

SKRIPSI

**DETEKSI MUTASI GEN Rv1419 PADA *Mycobacterium tuberculosis* DARI
PASIEN *MULTI-DRUG RESISTANT TUBERKULOSIS* (MDR-TB)
DI KOTA MAKASSAR**

**RAFFI GANI
H041191007**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**DETEKSI MUTASI GEN Rv1419 PADA *Mycobacterium tuberculosis* DARI
PASIEN *MULTI-DRUG RESISTANT* TUBERKULOSIS (MDR-TB)
DI KOTA MAKASSAR**

SKRIPSI

*Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada
program studi Strata Satu (S-1) Program Studi Biologi Fakultas Matematika
dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin*



Disusun dan diajukan oleh:

RAFFI GANI

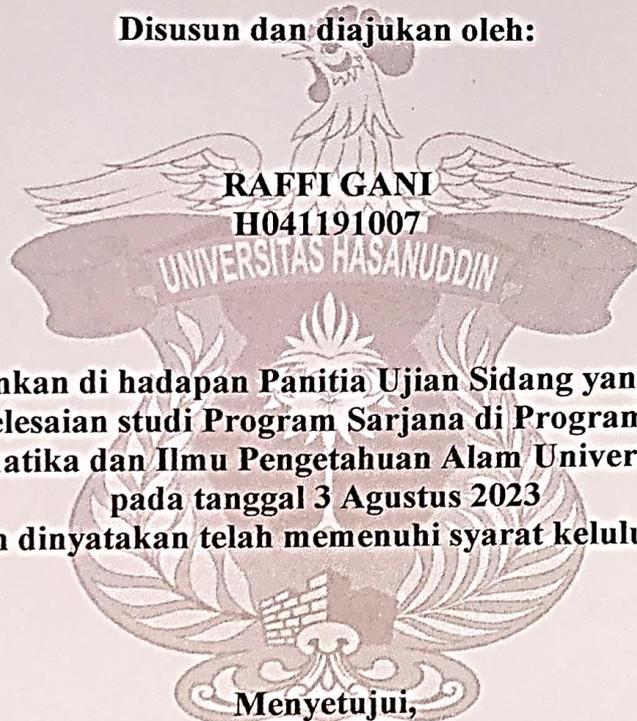
H041191007

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

LEMBAR PENGESAHAN

DETEKSI MUTASI GEN RV1419 PADA *Mycobacterium tuberculosis* DARI PASIEN MULTI-DRUG RESISTANT TUBERKULOSIS (MDR-TB) DI KOTA MAKASSAR

Disusun dan diajukan oleh:



Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang yang dibentuk dalam rangka penyelesaian studi Program Sarjana di Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal 3 Agustus 2023 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Dr. Rosana Agus, M.Si
NIP 19650905 199103 2 003

Pembimbing Pertama

Prof. Dr. Sjafaraenan, M.Si
NIP 19580816 198703 2 001

Ketua Program Studi,

Dr. Magdalena Litaay, M.Sc
NIP 19640929 198903 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini;

Nama : Raffi Gani

NIM : H041119007

Program Studi : Biologi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa skripsi saya yang berjudul:

“Deteksi Mutasi Gen Rv1419 pada *Mycobacterium tuberculosis* Dari Pasien
Multi-Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) Di Kota Makassar”

adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambil-alihan tulisan orang lain, bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari skripsi karya saya ini terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya dari orang lain yang saya pergunakan dengan cara yang melanggar hukum hak cipta, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan yang berlaku.

Makassar, 3 Agustus 2023
Yang menyatakan,



Raffi Gani
Raffi Gani

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Segala puji penulis panjatkan kehadirat Allah atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada Rasulullah Muhammad *Shallallahu 'Alaihi Wasallam* yang telah mengantarkan manusia dari zaman kebodohan ke zaman penuh ilmu pengetahuan seperti saat ini.

Skripsi ini memiliki judul *Deteksi Mutasi Gen Rv1419 pada Mycobacterium tuberculosis Dari Pasien Multi-Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) Di Kota Makassar*. Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk mencapai gelar Sarjana pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Berisikan tentang laporan hasil penelitian di bidang Genetika Molekuler untuk melihat kemungkinan mutasi genetik dari gen Rv1419 dari bakteri patologis *M. tuberculosis* di Kota Makassar.

Selama pelaksanaan penelitian hingga penyusunan skripsi ini, banyak masalah dan kendala yang penulis hadapi. Akan tetapi, berkat bantuan dari beberapa pihak sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini. Terkhusus kepada bapak Abdul Gani dan Ibu Sitti Aniah sebagai orang tua penulis mengucapkan terima kasih setulus-tulusnya dan sebesar-besarnya karena telah membesarkan, mendidik penulis dengan kasih sayang serta tiada hentinya mendoakan dan memberi dukungan moral serta materi kepada penulis. Penulis tak lupa pula mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Rosana Agus, M.Si., selaku Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Sjafaraenan, M.Si., selaku Pembimbing Pertama

yang memberikan arahan dan masukan dari penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian, hingga ke penyusunan skripsi ini. Selain itu, Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang memberikan bantuan selama perkuliahan hingga penyusunan tugas akhir ini, yakni:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. selaku Rektor Universitas Hasanuddin, Bapak Dr. Eng. Amiruddin, M.Si., selaku Dekan Fakultas MIPA, beserta Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc., selaku Ketua Program Studi Biologi. Terima kasih atas bantuan akademik dan administrasi lainnya yang membantu penulis dalam perkuliahan.
2. Ibu Dr. Irma Andriani, S.Pi, M.Si., selaku Pembimbing Akademik dan Dosen Penguji yang senantiasa memberikan saran-saran yang diberikan kepada Penulis dan memberikan bimbingan akademik dari awal perkuliahan hingga akhir studi, termasuk dalam penyusunan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Juhriah, M.Si. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan saran-saran dan masukan dalam penyusunan skripsi ini sehingga dapat menghasilkan skripsi dengan kualitas isi yang lebih baik.
4. Bapak/Ibu Dosen, Kakak Laboran, dan Bapak Ibu Staf Departemen Biologi yang memberikan ilmu, keterampilan, dan pengalaman kepada Penulis.
5. Kakak-kakak staf dan pegawai *Hasanuddin University Medical Research Center* Fakultas Kedokteran, terkhusus kepada Kakak Marina Binti Ali selaku Pembimbing selama proses penelitian yang dengan sabar mendampingi proses penelitian sehingga penelitian dapat diselesaikan dengan baik dan masalah-masalah selama penelitian dapat diatasi.
6. Teman-teman peneliti *Mycobacterium tuberculosis* Firazh Ahmadilla Ma'ga, Noer Zakiah Derajat S., dan Kak Deden Wahyudi, Kak St. Rahmah dan Kak

Wa Ode Siti Purnamasari selaku rekan seperjuangan selama 2-3 bulan meneliti gen Mtb. Semoga dapat lulus dengan hasil yang memuaskan.

7. Teman-teman sesama peneliti genetika, Muhammad Farid, Nur Fitrah Amelia, Noer Zakiah D. S., dan Firazh Ahmadilla M. yang saling tolong menolong di setiap permasalahan terkait penyelesaian tugas akhir ini
8. Teman-teman Biologi 2019, yang telah Bersama-sama belajar, mengasah diri, meningkatkan *skill*, dan berjuang bersama dari semester pertama perkuliahan hingga semester akhir ini.
9. Kakak, adik, dan teman-teman KMF MIPA Unhas dan Himbio FMIPA Unhas yang telah memberikan tempat pengembangan diri dan pelatihan sehingga penulis dapat meningkatkan kemampuan *softskill*
10. Teman-teman KKNT Smart Village, khususnya teman-teman posko 9 Desa Lipukasi yang terus memberikan motivasi dan semangat kepada penulis selama penyusunan skripsi.
11. Pihak-pihak yang tidak sempat penulis sebutkan satu persatu, yang memberikan bantuan baik moril, fisik, mental, maupun finansial.

Akhirnya, dengan segenap kerendahan hati, penulis memohon maaf atas kekurangan-kekurangan yang ada. Selain itu, penulis berharap karya ini dapat memberikan manfaat demi kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Wassalamu 'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Makassar, Agustus 2023

Raffi Gani

ABSTRAK

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit penyebab kematian tertinggi di dunia setiap tahunnya. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis complex*. Bakteri ini memiliki tingkat virulensi yang tinggi akibat gen-gen pengkode protein yang digunakan dalam proses infeksi inang. Salah satunya adalah gen Rv1419 yang mengkode sMTL-13, sebuah protein lektin β -trefoil tipe risin yang berperan dalam interaksi dengan sel inangnya. Masalah lain dari penyakit ini adalah adanya resistansi obat akibat mutasi gen yang terjadi, disebut dengan kasus MDR-TB (*Multi-Drug Resistant Tuberculosis*). Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mendeteksi adanya mutasi gen Rv1419 pada pasien MDR-TB di kota Makassar yang datanya dapat dijadikan informasi awal pengembangan diagnosis maupun kandidat vaksin. Penelitian dilakukan di Hasanuddin University Medical Research Center pada April – Juni 2023. Deteksi mutasi gen dilakukan dengan metode *Sanger Sequencing* yang kemudian dianalisis menggunakan aplikasi BioEdit dengan *Multiple Sequence Alignment* dan fitur BLAST pada laman NCBI. Hasil penelitian menunjukkan nilai *Query Cover* mencapai 94% hingga 96% dan *Percentage of Identity* mencapai 99% dengan *E value* bernilai 0. Selain itu, berdasarkan hasil *Multiple Sequence Alignment* dapat dilihat kecocokan sekuens gen antara ke-10 sampel dengan data sekuens gen Rv1419 dari NCBI. Penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat kesesuaian (*similarity*) yang tinggi antara gen Rv1419 sampel dengan gen Rv1419 pada GenBank oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa tidak terjadi mutasi gen gen Rv1419 pada pasien MDR-TB.

Kata kunci: Tuberkulosis, MDR-TB, Gen Rv1419, Mutasi gen, *Sequencing*

ABSTRACT

*Tuberculosis (TB) is one of the highest causes of death in the world every year. This disease is caused by the bacteria *Mycobacterium tuberculosis* complex. This bacterium has a high level of virulence due to the protein coding genes used in the host infection process. One of them is the Rv1419 gene, which encodes sMTL-13, a ricin-type β -trefoil lectin protein that plays a role in interactions with its host cells. Another problem with this disease is the possibility of drug resistance due to gene mutations that occur, which is called MDR-TB (Multi-Drug Resistant Tuberculosis) case. Therefore, a study was conducted to detect the presence of Rv1419 gene mutations in MDR-TB patients in Makassar City, which data can be used as initial information for the development of a diagnosis or vaccine candidate. The research was conducted at the Hasanuddin University Medical Research Center from April to June 2023. Gene mutation detection was carried out using the Sanger Sequencing method which was then analyzed using the BioEdit application with Multiple Sequence Alignment and the BLAST feature on the NCBI website. The results showed that the Query Cover value reached 94% to 96% and the Percentage of Identity reached 99% with an E value of 0. In addition, based on the Multiple Sequence Alignment results, it can be seen that the gene sequence matches between the 10 samples and the Rv1419 gene sequence data from NCBI. This study showed that there was a high degree of similarity between the sample Rv1419 gene and the Rv1419 gene in GenBank. Therefore, it can be concluded that there was no mutation of the Rv1419 gene in MDR-TB patients.*

Keywords: *Tuberculosis, MDR-TB, Rv1419 gene, gene mutation, sequencing*

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGAJUAN.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Tujuan Penelitian	4
I.3 Manfaat Penelitian	4
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
II.2 Patogenitas <i>M. tuberculosis</i>	6
II.3 Perawatan Pasien Tuberkulosis	9
II.4 <i>Multi-Drug Resistant</i> Tuberkulosis	11
II.4.1 Mekanisme Resistansi Rifampisin.....	12

II.4.2 Mekanisme Resistansi Isoniazid	13
II.5 Gen Rv1419.....	15
II.6 Mutasi Gen	17
II.7 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	19
II.6 DNA <i>Sequencing</i>	22
II.6.1 Teknik Sanger <i>Sequencing</i>	23
BAB III METODE PENELITIAN.....	26
III.1 Alat.....	26
III.2 Bahan.....	26
III.3 Prosedur Kerja.....	26
III.3.1 Kriteria Sampel <i>Multi Drug Resistant</i>	26
III.3.2 Pengambilan dan Dekontaminasi Sputum	27
III.3.2 Pewarnaan Ziehl-Neelsen	27
III.3.3 Ekstraksi DNA	28
III.3.4 Amplifikasi Gen Rv1419 dengan PCR	29
III.3.5 Elektroforesis	30
III.3.6 <i>Sequencing</i> DNA	31
III.3.7 Analisis Hasil <i>Sequencing</i>	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	32
IV.1 Hasil Pengambilan Sampel	32
IV.2 Ekstraksi DNA	35
IV.3 Amplifikasi Gen Rv1419	36
IV.4 Analisis Mutasi Gen Rv1419	39

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	45
V.1 Kesimpulan.....	45
V.2 Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	51

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Kategori Hasil Pewarnaan Ziehl-Neelsen	28
2. Data Pasien Sampel MDR-TB	32
3. Hasil <i>Sequencing</i> Sampel.....	40
4. Data Hasil Analisis Nilai Kesamaan (<i>Similarity Score</i>)	42

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2. Patogenesis bakteri <i>M. tuberculosis</i> penyebab Tuberkulosis	7
3. Interaksi MHC tipe II dengan bakteri <i>M. tuberculosis</i>	8
4. Mekanisme Resistansi Obat Anti-TB.....	12
5. Lokus gen Rv1419 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
6. Contoh Mutasi yang Terjadi Akibat Pengaruh Lingkungan	18
7. Mekanisme PCR dalam Amplifikasi Gen.....	21
8. Tahapan dalam Teknik Sanger <i>Sequencing</i>	25
9. Hasil Pewarnaan Ziehl Neelsen dari Sampel Sputum.....	34
10. Hasil Ekstraksi DNA <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36
11. Hasil BLAST <i>Primer Forward</i>	37
12. Hasil BLAST <i>Primer Reverse</i>	37
13. Hasil Elektroforesis Sampel MDR-TB	38
14. Visualisasi Hasil <i>Alignment</i> Antara Sampel dengan Data Gen Rv1419 dari NCBI dengan BioEdit	41

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Skema Kerja	51
2. Peta Origin Antara Primer dan Gen Rv1419 dari DataBank	57
3. Hasil Sekuensing Sampel	58
4. Komposisi Bahan	61
5. Hasil Analisis BLAST	63
6. Dokumentasi Penelitian	66

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit yang menjadi penyebab kematian tertinggi di dunia setiap tahunnya. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC), jenis bakteri basil yang biasanya masuk ke tubuh melalui saluran pernapasan (transmisi inhalasi). Gejala infeksi dari *M. tuberculosis* ini sangat bervariasi, dari tanpa gejala akibat respon imun yang cepat, gejala infeksius dari penyakit paru-paru hingga meningitis, hingga penyakit laten yang dapat muncul kembali setelah kasus pertama. Secara umum, gejala yang timbul akibat infeksi *M. tuberculosis* pada penyakit TB bergantung pada variabel inang (faktor genetik dan ketahanan tubuh inang terhadap bakteri) serta lingkungan (Coscolla dan Gagneux, 2014).

Tuberkulosis merupakan penyakit yang dapat menular melalui media udara. Penyakit ini merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi oleh infeksi agen tunggal, setelah Covid-19. Penyakit ini menyerang paru-paru, akan tetapi dapat menjangkiti organ lainnya juga. Sekitar 90% penderitanya adalah orang dewasa menyebabkannya menjadi penyakit yang telah menginfeksi seperempat populasi dunia. Penyakit ini sebenarnya dapat disembuhkan melalui perawatan dan pemberian obat selama 1 – 6 bulan. Akan tetapi, kurangnya diagnosis dan cepatnya penyebaran menjadikan angka kematian akibat TB meningkat (WHO, 2021). Menurut data WHO (2021), penyakit TB menyerang 9,9 juta orang di seluruh dunia dengan 1,5 juta pasien di antaranya meninggal dunia.

Menurut data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2022), pada 2 dekade terakhir, Indonesia menunjukkan angka kasus TB yang relatif meningkat tiap tahunnya. Pada 2020 misalnya terdapat 393.323 kasus TB dan meningkat pada 2021 hingga sebesar 443.235 kasus dengan 15.186 kasus di antaranya meninggal dunia. Di Sulawesi Selatan sendiri, menurut data Dinas Kesehatan Sulawesi Selatan, terdapat 12.203 kasus TB di 24 kabupaten/kota di Sulawesi Selatan. Di Kota Makassar sendiri, jumlah kasus TB dikonfirmasi sebanyak 3255 kasus pada 2020.

Bakteri *M. tuberculosis* dikenal sebagai bakteri yang sangat mematikan. Hal ini disebabkan karena bakteri ini memiliki kemampuan yang dimiliki oleh bakteri ini yang dapat menyebabkan beberapa gangguan bagi inangnya bahkan hingga kematian. Beberapa kemampuan penting tersebut seperti: memiliki fase non-replikasi dalam jangka waktu lama yang menyebabkan infeksi laten, mengatur kembali metabolismenya saat infeksi kronis, memiliki dinding sel yang tebal dan berlapis lilin (*wax*), memiliki resistansi terhadap beberapa obat intrinsik dan toleransi terhadap antibiotik, serta dapat bereplikasi di dalam makrofag dan mengekspresikan beragam imunomodulator (Gordon dan Parish, 2018).

Bakteri *M. tuberculosis* memiliki tingkat virulensi yang tinggi. Bakteri ini memiliki gen-gen yang mengkode beberapa sekret yang berperan dalam infeksi bakteri ke inang. Salah satu gen tersebut adalah Rv1419 yang mengkode protein sMTL-13, protein lektin β -trefoil tipe risin. Meskipun peran spesifiknya belum diketahui pasti, diketahui bahwa protein ini bersama protein permukaan bakteri *M. tuberculosis* lainnya berperan dalam proses adhesi bakteri ke sel inang (Kolbe, *et al.*, 2019).

Masalah lain terkait virulensi *M. tuberculosis* adalah kemampuan bermutasi genetik yang dapat berakibat pada resistansi obat, terutama pada kasus pasien TB laten. Mutasi yang dimaksud adalah perubahan materi genetik (DNA maupun RNA) pada urutan gen atau segmen kromosom yang menyebabkan terbentuknya sifat baru yang dapat menjadi permanen dan dapat diwariskan (*viable*) (Arumingtyas, 2019). Menurut Pratiwi (2017), mutasi genetik dapat menyebabkan perubahan susunan basa nitrogen hingga terbentuknya gen-gen resisten terhadap obat yang diberikan kepada pasien. Penyebab terjadinya mutasi dapat berasal dari pemberian obat antibiotik yang tidak rutin, kinerja obat yang tidak tepat sasaran, hingga faktor aktivitas pasien yang merusak. Resistansi obat inilah yang menjadi tantangan baru dalam menanggulangi tuberkulosis di dunia. Pasien yang resistansi terhadap lini pertama obat tuberkulosis disebut pasien MDR (*Multi Drug Resistant*).

MDR-TB adalah suatu kasus ketika pasien telah terinfeksi strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap obat isoniazid dan rifampisin. Obat-obatan ini yang biasanya ampuh menyerang target bakteri sehingga pasien perlu diberikan obat lini kedua, *fluoroquinone* (Seung, *et al.*, 2015). Menurut WHO (2021), proporsi pasien yang berhasil dirawat melampaui 85% akan tetapi untuk pasien *Multi Drug Resistant/Rifampicin-Resistant* (MDR/RR) tidak mencapai 60% pasien yang berhasil dirawat. Selain itu, dilaporkan bahwa pemberian perawatan yang berkepanjangan menderita efek samping akibat perawatan yang tidak memadai. Oleh karena resistansi terhadap beberapa jenis obat anti-TB, maka diperlukan analisis dan pengujian kerentanan obat secara genotipik maupun fenotipik untuk mengetahui pengobatan yang baik (Lange, *et al.*, 2019).

Berdasarkan penjelasan di atas, dapat dilihat bahaya dari kasus resistansi tuberkulosis yang diakibatkan oleh mutasi genetik. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian mengenai mutasi genetik gen, seperti gen Rv1419 *M. tuberculosis*, dari pasien *Multi Drug Resistant* Tuberkulosis (MDR-TB).

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya mutasi gen Rv1419 yang terjadi pada *Mycobacterium tuberculosis* yang menginfeksi pasien *Multi Drug Resistant* Tuberkulosis (MDR-TB) di Kota Makassar.

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai mutasi gen Rv1419 pada *Mycobacterium tuberculosis* dari pasien *Multi Drug Resistant* Tuberkulosis (MDR-TB) di Kota Makassar yang dapat digunakan dalam pengembangan diagnosis MDR-TB.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April - Juni 2023 di Unit Tuberkulosis *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC), Fakultas kedokteran, Universitas Hasanuddin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

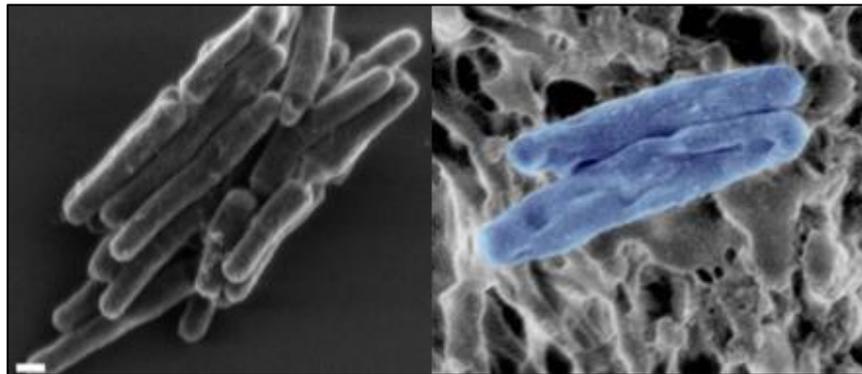
II.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* adalah bakteri basil aerob dengan pertumbuhan yang lambat, dengan waktu generasi sekitar 12-24 jam pada kondisi optimal (sekitar 37°C). Secara fisiologis, bakteri ini tergolong jenis kemoorganotrofik, non motil, tidak membentuk spora, serta memiliki kemampuan memproduksi niansin dan mereduksi nitrat. Dewasa ini, teknik identifikasi yang paling sering digunakan yakni dengan analisis lokus genetik spesifik berbasis PCR. Secara biosistematik, taksonomi dari *M. tuberculosis* adalah sebagai berikut (Gordon dan Parish, 2018):

Filum	: Actinobacteria
Classis	: Actinobacteria
Ordo	: Actinomycetales
Familia	: Mycobacteriaceae
Genus	: <i>Mycobacterium</i>
Species	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Bakteri *M. tuberculosis* merupakan bakteri penyebab penyakit Tuberkulosis (TB) yang merupakan salah satu penyakit dengan jumlah kasus tertinggi tiap tahunnya. Fitur utama yang menyebabkan kenapa bakteri ini memiliki virulensi yang tinggi berhubungan dengan struktur membran dan dinding selnya. Struktur dinding sel yang tebal memberikan sebuah penghalang kedap air (hidrofobik) yang

sangat kuat untuk senyawa berbahaya dan obat-obatan. Selain itu, secara fungsional, membran luarnya mirip dengan membran bakteri gram negatif (meskipun bukan bakteri gram positif), yakni terdiri dari lipid bilayer asimetris yang terbuat dari asam lemak panjang pada lapisan dalam (asam mikolat) dan glikolipid dan komponen lilin di lapisan luar (Gordon dan Parish, 2018).



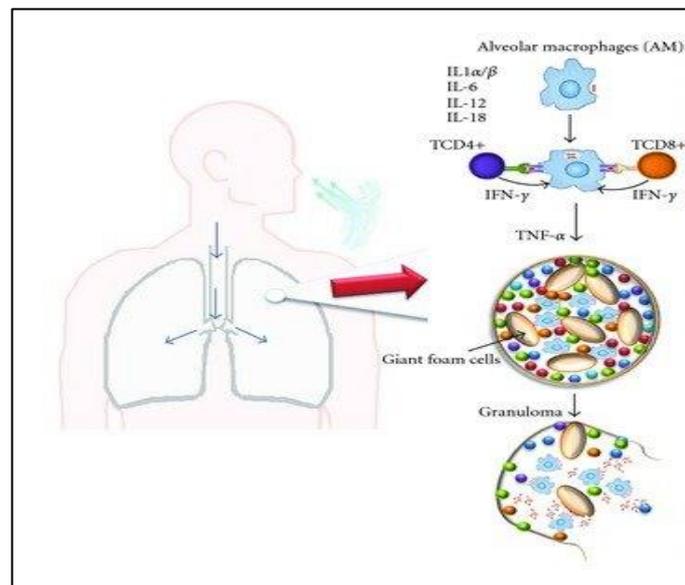
Gambar 1. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Schoonmaker *et al.*, 2014)

Strain bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang secara luas digunakan dalam penelitian adalah strain H37Rv. Strain ini pertama kali disekuens oleh Cole dan tim penelitiannya pada 1998 yang diisolasi dari pasien tuberkulosis paru-paru. Sejak saat itu, strain H37Rv tetap menjadi strain yang paling sering digunakan dalam penelitian laboratorium dan *whole genom sequence* dari strain H37Rv 1998 diterima secara luas sebagai referensi sekuens *M. tuberculosis* dan digunakan dalam berbagai penelitian, seperti pensejajaran (*alignment*) dan analisis DNA, RNA, dan studi Tn-Seq (Chitale *et al.*, 2022).

II.2 Patogenitas *M. tuberculosis*

Penyakit Tuberkulosis disebabkan karena infeksi oleh bakteri *M. tuberculosis* yang merupakan bakteri aerobik obligat sehingga lebih menyukai jaringan yang kaya akan oksigen. Oleh karena itu, bakteri ini biasanya menyerang

pertama kali pada jaringan pernapasan terutama paru-paru yang memiliki tekanan apikal lebih tinggi dibandingkan jaringan lain yang akan mendukung pertumbuhan bakteri ini. *M. tuberculosis* dapat menular melalui transmisi udara. Ketika penderita aktif berbicara, bersin, maupun batuk secara tidak langsung akan mengeluarkan droplet nukleai yang mengandung mikroba ini dan jatuh di permukaan benda. Droplet ini kemudian menguap sehingga bakteri yang terkandung dalam droplet terbang melayang pada aliran udara. Apabila bakteri ini terhirup oleh orang sehat, maka orang tersebut berpotensi besar terinfeksi bakteri *M. tuberculosis* dan dapat menderita tuberkulosis, terlebih bila sistem imunnya sedang turun (Martyah dan Zulkarnain, 2021).

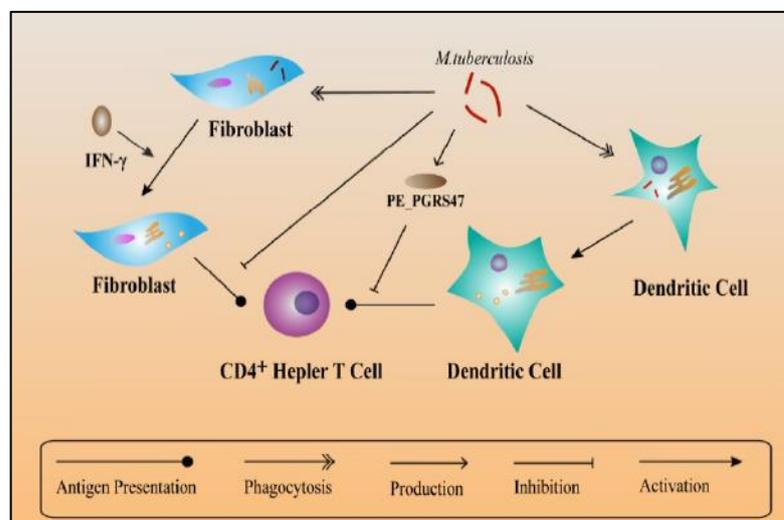


Gambar 2. Patogenesis bakteri *M. tuberculosis* penyebab Tuberkulosis (Zuñiga *et al.*, 2012)

Setelah terinfeksi oleh *M. tuberculosis*, terdapat kemungkinan sebesar 10% bahwa inang tersebut akan menderita tuberkulosis dan bakteri akan menyerang banyak organ. Membran sel bakteri *M. tuberculosis* yang kompleks mengandung asam lemak rantai cabang metil melindungi mereka dari enzim inang dan

memungkinkan mereka untuk lolos dari respon imun. Ada berbagai aspek interaksi makrofag-mikobakteri, seperti pengikatan *M. tuberculosis* ke makrofag melalui reseptor permukaan, fusi fagosom-lisosom, pertumbuhan mikobakteri, penghambatan/kerusakan melalui mekanisme radikal bebas (oksigen reaktif dan intermediet nitrogen), mekanisme yang di mediasi sitokin untuk merekrut sel imun aksesori untuk respon inflamasi lokal dan presentasi antigen ke sel T untuk pengembangan imunitas yang didapat (Zhai, *et al.*, 2019).

Berbagai sistem kekebalan tubuh yang berbeda bekerja melawan serangan bakteri *M. tuberculosis*. Keberhasilan *M. tuberculosis* selama ribuan tahun dalam menginfeksi manusia berasal dari kemampuannya untuk mengalahkan mekanisme imunitas tubuh pada awal infeksi, yakni makrofag. Pada awal infeksi, *M. tuberculosis* berhasil melubangi fagosom di makrofag melalui sistem ESX dan berhasil menghambat pematangannya via Npk, yang berakibat pada terhambatnya lalu lintas lisosom dan aktivitas NADPH-oksidadase (Zhai, *et al.*, 2019).



Gambar 3. Interaksi MHC tipe II dengan bakteri *M. tuberculosis* (Zhai, *et al.*, 2019)

Menurut De Martino, *et al.* (2019), mekanisme pertahanan *M. tuberculosis* terhadap sistem imunitas juga di antaranya bekerja pada tingkat DNA makrofag, pencegahan kerja sistem penghancuran patogen melalui autofag. DNA *M. tuberculosis* berhasil mencegah aktivasi anflammasome AIM2 sehingga menghambat sintesis IL-1 β dan IL-18. Pada kondisi yang normal, IFN- γ akan merangsang ekspresi molekul MHC kelas II pada makrofag. Tetapi berkat aktivasi TLR2 yang berkepanjangan, *M. Tuberculosis* berhasil menekan mekanisme ini. Bahkan dalam sel yang sudah mengespresikan molekul MHC kelas II, *M. Tuberculosis* berhasil memblokir presentasi antigen melalui aksi protein EsxG-EsxH pada ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*). *M. Tuberculosis* juga mengganggu fungsi dari sel dendritik, neutrofil, dan seluruh komponen sistem imunitas lainnya dalam tubuh. Menurut Zhai, *et al.* (2019), dengan menekan pematangan makrofag dan pengasaman lisosom serta menghambat stres oksidatif, apoptosis dan autofag, *M. Tuberculosis* dapat tetap bertahan di inang selama bertahun-tahun. Melalui mekanisme inilah yang kemudian menyebabkan kasus TB laten.

II.3 Perawatan Pasien Tuberkulosis

Pengobatan tuberkulosis ditujukan untuk menyembuhkan dan mengurangi penularan penyakit secara cepat. Agar hal ini terjadi, obat-obatan yang digunakan harus dapat mengurangi populasi bakteri basil dengan cepat (menghentikan penularan), mencegah seleksi galur yang resisten secara alami (menghindari munculnya resistansi obat selama terapi), dan mensterilkan lesi (mencegah kekambuhan penyakit). Meskipun rencana pengobatan anti-tuberkulosis memiliki kemanjuran hingga 95%, efektivitas pengobatan (pasien yang sembuh pada akhir

pengobatan dalam kondisi rutin) sangat bervariasi menurut lokasi. Satu penyebab rendahnya efektivitas adalah ketidakpatuhan pasien. Ketidakpatuhan ini dapat berupa konsumsi yang tidak teratur, penggunaan obat maupun dosis yang salah, hingga pasien memutuskan berhenti minum obat (Rabahi, *et al.*, 2017).

Beberapa obat anti-TB yang disetujui oleh FDA untuk pengobatan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* yakni: rifampisin, isoniazid, pirazinamid, dan etambutol. Komplikasi terapi tuberkulosis yang ditakuti adalah tuberkulosis yang resistan terhadap berbagai obat (MDR-TB). MDR-TB dibedakan dari resistansinya terhadap obat lini pertama isoniazid dan rifampisin. Terapi untuk MDR-TB terus berkembang, dan saran terus berubah. Obat lini kedua yang umum digunakan untuk MDR-TB adalah kanamisin, kapreomisin, dan amikasin melalui suntikan. Fluorokuinolon seperti levofloxacin, moxifloxacin, dan gatifloxacin juga merupakan agen lini kedua yang umum digunakan ketika resistansi obat berkembang terhadap agen lini pertama. Obat yang baru-baru ini menerima persetujuan FDA untuk TB resistansi multi-obat adalah pretomanid, digunakan secara berurutan dengan bedaquiline dan linezolid. Jenis MDR-TB yang lebih berbahaya dan tidak umum adalah TB yang resistan terhadap banyak obat (XDR-TB). Infeksi ini secara khas menunjukkan resistansi terhadap obat lini pertama rifampisin dan isoniazid, satu aminoglikosida lini kedua, dan salah satu dari fluorokuinolon (Padda, *et al.*, 2021).

Rifampisin adalah turunan senyawa rifamisin yang diperkenalkan pada tahun 1972 sebagai agen antituberkulosis. Obat ini adalah salah satu antibiotik anti-TB yang paling efektif dan bersama dengan isoniazid merupakan dasar dari rejimen pengobatan multi-obat untuk TB. Rifampisin aktif melawan bakteri basil yang aktif tumbuh maupun dengan metabolisme lambat. Cara kerja rifampisin pada M.

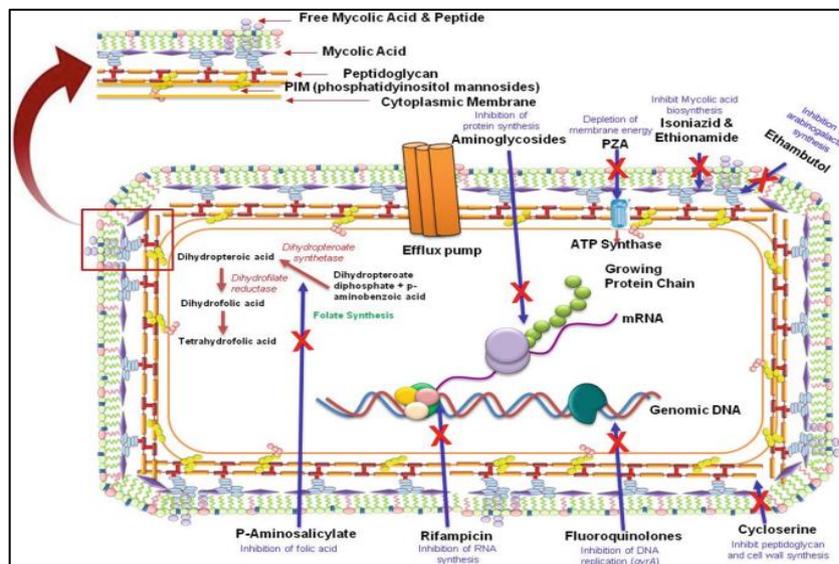
tuberculosis adalah dengan mengikat subunit β dari RNA polimerase sehingga menghambat pemanjangan m-RNA. Sementara itu, isoniazid diperkenalkan pada tahun 1952. Tidak seperti rifampisin, isoniazid hanya aktif terhadap basil replikasi yang aktif secara metabolik. Juga dikenal sebagai hidrazida asam isonikotinic, isoniazid adalah pro-obat yang membutuhkan aktivasi oleh enzim katalase/peroksidase KatG, yang dikodekan oleh gen katG, untuk mengerahkan efeknya. Isoniazid bekerja dengan menghambat sintesis *mycolic acid* melalui NADH-dependent enoyl-acyl carrier protein (ACP)-reductase, yang dikodekan oleh inhA (Palomino dan Martin, 2014).

II.4 Multi-Drug Resistant Tuberculosis

Multi-Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) adalah istilah kasus yang diberikan pada pasien yang telah terinfeksi strain *M. Tuberculosis* yang resisten terhadap obat isoniazid dan rifampisin. Perlu diketahui bahwa isoniazid dan rifampisin merupakan jenis obat kuat yang digunakan sebagai lini pertama dalam perawatan tuberkulosis. Oleh karena itu, pasien yang resisten terhadap obat ini tidak mempan lagi diberi perawatan standar dan perlu diberikan perawatan obat anti-tuberkulosis lini kedua, yakni fluorokuinolon (Seung, *et al.*, 2015).

Resistensi obat tuberkulosis pada pasien MDR terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dihasilkan dari mutasi kromosom spontan dan acak yang mengakibatkan berkurangnya kerentanan terhadap agen spesifik. Mekanisme yang berakibat pada resistensi obat meliputi aktivasi pompa efluks pada permukaan bakteri, perubahan target obat, produksi enzim inaktivasi obat, dan gangguan aktivasi obat. Tingkat kasus TB-MDR relatif rendah, karena tingkat mutasinya adalah 10^{-5} untuk isoniazid dan 10^{-7} untuk rifampisin. Resistensi obat dapat terjadi

dalam dua cara (resistensi primer atau sekunder). Resistansi primer berkembang ketika pasien terpapar dan terinfeksi dengan strain yang sudah resistan terhadap obat. Resistansi sekunder atau resistansi yang didapat berkembang karena ketidakpatuhan terhadap pengobatan, malabsorpsi obat, dan rejimen yang tidak memadai di antara pasien yang minum obat TB. Meskipun sebagian besar kasus MDR-TB adalah resistansi sekunder, penelitian sebelumnya melaporkan bahwa sebagian besar insiden MDR-TB dihasilkan dari penularan daripada resistansi yang didapat selama pengobatan di sebagian besar rangkaian beban tinggi (Jang dan Chung, 2020).



Gambar 4. Mekanisme Resistansi Obat Anti-TB (Singh *et al.*, 2020)

II.4.1 Mekanisme Resistansi Rifampisin

Sebagian besar isolat klinis *M. tuberculosis* yang resisten terhadap rifampisin mengandung mutasi pada gen *rpoB* yang mengkode subunit β dari RNA polimerase. Akibatnya, terjadi perubahan konformasi yang menurunkan afinitas terhadap obat dan menghasilkan perkembangan resistansi. Pada sekitar 96% isolat *M. tuberculosis* yang resisten terhadap rifampisin, terdapat mutasi pada apa yang

disebut “wilayah *hot-spot*” dari 81-bp yang mencakup kodon 507–533 dari gen *rpoB*. Wilayah ini juga dikenal sebagai wilayah penentu resistansi rifampisin. Mutasi pada kodon 516, 526 dan 531 adalah mutasi yang paling sering dikaitkan dengan resistansi rifampisin pada sebagian besar penelitian. Meskipun lebih jarang, beberapa laporan juga mencatat terjadinya mutasi di luar wilayah *hot-spot* *rpoB*. Resistansi silang dengan rifamycin lain dapat terjadi (Palomino dan Martin, 2014).

Mutasi pada beberapa kodon (misalnya, 518 atau 529) telah dikaitkan dengan resistansi tingkat rendah terhadap rifampisin tetapi masih rentan terhadap *rifamycin* lain, seperti rifabutin atau rifalazil. Hal ini penting untuk pasien TB yang perlu menerima terapi antiretroviral karena rifabutin adalah penginduksi enzim oksidatif sitokrom P450 CYP3A yang kurang efektif. Sebaliknya, monoresisten terhadap rifampisin cukup jarang dan hampir semua strain yang resisten terhadap rifampisin juga resisten terhadap obat lain, terutama isoniazid. Inilah alasan mengapa resistansi rifampisin dianggap sebagai penanda pengganti untuk MDR-TB (Palomino dan Martin, 2014).

II.4.2 Mekanisme Resistansi Isoniazid

Isoniazid sebagai salah satu obat anti-TB meskipun strukturnya sederhana, resistansi terhadap obat ini telah dikaitkan dengan mutasi pada beberapa gen, seperti *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, dan *NDH*. Dua mekanisme molekuler utama resistansi isoniazid dikaitkan dengan mutasi gen di *katG* dan *inhA* atau daerah promotornya. Banyak penelitian telah menemukan mutasi pada dua gen ini dikaitkan dengan resistansi isoniazid (Palomino dan Martin, 2014).

Di antara ini, mutasi gen yang paling umum telah diidentifikasi sebagai S315T di katG yang menghasilkan produk isoniazid yang kurang dalam membentuk adisi isoniazid-NAD yang diperlukan untuk aktivitas antimikrobanya. Mutasi ini secara konsisten dikaitkan dengan resistansi tingkat tinggi (MIC > 1 µg/mL) terhadap isoniazid dan lebih sering terjadi pada strain MDR. Mutasi kedua yang paling umum terjadi pada regio promotor inhA yang menyebabkan ekspresi berlebih dari InhA atau lebih jarang, mutasi pada sisi aktifnya, yang menurunkan afinitasnya terhadap adisi isoniazid-NAD. Mutasi pada inhA tidak hanya menyebabkan resistansi terhadap isoniazid tetapi juga terhadap obat ethionamide yang terkait secara struktural, yang memiliki target yang sama. Pada *M. tuberculosis*, mutasi pada promotor ahpC adalah mutasi kompensasi untuk hilangnya aktivitas katalase/peroksidase daripada penyebab resistansi isoniazid. Selain itu, overekspresi AhpC tidak memberikan resistansi terhadap isoniazid (Palomino dan Martin, 2014).

II.4.3 Usaha Pengobatan MDR-TB

Pengujian kerentanan obat genotipik dan fenotipik yang mendalam diperlukan untuk menyusun rencana pengobatan pengobatan yang dipersonalisasi untuk meningkatkan hasil pengobatan. Deteksi resistansi rifampisin (RMP) pada uji molekuler (misalnya, Xpert) sering kali menjadi bukti pertama adanya MDR-TB. Dengan pengecualian yang jarang, ketika tidak ada hasil tes lain yang mengkonfirmasi resistansi RMP tersedia, pasien tidak boleh menerima rencana pengobatan MDR-TB standar berdasarkan hasil tes Xpert saja. Deteksi resistansi RMP menggunakan Xpert harus selalu dikonfirmasi dengan tes molekuler tambahan yang juga dapat mendeteksi mutasi yang terkait dengan resistansi obat lain (Lange, *et al.*, 2019).

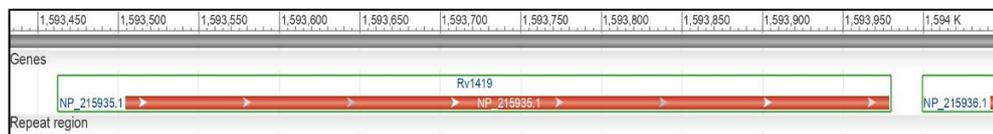
Pengobatan TB-MDR sulit dilakukan karena obat TB lini kedua sebagian besar lemah dan beracun. Sebagian besar obat ini dikembangkan beberapa dekade yang lalu tetapi hampir tidak pernah digunakan karena profil efek samping yang buruk. Karena aktivitas sterilisasi yang lemah dari obat TB lini kedua, pengobatan TB-MDR umumnya membutuhkan waktu 18-24 bulan. Dalam program pengobatan terbaik, yang mengatasi hambatan sosial ekonomi dan secara agresif mengelola efek samping, tingkat kesembuhan 60% -80% telah dilaporkan. Namun, secara global, angka kesembuhan untuk MDR-TB jauh lebih rendah. Pada tahun 2013, WHO melaporkan bahwa hanya 48% pasien TB-MDR yang sembuh. Tingkat kesembuhan global untuk XDR-TB bahkan lebih rendah: Hanya 20% yang sembuh, dan 44% meninggal (Seung, *et al.*, 2015).

Penelitian beberapa tahun terakhir ditujukan untuk mengembangkan obat anti-TB baru, dengan tujuan meningkatkan pengobatan TB. Sekarang ada dua obat anti-TB baru yang dibuat khusus, yang pertama dalam lebih dari 40 tahun. Bedaquiline disetujui secara kondisional oleh FDA AS untuk pengobatan MDR-TB pada Desember 2012. Delamanid disetujui secara kondisional oleh European Medicines Agency pada November 2013. Setidaknya tiga obat TB baru tambahan sedang dalam uji klinis fase akhir. Obat baru ini kemungkinan besar akan merevolusi pengobatan TB-MDR dan TB-XDR (Seung, *et al.*, 2015).

II.5 Gen Rv1419

Gen Rv1419 merupakan gen dengan *Open Reading Frame* (ORF) yang mengandung 474 nukleotida yang secara hipotesis mengkode protein dengan 157 asam amino dan peptide *signaling* yang diprediksi dengan 33 asam amino N-

terminal. Analisis struktural protein Rv1419 dengan Teknik bioinformatika dan difraksi sinar-X menunjukkan bahwa protein tersebut termasuk ke dalam kelompok β -trefoil tipe risin. Protein ini terlibat dalam berbagai proses biologis, misalnya adhesi sel ke sel, mitosis sel dan imunitas bawaan, serta berperan penting dalam interaksi inang-patogen (Liang, *et al.*, 2016). Menurut Dellanoy, *et al.* (2020), sekret lektin β -trefoil tipe risin, yang dikodekan oleh gen Rv1419, telah terdeteksi pada efusi pleura dan granuloma pasien penderita tuberkulosis aktif. Senyawa ini memodulasi adhesi ke makrofag dan memengaruhi pertumbuhan *M. tuberculosis* intraseluler.



Gambar 5. Lokus gen Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis* (NCBI, 2023)

Analisis molekuler dari gen Rv1419 menunjukkan bahwa terdapat sekret berupa 13kDA lektin, yang kemudian disebut sMTL-13. Produk gen *M. tuberculosis* dari Rv1419 menunjukkan kemiripan sekuens asam amino 41% dengan lektin tipe-R dan mengkodekan protein *M. tuberculosis* sMTL-13. Peneliti berhasil mendeteksi titer antibodi IgG yang tinggi terhadap sMTL-13 dalam serum dari pasien TB dengan hasil yang berkurang setelah terapi antituberkulosis sukses. Hasil ini menunjukkan bahwa lektin mikobakteri ini diekspresikan secara *in vivo* dan mungkin penting untuk infeksi *M. tuberculosis*. Selanjutnya, antibodi anti-sMTL-13 dapat berfungsi sebagai biomarker perkembangan pengobatan penyakit. Namun, fungsi pasti dari sMTL-13 dan spesifisikasi ligannya masih belum diketahui. Seperti dijelaskan sebelumnya, beberapa lektin tipe-R menunjukkan

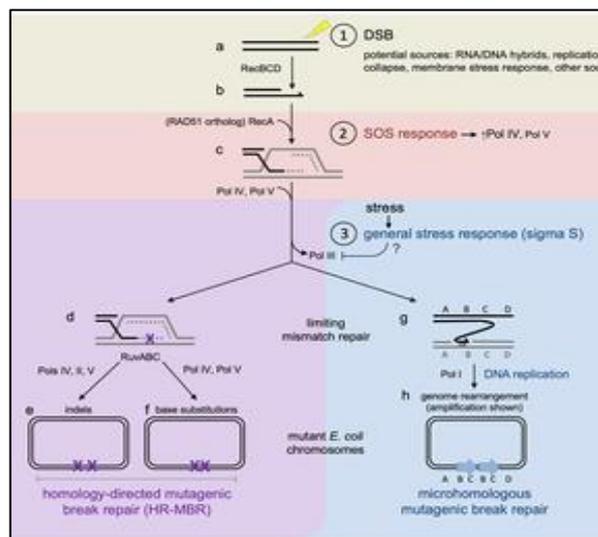
aktivitas toksin (Kolbe, *et al.*, 2019). Sekuens DNA dari gen Rv1419 menurut NCBI (2023) adalah sebagai berikut:

```
ATGGGTGAATTACGGTTGGTGGGCGGTGTGCTCCGGGTCCTTGT
CGTGGTTCGGTGCGGTGTTCGATGTGGCGGTGCTAAACGCCGGT
GCGGCTAGTGCCGACGGCCCCGGTCCAGCTGAAGAGCCGATTGG
GCGATGTTTGCCTGGACGCCCCGAGTGGGAGCTGGTTCAGCCC
GCTGGTGATCAACCCCTGCAATGGGACCGACTTTCAGCGCTGG
AATCTCACCGATGACCGGCAGGTCGAGAGCGTGGCCTTCCCCG
GGGAATGCGTGAATATCGGAAATGCTTTGTGGGCGCGCCTGCA
GCCCTGTGTGAACTGGATCAGCCAGCACTGGACTGTCCAGCCC
GACGGCCTGGTCAAGAGTGATCTTGATGCCTGCCTCACGGTTCT
CGGCGGTCCGGATCCTGGGACCTGGGTGTCCACCCGCTGGTGC
GACCCCAATGCACCCGACCAACAGTGGGATAGCGTGCCGTAA
```

II.6 Mutasi Gen

Mutasi adalah peristiwa atau proses perubahan dalam urutan genom suatu organisme. Mutasi yang terjadi ini menyebabkan terjadinya evolusi dan sering digunakan dalam pohon kehidupan (filogenik). Mekanisme ini menunjukkan gambaran mutagenesis yang sangat diatur secara temporal oleh respon stres lingkungan dan aktif ketika sel atau organisme tersebut mencoba beradaptasi dengan lingkungannya. Mekanisme molekuler dari mutasi yang diinduksi (dipicu) oleh adanya respon stress memunculkan gagasan baru tentang evolusi dan memberikan masukan untuk memodelkan dan menangani perkembangan kanker, penyakit menular, dan evolusi makhluk hidup secara umum (Fitzgerald dan Rosenberg, 2019).

Mutasi gen didefinisikan sebagai suatu perubahan atau variasi dalam urutan DNA dan gen sehingga struktur basa nitrogennya berbeda dengan organisme *type wild*. Mutasi gen ini memiliki variasi dalam ukuran, dan dapat memengaruhi setiap komponen DNA hingga ke bagian yang sangat besar dari kromosom. Mutasi gen dikategorikan dalam dua kelompok utama. Jenis mutasi pertama adalah mutasi hereditas, yakni mutasi gen yang diperoleh dari sel parental yang telah bermutasi dan diwariskan ke keturunannya. Jenis mutasi lainnya adalah mutasi yang terbentuk pada suatu waktu selama masa hidup seseorang dan hanya ada pada sel tertentu. Perubahan ini disebabkan ketika terdapat beberapa kesalahan dalam penyalinan DNA selama pembelahan sel atau karena faktor lingkungan dan radiasi tertentu. Beberapa jenis mutasi gen diklasifikasikan sebagai *missense*, *nonsense*, insersi, delesi, duplikasi, dan *frameshift*, dan banyak lainnya (Gupta, *et al.*, 2021).



Gambar 6. Contoh Mutasi yang terjadi Akibat Pengaruh Lingkungan (Fitzgerald dan Rosenberg, 2019)

Bakteri dapat mengalami mutasi secara acak (*random*) dapat disebabkan oleh resistansi terhadap antibiotik. Misalnya bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

yang mengalami mutasi pada gen *rpoB* menyebabkan resistansi terhadap antibiotik rifampisin (Rahman, *et al.*, 2022). Menurut Liu, *et al.* (2021), studi terbaru menunjukkan bahwa mutasi yang berbeda dapat terjadi pada wilayah atau daerah gen yang sama sehingga memberikan tingkat resistansi fenotipik yang berbeda terhadap antibiotik. Oleh karena itu, kombinasi beberapa mutasi gen pada banyak lokasi memiliki efek yang komprehensif terhadap resistansi obat, dan mengakibatkan pada kasus pasien *Multi Drug Resistant* (MDR).

Mutasi dapat memberikan jalan menuju evolusi akan tetapi dapat pula menurunkan *fitness* suatu organisme. Oleh karena itu, tingkat mutasi dalam tubuh sepertinya diatur sedemikian rupa untuk menekan terjadinya mekanisme ini melalui seleksi tahap dua (keturunan). Mutasi yang tinggi secara konstruktif menguntungkan pada lingkungan yang berubah-ubah dengan cepat akan tetapi menurunkan *fitness* pada lingkungan yang stabil. Mekanisme mutasi yang diinduksi stres cenderung memainkan peran penting dalam penyakit manusia dengan mempromosikan patogen dan evolusi tumor dan dapat mendorong evolusi secara lebih umum. Mekanisme mutasi juga dapat menjadi target obat yang menarik untuk memerangi penyakit menular, kanker, dan evolusi resistansi obat di keduanya (Fitzgerald dan Rosenberg, 2019).

II.7 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

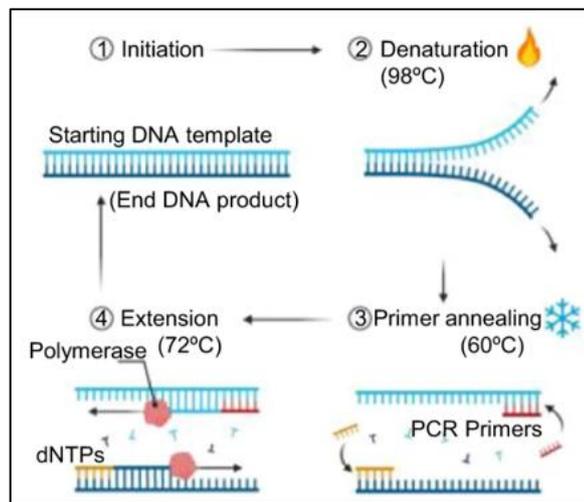
PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan teknik yang pertama kali dicetuskan oleh Mullis pada 1983 dan dipatenkan pada 1985. Prinsipnya didasarkan pada aplikasi DNA polimerase yang merupakan agen replikasi *in vitro* dari sekuens DNA spesifik. Metode ini menghasilkan produk berupa puluhan miliar salinan

fragmen DNA target atau DNA yang diinginkan (*DNA of interest*) dari ekstrak DNA (*DNA template*). Beberapa teknik penelitian biologi molekuler yang berkembang saat ini didasarkan pada teknik PCR yang menyediakan produk sesuai dan spesifik terutama di bidang karakterisasi dan konservasi keragaman genetik. Beberapa penerapan dengan teknik PCR, seperti: Pembentukan sekuens genom yang lengkap (*whole genom sequencing*) dari spesies-spesies penting, pengembangan teknologi analisis polimorfisme yang tersebar pada lokus di seluruh genom, dan pengembangan teknologi *microarray* untuk mengukur transkripsi gen dalam skala besar (Kadri, 2019).

Teknik PCR dilakukan dengan membuat campuran reaksi yang terdiri dari ekstrak DNA, taq polymerase, primer, dan empat deoksiribonukleat trifosfat (dNTP) dalam larutan *buffer*. Tabung yang berisi campuran ini kemudian diberi perlakuan siklus panas secara berulang-ulang hingga beberapa puluh kali dalam blok pemanas dari sebuah alat yang disebut *thermal cycler*. Campuran ini akan melalui 3 tahapan selama beberapa detik, yakni (Kadri, 2019):

- Denaturasi, yakni pemutusan dan pemisahan struktur *double helix* DNA dengan suhu tinggi (94°-95°C). Pada suhu ini, ikatan hidrogen pada matriks DNA putus dan untai ganda DNA akan menjadi 2 untai tunggal DNA.
- *Annealing* atau hibridisasi, yakni penempelan primer-primer spesifik pada segmen DNA tertentu untuk menginisiasi proses penempelan DNA-*Polymerase* dan basa nitrogen ke untai DNA. Pada tahap ini, suhu diturunkan ke suhu yang spesifik sehingga ikatan hidrogen dapat terbentuk kembali pada untai DNA baru.

- Ekstensi atau elongasi, yakni penambahan basa nitrogen pada untai tunggal DNA sesuai dengan basa nitrogen komplementernya hingga terbentuk untai DNA baru yang diinginkan. DNA hasil dari tahap ini akan mengalami tahap denaturasi kembali hingga diperoleh jumlah DNA yang diinginkan untuk identifikasi.



Gambar 7. Mekanisme PCR dalam Amplifikasi Gen (Gavrilov *et al.*, 2022)

Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam proses PCR. Selain suhu, kondisi primer dan jenis Taq polimerase yang digunakan juga penting demi kesuksesan amplifikasi. Primer adalah DNA rantai tunggal yang akan menempel pada sekuens yang diinginkan dan akan menginisiasi replikasi yang selektif. Penting untuk menggunakan setidaknya satu pasang oligonukleotida sebagai primer replikasi untuk mencapai amplifikasi selektif. Salah satu primer akan mengenali ujung 5'-3' dari gen target dan primer lainnya mengenali ujung komplementernya. Setelah itu, digunakan *Taq Polymerase* yang akan memulai proses penempelan basa-basa nitrogen pada untai yang baru. Jumlah Taq polimerase yang digunakan biasanya antara 1-3 unit persampel. Biasanya taq polimerase yang beredar telah

ditetapkan formula tertentu oleh manufaktur dan biasanya juga mengandung senyawa buffer dan bahan-bahan yang diperlukan dalam replikasi (Kadri, 2019).

Penggunaan PCR untuk ampifikasi DNA yang ada dalam sampel telah mengembangkan tes berbasis gen dan mengatasi tantangan utama pengujian cepat sampel dalam pengaturan perawatan kesehatan yakni identifikasi bakteri/virus menjadi lebih cepat. Pengujian genom, yang dulunya sangat mahal untuk penggunaan rutin sekarang mendekati tingkat hemat biaya. Meskipun metode genomik cepat dan memberikan identitas yang meyakinkan dari setiap bakteri yang ada dalam sampel, metode ini sangat sensitif sehingga dapat mendeteksi bakteri yang ada dalam jumlah yang sangat kecil, di bawah ambang infeksi, dan dengan demikian dapat mengakibatkan dimulainya terapi antibiotik yang tidak perlu. Oleh karena itu, metode deteksi harus sensitif secara analitis untuk setiap patogen yang dicurigai (Váradi, *et al.*, 2017).

II.6 DNA Sequencing

DNA *sequencing* adalah suatu teknik penerjemahan dan pengurutan semua urutan basa nitrogen nukleotida suatu DNA maupun gen, termasuk pengurutan asam amino suatu protein yang dikodekan secara tepat dan cepat. Penggunaan *sequencing* DNA ditujukan untuk menentukan urutan asam nukleat dalam sampel biologis dan telah digunakan dalam berbagai aplikasi di berbagai aspek penelitian. Selama 50 tahun terakhir, *sequencing* terus mengalami pengembangan, dari pengurutan oligonukleotida pendek hingga jutaan basa nitrogen, dari pengkodean gen tunggal hingga ke pengurutan seluruh genom (*whole genom sequencing*) (Heather dan Chain, 2016; Shofa, 2019).

Beberapa teknik *sequencing* DNA yakni: Hibridisasi, teknik Sanger, Maxam Gilbert, dan Automatic DNA sequencer yang dikenal sebagai *first generation sequencing* (Chinmayee *et al.*, 2018). Teknik *sequencing* pertama yang digunakan secara luas dikembangkan oleh Sanger yang diberi nama *chain-termination* atau teknik dideoksi. Teknik Sanger ini terus mengalami perkembangan hingga kemudian menggunakan elektroforesis kapiler dan kemudian dikenal sebagai “*first generation sequencing*”. Salah satu kelemahan dari teknik ini yakni hanya dapat melakukan analisis sekuens satu sisi pada saat yang sama sehingga metode ini cukup terbatas, akan tetapi metode ini menjadi dasar pengembangan *New-Generation Sequencing* (NGS) (Hu *et al.*, 2021; Heather dan Chain, 2016).

Saat ini penelitian genomik yang kompleks membutuhkan informasi mendalam. Dalam hal ini, *Next Generation Sequencing* membantu dan telah menjadi alat penelitian harian untuk menjawab pertanyaan genomik bagi para peneliti. NGS mendukung berbagai aplikasi seperti profil ekspresi gen, penghitungan kromosom, analisis molekuler, dan lain-lain. Meskipun pengurutan sanger memberi kami akurasi 99,99% untuk penelitian, metodologi yang lebih baru seperti NGS juga menjadi populer karena laju hasil yang lebih tinggi sehingga biaya lebih efisien (Chinmaya *et al.*, 2018).

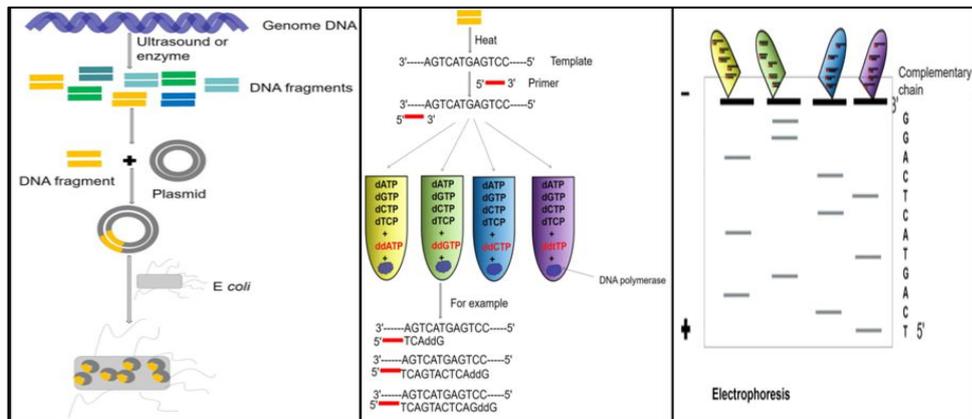
II.6.1 Teknik Sanger Sequencing

Teknik dideoksi *chain termination* yang dikemukakan oleh Fredrick Sanger pada 1977. Teknik ini akan menerjemahkan salah satu untai DNA ke dalam kode urutan basa nitrogen dengan tingkat akurasi mencapai 99%. Dalam teknik ini, DNA pertama kali dipisahkan menjadi dua untai terpisah. Untai pertama yang akan di-

sequencing ini kemudian disalin dengan bantuan senyawa basa yang diubah secara kimiawi. Basa ini bertindak sebagai marker identifikasi dan akan menghentikan proses penyalinan setiap kali basa ini ditemukan dalam untai. Proses ini diulang beberapa kali untuk semua basa nitrogen dan kemudian disatukan bersama hingga menjadi urutan asli DNA yang diinginkan. Secara rinci, tahapan Sanger *sequencing* adalah (Chinmaya *et al.*, 2018):

- Preparasi Template: Salinan setiap untai template disiapkan di tiap akhir ujung 3' dengan bantuan DNA primer.
- Pembuatan set segmen berlabel: Berbagai reaksi replikasi dilakukan menggunakan salinan setiap templat dengan membaginya menjadi empat bagian. Primer standar disalin dan digunakan di keempat batch bersama dengan polimerase I. Untuk memadukan bagian-bagian yang berakhir pada A, ddATP dimasukkan ke kluster paduan respons I bersama dATP, dTTP, dCTP, dan dGTP, pendahuluan standar, dan DNA polimerase I. Jadi, untuk menghasilkan, semua bagian yang berakhir pada C, G dan T, ddNTP, ddCTP, ddGTP dan ddTTP yang terpisah ditambahkan secara individual ke berbagai campuran respons pada berbagai rumpun bersama dNTP normal.
- Elektroforesis dan Pembacaan Gel: Campuran dari empat kluster ditumpuk menjadi empat sumur khusus pada gel poliakrilamida dan dielektroforesis. Autoradiogram gel dibaca untuk menentukan basa untai korelatif dengan untai format. Pita potongan terpendek berada di dasar autoradiogram, sehingga susunan untai korelatif dibaca dari dasar/bawah ke atas. Ada berbagai keuntungan sekuensing Sanger seperti fokus pada distrik genom yang lebih

kecil dalam jumlah tes yang lebih banyak, memvalidasi hasil Sekuensing Generasi Selanjutnya dan banyak lainnya, tetapi Sekuensing Generasi Selanjutnya masih merupakan pilihan yang lebih cepat, lebih murah, dan lebih baik.



Gambar 8. Tahapan dalam Teknik Sanger *Sequencing* (Zhang *et al.*, 2021)

Dalam prakteknya, metode Sanger ini masih sering dipilih sebagai teknik *sequencing*. Metode ini umumnya dipilih untuk beberapa kasus, seperti: sekuensing untuk satu untai gen, sekuensing 1-100 amplicon target, sekuensing 96 sampel di saat bersamaan, dan sekuensing untuk microbial identifikasi. Meskipun teknik ini memiliki prinsip yang hampir sama dengan teknik lain, akan tetapi teknik ini memiliki akurasi, ketahanan, dan kemudahan aplikasi yang lebih baik sehingga metode *chain-termination* oleh Sanger ini menjadi teknologi *sequencing* DNA yang paling umum digunakan untuk mengurutkan DNA selama bertahun-tahun (Chinmaya *et al.*, 2018; Heather dan Chain, 2016).