

TESIS

**ANALISIS MUTASI GEN *FBPA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
PADA PENDERITA TUBERKULOSIS AKTIF DI KOTA MAKASSAR**

***THE MUTATION ANALYSIS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FBPA
GENE IN ACTIVE TUBERCULOSIS PATIENTS IN MAKASSAR CITY***

SITTI RAHMAH MUSTAKIN

P062192013



PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK

SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

TESIS

**ANALISIS MUTASI GEN *FBPA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
PADA PENDERITA TUBERKULOSIS AKTIF DI KOTA MAKASSAR**

***THE MUTATION ANALYSIS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FBPA
GENE IN ACTIVE TUBERCULOSIS PATIENTS IN MAKASSAR CITY***

SITTI RAHMAH MUSTAKIN

P062192013



PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK

SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

HALAMAN PENGANTAR

**ANALISIS MUTASI GEN FBPA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PADA
PENDERITA TUBERKULOSIS AKTIF DI KOTA MAKASSAR**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu Biomedik
Konsentrasi Mikrobiologi

Disusun dan diajukan oleh

SITTI RAHMAH MUSTAKIN
P062192013

kepada

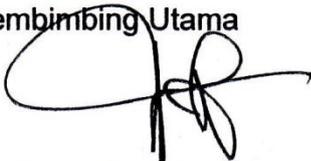
**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS**ANALISIS MUTASI GEN *FBPA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
PADA PENDERITA TUBERKULOSIS AKTIF DI KOTA MAKASSAR****Disusun dan diajukan oleh****SITTI RAHMAH MUSTAKIN
P062192013**

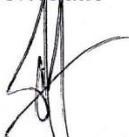
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
pada tanggal 27 Desember 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

**Prof. dr. Muhl Nasrum Massi, Ph.D., Sp.MK
NIP. 196709101996031001**

Pembimbing Pendamping

**Dr. Rosana Agus, M.Si
NIP. 196509051991032003**Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik**Prof. dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D., Sp.PD-KHOM
NIP. 196802181999032002**Dekan Sekolah Pascasarjana
Universi Hasanuddin
**Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed
NIP. 196612311995031009**

**PERNYATAAN KEASLIAN TESIS
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "**Analisis Mutasi Gen *fbpA* *Mycobacterium tuberculosis* pada Penderita Tuberkulosis Aktif di Kota Makassar**" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D., Sp.MK sebagai Pembimbing Utama dan Dr. Rosana Agus, M.Si sebagai Pembimbing Pendamping. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal *Malaysian Journal Of Microbiology*, Volume, Halaman, dan DOI sebagai artikel dengan judul "**Mutation of *Mycobacterium tuberculosis fbpA* Gene in Clinical Isolates of Active Tuberculosis in Makassar City, Indonesia**". Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku. Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 27 Desember 2023



Sitti Rahmah Mustakin

P062192013

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Subhanahu wa ta'ala atas segala berkah, rahmat, hidayah, dan nikmat-Nya, serta salam dan salawat tercurah kepada junjungan Nabiullah Muhammad Shallahu 'alaihi wasallam sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul "**Analisis Mutasi Gen *fbpA Mycobacterium tuberculosis* pada Penderita Tuberkulosis Aktif di Kota Makassar**".

Dalam penulisan tesis ini, tentu terdapat banyak kesulitan, namun karena adanya bantuan dan bimbingan yang diberikan dari berbagai pihak kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai salah satu persyaratan untuk mencapai gelar pendidikan sebagai Magister. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof.dr.Budu, Ph.D., Sp.M(K)., M.Med.Ed selaku Dekan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin atas dukungan dan nasehatnya selama proses penulisan tesis ini.
2. Prof.dr.Rahmawati M., Ph.D, Sp.PD-KHOM, FINASIM, selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik atas dukungan dan nasehatnya selama proses penyusunan tesis ini.
3. Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D., Sp.MK dan Dr. Rosana Agus, M.Si selaku Dosen Pembimbing atas bimbingan dan arahnya.
4. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K), dr. Rizalinda Sjahril, M. Sc, Ph.D, Sp.MK, dan dr. Firdaus Hamid, Ph.D, Sp.MK selaku penguji atas saran, masukan, dan arahnya.
5. Orang tua penulis, Ayahanda (alm.) Mustakin dan Ibunda Radiah, S.Pd, M.Si, terima kasih atas doa, pengorbanan dan motivasi mereka selama saya menempuh pendidikan.
6. Ibu Handayani, Ibu Nursamsi, Ibu Marina, Pak Syafri, Pak Rian, dan Pak Yusuf selaku staf Bagian Mikrobiologi HUM-RC RSPTN UNHAS atas bimbingan dan bantuannya selama proses penelitian.
7. Dhian Karina Aprilani Hattah, Nurul Rezky, Ian Astarina Mas'ud, Wa Ode Siti Purnamasari, Husnul Inayah, selaku teman seangkatan saya di program studi mikrobiologi yang telah membantu dan mendorong saya untuk terus berusaha dalam menyelesaikan tesis ini demi mewujudkan cita-cita untuk memperoleh gelar M.Biomed.
8. Semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat dan Karunia-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian tesis ini. Penulis menyadari kekurangan dan keterbatasan yang ada, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran.

Penulis,

Sitti Rahmah Mustakin

ABSTRAK

SITTI RAHMAH MUSTAKIN. Analisis Mutasi Gen *fbpA Mycobacterium tuberculosis* pada Penderita Tuberkulosis Aktif di Kota Makassar (dibimbing oleh **Muhammad Nasrum Massi dan Rosana Agus**).

Kerentanan terhadap tuberkulosis (TB) dapat dipengaruhi oleh faktor genetik karena keterlibatan beberapa gen dalam respon imun tubuh terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Salah satu protein potensial tersebut adalah Antigen 85A (Ag-85-A) yang dikodekan oleh *fibronectin-binding protein A* (*fbpA*) *M. tuberculosis*. Komplek Ag-85 menginduksi proliferasi sel T dan IFN- γ pada sebagian besar individu sehat yang terinfeksi *M. tuberculosis*, membuatnya menjadi antigen potensial. Penelitian ini bertujuan menganalisis mutasi gen *fbpA M. tuberculosis* pada penderita TB aktif berdasarkan hasil DNA Sequencing dengan melihat adanya perubahan urutan nukleotida. Penelitian bersifat deskriptif ini menggunakan 30 isolat klinis penderita TB aktif. DNA yang diekstraksi sebagai *template* amplifikasi gen target dengan PCR yang menggunakan primer spesifik gen *fbpA* berukuran 900 bp. Produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa 2% dan diamati dalam transilluminator sinar UV. Kemudian dilakukan pengurutan menggunakan metode Sanger Sequencing, yang diimpor ke aplikasi program Bio-Edit dan dilanjutkan ke *software* Clustal-X. Urutan DNA dianalisis dengan membandingkan urutan homologi yang tersedia oleh Gene-Bank melalui *Basic Local Alignment Search Tool*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 30 isolat didapatkan lima isolat positif gen *fbpA M. tuberculosis*. Hasil sekuensing menunjukkan adanya keselarasan antara gen *fbpA* dan *M. tuberculosis* strain H-37-Rv yang memiliki homologi berkisar 99-100%. Terjadinya 1% mutasi dikarenakan gen *fbpA* terkonservasi sehingga bakteri TB mempertahankan gen ini di dalam keberlangsungan hidupnya.

Kata kunci: gen *fbpA*, protein Ag-85-A, amplifikasi, pengurutan, mutasi



ABSTRACT

SITTI RAHMAH MUSTAKIN. The Mutation Analysis of *Mycobacterium tuberculosis fbpA* Gene in Active Tuberculosis Patients In Makassar City (supervised by **Muhammad Nasrum Massi** and **Rosana Agus**).

The susceptibility to the tuberculosis (TB) can be influenced by the genetic factors due to the involvement of several genes in the body immune response towards the *Mycobacterium tuberculosis* bacteria, one such potential protein is Antigen 85A (Ag85A) encoded by the fibronectin-binding protein A (*fbpA*) *Mycobacterium tuberculosis* gene. The Ag85 complex induces the proliferation of T cells and IFN- γ in the most healthy individuals infected by *M. tuberculosis*, making it the potential antigen. The research aims to describe the mutation of *fbpA* gene in the active TB patients based on the DNA sequencing result by looking at the changes in the nucleotide sequence. This descriptive research used 30 clinical isolates of the active TB patients. The DNA was extracted as the template for the amplification of the target gene by PCR, using the specific primer for the *fbpA* gene measuring 900 bp. PCR products were electrophoresed on the 2% agarose gel and observed in the UV light transilluminator. Then sequencing was carried out using the Sanger Sequencing method, which was imported into BioEdit program application and continued into the ClustalX software. DNA sequences were analyzed by comparing the homology sequences being available by GeneBank via Basic Local Alignment Search Tool. The results indicate that from 30 isolates, 5 isolates are positive for the *M. tuberculosis fbpA* gene. The sequencing results show that there is aligned between *fbpA* gene and *M. tuberculosis* strain H37Rv which has the homology ranging from 99 to 100%. The occurrence of 1% of the mutations is because *fbpA* gene is conserved, so that the TB bacteria maintain this gene in their survival.

Key words: *fbpA* gene, Ag85A protein, amplification, sequencing, mutation



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGANTAR	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR ISTILAH, SINGKATAN, DAN LAMBANG	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1. Bidang Akademik.....	4
1.4.2. Bidang Klinik.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Tinjauan Umum <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.1.1. Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.1.2. Taksonomi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2.1.3. Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2.2. Tinjauan Umum Tuberkulosis	7

2.2.1. Patogenesis Tuberkulosis.....	9
2.2.2. Klasifikasi Tuberkulosis	13
2.2.3. Tuberkulosis Aktif	15
2.2.4. Diagnosis Tuberkulosis.....	16
2.3. Gen <i>fbpA Mycobacterium tuberculosis</i>	17
2.4. Mutasi Gen	18
2.5. Tinjauan Umum <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	19
2.5.1. Definisi <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	19
2.5.2. Tahapan Proses <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	20
2.6. <i>DNA Sequencing</i>	22
2.7. Kerangka Teori	24
2.8. Kerangka Konsep	25
BAB III METODE PENELITIAN	26
3.1. Jenis Penelitian.....	26
3.2. Populasi, Sampel, Teknik Pengambilan Sampel, dan Besar Sampel	26
3.2.1. Populasi.....	26
3.2.2. Sampel	26
3.2.3. Besar Sampel	26
3.2.4. Teknik Pengambilan Sampel	26
3.3. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	27
3.3.1. Lokasi Penelitian.....	27
3.3.2. Waktu Penelitian.....	27
3.4. Definisi Operasional.....	27
3.5. Alur Penelitian.....	28
3.6. Alat dan Bahan Penelitian	28
3.7. Prosedur Penelitian	29
3.8. Analisis Data.....	31
BAB IV HASIL.....	32
4.1. Hasil Produk PCR.....	32

4.2. Analisis Sekuens Nukleotida.....	34
4.3. Analisis Sekuens Asam Amino	37
BAB V PEMBAHASAN	40
BAB VI PENUTUP	45
6.1. Kesimpulan.....	45
6.2. Saran	45
DAFTAR PUSTAKA.....	46
LAMPIRAN	50

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Klasifikasi Klinis Tuberkulosis (CDC, 2013).....	15
2. Hasil Nilai Kesamaan dari Gen <i>fbpA</i> dengan <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv pada fitur BLAST di situs NCBI	36
3. Hasil Pemetaan Basa Nukleotida	37

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Struktur morfologi Mycobacterium tuberculosis (NIAID, 2022)	6
2. Genom Mycobacterium tuberculosis (Sampson, et al., 2001)	7
3. Patogenesis tuberkulosis (Rizvi et al, 2016).....	9
4. Letak Gen fbpA pada Genome Mycobacterium tuberculosis (NCBI, 2022)....	17
5. Skema sederhana satu siklus PCR (Wilson dan Walker, 2010)	21
6. Kerangka Teori Penelitian	24
7. Kerangka Konsep Penelitian	25
8. Kerangka Alur Penelitian	28
9. Hasil ekstraksi menggunakan Kit Geneaid	32
10. Hasil elektroforesis produk PCR kode sampel 1-15	33
11. Hasil elektroforesis produk PCR kode sampel 16-30	33
12. Hasil Elektroforesis setelah Purifikasi DNA	34
13. Visualisasi Hasil Alignment (Penjajaran) antara Sampel dengan Data Gen fbpA dari NCBI dengan BioEdit	35
14. Hasil BLAST Asam Amino pada Sampel 1	38
15. Hasil BLAST Asam Amino pada Sampel 2	38
16. Hasil BLAST Asam Amino pada Sampel 4	39
17. Hasil BLAST Asam Amino pada Sampel 5	39

DAFTAR ISTILAH, SINGKATAN, DAN LAMBANG

Lambang/Singkatan	Arti dan Penjelasan
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
BACTEC	<i>Becton Dickinson Diagnostic Instrument System</i>
BCG	Bacillus Calmette Guerin
BTA	Basil Tahan Asam
CD	<i>Cluster Differentiation</i>
DNA	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>
ICT	<i>Immunochromatographic</i>
IFN- γ	<i>Interferon Gamma</i>
IgG	Immunoglobulin G
IGRA	<i>Interferon Gamma Release Assays</i>
IL	<i>Interleukin</i>
KEMENKES	Kementerian Kesehatan
LAM	Lipoarabinomannan
LED	Laju Endap Darah
Limfosit Th	Limfosit T Helper
LTBI	<i>Latent Tuberculosis Infection</i>
M. tb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR	<i>Multi Drug Resistant</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
OAT	Obat Anti Tuberkulosis
PAP	<i>Peroxidase Anti-Peroxidase</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDPI	Persatuan Dokter Paru Indonesia
TB	Tuberkulosis
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TST	<i>Tuberculin Skin Test</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

%	persen
bp	basepair
ml	mililiter
μ l	mikroiliter

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang terutama menyerang paru-paru, namun juga dapat menyerang organ tubuh lainnya. Penularan TB yang dilakukan oleh penderita TB aktif dapat menyerang semua orang di sekelilingnya. Penderita TB dapat menyebarkan atau menularkan bakteri di udara dalam bentuk percikan dahak yang dihasilkan saat batuk atau bersin, yang disebut droplet nuclei (WHO, 2021).

Berdasarkan laporan dalam *Global TB Report* tahun 2020 oleh *World Health Organization* (WHO), 1,2 juta orang meninggal karena TB setiap tahunnya, dan berdampak pada 10 juta orang di seluruh dunia. Berada di peringkat ketiga dunia setelah India dan Tiongkok, Indonesia merupakan salah satu negara dengan tingkat kematian akibat TB tertinggi yang berjumlah 824 ribu kasus, dengan 93 ribu kematian setiap tahunnya atau 11 kematian per jam. Terdapat sebanyak 500 ribu pasien TB yang tidak diobati di Indonesia dan berisiko menyebarkan infeksi, karena hanya 49% dari perkiraan 824 ribu pasien TB di Indonesia yang telah teridentifikasi dan diobati (Kemenkes RI, 2022).

Estimasi kasus TB di Sulawesi Selatan mengacu pada laporan Dinas Kesehatan Provinsi Sulawesi Selatan pada tahun 2021 mencatat terdapat sebanyak 31.022 orang, yang ternotifikasi hanya 14.808 orang atau 47,73% dari total kasus yang digunakan untuk menghitung perkiraan kasus TB di Sulawesi Selatan. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun risiko penularannya tinggi, namun sekitar 53% masyarakat masih belum mengetahuinya. Berdasarkan data yang dihimpun Dinas Kesehatan Kota Makassar, jumlah penderita TB di Makassar masih cukup tinggi, dengan 5.412 kasus dilaporkan pada tahun 2019 dan tingkat kesembuhan sebesar 83%. Jumlah kasus kemudian turun menjadi 3.250 pada tahun 2020 dengan tingkat kesembuhan sebesar 85%, kemudian kembali meningkat menjadi 3.911 pada tahun 2021.

Ada empat kemungkinan akibat terpapar bakteri TB yaitu tidak ada infeksi (ditunjukkan dengan tes kulit tuberkulin negatif), terjadi infeksi yang menjadi TB

aktif (TB primer), menjadi TB laten yaitu sistem kekebalan tubuh yang menghentikan perkembangan penyakit, dan menjadi TB laten namun berkembang menjadi TB aktif setelah reaktivasi yang terjadi beberapa bulan hingga bertahun-tahun kemudian (Martin dan Hasibuan, 2010).

Strategi End TB oleh WHO memiliki indikator pencapaian dalam hal penurunan jumlah kematian dan tingkat kejadian akibat TB, salah satu pendekatan yang dilakukan adalah mencegah infeksi TB laten berkembang menjadi infeksi TB aktif (WHO, 2018). Pencegahan reaktivasi kini dianggap sebagai pendekatan pencegahan utama TB dan merupakan salah satu kunci penerapan *End TB Strategy*, yang ingin dicapai WHO pada tahun 2035 (Paton NI et al., 2019).

Beberapa penelitian berkaitan pada kandidat gen menunjukkan genetik host berperan terhadap kerentanan TB, yang menyiratkan bahwa faktor genetik berdampak pada kemampuan sistem kekebalan untuk memerangi patogen *M. tuberculosis*. Patogenesis infeksi awal mencakup tahap penting yang melibatkan *M. tuberculosis* dan makrofag. Dalam hal memicu dan memulai respons imun bawaan, makrofag adalah sel efektor yang penting. Imunitas bawaan kemungkinan memainkan peran penting dalam menentukan hasil akhir klinis dan merupakan garis pertahanan pertama yang penting terhadap *M. tuberculosis*. Respons imun bawaan disebabkan oleh interaksi antara struktur permukaan *M. tuberculosis* dan reseptor pengenalan pola makrofag. Ketika gilirannya faktor tersebut memicu aktifnya komponen respon imun bawaan, menarik sel inflamasi ke lokasi asal infeksi (Mortaz E et al., 2015).

Adanya gen yang memiliki kemampuan dalam stimulasi respons imun pada pasien tuberkulosis dengan menyandi protein antigenik yang merupakan faktor virulen terdapat pada gen *fibronectin binding protein-A* (fbp-A). Gen ini mengkodekan protein Ag85A, protein ini menarik perhatian ketika *M. tuberculosis* ditemukan mengikat secara selektif ke fibronektin dan tidak pada protein matriks ekstraseluler murni lainnya yang diuji (Lisa YA et al., 2000).

Fraksi utama dari protein sekretori dan protein permukaan dinding sel yang terpajang merupakan antigen besar yang dikenali oleh sistem kekebalan tubuh sebagai pertahanan terhadap infeksi *M. tuberculosis* (Zvi. A et al, 2008). Komponen utama protein sekretori filtrat kultur *M. tuberculosis* BCG merupakan

kompleks Ag85. Permukaan dinding sel *Mycobacterium* merupakan keberadaan dari protein antigen 85 (Ag85) yang disekresikan (Kuo, C. J. et al, 2013).

Sebagian besar orang sehat yang terinfeksi *M. tuberculosis*, protein Ag85A mampu menghasilkan IFN- γ dan menginduksi proliferasi sel T yang kuat. Gangguan pengkodean gen untuk Ag85A pada *M. tuberculosis* menghasilkan strain yang gagal untuk memanipulasi makrofag manusia menunjukkan bahwa Ag85A mungkin berperan penting dalam patogenesis *M. tuberculosis* (Wang, D., 2010).

Berdasarkan tinjauan di atas, untuk menangani jumlah penderita TB yang terus bertambah maka diperlukan analisis gen yang terlibat dalam penyakit melalui metode diagnostik molekuler, dikarenakan juga penelitian mengenai mutasi gen *fbpA M. tuberculosis* belum pernah dilakukan sehingga dengan menganalisis gen *fbpA M. tuberculosis* yang mengkode protein Ag85A pada penderita tuberkulosis aktif diperoleh pengetahuan terkait gen yang dapat digunakan sebagai diagnosis terhadap TB.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana mutasi gen *fbpA Mycobacterium tuberculosis* pada penderita tuberkulosis aktif di Kota Makassar.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk menganalisis mutasi gen *fbpA Mycobacterium tuberculosis* pada penderita tuberkulosis aktif di Kota Makassar

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Untuk mengisolasi gen *fbpA Mycobacterium tuberculosis* pada penderita tuberkulosis aktif
- b. Untuk menganalisis mutasi pada gen *fbpA Mycobacterium tuberculosis* pada penderita tuberkulosis aktif sehingga mengetahui adanya perubahan pada proteinnya

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Bidang Akademik

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan terkait gen *fbpA* *Mycobacterium tuberculosis* dan mutasi gen yang terjadi pada penderita tuberkulosis aktif

1.4.2. Bidang Klinik

Hasil penelitian ini diharapkan berguna untuk informasi ilmiah sebagai acuan dalam pengembangan penelitian lebih lanjut terkait dengan mutasi gen *fbpA* *Mycobacterium tuberculosis*

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum *Mycobacterium tuberculosis*

2.1.1. Morfologi *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri berbentuk batang yang tumbuh pada pH 6,4–7. Ukurannya berkisar antara 1–4/um dan ketebalannya antara 0,3–0,6/um (Saputra, 2013). *M. tuberculosis* adalah jenis bakteri aerob obligat yang tidak membentuk spora dan merupakan basil tahan asam yang nonmotil. Karena bakteri ini dapat hidup di udara dingin atau kering sehingga bersifat dorman, akibatnya bakteri ini dapat hidup kembali dan menyebabkan TB menjadi aktif. Karena *M. tuberculosis* merupakan bakteri *Bacillus* gram positif yang berukuran kecil, berdinding tebal serta kandungan zat lilin tinggi yang berasal dari peptidoglikan, sehingga bakteri ini di alam bersifat hidrofobik. Selain itu, mesofil sangat berbeda dari bakteri lain karena bisa tumbuh lambat di lingkungan alam namun cepat ketika berada pada keadaan asam (Lamichhane, 2018).



Gambar 2.1. Struktur morfologi *Mycobacterium tuberculosis* (NIAID, 2022)

Suhu 37°C merupakan suhu ideal untuk pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* memiliki dinding yang sangat kompleks yang terdiri dari 60% lemak. Bakteri *M. tuberculosis* bersifat tahan asam karena memiliki struktur dinding sel yang kompleks. Sehingga ketika sekali diwarnai, zat warna tidak dapat dihilangkan dengan larutan asam-alkohol. Pada sitoplasma dan dinding sel yang meliputi komponen lipid, protein, dan polisakarida merupakan komponen yang membentuk antigen.

Pewarnaan *Ziehl-Neelsen* merupakan metode pewarnaan khusus untuk bakteri *M. tuberculosis*, karena bakteri yang bersifat tahan asam yakni sulit diwarnai dan tahan terhadap zat asam dan mineral setelah menyerap zat warna. Bakteri TB tampak berwarna merah pada hasil akhir pewarnaan *Ziehl-Neelsen* (Girsang, 2013).

2.1.2. Taksonomi *Mycobacterium tuberculosis*

Klasifikasi bakteri *M. tuberculosis* yaitu (Kenneth Todar, 2012):

Kingdom : *Bacteria*

Phylum : *Actinobacteria*

Order : *Actinomycetales*

Suborder : *Corynebacterineae*

Family : *Mycobacteriaceae*

Genus : *Mycobacterium*

Spesies ; *Mycobacterium tuberculosis*

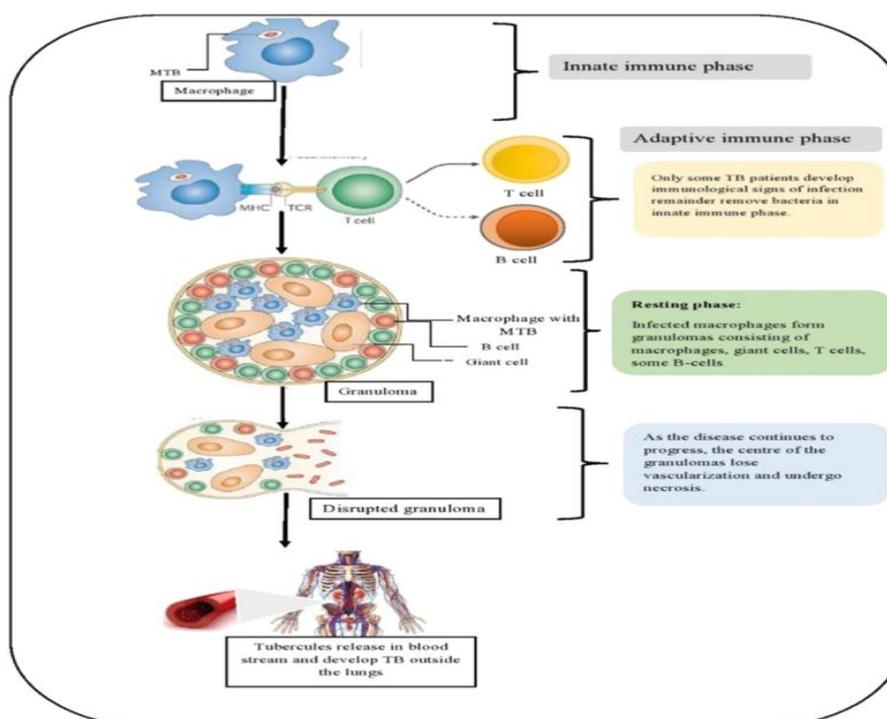
2.1.3. Genom *Mycobacterium tuberculosis*

Strain TB yang paling sering dipelajari di laboratorium penelitian merupakan strain *M. tuberculosis* galur H37Rv. Dengan terbitnya genom lengkap pada tahun 1998, H37Rv tetap menjadi strain TB yang paling sering digunakan dalam bidang ilmiah. *Genom M. tuberculosis* terdiri dari 411.529 pasangan basa, mengandung sekitar 4.000, terdapat kandungan guanin + sitosin yang tinggi terlihat pada komposisi asam amino yang terkandung dalam protein, dan memiliki ukuran 4,4 Mb (megabase) (Cole, et al., 1998).

pengendalian penyakit ini baru terjadi dalam 200 tahun terakhir (InfoDATIN, 2015).

Hipokrates menyebut TB paru sebagai "pthisis" dalam uraiannya. Pada akhir tahun 1882, Robert Koch telah mengidentifikasi basil tuberkulosis (bentuk batang) sebagai agen penyebab TB. Presentasi penemuannya dilakukan pada 24 Maret 1882 di Berlin. Hal ini diperingati sebagai Hari TB Sedunia. Deklarasi keadaan darurat global TB mengejutkan WHO, karena pada tahun 1993 sebagian besar negara di dunia tidak berhasil mengendalikan penyakit TB. Hal ini disebabkan oleh rendahnya tingkat kesembuhan, sehingga meningkatkan risiko penularan. Dengan terjadinya lonjakan kasus kejadian MDR (*Multi-Drug Resistance*), penyakit ini kembali menjadi kekhawatiran. Penyakit menular yang dapat menyerang berbagai jaringan atau organ tubuh adalah TB, dan jenis yang paling umum dan signifikan adalah TB paru (Masriadi, 2017).

2.2.1. Patogenesis Tuberkulosis



Gambar 2.3. Patogenesis tuberkulosis (Rizvi et al, 2016)

Masuknya kuman dan berkembangnya beragam tanda klinis merupakan langkah pertama dalam patogenesis TB. *M. tuberculosis* memiliki siklus hidup yang menginfeksi dan menginduksi sistemik

kekebalan tubuh, sehingga penyembuhan menjadi sulit. Pada akhirnya dapat menyebabkan infeksi TB paru aktif dengan cara reaktivasi atau infeksi ulang yang berlanjut sehingga menghasilkan rongga di paru-paru, sebelum akhirnya menyebar ke lingkungan sekitar (Hunter, 2018).

Infeksi TB dimulai dari adanya inhalasi *droplet nuclei* yang mengandung bakteri *M. tuberculosis*. *Droplet nuclei* yang berisi tuberkel basil TB terhirup masuk ke dalam paru-paru dan bergerak menuju alveolus. Fase awal infeksi, basil tersebut dikenali dan memasuki sel fagosit makrofag alveolar untuk bereplikasi, kemudian sel akan menfagositosis dan mengeliminasi *M. tuberculosis* tergantung kapasitas fagosit penjamu dan virulensi dari bakteri, jika pada tahap ini sistem tubuh manusia adekuat maka bakteri yang terperangkap oleh makrofag akan dieliminasi, namun jika bakteri lolos maka akan mulai berproliferasi dan menghancurkan makrofag, tahap berikutnya sel di dalam darah berdiferensiasi menjadi makrofag dan mediator-mediator inflamasi akan menuju ke paru-paru, kemudian makrofag kembali namun tidak membunuh bakteri. Sel T mulai teraktivasi dan berproliferasi di dalam tuberkel kemudian meningkatkan aktivitas makrofag untuk membunuh bakteri, jika sistem imun inadkuat maka sel-sel imun tidak dapat mengendalikan bakteri dan dapat berkembang dengan cepat menjadi infeksi TB aktif, pada beberapa kasus sistem imunitas tidak dapat merusak semua tuberkel TB, maka sel T yang teraktivasi dan makrofag akan membentuk lapisan pelindung (granuloma) untuk mengendalikan proliferasi MTB dan mencegah terjadinya penyebaran bakteri ke tempat lain. MTB sebagian besar dieliminasi di dalam granuloma kaseosa dan progresifitas bakteri terhenti, namun pada beberapa individu, bakteri berhasil menghindari respon imun sehingga tidak sepenuhnya tereliminasi di dalam makrofag. Bakteri yang tidak tereliminasi bertahan menjadi dormant dan dapat bertahan lama dalam granuloma host. Kondisi dormant tidak menunjukkan gejala klinis, kelainan radiologi, kelainan bakteriologis dan tidak dapat menularkan ke orang lain. Kondisi tersebut dikenal sebagai TB Laten. Granuloma yang muncul saat fase laten dari TB ini berfungsi sebagai pelindung dan mencegah penyebaran TB dalam tubuh (Highsmith et al., 2018).

Bakteri ketika dormant dapat aktif kembali dan merusak sistem imunitas, proses tersebut dikenal sebagai infeksi TB sekunder. Ketika sistem kekebalan tubuh memburuk dan tidak mampu melawan infeksi bakteri, infeksi TB sekunder bisa saja terjadi. Hal ini sering terjadi lima tahun dari infeksi primer. Infeksi TB sekunder sering kali dianggap sebagai onset penyakit TB aktif (Wijaya, 2017).

Bakteri masuk ke dalam tubuh akan difagositosis oleh makrofag alveolar, kemudian makrofag akan menjalankan tiga fungsi yaitu menghasilkan enzim yang mempunyai efek bakterisidal, menghasilkan mediator terlarut (sitokin pro-inflamasi dan anti-inflamasi) sebagai respon terhadap MTB berupa IL-10, IL-6, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , dan memproses serta mempresentasikan antigen *M. tuberculosis* kepada limfosit (Tebruegge et al., 2015).

Bakteri pada makrofag mengalami endositosis dan selanjutnya masuk ke sitoplasma membentuk kantong (fagosom). Fagosom akan mengalami fusi dengan lisosom membentuk fagolisosom yang mengandung enzim proteinase dan hidrolase sehingga dapat mendegradasi lapisan peptidoglikan pada dinding sel bakteri TB.

. Jika makrofag tidak dapat membunuh bakteri maka bakteri akan tumbuh dalam makrofag dan berakhir dengan matinya makrofag. Bakteri tersebut akan keluar dari makrofag dan difagositosis oleh makrofag-makrofag lainnya. Respon imun akan terus berlangsung, kemudian makrofag akan memproses MTB dan sel dendritik akan menyajikan MTB melalui antigen presenting cell (APC) ke molekul major histocompatibility complexes (MHC) II dan dikenali oleh cell T receptors (TCR) sel limfosit T (Ahmed, 2017).

Mediator utama pertahanan imun terhadap *M. tuberculosis* adalah sel limfosit T, secara imunofenotipik sel limfosit terdiri dari limfosit Th yang dikenal sebagai CD4+ karena terdapat molekul CD4+ pada permukaannya. Sel Th (CD4) berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan sel Th2. Meskipun sel limfosit tidak dapat dibedakan secara morfologi, tetapi dapat dibedakan melalui sitokin yang diproduksinya. Sel Th1 memproduksi sitokin tipe 1 seperti IL-2, IL-12, IFN- γ , dan TNF- α . Sitokin yang disekresi oleh Th1 adalah aktivator efektif untuk memicu

respon imun seluler. Sel Th2 memproduksi sitokin tipe 2 antara lain seperti IL-4, IL-5, IL6, dan IL-10 (Highsmith et al., 2018).

Sitokin yang diproduksi oleh makrofag mempunyai potensi untuk menekan efek imunoregulator dan menyebabkan gejala klinis terhadap TB. IL-1 selain dapat merangsang sel limfosit T juga merupakan penyebab demam sebagai karakteristik tuberkulosis. IFN- γ berfungsi meningkatkan produksi metabolit *Reactive Nitrogen Intermediate* (RNI) dan *Reactive Oxygen Intermediate* (ROS) pada makrofag dan membunuh basil TB serta pembentukan granuloma untuk melawan infeksi, TNF- α juga dapat menyebabkan gejala spesifik TB seperti nekrosis jaringan dan demam. Granuloma yang terdiri dari sel T dan makrofag, berfungsi sebagai mekanisme pertahanan dengan membatasi replikasi bakteri di area fokus infeksi. Granuloma mengalami enkapsulasi yang disebabkan oleh kalsifikasi, fibrosis, dan nekrosis. Hal tersebut menurunkan ketersediaan oksigen dan nutrisi, yang menyebabkan kematian mikroorganisme, namun jika bakteri terus bereplikasi secara progresif maka bagian sentral dari granuloma akan kehilangan vaskularisasi akan ruptur dan basil MTB akan keluar menuju aliran darah yang mengakibatkan terjadi penyebaran MTB ke organ lain diluar paru-paru (Ahmad, 2011).

Interaksi antara makrofag, sel T dan berbagai sitokin yang terlibat dalam respon imun terhadap TB (Katial, 2001). Ketika infeksi TB muncul, ada dua jenis respon imun yang terlibat yaitu respon imun humoral (*antibody-mediated*) dan respon imun seluler (sel T dan makrofag teraktivasi) bersama dengan beberapa sitokin, kedua respon imun ini dimediasi oleh berbagai komponen sistem imun dan membantu untuk mengeleminasi berbagai mikroba (Kauffman, 2003).

Dalam melindungi tubuh dari infeksi TB, respon imun seluler yang lebih banyak berperan. respon imun seluler yang mematikan sel-sel yang terinfeksi untuk mengurangi proses infeksi atau menyebabkan destruksi bakteri di dalam fagosit. Sejak infeksi TB dimulai hingga fagositosis bakteri terjadi oleh makrofag, dan dengan aktivasi sel limfosit T hingga pelepasan sitokin dan terbentuknya granuloma. Mekanisme pertahanan tubuh sangat bergantung pada sel Th1, terutama ketika menghadapi infeksi bakteri intraseluler (Kauffman, 2003).

IFN- γ merupakan salah satu sitokin yang diproduksi oleh sel Th1 dan berperan penting dalam eliminasi bakteri *M. tuberculosis*. Jalur mekanisme produksi IFN- γ yang ditemukan dengan menggunakan sel T CD4+ yaitu TCR *mediated antigen-dependent pathway*. IFN- γ bertugas untuk memperkuat potensi fagosit dari makrofag yang terinfeksi bakteri *M. tuberculosis* yaitu dengan cara menstimulasi pembentukan fagolisosom dan juga menstimulasi pembentukan radikal bebas untuk menghancurkan komponen bakteri *M. tuberculosis*. Peran IFN- γ sebagai sitokin yang mengontrol infeksi TB karena meningkatkan atau menguatkan presentasi antigen pada makrofag alveolar dan memacu limfosit T CD4+ dan limfosit T sitotoksik yang berpartisipasi pada kerusakan mikobakterial (Sitti Ridha dkk, 2017).

2.2.2. Klasifikasi Tuberkulosis

Tuberkulosis dibagi menjadi dua jenis yaitu TB paru dan TB ekstra paru berdasarkan pada lokasi anatomi infeksinya. TB paru yang menyerang jaringan paru, namun pleura tidak termasuk. Sedangkan TB ekstra paru menyerang organ tubuh lainnya seperti tulang, ginjal, meningitis, kelenjar limfe, dan organ lainnya (PDPI, 2011).

a. Berdasarkan hasil pemeriksaan basil tahan asam (BTA)

Berdasarkan hasil pemeriksaan BTA, TB paru diklasifikasikan sebagai berikut:

- Tuberkulosis paru BTA positif
 - o Setidaknya dua dari tiga spesimen dahak positif BTA
 - o Hasil rontgen dada menunjukkan TB aktif, dan satu sampel dahak menunjukkan BTA positif
 - o Hasil kultur basil TBC dan satu sampel BTA dahak keduanya positif ketika tiga spesimen negatif dari evaluasi sebelumnya, satu atau lebih sampel dahak memiliki BTA positif, dan kondisinya tidak membaik meskipun telah diberikan antibiotik spektrum luas (PDPI, 2011).
- Tuberkulosis paru BTA negatif

Kasus berikut ini tidak sesuai dengan definisi TB paru BTA positif antara lain:

- Sampel dahak menunjukkan BTA negatif tiga kali, gejala klinis dan rontgen dada menunjukkan tuberkulosis aktif, dan obat spektrum luas hanya memberikan pengaruh yang kecil
- Tiga sampel dahak dinyatakan positif kultur basil TBC tetapi negatif BTA
- Ditentukan atau dianggap oleh dokter untuk diobati dengan obat anti tuberkulosis (OAT) (PDPI, 2011)

b. Berdasarkan tipe penderita

Berdasarkan riwayat pengobatan penderita sebelumnya, yang diklasifikasikan sebagai berikut:

- Kasus baru: pasien baru mengonsumsi OAT kurang dari sebulan (30 dosis per hari) atau belum pernah menjalani terapi OAT
- Kasus kambuh: Setelah menyelesaikan pengobatan TBC atau dianggap sembuh, pasien dengan hasil tes BTA sputum positif atau hasil kultur *M.tuberculosis* positif mencari terapi sekali lagi
- Kasus transfer terjadi ketika seorang pasien dirawat di suatu daerah dan kemudian dipindahkan ke daerah lain untuk berobat
- Contoh pengobatan yang tidak sesuai: pasien berhenti menerima terapi setidaknya selama dua minggu setelah memulainya setidaknya sebulan yang lalu, dan kemudian kembalinya (biasanya dengan hasil tes darah positif)
- Kasus gagal :
 - Pasien yang hasil tesnya positif BTA namun tetap positif atau menjadi positif lagi pada akhir bulan kelima (satu bulan sebelum pengobatan berakhir)
 - Setelah bulan kedua pengobatan, pasien yang sebelumnya secara radiologi positif tetapi BTA negatif menjadi positif lagi, jika gambaran radiologi kontrol memburuk.
- Pasien yang tergolong kasus kronis adalah pasien yang temuan BTA-nya tetap positif bahkan setelah terapi kategori 2 selesai.
- Kasus TB sebelumnya :
 - Pemeriksaan radiologi menunjukkan lesi TB yang tidak aktif, dan temuan BTA negatif. Gambar radiologi serial dilanjutkan

- o Bila tidak ada perbaikan gambaran radiologi setelah mendapat OAT selama dua bulan dan gambaran radiologi menimbulkan kecurigaan adanya lesi TB aktif (PDPI, 2011; Kemenkes RI, 2011)

c. Berdasarkan patogenesis penyakit

Tabel berikut menunjukkan sistem klasifikasi klinis TB berdasarkan pada patogenesis yang saat ini digunakan di Amerika Serikat.

Tabel 2.1. Klasifikasi Klinis Tuberkulosis (CDC, 2013)

Kelas	Tipe	Deskripsi
0	- Tidak ada paparan TB - Tidak terinfeksi	- Tidak ada riwayat paparan TB dan indikasi penyakit atau infeksi TB - Reaksi tes TST atau IGRA negatif
1	- Paparan TB - Tidak ada gejala infeksi	- Ada riwayat paparan <i>M. tuberculosis</i> - Hasil tes IGRA atau TST negatif (diukur 8-10 minggu setelah paparan)
2	- Infeksi TB - Tidak ada penyakit TB	- Hasil positif terhadap tes IGRA atau TST - Hasil kultur basil TB dan BTA dahak negatif, tidak menunjukkan tanda-tanda TB aktif
3	- TB klinis aktif	- Kultur basil TB positif atau - Terdapat bukti TB aktif (klinis, bakteriologis, dan radiografi) disertai tes TST atau IGRA positif
4	- Riwayat klinis TB tidak aktif	- Latar belakang medis TB - Gambaran radiologi yang konsisten abnormal - Reaksi
5	- Dicurigai TB	- Gejala dan indikator TB aktif, namun pengujiannya tidak memadai

Ket: TST (*Tuberculin Skin Test*); IGRA (*Interferon Gamma Release Assay*)

2.2.3. Tuberkulosis Aktif

Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* adalah penyebab penyakit TB. Penyakit ini kebanyakan menyerang paru-paru, namun bisa juga menyerang otak, ginjal, tulang, atau organ lainnya. TB bisa aktif dalam tubuh atau laten (diam). TB aktif dapat mengakibatkan masalah kesehatan yang serius dan kemungkinan kematian apabila tidak diobati (NSW, 2010).

Infeksi TB aktif terjadi ketika seorang penderita TB mengalami batuk atau bersin yang tidak ditutup ketika berbicara sehingga menyebar melalui

udara, penularan infeksi TB aktif pada umumnya sering menyerang paru-paru (Jordao, 2011). Kuman TB dapat menyebar melalui pembuluh darah, kelenjar getah bening, yang akibatnya menginfeksi hampir seluruh organ tubuh manusia seperti paru-paru, otak, ginjal, sistem pencernaan, tulang, dan kelenjar getah bening (Zhang, 2011).

Meskipun perkiraan tingkat infeksi global *M. tuberculosis* adalah sekitar 30%, hanya 10% orang yang terinfeksi berkembang menjadi TB aktif secara klinis, dan 90% kasus lainnya masih berada dalam fase laten. Hal ini menunjukkan banyaknya reservoir individu yang mengidap infeksi tuberkulosis laten. Oleh karena itu, pencapaian target “End TB” oleh WHO akan bergantung pada peningkatan diagnosis dan pengelolaan infeksi tuberkulosis laten di Asia.

2.2.4. Diagnosis Tuberkulosis

Penegakan diagnosis TB dapat dilakukan dengan beberapa metode yang meliputi anamnesis untuk pemeriksaan fisik, pemeriksaan laboratorium darah rutin (LED, monosit, limfositosis), pemeriksaan sputum BTA, pemeriksaan kultur, pemeriksaan resistensi obat metode cepat (uji diagnostik molekuler cepat), *genXpert assay*, *Tuberculin Skin Test (TST) / mantoux test*, *Interferon Gamma Release Assays (IGRA)*, *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Pemeriksaan serologi seperti *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)*, *mycodot*, *Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP)*, uji tuberkulosis IgG, dan uji *Immuno chromatographic (ICT)*, *Becton Dickinson Diagnostic Instrument System (BACTEC)*, pemeriksaan antigen Lipoarabinomannan (LAM), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* urinary antigen test, dan diagnosis TB ditegakkan berdasarkan setidaknya satu spesimen *M. tuberculosis* yang terkonfirmasi atau sesuai gambaran histologis TB, atau data klinis dan radiologis yang mendukung diagnosis TB (Kemenkes RI, 2013).

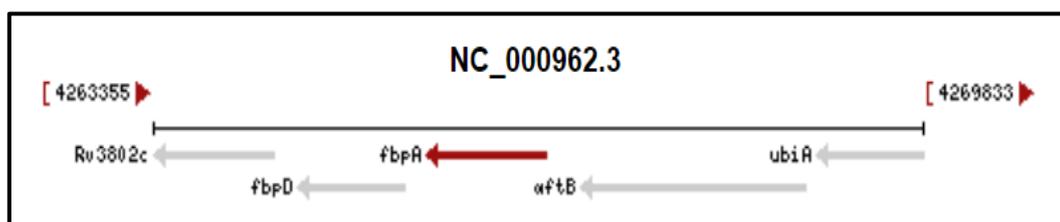
Rangkaian pemeriksaan dan identifikasi mikroorganisme pada sekret atau jaringan pasien merupakan hal utama dalam mendiagnosis TB, namun proses ini cukup sulit dan memiliki keterbatasan. Hasil pemeriksaan BTA (+) dari dahak memerlukan kurang lebih 5000 kuman/ml. Kuman (+) dalam kultur membutuhkan sekitar 50–100 kuman/ml dan waktu pertumbuhan sekitar 4–8 minggu. Apabila pada foto polos toraks terdapat

gambaran infiltrat pada lobus atas dan kaviti, maka kemungkinan terjadinya TB paru adalah 80-85% (Palomino, 2007).

2.3. Gen *fbpA* *Mycobacterium tuberculosis*

Dinding sel pada *M. tuberculosis* terdiri dari asam mikolat yang terikat secara kovalen, arabinogalaktan dan peptidoglikan. Peningkatan jumlah enzim yang berpartisipasi dalam biosintesis dinding sel mikobakteri yaitu di antaranya tiga protein pengikat fibronektin yang diekspor dominan terdiri dari Ag85A (*fbpA*), Ag85B (*fbpB*) dan Ag85C (*fbpC*). Untuk perakitan akhir dinding sel mikobakteri yang disarankan untuk berperan menunjukkan bahwa pada ketiga antigen *M. tuberculosis* yang dimurnikan mengkatalisis transfer mikolat melalui proses pertukaran *mycolyltransferase*, yang mengarah pada pembentukan α, α' -trehalose monomycolate (TMM) dan α, α' -trehalose dimycolate (TDM, juga dikenal sebagai *cord factor*). Selain itu, analog trehalosa, 6-azido-6-deoxytrehalose, menghambat aktivitas *mycolyltransferase* dari ketiga anggota kompleks Ag85 in vitro, menunjukkan pentingnya TDM dalam kelangsungan hidup bakteri (Belisle *et al.*, 1997). Protein ini memiliki kontribusi dalam perlekatan *M. tuberculosis* ke sel inang melalui makrofag yang terdapat pada alveoli dan dapat mempertahankan kelangsungan hidup *M. tuberculosis* di bagian intraseluler inang (Zarif *et al.*, 2013).

Kompleks antigen 85 (Ag85) merupakan keluarga protein pengikat fibronektin yang dianggap sebagai faktor virulensi potensial. Protein Ag85A, Ag85B, dan Ag85C, yang dikodekan masing-masing oleh gen *fbpA*, *fbpB*, dan *fbpC* menarik perhatian ketika *M. tuberculosis* ditemukan mengikat secara selektif ke fibronektin dan tidak pada protein matriks ekstraseluler murni lainnya yang diuji. Sejumlah residu dilestarikan antara *fbpA*, *fbpB* dan *fbpC* menyoroti situs potensial untuk interaksi dengan fibronektin manusia (Ronning *et al.*, 2000).



Gambar 2.4. Letak Gen *fbpA* pada Genome *Mycobacterium tuberculosis* (NCBI, 2022)

Fraksi utama pada protein sekretori (*secreted protein*) dari filtrat kultur *M. tuberculosis* BCG adalah kompleks Ag85. Pada permukaan dinding sel *Mycobacterium* terdapat protein antigen 85 (Ag85) yang disekresikan. Ekspresi Ag85 diperlukan untuk kelangsungan hidup *M. tuberculosis* di makrofag dan dianggap sebagai faktor virulensi (Kuo, C. J. et al, 2013).

Protein Ag85 yang disekresikan bersifat sebagai imunogenik dan diekspresikan secara terus menerus oleh *M. tuberculosis* dan dapat merangsang respon dan sel T. Sel T dapat mengaktifkan sistem imunitas seluler dan humoral melalui pelepasan sitokin dan mengaktifkan sel makrofag, sel NK, sel DC, dan sel Tc yang berguna dalam menghancurkan sel yang terinfeksi *M. tuberculosis* intraseluler (Jiang et al., 2015; Fihiruddin et al., 2020).

Salah satu protein yang disekresikan oleh *M. tuberculosis* adalah antigen 85A (Ag85A) *Mycobacterium*, yang dikodekan pada fibronectin binding protein-A (*fbp-A*), dengan berat molekul 32 kD dan 1017 bp. Sebagian besar orang sehat yang terinfeksi *M. tuberculosis* menunjukkan proliferasi sel T yang kuat dan produksi IFN- γ yang diinduksi oleh protein Ag85A. Ag85A mungkin memainkan peran kunci terhadap patogenesis *M. tuberculosis*, sebagaimana dibuktikan dengan terganggunya gen *fbpA* yang mengkode Ag85A pada *M. tuberculosis*. Gangguan ini menghasilkan strain yang tidak mampu untuk memanipulasi makrofag manusia (Wang, D., 2010).

2.4. Mutasi Gen

Secara umum perubahan sifat keturunan disebut dengan mutasi. Mutasi adalah perubahan materi genetik (DNA atau RNA) yang terjadi pada tingkat urutan gen (mutasi titik) dan pada tingkat kromosom. Kesalahan dalam replikasi materi genetik selama pembelahan sel yang disebabkan oleh radiasi, bahan kimia, atau virus dapat mengakibatkan mutasi. Di sisi lain, mutasi tertentu diyakini hanya disebabkan oleh kealpaan yang terjadi pada proses metabolisme sel, meskipun mutagen pastinya masih belum diketahui.

Mutasi bertujuan untuk menghadapi perubahan alam yang sewaktu-waktu bisa terjadi. Peristiwa terjadinya mutasi disebut mutagenesis. Mutagen adalah

sumber terjadinya mutasi (agen mutasi). Mayoritas mutagen adalah bahan fisika, kimia, atau biologis dengan daya tembus tinggi yang memungkinkan untuk mengakses materi genetik yang terletak di inti sel. Sedangkan individu yang menunjukkan perubahan sifat akibat mutasi disebut mutan (Yanti Fitria, 2020).

Mutasi titik pada dasarnya adalah mutasi gen. Mutasi ini mengakibatkan perubahan sifat individu tanpa mengubah jumlah atau urutan kromosom. Hal ini disebabkan oleh perubahan kimia pada satu atau lebih pasangan basa dalam satu gen. Kondisi yang terjadi pada mutasi gen adalah perubahan urutan DNA, atau lebih tepatnya mutasi titik terjadi ketika perubahan basa nitrogen (basa N) dari DNA. Mutasi gen terjadi ketika adanya perubahan urutan sekuens gen karena terjadi perubahan pada level DNA. Mutasi DNA dapat terjadi melalui proses transisi, transversi, delesi, insersi, dan duplikasi. Mutasi gen dapat berdampak pada terjadinya:

- a. *Silent mutation* : mutasi yang tidak menyebabkan perubahan asam amino
- b. *Nonsense mutation* : mutasi yang menyebabkan terbentuknya kodon stop
- c. *Missense mutation* : mutasi yang menyebabkan perubahan protein

Ketika salah satu nukleotida dengan pasangannya dalam untai DNA komplementer digantikan dengan pasangan nukleotida lain, proses ini dikenal sebagai penggantian atau substitusi pasangan basa. Ikatan hidrogen yang lemah menghubungkan pasangan basa N pada DNA yang terletak di antara guanin dengan sitosin atau antara timin dengan adenin. Pada purin atau pirimidin memungkinkan perpindahan atom hidrogen dari satu posisi ke posisi lainnya. Perubahan kimawi seperti itu disebut dengan perubahan tautomer. Misalnya adenin berpasangan dengan sitosin dan timin dengan guanin, yang mana berpasangan secara tidak normal. Karena hanya terjadi di dalam gen, maka peristiwa perubahan genetik ini disebut sebagai mutasi gen (Warmadewi D. A, 2017).

2.5. Tinjauan Umum Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.5.1. Definisi Polymerase Chain Reaction (PCR)

Pentingnya pengembangan metode identifikasi dan deteksi *M. tuberculosis* pada spesimen klinis yang bersifat sensitif, relatif cepat dan spesifik. Sebagai alternatif teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dapat digunakan untuk memastikan ada tidaknya *M. tuberculosis* dalam

spesimen klinis. Selain itu dapat dilakukan deteksi *M. tuberculosis* pada sputum melalui pemeriksaan mikroskopis dan kultur bakteri. Program pengendalian TB sangat bergantung pada pemeriksaan mikroskopis dahak untuk menegakkan diagnosis, evaluasi, dan tindak lanjut pengobatan berdasarkan pemeriksaan tiga spesimen dahak sewaktu pagi sewaktu (SPS). Pemeriksaan ini adalah tes yang paling mudah, terjangkau, efektif, dan spesifik, serta dapat dilakukan di setiap unit laboratorium. Dengan teknik PCR, kuman TB dapat dideteksi dengan tingkat sensitivitas yang sangat tinggi. Teknik PCR merupakan suatu teknik *in vitro* untuk mengamplifikasi DNA, dalam hal ini DNA *M. tuberculosis*. Proses ini melibatkan DNA cetakan (*template*) beruntai ganda yang mengandung DNA target, enzim DNA polimerase, nukleotida trifosfat, dan sepasang primer.

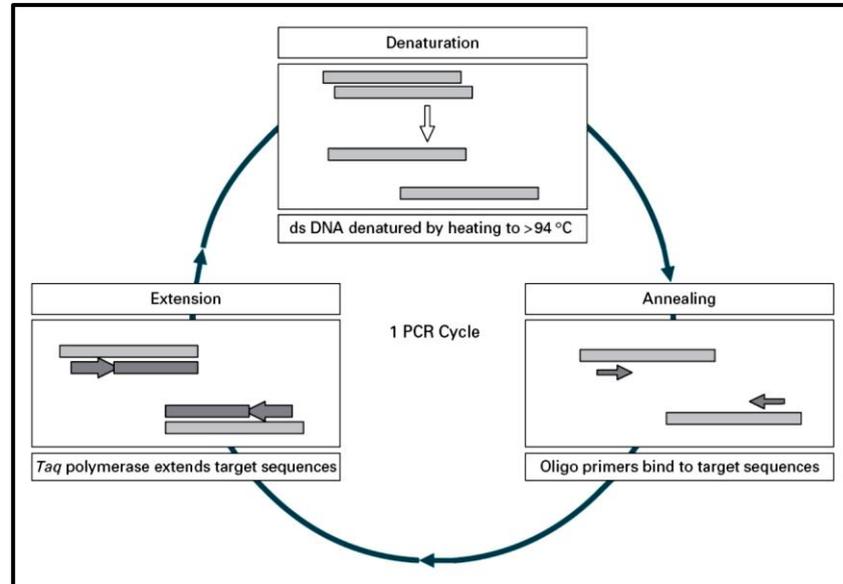
Salah satu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA secara *in vitro* adalah reaksi berantai polimerase. Kary B. Mullis mengembangkan PCR pertama kali pada tahun 1985. Jumlah urutan DNA dapat bertambah sebanyak ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10^6 – 10^7 dengan menggunakan proses PCR. Akan ada urutan basa nukleotida yang teramplifikasi dua kali lebih banyak jumlahnya. 2^n kali banyaknya DNA target akan diperoleh dalam setiap n siklus PCR. Kunci dalam mengembangkan PCR adalah mencari cara untuk mengurangi amplifikasi sekuens non-target dan hanya mengamplifikasi sekuens DNA target (Fatchiyah, 2011).

Pelipatgandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{-19} mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit diperoleh melalui teknik PCR. Ini menunjukkan betapa cepatnya sebuah fragmen DNA dapat dilipatgandakan. Teknik PCR dapat dilakukan dengan jumlah komponen yang sangat sedikit dan cetakan DNA tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu, sehingga teknik PCR dapat berfungsi mereplikasi suatu sekuens DNA genom bakteri dalam tabung PCR (Triwibowo, 2006).

2.5.2. Tahapan Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Ada tiga langkah penting yang terlibat dalam prosedur teknik PCR, yaitu denaturasi (*denaturation*), penempelan (*annealing*), dan ekstensi atau elongasi (*extension*). Secara teknis, penggandaan DNA oleh PCR

memerlukan tujuh komponen yaitu air, larutan *buffer*, sepasang primer, enzim DNA polimerase tahan panas, dNTP, kofaktor MgCl₂, dan cetakan atau template DNA yang akan diperbanyak (Budiarto, 2015). Berikut ini tiga fase bekerjanya PCR dalam satu siklus.



Gambar 2.5. Skema sederhana satu siklus PCR (Wilson dan Walker, 2010)

a. Denaturasi

Untaian ganda DNA diuraikan menjadi untai tunggal merupakan tahap untuk denaturasi, yang terjadi antara suhu 94°C–98°C. Pemanasan pada suhu 94°C–98°C dilakukan selama 20–30 detik. Pemanasan dengan suhu tinggi mempunyai efek akan mengganggu ikatan hidrogen antara basa komplementer. Suhu denaturasi yang terlalu tinggi akan menurunkan aktivitas DNA polimerase, yang akan mempengaruhi efisiensi PCR. Selain itu, hal ini dapat merusak *template* DNA dan sebaliknya, suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan denaturasi *template* DNA tidak bekerja dengan sempurna. Suhu 94°C merupakan suhu denaturasi yang umum digunakan (Herman et al., 2018).

Temperatur yang lebih tinggi juga diperlukan untuk *template* DNA dengan kandungan G+C dalam jumlah yang lebih tinggi. Hanya wilayah A–T pada *template* DNA yang akan terdenaturasi jika suhu denaturasi terlalu rendah atau waktunya terlalu pendek (Ehtisham et al., 2016).

b. Penempelan Primer (*Annealing*)

Primer gen target dilekatkan selama proses penempelan (annealing) ini. Kisaran suhu optimum untuk annealing adalah antara 55°C–60°C, begitu juga dengan komposisi primer. Apabila suhu terlalu rendah akan menyebabkan terjadinya false priming akibatnya kesalahan pembentukan produk, sedangkan primer tidak dapat menempel pada DNA target jika suhu terlalu tinggi sehingga proses PCR tidak berhasil (Nakamura et al., 2014).

Primer yang baik harus dirancang dengan kriteria primer berukuran 18–25 basa, mengandung 50–60% G+C, dan kedua primer tersebut sebaiknya harus identik. Waktu annealing yang biasa digunakan pada PCR umumnya adalah 30–45 detik. Suhu meningkat seiring dengan bertambahnya panjang ukuran primer. Meskipun suhu yang sering digunakan antara 50°C–60°C, namun suhu penempelan yang digunakan berkisar antara 36°C–72°C (Yusuf, 2010).

c. Ekstensi Primer (*Extension*)

Taq polimerase mulai bekerja pada tahap ini untuk memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Diperkirakan bahwa enzim tersebut dapat menyusun nukleotida dengan kecepatan 35–100 nukleotida per detik pada suhu 72°C, bergantung pada molekul DNA target, pH, buffer, dan konsentrasi garam. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai dengan 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA seperti untai ganda (Yusuf, 2010).

2.6. DNA Sequencing

Metode untuk menentukan urutan basa nukleotida pada suatu fragmen molekul DNA tertentu dikenal sebagai sekuensing DNA. Sekuensing DNA dapat digunakan untuk menentukan identitas dan memahami fungsi gen atau fragmen DNA lainnya, dengan cara membandingkan sekuens sampel dengan sekuens DNA lain yang diketahui. Metode ini berguna untuk membandingkan gen homolog antara spesies dan untuk mengidentifikasi terjadinya mutasi gen. Tahapan terakhir dalam menentukan urutan nukleotida fragmen yang diamplifikasi adalah sekuensing DNA.

Tahapan *direct sequencing* melibatkan penentuan urutan nukleotida dari fragmen yang diperoleh dari amplifikasi PCR tanpa memerlukan kloning. Direct sequencing pada dasarnya sama dengan proses sekuensing biasa. Namun demikian, terdapat beberapa perbedaan dalam fase reaksi, khususnya dalam persiapan template DNA dan proses amplifikasi PCR.

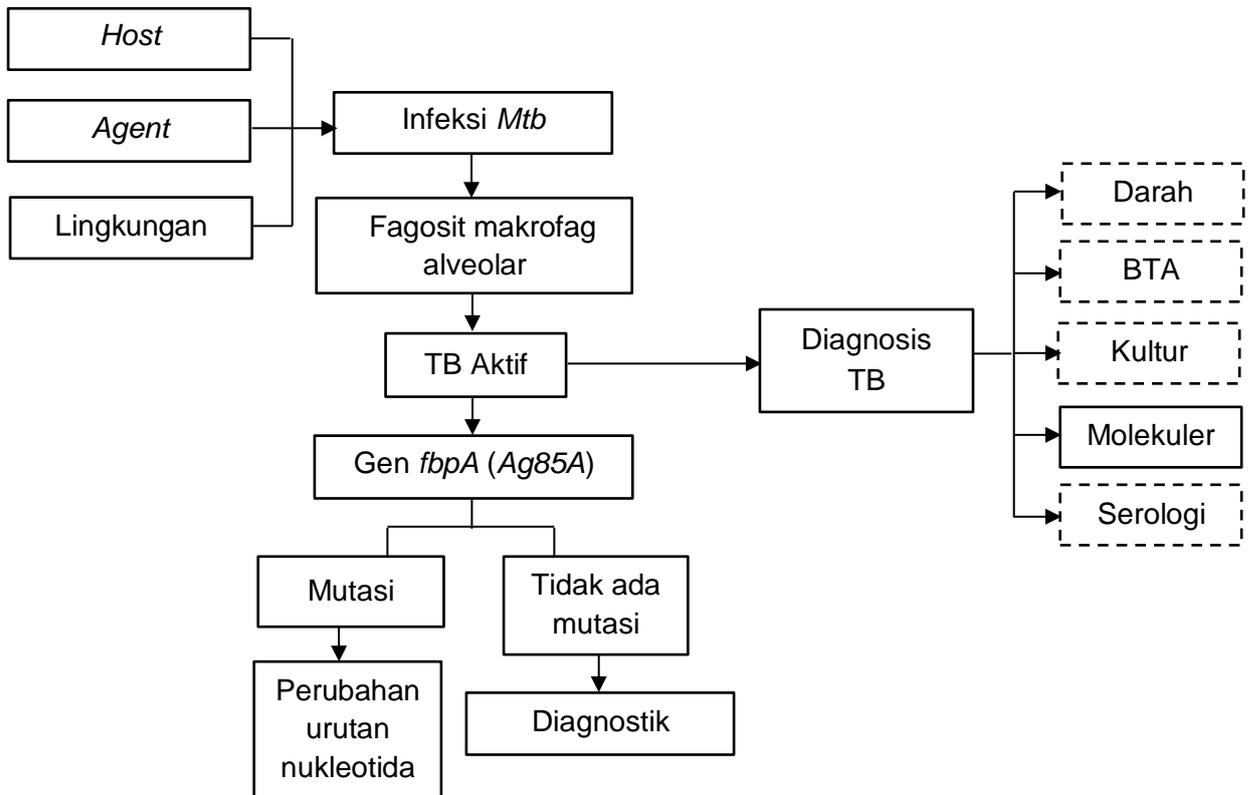
Automatic DNA Sequencer yang didasarkan pada metode *Dye Terminator Labeling* dapat digunakan untuk melakukan sekuensing menggunakan metode *Dideoxy Sanger*. Metode yang dikembangkan sekitar akhir tahun 1970 ini dapat mengurutkan DNA secara efisien dan cepat. Metode ini dikenal dengan nama *Dideoxy Sanger-Coulson* karena disarankan oleh F. Sanger dan A. R. Coulson. Metode ini sering digunakan karena lebih aman sebab tidak memerlukan reagen berbahaya dan terbukti lebih mudah digunakan secara teknis untuk DNA untai panjang. Prinsip dasarnya adalah keberadaan nukleotida dideoksi (ddNTP) menyebabkan terminasi rantai nukleotida (Gumilar et al., 2008).

Metode *Dideoxy Sanger* membutuhkan DNA beruntai tunggal. Reaksi sekuensing metode Sanger membutuhkan enzim polimerase, dNTP, ddNTP, dan primer. Primer yang dikatalisis oleh fragmen DNA polimerase Klenow digunakan dalam reaksi Sanger. Teknik sekuensing DNA dideoksi atau terminasi rantai ini dilakukan dalam empat reaksi terpisah. Untuk memungkinkan polimerisasi DNA dapat berlangsung dan terhenti di lokasi yang tepat, maka dNTP dan ddNTP berada dalam rasio yang sama pada keempat proses.

Sejumlah fragmen DNA dengan berbagai ukuran akan dihasilkan dalam setiap reaksi, namun ujung 3' setiap fragmen selalu diakhiri dengan nukleotida yang sama. Primer diperlukan karena primer dibutuhkan karena DNA polimerase tidak dapat memulai sintesis DNA pada molekul yang seluruhnya

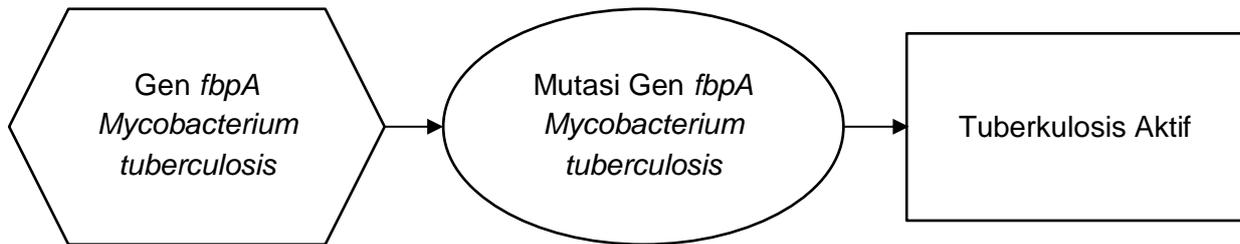
berantai tunggal, maka untai ganda pendek diperlukan untuk memberikan ujung 3' dimana enzim dapat menambahkan nukleotida yang baru. Primer juga berperan dalam menentukan secara spesifik area molekul template yang akan disekuens (Dewiyanti R, 2009).

2.7. Kerangka Teori



Gambar 2.6. Kerangka Teori Penelitian

2.8. Kerangka Konsep



Keterangan:

 Variabel bebas

 Variabel antara

 Variabel terikat

Gambar 2.7. Kerangka Konsep Penelitian