memudahkan penderita mengalami IRA-B (Sectish dan Prober, 2004). Diagnosis palsi serebral ditegakkan bila dijumpai kelainan gerak dan postur yang tidak progresif, dapat berupa diplegia spastik, kuadriplegia spastik, hemiplegia, atetoid atau diskinetik (Johnston, 2011).

2.2.1.8 Riwayat bayi berat lahir rendah

Bayi berat lahir rendah adalah bayi yang lahir dengan berat lahir di bawah 2.500 gram tanpa memandang masa kehamilan (MK) (Damanik, 2008). Bayi dengan riwayat BBLR (mungkin disebabkan oleh kurang nutrisi saat masih intrauterin) secara anatomis memiliki saluran respiratorius yang relatif lebih sempit dibanding bayi yang tidak mengalami BBLR sehingga manifestasi klinisnya lebih nyata (Lewis dkk., 1995).

2.2.1.9 Riwayat bayi kurang bulan

Bayi kurang bulan adalah bayi yang lahir dengan MK di bawah 37 minggu (Damanik, 2008). Pada BKB dihubungkan dengan paru bayi yang belum sepenuhnya berkembang, baik secara anatomis maupun imunologis. Imaturitas ini bisa membuat anak lebih peka terhadap paparan (Jaakkola dkk., 2006). Selain itu bayi yang lahir kurang bulan berisiko mengalami defisiensi vitamin D (Misra dkk., 2008).

2.2.1.10 Asma

Diagnosis asma ditegakkan bila dari anamnesis didapat adanya mengi berulang dan/atau batuk persisten dengan karakteristik sebagai berikut: timbul secara episodik, cenderung pada malam/dini hari (nokturnal), musiman, setelah aktivitas fisik, dan dapat membaik dengan atau tanpa pengobatan serta adanya riwayat asma atau atopi lain pada pasien dan/atau keluarganya (Nataprawira, 2008).

Pada penderita asma terjadi kerusakan dinding saluran respiratori yang diakibatkan oleh proses inflamasi kronis saluran respiratori sehingga hal ini akan merusak respon imun alamiah pada saluran respiratori (Roche dan Jeffery, 2002).

2.2.1.11 Penyakit jantung bawaan

Papa penyakit jantung bawaan khususnya pirau dari kiri ke kanan sering terjadi gangguan klirens mukosilia yang akhirnya memudahkan terjadinya IRA-B (Basier dkk., 2008).

2.2.1.12 Defisiensi imun

Penyakit defisiensi imun adalah sekumpulan aneka penyakit yang karena memiliki satu atau lebih ketidaknormalan sistem imun menyebabkan kerentanan terhadap infeksi meningkat (Akib dkk., 2008). Defisiensi imun ditegakkan bila secara klinis dijumpai antara lain infeksi sistem respiratori berulang, infeksi bakteri yang berat, penyembuhan inkomplit antar episode infeksi atau respon pengobatan inkomplit, gagal tumbuh, infeksi oleh mikroorganisme yang tidak lazim, lesi kulit (ruam, pioderma, abses nekrotik/noma, alopesia, eksim, teleangiectasis, *warts* yang hebat), *oral thrush* yang tidak menyembuh dengan pengobatan, diare kronis, mastoiditis atau otitis persisten, kelainan hematologik (anemia aplastik, anemia hemolitik, neutropenia, trombositopenia). Manifestasi klinis yang jarang dijumpai adalah berat badan menurun, demam, periodontitis, limfadenopati, hepatosplenomegali, penyakit virus yang berat, artritis atau artralgia, ensefalitis kronik, meningitis berulang, pioderma gangrenosa, kolangitis sklerosis, hepatitis kronik (virus atau autoimun), reaksi simpang terhadap vaksinasi, bronkiektasis, infeksi saluran kemih, lepas/puput tali pusat terlambat (>30 hari), stomatitis kronik, granuloma, dan keganasan limfoid (Stiehm dkk., 2005).

Penulis lain menyebutkan kecurigaan adanya defisiensi imun bila ditemukan antara lain: infeksi berulang (≥ 3 episode infeksi bakteri yang sangat berat seperti pneumonia, meningitis, sepsis, dan selulitis dalam 12 bulan terakhir), bercak putih di mulut (*thrush*), parotitis kronik, limfadenopati generalisata, hepatomegali tanpa sebab yang jelas, demam yang menetap dan/atau berulang,

disfungsi neurologis, herpes zoster (*shingles*), dermatitis HIV, penyakit paru supuratif kronik, otitis media kronik, diare persisten, gizi buruk, pneumonia pneumosistis, kandidiasis esofagus, pneumonitis interstisial limfositik, atau sarkoma Kaposi (Rahajoe dkk., 2013).

2.2.1.13 Defisiensi vitamin A

Vitamin A penting untuk reepitelisasi saluran respiratorius, sistem imun alamiah maupun didapat. Sebuah meta-analisis melaporkan bahwa suplementasi vitamin A pada anak usia di bawah lima tahun terbukti dapat mengurangi insidens campak dengan *rate ratio* 0,59 (IK95% 0,37 sampai 0,67) (Mayo-Wilson dkk., 2011). Manifestasi klinis defisiensi vitamin A (dari ringan sampai berat) antara lain adanya gangguan penglihatan (buta senja), *xerosis* konjungtiva, adanya bercak Bitot, *xerosis* kornea, keratomalasia dan ulkus kornea, *xerophthalmia scar*, xeroftalmia fundus (Depkes RI, 2003).

2.2.1.14 Konsumsi vitamin D sejak gejala IRA mulai

Konsumsi vitamin D sejak gejala IRA mulai akan meningkatkan kadar vitamin D subjek.

2.2.1.15 Status imunisasi

Balita yang tidak diimunisasi atau status imunisasi DPT, Hib, pneumokokus, influenza, dan campak yang tidak lengkap sesuai umur merupakan faktor risiko pneumonia yang disebabkan oleh mikroba tersebut karena balita

tersebut tidak memiliki kekebalan atau mempunyai kekebalan parsial terhadap mikroba tersebut (Matondang dan Notoatmojo, 2008)).

2.2.2 Peranan faktor penyebab terhadap kejadian penyakit IRA-B

Penyakit dapat terjadi bila ada penyebab. Penyebab bronkiolitis antara lain *RSV*, *human metapneumovirus (hMPV)*, virus parainfluenza, virus adeno (Watts dan Goodman, 2011; Ali dkk., 2012), *M. pneumoniae* (Wohl, 2006; Watts dan Goodman, 2011), *rhinovirus*, virus influenza, virus entero (Ali dkk., 2012), dan *human bocavirus* (Watts dan Godman, 2011), dengan *RSV* dan *hMPV* sebagai penyebab pertama dan kedua terbanyak (Watts dan Goodman, 2011; Ali dkk., 2012); sedangkan penyebab pneumonia dikelompokkan berdasarkan umur seperti yang terlihat pada Tabel 2.8 dan Tabel 2.9.

Tabel 2.8
Virus Penyebab Pneumonia berdasarkan Umur (Crowe, 2012)

Usia	Virus yang sering	Virus yang jarang
Perinatal	CMV, HSV tipe 1 dan 2, enterovirus, rubela	Adenovirus tipe 1,2,3,5 Echovirus, coxsackievirus,
3 minggu-3 bulan	RSV subgrup A dan B, hMPV subgrup A dan B, PIV tipe 3	coronavirus, SARS-coronavirus, E-B virus, CMV, human herpesvirus 6, varicela-zoster, campak, mumps, hantavirus
4 bulan-4 tahun	RSV subgrup A dan B, hMPV subgrup A dan B, PIV tipe 1,2, dan 3, influenza A dan B, rhinovirus, adenovirus	
>4 tahun	Influenza A atau B, adenovirus tipe 4 dan 7	

Tabel 2.9
Bakteri Penyebab Pneumonia berdasarkan Umur
(Marostica dan Stein, 2012)

Usia	Penyebab
Neonatus	Streptokokus grup B, bakteri enterik Gram (-)
1-3 bulan	<i>C. trachomatis</i> , <i>U. urealitikum</i> , <i>B. pertusis</i>
3-12 bulan	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. Catarrhalis</i>
1-5 tahun	<i>S. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i>
>5 tahun	<i>S. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. Pneumoniae</i>

2.2.3 Peranan faktor lingkungan terhadap kejadian penyakit IRA-B

2.2.3.1 Letak geografi

Letak geografi berdasarkan garis lintang akan mempengaruhi lama paparan sinar matahari pada kulit subjek. Negara yang terletak di area subtropis mengalami paparan yang lebih singkat dibanding negara tropis.

Selain mengandung sinar UV-B, sinar matahari juga mengandung sinar ultraviolet A (UV-A) dengan panjang gelombang 320-400 nm (Holick, 2003). Paparan sinar UV pada kulit dinyatakan dalam dosis eritema minimum (DEM) atau jumlah paparan sinar UV yang akan menyebabkan eritema minimal (*slight pinkness*) pada kulit (Holick, 2004; Webb dan Engelson, 2006). Jumlah paparan sinar UV yang ekuivalen dengan 1 DEM tergantung pada pigmentasi kulit dan lama paparan. Paparan seluruh tubuh sampai 1 DEM diestimasikan menghasilkan pelepasan vitamin D ke sirkulasi sebesar 10.000-20.000 IU perhari. Paparan 40% permukaan tubuh sampai $\frac{1}{4}$ DEM akan menghasilkan sekitar 1000 IU vitamin D perhari, yang merupakan jumlah sintesis minimum yang diperlukan (Holick, 2004).

Rasio antara sinar UV-B dan UV-A tertinggi terjadi pada siang hari (saat matahari pada posisi puncak). Pada siang hari sinar UV-B cukup mencapai

permukaan bumi untuk memproduksi vitamin D di kulit. Lama paparan sinar matahari pada saat matahari ada pada posisi puncak untuk mencapai 1 DEM adalah 4-10 menit untuk kulit putih, dan 60-80 menit untuk kulit gelap (Holick, 2004). Pada anak, dan khususnya bayi memerlukan paparan sinar matahari yang lebih singkat untuk memproduksi vitamin D yang cukup karena permukaan tubuh yang lebih luas dan kemampuan memproduksi vitamin D lebih besar dibanding anak yang lebih besar (Munns dkk., 2006).

Di lain pihak, kanker kulit (melanoma maligna dan kanker sel basal) lebih mungkin terjadi setelah paparan berlebihan oleh sinar UV-A daripada UV-B (Armstrong dan Krickler, 2001; Garland dkk., 2003). Oleh karena itu, paparan sinar matahari pada tengah hari kurang mungkin menyebabkan kanker daripada paparan pada pagi atau sore hari. Sebaliknya dengan keratosis aktinik dan karsinoma sel skuamosa yang dihubungkan dengan paparan sinar UV-B (Millen dkk., 2004).

2.2.3.2 Riwayat air susu ibu non-eksklusif

Air susu ibu (ASI) merupakan nutrisi yang paling fisiologis untuk bayi. Selain untuk pemenuhan nutrisi, ASI juga berperan dalam memberikan proteksi terhadap penyakit-penyakit tertentu seperti diare, infeksi baik di saluran cerna maupun di luar saluran cerna, penyakit-penyakit kronis seperti leukemia, limfoma, *inflammatory bowel disease*, dan penyakit *celiac*; bahkan proteksi terhadap penyakit-penyakit atopi dan asma (Lawrence, 2005). Oleh karena itu dianjurkan

untuk memberikan ASI eksklusif yaitu pemberian ASI saja (tanpa makanan pendamping ASI) sampai umur 6 bulan (Kramer dan Kakuma, 2002).

Kadar vitamin D pada ASI dari ibu yang mempunyai kadar vitamin D cukup adalah sekitar 22 IU/L (15-50 IU/L) (Leerbeck dkk., 1980). Berdasarkan rerata konsumsi ASI sebesar 750 mL/hari (Henderson, 2005), pemberian ASI eksklusif tanpa paparan sinar matahari akan memberikan vitamin D 11-38 IU/hari (Gartner dan Greer, 2003), yang masih jauh di bawah rekomendasi minimum sebesar 400 IU/hari (Holick dkk., 2011). Satu IU vitamin D sama dengan 25 ng/mL, dan satu ng/mL vitamin D sama dengan 2,5 nmol/L (Holick dkk., 2011).

2.2.3.3 Polusi udara di dalam rumah

Polusi udara di dalam rumah adalah polusi udara sehari-hari di dalam rumah subjek yang bersumber dari asap bahan bakar padat (*solid fuels*), misalnya kayu api. Polusi udara akan menyebabkan rusaknya dinding saluran respiratori sehingga akan mengganggu sistem imun alamiah di saluran respiratori (WHO, 2007; Dherani dkk., 2008).

2.2.3.4 Hunian rumah padat

Hunian padat adalah hunian atau rumah yang rasio luas lantai dibanding penghuninya $\leq 4\text{m}^2/\text{orang}$ (Menkes RI, 1999). da Costa Lima dkk. (2003) dalam penelitian kasus-kontrol di Brazil mendapatkan bahwa keluarga yang penuh sesak (didefinisikan sebagai hunian ≥ 4 orang dalam kamar tidur anak) berhubungan dengan menurunnya kejadian asma [RO 0,42 (IK95% 0,21;0,87)], tetapi terjadi

peningkatan kejadian infeksi respiratori akut bawah pada anak usia 2-59 bulan. Hal ini dikaitkan dengan lebih mudahnya transmisi dari seseorang penderita IRA ke orang lain di sekitarnya.

2.2.3.5 Paparan asap rokok

Asap rokok mengandung banyak partikel yang dapat menyebabkan inflamasi pada dinding saluran respiratorius sehingga terjadi kerusakan yang akhirnya menimbulkan gangguan imunitas alamiah saluran respiratorius dengan akibat lebih mudah mengalami IRA (Sanchez dkk., 2006).

2.2.3.6 Dititip di tempat penitipan anak

Anak yang dititip di TPA lebih sering terpapar orang-orang yang menderita IRA sehingga kemungkinan menderita IRA lebih besar dibanding anak yang tidak dititip di TPA (Nandi-Lozano dkk., 2002; de Freitas dkk., 2003).