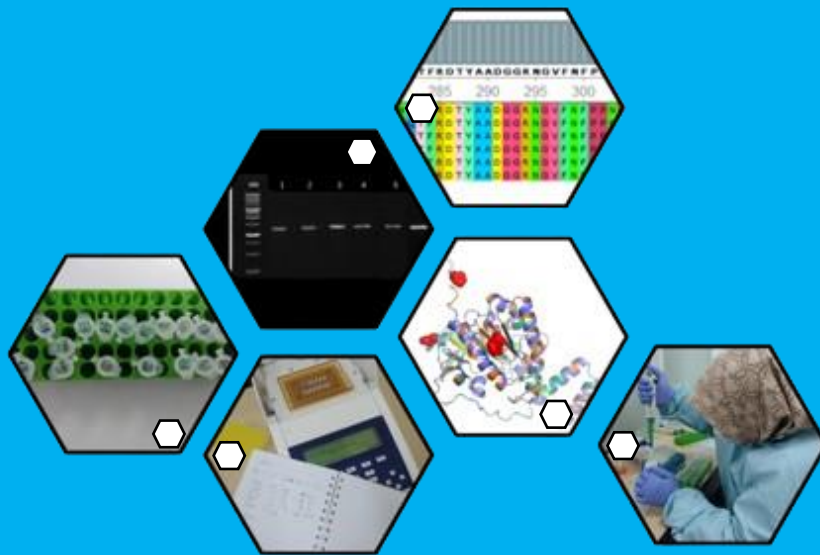


TESIS

VARIASI SEKUENS AG85 KOMPLEKS DARI ISOLAT KLINIS
Mycobacterium tuberculosis DENGAN SEKUENSING

VARIATION OF AG85 COMPLEX SEQUENCES FROM CLINICAL
ISOLATE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY SEQUENCING



ISRINI WIYULANDA ISKANDAR

P062221036



PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

TESIS

VARIASI SEKUENS AG85 KOMPLEKS DARI ISOLAT KLINIS
Mycobacterium tuberculosis DENGAN SEKUENSING

VARIATION OF AG85 COMPLEX SEQUENCES FROM CLINICAL
ISOLATE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY SEQUENCING

ISRAINI WIYULANDA ISKANDAR

P062221036



PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

Halaman Pengajuan

VARIASI SEKUENS AG85 KOMPLEKS DARI ISOLAT KLINIS *Mycobacterium tuberculosis* DENGAN SEKUENSING

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

ISRAINI WIYULANDA ISKANDAR

P062221036

kepada

PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

Halaman Pengesahan

TESIS

VARIASI SEKUENS AG85 KOMPLEKS DARI ISOLAT KLINIS

Mycobacterium tuberculosis DENGAN SEKUENSING

ISRAINI WIYULANDA ISKANDAR

P062221036

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister pada 20 Agustus 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Magister Ilmu Biomedik
Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin
Makassar
2024

Mengesahkan:

Pembimbing Utama,



Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi., Ph.D., Sp.MK(K).
NIP. 196709101996031001

Pembimbing Pendamping,



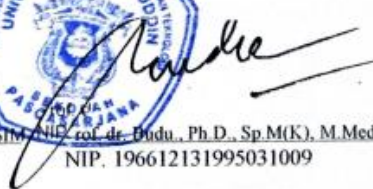
Dr. rer. nat. Astutiati Nurhasanah
NIP. 197503311994012001

Ketua Program Studi
Ilmu Biomedik,



Prof. dr. Rahmawati Minhajat., Ph.D, Sp.PD-KHOM, FINASIM
NIP. 196802181999032002

Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin



Prof. dr. Budu., Ph.D., Sp.M(K), M.Med.E
NIP. 196612131995031009



Dokumen ini difasilitasi secara elektronik menggunakan simbol QR Code. Silakan lakukan verifikasi pada dokumen elektronik yang dapat diunduh dengan melakukan scan QR Code.

Lembar Pernyataan Keaslian Tesis

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "VARIASI SEKUENS AG85 KOMPLEKS DARI ISOLAT KLINIS *Mycobacterium tuberculosis* DENGAN SEKUENSING" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi., Ph.D., Sp.MK(K). sebagai Pembimbing Utama dan Dr. rer. nat. Astutiati. Nurhasanah 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 of Narra J sebagai artikel dengan judul "Computational Drug Repurposing of Tuberculosis for Inhibiting Ag85 Complex Proteins: Predicted Compound-Based Approaches". 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 (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.



Makassar, 20 Agustus 2024

ISRAINI WIYULANDA ISKANDAR
NIM P062221036

Kata Pengantar

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan tesis ini yang berjudul “*VARIASI SEKUENS AG85 KOMPLEKS DARI ISOLAT KLINIS Mycobacterium tuberculosis DENGAN SEKUENSING*” dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi., Ph.D., Sp.MK(K). sebagai Pembimbing Utama dan Dr. rer. Nat. Astutiati Nurhasanah sebagai Pembimbing Pendamping serta para dosen penguji yang juga telah memberikan masukan-masukan dalam perjalanan penelitian kami. Penghargaan yang tinggi saya sampaikan kepada Dr.dr.Najdah Hidayah atas bantuan selama penelitian yang tidak mungkin saya lakukan tanpa bantuan dan arahan beliau. Saya mengucapkan berlimpah terima kasih kepada saya sampaikan kepada Tim HUMRC di Rumah Sakit Uiversitas Hasanuddin telah mengizinkan kami untuk melaksanakan penelitian dan kesempatan untuk menggunakan fasilitas dan peralatan di Laboratorium HUMRC. Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin dan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah memfasilitasi saya menempuh program magister serta para dosen dan rekan-rekan dalam tim penelitian. Akhirnya, kepada kedua orang tua tercinta saya mengucapkan limpah terima kasih dan sembah sujud atas doa, pengorbanan dan motivasi mereka selama saya menempuh pendidikan. Penghargaan yang besar juga saya sampaikan kepada seluruh keluarga, sahabat, dan teman-teman atas motivasi dan dukungan yang tak ternilai.

Penulis,

Israini Wiyulanda Iskandar

ABSTRAK

ISRAINI WIYULANDA ISKANDAR. **Variasi sekuens Ag85 kompleks dari isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* dengan sekuensing** (dibimbing oleh Muhammad Nasrum Massidan Astutiati. Nurhasanah).

Gen *fbpA*, *fbpB*, dan *fbpC* mengkode protein kompleks antigen 85 (Ag85), yang penting dalam patogenesis tuberkulosis (TB) melalui aktivitas enzim mycolyltransferase. Enzim ini berperan dalam sintesis dinding sel mycobacteria serta membantu penempelan, invasi, dan penyebaran mycobacteria dalam sel inang. Penelitian ini bertujuan mengkaji variasi sekuens DNA dari kompleks Ag85 pada isolat klinis *M. tuberculosis* dengan metode sekuensing dan analisis bioinformatika. Metode yang digunakan meliputi identifikasi variasi sekuens menggunakan PCR dan *Sanger sequencing*. Hasil sekuensing dicocokkan dengan sekuens referensi dari NCBI menggunakan UGENE dan dianalisis pohon filogenetik menggunakan MEGA versi 11.3.0 dengan Bootstrap 1000. Analisis perubahan asam amino dilakukan menggunakan PyMoL. Analisis terhadap 40 sampel menemukan beberapa variasi DNA pada gen target. Pada gen *fbpA*, ditemukan satu titik variasi pada 1 sampel dengan basa T12C. Pada gen *fbpB*, ditemukan variasi yang sama pada 11 sampel dengan C714A, sedangkan pada *fbpC* ditemukan 4 variasi, yaitu G309A, G472A, G755T, and C1003C. Pohon filogenetik menunjukkan beberapa variasi pada gen target juga ada pada strain lain seperti FDAARGOS, Beijing, dan CAS. Analisis asam amino menunjukkan bahwa hanya variasi pada *fbpC* yang mempengaruhi perubahan asam amino G158S, W252L, P335A, sementara variasi pada *fbpA* dan *fbpB* tidak mengubah asam amino. Penelitian ini menunjukkan adanya variasi sekuens pada gen target yang memengaruhi perubahan asam amino, khususnya pada gen *fbpC* yang mengekspresikan Ag85C. Temuan ini diharapkan memberikan informasi baru mengenai variasi sekuens kompleks Ag85 sebagai target pengobatan TB.

Kata Kunci: Ag85 Kompleks, Analisis Bioinformatika, *Mycobacterium tuberculosis*, Sekuen DNA, Tuberkulosis,

ABSTRACT

ISRAINI WIYULANDA ISKANDAR. **Variation of Ag85 complex sequences from clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by sequencing** (Supervised by Muhammad Nasrum Massi and Astutiati. Nurhasanah).

The genes *fbpA*, *fbpB*, and *fbpC* encode the antigen 85 (Ag85) complex proteins, which are crucial in the pathogenesis of tuberculosis (TB) through the activity of the mycolyltransferase. This enzyme plays a role in synthesizing the mycobacterial cell wall and aids in the adhesion, invasion, and spread of mycobacteria within host cells. This study aimed to examine DNA sequence variations of the Ag85 complex in clinical isolates of *M. tuberculosis* using sequencing methods and bioinformatics analysis. The methods used include identifying sequence variations using PCR and Sanger sequencing. Sequencing results were aligned with reference sequences from the NCBI database using UGENE and phylogenetic trees were analyzed using MEGA version 11.3.0 with 1000 Bootstraps. Amino acid changes were analyzed using PyMol. Analysis of 40 samples found several DNA variations in the target genes. In the *fbpA* gene, one sample showed a single variation with a T12C base change. In the *fbpB* gene, the same variation was found in 11 samples with a C714A change, while in *fbpC*, four variations were found: G309A, G472A, G755T, and C1003C. Phylogenetic trees indicated that some variations in the target genes were also present in other strains like FDAARGOS, Beijing, and CAS. Amino acid analysis showed that only variations in *fbpC* affected amino acids (G158S, W252L, P335A), while variations in *fbpA* and *fbpB* did not alter amino acids. This study revealed sequence variations in the target genes that affect amino acids, particularly in the *fbpC* gene expressing Ag85C. These findings are expected to provide new insights into Ag85 complex sequence variations as a target for TB treatment.

Keywords: Ag85 Complex, Bioinformatics Analysis, *Mycobacterium tuberculosis*, DNA Sequence, Tuberculosis

DAFTAR ISI

Halaman Pengajuan	3
Halaman Pengesahan	4
Lembar Pernyataan Keaslian Tesis	5
Kata Pengantar	6
ABSTRAK	7
ABSTRACT	8
DAFTAR ISI	9
BAB I	12
PENDAHULUAN.....	12
1.1 Latar Belakang.....	12
1.2 Rumusan Masalah.....	14
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian	14
BAB II	16
METODE PENELITIAN	16
2.1 Tempat dan Waktu Penelitian	16
2.2 Bahan dan Alat	16
2.3. Metode Penelitian.....	17
2.3.1 Kultivasi dan Isolasi DNA Genom	17
2.3.3 Elektroforesis gel agarosa.....	18
2.3.4 Sekuensing	19
2.3.5 Analisa Bioinformatika	19
2.4 Alur Penelitian.....	20
.....	20
2.5. Kerangka Teori	21
2.6. Kerangka Konsep	22
BAB III	23
HASIL DAN PEMBAHASAN	23
3.1 Hasil.....	23
3.1.1. Karakteristik Sampel	23
3.1.2 Amplifikasi dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR) ..	23
3.1.3 Analisis Sekuens Gen Ag85 Complex	24

3.1.4 Analisis Filogenetik.....	26
3.1.5 Analisis Perubahan Asam Amino.....	31
3.1.6 Analisis Perubahan Struktur Protein	34
3.2 Pembahasan.....	37
BAB IV	42
KESIMPULAN DAN SARAN	42
4.1 Kesimpulan	42
4. 2 Saran	42
Daftar Pustaka	43
Lampiran	47

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Sekuens Primer Ag85 Kompleks	33
Tabel 2.2 Kondisi PCR.....	34
Tabel 2.3 Mix Reaksi PCR.....	34
Tabel 3.1 Varasi Nukelotida pada masing-masing gen.....	40

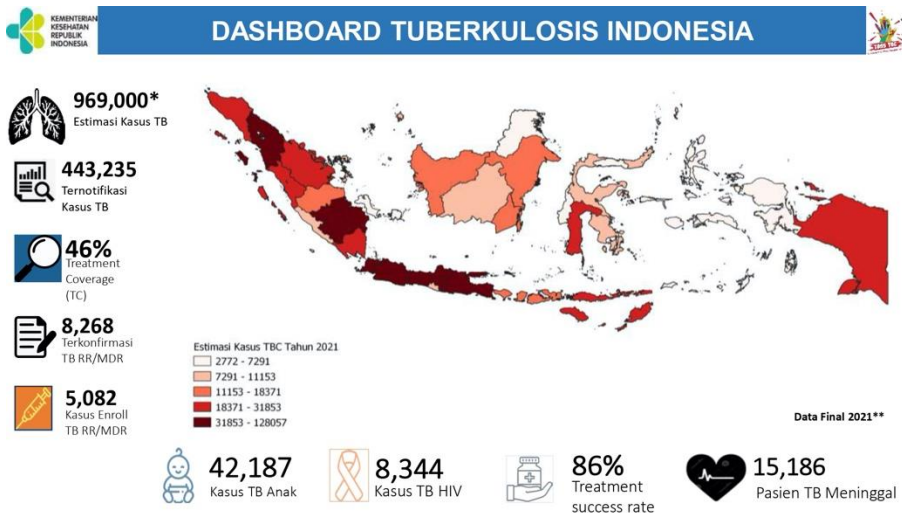
DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1 Peta Penyebaran TB diIndonesia.....	15
Gambar 3.1 Elektroforesis produk PCR. (a) gen <i>fbpA</i> , (b) gen <i>fbpB</i> dan (c) gen <i>fbpC</i>	38
Gambar 3.2 Jenis dan posisi variasi gen <i>fbpA</i> yang terletak pada nukleotida urutan 12	38
Gambar 3.3 Jenis dan posisi variasi gen <i>fbpB</i> yang terletak pada nukleotida urutan 714.....	39
Gambar 3.4 Jenis dan posisi variasi gen <i>fbpC</i> yang terletak pada nukleotida urutan (a) 309, (b) 472, (c) 755, dan (d) 1003.	40
Gambar 3.5 (a) Hasil Alignment gen <i>fbpA</i> bersama dengan gen reference, dan (b) pohon filogenetik.	42
Gambar 3.6 (a) Hasil Alignment gen <i>fbpB</i> bersama dengan gen reference, dan (b) pohon filogenetik	43
Gambar 3.7 Hasil Alignment gen <i>fbpC</i> bersama dengan gen reference pada beberapa titik variasi (a) posisi 309, (b) posisi 472, (c) posisi 755, (d) posisi 1003, dan (e) pohon filogenetik.....	45
Gambar 3.8 Sekuens asam amino pada sample A3 dan reference H37Rv.....	46
Gambar 3.9 Sekuens asam amino pada sample B B (B1, B5, B7, B8, B9, B12, B14, B16, B33, B35, B40) dan reference H37Rv	46
Gambar 3.10 Sekuens asam amino pada sample <i>fbpC</i> dan reference H37Rv pada posisi sekuens asam amino (a)103, (b)158, (c)252, dan (d)335.....	48
Gambar 3.11 (a)Visualisasi model struktur protein dari <i>fbpC</i> (Ag85C) dari SWISS Model (b) Alignment model struktur protein untuk sampel C5 (orange), C16 (ungu) dan C40 (hijau) bersama dengan reference <i>fbpC</i> H37Rv (biru) yang menunjukkan 3 titik variasi asam amino (dots merah).	49
Gambar 3.12 Ramachandran plot pada model struktur protein asam amino (a) C5, (b)C16, (c)C40, dan (d)Reference H37Rv <i>fbpC</i>	50
Gambar 3.12 Visualisasi posisi variasi masing-masing asam amino pada model struktur protein reference <i>fbpC</i> H37Rv (merah) yang menunjukkan 3 titik variasi asam amino pada C16 (b), C40 (d) dan C5 (f) (kuning).....	51

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan secara utama mempengaruhi paru-paru. TB merupakan salah satu dari 10 penyebab kematian teratas di seluruh dunia, dimana pada tahun 2021, diperkirakan sekitar 10,6 juta orang terkena penyakit TB di seluruh dunia. Adapun delapan negara yang menyumbang lebih dari dua pertiga dari total global, yaitu India, Indonesia, Tiongkok, Filipina, Pakistan, Nigeria, Bangladesh, dan Republik Demokratik Kongo (WHO, 2021).



Gambar 1.1. Peta Penyebaran TB di Indonesia (TBC Indonesia, 2023).

Indonesia adalah negara kedua dengan kasus TB terbanyak secara global dengan estimasi 969.000 kasus per Februari 2023 (Gambar 1.1) dengan jumlah penduduk ± 270 juta jiwa (TBC Indonesia, 2023). Adapun Provinsi Sulawesi Selatan yang terletak di sebelah selatan dari pulau Sulawesi menjadi salah satu penyumbang angka TB yang cukup besar dengan estimasi 12.203 kasus TBC. Berdasarkan data dari Yayasan KNCV Indonesia secara lebih spesifik pula menunjukkan bahwa daerah dengan kontribusi terbanyak berasal dari Kota Makassar, yaitu sebanyak 3.254 kasus TBC (27%), dimana 110 diantaranya merupakan kasus TBC-RO (Resisten Obat) (Yayasan KNCV Indonesia, 2023).

Tingginya persentasi kasus TB tersebut memiliki keterkaitan erat dengan sifat bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang menjadi penyebab utama penyakit ini. *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) merupakan bakteri aerob intraseluler yang dapat menyebar melalui aerosol yang dihasilkan oleh seseorang yang terinfeksi saat batuk atau bersin. Setelah memasuki tubuh inang melalui sistem pernapasan, Mtb dikelilingi oleh makrofag alveolar, sel dendritik, neutrofil, atau sel epitel (Karbalaie Zadeh Babaki et al., 2017). *Mycobacterium tuberculosis* memproduksi protein tertentu guna bertahan hidup, terhubung dengan inang selama infeksi, mengendalikan lingkungan intraseluler, dan memicu respons imun yang bersifat patogenik maupun pelindung. Para ilmuwan sebelumnya melaporkan bahwa titer antibodi terhadap enam dari 23 jenis antigen Mtb berikut, yaitu kompleks antigen 85 (Ag85), ESAT6, CFP10, MDP1, Acr, dan Dos-S, terlihat tinggi pada individu yang pernah mengalami TB (Maekura et al., 2019).

Kompleks antigen 85 (Ag85) yang terdiri dari Ag85A, Ag85B, dan Ag85C, yang terlibat dalam patogenesis tuberkulosis, menunjukkan aktivitas enzim mycolyltransferase dan berperan dalam sintesis dinding sel mycobacteria dan berkontribusi pada penempelan, invasi, dan penyebaran mycobacteria di dalam sel inang. Aktivitas enzim mycolyl transferase dari kompleks antigen 85 sangat penting untuk jalur asam mikolik menuju arabinogalaktan dalam dinding sel dan diperlukan untuk biogenesis trehalose-dimycolate (Fihiruddin et al., 2020a). Kompleks Ag85 juga menginduksi respons imun tipe Th1 dan membantu dalam pengendalian infeksi intraseluler (Mertaniasih et al., 2016). Kompleks Ag85 diekspresikan oleh 3 gen yang berbeda dalam genom mycobacterial, yaitu *fbpA*, *fbpB*, dan *fbpC*. Disisi lain, selain pada pasien tuberkulosis, kompleks Antigen 85 ditemukan pula merupakan penyebab utama dari respons imun humoral dan seluler pada pasien lepra (Dayal et al., 2018).

Berdasarkan aktivitas enzimatik dari kompleks Ag85 dan perannya yang sangat penting dalam pembentukan dinding sel bakteri, Ag85A, Ag85B, dan Ag85C diidentifikasi sebagai target potensial dalam pengobatan tuberkulosis. Penelitian sebelumnya melaporkan penemuan inhibitor potensial terhadap ketiga enzim Antigen 85, membentuk kompleks kovalen yang stabil dengan enzim Ag85. Meskipun demikian, keanekaragaman genetik pada variasi sekuens dapat menjadi faktor yang signifikan yang memengaruhi respon imun. Penelitian menunjukkan bahwa polimorfisme dalam variasi sekuens dapat menyebabkan perubahan dalam struktur dan fungsi protein, menjadikannya sebagai varian antigenik yang mampu menghindari respon imun (Mertaniasih et al., 2016). Pengetahuan terkait variasi sekuens, termasuk mutasi kecil, insersi, atau delesi, sangat

mendukung pemahaman lebih mendalam tentang keragaman genetik pada Ag85 kompleks (Rohit et al., 2016). Oleh karena itu, penelitian ini memiliki tujuan untuk melakukan studi variasi sekuens DNA Ag85 kompleks dari isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* dengan mengintegrasikan metode sekuensing dan analisis bioformatika. Hal ini diharapkan dapat memberikan informasi terbaru terkait variasi sekuens Ag85 kompleks sebagai kandidat target pengobatan terhadap tuberkulosis.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disampaikan, maka dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat variasi sekuens DNA Ag85 Kompleks dari isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* di Sulawesi Selatan, Indonesia?
2. Apakah variasi sekuens tersebut juga terdapat pada sekuens strain/lineage yang lain dan apakah berpengaruh terhadap tingkat kekerabatan/filogenetik ?
3. Apakah variasi sekuens DNA Ag85 Kompleks tersebut akan berpengaruh pada urutan asam amino?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

a. Tujuan Umum

Untuk mengetahui variasi sekuens DNA Ag85 Kompleks dari isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* di Sulawesi Selatan, Indonesia

b. Tujuan Khusus

1. Mengidentifikasi variasi sekuens DNA Ag85 Kompleks dari isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* di Sulawesi Selatan, Indonesia.
2. Mengidentifikasi keberadaan variasi sekuens DNA Ag85 Kompleks pada strain/lineage yang lain dan hubungannya terhadap tingkat kekerabatan/filogenetik.
3. Menganalisis pengaruh variasi sekuens DNA Ag85 Kompleks terhadap urutan asam amino.

c. Manfaat Penelitian

1. Bidang Akademik

Menyumbangkan data baru mengenai variasi sekuens DNA Ag85 Kompleks pada isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis*.

2. Bidang Klinik

Memberikan dasar pengetahuan yang lebih kuat untuk pengembangan pengobatan TB yang lebih efektif dan adaptif

terhadap variasi genetik *Mycobacterium tuberculosis* di wilayah tersebut.

3. Masyarakat

Memberikan informasi mengenai variasi genetik pada Ag85 kompleks dapat digunakan untuk pemantauan dan pengendalian penyebaran penyakit tuberkulosis