

ANALISIS SEKUEN GEN *GLUTATION PEROKSIDASE* (GPX1) SEBAGAI DETEKSI STRES OKSIDATIF AKIBAT INFEKSI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Ari Yuniastuti, R. Susanti

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahaun Alam Unuversitas Negeri Semarang
Email: ari_yuniastuti@yahoo.co.id

Abstrak. Glutation merupakan antioksidan yang berperan dalam fungsi imun, dan diekspresikan secara genetik oleh urutan gen yang membentuk protein enzim *Glutation Peroxidase* (GPx1). Bila ekspresi gen berubah maka terjadi perubahan fungsi glutation dan kerentanan terhadap stress oksidatif. Metode yang digunakan adalah Kasus-kontrol. Sampel yang digunakan adalah sampel darah. Kelompok kasus adalah sampel darah pasien tuberkulosis paru sedangkan kelompok kontrol adalah sampel darah orang sehat. Pemeriksaan gen *Glutation peroxidase* (GPx1) menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk melihat pita DNA pada pasien tuberkulosis paru serta elektroforesis produk PCR-RFLP gen GPx1 kelompok sampel tuberkulosis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan yang bermakna antara polimorfisme gen GPx1 ($p=0,365$) pasien tuberkulosis dengan individu sehat, sehingga tidak dapat digunakan sebagai alat deteksi kerentanan terhadap stress oksidatif pada pasien tuberkulosis. Perlu penelitian lanjutan yang menggunakan sampel lebih besar dan populasi etnik yang berbeda.

Kata kunci : tuberkulosis paru, gen GPx1, sekuen gen

PENDAHULUAN

Sejak Penyakit tuberkulosis paru (TB) merupakan penyakit infeksi menular yang menyebabkan kematian terbesar di dunia dan masih menjadi masalah kesehatan masyarakat yang serius di negara berkembang termasuk Indonesia. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa penyakit tuberkulosis saat ini telah menjadi ancaman global, diperkirakan terdapat 8 juta kasus baru dan 3 juta kematian karena penyakit TB setiap tahunnya. Setiap detik ada satu orang yang terinfeksi bakteri tuberkulosis di dunia dan dalam dekade mendatang tidak kurang dari 300 juta orang akan terinfeksi oleh tuberkulosis (Priantini, 2003). Prevalensi TB di Indonesia pada tahun 2007 terdapat sekitar 9,3 juta kasus TB dan pada tahun 2010 meningkat menjadi 11 juta kasus TB (WHO, 2010). Diperkirakan tahun 2020 TB menyerang 1 miliar

populasi dengan 70 juta kematian, kalau tidak dilakukan pengendalian (Soemantri *et al.*, 2007).

Penyakit ini disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Selama ini para ahli menduga terdapat gangguan sistem imun pada penderita TB (Widjaya *et al.*, 2010 dan Maderuelo *et al.*, 2003). Akibat klinis infeksi *M. tuberculosis* (Mtb) lebih dipengaruhi oleh sistem imunitas seluler daripada imunitas humoral. Pertahanan tubuh terhadap infeksi *Mtb* menyebabkan ketidakseimbangan reduksi-oksidasi (redoks), dikenal sebagai stres oksidatif. Stres Oksidatif pada TB paru terjadi karena produksi ROS oleh sistem imun tubuh untuk melisis Mtb mengalami peningkatan (Jack *et al.*, 2004). Peningkatan ROS, menyebabkan peningkatan penggunaan antioksidan endogen (*superoksid dismutase*, *katalase* dan *glutation*) untuk menetralkan ROS. Sedangkan antioksidan eksogen (vitamin C dan E) yang berasal dari asupan makanan jumlahnya rendah, sehingga pada pasien TB paru konsentrasi antioksidan mengalami penurunan (Akiibinu *et al.*, 2011; Suresh *et al.*, 2010; Taha and Imdad, 2010; Akiibinu *et al.*, 2008; Akiibinu *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 2004; Almira *et al.*, 2004; Wiid *et al.*, 2004; Madebo *et al.*, 2003). Antioksidan adalah sistem perlindungan yang kompleks dan komprehensif yang dimiliki tubuh untuk mengatasi stres oksidatif. Stres oksidatif menyebabkan kerusakan berbagai komponen sel seperti DNA, protein, karbohidrat, lemak dan makromolekul lainnya (Pauwels, *et al.*, 2007), fragmentasi protein dan lipid peroksidasi, disfungsi membran sel dan enzim, gangguan fungsi membran sel, penurunan fluiditas, inaktivasi ikatan antara reseptor dengan membran dan peningkatan permeabilitas ion (Singh *et al.*, 2008). Kerusakan molekul tersebut, selanjutnya berdampak pada kematian sel, inaktivasi enzim, mutasi juga dapat menyebabkan terjadinya kerusakan fungsi imun, penuaan dan dapat memicu terjadinya penyakit-penyakit seperti kanker, jantung koroner, arthritis, alzheimer's, parkinson dan lainnya (Yunanto *et al.*, 2009). Peningkatan ROS pada pasien TB paru merupakan proses yang berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit (Mohod *et al.*, 2011).

Glutation (GSH) adalah salah satu antioksidan yang berperan penting dalam pemeliharaan kelangsungan hidup sel, replikasi DNA, sintesis protein, katalisis enzim, transpor transduksi membran, aksi reseptor, metabolisme antara dan maturasi sel serta regulasi fungsi sel imun (De Rose, 2000, Zhang *et al.*, 2005; Heisterkamp *et al.*, 2008). Bila kadar glutatone dalam serum rendah menyebabkan penurunan mobilisasi Ca^{2+} dan kegagalan fosforilasi tirosin pada beberapa protein, termasuk pembentukan reseptor sel imun seperti CD3 (Chew dan Park, 2004), sehingga regulasi fungsi sel imun tubuh terganggu. Glutation disintesis oleh rangkaian gen yang menjadi glutatone (gen GCS). Sintesis GSH diekspresikan secara genetik oleh urutan gen yang membentuk protein enzim. Bila ekspresi gen berubah maka sintesis GSH tersebut terganggu, sehingga tidak terbentuk GSH baru. Akibat rendahnya GSH maka terjadi keparahan penyakit tuberkulosis paru.

Pemberian obat anti tuberkulosis (OAT) pada pasien TB paru diduga menghasilkan berbagai senyawa oksigen reaktif/radikal bebas yang dapat menimbulkan terjadinya cekaman oksidatif.

Sedangkan peningkatan radikal bebas pada pasien TB paru merupakan proses yang berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit (Mohod *et al.*, 2011). Akibat radikal bebas yang berlebihan sedangkan kapasitas detoksifikasi antioksidan endogen tetap atau bahkan berkurang, maka terjadilah cekaman oksidatif (Akiibinu *et al.*, 2011). Cekaman oksidatif berpotensi menyebabkan kerusakan berbagai komponen sel seperti DNA, protein, karbohidrat, lemak dan makromolekul lainnya, selanjutnya berdampak pada kematian sel, inaktivasi enzim, mutasi dan kerusakan fungsi imun. Biomarker untuk deteksi dini adanya cekaman oksidatif pada pasien TB paru yang mendapat terapi OAT belum pernah dilaporkan di Indonesia, maka perlu dikembangkan suatu biomarker yang merupakan respon dini tingkat molekuler, reaksi awal sebelum terjadi keparahan penyakit.

Berdasarkan latar belakang masalah maka rumusan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut: Apakah sekuen gen *Glutation peroksidase* (GPx1) dapat digunakan sebagai alat deteksi adanya kerentanan terhadap stress oksidatif pada pasien tuberkulosis paru akibat infeksi *Mycobacterium tuberculosis*?

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain kasus kelola (*case-control*). Kelompok kasus adalah kelompok penderita TB berdasarkan BTA positif. Sedangkan kelompok kontrol adalah kelompok individu sehat. Populasi dan sampel pada penelitian ini adalah semua penderita TB paru yang datang berobat ke Balai Kesehatan Paru Masyarakat (BKPM) dan Puskesmas jejaring di kota Semarang yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Jumlah sampel sebanyak 25 pasien TB BTA (+) dan 25 orang sehat. Sampel diperoleh berdasarkan urutan kedatangan pasien berobat ke BKPM atau Puskesmas jejaring selama periode penelitian (*consecutive sampling from admission*). Kriteria inklusi yaitu tuberkulosis paru 1-BTA dahak positif, pria atau wanita usia 15-55 tahun, bersedia menjadi responden sampai penelitian selesai, mendapat obat antituberkulosis dalam program DOTS. Kriteria eksklusi yaitu : diabetes Mellitus, gagal ginjal akut atau gagal ginjal kronis, gagal jantung/aritmia kordis, penyakit hati kronis/akut, tumor paru atau keganasan lain, penyakit degeneratif, menghentikan terapi, penyakit saluran cerna, hamil atau laktasi, dan kontrasepsi hormonal, HIV/AIDS. Alat dan bahan penelitian meliputi mortal, tabung eppendorf 1,5 ml, mikropipet (Gilson, France), spuit 5ml, tabung vacutainer, yellow tip, blue tip, white tip, freezer, mikrosentrifuge (Microfuge-E, Beckman, UK), mikrosentrifuge suhu 4°C (Tomy MX-200 Refrigerated microcentrifuge, Jepang), magnetik stirer, rotary shaker (RIKO RS-12-TE), vortex (Vortec-2 Genie, Pro-natura, Nacs-J, Jepang), pH mater (TOA model HSM 10 A), aspirator (Cleanc Bench, Hitachi, Jepang), Weterbath 55°C (Aquabath, Lab-line), Waterbath 37°C (Refrigerated bath RB-%A, Techne), Spektrofotometer (DU 650 spectrophometer, Beckman, UK), PCR, Primer gen GPx1 *Forward*

(5'-TCGTCCCAAGTCTCACAGTC-3'), Revers : (5'-CGCCCTCCCCGCTGCTCCTC-3'), enzim restriksi ApaI, fenol, kloroform, etanol, buffer digestion, lysis buffer, Agarose 1% (Difco), Loading dye (Sigma), DNA ladder (Amersham), TAE, ethidium bromide (Sigma) Penelitian dilakukan bulan Mei 2013 – September 2013 dengan pengambilan sampel darah pasien TB paru di BKPM dan Puskesmas jejaring (Puskesmas Tlogosari kulon, Puskesmas Tlogosari Wetan, Puskesmas Gunungpati, Puskesmas Kagok, dan Puskesmas Bandarharjo). Ekstraksi genom DNA, amplifikasi DNA gen GPx1 dengan metode PCR dilakukan di laboratorium Biologi molekuler jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Semarang dan laboratorium biologi molekuler (NECHRI) Rumah Sakit Pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin Makassar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

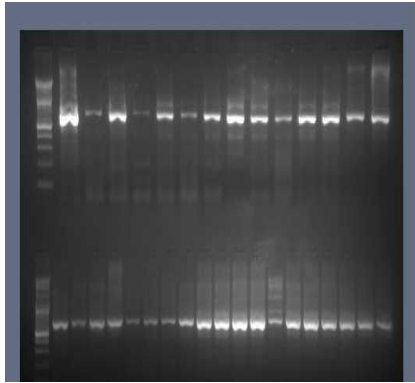
Penelitian ini berlangsung dari bulan Mei 2013 sampai dengan September 2013 di Balai Kesehatan Paru Masyarakat (BKPM) kota Semarang, Puskesmas jejaring di kota Semarang, laboratorium biologi molekuler, Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang dan laboratorium biologi molekuler (NECHRI) Rumah Sakit Pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin Makassar. Selama periode waktu tersebut diperoleh 30 orang sampel pasien tuberkulosis paru BTA (+) yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi serta bersedia mengikuti penelitian. Selanjutnya sebanyak 5 orang dropout karena menderita penyakit yang lain, sehingga sampel kasus sisa sebanyak 25 orang. Sedangkan kontrol sebanyak 25 sampel dari darah sukarelawan yang donor ke Palang Merah Indonesia (PMI).

Penelitian ini menunjukkan subyek perempuan 12 orang (50%) sedibanding dengan subyek laki-laki 12 orang (50%) dengan rentang usia subyek penelitian 15 sampai 60 tahun. Rentang usia kelompok kasus antara 15-60 tahun dengan rerata 59,16 tahun ($\pm 11,62$), sementara rentang usia kelompok kontrol antara 22-60 tahun dengan rerata 50,76 ($\pm 14,56$).

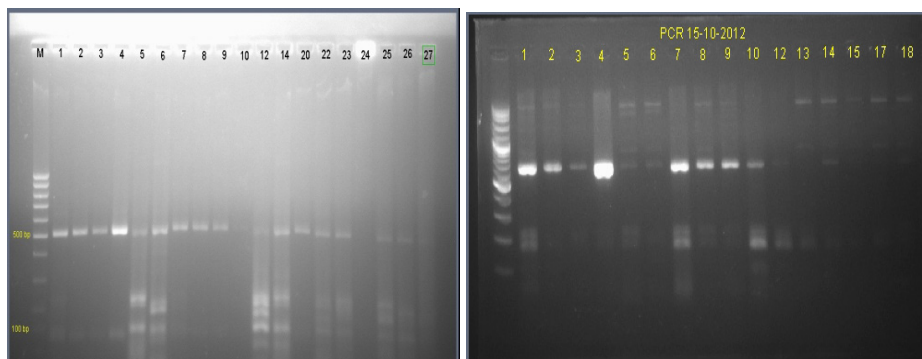
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kontribusi sekuen gen antioksidan *glutation peroxidase* (GPx1) sebagai penanda biologi untuk deteksi adanya kerentanan terhadap stress oksidatif pada pasien TB paru akibat infeksi *Mycobacterium tuberculosis* melalui serangkaian kegiatan yang dilakukan untuk mengetahui gambaran variasi gen enzim *Glutation Peroxidase* (GPx1). Adanya sekuen gen GPx1 dapat digunakan sebagai penanda dini terjadinya stress oksidatif pada pasien tuberkulosis paru dan kemungkinan menyebabkan keparahan penyakit tuberkulosis paru seperti berkembangnya penyakit fibrosis paru bahkan kanker paru. Lokasi gen GPx1 adalah pada kromosom 11q13.

Duapuluh lima penderita tuberkulosis paru yang berobat ke Balai Kesehatan Paru Masyarakat (BKPM) kota Semarang dan Puskesmas jejaring diikutkan dalam penelitian ini.

Penelitian ini untuk mengetahui sekuen gen enzim GPx1 dilakukan pemeriksaan molekuler dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk melihat pita DNA dari kelompok kasus tuberculosis paru dan kelompok control orang sehat (gambar 1).



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk PCR gen GPx pasien TB paru (bagian atas) dan individu sehat (bagian bawah)



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk PCR-RFLP gen GPx1 (kiri) pada pasien sehat dan tuberculosis paru (kanan)

Hasil PCR selanjutnya dipotong oleh enzim restriksi *ApaI* gambar 2a dan 2b menunjukkan hasil elektroforesis dari produk PCR yang telah dipotong oleh enzim restriksi *ApaI*. Pada pasien tuberculosis paru ditemukan adanya polimorfisme gen GPx1 genotip C/C (86%) dan genotip C/T (4%), Sedangkan pada individu sehat genotip C/C (100%) dan genotip C/T (0%). Tabel 2 menunjukkan frekuensi genotip gen GPx kelompok kasus dan kontrol. Polimorfisme ini secara signifikan menunjukkan bahwa gen GPx tidak dapat digunakan sebagai alat deteksi untuk mengetahui kerentanan pasien tuberculosis paru terhadap stress oksidatif. Hal tersebut dibuktikan bahwa pada polimorfisme gen GPX1 pasien tuberculosis paru hanya sebesar 4% atau sekitar 1 orang hamper sama dengan individu sehat, dimana juga tidak terdapat polimorfisme gen GPx1.

Tabel 2. Frekuensi genotip promotor Gen GPx kelompok kasus dan kontrol

Frekuensi Genotip	Kasus (%)	Normal (%)	Nilai p (Chi Square test)
C/C Homozigot	86	100	0,365
C/T Heterozigot	4	0	

Nilai p < 0,05

Enzim *glutation peroksidase* berperan penting dalam melindungi sel, melalui reaksi seperti di atas maupun melalui peroksida organik yang terbentuk dalam oksidasi kolesterol dan asam lemak. Aktivitas enzim *glutation peroksidase* mampu mereduksi 70% peroksida organik dan lebih dari 90% H₂O₂. Enzim *glutation peroksidase* yang ditemukan dalam sitoplasma tersebut merupakan tetramer, dan mengandung selenosistein pada sisi aktifnya. Enzim ini bersifat nukleofilik, yang sangat mudah terionisasi dan mengakibatkan terlepasnya proton.

Aktivitas enzim *glutation peroksidase* juga ditemukan dalam mitokondria, plasma, dan saluran pencernaan. Dalam sitoplasma, enzim *glutation peroksidase* bekerja pada membran fosfolipid yang teroksidasi sehingga dikenal juga sebagai hydroperoxide glutathione peroxidase. Enzim *glutation peroksidase* juga dapat langsung mereduksi hidroperoksida kolesterol, ester kolesterol, lipoprotein, dan fosfolipid yang teroksidasi dalam membran sel. Aktivitas enzim tersebut dapat juga diinduksi oleh keadaan hiperoksia (Asikin, 2001).

Enzim *glutation peroksidase* bersama *glutation reduktase* (suatu flavoprotein) dan NADPH (yang diperoleh dari aktivitas glukosa-6 fosfat dehidrogenase pada HMP-shunt) merupakan bagian dari siklus redoks *glutation* yang berperan untuk mempertahankan kadar *glutation*. Kelainan pada siklus tersebut bermanifestasi pada penyakit anemia hemolitik.

Pada penderita nekrosis hati dan penyakit degeneratif, aktivitas *glutation peroksidase* rendah karena terjadi defisiensi selenium. Sementara pada penderita alergi, aktivitas **glutation peroksidase** sel darah merah meningkat 2 kali dibandingkan dengan kontrol, yaitu 16 U/g Hb. Aktivitas enzim ini juga dapat diinduksi oleh antioksidan sekunder isoflavon. Berikut laporan dari beberapa peneliti tentang potensi antioksidan isoflavon yang berasal dari tanaman terhadap aktivitas *glutation peroksidase*.

Rohrdanz, et al. (2002) melaporkan bahwa aktivitas **glutation peroksidase** meningkat ketika sel hepatoma H4IIE dipapar dengan 300 mmol/l daidzein, demikian juga aktivitas katalasenya. Suplementasi isoflavon dengan kadar genistein tinggi, yaitu sebanyak 598 mg/kg pakan tikus selama 4 minggu pada tikus yang dilatih berlari ternyata meningkatkan aktivitas *glutation peroksidase* dari 0,403 mmol/det/mg menjadi 0,412 mmol/det/mg protein RBC tikus (Chen, et al., 2002). Isoflavon kedelai merupakan senyawa flavonoid. Potensinya sebagai antioksidan diduga serupa dengan antioksidan quersetin, yaitu sebagai scavenger radikal bebas (Kameoka, et al., 1999).

Aktivitas *glutation peroksidase* plasma juga meningkat path 4 wanita dan 1 laki-laki yang

mengonsumsi jus buah apel dan kismis yang mengandung quersetin selama 1 minggu (Young, et al., 1999). Quersetin adalah suatu senyawa flavonoid dalam sayuran atau buah-buahan yang memiliki potensi antioksidan. Potensi tersebut ditunjukkan oleh posisi gugus hidroksil yang dapat langsung menangkap radikal bebas. Flavonoid melindungi sel dari serangan senyawa oksigen reaktif seperti oksigen singlet, superoksida, radikal peroksil, radikal hidroksil, dan peroksinitrit.

Glutation peroksidase intraseluler berpotensi mengubah, molekul hidrogen peroksida dengan cara mengoksidasi glutation bentuk tereduksi (GSH) menjadi bentuk teroksidasi (GSSG). Glutation bentuk tereduksi mencegah lipid membran dan unsurunsur sel lainnya dari kerusakan oksidasi, dengan cara merusak molekul hidrogen peroksida dan lipid hidroperoksida. Delmas Beauvieux, et al. (1996) melaporkan bahwa enzim glutation peroksidase mendekomposisikan H₂O₂ lebih kuat dibandingkan dengan enzim katalase. Agar enzim bisa bekerja, selalu diperlukan adanya substrat, misalnya glutation, yang merupakan substrat enzim glutation peroksidase.

Penelitian ini telah dapat mengidentifikasi polimorfisme pada daerah gen GPx1, ditemukan ekspresi genotip C/C (86%), C/T (4%) dan T/T (0%) pada kelompok kasus dibandingkan dengan orang normal C/C (100%), C/T (0%), dan T/T (0%). Berdasarkan uji statistik dengan menggunakan *Chi-Square Test* didapatkan nilai $p=0,365$ menunjukkan bahwa terdapat tidak terdapat hubungan secara signifikan antara polimorfisme genotip promoter gen GPx1 individu sehat dengan penderita tuberkulosis paru. Glutation memiliki beberapa bentuk di dalam tubuh yaitu glutation peroksidase (GPx), glutation reduktase (Gsr) dan glutation oksidase (GSSG) (Lu, 2008).

Glutation Peroksidase merupakan enzim dari glutation yang mengalami peroksidasi. Peroksidasi dapat terjadi akibat adanya paparan radikal bebas baik dari polutan maupun infeksi bakteri dan virus (Rahman, 2000 dan Lu, 2008). Ketika sel terpapar oleh oksidan dan terjadi peristiwa stres oksidatif (cekaman oksidatif) dan terjadi penurunan GSH, maka ekspresi gen GPx mengalami peningkatan regulasi oleh aktivasi elemen respon terhadap stress oksidatif pada daerah promoter.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Iskusnykh *et al.* (2013) terhadap 429 tikus hepatitis, hasilnya menggambarkan adanya variasi gen GPx pada -129C/T yang mana menunjukkan alel T lebih rendah pada aktivitas promoter (40%) dibanding alel C (50%). Frekuensi polimorfisme T secara signifikan lebih tinggi pada kelompok kasus dibanding kelompok kontrol (genotip C/T dan T/T pada kelompok kasus 31,5% sedangkan kelompok kontrol 19,2%, $p<0,001$). Hasil analisis regresi menunjukkan bahwa polimorfisme T merupakan faktor risiko terjadinya penyakit jantung dan faktor risiko penyakit pembuluh darah jantung (Odd Ratio 1,98; 95% confidence Interval 1,38-2,83, $p<0,001$). Kesimpulan penelitian ini adalah bahwa polimorfisme -129/T gen GCL bukan gen GPx1 menekan induksi gene GCLM dalam merespon adanya oksidan dan secara genetik merupakan faktor risiko penyakit hepatitis.

Penelitian mengenai gen-gen lain yang terkait dengan patogenesis tuberkulosis paru juga pernah diteliti oleh Adriani *et al* (2011) terhadap polimorfisme gen nucleotide binding oligomerization domain 2 (NOD2) pada penderita tuberkulosis di Makassar hasilnya menunjukkan tidak adanya hubungan yang bermakna antara penderita TB dengan polimorfisme gen NOD2. Namun terdapat hubungan antara polimorfisme gen NOD2 dengan indeks bakteri.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan yang bermakna antara polimorfisme gen GPx1 ($p=0,0036$) pasien tuberkulosis dengan individu sehat. Oleh karena itu hal ini menunjukkan bahwa polimorfisme gen GPx1 tidak dapat digunakan sebagai alat deteksi kerentanan terhadap stress oksidatif pada pasien tuberkulosis.

Saran

Perlu penelitian lanjutan yang menggunakan sampel lebih besar dan populasi etnik yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A, and Pober, J.S. 2012. *Cellular and Molecular Immunology*. Second ed. WB Saunders Co : Philadelphia. p: 327.
- Akiibinu, M.O., Arinola, O.G., Ogunlewe, J.O, and Onih, F.A. 2007. Non Enzymatic-Antioxidant and Nutritional Profiles in Newly Diagnosed Pulmonary Tuberculosis Patients in Nigeria. *African Journal of Biomedical Research*. 10: 223-228.
- Akiibinu, M.O., Ogunyemi, O.E., Arinola, O.G., Adenaike, A.F, and Adegoke, O.D. 2008. Assessment of Antioxidants and Nutritional Status of Pulmonary Tuberculosis Patients in Nigeria. *Eur. J. Gen. Med*. 5(4): 208-211.
- Akiibinu, M.O., Ogunyemi, E.O, and Shoyebo, E.O. 2011. Levels of Oxidative Metabolites, Antioxidants and Neopterin in Nigerian Pulmonary Tuberculosis Patients. *Eur. J. Gen. Med*. 8(3): 213-218. 2011-12-24
- Almirall, J., Bolibar, J., Toran, P. et al. 2004. Contribution Of C-Reactive Protein To The Diagnosis And Assessment Of severity Of Community-Acquired Pneumonia. *Chest*.125(1): 1335-1342.
- Barmawi. 2004. *Tuberkulosis : Ancaman Kegawatan Dunia Aspek Immunologi dan Terapi*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Chew BP and Park JS. 2004. Caretenoid Action on The Immune Response. *J. Nutr*;134;257S-261S.
- Dayaram YK, Talaue MT, Connell ND and Venketeramana V.2006. Characterization of a Glutathione Metabolic Mutant of Mycobacterium tuberculosis and its Resistance to Glutathione and Nitroglutathione. *J. Bacteriol*;188(4):1364-1372.
- Depkes. 2008. Penatalaksanaan Tuberkulosis Paru. Departemen Kesehatan. Jakarta.

- Deneke SM and Fanburg BL. 1989. Regulation of Cellular Glutathione. *Am, J. Physiol*;257(4Pt1):163-173.
- De Rosa SC, Zaretsky MD, Dubs JG. 2000. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur. J. Clin. Invest*;30:915-929.
- Griffith OW. 1999. Biologic and Pharmacologic Regulation of Mamalian Glutathione Synthesis. *Free Radic ATTN: Biol Med*; 9-10:922-935.
- Heisterkamp N, Groffen J, Warburton D and Snedon TP. 2008. The Human gamma-glutamyltransferase gene family. *Human Genetic*;123(4):321-332.
- Iskusnykh, IY, Tatyana N. Popova, Aleksander A. Agarkov, Miguel Â. A. Pinheiro de Carvalho, and Stanislav G. Rjevskiy. 2013. Expression of Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase and Level of Free Radical Processes under Toxic Hepatitis in Rats. *Journal of Toxicology Volume 2013, Article ID 870628, 9 pages* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/870628>.
- Jack, C.I., Jackson, M.J., Hind, C.R. 1994. Circulating Markers Of Free Radical Activity In Patients With Pulmonary Tuberculosis. *Tuber Lung Disc.* 75:132-137.
- Kaur, K., Jai, K., Gurdeep, K.B, and Rajinderjit, S.A. 2005. Oxidants Stress And Antioxidant in Pulmonary Tuberculosis. Diakses tanggal 30 Juli 2011.
- Klebanoff, SJ. 2005. Myeloperoxidase : friend or foe. *Journal Leukocyte Biology*;77:598-625.
- Madebo, T., Bernt, L., Pal, A, and Roef, K.B. 2003. Circulating Antioxidants and Lipid Peroxidation Products in Treated Tuberculosis Patients in Ethiopia. *Am J. Clin. Nutr.*78: 117-122.
- Maderuelo, D.L., Fransisco, A., Rocio, S., Alicia, G., Rosa, C., Rosario, M., Juan, J, and Carmen, M. 2003. Interferon- γ And Interleukin-10 Gene Polymorphisme in Pulmonary Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Cerc. Med.* 167:970-975.
- Me ´plan, C, Lars Ove Dragsted, Gitte Ravn-Haren, Anne Tjønneland, Ulla Vogel, John Hesketh. 2013. Association between Polymorphisms in Glutathione Peroxidase and Selenoprotein P Genes, Glutathione Peroxidase Activity, HRT Use and Breast Cancer Risk. *PLoS ONE* 8(9): e73316. doi:10.1371/journal.pone.0073316
- Mohod, K., Archana, D, and Smith, K. 2011. Status of Oxidants and Antioxidants in Pulmonary Tuberculosis With Varying Bacillary Load. *Journal of Experimental Science.* 2(6):35-37.
- Pauwels, E.K., Erba, P.A, and Kostkiewicz, M. 2007. Antioxidants : A tale of two stories. *Drug News Persoect.* 20(9):579-585.
- Priantini, N.N. 2003. MDR-TB Masalah dan Penanggulangannya. *Medicinal.* 4:27-33.
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R, and MC Prabhakar. 2004. Role of Free Radicals And Antioxidants in Tuberculosis Patients. *Indian J. Tuberc.* 51:213-218.
- Singh, R., Manjunatha, U., Helena, I., Bushoff, M, and Hwan-ha, Y. 2008. PA-824 Kills non-replicating M. Tuberculosly intracelular NO releas. *Science.* 322(5906):1392-5.
- Soemantri, S., Senewe, F.P., Tjandrarini, D.H, Day, R., BAsri, C., Manissero, D et al .2007. Threefold Reduction In The Prevalence of Tuberculosis Over 25 Years in Indonesia and Risk Factor. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* 11(4):398-404.
- Sulandari, S. dan M. S. A. Zein. 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. Puslit Biologi-Bidang Zoologi. LIPI. Bogor
- Suresh, D.R., Vamseedhar, A., Krishneppa, P and Hamsaveena. 2010. Immunological Correlation of Oxidative Stress Markers in Tuberculosis Patiens. *Int. J. Biol. Med. Res.* 1(4):185-187.
- Taha, D.A, and Imad, A.J.T. 2010. Antioxidant status, C-Reactive Protein and Status in Patient with Pulmonary tuberculosis. *SQU MED.J.* 10 (3):361-369.

- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M, and Mazur., M. 2006. Free Radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact.* 160(1):1-40.
- Venketeraman V, Dayaram YK, Amin GA, Ngo R, Green RM, Talaue MT, Mann J and Connel ND. 2003. Role of Glutathione in Macrophage Control of Mycobacteria. *Infection and Immunity*;71(4):1864-1871.
- Venketerama V, Dayaram YK, Talaue MT, and Connel ND. 2005. Glutathione and Nitrosoglutathione in Macrophage Defense against Mycobacterium tuberculosis. *Infection and Immunity*;71(3):1886-1889.
- Widjaja, J.T., Diana, K.J, dan Rina, L.R. 2010. Analisis Kadar Interferon Gamma Pada Penderita Tuberkulosis Paru dan Orang Sehat. *J. Respir Indo.* 30(2):119-124.
- Wiid, I., T. Seaman, E.G. Hoal, AJS Benade and Paul DVH. 2004. Total Antioxidant Levels Are Low During Active TB and Rise With Anti-Tuberculosis Therapy. *IUBMB Life*:56(2):101-106.
- World Health Orgnitation. 2010. *Tuberculosis*. WHO Fact sheet; 104
- Yunanto, A., Bambang, S. dan Eko, S. 2009. *Kapita Selektta Biokimia : Peran Radikal Bebas pada Intoksikasi dan Patobiologi Penyakit*. Penerbit Pustaka Banua: Banjarmasin. p: 243-249.
- Zhang H, Forman HJ and Choi J. 2005. γ -glutamyltrnas peptidase in glutathione biosynthesis. *Methods in Enzymology*;401:468-483.