

**ISOLASI GEN Rv3204 DARI *Mycobacterium tuberculosis* ISOLAT MAKASSAR SEBAGAI  
KANDIDAT VAKSIN TUBERKULOSIS**

**RESKI RAHMAWATI ANWAR**

**H411 15 506**



**DEPARTEMEN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2018**



**ISOLASI GEN Rv3204 DARI *Mycobacterium tuberculosis* ISOLAT MAKASSAR SEBAGAI  
KANDIDAT VAKSIN TUBERKULOSIS**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Sains*

**RESKI RAHMAWATI ANWAR**

**H41115506**

**DEPARTEMEN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2018**



**HALAMAN PENGESAHAN**

**ISOLASI GEN Rv3204 DARI *Mycobacterium tuberculosis* ISOLAT  
MAKASSAR SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN TUBERKULOSIS**

**Disusun dan diajukan oleh**

**RESKI RAHMAWATI ANWAR**

**H41115506**

**Disetujui oleh:**

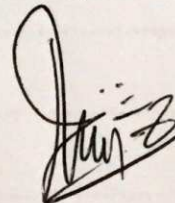
**Pembimbing Utama,**



**Agus, M.Si.**

**0905 199103 2 003**

**Pembimbing Pertama,**



**Andi Arfan Sabran, S.Si, M.Kes**

**NIP. 19811012 200812 1 001**



## DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT .....	ix
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
I.1 Latar Belakang .....	1
I.2 Tujuan Penelitian .....	3
I.3 Manfaat Penelitian .....	3
I.4 Waktu dan Tempat .....	3
<b>BAB II TINJUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
II.1 Karakteristik <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	4
II.2 Klasifikasi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
II.3 Gen Rv3204 .....	7
II.4 Patogenesis .....	8
..... DNA .....	10
..... ksi DNA .....	13



II.7 PCR .....	13
<b>sBAB III METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>19</b>
III.1 Alat dan Bahan .....	19
III.2 Prosedur Kerja .....	20
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>25</b>
IV.1 Kultur Bakteri <i>Micobacterium tuberculosis</i> .....	25
IV.2 Amplifikasi Gen Rv3204 Mycobacterium tuberculosis dengan PCR .....	28
IV.3 Purifikasi Produk PCR dengan menggunakan Purification Kit .....	30
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>32</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>33</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>x</b>



## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Tak lupa pula penulis mengirimkan salam dan shalawat kepada Nabi Besar Muhammad SAW yang telah membawa umat Islam ke jalan yang diridhoi Allah SWT.

Penulis menyadari dengan sepenuhnya dalam menulis sebuah karya tulis ilmiah tidaklah mudah, oleh karena itu tidak menutup kemungkinan dalam penyusunan skripsi ini terdapat kekurangan dan kesalahan, sehingga penulis sangat mengharapkan masukan yang membangun guna kesempurnaan skripsi ini.

Skripsi yang berjudul **“Isolasi dan Karakterisasi Gen Rv3204 dari *Mycobacterium tuberculosis* dari Isolat Makassar sebagai Kandidat VaksinTuberkulosis”** merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana sains. Terwujudnya skripsi ini tidak lepas dari partisipasi serta bantuan dari segala pihak. Kepada orangtuaku ayahanda H. Anwar Haru dan ibunda Hj. Ernawati Tahang yang sangat saya cintai dan hormati yang tak henti-hentinya memberikan dukungan, doa, nasehat, dan motivasi hingga sampai detik ini penulis tetap kuat dan bersemangat dalam menyelesaikan studi. Selain itu penulis juga ingin menyampaikan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada :

1. Dr. Eng Amiruddin, M.Si. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

r. Hj. Nurhaedar, S.Si, M.Si. selaku Ketua Departemen Biologi sekaligus nasehat akademik yang senantiasa memberikan masukan dan motivasi kepada penulis.



3. Dr. Rosana Agus, M.Si. selaku dosen pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan, bimbingan, dan motivasi yang membangun kepada penulis hingga skripsi ini terselesaikan dengan baik
4. Andi Arfan Syabran, S.Si, M.Kes selaku dosen pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan, bimbingan, serta motivasi yang membangun kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik sebagaimana mestinya.
5. Staf pengajar dan pegawai Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Unhas atas segala ilmu, masukan dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis.
6. Saudara – saudariku yang tercinta Kak Muhammad Ismail Anwar, S.P., Adik-adikku Muhammad Yusuf Anwar, Muthia Rahmadani Anwar, Muhammad Fahri Anwar dan Saudara Iparku Ekayanti Sirajuddin terimakasih atas keceriaan, masukan, dan dukungan yang telah kalian berikan.
7. Kepada sahabat-sahabatku Ririn Ulfa Damayanti, Wa Ode Hajratul Isti Tasrin, Asnidar, Aulia Magfirah Cahyani, Muhammad Rifaat, Muhammad Anugrah Ariansyah, Megawati dan Sri Hardianti serta teman seperjuanganku KMF MIPA 2015 terima kasih atas kasih sayang dan dukungan yang diberikan hingga saat ini.
8. Teman-teman satu pembimbing akademik Luthfi Nurpratama dan Arfina Yusuf serta teman-teman seperjuangan skripsi Unzia Sagita Putri, Nurhidayah Haruna, Musdalifah, St. Nurkhalisa Syam, Rosdiana Marzuki, Nurul Fadillah, Wa Ode Kamillah, Wa Ode St Purnamasari, Risa Dengan Parura, dan Jesicca Dea Rapar terima kasih atas semangat dan kerja samanya



9. Muhammad Faisal yang selalu setia meluangkan waktunya dan sabar mendengarkan keluh kesah penulis. Terimakasih atas dukungan dan motivasinya dalam membantu penulis menyelaikan skripsi ini.
10. Serta seluruh pihak yang ikut membantu, baik secara langsung maupun tidak langsung. Penulis hanya bisa berdoa, semoga Allah membalas kebaikan-kebaikan mereka dengan setimpal. Aamiin.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis memohon maaf bila ada kesalahan dalam penulisan skripsi ini. Besar harapan penulis, semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan dapat bernilai positif bagi semua pihak yang membutuhkan.





## ABSTRAK

Tuberkulosis merupakan penyebab kematian kesembilan di dunia yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Menurut WHO tahun 2017 sekitar 5-15% dari perkiraan 1,7 miliar orang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Vaksin yang digunakan sampai saat ini adalah vaksin Bacille Calmette Guerin (BCG). Salah satu dari banyak kelemahan vaksin BCG yaitu efektivitas perlindungan terhadap tuberkulosis hanya berkisar 0-80%. Seiring perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi saat ini berkembang vaksin DNA sehingga pengembangan vaksin baru menjadi prioritas global untuk melawan tuberkulosis. Salah satu yang dapat menjadi kandidat vaksin adalah Gen Rv3204 dari *Mycobacterium tuberculosis* yang mampu menginduksi produksi IFN- $\gamma$  dalam sel mononuklear darah perifer. Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi gen Rv3204 dari *Mycobacterium tuberculosis*. Metode yang digunakan adalah dengan membuat kultur bakteri dari sputum penderita TB positif kemudian di isolasi menggunakan gSYNC DNA Extraction Kit dan dipurifikasi produk PCR menggunakan QIAquick PCR Purification Kit (50). Hasil penelitian yang didapatkan adalah gen Rv3204 telah di isolasi dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Hal ini ditandai dengan terbentuknya band dengan ukuran 306 bp dari hasil elektroforesis produk PCR.

Kata Kunci : Gen Rv3204, Isolasi DNA, *Polymerase Chain Reacton* (PCR).



## ABSTRACT

Tuberculosis is the ninth cause of death in the world caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. According to WHO in 2017 around 5-15% of the estimated 1.7 billion people are infected with *Mycobacterium tuberculosis*. The vaccine used to date is the *Bacille Calmette Guerin* (BCG) vaccine. One of the many weaknesses of the BCG vaccine is that the effectiveness of protection against tuberculosis only ranges from 0 to 80%. As the development of science and technology is currently developing DNA vaccines so that the development of new vaccines becomes a global priority to fight tuberculosis. One of the candidates for the vaccine is Gen Rv3204 from *Mycobacterium tuberculosis* which is able to induce IFN- $\gamma$  production in peripheral blood mononuclear cells. The purpose of this study was to isolate the Rv3204 gene from *Mycobacterium tuberculosis*. The method used was to make bacterial cultures of sputum positive TB patients then isolated using the gSYNC DNA Extraction Kit and purified PCR products using QIAquick PCR Purification Kit (50). The results obtained were that the Rv3204 gene was isolated from the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. This is indicated by the formation of a band with a size of 306 bp from the results of PCR product electrophoresis.

Keywords: Gen Rv3204, DNA Isolation, Polymerase Chain Reacton (PCR).



# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

Penyakit Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. TB biasanya mempengaruhi paru-paru (TB pulmonal) tetapi juga dapat mempengaruhi situs lain (TB luar paru). Sekitar 5–15% dari perkiraan 1,7 miliar orang yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* akan mengembangkan penyakit TB selama masa hidup mereka (WHO, 2017).

TB adalah penyebab kematian kesembilan di dunia dan penyebab kematian utama dari agen infeksi tunggal setelah HIV/AIDS. Pada tahun 2016, diperkirakan ada 1,3 juta TB kematian di antara orang HIV-negatif dan tambahan 374.000 kematian di antara HIV-positif. Diperkirakan 10,4 juta orang jatuh sakit dengan TB di 2016: 90% adalah orang dewasa, 65% adalah laki-laki, 10% adalah orang hidup dengan HIV (74% di Afrika) dan 56% berada di lima negara: India, Indonesia, Cina, Filipina dan Pakistan (WHO, 2017).

Angka TBC di Indonesia berdasarkan mikroskopik sebanyak 759 per 100 ribu penduduk untuk usia 15 tahun ke atas dengan jumlah laki-laki lebih tinggi dibanding dengan perempuan. Jumlah di perkotaan lebih tinggi dibanding di daerah pedesaan (Kemenkes, 2016).

Dinas Kesehatan Provinsi Sulawesi Selatan pada tahun 2016 jumlah penderita kasus TB paru BTA positif (Bakteri Tahan Asam) terdapat 8.943

orang. Angka kesembuhan (Cure Rate) hanya 78,36% atau dengan 7.008 dari keseluruhan kasus tersebut jumlah kematian selama pengobatan 377 orang. Berdasarkan seluruh Kabupaten/Kota se-Sulawesi Selatan,



Kota Makassar menduduki peringkat pertama dengan jumlah penderita TB Paru BTA positif sebanyak 1661 kasus dengan angka kematian selama pengobatan sebanyak 55 orang (Dinkes Provinsi Sulsel, 2016).

Imunisasi adalah perlindungan yang diberikan oleh pemerintah hingga saat ini. Imunisasi merupakan suatu metode pencegahan dengan memberikan vaksin kepada bayi atau anak-anak. Vaksin Bacille Calmette Guerin (BCG) adalah satu-satunya vaksin untuk pencegahan tuberkulosis. BCG merupakan bakteri *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan. Efektivitas perlindungan BCG terhadap tuberkulosis berkisar 0% - 80%, BCG ini masih memiliki banyak keterbatasan.

Vaksin *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) telah ada selama 80 tahun dan merupakan salah satu vaksin yang paling banyak digunakan saat ini. Vaksin BCG memiliki efek perlindungan yang terdokumentasi terhadap meningitis dan TB diseminata pada anak-anak. Itu tidak mencegah infeksi primer dan, lebih penting lagi, tidak mencegah reaktivasi infeksi paru laten. (WHO, 2016).

Banyaknya kelemahan yang terdapat pada vaksin BCG, sehingga pengembangan vaksin baru sangat diperlukan sebagai upaya dalam pencegahan penyakit tuberkulosis. Pengembangan vaksin baru merupakan strategi dalam melawan TB manusia dan tetap menjadi prioritas global. Selain itu efikasi variabel yang diberikan oleh vaksinasi BCG dan tidak adanya proteksi vaksin TB pada orang dewasa telah menjadi alasan utama untuk mengisolasi satu antigen *Mtb* imunogenik yang dapat digunakan sebagai kandidat vaksin tuberkulosis.

Menurut Lim (2004) Gen Rv3204 dapat menginduksi produksi secara

IFN- $\gamma$  dan IL 12p40 dalam sel mononuklear darah perifer dari reaktor

sehat. Produksi interleukin (IL)-12p40 secara signifikan tinggi



sehingga menunjukkan bahwa antigen MTSP11 harus dievaluasi lebih lanjut sebagai komponen vaksin. Berdasarkan hal tersebut sehingga dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menggunakan gen Rv3204 sebagai kandidat vaksin tuberkulosis.

## **I.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi gen Rv3204 dari *Mycobacterium tuberculosis*.

## **I.3 Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperoleh gen target Rv3204 sebagai kandidat vaksin tuberkulosis.

## **I.4 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan September - Oktober 2018 di Unit Tuberkulosis *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC). Analisis data dilakukan di Laboratorium Genetika, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.



## BAB II

### TINJAUN PUSTAKA

#### II.1 Karakteristik *Mycobacterium tuberculosis*

##### II.1.1 Morfologi

*Mycobacterium tuberculosis* tumbuh lambat, *chemoorganotrophic*, non-motil, tidak membentuk spora, *bacillus aerobic*. Dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* merupakan karakteristik dari *Mycobacteria*. Lapisan di luar membran sitoplasma membentuk kompleks utama, dengan inti yang terdiri dari peptidoglikan yang terkait dengan arabinogalactan, pada gilirannya terkait dengan asam mycolic (mAGP complex). Selain memberikan banyak karakteristik penting seperti impermeabilitas relatif terhadap antibiotik, dinding sel mengandung banyak molekul imunomodulator termasuk lipoarabinomannan, sulpholipids dan phthiocerol dimycocerosate (Gordon and Parish, 2017).

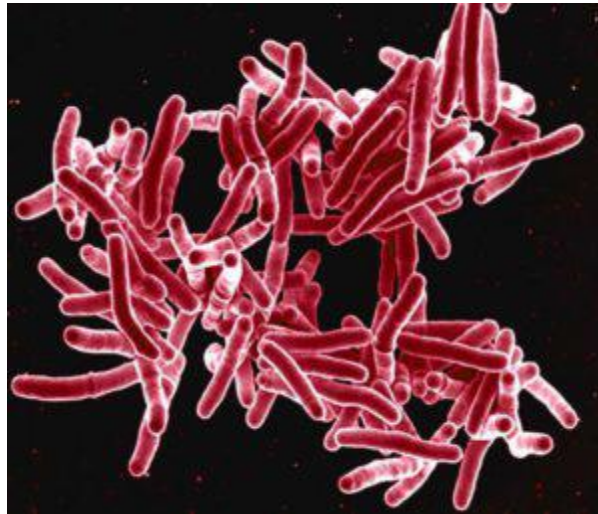
*Mycobacterium tuberculosis* yang diamati dengan SEM mengalami dua fitur yang berbeda, pertama sel mengalami retakan atau gerakan *post fission* gerakan yang dikarenakan dinding sel berlapis – lapis dimana lapisan dalam membentuk septum sedangkan lapisan luar pecah di satu sisi, fitur kedua terkait dengan pembelahan sel membentuk struktur percabangan sementara (Dahl, 2004).

Dinding sel *Mycobacterium* pada prinsipnya terdiri dari lapisan dalam dan lapisan luar yang mengelilingi membrane plasma. Lapisan luar terdiri dari lipid dan protein lapisan dalam terdiri dari peptidoglikan, arabinogalactan, dan asam

yang dihubungkan secara kovalen untuk membentuk kompleks yang sebagai MAAG. Kompleks PG yang memanjang dari membran plasma



keluar berlapis-lapis, dimulai dengan peptidoglikan dan di akhiri dengan asam mycolic (Velayati and Farnia, 2012).



**Gambar 1.** *Mycobacterium tuberculosis*  
(Sumber: Public Health Image Library, NIAID, Image ID: 18139)

Selubung pada *M. tuberculosis* memiliki tiga komponen penyusun yaitu struktur plasma membran, dinding dan kapsul. Pelasma membran memainkan peran dalam proses patologis, dinding menyerupai dinding gram positif tetapi memiliki lapisan lipid ester mikolat yang semua komponennya mempunyai peran penting dalam fisiologi dan patogenesis (Daffe and Draper, 1998).

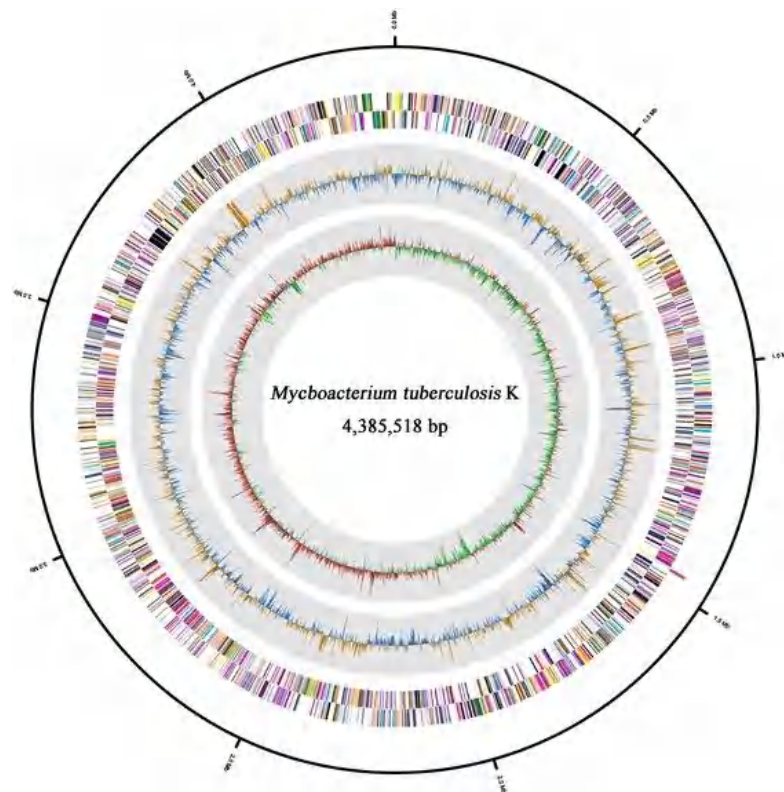
*Mycobacterium tuberculosis* mampu merubah morfologi permukaan sel, bentuk, ukuran, matrik seluler, pengaturan beberapa protein dengan berat molekul rendah yang ditunjukkan ke membrane atau keluar sel, mempengaruhi pertumbuhan, virulensi dan ketahanan *Mycobacterium tuberculosis* untuk amoxicillin clavulanate dan vancomycin (Schoonmaker et al., 2014).

### II.1.3 Genom Rv3204



eta melingkar grafis dari *Mycobacterium tuberculosis* K strain genom.  
ke pusat: fitur RNA (RNA ribosom berwarna biru, dan transfer RNA

berwarna merah), gen pada untai ke depan dan untai terbalik (berwarna sesuai dengan kategori COG). Dua lingkaran dalam menunjukkan rasio GC dan GC condong. Rasio GC dan GC condong ditampilkan dalam warna oranye dan merah menunjukkan positif, dan biru dan hijau menunjukkan negatif (Jung-Han, 2015).



**Gambar 2.** Peta Genom *Mycobacterium tuberculosis* (Jung-Han, 2015).

## II.2 Klasifikasi *Mycobacterium tuberculosis*

Filum : Actinobacteria

Classis : Actinobacteria

Ordo : Actinomycetales

Familia : Mycobacteriaceae

: *Mycobacterium*

: *Mycobacterium tuberculosis*

: Gordon and Parish, 2017.





### II.3 Gen Rv3204

Protein baru telah diidentifikasi yaitu protein 11-kDa (Rv3204, MTSP11) menginduksi produksi signifikan IFN- $\gamma$  dan interleukin (IL)-12p40 dalam sel mononuclear darah perifer dari tuberkulin yang sehat. Produksi interleukin (IL)-12p40 secara signifikan tinggi sehingga menunjukkan bahwa antigen (Possible-DNA Methyltransferase) MTSP11 harus dievaluasi lebih lanjut sebagai komponen vaksin subunit (Lim, 2004).

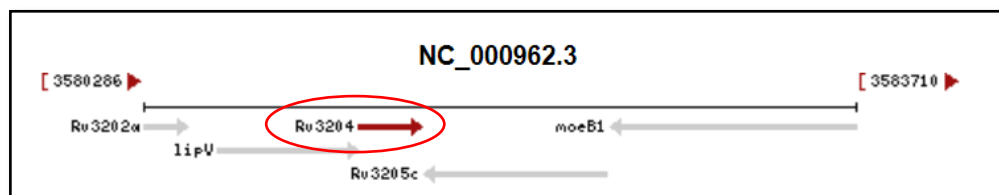
Sumber utama IFN- $\gamma$  dalam pengujian adalah karena system memori sel-T menanggapi mikobakteri antigen karena produksi IFN- $\gamma$  di PBMC dari tuberculin non-reaktor sangat rendah. Sel-T meningkatkan produksi tidak hanya melalui sel-sel langsung seperti interaksi IFN- $\gamma$  dan IL-4, tetapi juga interaksi langsung CD40L yang diaktifkan sel-T dengan CD40 pada sel dendritic atau makrofag. Produksi IFN- $\gamma$  yang lebih tinggi terhadap tanggapan MTSP11 disebabkan karena perbedaan epitope sel-T yang disajikan oleh monosit atau makrofag (Lim, 2004).

Protein disekresikan oleh *Mycobacterium tuberculosis* adalah target yang penting untuk pengembangan vaksin. Untuk mengidentifikasi antigen dari *Mycobacterium tuberculosis* filtrate kultur (Culture Filtrate - CF) yang sangat merangsang sel-T, CF difraksinasi dengan kromatografi pertukaran ion dan kemudian non-reducing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide dengan elusi gel mini. Setiap fraksi diputar karena kemampuannya untuk menginduksi interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) yang diproduksi dalam sel mononuclear darah perifer terisolasi

or tuberculin sehat (Lim, 2004).



Kekebalan protektif untuk *Mycobacterium tuberculosis* tergantung pada respon imun seluler. Dalam model tikus dengan TB, deplesi seluler dan percobaan transfer telah menunjukkan peran perlindungan untuk CD4 dan CD8, limfosit T. selain itu, IFN- $\gamma$  sangat penting untuk kekebalan terhadap tuberkulosis. Karena gangguan IFN- $\gamma$  pada tikus dan mutasi IFN- $\gamma$  Receptor pada manusia menghasilkan peningkatan kerentanan terhadap infeksi tuberkulosis. Selain itu ada bukti bahwa protein secara aktif disekresikan oleh *Mycobacterium tuberculosis* selama pertumbuhan menginduksi sel mediated respon imun dan kekebalan protektif dengan menyebabkan perluasan tertentu. IFN- $\gamma$  memproduksi limfosit T yang mampu mengenali dan mengerahkan efek antimikroba terhadap makrofag yang mengandung intraseluler mycobacteria (Lim, 2004).



**Gambar 4.** Sequence gen Rv3204 – protein imunogenik *M. tuberculosis*  
 Sumber : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/888132>

## II.4 Patogenesis

Tuberkulosis (TB) merupakan masalah kesehatan utama di dunia. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan penyebarannya terjadi ketika penderita TB batuk maupun bersin sehingga bakteri menyebar melalui udara. Setiap tahun jutaan orang mengalami infeksi TB bersamaan dengan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) yang menjadi penyebab utama kematian di

zwar, dkk., 2017).



Tuberkulosis adalah salah satu penyakit tertua yang tercatat, masih merupakan salah satu pembunuh terbesar di antara penyakit yang menular, meskipun penggunaan vaksin hidup yang dilemahkan secara global dan beberapa antibiotik. Vaksin dan obat baru diperlukan untuk membendung epidemik TB di seluruh dunia yang membunuh dua juta orang setiap tahun. Untuk secara rasional mengembang agen antituberkular baru, penting untuk mempelajari genetika dan fisiologi *Mycobacterium tuberculosis* dan Mycobacteria terkait (Smith, 2003).

Infeksi ini terjadi dikarenakan reaktivasi pada pasien imunokompromais atau sebagai infeksi primer setelah penularan dari berbagai orang yang terinfeksi HIV. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan sekitar 9,6 juta kasus baru TB dengan 5,4 juta terjadi pada laki-laki, 3,2 terjadi pada perempuan dan 1 juta terjadi pada anak-anak (Azwar, dkk., 2017).

Tuberkulosis Paru yaitu tuberkulosis yang menyerang jaringan paru, tidak termasuk pleura (selaput paru). Berdasarkan hasil pemeriksaan dahak, TB Paru dibagi menjadi : 1) TB paru BTA positif : bila sekurang-kurangnya 2 dari 3 spesimen dahak SPS hasilnya BTA positif dan foto rontgen dada menunjukkan gambaran TB aktif. 2) TB paru BTA negatif : bila pemeriksaan 3 spesimen dahak SPS hasilnya BTA negatif dan foto rontgen dada menunjukkan gambaran tuberkulosis aktif. Hal ini dikarenakan kejadian TB dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain: umur, jenis kelamin, imunisasi BCG, status gizi, Bayi Berat Lahir (BBLR), Air Susu Ibu, Kebiasaan merokok dalam keluarga (Murniasih and Livana, 2007).

emampuan tubuh untuk secara efektif membatasi atau menghilangkan infeksi ditentukan oleh status kekebalan individu, faktor genetik dan



apakah itu paparan primer atau sekunder terhadap organisme. Selain itu, *M. tuberculosis* memiliki beberapa faktor virulensi yang membuatnya sulit untuk makrofag alveolar untuk menghilangkan organisme dari individu yang terinfeksi. Faktor virulensi termasuk kandungan asam mycolic tinggi dari kapsul luar bakteri, yang membuat fagositosis menjadi lebih sulit untuk makrofag alveolar. Selain itu, beberapa unsur lain dari dinding sel seperti faktor tali pusat dapat secara langsung merusak makrofag alveolar. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *Mycobacteria tuberculosis* mencegah pembentukan phagolysosome yang efektif, sehingga mencegah atau membatasi eliminasi organisme (Adigun et al, 2018).

Kontak pertama organisme *Mycobacterium* dengan inang mengarah ke manifestasi yang dikenal sebagai tuberkulosis primer. TB primer ini biasanya terlokalisir ke bagian tengah paru-paru, dan ini dikenal sebagai fokus Ghon TB primer. Pada sebagian besar individu yang terinfeksi, fokus Ghon memasuki keadaan latensi. Keadaan seperti kejadian ini dikenal sebagai tuberkulosis laten (Adigun et al, 2018).

*Mycobacterium tuberculosis* resisten secara alami terhadap antibiotik dikaitkan dengan struktur dari dinding sel yang mengandung mikolat sehingga permeabilitas rendah terhadap beragam antibiotik. Hal ini karena porin pada *Mycobacterium tuberculosis* tidak mudah dilalui oleh zat tertentu dalam konsentrasi rendah dan in aktivasi terhadap obat (Jarlier and nikaido, 1994).

## II.5 Vaksin

Vaksin konvensional baik vaksin generasi pertama yaitu vaksin yang mengandung mikroorganisme hidup yang telah dilemahkan dan vaksin generasi kedua yaitu vaksin yang mengandung mikroorganisme yang dimatikan, serta



vaksin generasi yang ketiga yaitu vaksin rekombinan yang juga dikenal dengan vaksin sub unit yang mengandung fragmen antigenik dari suatu mikroorganisme yang dapat merangsang respon imun, dalam penggunaannya masih memiliki beberapa kelemahan. Vaksin generasi pertama seringkali dapat bermutasi kembali menjadi virulen sehingga menimbulkan efek yang tidak diinginkan. Oleh sebab itu biasanya jenis vaksin yang dilemahkan ini tidak dianjurkan diberikan kepada penderita yang mengalami imunokompromais. Sedangkan vaksin generasi kedua adalah vaksin mengandung mikroorganisme yang dimatikan menggunakan zat kimia tertentu, biasanya dengan menggunakan formalin atau fenol, dalam penggunaannya sering mengalami kegagalan atau tidak menimbulkan respon imun tubuh (Radji, 2009).

Untuk mengatasi berbagai kelemahan yang terjadi pada penggunaan vaksin generasi pertama dan kedua mulailah dikembangkan vaksin generasi yang ketiga yaitu vaksin rekombinan yang juga dikenal dengan vaksin sub unit. Vaksin sub unit dibuat melalui teknik rekayasa genetika untuk memperoleh fragmen antigenik dari mikroorganisme, sehingga disebut dengan vaksin rekombinan. Sebagai contoh, vaksin hepatitis B mengandung bagian protein selubung dari virus hepatitis B yang diproduksi melalui rekayasa genetika, oleh sel ragi. Vaksin rekombinan lebih aman dibandingkan dengan vaksin yang mengandung seluruh sel virus, karena fragmen antigenik yang terdapat dalam vaksin rekombinan tidak dapat bereproduksi dalam tubuh penerima, disamping itu vaksin rekombinan umumnya tidak menimbulkan efek samping. Namun demikian vaksin generasi

pun ternyata hanya dapat menimbulkan respon imun humoral dan tidak menimbulkan respon imun seluler (Radji, 2009).



*Mycobacterium tuberculosis* adalah agen dari penyebab penyakit tuberkulosis pada manusia yang merupakan permasalahan global utama pada kesehatan. Sampai saat ini vaksin yang digunakan untuk melawan penyakit tuberkulosis pada manusia adalah bakteri dari *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan untuk menjadi vaksin BCG (*Bacillus Calmette Guerin*). Vaksin ini umumnya diberikan lahir dan memberikan beberapa perlindungan terhadap TB anak-anak. Namun, efektivitas perlindungannya terhadap TB paru pada remaja atau dewasa bervariasi (0-80%). Jadi pengembangan vaksin baru sebagai strategi melawan TB manusia merupakan prioritas kesehatan global (Samperio, 2016).

Pencegahan penyakit tuberkulosis dengan imunisasi atau vaksinasi merupakan tindakan yang mengakibatkan seseorang mempunyai ketahanan tubuh yang lebih baik, sehingga mampu mempertahankan diri terhadap penyakit atau masuknya kuman dari luar. Vaksinasi terhadap penyakit tuberkulosis menggunakan vaksin *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) dari galur *Mycobacterium bovis* yang telah dilemahkan. Vaksin BCG ini telah diwajibkan di 64 negara dan direkomendasikan di beberapa negara lainnya (Rosandali, dkk., 2016).

Vaksinasi dengan *Bacille Calmette Guerin* (BCG) masih digunakan diseluruh dunia. Umumnya, kebanyakan orang di Indonesia telah mendapatkan vaksin BCG pada saat bayi, tetapi efektivitas dari vaksin BCG ini tidak mampu bertahan hingga dewasa. Oleh karena itu, vaksin pengganti BCG diperlukan lebih efektif untuk menghilangkan penyakit tuberkulosis (Agus, et al., 2016).

Indonesia telah melaksanakan vaksin BCG sejak tahun 1973 dan kini

vaksinasi BCG setidaknya dapat menghindarkan terjadinya TB paru berat k, tuberkulosis milier yang menyebar keseluruh tubuh dan meningitis



tuberkulosis yang menyerang otak. Kedua penyakit ini bisa menyebabkan kematiann pada anak (Rosandali, dkk., 2016).

Efetivitas vaksin BCG telah lama diperdebatkan, bahkan sejak awal penggunaannya pada awa decade 1920-an. Kemampuan vaksin ini dinilai terbatas untuk menangkal tuberkulosis. Studi klinis telah banyak dilakukan untuk membuktikan klaim ini. Secara umum terungkap bahwa efektivitas BCG sangat bervariasi (0-80 persen) (Rosandali, dkk., 2016).

Tuberkulosis masih bertanggung jawab untuk dua juta kematian setiap tahun. Karena sifat menular, perkembangan kronis dan pengobatan yang lama, TB merupakan beban besar bagi masyarakat. Selain itu munculnyaTB yang resisten terhadap obat dan epidemic TB-HIV saat ini telah menimbulkan kekhawatiran yang lebih besar. Mengobati dan mencegah TB telah menjadi tantangan permanen sejak zaman kuno. Bacille Calmatte Guerin (BCG) adalah satu-satunya vaksin yang tersedia saat ini dan telah digunakan selama lebih dari 90 tahun dengan catatan keselamatan yang mengagumkan. Namun, kemanjurannya masih kontroversial. Tidak ada yang universal kebijakan vaksinasi BCG, dengan beberapa negara hanya merekomendasikan penggunaan dan negara lain yang menerapkan program imunisasi (Luca and Muhaescu, 2013).

## II.6 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan salah satu tahap penting dalam kegiatan berbasis molekuler. Beberapa permasalahan yang sering muncul saat ekstraksi DNA yaitu DNA patah-patah selama proses ekstraksi, DNA mengalami degradasi hadiran enzim nuclease, adanya kontaminasi senyawa polisakarida dan plasinya senyawa metabolit sekunder (Nugroho, dkk., 2016).



## II.7 PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Dengan ditemukannya teknik PCR di samping juga teknik-teknik lain seperti sekuensing DNA, telah merevolusi bidang sains dan teknologi khususnya di bidang diagnose penyakit genetic, kedokteran forensic dan evolusi molekuler (Handoyo and Rudiretna, 2001).

Polymerase Chain Reaction (PCR) memiliki potensi untuk meningkatkan diagnosis tuberkulosis, meskipun juga masih memiliki keterbatasan diagnostik. Tingkat akuratan negatif yang tinggi sekitar 20% umumnya terkait dengan adanya inhibitor intrinsik dan ekstrinsik dari polimerase Taq-8. Namun, tingkat ketidaktepatannya sering disebabkan oleh kontaminasi sampel DNA mycobacterium atau proses amplifikasi PCR yang tidak bersih (Carnevale, et al., 2018).

### A. Prinsip Umum PCR

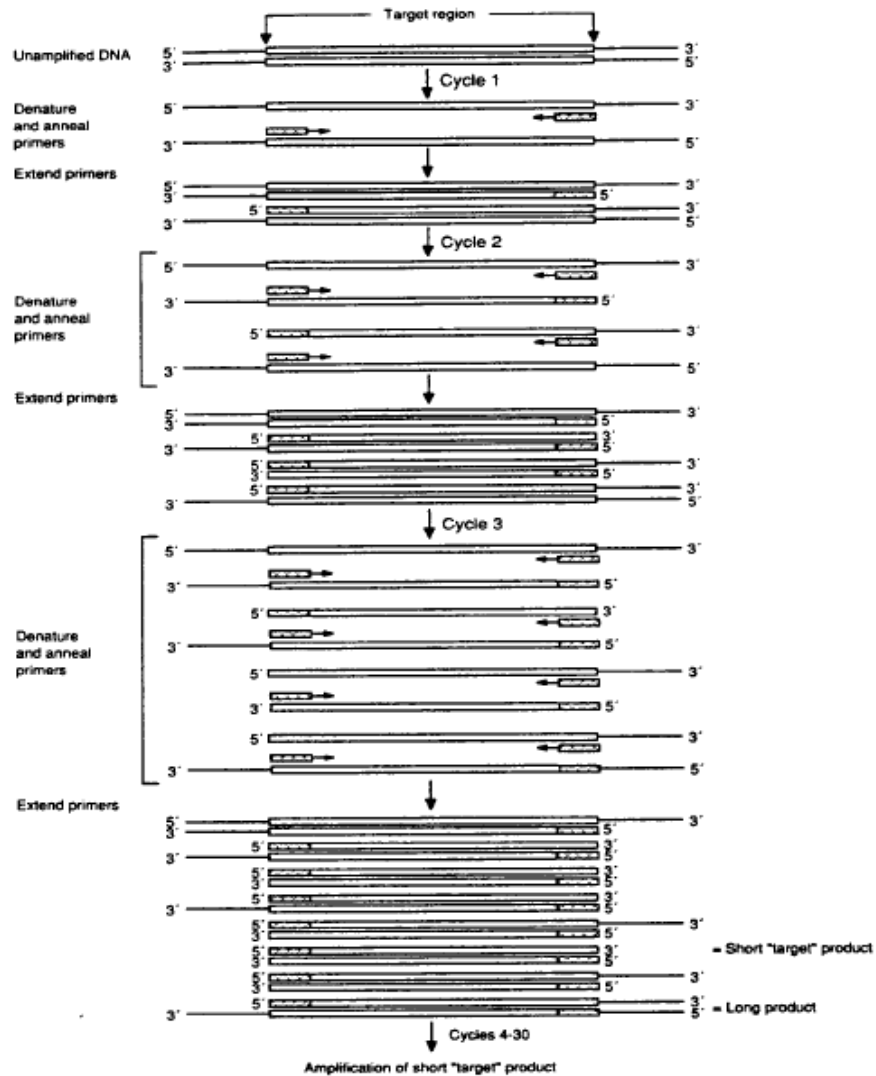
Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah template DNA; sepasang primer; yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA template; dNTPs (Deoxynukleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida ( $MgCl_2$ ) dan enzim polimerase DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu : Pra denaturasi DNA, denaturasi DNA template, penempelan primer pada template (*annealing*), pemanjangan primer (*extension*) dan pemantapan (post-extension). Tahapan kedua





sampai dengan tahapan keempat berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).



**Gambar 2.** Bagan Tahapan PCR (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Tahap optimasi produk PCR dilakukan untuk mendapatkan hasil amplifikasi DNA densitas tinggi. Dengan melakukan gradient PCR hasil produk dengan control positif dan mempertimbangkan konsentrasi. Selanjutnya

uat DNA pada sampel positif dan sampel klinis dengan menggunakan kemudian menganalisisnya menggunakan metode elektroforesis. Setelah



melakukan elektroforesis, kontrol positif akan menunjukkan hasil yang lebih tinggi (Agus, et al., 2018).

## **B. Pelaksanaan PCR**

Untuk melakukan proses PCR diperlukan komponen-komponen seperti:

### **1. Template DNA**

Fungsi DNA template di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Template DNA ini dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA template tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Penyiapan DNA template untuk proses PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel ataupun dengan cara melakukan isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid dengan menggunakan metode standar yang ada. Pemilihan metode yang digunakan di dalam penyiapan DNA template tergantung dari tujuan eksperimen (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Selain dengan cara lisis, penyiapan DNA template dapat dilakukan dengan cara mengisolasi DNA kromosom ataupun DNA plasmid menurut metode standar yang tergantung dari jenis sampel asal DNA tersebut diisolasi. Metode isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid memerlukan tahapan yang lebih kompleks dibandingkan dengan penyiapan DNA menggunakan metode lisis. Prinsip isolasi DNA kromosom dan DNA plasmid adalah pemecahan dinding sel, yang diikuti dengan pemisahan DNA kromosom/ DNA plasmid dari komponen-komponen lain.

demikian akan diperoleh kualitas DNA yang lebih baik dan murni

o and Rudiretna, 2001).

er



Kerberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatasan fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan juga sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA (Handoyo and Rudiretna, 2001).

### 3. dNTPs (deoxynucleotide triphosphates)

dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri dari dATP (deoksiadenosin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Dalam proses ekstensi DNA, dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA template. Konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR harus ditentukan (Handoyo and Rudiretna, 2001).

### 4. Buffer PCR dan $MgCl_2$

Reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Oleh karena itu untuk melakukan proses PCR diperlukan buffer PCR. Fungsi buffer di sini adalah untuk menjamin pH medium. Selain buffer PCR diperlukan juga adanya ion  $Mg^{2+}$ , ion tersebut berasal dari  $MgCl_2$ .  $MgCl_2$  bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polymerase. Dengan adanya  $MgCl_2$  ini akan meningkatkan interaksi primer dengan template yang membentuk kompleks larutan dengan dNTP (senyawa antara). Dalam proses PCR konsentrasi  $MgCl_2$  berpengaruh pada spesifisitas dan perolehan proses (Handoyo dan Rudiretna, 2001).



n Polimerase DNA

Enzim polymerase DNA berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA. Pada proses PCR enzim ini diperlukan untuk tahapan ekstensi DNA. Enzim polymerase DNA yang digunakan untuk proses PCR diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik oleh karena itu enzim ini bersifat termostabil sampai tempratur 95°C. Aktivitas polymerase DNA bergantung dari jenisnya dan dari mana tersebut diisolasi. Sebagai contoh adalah enzim Pfu polymerase (diisolasi dari bakteri *Pyrococcus furiosus*) mempunyai aktivitas spesifik 10x lebih kuat dibandingkan aktivitas spesifik enzim Taq polymerase (diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus*). Penggunaan jenis polymerase DNA berkaitan erat dengan buffer PCR yang dipakai (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

