

Pengembangan Metode PCR Multipleks untuk Analisis Genotipe Null Gen GSTM1/GSTT1 pada Pasien Tuberkulosis

Kinasih Prayuni¹, Intan Razari², Silviatun Nihayah³, Syafrizal⁴, Rika Yuliwulandari^{5*}

¹Pusat Penelitian Genetik, Lembaga Penelitian Terpadu, Universitas YARSI, kinasih.prayuni@yarsi.ac.id

²Lembaga Penelitian Terpadu, Universitas YARSI, intan.razari@yarsi.ac.id

³Lembaga Penelitian Terpadu, Universitas YARSI, silviatun.nihayah@yarsi.ac.id

⁴Rumah Sakit Umum Pasar Rebo, osyafrizal@gmail.com

⁵Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, rika.yuliwulandari@yarsi.ac.id

ABSTRAK

Penyakit tuberkulosis (TB) masih menjadi penyakit infeksi terbesar di Indonesia. Hepatotoksisitas menjadi efek samping yang paling sering dialami oleh pasien TB karena terapi obat lini pertama TB. Gen glutathione S-transferase (GST) GSTM1 dan GSTT1 terlibat dalam detoksifikasi dari berbagai zat beracun, seperti obat-obatan. Pengembangan metode yang cepat dan sederhana untuk analisis genotipe null dapat memfasilitasi besar studi farmakogenetik dan aplikasi klinis penyesuaian dosis obat secara personal sesuai dengan profil genetik pasien. Tujuan penelitian adalah mengembangkan metode PCR multiple untuk amplifikasi simultan gen GSTM1/GSTT1 untuk analisis molekuler. Sebanyak 25 sample pasien TB digunakan untuk validasi metode tersebut yang terdiri dari pasien TB dengan hepatotoksisitas dan pasien TB tanpa hepatotoksisitas. Berdasarkan hasil validasi PCR pasien TB dengan hepatotoksisitas menunjukkan frekuensi genotipe null gen GSTM1 sebesar 90% dan pasien TB tanpa hepatotoksisitas sebesar 100%. Frekuensi genotipe null gen GSTT1 pada pasien TB dengan hepatotoksisitas sebesar 90%, sedangkan pada pasien TB tanpa hepatotoksisitas sebesar 80%. Hasil sekuensing pada sampel positif menunjukkan similaritas sebesar 99% pada data genbank NCBI. Penelitian ini berhasil mengidentifikasi genotipe null gen GSTM1 dan GSTT1 dengan metode PCR multipleks pada pasien TB. Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan jumlah sampel yang lebih besar untuk melihat hubungan menyeluruh antara genotipe null GSTM1 dan GSTT1 dengan hepatotoksisitas akibat pengobatan TB.

Kata kunci: Genotipe null, GSTM1, GSTT1, Hepatotoksisitas, Tuberkulosis

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains Indonesia's leading infectious disease. Hepatotoxicity is the most common side effect of TB first-line medication therapy in TB patients. GSTM1 and GSTT1 are glutathione S-transferase (GST) genes involved in the detoxification of various toxic compounds such as drugs. The development of fast and simple methods for null genotyping of GSTM1/GSTT1 could facilitate large pharmacogenetic studies and the clinical application of personalized drug dose adjustment according to the patient's genetic profile. The aim of this research was to develop a multiple PCR method for simultaneous amplification of GSTM1/GSTT1 genes for molecular analysis. A total of 25 samples of TB patients were used to validate the method consisting of TB patients with hepatotoxicity and without hepatotoxicity. Our result showed the genotype frequency of the GSTM1 null genotype was 90% in TB patients with hepatotoxicity and 100% in TB patients without hepatotoxicity. The frequency of the GSTT1 null genotype in TB patients with hepatotoxicity was 90%, whereas in TB patients without hepatotoxicity was 80%. The sequencing results on the positive samples showed a similarity of 99% to the GenBank NCBI. Our study was successful in detecting GSTM1 and GSTT1 null genotypes using the multiplex PCR method in TB patients. Further study needs to be done with larger sample of TB patients.

Keywords: null genotype, GSTM1, GSTT1, Hepatotoxicity, Tuberculosis

*Correspondence Author: Rika Yuliwulandari, Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, rika.yuliwulandari@yarsi.ac.id. +62 877-8206-5501

I. PENDAHULUAN

Penyakit tuberkulosis (TB) masih menjadi penyakit infeksi terbesar di Indonesia dan menempati peringkat ketiga setelah India dan Cina. Jumlah kasus yang ditemukan pada tahun 2022 sebanyak 824 ribu dan kematian 93 ribu per

tahun atau setara dengan 11 kematian per jam. Di Indonesia jumlah kasus TB terbanyak yaitu pada kelompok usia produktif terutama pada usia 45 sampai 54 tahun.¹ Hepatotoksisitas menjadi efek samping yang paling sering dialami oleh pasien TB karena terapi obat lini pertama TB, yaitu

isoniazid, rifampisin dan pirazinamid.² Insiden hepatotoksitas yang diinduksi oleh obat TB bervariasi antara 2% sampai 28% dan sering menambah morbiditas penyakit karena penghentian pengobatan.³

Glutathione S-transferase (GST) adalah salah satu enzim fase 2 dan merupakan famili enzim multifungsional yang memiliki kemampuan untuk detoksifikasi senyawa beracun yang terdapat pada pestisida, obat-obatan, komponen makanan dan sebagainya. Enzim GST yang telah diketahui berperan dalam detoksifikasi senyawa xenobiotik adalah GSTM1 dan GSTT1.^{4,5}

GSTM1 merupakan enzim kelas Mu yang dikode oleh enzim GSTM1, Glutathione S-transferase Mu 1, yang berfungsi untuk detoksifikasi senyawa elektrofilik, termasuk karsinogen, obat, racun lingkungan serta produk dari stres oksidatif, melalui konjugasi dengan glutathione. Gen GSTT1 mengkode enzim Glutathione S-transferase theta-1 yang berfungsi untuk katalisis konjugasi glutathione tereduksi ke berbagai senyawa elektrofilik dan hidrofobik. Dalam beberapa penelitian, polimorfisme null pada gen *GSTM/GSTT1* ini dikaitkan dengan hepatotoksitas akibat obat anti-TB, yaitu isoniazid⁶⁻⁸ dan peningkatan resiko terhadap penyakit kanker, seperti kanker pankreas, kanker kandung kemih, kanker paru-paru, kanker esofagus, dan kanker melanoma.⁹

Polimorfisme GST dapat dinilai dengan analisis PCR untuk mendeteksi adanya genotype null. Dalam upaya meningkatkan efisiensi deteksi, kami mengembangkan PCR multipleks untuk amplifikasi simultan gen GSTM1/GSTT1 untuk analisis molekuler. Pengembangan ini diharapkan dapat berkontribusi untuk mendukung pengobatan yang dipersonalisasi (*personalize medicine*) pada pasien TB seperti dalam penentuan dosis obat pada pasien yang memiliki genotype null gen GSTM1/GSTT1.

II. METODOLOGI

Pengumpulan Sampel

Sebanyak 25 sampel pasien TB dikumpulkan dari RS Pasar Rebo, Jakarta. Pasien yang termasuk dalam penelitian adalah laki-laki dan perempuan, berusia 17-84 tahun, didiagnosis

dengan TB menurut standar Organisasi Kesehatan Dunia, dan dalam pengobatan yang dipantau dengan obat anti-TB, yaitu selama 2 bulan diberikan Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol, Pyrazinamide dan 4 bulan selanjutnya diberikan Isoniazid dan Rifampicin.¹⁰

Kriteria inklusi pasien untuk kontrol adalah sebagai berikut: 1) pasien yang tidak mengembangkan AT-DILI selama periode 6 bulan terapi anti-TB; 2) pasien yang sembuh atau telah menyelesaikan pengobatan sesuai kriteria WHO; 3) pasien dengan hasil tes fungsi hati dalam kisaran normal selama kunjungan tindak lanjut pada bulan 2 dan 6; dan 4) pasien dengan kepatuhan pengobatan yang sangat baik sesuai informasi Program Nasional Pengendalian TB Berbasis DOTS. Kriteria eksklusi untuk kontrol adalah sebagai berikut: (1) pasien dengan riwayat penyakit hati, seperti hepatitis A, B, dan C; hepatoma; sirosis hati, dan cholelithiasis; dan (2) pasien dengan hasil tes fungsi hati abnormal (alanine transaminase, aspartate aminotransferase, dan total bilirubin) sebelum pengobatan anti-TB.

Kriteria inklusi untuk kasus hepatotoksitas adalah pasien dengan peningkatan alanin (ALT) atau aspartat transaminase (AST) 3 kali batas atas kisaran normal (ULN) dan setidaknya satu gejala hepatitis, seperti anoreksia, kelelahan, mual dan muntah, demam ringan, nyeri tekan dan/atau pembesaran hati, penyakit kuning, dan urin berwarna gelap. AT-DILI, sebagaimana didefinisikan menurut kriteria Council for International Organizations of Medical Sciences (Geneva, Switzerland).¹¹ Pasien menandatangani *informed consent* untuk keikutsertaannya dalam studi ini. Sebanyak 3 mL darah dikumpulkan dari pasien.

Ekstraksi DNA

Darah EDTA yang dikumpulkan di ekstraksi menggunakan *Maxwell RSC Whole Blood DNA kit* (Promega) sesuai instruksi manual alat menggunakan *Maxwell automatic instrument* (Promega). Kualitas dan kuantitas DNA diukur dengan Tecan MPro 200 (Tecan).

Amplifikasi genotype null GSTM1/GSTT1

Desain Primer untuk deteksi gen GSTM1/GSTT1 dilakukan dengan *free software* MP_Primer

(<http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/>).¹²

Primer untuk deteksi gen GSTM1 null adalah:

F: 5'-TGAGGACAGATTCAGGGACAGCA-3'

R: 5'-ACCCTGAGCAAAGGACTGACCC-3'

Sedangkan primer yang akan digunakan untuk deteksi gen GSTT1 null adalah:

F: 5'-TCCCGACTTTGCCTGCCCAATC-3'

R: 5'-AGGACGGTGCAAGGGTGAGGTT-3'

Dalam penelitian ini digunakan kontrol internal, yaitu gen HBB dengan primer sebagai berikut:

F:5'-

TCATACCTCTTATCTTCCTCCCACAGC-3'

R:5'-

GAAATTGGACAGCAAGAAAGCGAGC-3'

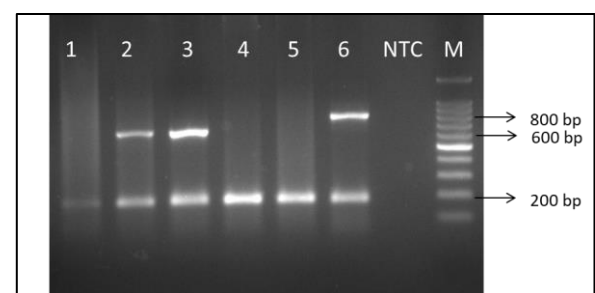
Primer tersebut kemudian dilakukan optimasi suhu dan ditemukan bahwa suhu 68°C adalah suhu optimum dari kesemua primer multipleks. Campuran PCR memiliki volume akhir sebesar 25 µl yang mengandung 20 ng genomic DNA, 1X KAPA 2 G Fast Multiplex master mix (KAPA Biosystem, Cape Town, Afrika Selatan), dan 10 pM setiap primer. Amplifikasi PCR dilakukan pada mesin PCR konvensional T-100 (BioRad, CA, USA). Profil reaksi amplifikasi pada mesin adalah 3 menit pada suhu 95°C; 30 siklus dari proses denaturasi selama 15 detik pada suhu 95°C, proses annealing selama 30 detik pada suhu 68°C, dan proses elongasi selama 30 detik pada suhu 72°C; serta proses elongasi akhir selama 1 menit pada suhu 72°C.

Visualisasi PCR dilakukan pada gel 2% dengan PeqGreen yang dilihat pada Gel Documentation. Produk hasil dari PCR multipleks sebesar gen GSTM1, GSTT1, dan β-globin berukuran 800-bp, 632-bp, dan 180-bp secara berurutan. Genotipe sampel yang memiliki Gen GSTM1/GSTT1 null tidak akan memiliki pita DNA pada hasil PCRnya dan sampel tersebut hanya menunjukkan gen β-globin sebesar 180-bp sebagai kontrol. Sampel dengan gen GSTM1 dan GSTT1 yang positif kemudian disekuensing untuk memastikan apakah primer spesifik mengamplifikasi gen target yang diinginkan.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengembangan protokol PCR multipleks untuk menganalisis beberapa gen secara signifikan akan meningkatkan penerapan skrining genetik sebagai alat untuk deteksi dini hasil kesehatan yang terkait dengan lingkungan paparan, dalam penelitian ini pada pasien TB.^{13,14} Untuk memvalidasi prosedur PCR multipleks ini, kami menggunakan 25 pasien TB untuk analisis dari setiap gen.

Optimasi primer dilakukan dengan gradien suhu menggunakan mesin PCR T-100 (BioRad). Gradien PCR dilakukan dengan peningkatan suhu *annealing* (Ta) dari 60°C – 70°C berdasarkan suhu melting dari masing-masing primer (Tm). Optimasi Ta sangat penting untuk kesuksesan reaksi PCR. Suhu *annealing* adalah suhu ketika primer akan berikatan secara spesifik dengan target gen. Dalam penelitian ini juga digunakan metode PCR multiplex dengan mencampurkan 3 pasang primer dalam satu tabung, sehingga Ta yang sesuai sangat diperlukan untuk mendeteksi secara spesifik gen yang ditargetkan dalam penelitian ini.^{15,16} Jika Ta terlalu rendah maka fragmen DNA yang diamplifikasi menjadi tidak spesifik Fragmen sehingga menyebabkan munculnya banyak pita pada visualisasi gel agarosa. Sebaliknya, jika Ta terlalu tinggi maka akan mempengaruhi *yield* produk PCR serta mengurangi kemurnian produk PCR.¹⁵ Hasil optimasi menunjukkan bahwa suhu optimum dari ketiga pasang primer dalam penelitian ini adalah 68°C.



Gambar 1. Hasil visualisasi primer deteksi genotipe null gen GSTM1/GSTT1
Keterangan: M, 100 bp ladder; NTC, *non-template control*, lajur 1-6, representasi sampel.

Gambar 1 menunjukkan representasi hasil visualisasi primer deteksi genotipe null

GSTM/GSTT1. Berdasarkan hasil visualisasi tersebut primer dapat mendeteksi genotype null gen GSTM1/GSTT1. Pada sampel 1, 4, dan 5 terdeteksi bahwa sampel tersebut memiliki genotype null untuk GSTM1 dan GSTT1 dan hanya menunjukkan amplifikasi gen β -globin. Sampel 2 dan 3 menunjukkan amplifikasi gen GSTT1 sebesar 632-bp dan gen β -globin sebesar 180-bp, namun tidak ada amplifikasi gen GSTM1, yang mengindikasikan bahwa genotype tersebut adalah GSTM1 null. Sampel 6 menunjukkan amplifikasi gen GSTM1 sebesar 800-bp dan gen β -globin sebesar 180-bp, namun tidak ada amplifikasi gen GSTT1, yang mengindikasikan bahwa genotype tersebut adalah GSTT1 null.

Berdasarkan hasil PCR kami mentabulasikan frekuensi genotype null gen GSTM1 dan GSTT1 pada 25 sampel pasien (Tabel 1). Pasien TB dengan hepatotoksitas menunjukkan frekuensi GSTT1 null yang lebih besar di dibandingkan pasien TB tanpa hepatotoksitas, yaitu 90% vs 80%. Sebaliknya genotype null gen GSTM1 lebih banyak pada sampel pasien TB tanpa hepatotoksitas di dibandingkan dengan pasien TB dengan hepatotoksitas yaitu 100% vs 90%. Merujuk pada penelitian sebelumnya pada suku Jawa dan Sunda, genotype null gen GSTM1 dan GSTT1 ditemukan cukup besar yaitu 99% dan 67%.¹⁷

Sample pasien yang kami kumpulkan dari Rumah Sakit Pasar Rebo tidak kami ambil secara spesifik berdasarkan suku, namun demikian data ini sejalan dengan data pada normal populasi, khususnya suku Jawa-Sunda. Hal ini bisa menjadi rujukan untuk dilakukan penelitian yang lebih lanjut terkait genotype null gen GSTM1/GSTT1 pada pasien TB di Indonesia dengan jumlah yang lebih besar. Hasil sekuensing pada sampel dengan gen GSTM1 dan GSTT1 yang positif menunjukkan hasil similaritas sebesar 99% dengan data *gen bank* NCBI yang menunjukkan bahwa desain primer pada metode PCR multipleks ini spesifik terhadap gen GSTM1 dan GSTT1.

Tabel 1. Frekuensi Genotipe Gen
GSTM1/GSTT1

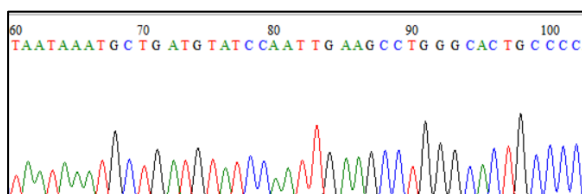
Genotipe	Pasien TB dengan hepatotoksitas (n=10)	Pasien TB tanpa hepatotoksitas (n=15)
GSTM1		
Present	1 (10%)	0 (0%)
Null	9 (90%)	15 (100%)
GSTT1		
Present	1 (10%)	3 (20%)
Null	9 (90%)	12 (80%)

Beberapa penelitian telah mengamati hubungan antara genotype GST dan hepatotoksitas yang diinduksi oleh obat antituberkulosis.^{6,18-20} Namun demikian hasil penelitian tersebut masih kontradiktif, Roy et al. melaporkan bahwa hubungan yang signifikan antara genotype null homozigot GSTM1 dan hepatotoksitas yang diinduksi obat anti-tuberkulosis pada pasien tuberkulosis India.¹⁸ Hal ini menunjukkan bahwa resiko pasien untuk mengembangkan hepatotoksitas karena pengobatan TB meningkat karena memiliki genotype null homozigot GSTM1. Namun demikian Roy et al. tidak menemukan hubungan yang signifikan antara genotype null GSTT1 dengan peningkatan resiko terhadap hepatotoksitas akibat pengobatan TB.¹⁸ Hasil penelitian Huang et al. pada populasi Cina mendukung hasil penelitian Roy et al. Huang et al. melaporkan juga bahwa genotype null homozigot GSTM1 meningkatkan resiko hepatotoksitas pada pasien TB.²¹ Penelitian meta-analisis yang dilakukan oleh Chanhom et al. menunjukkan bahwa genotype null GSTM1 meningkatkan resiko terhadap hepatotoksitas pada individu di populasi Asian Selatan dibandingkan individu pada populasi Caucasia, Asia Timur maupun Asia Tenggara.²²

Hasil penelitian pada pasien TB di Spanyol menunjukkan bahwa genotype null GSTT1 homozigot dilaporkan meningkatkan resiko hepatotoksitas yang diinduksi obat anti-TB, dan tidak ada hubungan signifikan yang ditemukan antara genotype null homozigot GSTM1 dan hepatotoksitas.¹⁹ Penelitian lain pada populasi Kaukasia menunjukkan bahwa genotype null GSTT1 juga meningkatkan resiko terhadap hepatotoksitas daripada genotype null GSTM1.¹⁹ Namun demikian hasil penelitian

Singla et al. justru melaporkan bahwa kombinasi genotipe *double* null GSTM1 dan GSTT1 terkait dengan resiko lebih besar pasien TB untuk mengembangkan hepatotoksitas akibat pengobatan TB.²⁰

Namun demikian terdapat beberapa penelitian yang tidak menemukan hubungan yang signifikan antara genotipe null GSTM1 maupun GSTT1 dengan hepatotoksitas akibat pengobatan TB. Penelitian terbaru pada pasien di Peru melaporkan hasil yang kontra dengan penelitian sebelumnya dan tidak menemukan hubungan yang signifikan antara genotipe null GSTM1 maupun GSTT1 dengan hepatotoksitas akibat obat anti-tuberkulosis.²³ Studi lain di India juga menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan antara GSTM1 dan GSTT1 dengan hepatotoksitas.² Penelitian lain pada populasi Cina juga menunjukkan tidak ada resiko peningkatan hepatotoksitas pada pasien dengan genotipe null GSTM1 maupun GSTT1.²⁴ Perbedaan ini dapat dijelaskan karena konsentrasi obat anti-tuberkulosis dan polimorfisme genetik sangat bervariasi antara populasi dan/atau individu.²³



Gambar 2. Kromatogram hasil sekuensing

Konfirmasi dengan metode sekuensing diperlukan untuk memastikan bahwa fragmen yang diamplifikasi adalah betul fragmen gen target. Dalam penelitian ini dilakukan konfirmasi sekuensing pada sampel yang tidak menunjukkan genotipe null baik pada gen GSTM1 maupun gen GSTT1. Hasil sekuensing berupa data basa-basa nukleotida yang diwakili sebagai grafik dengan warna tertentu yang dikenal sebagai kromatogram (Gambar 2). Dalam studi identifikasi *single nucleotide polymorphism* (SNP) pemisahan grafik kromatogram sangat menentukan hasil interpretasi. Urutan kromatogram dapat diklarifikasi secara manual dan harus menunjukkan tidak ada puncak yang tumpang tindih, yang mungkin menunjukkan 2

genotipe yang terkait erat atau menunjukkan pengikatan primer nonspesifik pada DNA sampel. Jika setelah dilakukan analisis terdeteksi bahwa ada primer nonspesifik maka proses amplifikasi dan sekuensing harus diulang.²⁵



Gambar 3. Hasil penyelarasan (alignment) hasil sekuensing gen A. Tubulin, B. GSTM1, C. GSTT1 dengan program BioEdit

Basa nukleotida hasil sekuensing konfirmasi kemudian dianalisis dengan *software* BioEdit. Saat ini, BioEdit menjadi *tool* bioinformatika yang sangat penting dalam studi biologi molekuler. Fitur dari BioEdit yang paling umum digunakan adalah fitur penyelarasan (*alignment*). Penyelarasan basa nukleotida hasil sekuensing konfirmasi gen Tubulin, gen GSTM1 dan gen GSTT1 dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil penyelarasan amplifikasi primer *forward* maupun primer *reverse* menunjukkan bahwa ketiga gen yang diteliti sejajar dengan sekuen referensi dari GenBank.

Sekuen konsensus hasil penyelarasan kemudian diverifikasi dengan basis data (*database*) genomik melalui fitur Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Basis data yang umum digunakan adalah National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang dikembangkan oleh peneliti dari National Institutes of Health (NIH). Algoritma BLAST memungkinkan perbandingan urutan basa yang didapatkan peneliti dengan data library pada GeneBank. BLAST mendeteksi kesamaan antara urutan basa nukleotida atau protein sampel uji dengan membandingkan urutan basa nukleotida atau protein pada urutan basa nukleotida atau protein pada database dan menghitung signifikansi statistik dari temuan tersebut. Perangkat lunak ini dirancang untuk mendeteksi hubungan fungsional dan evolusi antara urutan basa nukleotida serta untuk membantu

mengidentifikasi anggota *family gene*.²⁵ Hasil BLAST menunjukkan bahwa kesamaan (*similarity*) urutan basa gen Tubulin, gen GSTM1 dan gen GSTT1 sebesar 99% dengan urutan basa database GenBank. Hal ini menunjukkan bahwa primer yang dikembangkan dalam penelitian ini spesifik mendeteksi gen target dan mendeteksi genotype null dari gen GSTM1 dan gen GSTT1.

IV. SIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi genotype null gen GSTM1 dan GSTT1 dengan metode PCR multipleks pada pasien TB. Interpretasi hasil dapat dilakukan dengan jelas karena produk PCR teramplifikasi dengan baik. Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan jumlah sampel yang lebih besar untuk melihat hubungan menyeluruh antara genotype null GSTM1 dan GSTT1 dengan hepatotoksisitas akibat pengobatan TB.

V. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada pasien yang telah berpartisipasi dalam penelitian ini. Dukungan dana berasal dari Hibah Internal Universitas YARSI (No. 135/INT/UM/WRII/UY/VII/2017)

REFERENSI

1. World Health Organization(WHO). Global Tuberculosis Report 2021. Geneva, Switzerland; 2021.
2. Chatterjee S, Lyle N, Mandal a, Kundu S. GSTT1 and GSTM1 gene deletions are not associated with hepatotoxicity caused by antitubercular drugs. J Clin Pharm Ther [Internet]. 2010;35(4):465–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20853551>
3. Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, De Lange WCM, Van Der Ven AJ a M, Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review. Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia). 2008;23(2):192–202.
4. Da Fonseca RR, Johnson WE, O'Brien SJ, Vasconcelos V, Antunes A. Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases. BMC Evol Biol. 2010;10(1).
5. Saitou M, Ishida T. Distributions of the GSTM1 and GSTT1 null genotypes worldwide are characterized by latitudinal clines. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2015;16(1):355–61.
6. Huang YS. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2007;3(1):1–8.
7. Li C, Long J, Hu X, Zhou Y. GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity: An updated meta-analysis. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2013;32(7):859–68.
8. Ambreen K, Sharma R, Singh KP, Abbas1 M, Kumar S. Association of GSTM1, GSTT1 and CYP2E1 Gene Polymorphisms with Antituberculosis Drug Induced Hepatotoxicity in North Indian Population. Int J Health Sci Res. 2014;4:149–60.
9. Kasthurinaidu SP, Ramasamy T, Ayyavoo J, Dave DK, Adroja DA. GST M1-T1 null allele frequency patterns in geographically assorted human populations:A phylogenetic approach. PLoS One. 2015;10(4): e0118660.
10. World Health Organization. Treatment of tuberculosis. Geneva, Switzerland; 2010. 160 p.
11. Benichou C. Criteria of drug-induced liver disorders Report of an International Consensus Meeting. J Hepatol. 1990;11:272–6.
12. Shen Z, Qu W, Wang W, Lu Y, Wu Y, Li Z, et al. MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. BMC Bioinformatics. 2010;11(1):143.
13. Hawkins SFC, Guest PC. Multiplex analyses using real-time quantitative PCR. In: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.; 2017. p. 125–33.
14. Kim MS, Kang HJ, Park HJ, Yook YJ, Han BD, Kim CW, et al. Development of multiplex PCR method for the analysis of glutathione S-transferase polymorphism. Mol Diagn Ther. 2011;15(5):285–92.
15. Rychlik W, Spencer W, Rhoads R. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Vol. 18, Nucleic Acids Research. 1990.
16. Park M, Won J, Choi BY, Lee CJ. Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. Exp Mol Med. 2020 Jun 1;52(6):963–77.
17. Prayuni K, Razari I, Yuliwulandari R. Glutathione S-transferase M1 and T1 null allele frequencies among Indonesian ethnics toward improved disease risk assessment. Environ Toxicol Pharmacol. 2019;65:14-17.
18. Roy B, Chowdhury a, Kundu S, Santra a, Dey B, Chakraborty M, et al. Increased risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 “null” mutation. J Gastroenterol Hepatol. 2001;16(9):1033–7.

19. Leiro V, Fernandez-Villar A, Valverde D, Constenla L, Vazquez R, Pineiro L, et al. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population. *Liver International*. 2008;28(6):835–9.
20. Singla N, Gupta D, Birbian N, Singh J. Association of NAT2, GST and CYP2E1 polymorphisms and anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Tuberculosis*. 2014;94(3):293–8.
21. Huang YS, Su WJ, Huang YH, Chen CY, Chang FY, Lin HC, et al. Genetic polymorphisms of manganese superoxide dismutase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, glutathione S-transferase M1 and T1, and the susceptibility to drug-induced liver injury. *J Hepatol*. 2007;47(1):128–34.
22. Chanhom N, Udomsinprasert W, Chaikledkaew USA, Mahasirimongkol S, Wattanapokayakit S, Jittikoon J. GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and their association with antituberculosis drug-induced liver injury. *Biomed Rep*. 2020;12(4):153–62.
23. Jaramillo-Rangel G, Ortega-Martínez M, Cerda-Flores RM, Barrera-Saldaña H a. Polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, and GSTM3 genes and breast cancer risk in northeastern Mexico. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14(2):6465–71.
24. Tang SW, Lv XZ, Zhang Y, Wu SS, Yang ZR, Xia YY, et al. CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: A nested case-control study. *J Clin Pharm Ther*. 2012;37(5):588–93.
25. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2020 Nov 1;32(6):767–75.