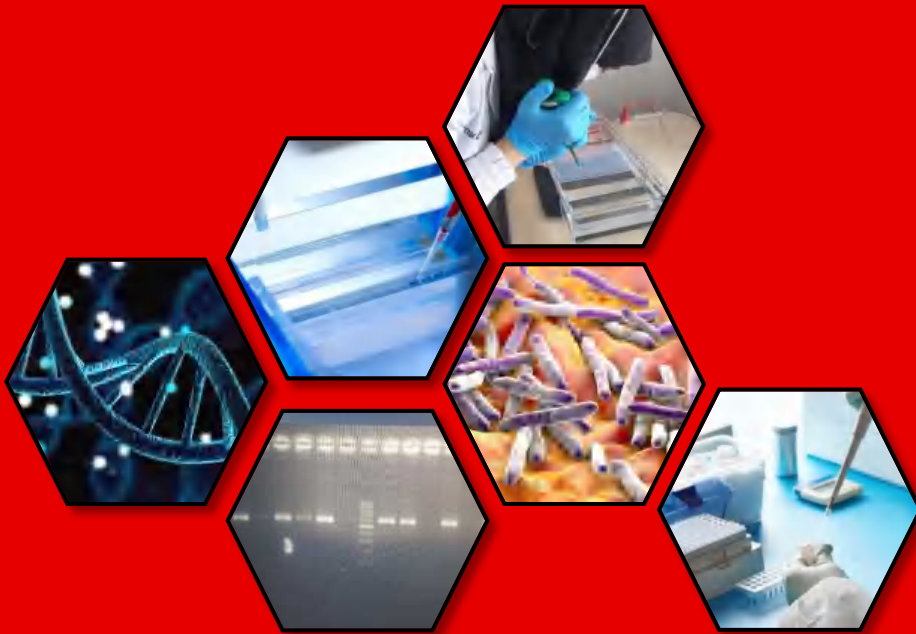


**POLIMORFISME GEN PENGKODE RESUSCITATION PROMOTING  
FACTOR (Rpf)-D PADA ISOLAT LOKAL *Mycobacterium tuberculosis*  
DI SULAWESI SELATAN**



**NUR FITRAH AMELIA  
H041 19 1051**



**Optimization Software:  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FACULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
ILMIAH MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**POLIMORFISME GEN PENGKODE RESUSCITATION PROMOTING  
FACTOR (Rpf)-D PADA ISOLAT LOKAL *Mycobacterium tuberculosis*  
DI SULAWESI SELATAN**

**NUR FITRAH AMELIA  
H041 19 1051**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
& MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**POLIMORFISME GEN PENGKODE RESUSCITATION PROMOTING  
FACTOR (Rpf)-D PADA ISOLAT LOKAL *Mycobacterium tuberculosis*  
DI SULAWESI SELATAN**

NUR FITRAH AMELIA  
H041 19 1051

Skripsi

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Biologi

pada




**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
& MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**SKRIPSI****POLIMORFISME GEN PENGKODE RESUSCITATION PROMOTING  
FACTOR (Rpf)-D PADA ISOLAT LOKAL *Mycobacterium tuberculosis*  
DI SULAWESI SELATAN****NUR FITRAH AMELIA****H041 19 1051**

Skripsi,

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada "13 Mei 2024"  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

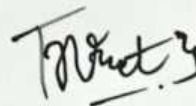


Program Studi Biologi  
Departemen Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pertama,



Dr. Rosana Agus, M. Si.  
NIP. 196509051991032003

Nihayatul Karimah, M.Sc., Apt.  
NIP. 199008012019022003



Optimization Software:  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

Mengetahui:  
Ketua Program Studi  


Dr. Magdalena Litaay, M. Sc.  
NIP. 196409291989032002

## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Polimorfisme Gen Pengkode Resuscitation Promoting Factor (Rpf)-D pada Isolat Lokal *Mycobacterium tuberculosis* di Sulawesi Selatan" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Rosana Agus, M.Si. sebagai Pembimbing Utama dan Nihayatul Karimah, M.Sc., Apt sebagai Pembimbing Pertama). 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 skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan skripsi 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 skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 13 Mei 2024



Nur Fitrah Amelia  
H041 19 1051



Optimization Software:  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## UCAPAN TERIMA KASIH

*Bismillahirrahmanirrahim*

Segala puji dan puja syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT. atas segala limpahan rahmat, taufik, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Salam dan shalawat senantiasa tercurahkan kepada Rasulullah SAW. yang menjadi sumber inspirasi dan teladan terbaik bagi umat manusia. Skripsi yang telah disusun dengan judul “Polimorfisme Gen Pengkode Resuscitation Promoting Factor (Rpf)-D pada Isolat Lokal *Mycobacterium tuberculosis* di Sulawesi Selatan” merupakan karya resmi pertama penulis sehingga apabila terdapat kekurangan ataupun kesalahan di dalamnya mohon untuk dimaklumi. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Dalam penyusunan skripsi ini, tentunya tidak lepas dari bimbingan serta saran dan kritik yang membangun dari kedua pembimbing Ibu Dr. Rosana Agus, M.Si. dan Ibu Nihayatul Karimah, M.Sc., Apt. serta Ibu penguji yakni Bapak Dr. Eddyman W. Ferial, S.Si.,M.Si dan Ibu Mustika Tuwo, S.Si.,M.Sc. Terima kasih atas ilmu dan pengetahuan serta waktu yang telah diberikan dalam penyusunan skripsi ini. Selain itu, tersusunnya skripsi ini juga berkat doa dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan kali ini penulis ingin mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

Selain itu, tersusunnya skripsi ini juga berkat doa dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan kali ini penulis ingin mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. selaku Rektor Universitas Hasanuddin.
2. Bapak Dr. Eng. Amiruddin, M.Si. selaku Dekan Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin dan kepada seluruh staf yang telah membantu penulis dalam urusan akademik maupun administrasi.
3. Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. selaku Ketua Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin yang telah memberi saran, ilmu, dan dukungan kepada penulis dari awal hingga akhir perkuliahan.
4. Bapak/Ibu dosen, staf, dan laboran Departemen Biologi FMIPA Unhas yang telah memberikan ilmu, keterampilan, dan pengalaman kepada penulis.
5. Bapak Dr. Eddyman W. Ferial, S.Si., M.Si selaku pembimbing Akademik yang senantiasa memberikan saran-saran yang diberikan kepada penulis dan senantiasa memberikan bimbingan akademik dari awal perkuliahan hingga akhir studi.
6. Bapak Prof. dr. Nasrum Massi, Ph.D. yang telah medampingi penulis selama melakukan penelitian juga memberikan saran dan dukungan kepada penulis.
7. Tim riset dari Pusat Riset Vaksin dan Obat (PRVO) Organisasi Riset Kesehatan (ORK) Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Republik Indonesia, yakni ibu Nihayatul Karimah, M.Sc., Apt. dan Dr. dr. Najdah Hidayah selaku pembimbing yang telah banyak membantu selama proses penelitian.
8. Para staf dan pegawai Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Hasanuddin (LPPM Unhas) yang telah memberi dukungan kepada



Optimization Software:  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

pegawai *Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC)* dan Universitas Hasanuddin, terkhusus kepada Kakak Marina Binti selaku pembimbing selama proses penelitian yang telah dengan sabar membantu penulis selama melakukan penelitian.

pegawai *Laboratorium Animal, Zoonotic, and Emerging Deseases* Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, khususnya bapak dr. Isra Wahid,

Ph.D. selaku kepala laboratorium yang telah memfasilitasi penulis selama melakukan penelitian.

11. Teman-teman peneliti, Muhammad Farid, Israini Wiyulanda Iskandar, Sadiya, dan Ummi Chaera yang telah bersama-sama saling memberi dukungan selama melakukan penelitian hingga penyelesaian skripsi ini.
12. Teman-teman sesama peneliti di bidang yang sama, Noer Zakiah Derajat Sam, Raffi Gani, dan Firazh Ahmadilla Ma'ga yang memberikan motivasi dan senantiasa saling tolong-menolong di setiap permasalahan terkait penyelesaian tugas akhir ini.
13. Teman-teman karib penulis yakni Nurul Amalia Saleh dan Azizah Isfah yang telah membantu dan mendukung serta berbagi kebahagiaan dan kesedihan bersama penulis selama masa perkuliahan.
14. Teman-teman Biologi Unhas 2019 yang telah bersama-sama dalam suka duka berjuang bersama di lingkup akademik dan organisasi.
15. Teman-teman KKNT PUPR Maros terkhusus teman-teman Posko Desa Majannang yang terus memberikan dukungan kepada penulis selama penyusunan skripsi.

Ucapan terimakasih tiada akhir penulis persembahkan untuk kedua orangtua penulis Bapak Kamil dan Ibu Sitti Nurmiati yang hari-harinya senantiasa selalu mendoakan yang terbaik untuk penulis serta mengingatkan akan pentingnya pendidikan yang membuat penulis dapat bertahan selama masa perkuliahan. Selain itu, ucapan terimakasih juga penulis haturkan kepada saudara-saudari penulis yakni Nurul Auliyah Annisa, Nurfaidah Kamil, dan Muhammad Adib Pratama yang menjadi harapan bagi penulis untuk selalu mengutamakan Pendidikan, serta memberikan dukungan dan doa.

Akhirnya, penulis berharap karya ini dapat memberikan manfaat kepada rekan-rekan mahasiswa, para peneliti, dan masyarakat demi kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi.

*Walaikumsalam Warahmatullahi Wabarakatuh.*

Makassar, Februari 2024

Nur Fitrah Amelia



## ABSTRAK

**Nur Fitrah Amelia. 2024.** Polimorfisme Gen Pengkode Resuscitation Promoting Factor (Rpf)-D pada Isolat Lokal *Mycobacterium tuberculosis* di Sulawesi Selatan.

Tuberkulosis (TB) merupakan suatu penyakit yang diakibatkan oleh adanya bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Pencegahan melalui vaksinasi merupakan suatu cara untuk melindungi diri dari bakteri ini. Salah satu antigen yang dianggap berpotensi sebagai kandidat vaksin yaitu *Resuscitation promoting factors* (Rpf)-D berperan dalam reaktivasi *M. tuberculosis* dari keadaan laten menjadi aktif. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan studi polimorfisme terhadap gen pengkode Rpf-D *Mycobacterium tuberculosis* pada isolat lokal di Sulawesi Selatan yang hasilnya dapat dijadikan sebagai informasi dasar dalam pengembangan kandidat vaksin TB. Penelitian ini dilaksanakan di Unit Tuberkulosis *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada bulan Juli-September 2023 dengan jumlah sampel sebanyak 15 isolat TB Sensitif Obat, 10 isolat TB Resisten Rifampicin, dan 10 isolat *Multi Drug Resistance Tuberculosis* (MDR-TB). Studi polimorfisme dilakukan dengan metode *Sanger Sequencing* yang kemudian dianalisis dengan aplikasi BioEdit dan fitur BLAST pada laman NCBI. Hasil penelitian menunjukkan nilai *identity* mencapai 99% hingga 100% dengan *E-value* bernilai 0,0. Serta, berdasarkan hasil *Multiple Sequence Alignment* menunjukkan kecocokan sekuens gen antara ke-24 sampel dengan data sekuens gen Rpf-D dari NCBI. Penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat nilai kesesuaian yang tinggi antara gen Rpf-D sampel dengan gen Rpf-D pada GenBank. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa polimorfisme yang terjadi tidak signifikan pada gen Rpf-D pada sampel bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dari isolat lokal di Sulawesi Selatan.

**Kata kunci:** Tuberkulosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Gen Rpf-D, Polimorfisme, Mutasi, Sekuensing.





## ABSTRACT

**Nur Fitrah Amelia. 2024.** Polymorphism of The Gene Encoding Resuscitation Promoting Factor (Rpf)-D on Local Isolates *Mycobacterium tuberculosis* at South Sulawesi.

Tuberculosis (TB) is a disease caused by the bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Prevention through vaccination is a way to protect oneself from these bacteria. One of the antigens considered to have potential as a vaccine candidate, namely Resuscitation promoting factors (Rpf)-D, plays a role in the reactivation of *M. tuberculosis* from a latent to an active state. This research aims to conduct a polymorphism study of the *Mycobacterium tuberculosis* Rpf-D coding gene in local isolates in South Sulawesi, the results of which can be used as basic information in developing TB vaccine candidates. This research was carried out at the Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC) Tuberculosis Unit, Faculty of Medicine, Hasanuddin University in July-September 2023 with a total sample of 15 Drug Sensitive TB isolates, 10 Rifampicin Resistant TB isolates, and 10 Multi Drug Resistance Tuberculosis isolates (MDR-TB). The polymorphism study was carried out using the Sanger Sequencing method which was then analyzed using the BioEdit application and the BLAST feature on the NCBI website. The results of the research show that the identity value reaches 99% to 100% with an E-value of 0,0. Also, based on the Multiple Sequence Alignment results, it shows that the gene sequences match the 24 samples with the Rpf-D gene sequence data from NCBI. This research shows that there is a high concordance value between the sample Rpf-D gene and the Rpf-D gene in GenBank. Therefore, it can be concluded that the polymorphism that occurred was not significant in the Rpf-D gene in samples of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria from local isolates in South Sulawesi.

**Key words:** Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Rpf-D gene, Polymorphism, Mutation, Sequencing.



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGANTAR.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH .....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	2
1.3 Manfaat Penelitian .....	2
BAB II METODE PENELITIAN .....	3
2.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	3
2.2 Alat dan Bahan .....	3
2.2.1 Alat .....	3
2.2.2 Bahan.....	3
2.3 Metode Kerja .....	3
2.3.1 Kriteria Sampel.....	3
2.3.2 Preparasi Sampel.....	4
2.3.2 Ekstraksi DNA .....	4
2.3.4 Amplifikasi Gen.....	5
2.3.5 Elektroforesis.....	5
2.3.6 Sekuensing.....	6
2.3.7 Analisis Data.....	6
DISKUSI DAN PEMBAHASAN .....	7
.....	7
Rpf-D dengan <i>Polymerase Chain Reaction</i> .....	8
n Rpf-D dengan Metode Sanger .....	12



BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN ..... 26

    4.1 Kesimpulan..... 26

    4.2 Saran..... 26

DAFTAR PUSTAKA ..... 27

LAMPIRAN ..... 30



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Hasil Sekuensing Sampel <i>Forward Sequence</i> .....	12
2. Hasil Sekuensing Sampel <i>Reverse Sequence</i> .....	16
3. Data Hasil Analisis Nilai Kesamaan (Homologi).....	24



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Hasil Ekstraksi Menggunakan <i>gSYNC DNA Extraction Kit</i> .....	8
2. Hasil BLAST Primer <i>forward</i> Gen Rpf-D .....	8
3. Hasil BLAST Primer <i>reverse</i> Gen Rpf-D .....	9
4. Hasil Visualisasi Elektroforesis Gen Rpf-D pada Isolat Tuberkulosis Sensitif Obat (TB SO) .....	10
5. Hasil Visualisasi Elektroforesis Gen Rpf-D pada Isolat Resisten Rifampicin (TB RR) .....	10
6. Hasil Visualisasi Elektroforesis Gen Rpf-D pada Isolat <i>Multi Drug Resistance Tuberculosis</i> (MDR TB) .....	11
7. Visualisasi Hasil <i>Alignment</i> antara Sampel Isolat Tuberkulosis dengan Data Gen Rpf-D dari NCBI dengan BioEdit .....	21



**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Gen Pengkode Rpf-D pada <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv .....	30
2. Skema Kerja.....	31
3. Hasil Analisis BLAST.....	36
4. Komposisi Bahan .....	48
5. Posisi Primer Rpf-D pada Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv .....	50
6. Dokumentasi Penelitian.....	51



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan suatu penyakit yang diakibatkan oleh adanya bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Penyakit Tuberkulosis dapat menyerang berbagai organ tubuh, namun yang paling sering terkena adalah paru-paru. Jika penyakit TBC paru tidak diobati atau pengobatan tidak dilakukan secara teratur, maka dapat membahayakan kesehatan penderita dan bahkan menyebabkan komplikasi dan kematian (Infodatin, 2016). Menurut Patricia *et.al.*, (2020) bahwa tuberkulosis menjadi salah satu penyakit yang paling mengkhawatirkan masyarakat karena menjadi penyebab kematian ketiga terbesar setelah penyakit kardiovaskular dan saluran pernapasan.

Penyebaran kuman *Mycobacterium tuberculosis* yang menjadi penyebab penyakit TBC paru terjadi melalui droplet nuclei. Hal ini terjadi ketika kuman menyebar melalui udara dalam percikan dahak pasien (Kemenkes, 2014). Menurut Widayanti (2013), pada waktu penderita batuk, butir-butir air ludah beterbangan di udara kemudian terhisap oleh orang yang sehat dan masuk ke dalam parunya. Hal tersebut merupakan salah satu penyebab penyakit tuberkulosis paru mudah tersebar. Menurut WHO lebih dari sepertiga populasi di dunia yang telah terinfeksi oleh bakteri ini dan menyebabkan kematian 1,3 juta orang per tahunnya (Pratama, 2020).

Pencegahan melalui imunisasi atau vaksinasi merupakan suatu cara untuk meningkatkan daya tahan tubuh manusia, sehingga dapat melindungi diri terhadap penyakit atau bakteri dari luar. Salah satu vaksin TB adalah vaksin Bacillus Calmette-Guerin (BCG) yang telah dilemahkan berasal dari strain *Mycobacterium bovis*, yang telah menjadi wajib di 64 negara dan direkomendasikan di beberapa negara lainnya (George *et. al.*, 2005).

Indonesia telah menerapkan vaksin BCG sejak tahun 1973, dan saat ini diketahui bahwa vaksin BCG setidaknya dapat mencegah tuberkulosis paru akut pada anak, tuberkulosis milier yang menyebar ke seluruh tubuh, dan meningitis tuberkulosis yang menyerang otak. Menurut Rosandali *et.al.*, (2016) menyatakan bahwa vaksin BCG yang diberikan kepada bayi tidak memberikan perlindungan terhadap tuberkulosis pada karena efek perlindungan dari vaksin BCG yang diberikan kepada 10 tahun. Oleh karena itu, ada kebutuhan mendesak untuk vaksin yang lebih efektif melawan *tuberculosis*, sehingga vaksin TB perlu dikembangkan.



*Resuscitation promoting factors* (Rpf) merupakan salah satu antigen yang dianggap berpotensi sebagai kandidat vaksin dan salah satu jenis protein Rpf yang berpotensi yaitu Rpf-D. Rpf-D adalah protein dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*, yang diekspresikan setelah reaktivasi Mtb dari keadaan laten menjadi aktif. Protein Rpf-D dalam jumlah kecil dapat merangsang pertumbuhan bakteri dan berperan sebagai faktor pertumbuhan. Namun saat ini, data dan publikasi tentang poliformisme gen ini pada populasi *Mycobacterium tuberculosis* di Indonesia masih terbatas (Romano, *et. al.*, 2012). Oleh karena itu, penelitian ini diperlukan untuk memberikan informasi tentang polimorfisme pada gen Rpf-D, yang dapat digunakan sebagai dasar pertimbangan dalam merancang vaksin TB yang efektif.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan studi polimorfisme gen pengkode *Resuscitation promoting factor* (Rpf)-D *Mycobacterium tuberculosis* pada isolat lokal di Sulawesi Selatan.

## 1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah diperolehnya informasi mengenai data polimorfisme dalam bentuk sekuens gen pengkode *Resuscitation Promoting Factor* (Rpf)-D yang berasal dari isolat lokal di Sulawesi Selatan.





## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### 2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-September 2023 di Laboratorium *Tuberculosis* (TB) *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC), Universitas Hasanuddin

#### 2.2 Alat dan Bahan

##### 2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah DNA thermal cycler, sentrifuse, vortex, shaker, microwave, waterbath, pendingin, inkubator, gel documentation, power supply, tabung vial PCR, tabung eppendorf, collection tube, GS column, object glass, pipet pasteur, timbangan analitik, mikropipet, mikrotip, erlenmeyer, gelas kimia, dan gelas ukur.

##### 2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat *Mycobacterium tuberculosis*, primer forward dan reverse, media Löwenstein-Jensen (LJ), gel agarosa, loading dye, enzim proteinase K, *elution buffer*, *GSB buffer*, etanol pekat, *W1 buffer*, TBE (Tris/Borate/EDTA) *buffer*, *washing buffer*, ddH<sub>2</sub>O, *MyTaq Red Mix*, Ethium Bromida, *Gene Ruler* (DNA Ladder), ddNTPs, dan akuades.

#### 2.3 Metode Kerja

##### 2.3.1 Kriteria Sampel

Sampel yang digunakan diperoleh dari stok kultur Laboratorium *Tuberculosis* (TB) *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC). Sampel tersebut dipilih diantaranya 10 isolat TB RR (*Tuberculosis Resistant Rifampicin*), 10 isolat MDR TB (*Multi Drug Resistant Tuberculosis*), dan 15 isolat TB *Sensitive* (tidak resisten obat). Adapun kriteria sampel berdasarkan panduan Kementerian Kesehatan adalah sebagai berikut:



Resistan Rifampicin (TB RR): Pasien TB gagal pengobatan kategori 1 (gagal pengobatan kategori 1) dengan atau tanpa resisten OAT lainnya.

*Drug Resistant Tuberculosis* (MDR TB):

Pasien TB gagal dan tidak konversi pengobatan kategori 1 (pengobatan kategori 1) dengan rifampicin, isoniazid, pirazinamide, etambutol) yakni pasien TB

dengan hasil pemeriksaan dahak tetap positif setelah pengobatan tahap awal.

- b. Terduga TB yang pernah memiliki riwayat atau masih kontak erat dengan pasien TB RO.
  - c. Pasien TB yang pernah dinyatakan sembuh atau pengobatan lengkap dan saat ini diagnosis TB berdasarkan hasil pemeriksaan bakteriologis atau klinis.
  - d. Pasien TB yang pernah diobati dan dinyatakan putus berobat selama 2 bulan berturut-turut atau lebih.
3. Pasien TB Sensitif Obat (TB SO): Pasien TB yang dapat disembuhkan dengan pengobatan kategori 1.

### 2.3.2 Preparasi Sampel

Stok kultur sampel MTB dipindahkan ke larutan buffer PBS yang sebelumnya ditanam dalam medium Lowenstein-Jensen. Sampel kemudian disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk dilakukan isolasi DNA.

### 2.3.3 Ekstraksi DNA

Kultur *Mycobacterium tuberculosis* kemudian diisolasi. Isolasi DNA dilakukan menggunakan *gSYNC DNA Extraction kit*. Sampel sebanyak 200  $\mu\text{l}$  diambil dan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf. Kemudian, sampel dipanaskan di dalam waterbath selama  $\pm 2$  jam pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$ . Setelah itu, sebanyak 200  $\mu\text{l}$  sampel diambil dan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf. Reagen berupa enzim proteinase K sebanyak 20  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke dalam tabung eppendorf, kemudian homogenkan selama 10 detik dan diinkubasi pada waterbath selama 5 menit pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ . Setelah diinkubasi, sebanyak 200  $\mu\text{l}$  GSB buffer ditambahkan ke dalam sampel, lalu homogenkan menggunakan dan diinkubasi kembali pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  Elution buffer disiapkan dengan cara diinkubasi pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ . Setelah sampel diinkubasi, etanol pekat sebanyak 200  $\mu\text{l}$  ditambahkan, kemudian homogenkan selama 10 detik. Sampel kemudian dipindahkan ke dalam collection tube melalui GD column dan disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 13000 rpm. Setelah itu, bagian natannya

engotornya dibuang dan ditambahkan wash buffer sebanyak 600  $\mu\text{l}$ . Sampel kemudian disentrifugasi kembali selama 3 menit untuk pengeringan. Sampel kemudian ditambahkan kembali ke tabung eppendorf melalui GS column dan sebanyak 200  $\mu\text{l}$  elution buffer ditambahkan yang sudah dipanaskan sebelumnya. Kemudian

