

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

MUHAMMAD FARID

H041 19 1002



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

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

SKRIPSI

*Diajukan sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin*



MUHAMMAD FARID

H041 19 1002

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

2023

LEMBAR PENGESAHAN

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

Disusun dan diajukan oleh:

MUHAMMAD FARID

H041 19 1002

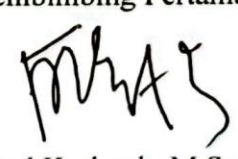
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
pada tanggal 20 November 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama


Dr. Rosana Agus, M.Si
NIP. 196509051991032003

Pembimbing Pertama


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

Ketua Program Studi,


Dr. Magdalena Litaay, M.Sc
NIP. 196409291989032002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini;

Nama : Muhammad Farid
NIM : H041191002
Program Studi : Biologi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul:

Polimorfisme Gen Pengkode Resuscitation promoting factor (Rpf)-B pada Isolat Lokal *Mycobacterium tuberculosis* di Sulawesi Selatan

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 20 November 2023

Yang menyatakan



Muhammad Farid

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Segala puji dan puja syukur penulis panjatkan kehadiran 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)-B 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 disusun untuk memenuhi tugas akhir perkuliahan dan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana pada Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari dalam penyelesaian skripsi ini banyak pihak yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian hingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan. Ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada kedua orang tua penulis Bapak Abdullah, S.E., M.Si. dan Ibu Devi Yunita, A.Md. yang senantiasa selalu mendidik dan mendoakan yang terbaik untuk penulis sehingga dapat bertahan selama masa perkuliahan. Skripsi ini juga tentunya tidak lepas dari bimbingan serta saran dan kritik yang membangun dari kedua pembimbing yakni ibu Dr. Rosana Agus, M.Si. dan ibu Nihayatul Karimah, M.Sc., Apt. serta Ibu penguji yakni Ibu Dr. Eva Johannes, M.Si. dan Ibu Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si.

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. Ibu Dr. Eva Johannes, 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 penulis.
9. Para staf dan pegawai *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, khususnya bapak Riyan Sukma, S.Si. selaku pembimbing selama proses penelitian yang telah dengan sabar mendampingi penulis selama melakukan penelitian.
10. Para staf dan pegawai *Laboratorium Animal, Zoonotic, and Emerging Diseases* Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, khususnya bapak dr. Isra Wahid, Ph.D. selaku kepala laboratorium yang telah memfasilitasi penulis selama melakukan penelitian.
11. Teman-teman peneliti, Nur Fitrah Amelia, 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, Firazh Ahmadilla Ma'ga, dan Nur Fitrah Amelia yang memberikan motivasi dan senantiasa saling tolong-menolong di setiap permasalahan terkait penyelesaian tugas akhir ini.
13. Teman-teman karib penulis yakni Abdul Hayat, Raffi Gani, Firazh Ahmadilla, Sulfikar, Zulfiqar Lukman, Muh. Alfarabi Fadhil, Henra, Yusuf Hamonangan Nainggolan, dan Muhammad Fadhil Banjar 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 KM FMIPA Unhas dan Himbio FMIPA Unhas yang telah menjadi tempat pengembangan diri.
16. Teman-teman program Pertukaran Mahasiswa Merdeka 2 (PMM 2) MBKM di Universitas Gadjah Mada yang terus memberikan dukungan kepada penulis selama penyusunan skripsi.

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, 20 November 2023

Muhammad Farid

ABSTRAK

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit penular yang menyerang pernapasan dan disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri ini telah banyak bermutasi sehingga resisten terhadap sejumlah vaksin dan pengobatan TB saat ini, hal ini mendorong para peneliti untuk meneliti dan mengembangkan vaksin terbaru. Salah satu kandidat vaksin yang potensial adalah gen pengkode *Resuscitation promoting factor* (Rpf)-B yang berperan dalam resusitasi bakteri *M. tuberculosis* dari fase dorman (TB Laten) menjadi TB Aktif. Oleh karena itu, dilakukan penelitian ini yang bertujuan untuk melakukan studi polimorfisme terhadap gen pengkode Rpf-B *Mycobacterium tuberculosis* pada isolat lokal di Sulawesi Selatan yang hasilnya dapat dijadikan sebagai informasi dasar dalam pengembangan kandidat vaksin TB. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-September 2023 di Unit Tuberkulosis *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dengan jumlah sampel sebanyak 10 isolat TB Resistensi Rifampisin, 10 isolat *Multi Drug Resistance Tuberculosis* (MDR-TB), dan 15 isolat TB Sensitif Obat. Studi polimorfisme dilakukan dengan metode *Sanger Sequencing* yang 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 Selain itu, berdasarkan hasil *Multiple Sequence Alignment* dapat dilihat kecocokan sekuens gen antara ke-15 sampel yang disekuensing dengan data sekuens kontrol dari NCBI gen Rpf-B. Penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat nilai homologi yang tinggi pada sampel.

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

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that attacks the respiratory tract and is caused by Mycobacterium tuberculosis bacteria. This bacteria has mutated so much that it is resistant to a number of current TB vaccines and treatments, this has encouraged researchers to research and develop the latest vaccine. One potential vaccine candidate is the gene encoding Resuscitation Promoting Factor (Rpf)-B which plays a role in resuscitating M. tuberculosis bacteria from the dormant phase (Latent TB) to Active TB. Therefore, this research was carried out with the aim of conducting a polymorphism study of the Mycobacterium tuberculosis Rpf-B coding gene in local isolates in South Sulawesi, the results of which can be used as basic information for the development of a TB vaccine candidate. This research was carried out in July-September 2023 at the Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC) Tuberculosis Unit, Faculty of Medicine, Hasanuddin University with a number of samples of 10 Rifampicin Resistant TB isolates, 10 Multi Drug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) isolates, and 15 Sensitive TB Drug isolate. Polymorphism studies were carried out using the Sanger Sequencing method which is explained using the BioEdit application and the BLAST feature on the NCBI page. The research results show that the identity value reaches 99% to 100% with an E-value of 0.0. In addition, based on the Multiple Sequence Alignment results, it can be seen that the gene sequence matches between the 15 samples sequenced and the control sequence data from the NCBI Rpf-B gene. This research shows that there is a high homology value in the sample.

Keywords: Tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, Rpf-B Gene, Polymorphism, Mutation, Sequencing.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGANTAR.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan Penelitian	3
I.3 Manfaat Penelitian	3
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
II.2 Patogenitas <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
II.3 Mekanisme Resistensi pada <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
II.4 <i>Resuscitation Promoting Factor</i> (Rpf)	12
II.5 Polimorfisme.....	13
II.6 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	15
II.7 Sekuensing.....	17
BAB III METODE PENELITIAN.....	21
III.1 Alat dan Bahan	21
III.1.1 Alat.....	21
III.1.2 Bahan	21
III.2 Prosedur Kerja	21

III.2.1 Kriteria Sampel	21
III.2.2 Preparasi Sampel.....	22
III.2.3 Ekstraksi DNA.....	23
III.2.4 Amplifikasi Gen Rpf-B.....	24
III.2.5 Elektroforesis	24
III.2.6 Sekuensing	25
III.2.7 Analisis Data.....	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
IV.1 Ekstraksi DNA	26
IV.2 Amplifikasi Gen Rpf-B dengan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	27
IV.3 Sekuensing Gen Rpf-B dengan Metode Sanger.....	33
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	47
V.1 Kesimpulan.....	47
V.2 Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN.....	51

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Hasil Sekuensing Sampel <i>Forward Sequence</i>	34
2. Hasil Sekuensing Sampel <i>Reverse Sequence</i>	37
3. Data Hasil Analisis Nilai Kesamaan (Homologi)	44

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pada Citra Mikroskop Elektron	4
2. Peta Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	6
3. Patogenitas <i>M. tuberculosis</i>	7
4. Lokus Gen Rpf-B (Rv1009).....	13
5. <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNPs)	15
6. Skema PCR	16
7. Skema Metode <i>Sanger Sequencing</i>	18
8. Hasil Ekstraksi menggunakan <i>gSYNC DNA Extraction Kit</i>	27
9. Hasil BLAST Primer <i>Forward</i> Gen Rpf-B.....	28
10. Hasil BLAST Primer <i>Reverse</i> Gen Rpf-B.....	28
11. Hasil Visualisasi Elektroforesis Gen Rpf-B pada Isolat Tuberkulosis Resisten Rifampicin (TB RR)	30
12. Hasil Visualisasi Elektroforesis Gen Rpf-B pada Isolat <i>Multi Drug</i> <i>Resistance Tuberculosis</i> (MDR TB)	31
13. Hasil Visualisasi Elektroforesis Gen Rpf-B pada Isolat Tuberkulosis Sensitif Obat (TB SO).....	31
14. Visualisasi Hasil <i>Alignment</i> antara Sampel dengan Data Gen Rpf-B dari NCBI dengan BioEdit	41

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Skema Kerja	51
2. Gen Pengkode Rpf-B pada Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	55
3. Hasil Analisis BLAST	56
4. Komposisi Bahan	71
5. Posisi Primer Rpf-B pada Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	73
6. Dokumentasi Penelitian.....	74

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tuberkulosis atau TB merupakan penyakit yang bersifat menular akibat adanya infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Mtb bersifat aerob obligat sehingga bakteri ini sering kali menyerang paru-paru pada manusia. Hal ini juga dapat disebabkan oleh cara penyebarannya yang ditularkan melalui udara (aerob) maupun percikan pernafasan (*droplet*) oleh orang yang telah terinfeksi sebelumnya. Walau demikian, bakteri TB juga dapat menyerang bagian tubuh lainnya seperti kelenjar getah bening, tulang, pleura, tulang belakang, hingga otak. Mudahnya penyebaran Mtb ini yang menyebabkan banyak orang yang mudah menderita penyakit TBC hingga saat ini (Sahoo *et al.*, 2020). Masalah lain terkait virulensi *M. tuberculosis* adalah kemampuan bermutasi genetik yang dapat berakibat pada resistensi obat (Rakhmawati *et al.*, 2018).

Berdasarkan data statistik WHO (*World Health Organization*) pada tahun 2020 menunjukkan bahwa 10 juta orang di seluruh dunia terinfeksi TB. Dan di tahun 2021 angka penderita TB mengalami peningkatan dengan kasus tercatat sebanyak 10,6 juta orang terinfeksi TB dan 1,3–1,6 juta di antaranya meninggal dunia. Meskipun ketersediaan vaksin selama hampir 100 tahun sudah ada, tingkat infeksi global *Mycobacterium tuberculosis* masih sekitar satu dari tiga orang di seluruh dunia. TB tidak mengenal gender maupun umur, tercatat 6 juta pria maupun 3,4 juta wanita bahkan 1,2 juta anak terinfeksi penyakit ini. Di Indonesia sendiri per

2021, tercatat terdapat 969.000 orang terinfeksi TB (yang sebelumnya 824.000 kasus di 2020) dan 150.000 orang di antaranya meninggal akibat TB (yang sebelumnya 93.000 kasus kematian di 2020) (WHO, 2022). Di provinsi Sulawesi Selatan tercatat 31.022 penderita TB per tahun 2021 (Dinas Kesehatan Sulawesi Selatan, 2021) dan 15.298 kasus di antaranya berasal dari Kota Makassar (Dinas Kesehatan Kota Makassar, 2021). Protokol pencegahan TB sampai saat ini masih menerapkan pemberian vaksin Bacilli Culmette Guerin (BCG).

Vaksin BCG masih menjadi vaksin utama dalam perlindungan dini terhadap infeksi *M. tuberculosis*. Namun langkah tersebut tidak berjalan maksimal, karena vaksin BCG tidak dapat memberikan perlindungan yang optimal untuk mencegah penularan MDR-TB dan kasus TB yang mewabah saat ini. Vaksin BCG hanya efektif mencegah TB milier atau pencegahan meningitis pada anak, tetapi tidak memberikan perlindungan pada orang dewasa dengan TB laten dan reaktivasi (Fihiruddin *et al.*, 2020). Sehingga vaksin TB baru yang lebih efektif sangat perlu untuk dikembangkan.

Salah satu antigen yang diketahui potensial sebagai kandidat vaksin dan telah digunakan dalam desain vaksin TB baru adalah *Resuscitation promoting factors* (Rpf). Rpf merupakan protein dieskpresikan pada fase reaktivasi infeksi laten menjadi aktif. Salah satu jenis protein Rpf yang berpotensi sebagai kandidat vaksin adalah Rpf-B (Rosser *et al.*, 2017). Belum banyak data dan publikasi mengenai polimorfisme gen tersebut pada populasi Mtb di Indonesia hingga saat ini khususnya di Sulawesi Selatan, sehingga diperlukan adanya penelitian ini untuk memberikan informasi mengenai polimorfisme DNA gen pengkode Rpf-B dari pasien penderita TB yang dirawat dan berasal dari Sulawesi Selatan agar dapat digunakan sebagai landasan pertimbangan dalam desain vaksin TB yang sesuai.

I.2 Tujuan Penelitian

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

I.3 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini adalah sebagai bahan informasi mengenai data polimorfisme gen pengkode *Resuscitation promoting factor* (Rpf)-B pada *Mycobacterium tuberculosis* yang bersumber dari isolat lokal di Sulawesi Selatan.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

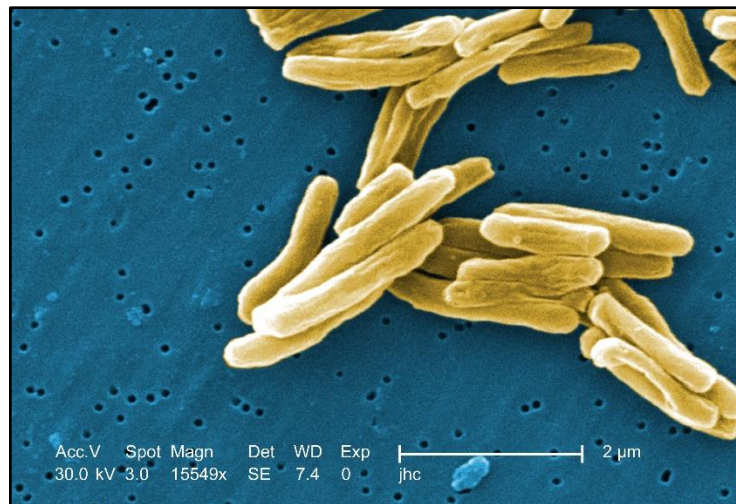
Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-September 2023 di Laboratorium Tuberculosis (TB) *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) merupakan patogen penyebab tuberkulosis. Mtb bersifat parasit intraseluler yang terutama menyerang makrofag dan menghambat apoptosisnya. Hal tersebut bisa menyebabkan infeksi jangka panjang pada manusia, menyebabkan serangkaian perubahan patologis dan manifestasi klinis (Zhai *et al.*, 2019).

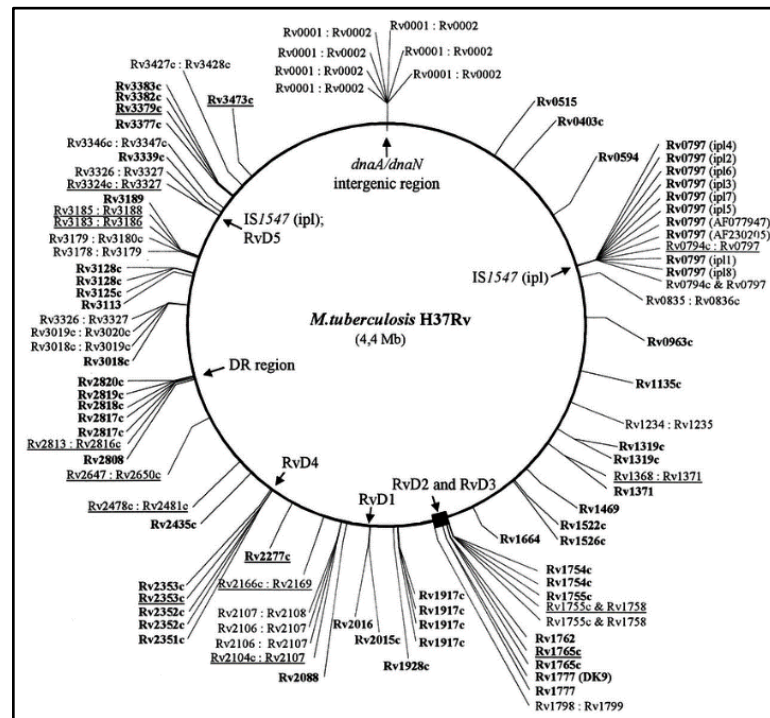


Gambar 1. *Mycobacterium tuberculosis* pada Citra Mikroskop Elektron (Sen, 2014)

Kelompok mikobakteri (*Mycobacterium*) termasuk dalam kelompok bakteri Gram-positif, katalase positif, non-motil, tidak membentuk spora, dan berbentuk basil dengan lebar 0,2-0,6 mm dan panjang 1,0-10 mm. Morfologi koloni mikobakteri dapat bervariasi, beberapa spesies tumbuh sebagai koloni kasar dan ada juga yang tumbuh sebagai koloni halus. Selain itu, warna koloni juga dapat bervariasi mulai dari warna putih hingga jingga atau merah muda.

Salah satu yang menjadikan mikobakteria cukup resisten ialah dinding selnya yang sangat tebal dan terdiri dari empat lapisan. Lapisan terdalam terdiri dari peptidoglikan dan lipid lainnya. Kehadiran lipid ini memberikan bakteri ketahanan terhadap lingkungan asam-basa dan membuat sel relatif kedap terhadap berbagai pewarna dasar, sehingga perlu dikombinasikan dengan fenol untuk memungkinkan penetrasi dinding sel. Komposisi dinding sel membuat mikobakteri hidrofobik sehingga bakteri ini cenderung tumbuh secara agregat yang seperti mengambang di permukaan media cair. Namun pada mikobakteri tertentu, termasuk *Mycobacterium paratuberculosis* (MAP) dapat meluruhkan dinding selnya, kemudian membentuk sferoplas yang tidak terdeteksi menggunakan uji pewarnaan tahan asam. Kebanyakan mikobakteri adalah organisme aerobik meskipun beberapa spesies mikroaerofilik, hal ini yang menyebabkan *Mycobacterium tuberculosis* sering menyerang bagian paru-paru (Percival and Williams, 2014). Adapun klasifikasi dari *Mycobacterium tuberculosis* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Posibacteria
Filum	: Actinobacteria
Subkelas	: Actinobacteridae
Order	: Actinomycetales
Suborder	: Corynebacterineae
Famili	: Mycobacteriaceae
Genus	: <i>Mycobacterium</i>
Spesies	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Zopf) Lehmann and Neumann
Sumber	: <i>Integrated Taxonomic Information System (ITIS) Report</i> , 2012

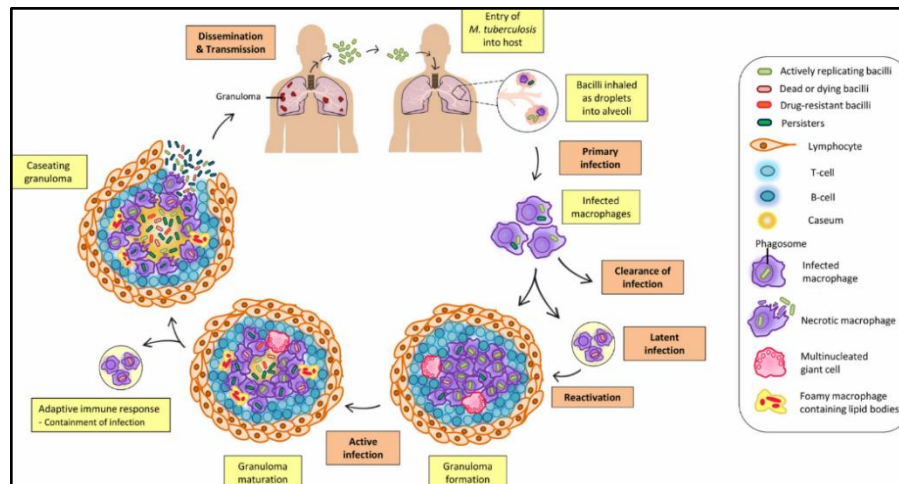


Gambar 2. Peta Genom *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Sampson *et al.*, 2001)

Mycobacterium tuberculosis memiliki karakteristik pertumbuhan yang lambat, dorman, memiliki komponen dinding sel yang kompleks, merupakan organisme intraseluler serta memiliki homogenitas genetik. Genom *Mycobacterium tuberculosis* berukuran sangat besar, yaitu 4,4 Megabasa dan terdiri dari 3920 gen. Genom sendiri merupakan keseluruhan informasi genetika yang dimiliki suatu sel atau organisme, genom berisi keseluruhan asam nukleat yang memuat informasi tersebut. Struktur genom ini diketahui mengalami evolusi dan pengaturan ulang yang bertujuan untuk mempertahankan gen-gen yang bersifat konstitutif (dibutuhkan untuk kelangsungan hidup) serta menghilangkan sejumlah gen yang tidak diperlukan lagi. Diketahui juga bahwa evolusi tersebut juga membuat *Mycobacterium tuberculosis* semakin resisten terhadap antibiotik maupun vaksin saat ini seperti vaksin Bacilli Culmette Guerin (BCG) (Rinanda, 2015).

II.2 Patogenitas *Mycobacterium tuberculosis*

Penurunan kekebalan dapat menyebabkan resusitasi Mtb sebagai respons terhadap gangguan respons imun dan TBC aktif terjadi. Respons imun yang terjadi setelah infeksi Mtb memiliki mekanisme imun yang kompleks. Mtb adalah patogen yang menyebabkan tuberkulosis. Setelah inang (manusia) terinfeksi Mtb, ada kemungkinan 10% bahwa Mtb akan mengembangkan TBC aktif dan bakteri dapat menyerang banyak organ.



Gambar 3. Patogenitas *M. tuberculosis*
(Parbhoo, Sampson and Mouton, 2020)

Individu yang sehat dapat terinfeksi melalui saluran pernapasan, saluran pencernaan, kulit yang rusak dan selaput lendir. Menghirup *droplet* yang mengandung Mtb merupakan rute utama infeksi. Membran sel bakteri kompleks mengandung asam lemak rantai bercabang metil yang melindunginya dari enzim inang dan memungkinkan mereka untuk menghindari dari respons imun. Ada beragam aspek interaksi makrofag-mycobacterium, seperti pengikatan Mtb ke makrofag melalui reseptor permukaan, fusi fagosom-lisosom, pertumbuhan mikobakteri, penghambatan/kerusakan melalui mekanisme radikal bebas (oksigen reaktif dan intermediates nitrogen).

Ketika Mtb memasuki tubuh, mereka dapat memulai serangkaian respons imun dengan berinteraksi dengan makrofag. Reseptor seperti reseptor Toll (TLR) yang berada di makrofag dan interaksi antara Mtb dengan berbagai TLR merupakan komponen pada mikobakteri yang kompleks. Protein TLR8 yang diekspresikan secara langsung dalam makrofag yang dibedakan pada infeksi Mtb; Reseptor seperti NOD, terdiri dari keluarga besar reseptor pengenalan pola intraseluler yang dicirikan oleh adanya NOD yang dikonservasi. Variasi genetik dalam reseptor seperti NOD dikaitkan dengan perkembangan gangguan peradangan; dan reseptor seperti lektin tipe-C juga berperan dalam pengenalan mikobakteri melalui mengatur produksi sitokin yang diinduksi mikobakteri oleh sel-sel seperti sel dendritik. Sehingga, beberapa mekanisme yang menghalangi pematangan dan pengasaman yang biasanya mempresentasikan antigen ke limfosit T untuk melepaskan limfokin yang mengaktifkan makrofag melalui umpan balik positif, meningkatkan pematangan dan pengasamannya dan mempercepat mekanisme untuk membunuh patogen intraseluler dalam lisosom autofag. Oleh karena itu, beberapa mekanisme yang menghalangi pematangan dan pengasaman lisosom tersebut dapat membantu Mtb terbebas dari sistem kekebalan tubuh (Zhai *et al.*, 2019).

II.3 Mekanisme Resistensi pada *Mycobacterium tuberculosis*

Antibiotik merupakan obat yang digunakan untuk mencegah dan mengobati infeksi bakteri. Namun pemberian antibiotik yang terlalu berlebih dapat menyebabkan suatu bakteri menjadi resistensi terhadap antibiotik. Hal ini dapat ditandai dengan bakteri yang berevolusi dan obat yang tidak lagi memberi efek terhadap bakteri patogen. Efek yang ditimbulkan dapat berupa infeksi lebih sulit

disembuhkan dan meningkatkan risiko penyebaran penyakit hingga kematian. Resistensi bakteri mengacu pada kemampuan bakteri untuk menahan atau mentolerir efek antibiotik. Bakteri dapat menjadi resisten karena gen mereka dapat diwariskan dari kerabat atau dapat diperoleh dari plasmid. Proses transfer gen tersebut dapat memungkinkan resistensi antibiotik ditransfer di antara spesies bakteri yang berbeda. Resistensi juga dapat terjadi secara spontan melalui mutasi. Mutasi acak dengan intensitas yang tinggi pada DNA bakteri dan jumlahnya yang sangat banyak dapat menghasilkan berbagai macam perubahan genetik. Melalui mutasi dan seleksi tersebut bakteri dapat mengembangkan mekanisme pertahanan terhadap antibiotik.

Resistensi antibiotik merupakan masalah global yang berkembang di mana antibiotik tidak lagi efektif dalam pengobatan penyakit infeksius. Beberapa tahun ini munculnya bakteri yang resisten terhadap obat telah menimbulkan tantangan kritis terhadap pengobatan penyakit infeksi klinis, yang mengakibatkan peningkatan frekuensi infeksi secara bertahap. Karena potensinya untuk menyebar secara internasional dan pilihan pengobatan yang terbatas, resistensi antibiotik menjadi perhatian utama dalam perawatan kesehatan. Karena antibiotik menjadi kurang efektif, infeksi seperti pneumonia, keracunan darah, gonore, hingga tuberkulosis menjadi lebih sulit ditangani (Chinemerem Nwobodo *et al.*, 2022).

Kasus tuberkulosis (TB) yang resisten terhadap pengobatan antituberkulosis (OAT) semakin meningkat di dunia. Hal ini menjadi ancaman terhadap kontrol TB di dunia. Insiden kasus tuberkulosis resisten obat (TB RO) semakin meningkat tiap tahunnya. Adapun kriteria pasien terduga TB RO berdasarkan panduan

Kementerian Kesehatan (2020) adalah pasien yang mempunyai satu atau lebih kriteria di bawah ini, yaitu:

1. Pasien TB gagal pengobatan Kategori 2: Pasien TB dengan hasil pemeriksaan dahak positif pada bulan ke-5 atau pada akhir pengobatan.
2. Pasien TB yang tidak konversi pengobatan kategori 2: Pasien TB dengan hasil pemeriksaan dahak tetap positif setelah pengobatan tahap awal.
3. Pasien TB yang mempunyai riwayat pengobatan TB yang tidak standar: Pasien TB yang memiliki riwayat pengobatan TB tidak sesuai dengan paduan OAT standar; dan/atau menggunakan kuinolon serta obat injeksi lini kedua paling sedikit selama 1 bulan.
4. Pasien TB gagal pengobatan kategori 1: Pasien TB dengan hasil pemeriksaan dahak positif pada bulan ke-5 atau pada akhir pengobatan.
5. Pasien TB yang tidak konversi pengobatan kategori 1: Pasien TB dengan hasil pemeriksaan dahak tetap positif setelah pengobatan tahap awal.
6. Pasien TB kambuh pengobatan kategori 1 atau kategori 2: Pasien TB yang pernah dinyatakan sembuh atau pengobatan lengkap dan saat ini diagnosis TB berdasarkan hasil pemeriksaan bakteriologis atau klinis.
7. Pasien TB yang kembali setelah putus berobat (*loss to follow-up*): Pasien TB yang pernah diobati dan dinyatakan putus berobat selama 2 bulan berturut-turut atau lebih.
8. Terduga TB yang mempunyai riwayat kontak erat dengan pasien TB RO: Terduga TB yang pernah memiliki riwayat atau masih kontak erat dengan pasien TB RO.

9. Pasien ko-infeksi TB-HIV yang tidak respons secara klinis maupun bakteriologis terhadap pemberian OAT: Pasien ko-infeksi TB-HIV yang dalam pengobatan OAT selama 2 minggu tidak memperlihatkan perbaikan klinis.

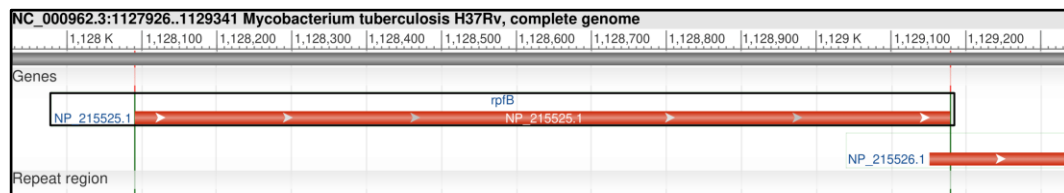
Berdasarkan kemampuan resistennya terhadap obat antituberkulosis (OAT), TB dibagi atas 5 kategori yang berbeda, yaitu:

1. Monoresistan (*Monoresistance*): Resistan terhadap salah satu OAT, misalnya resistan isoniazid (H)
2. Poliresistan (*Polyresistance*): Resistan terhadap lebih dari satu OAT, selain kombinasi isoniazid (H) dan Rifampicin (R), misalnya resistan isoniazid dan etambutol (HE), Rifampicin –etambutol (RE), isoniazid – etambutol dan streptomisin (HES), serta Rifampicin- etambutol dan streptomisin (RES).
3. *Multi Drug Resistance* (MDR): Resistan terhadap isoniazid dan Rifampicin, dengan atau tanpa OAT lini pertama yang lain, misalnya resistan HR, HRE, HRES.
4. *Extensively Drug Resistance* (XDR): TB MDR disertai resistansi terhadap salah satu obat golongan fluorokuinolon dan salah satu dari OAT injeksi lini kedua (capreomisin, kanamisin dan amikasin)
5. TB Resistan Rifampicin (TB RR): Resistan terhadap Rifampicin (monoresistan, poliresistan, TB MDR, TB XDR) yang terdeteksi menggunakan metode fenotip atau genotip dengan atau tanpa resisten OAT lainnya.

II.4 Resuscitation Promoting Factor (Rpf)

Protein *Resuscitation promoting factor* (Rpf) merupakan keluarga protein bakteri yang mampu mengaktifkan kembali bakteri non-replikasi dan ditemukan di *Mycobacterium tuberculosis*. Mtb memiliki lima gen mirip Rpf yakni Rpf-A (Rv0867c), Rpf-B (Rv1009), Rpf-C (Rv1884c), Rpf-D (Rv2389c), dan Rpf-E (Rv2450c) yang produknya menunjukkan aktivitas biologis yang mirip dengan Rpf dari *Micrococcus luteus*. Rpf merangsang pertumbuhan bakteri pada konsentrasi picomolar dan juga mengarahkan aktivitas mereka dari lokasi ekstra sitoplasma yang menunjukkan bahwa mereka terlibat dalam pensinyalan antar sel. Dalam mereaktivasi Mtb yang berada pada fase dorman atau laten, Rpf akan menstimulus produksi molekul pensinyalan autokrin sehingga merangsang pertumbuhan dan penggandaan sel Mtb yang memproduksinya. Rpf juga menstimulus parakrin yang berfungsi memberi sinyal sehingga sel-sel yang berada di dekatnya akan ikut teraktivasi. Sel-sel yang tidak aktif membutuhkan sumber eksogen dari Rpf untuk resusitasinya (Gupta dan Srivastava, 2012).

Rpf merupakan protein yang menempel pada dinding sel, sehingga mereka dapat menjadi target potensial untuk sistem kekebalan dari inangnya (manusia). Rpf adalah faktor virulensi kunci untuk Mtb sehingga respon imun yang diarahkan ke Rpf mungkin bersifat protektif. Studi *in vitro* telah berkonsentrasi pada respon imun terhadap protein Rpf-B. Hal ini dikarenakan Rpf-B mampu menginduksi pematangan sel dendritik melalui Reseptor seperti Toll 4 (TLR4). Temuan ini menunjukkan Rpf-B dapat menginduksi respons imun protektif *in vitro* dan mendukung peran mereka sebagai kandidat vaksin potensial untuk diteliti dan dikembangkan lebih lanjut (Rosser *et al.*, 2017).



Gambar 4. Lokus Gen Rpf-B (Rv1009)
(NCBI.nlm.nih.gov, 2021)

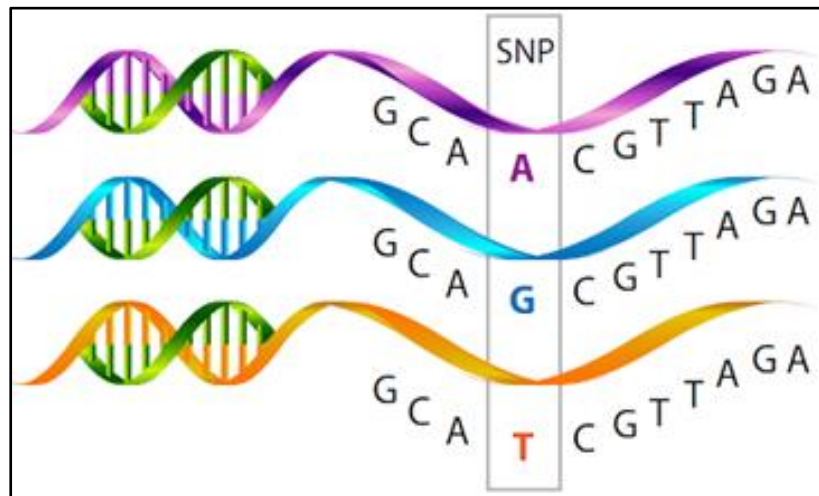
Gen pengkode Rpf-B terletak pada lokus Rv1009 dan terdiri atas 1089 bp dengan range 1.128.091-1.129.179 bp pada genom *M. tuberculosis* H37Rv (NCBI.nlm.nih.gov, 2021). Komposisi protein Rpf-B telah menunjukkan bahwa protein ini merupakan protein membran dengan banyak epitop sel B dan sel T. Protein Rpf-B memiliki karakteristik biologis dan imunologi tertinggi di antara protein keluarga Rpf lainnya. Penghapusan gen Rpf-B juga menyebabkan penundaan dalam reaktivasi pada tikus yang terinfeksi Mtb. Selain itu, mutasi pada gen ini dapat mengurangi tingkat pertumbuhan strain *M. tuberculosis* H37Rv (strain tuberkulosis yang paling banyak dipelajari di laboratorium penelitian). Hal ini juga kemudian yang memperkuat potensi antigen Rpf-B cocok untuk dilakukan pengembangan vaksin TB baru ataupun sebagai pelengkap (Saraswati *et al.*, 2018).

II.5 Polimorfisme

Polimorfisme genetik adalah variasi struktur genetik (urutan DNA) di antara individu, kelompok, atau populasi. Polimorfisme genetik juga dapat didefinisikan sebagai pewarisan sifat yang dikendalikan oleh lokus genetik tunggal dengan dua alel, di mana alel yang paling tidak umum memiliki frekuensi sekitar 1% atau lebih besar. Polimorfisme genetik dapat terjadi secara alami di dalam sel dan dapat diinduksi oleh agen eksternal seperti virus atau radiasi. Perubahan urutan DNA yang telah dikonfirmasi disebabkan oleh agen eksternal juga umumnya disebut

'mutasi' daripada 'polimorfisme'. Polimorfisme muncul melalui mutasi. Mutasi dapat disebabkan oleh perubahan dari satu jenis nukleotida, penyisipan atau penghapusan, atau penataan ulang nukleotida. Setelah terbentuk, polimorfisme dapat diwariskan seperti urutan DNA lainnya, yang memungkinkan warisannya dilacak dari orang tua ke anak. Polimorfisme juga ditemukan di luar gen dalam jumlah besar pada DNA yang tidak mengkode protein dan cenderung lebih banyak terjadi polimorfisme. Hal ini dikarenakan perubahan dalam sekuens DNA yang menyandikan protein berpotensi memiliki efek berbahaya pada individu yang membawanya (Ismail and Essawi, 2012).

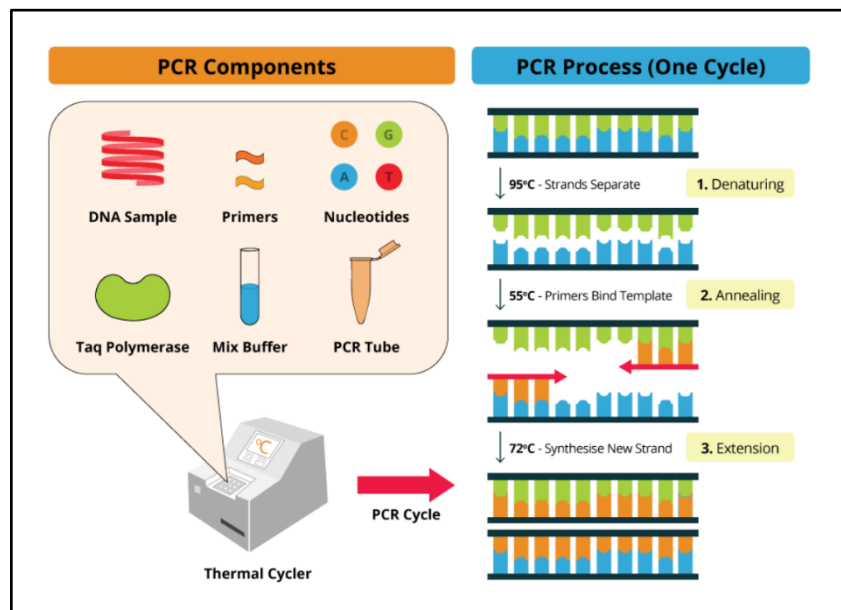
Salah satu jenis polimorfisme yang sering terjadi adalah *single nucleotide polymorphism* atau disingkat SNP (namun sering dibaca “*Snip*”). Polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) merupakan variasi kode genetik tunggal (yaitu, polimorfik). Meskipun SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) multiallel memang ada, SNPs biasanya bialelik (terjadi pada dua basa nitrogen alternatif) dan membutuhkan frekuensi minimum >1% dalam populasi. SNP adalah bentuk variasi genom yang paling umum dan banyak digunakan untuk mempelajari perbedaan genetik antara individu dan populasi. SNPs ini dapat berkontribusi pada perubahan dalam urutan genomik, baik di daerah pengkodean (ekson), intergenik, atau nonkode (intron) (Vallejos-Vidal *et al.*, 2020).



Gambar 5. *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)*
(Creative-biolabs.com, 2023)

II.6 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Reaksi berantai polimerase atau dalam bahasa Inggris dikenal dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode revolusioner yang dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1980-an dan didasarkan pada penggunaan kemampuan DNA polimerase untuk mensintesis untai baru DNA (asam deoksiribonukleat) yang melengkapi untai *template* yang diteliti. PCR mendasari hampir seluruh kloning molekuler modern. Dengan menggunakan PCR, urutan target terdefinisi yang terjadi sekali dalam DNA dengan kompleksitas tinggi dan ukuran besar dapat dengan cepat dan secara selektif diamplifikasi dalam reaksi berantai eksponensial yang menghasilkan jutaan salinan. Reaksinya mudah diatur, murah, dan tidak menuntut banyak persyaratan, satu-satunya persyaratan adalah pengetahuan tentang urutan nukleotida target. Selain kesederhanaannya, PCR dinilai kuat, cepat, fleksibel, dan sensitif. PCR menggunakan siklus suhu untuk memulai dan mengakhiri ledakan sintesis DNA yang dikatalisis oleh enzim. Setiap siklus PCR terdiri dari tiga tahap, yaitu (Green dan Sambrook, 2019):



Gambar 6. Skema PCR (*Polymerase Chain Reaction*)
(Bosterbio.com, 2021)

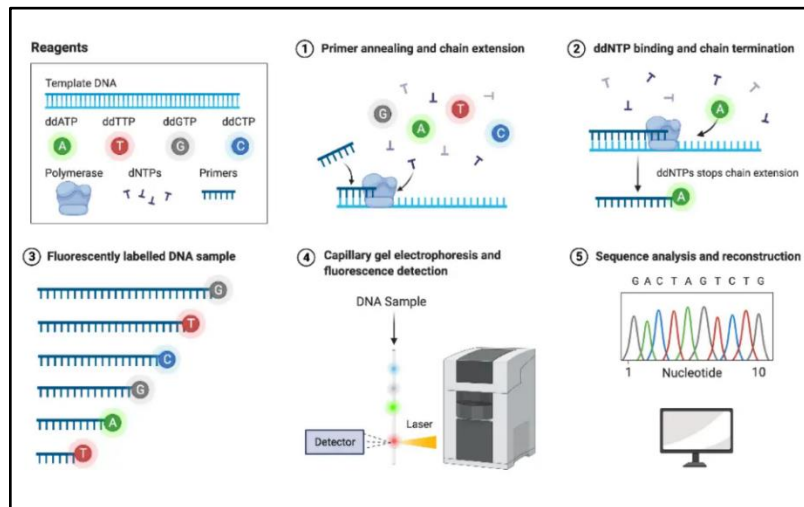
- **Denaturasi DNA** atau pemisahan struktur *double helix* pada DNA menjadi 2 untai tunggal DNA dengan teknik fisik berupa suhu tinggi ($>90^{\circ}\text{C}$).
- **Annealing** (penempelan) primer-primer spesifik pada segmen DNA tertentu untuk menginisiasi proses penempelan DNA-Polymerase dan basa nitrogen ke untai DNA dua primer oligonukleotida sintetis ke DNA *template* yang terdenaturasi. Primer-primer ini, biasanya panjangnya 20-28 nukleotida, dirancang menggunakan pengetahuan yang sudah ada sebelumnya tentang urutan DNA *template*. Kedua primer melengkapi urutan pada untai berlawanan dari DNA target. Situs atau daerah pengikatan untuk primer dapat dipisahkan hanya dengan beberapa nukleotida atau sebanyak beberapa ribu, sesuai keinginan peneliti. Pada tahap ini, suhu diturunkan ke suhu yang spesifik untuk memfasilitasi penempelan sesuai dengan primer yang digunakan (biasanya 54°C).

- **Ekstensi** (polimerasi) merupakan penambahan basa nitrogen pada untai tunggal DNA sesuai dengan basa nitrogen komplementernya hingga terbentuk untai DNA baru yang diinginkan. DNA hasil dari tahap ini akan mengalami tahap denaturasi kembali hingga diperoleh jumlah DNA yang diinginkan untuk identifikasi di mana sintesis DNA dimulai pada ujung 3' dari primer yang terikat. Perpanjangan primer terjadi pada suhu kurang lebih 70°C dalam reaksi enzimatik yang dikatalisis oleh DNA polimerase termostabil.

Pada proses perbanyakan DNA dengan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) memerlukan setidaknya beberapa komponen dasar, yaitu: (1) *template* atau cetakan DNA yang akan diperbanyak, (2) enzim DNA-Polymerase yang tahan terhadap suhu tinggi, (3) primer spesifik untuk struktur DNA (oligonukleotida) yang diinginkan, (4) dNTP (Deoksinukleosida trifosfat), (5) kofaktor MgCl₂, (6) larutan penyangga (*buffer*), dan (7) air. Semua komponen ini dicampurkan pada tabung (PCR *tube*) sebelum dimasukkan ke mesin PCR. Lama waktu PCR biasanya bervariasi bergantung pada mesin PCR yang digunakan, namun biasanya dalam satu siklus PCR membutuhkan waktu sekitar 30 detik (Váradi *et al.*, 2017).

II.7 Sekuensing

Sekuensing DNA atau pengurutan basa DNA merupakan teknik kunci dalam perkembangan ilmu pengetahuan, di antaranya genetika, bioteknologi, biologi molekuler, dan genomika. Sekuensing DNA bertujuan untuk menentukan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin, dan timin) suatu sampel DNA. Dalam ilmu pengobatan, sekuensing DNA digunakan untuk mengidentifikasi, mendiagnosis, dan mengembangkan pengobatan penyakit genetik.



Gambar 7. Skema Metode *Sanger Sequencing* (Shrestha, 2023)

Metode sekuensing DNA yang pertama kali digunakan adalah metode Sanger (*Sanger dideoxy sequencing*). Metode ini menggunakan DNA templat dan memerlukan primer spesifik untuk reaksi sekuensing. Teknologi sekuensing Sanger dan modifikasinya mendominasi metode sekuensing selama 30 tahun. Panjang sekuen yang dihasilkan berkisar antara 1.000–1.200 pasang basa (bp) dan tidak mampu mencapai lebih dari 2.000 bp (Tasma, 2016).

Metode sekuensing DNA Sanger juga dikenal sebagai metode terminasi rantai dideoksi yang merupakan metode yang pernah ada untuk mengurutkan kode genetik dan dirancang oleh Fredrick Sanger pada tahun 1977. Metode ini telah banyak digunakan untuk mendorong bidang genomik praktis dan fungsional, transformatif kualitas keturunan dan penelitian penyakit. Secara jelas, teknik dideoksi digunakan dalam pengurutan genom manusia utama pada tahun 2002. Karena kesesuaiannya untuk persetujuan rutin dalam pemeriksaan kloning dan PCR, pengurutan Sanger tetap menjadi metode utama di berbagai pusat penelitian di dunia. Dalam metode ini, pertama DNA dibagi menjadi dua untai. Dengan bantuan basa yang diubah secara kimiawi, untai pertama yang akan diurutkan

disalin. Basa yang diubah ini bertindak sebagai penanda identifikasi dan menghentikan proses penyalinan setiap kali salah satunya ditemukan. Prosedur yang sama ini diulangi untuk keempat basa dan kemudian potongan-potongan itu disatukan, akhirnya mengungkap urutan asli DNA. Pengurutan sanger terdiri dari tiga langkah (Chinmaye *et al.*, 2018):

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

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