

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GEN *fbpA*
PADA *Mycobacterium tuberculosis* DARI PASIEN MDR-TB
(MULTI-DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS) DI KOTA MAKASSAR**

DEDENG WAHYUDI

H041181017



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

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GEN *fbpA*
PADA *Mycobacterium tuberculosis* DARI PASIEN MDR-TB
(MULTI-DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS) DI KOTA MAKASSAR**

DEDENG WAHYUDI

H041181017



**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GEN *fbpA*
PADA *Mycobacterium tuberculosis* DARI PASIEN MDR-TB
(MULTI-DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS) DI KOTA MAKASSAR**

SKRIPSI

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



**DEDENG WAHYUDI
H041181017**

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

LEMBAR PENGESAHAN

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GEN *fbpA*
PADA *Mycobacterium tuberculosis* DARI PASIEN MDR-TB
(MULTI-DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS) DI KOTA MAKASSAR**

Disusun dan diajukan oleh:

DEDENG WAHYUDI

H041181017


Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Alam Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 4 Agustus 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Pertama


Dr. Rosana Agus, M.Si.
NIP. 19650905 199103 2 003


Helmy Widyastuti, S.Si, M.Si
NIP. 19801204 200801 2 013

Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA UNHAS


Dr. Magdalena Litaay, M. Sc.
NIP. 19640929 198903 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dedeng Wahyudi
NIM : H041181017
Program Studi : Biologi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul:

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GEN *fbpA* PADA *Mycobacterium tuberculosis*
DARI PASIEN MDR-TB (MULTI-DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS) DI
KOTA MAKASSAR

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis 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, 21 Agustus 2023

Yang menyatakan



Dedeng Wahyudi

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW sebagai suri tauladan terbaik serta *rahmatan lil alamin*, beserta keluarga, para sahabat dan seluruh umat muslim yang senantiasa istiqamah manapaki risalahnya hingga akhir zaman. Skripsi ini merupakan hasil penelitian yang diajukan untuk memenuhi syarat dalam menyelesaikan program pendidikan Sarjana (S1) pada Jurusan Biologi, fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada orang tua tercinta, Ibunda Almarhumah Pati yang telah melahirkan dan membesarkan saya dengan penuh kasih sayang, mendidik saya, dan tanpa henti mendoakan untuk kebahagiaan saya. Kepada Ayahanda Almarhum Sunardi yang senantiasa memimpin dan menafkahi keluarga kami. Semoga amal ibadah keduanya diterima disisi Allah SWT dan ditempatkan pada tempat yang terbaik. Kepada seluruh kakak laki-laki dan perempuan saya yang selalu memberikan motivasi dan mendukung perjuangan saya sampai ke titik ini sehingga saya dapat menjadi satu-satunya anak yang mampu menempuh pendidikan ke bangku kuliah di keluarga.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Dr. Rosana Agus, M.Si. selaku Pembimbing Utama dan Ibu Dr. Helmy Widyastuti, M.Si. selaku Pembimbing Pertama yang sabar meluangkan waktu, tenaga, pikirannya dari awal

hingga akhir penelitian dan penulisan skripsi ini, serta bantuan materi yang sangat membantu penulis dalam menyelesaikan tugas akhirnya. Semoga menjadi amal jariah yang senantiasa mengalir kepada keduanya.

Penulis juga mengucapkan terima kasih serta penghargaan yang tulus kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. selaku Rektor Universitas Hasanuddin, beserta jajarannya.
2. Dr. Eng. Amiruddin, M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, beserta staf pegawainya.
3. Dr. Zohra Hasyim, M.Si. selaku Penasehat Akademik selayaknya pengganti orangtua saat berada di kampus yang selalu megarahkan, membantu dan memotivasi penulis dari awal masuk kuliah sampai selesai.
4. Tim Penguji Mustika Tuwo, S.Si., S.Pd., M.Sc. dan Dr. Zohra Hasyim, M.Si. yang turut membantu dalam memberikan kritik dan saran selama proses seminar yang tentunya sangat bermanfaat bagi perbaikan skripsi ini.
5. Dr. Syahribulan, M.Si. yang telah memberikan izin mempergunakan ruangan serta memfasilitasi penulis dalam penyusunan skripsi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
6. Seluruh Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses perkuliahan. Serta staf pegawai Departemen Biologi yang turut membantu penulis dalam hal administrasi maupun memberikan dukungan.
7. Kepala Unit Tuberkulosis, HUM-RC, Rumah Sakit Universitas Hasanuddin beserta para staf dan pegawai yang telah membantu

mengarahkan dan mendampingi penulis selama proses penelitian berlangsung.

8. Teman-teman seperjuangan Biologi 2018, yang senantiasa kebersamai dikala senang dan duka selama masa perkuliahan.
9. Teman-teman Etos ID, yang menjadi tempat tumbuh dan berkembang sehingga saya dapat menggali segala potensi diri dan memiliki banyak prestasi hingga saat ini.
10. Ikhwan Masjid Kampus Ikhtiar Unhas, yang telah membukakan pintu dan menerima saya sebagai keluarga. Maskam yang telah menjadi tempat naungan saya diakhir masa perkuliahan dan bisa lebih dekat dengan Sang Pencipta, manis pahit dalam menuntut ilmu dan melayani jamaah, dan segala memori berharga yang membuat hidup saya lebih bermakna. Semoga tetap istiqomah dan kelak dipertemukan kembali di surga-Nya.

Dengan ini saya mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada semua pihak yang terlibat, baik yang disebutkan maupun yang tidak sempat saya sebutkan. Semoga skripsi yang sederhana ini dapat memenuhi harapan dan ikut serta membantu kearah kemajuan pendidikan dan bermanfaat bagi orang yang banyak, dan semoga kita senantiasa mendapatkan hidayah-Nya sehingga menjadi keberkahan di dunia dan akhirat kelak. *Aamiin Allahumma Aamiin.*

Makassar, 10 Juli 2023

Penulis

ABSTRAK

Berbagai upaya telah dilakukan dalam mengatasi penyakit TB (Tuberkulosis) termasuk penggunaan antibiotik, namun pada beberapa kasus terjadi resistensi obat. Biomarker pengobatan dapat menjadi alternatif untuk mendiagnosis pasien telah sembuh total atau belum sembuh dari penyakit TB. Gen *fbpA* memiliki peranan dalam pelekatan *Mycobacterium tuberculosis* terhadap jaringan manusia oleh karena itu gen *fbpA* berpotensi untuk dijadikan sebagai biomarker pengobatan. Penelitian mengenai Isolasi dan Identifikasi Gen *fbpA* pada *Mycobacterium tuberculosis* dari Pasien MDR-TB (*Multi-Drug Resistant Tuberculosis*) di Kota Makassar telah dilakukan pada bulan Maret – April 2023 di Unit Tuberkulosis HUM-RC (*Hasanuddin University Medical Research Center*), Rumah Sakit Universitas Hasanuddin, Makassar. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengisolasi dan mengidentifikasi gen *fbpA* dari sampel sputum pasien MDR-TB. Adapun manfaat penelitian dapat mengetahui potensi gen *fbpA* sebagai biomarker pengobatan terhadap TB dengan deteksi gen *fbpA* 900 bp dan sebagai referensi tambahan untuk penelitian dan analisis terkait gen *fbpA* yang akan datang. Dalam penelitian ini digunakan 10 sampel sputum yang diperoleh dari Unit Tuberkulosis HUM-RC, Rumah Sakit Universitas Hasanuddin, Makassar. Metode yang digunakan terdiri atas dekontaminasi sampel sputum, pewarnaan ZN (Ziehl-Neelsen) dan pemeriksaan BTA (Bakteri Tahan Asam), isolasi DNA, amplifikasi gen *fbpA* dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*), dan elektroforesis gel produk PCR. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan adanya terbentuk pita (*band*) DNA yang terbentuk pada setiap sampel dengan ketebalan atau terang yang berbeda-beda karena faktor dari konsentrasi DNA yang dikandungnya.

Kata kunci: *Isolasi, Identifikasi, Gen fbpA, MDR-TB, PCR, Elektroforesis*

ABSTRACT

Various efforts have been made in overcoming TB (Tuberculosis) disease including the use of antibiotics, but in some cases drug resistance occurs. Biomarker treatment can be an alternative to diagnose patients who have fully recovered or have not recovered from TB disease. The *fbpA* gene has a role in the attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to human tissue, therefore the *fbpA* gene has the potential to be used as a biomarker treatment. Research on the Isolation and Identification of the *fbpA* Gene in *Mycobacterium tuberculosis* from MDR-TB (Multi-Drug Resistant Tuberculosis) Patients in Makassar City was conducted in March – April 2023 at the HUM-RC Tuberculosis Unit (Hasanuddin University Medical Research Center), Universitas Hasanuddin Hospital, Makassar. This study aimed to isolate and identify the *fbpA* gene from sputum samples of MDR-TB patients. The benefit of this research is to know the potential of the *fbpA* gene as a biomarker for the treatment of TB (tuberculosis) by detecting the 900 bp *fbpA* gene and as an additional reference for future research and analysis related to the *fbpA* gene. In this study there were 10 sputum samples that obtained from the HUM-RC Tuberculosis Unit, Universitas Hasanuddin Hospital, Makassar. The method used consisted of sputum sample decontamination, ZN staining (Ziehl-Neelsen) and AFB (Acid-Fast Bacteria) examination, DNA isolation, *fbpA* gene amplification using PCR (Polymerase Chain Reaction) technique, and gel electrophoresis of PCR products. The results obtained from this study indicated that there were DNA bands formed in each sample with different thickness or brightness due to the concentration of DNA it contains.

Key word: *Isolation, Identification, fbpA Gene, MDR-TB, PCR, Electrophoresis*

DAFTAR ISI

Halaman Sampul Depan.....	i
Halaman Judul	ii
Halaman Pengajuan.....	iii
Halaman Pengesahan Skripsi.....	iv
Pernyataan Keaslian Penelitian	v
Kata Pengantar.....	vi
Abstrak.....	ix
Abstract.....	x
Daftar Isi	xi
Daftar Gambar	xiv
Daftar Tabel.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
1.4 Waktu dan Tempat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.1.1 Klasifikasi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.1.2 Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.1.3 Sifat Pertumbuhan <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
2.1.4 Patogenesis <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
2.1.5 Respon Imun terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11

2.1.6 Fase Infeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
2.1.7 Diagnosis Tuberkulosis	16
2.1.8 Pengobatan Tuberkulosis.....	18
2.2 Pasien MDR-TB (<i>Multi-Drug Resistant Tuberculosis</i>).....	20
2.3 Biomarker Pengobatan	22
2.4 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	23
2.5 Genom dan Gen <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
2.5.1 Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
2.5.2 Gen <i>fbpA</i> sebagai Gen Target	27
BAB III METODOLOGI	33
3.1 Alat	33
3.2 Bahan.....	33
3.3 Prosedur Penelitian.....	33
3.3.1 Kriteria Sampel.....	33
3.3.2 Dekontaminasi Sampel Sputum.....	34
3.3.3 Pewarnaan ZN dan Pemeriksaan BTA	35
3.3.4 Isolasi DNA	37
3.3.5 Amplifikasi Gen <i>fbpA</i> dengan Teknik PCR.....	38
3.3.6 Elektroforesis Gel Produk PCR	39
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
4.1 Preparasi Sampel	41
4.2 Dekontaminasi Sampel Sputum	42
4.3 Pewarnaan ZN dan Pemeriksaan BTA	43
4.4 Isolasi DNA	46
4.5 Amplifikasi Gen <i>fbpA</i> dengan Teknik PCR.....	48

4.6 Elektroforesis Gel Produk PCR.....	51
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	58
5.1 Kesimpulan.....	58
5.2 Saran.....	58
Daftar Pustaka.....	59
Lampiran	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
Gambar 2.2 Skematik komponen utama dinding sel <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
Gambar 2.3 Gambaran skematik dari dinding sel <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
Gambar 2.4 Model kapsul mikobakteri dan transfer lipid	8
Gambar 2.5 Pewarnaan <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dengan metode ZN perbesaran objektif 100X.....	9
Gambar 2.6 Ilustrasi penyebaran <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dari penderita TB kepada orang sehat.....	10
Gambar 2.7 Mekanisme respon imun bawaan terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
Gambar 2.8 Perjalanan alamiah penyakit dan spektrum TB.....	15
Gambar 2.9 Tahapan pengobatan TB.....	19
Gambar 2.10 Tahapan PCR.....	24
Gambar 2.11 Peta melingkar kromosom <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strain H37Rv	26
Gambar 2.12 Lokasi protein Ag85A (gen <i>fbpA</i>) di ruang periplasma pada sel bakteri	28
Gambar 2.13 Peta plasmid melingkar gen <i>fbpA</i>	28
Gambar 2.14 Struktur 3D dari gen <i>fbpA</i>	30
Gambar 4.1 Hasil dekontaminasi sampel sputum.....	42
Gambar 4.2 Hasil pewarnaan ZN bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dari	

sampel sputum dan pemeriksaan BTA pada sampel dengan kategori 3+ (a), sampel dengan kategori 2+ (b), dan sampel kontrol negatif (c)	44
Gambar 4.3 Hasil isolasi DNA dari sampel sputum	47
Gambar 4.4 Hasil BLAST primer forward gen fbpA	49
Gambar 4.5 Hasil BLAST primer reverse gen fbpA.....	49
Gambar 4.6 Hasil visualisasi elektroforesis gel	51
Gambar 4.7 Ukuran DNA marker dengan merek Geneaid	51

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Daftar sampel sputum yang diperoleh dari Unit Tuberkulosis

HUM-RC Rumah Sakit Universitas Hasanuddin 41

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) ialah pemicu utama morbiditas serta mortalitas di seluruh dunia. TB merupakan penyakit yang diakibatkan oleh bakteri patogen yaitu *Mycobacterium tuberculosis* yang menyerang paru-paru, namun bakteri ini juga dapat menyerang fungsi otak, tulang belakang dan ginjal. Sebanyak 1,5 juta orang meninggal karena TB pada tahun 2020 (termasuk 214.000 orang dengan HIV). Di seluruh dunia, TB adalah penyebab kematian ke-13 dan pembunuh menular nomor dua setelah COVID-19 (di atas HIV/AIDS). Berdasarkan data WHO (*World Health Organization*) tahun 2022 jumlah kasus TB di dunia sebesar 10.6 juta kasus, negara dengan peringkat beban kasus TB tertinggi di dunia ditempati oleh India dengan estimasi total penderita 2.5 juta jiwa, Cina 842 ribu jiwa, dan Indonesia 824 ribu jiwa (WHO, 2022).

Di negara Indonesia sendiri berdasarkan data dari Kemenkes RI tahun 2022 jumlah kasus TB yang ditemukan dan diobati di Indonesia tercatat sebanyak 258.355 kasus. Kasus ini menurun jika dibandingkan dengan seluruh kasus TB yang tercatat pada tahun 2021 yakni 443.235 kasus (Kemenkes RI, 2022). Sementara data laporan Dinas Kesehatan Provinsi Sulawesi Selatan tahun 2021 mencatat terdapat 31.022 estimasi kasus TB di Sulsel, di mana baru sebanyak 14.808 kasus yang jika dipersentasikan hanya 47,73%. Artinya, masih ada sekitar 53% yang tidak diketahui keberadaannya di tengah ancaman penularan yang juga besar (Dinkes Prov. Sulsel, 2022). Berdasarkan data yang dihimpun dari Dinas Kesehatan Kota

Makassar, penderita TB pada tahun 2020 mencapai 3.250 kasus, dengan angka kesembuhan 85% dan pada tahun 2021 kembali melonjak menjadi 3.911 kasus (Dinkes Kota Makassar, 2022).

Dari banyaknya kasus TB maka berbagai macam upaya telah dilakukan untuk menangani penyakit ini. Penggunaan obat antibiotik sudah menjadi hal umum dan paling banyak digunakan dalam pengobatan TB. Tetapi pada beberapa kasus terjadi resistensi antibiotik terhadap *Mycobacterium tuberculosis* karena akumulasi mutasi pada gen yang menjadi target antibiotik atau perubahan titrasi obat. Penderita atau pasien TB yang tidak disiplin dalam menjalani pengobatan TB akan rentan mengalami resistensi antibiotik sehingga dapat mengakibatkan MDR-TB (*Multi Drug-Resistant Tuberculosis*). MDR-TB adalah kondisi ketika pasien TB mengalami resistensi atau kebal obat antibiotik khususnya antibiotik rifampisin dan isoniazid yang merupakan obat lini pertama. Pada kasus yang lebih parah, TB dapat berkembang menjadi XDR-TB (*Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*) merupakan suatu kondisi dimana pasien kebal terhadap rifampisin dan isoniazid, ditambah fluoroquinolone dan setidaknya satu dari tiga obat lini kedua yang dapat disuntikkan (yaitu, amikacin, kanamycin, atau capreomycin) (CDC, 2022).

Dalam mengatasi masalah penyakit TB diperlukan pengobatan penyakit ini sebagai langkah optimal yang dapat diterapkan pada masyarakat. Salah satu cara dalam menangani penyakit TB dengan menggunakan biomarker sebagai pendeteksi untuk mengetahui apakah individu positif menderita penyakit TB. Pengobatan yang optimal sejak dini tidak hanya akan meningkatkan tingkat kesembuhan seorang pasien, tetapi juga akan mengurangi jumlah kasus TB di masa mendatang.

Biomarker pengobatan dengan menggunakan teknik spesifik pada pasien berstatus MDR-TB dilakukan untuk mengetahui apakah pasien tersebut sudah sembuh total atau belum. Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah teknik yang dapat digunakan dalam mengisolasi dan melakukan identifikasi gen. Salah satu gen yang berpotensi sebagai biomarker pengobatan adalah gen *fbpA*. Gen *fbpA* merupakan salah satu gen dari protein Ag85A (*Antigen 85 complex A*)/DGAT (*Diacylglycerol acyltransferase*) yang bertanggung jawab atas afinitas tinggi mikobakteri terhadap fibronektin, suatu glikoprotein perekat besar yang memfasilitasi perlekatan *Mycobacterium tuberculosis* ke murine AMs (*Alveolar macrophages*) (Uniprot, 2022). Gen *fbpA* terdapat pada lokus Rv3804c tepatnya di ruang periplasma membran sel bakteri. Gen *fbpA* memiliki fungsi sebagai enzim transferase (*acyltransferase*) yaitu mengkatalisis transfer gugus asil- (RCO-) ke senyawa lain. Sel yang kekurangan gen ini biasanya menghasilkan komponen dinding sel bermikoloilasi (Uniprot, 2022). Asam mikolat pada dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* diketahui berfungsi sebagai pertahanan bakteri dari kekeringan serta menjadi salah satu faktor virulensi dari penyakit TB (Murray, *et al.*, 2020).

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian mengenai isolasi dan identifikasi gen *fbpA* dari pasien MDR-TB di Kota Makassar dilakukan. Dalam penelitian ini menggunakan teknik PCR dimulai dari amplifikasi DNA *Mycobacterium tuberculosis* hingga visualisasi hasil PCR dengan elektroforesis. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai biomarker pengobatan untuk mengetahui sembuh atau belum sembuhnya seorang pasien TB dengan menyelidiki keberadaan gen *fbpA* yang menjadi faktor virulensi dari penyakit TB.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi gen *fbpA* dari pasien MDR-TB di Kota Makassar.

1.3 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini yaitu:

1. Untuk mengetahui potensi gen *fbpA* sebagai biomarker pengobatan untuk penyakit TB dengan mendeteksi gen *fbpA* 900 bp.
2. Sebagai referensi tambahan bagi penelitian dan analisis terkait gen *fbpA* yang akan dilakukan kedepannya.

1.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret hingga April 2023 di Unit Tuberkulosis HUM-RC (*Hasanuddin University Medical Research Center*), Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Kota Makassar, Sulawesi Selatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

2.1.1 Klasifikasi *Mycobacterium tuberculosis*

Klasifikasi bakteri berdasarkan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994), determinasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Prokaryote</i>
Divisi	: <i>Cyanobacteria</i>
Ordo	: <i>Actinomycetales</i>
Famili	: <i>Mycobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Mycobacterium</i>
Spesies	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

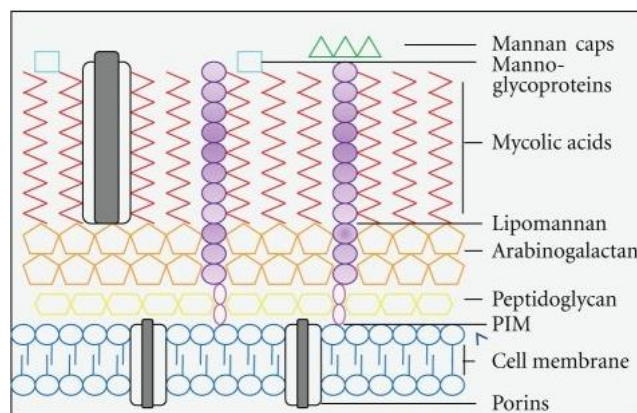
2.1.2 Morfologi *Mycobacterium tuberculosis*



Gambar 2.1 Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Agapova, *et al.*, 2019).

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri yang memiliki bentuk batang yang ukurannya berkisar 1-4 μm dan tebalnya 0,3–0,6 μm seperti pada Gambar 2.1. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri basil tahan asam, yang bersifat

nonmotil dan aerob obligat yang tidak membentuk spora. Bakteri ini dapat bertahan hidup pada udara yang kering maupun udara dingin sehingga bersifat dorman yang dapat hidup kembali menjadi penyakit TB yang aktif. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri jenis Gram positif yang berukuran sangat kecil, dengan dinding yang tebal dan kaya akan zat lilin (terbuat dari peptidoglikan), hal ini yang mengakibatkan keberadaan bakteri ini bersifat hidrofobik di alam (Lamichhane, 2018).

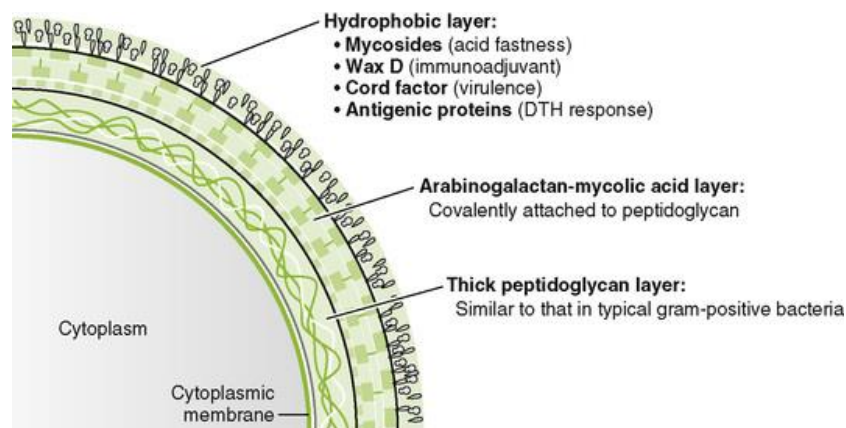


Gambar 2.2 Skematik komponen utama dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* dan sebaran setiap komponen (Kleinnijenhuis, 2011 dalam Nugraha, 2016).

Struktur dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* pada Gambar 2.2 sangat berbeda dengan bakteri lainnya, bakteri jenis ini dapat tumbuh dengan cepat dalam keadaan asam dan lambat ketika berada di alam (Lamichhane, 2018). Sifat tahan asam ini tergantung pada integritas selubung yang terbuat dari lilin. Dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* terdiri dari tiga komponen utama yaitu asam mikolat, *cord factor* dan *wax-D* seperti yang terlihat pada Gambar 2.3. Asam mikolat adalah lipid bercabang alfa unik yang ditemukan di dinding sel *Mycobacterium* dan *Corynebacterium*. Asam mikolat membentuk 50% dari berat kering selubung sel mikobakteri. Asam mikolat adalah molekul hidrofobik kuat yang membentuk

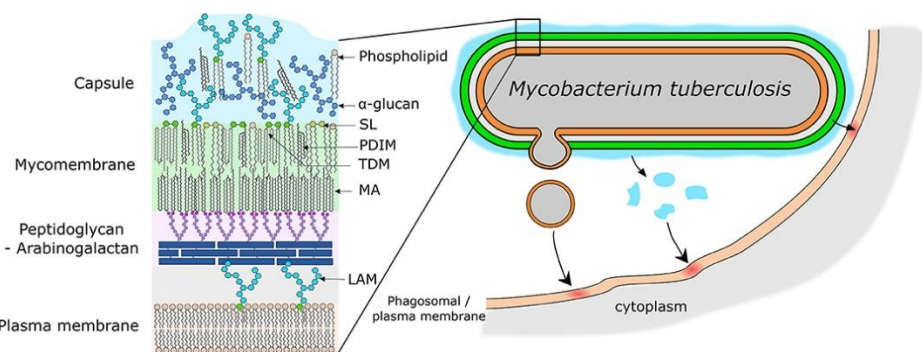
cangkang lipid di sekitar bakteri dan mempengaruhi sifat permeabilitas pada permukaan sel. Asam mikolat dianggap sebagai penentu virulensi yang signifikan pada *Mycobacterium tuberculosis* karena dapat mencegah serangan mikobakteri oleh protein kationik, lisozim, dan oksigen radikal dalam granul fagositik.

Asam mikolat juga mampu melindungi mikobakteri ekstraseluler dari pengendapan komplemen dalam serum. *Cord factor* bertanggung jawab atas *serpentine cording*. "*Cording*" adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan penampilan *Mycobacterium* yang berkelok-kelok dalam kultur media cair sebagai ciri khas yang menyebabkan karakteristik pertumbuhan bakteri ini dapat diekstraksi dan diidentifikasi oleh para ahli mikrobiologi dan dokter spesialis penyakit menular. *Cord factor* bersifat toksik bagi sel mamalia dan penghambat migrasi sistem imun. *Cord factor* banyak diproduksi pada strain virulen *Mycobacterium tuberculosis*. *Wax-D* dalam selubung sel adalah komponen utama dari FCA (*Freund's complete adjuvant*). *Wax-D* merupakan kompleks lipid yang disusun oleh LAM (*Liparabinomannan*), sulfatida, dan glikolipid dan berperan penting dalam mencegah ledakan oksidasi di dalam fagosom. Sulfatida dan glikolipid membantu *Mycobacterium tuberculosis* menempel pada makrofag dan dengan demikian menghambat fusi lisosom fagosom (Todar, 2020).



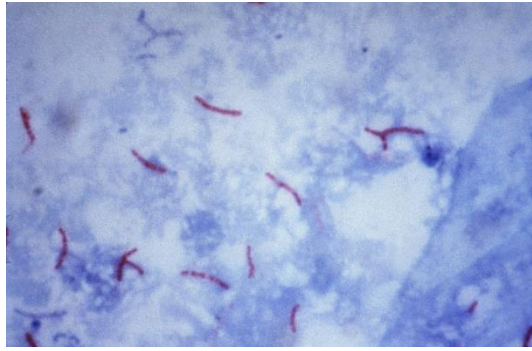
Gambar 2.3 Gambaran skematik dari dinding sel mikobakteri yang terdiri dari tiga lapisan utama (OncoHEMA, 2016).

Kapsul luar dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* pada Gambar 2.4 terdiri dari protein, glukan dan sedikit lemak. Dinding sel terdiri dari MM luar (*mycomembrane*), AG (*arabinogalactan*) dan PG (*inner peptidoglycan*). MM memiliki dua lapisan, bagian luar terdiri dari lipid seperti fosfolipid, *trehalose mycolates*, *glycopeptidolipids*, *lipoglycans* dan lapisan bagian dalam tersusun dari *long chain MA (mycolic acid)* (Andriani, 2022).



Gambar 2.4 Model kapsul mikobakteri dan transfer lipid (Augenstreich dan Briken, 2020).

Mycobacterium tuberculosis adalah bakteri asidorezisten yang berarti tahan asam dan tidak dapat diwarnai dengan metode pewarnaan Gram tradisional, sehingga bakteri ini tidak dapat diklasifikasikan sebagai bakteri Gram positif atau Gram negatif. *Mycobacterium tuberculosis* diklasifikasikan sebagai BTA (Bakteri Tahan Asam) yang sifat asamnya tergantung pada integritas selubung dinding selnya (Ervina, 2019). Pewarnaan asam dapat menggunakan metode seperti pewarnaan ZN (*Ziehl-Neelsen*) atau fluoresensi menggunakan *auramin-rhodamine* dapat digunakan untuk mengidentifikasi *Mycobacterium tuberculosis* di bawah mikroskop. Metode ZN merupakan pewarnaan umum yang melibatkan penggunaan pewarnaan seperti *carbol fuchsin* dan *methylene blue* sehingga bakteri akan tampak berwarna merah dengan latar belakang biru seperti yang terlihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Pewarnaan *Mycobacterium tuberculosis* dengan metode ZN perbesaran objektif 100X (Jewetz, 2008 dalam Ervina, 2019).

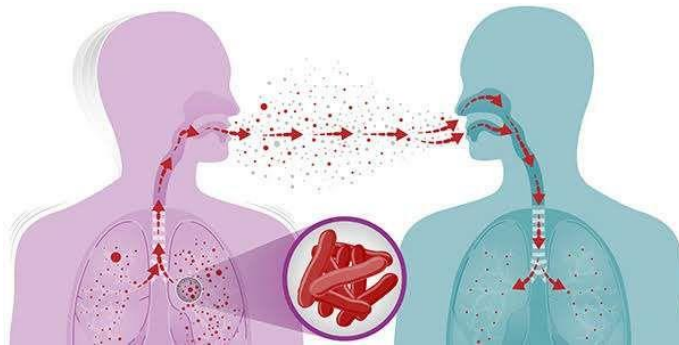
2.1.3 Sifat Pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis dapat mati jika terkena cahaya matahari langsung selama dua jam karena bakteri ini tidak tahan terhadap sinar ultraviolet. *Mycobacterium tuberculosis* mudah menular, mempunyai daya tahan tinggi dan mampu bertahan hidup beberapa jam ditempat gelap dan lembab. Oleh karena itu, dalam jaringan tubuh bakteri ini dapat dorman (tidur), tertidur lama hingga beberapa tahun. Dalam dahak dapat bertahan 20-30 jam. Basil yang berada dalam percikan bahan dapat bertahan hidup 8-10 hari. Biakan bakteri ini dalam suhu kamar dapat hidup 6-8 bulan dan dapat disimpan dalam lemari dengan suhu 20 °C selama 2 tahun. Diketahui bahwa pH optimal untuk pertumbuhannya adalah 6,8-8,0 (Wahdi dan Puspitosari, 2021).

Mycobacterium tuberculosis bersifat aerob obligat dan mendapatkan energi dari oksidasi banyak komponen karbon sederhana. Peningkatan CO₂ mendukung pertumbuhan bakteri ini. Waktu replikasi *Mycobacterium tuberculosis* sekitar delapan belas jam. Bentuk saprofitik cenderung untuk tumbuh lebih cepat, untuk berproliferasi dengan baik pada suhu 22-23°C, untuk memproduksi pigmen, dan tidak terlalu bersifat tahan asam bila dibandingkan dengan bentuk patogennya (Ervina, 2019).

2.1.4 Patogenesis *Mycobacterium tuberculosis*

Gambar 2.6 mengilustrasikan patogenesis TB dimulai dari masuknya bakteri sampai timbulnya berbagai gejala klinis. Siklus hidup dari *Mycobacterium tuberculosis* di dalam tubuh dapat menginfeksi seseorang dan menginduksi sistemik kekebalan tubuh yang menyebabkan susah untuk disembuhkan hingga akhirnya dapat mengakibatkan infeksi TB paru yang aktif baik melalui reaktivasi maupun infeksi ulang yang berlanjut sehingga menghasilkan rongga di paru-paru, sebelum akhirnya di tularkan ke lingkungan sekitarnya. Seseorang yang memiliki rongga dinding yang lebih tipis akan dilapisi oleh membran yang besar sehingga sebagian besar dapat disembuhkan atau penularan parasit dapat berkurang (Hunter, 2018).



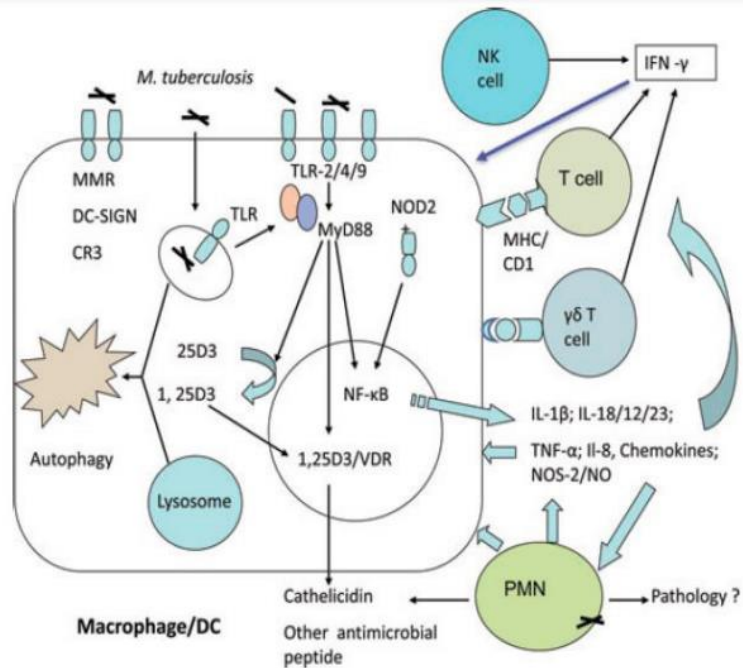
Gambar 2.6 Ilustrasi penyebaran *Mycobacterium tuberculosis* dari penderita TB kepada orang sehat (Mertaniasih, *et al.*, 2021).

Mycobacterium tuberculosis terdapat dalam droplet berdiameter 1-10 μm di udara yang berasal dari orang yang sudah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* lewat batuk, bersin maupun berbicara. Droplet yang mengandung mikrobakteri ini dapat berada pada udara selama beberapa jam yang kemudian akan terinhalasi oleh orang sehat dan masuk ke dalam sistem pernapasan (Silitonga, *et al.*, 2019). Penderita TB paru berisiko dapat menularkan penyakit pada orang yang berada di sekelilingnya, terutama orang yang memiliki kontak erat dengan penderita

(Deliananda dan Azizah, 2022). Masa inkubasi, yaitu waktu yang diperlukan sejak masuknya bakteri hingga timbulnya gejala penyakit. Masa inkubasi TB biasanya berlangsung dalam waktu 4-8 minggu dengan rentang waktu antara 2-12 minggu. Dalam masa inkubasi tersebut, bakteri tumbuh hingga mencapai jumlah 10³-10⁴, yaitu jumlah yang cukup untuk merangsang respon imunitas seluler (Ervina, 2019).

2.1.5 Respon Imun terhadap *Mycobacterium tuberculosis*

Ketika terjadi paparan oleh *Mycobacterium tuberculosis* pada manusia, maka hal ini akan menginduksi terjadinya suatu serangkaian respon imun seperti yang terlihat pada Gambar 2.7. Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* paling utama dikontrol oleh aktivasi makrofag yang diinduksi terlebih dahulu oleh sitokin tipe T-helper-1. Ketika bakteri mengalami kontak dengan manusia makrofag maka akan terjadi proses fagositosis. Namun pada beberapa penelitian juga terbukti bahwa *Mycobacterium tuberculosis* dapat hidup dan bermultiplikasi di dalam makrofag (Silitonga, *et al.*, 2019). Makrofag yang tidak mampu membunuh bakteri TB akan mengalami lisis dan *Mycobacterium tuberculosis* akan membentuk koloni. Lokasi pertama koloni kuman TB di jaringan paru disebut fokus primer Ghon (Ervina, 2019). Memungkinan juga bahwa *Mycobacterium tuberculosis* awalnya diingesti oleh pneumosit tipe II, yang mana sel ini ditemukan jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan makrofag pada jaringan paru-paru. Selain makrofag, sel dendritik juga dapat bertindak sebagai penyaji antigen dan dapat mengaktivasi sel T dengan antigen spesifik terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Namun pada beberapa penelitian, sel dendritik juga memegang peranan dalam menyebarkan *Mycobacterium tuberculosis* dari paru ke organ lainnya (Silitonga, *et al.*, 2019).



Gambar 2.7 Mekanisme respon imun bawaan terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (Syafa'ah dan Yudhawati, 2016).

Respon imun lain seperti IFN- γ (*interferon-gamma*) dan TNF- α (*tumour necrosis factor-alpha*) juga mempunyai suatu peran yang krusial pada proses aktivasi makrofag dan induksi iNOS (*nitric oxide synthetase*). Produksi iNOS ini dapat membunuh mikrobakteri intraselular sedangkan untuk respon imun adaptif sendiri, pada beberapa penelitian dibuktikan bahwa respon imun adaptif terhadap *Mycobacterium tuberculosis* lebih lambat dibandingkan dengan respon imun adaptif terhadap penyebab infeksi lainnya. Hal ini menyebabkan populasi mikrobakteri ini pada paru-paru meningkat selama fase infeksi preimun. Padahal respon imun tubuh terhadap TB lebih bergantung dan terbukti lebih efektif pada limfosit T CD4 (*cluster of differentiation 4*). Terbukti juga respon imun adaptif terhadap *Mycobacterium tuberculosis* tidak muncul pada jaringan paru-paru meskipun paru-paru merupakan pusat infeksi awal. Respon imun adaptif ini pertama muncul pada nodus limfatikus di mediastinal. Pada penelitian sebelumnya

juga terbukti bahwa sel T CD4 pada nodus limfatikus akan mulai bergerak menuju paru-paru. Proses yang tertunda inilah yang membantu perluasan populasi *Mycobacterium tuberculosis* di paru-paru.

Tanda dari seorang penderita TB aktif adalah terdapat dominasi ekspresi yang berlebihan dari gen induksi interferon yaitu *signal interferon* tipe I dan tipe II, gen mieloid dan gen inflamasi serta terdapat juga penurunan dari gen yang mengodekan fungsi sel B dan sel T. *Mycobacterium tuberculosis* dapat menyebabkan lesi (kerusakan, pertumbuhan, atau perubahan tidak normal) pada jaringan tubuh manusia. Terdapat dua jenis lesi akibat infeksi TB. Pertama ada tipe eksudatif, dimana terjadi inflamasi akut dengan kumpulan cairan edema, leukosit polimorfonuklear, dan monosit yang mengelilingi mikrobakteri ini. Tipe ini dapat sembuh dengan eksudat yang ada diabsorpsi namun akan meninggalkan jaringan nekrosis. Tipe yang kedua adalah tipe proliferasi yaitu lesi yang berisi granuloma kronik yang terdiri dari sel raksasa multinukleasi berisi *Mycobacterium tuberculosis*, sel epiteloid, dan fibroblast, limfosit serta monosit.

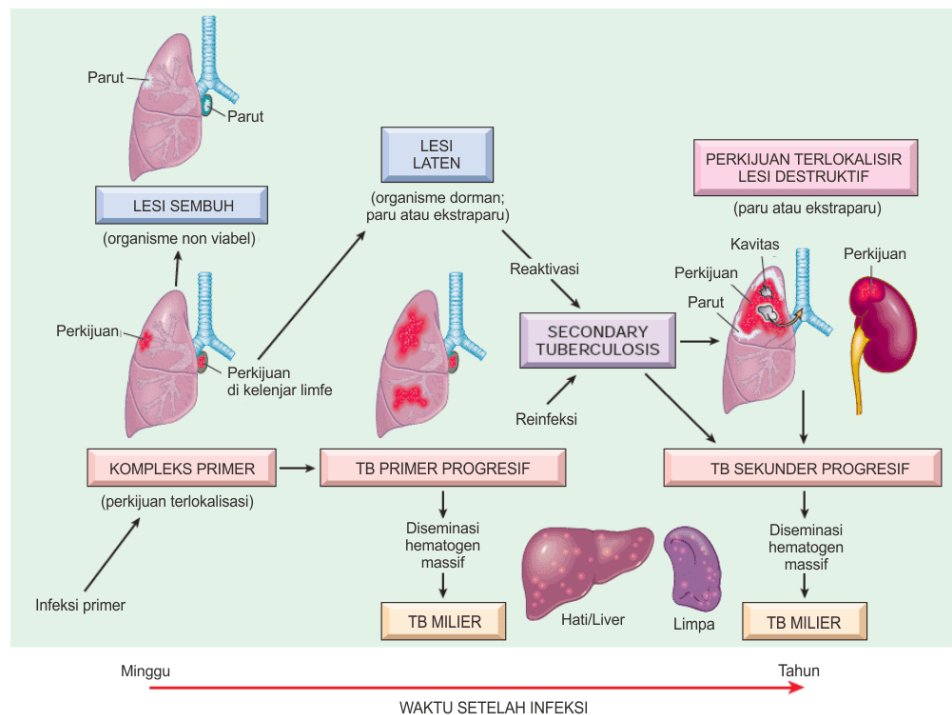
Salah satu cara untuk terhindar dari terkenanya penyakit TB dengan sistem pertahanan tubuh yaitu sistem imun. Sistem imun yang berada di tubuh sangat penting dalam pertahanan terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Sel imun bawaan (*innate immunity*) di paru-paru, terutama makrofag, sel dendritik, monosit, dan neutrofil, siap memfagosit *Mycobacterium tuberculosis* dan merupakan pertahanan paling awal melawan patogen (Sia dan Rengarajan, 2019). Berbagai manifestasi yang timbul akibat infeksi *Mycobacterium tuberculosis* menggambarkan adanya keseimbangan antara bakteri dengan mekanisme pertahanan tubuh host dimana mekanisme pertahanan tubuh host sangat menentukan hasil akhir yang dapat

ditimbulkan. Terdapat peran penting dari makrofag sebagai eksekutor nonspesifik dan sel T sebagai mediator spesifik dalam menghancurkan *Mycobacterium tuberculosis*. Fagositosis, pengenalan oleh sistem imun, produksi sitokin dan mekanisme efektor merupakan peran dari sel imun bawaan. Makrofag yang teraktivasi oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis* memproduksi sitokin tipe 1 seperti IL-12, IL-18, IL-23. Sekresi IL-12 dari makrofag merupakan awal dari regulasi respon imun, bertindak sebagai *sitokin proinflamatory* yang dapat merangsang produksi IFN- γ oleh sel Th1 (*T helper 1*) dan sel NK (*Natural Killer*) yang dapat meningkatkan aktivasi makrofag dalam menghadapi infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Respon imun limfosit T dimulai saat TB menyebar didalam kelenjar getah bening, limfosit T menjalani proses aktivasi dan perluasan populasi spesifik untuk antigen *Mycobacterium tuberculosis* (Martino, *et al.*, 2019).

2.1.6 Fase Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

TB mempunyai fase pada saat menyebabkan penyakit pada manusia. Ketika orang sehat mengalami kontak awal dengan *Mycobacterium tuberculosis* dan terjadi fagositosis oleh makrofag seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, fase ini disebut infeksi TB primer. Pada fase inilah terbentuk lesi pada paru-paru. Fase primer ini kemudian dapat berlanjut menjadi tiga kemungkinan yaitu sembuh sama sekali tanpa meninggalkan cacat, sembuh dengan meninggalkan sedikit bekas berupa garis-garis fibrotik atau kalsifikasi, dan kemungkinan yang terakhir adalah TB akan menimbulkan komplikasi dan menyebar. Penyebaran TB ini dapat melalui perkontinuitatum, lewat bronkus ke paru sebelahnya atau bisa tertelan dan menyerang usus, secara limfogen dan juga dapat secara hematogen ke organ tubuh lain (Silitonga, *et al.*, 2019).

Bakteri yang bersarang di jaringan paru akan berbentuk sarang TB pneumonia kecil dan disebut sarang primer atau efek primer atau sarang (*focus*) ghon. Dari sarang primer akan timbul peradangan saluran getah bening menuju hilus (limfangitis lokal), dan juga diikuti pembesaran kelenjar getah bening hilus (limfadenitis regional). Sarang primer limfangitis lokal dan limfadenitis regional akan menyebabkan kompleks primer (*ranke*). Semua proses ini memakan waktu 3-8 minggu (Wahyu, 2019). Fase infeksi TB yang kedua adalah fase pasca primer atau fase reaktivasi. Bakteri yang dorman pada TB primer akan menimbulkan kejadian reinfeksi pada penderita. Pada fase ini lesi-lesi akan mulai muncul kembali pada paru-paru. Timbulnya reaktivasi ini dapat dipengaruhi oleh imunitas yang menurun. Pada fase ini akan timbul gejala yang berat pada penderita (Silitonga, *et al.*, 2019). Perkembangan fase infeksi dari *Mycobacterium tuberculosis* dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Perjalanan alamiah penyakit dan spektrum TB (Caiherang, 2022).

Manifestasi klinis yang dapat muncul pada penderita TB antara lain lelah, kelemahan, penurunan berat badan, demam, batuk berdarah, sesak napas, nyeri dada dan keluhan berkeringat pada malam hari sedangkan pada pemeriksaan fisik kadang tidak menunjukkan tanda yang spesifik terhadap pasien TB. Pemeriksaan penunjang yang biasa digunakan untuk mendeteksi TB adalah foto rontgen dada. Pemeriksaan rontgen dada ini dapat menunjukkan adanya *infiltrate* pada paru. Namun, standar terbaik untuk mendiagnosis TB adalah dengan melakukan kultur pada sputum pasien (Silitonga, *et al.*, 2019).

2.1.7 Diagnosis Tuberkulosis

Dalam buku Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata laksana Tuberkulosis Tahun 2020 yang diterbitkan oleh Kementerian Kesehatan, semua pasien yang diduga mengidap TB harus menjalani pemeriksaan bakteriologis untuk mengkonfirmasi penyakit TB. Pemeriksaan bakteriologis merujuk pada pemeriksaan apusan dari sediaan biologis (dahak atau spesimen lain), pemeriksaan biakan dan identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* atau metode diagnostik cepat yang telah mendapat rekomendasi WHO. Pemeriksaan biakan dan uji kepekaan dapat dilakukan dengan 2 metode:

1. Metode konvensional uji kepekaan obat

Pemeriksaan biakan *Mycobacterium tuberculosis* dapat dilakukan menggunakan 2 macam media yaitu media padat LJ (*Lowenstein Jensen* atau Ogawa) dan media cair MGIT (*Mycobacterium growth indicator tube*). Biakan *Mycobacterium tuberculosis* pada media cair memerlukan waktu yang singkat minimal 2 minggu, lebih cepat dibandingkan biakan pada medium padat yang memerlukan waktu 28-42 hari.

2. Metode cepat uji kepekaan obat (uji diagnostik molekular cepat)

Pemeriksaan molekular untuk mendeteksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* saat ini merupakan metode pemeriksaan tercepat yang sudah dapat dilakukan di Indonesia. Metode molekular dapat mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* dan membedakannya dengan NTM (*Non-Tuberculous Mycobacteria*). Selain itu metode molekular dapat mendeteksi mutasi pada gen yang berperan dalam mekanisme kerja OAT (Obat Anti Tuberkulosis) lini 1 dan lini 2. WHO merekomendasikan penggunaan Xpert MTB/RIF (*Mycobacterium tuberculosis/rifampicin resistance*) untuk deteksi resistan rifampisin. Resistan OAT lini 2 direkomendasikan untuk menggunakan SL-LPA (*second line line probe assay*) yang dapat mendeteksi resistensi terhadap OAT injeksi dan golongan fluorokuinolon. Pemeriksaan molekular untuk mendeteksi gen pengkode resistensi OAT lainnya saat ini dapat dilakukan dengan metode sekuensing, yang tidak dapat diterapkan secara rutin karena memerlukan peralatan mahal dan keahlian khusus dalam menganalisisnya. WHO telah merekomendasi pemeriksaan molekular LPA (*line probe assay*) dan TCM (Tes Cepat Molekular), langsung pada spesimen sputum.

Pemeriksaan dengan TCM dapat mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* dan gen pengkode resistan rifampisin *rpoB* (*RNA Polymerase β -Subunit*) pada sputum kurang lebih dalam waktu dua jam. Konfirmasi hasil uji kepekaan OAT menggunakan metode konvensional masih digunakan sebagai baku emas (*gold standard*). Penggunaan TCM tidak dapat menyingkirkan metode biakan dan uji kepekaan konvensional yang

diperlukan untuk menegakkan diagnosis definitif TB, terutama pada pasien dengan pemeriksaan mikroskopis apusan BTA (Bakteri Tahan Asam) negatif, dan uji kepekaan OAT untuk mengetahui resistensi OAT selain rifampisin. Pada kondisi tidak berhasil mendapatkan sputum secara ekspektorasi spontan maka dapat dilakukan tindakan induksi sputum atau prosedur invasif seperti bronkoskopi atau torakoskopi. Pemeriksaan tambahan pada semua pasien TB yang terkonfirmasi bakteriologis maupun terdiagnosis klinis adalah pemeriksaan HIV dan gula darah. Pemeriksaan lain dilakukan sesuai indikasi misalnya fungsi hati, fungsi ginjal, dan lain-lain.

Pemeriksaan dahak secara mikroskopis adalah metode pemeriksaan yang paling sederhana, cepat, terpercaya dan paling murah untuk diagnosis pasien TB. Sekitar 70-80% TB paru BTA positif dapat terdeteksi (Ervina, 2019).

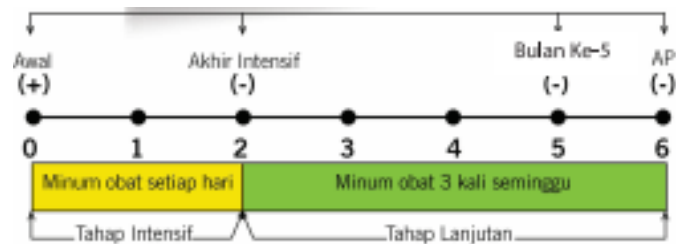
2.1.8 Pengobatan Tuberkulosis

Pengobatan TB harus dilakukan sesuai dengan standar yang berlaku yaitu DOTS (*Directly Observed Treatment Shortcourse*). DOTS merupakan salah satu strategi yang dilaksanakan oleh pelayanan kesehatan di dunia, dengan tujuan untuk mendeteksi dan menyembuhkan penyakit TB. Strategi ini diperkenalkan di Indonesia pada tahun 1995 dan telah diterapkan secara luas dalam sistem pelayanan kesehatan di Indonesia, terutama pada fasilitas kesehatan yang telah ditentukan. Terdapat beberapa tahapan dalam pengobatan TB yaitu:

1. **Tahap Awal** (Intensif): berlangsung sejak memulai pengobatan hingga 2 bulan, dimana pasien TB diwajibkan meminum obat setiap hari. Tahap ini bertujuan untuk menonaktifkan bakteri penyebab TB.

2. **Tahap Lanjutan:** sejak bulan ke-2 hingga bulan ke-6 atau lebih. Pada tahap ini, pasien hanya diwajibkan meminum obat 3x dalam seminggu. Tahap ini bertujuan untuk mematikan bakteri penyebab TB.

Kedua tahapan di atas jika ditotal akan berlangsung minimal 6 bulan, bisa juga lebih bahkan sampai 12 bulan. Namun, lamanya pengobatan ini tergantung pada berat ringannya penyakit TB yang diderita oleh pasien dan ditentukan oleh tenaga kesehatan yang sudah terlatih. Jika diakhir tahap intensif hasil pemeriksaan dahak masih positif, maka tahap pengobatan ini akan ditambah 1 bulan (Kemenkes RI, 2022). Gambar 2.9 menunjukkan tahap pengobatan dari penderita TB.



Gambar 2.9 Tahapan pengobatan TB (Kemenkes RI, 2022).

Menurut penelitian yang dilakukan Hasudungan (2020), stigma yang ada pada penyakit TB dapat berdampak negatif terhadap kelangsungan pengobatan sehingga menyebabkan keterlambatan dalam pengobatan pada penderita TB. Stigma kerap kali melekat pada masalah-masalah kesehatan, khususnya TB. Alasan mengapa bisa muncul stigma pada penyakit TB adalah karena penularannya, pengetahuan yang kurang tepat akan penyebabnya, perawatannya atau berhubungan dengan kelompok-kelompok tertentu seperti tingkat ekonomi, ras minoritas, pekerja seks, tahanan penjara, dan orang yang terinfeksi HIV/AIDS. Stigma sangat berpengaruh pada program pengobatan penyakit TB. Masalah utama dalam pengobatan TB adalah keterlambatan dalam pengobatan dan putusnya pengobatan. Salah satu penyebab dari masalah ini karena munculnya stigma yang membuat pasien TB menghindar untuk berobat.

2.2 Pasien MDR-TB (*Multi-Drug Resistant Tuberculosis*)

Faktor penyebab kekebalan *Mycobacterium tuberculosis* terhadap OAT adalah perilaku manusia, baik penyedia layanan, pasien, maupun program atau sistem layanan kesehatan yang berakibat terhadap tatalaksana pengobatan pasien TB yang tidak sesuai dengan standar dan mutu yang ditetapkan. Perilaku berobat secara teratur bagi penderita TB tetap menjadi permasalahan untuk mencapai angka kesembuhan yang tinggi. Tingginya angka putus obat mengakibatkan tingginya kasus MDR-TB dan akan membutuhkan biaya yang lebih besar serta bertambah lamanya pengobatan (Nugroho, *et al.*, 2018). Dengan adanya MDR-TB maka masa pengobatan menjadi lebih panjang yaitu dilakukan selama 24 bulan yang terdiri dari 8 bulan fase intensif dan 16 bulan fase lanjutan. Waktu pengobatan yang panjang dengan jumlah obat yang banyak serta berbagai efek pengobatan menyebabkan penderita sering terancam putus berobat (*Drop Out*) selama masa penyembuhan (Yuni dan Arda, 2016). Faktor lain yang menyebabkan MDR-TB adalah tidak mengimplementasikan DOTS sebagai terapi TB yang disarankan oleh WHO (Devi, *et al.*, 2019).

Pada kasus yang lebih parah, TB dapat berkembang menjadi XDR-TB (*Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*) merupakan suatu kondisi dimana pasien kebal terhadap pengobatan TB yang dikenal ampuh seperti isoniazid dan rifampisin. Penyakit ini serupa dengan MDR-TB tetapi lebih serius dan tidak bisa ditangani dengan obat lini dua.

Adanya mutasi pada gen *Mycobacterium tuberculosis* menjadi penyebab terjadinya resistensi terhadap OAT yang disebabkan karena tidak memadainya kadar terapeutik obat, terutama akibat ketidakpatuhan dalam konsumsi obat.

Konsumsi obat yang tidak tepat dan tidak teratur diduga sebagai penyebab terjadinya resistensi, sehingga menimbulkan mutasi pada gen yang mengkode/menyandi target OAT, misalnya pada gen *katG* (*Catalase-peroxidase G*) untuk linizid. INH (*isoniazid*) dan RIF (*rifampisin*) adalah dua OAT yang paling efektif yang setidaknya dijumpai resistensinya pada kasus MDR-TB (Siregar, 2018).

Dalam penelitian Siregar (2018) juga mengemukakan bahwa mutasi genomik tertentu pada beberapa gen spesifik *Mycobacterium tuberculosis* bertanggung jawab terhadap terjadinya resistensi agen OAT. Saat ini telah diidentifikasi sembilan mutasi gen yang bertanggung jawab terhadap resistensi OAT lini pertama. Gen-gen *katG*, *inhA* (*Isoniazid target A*), *aphC* (*aminoglycoside phosphotransferase C*), dan *kasA* (*beta-ketoacyl-ACP synthase A*) untuk resistensi INH, *rpoB* untuk resistensi RIF, *rpsL* (*ribosomal protein S12*) dan *rss* (*riboswitch*) untuk resistensi streptomisin, *EmbB* (*Ethambutol resistance protein B*) untuk resistensi EMB (*etambutol*), dan *pncA* (*Pyrazinamidase/nicotinamidase A*) untuk resistensi PZA (*pirazinamid*). MDR-TB adalah akibat akumulasi dari mutasi-mutasi tersebut.

Sputum (dahak) dari pasien MDR-TB biasanya banyak digunakan sebagai sampel pemeriksaan dari penyakit TB. Berdasarkan data Kemenkes RI 2022, kriteria sampel pasien MDR-TB ialah:

- 1) Pasien TB berjenis kelamin laki-laki atau perempuan.
- 2) Pasien TB dengan hasil pemeriksaan dahak positif pada bulan ke-5 atau pada akhir pengobatan, yakni bulan ke-6.
- 3) Pasien TB dengan hasil pemeriksaan dahak tetap positif setelah pengobatan tahap awal hingga bulan ke-6.

- 4) Pasien TB yang pernah dinyatakan sembuh atau pengobatan lengkap dan saat ini diagnosis TB berdasarkan hasil pemeriksaan bakteriologis atau klinis.
- 5) Pasien TB yang pernah diobati dan dinyatakan putus berobat selama 2 bulan berturut-turut atau lebih.

2.3 Biomarker Pengobatan

Dalam tubuh manusia, terdapat beberapa penanda penting yang bisa dijadikan tolok ukur keberhasilan sebuah pengobatan, salah satunya adalah biomarker. Istilah biomarker juga dapat merujuk pada penanda atau identitas molekuler. Biomarker merupakan respon dini tingkat molekuler, reaksi awal sebelum respon terjadi pada tingkatan organisasi (spektrum) biologi yang lebih tinggi (Dewi, *et al.*, 2014, dalam Elsi, 2023). Sederhananya biomarker dapat didefinisikan sebagai respon biologis dari organisasi biologis suatu organisme terhadap tekanan lingkungan (Yaqin, 2019). Biomarker jenis ini dapat dijadikan penentu dalam memprediksi siapa yang berisiko, riwayat penyakit, hingga target uji klinis.

Maka diperlukan biomarker yang dapat mengidentifikasi sedari awal agar dapat mengobati dan monitoring tingkat keparahan dari penyakit TB yang memanfaatkan analisis kimia. Hal ini dikarenakan pada tingkat seluler sudah ada sinyal peringatan dini terjadinya penyakit sehingga sudah bisa ditanggulangi sejak tingkat sub seluler dan dapat dicegah agar tidak menimbulkan keparahan pada tingkat yang luas. Hasil isolasi dan identifikasi gen *fbpA* yang berpotensi sebagai biomarker pengobatan diharapkan dapat menjadi sumbangan bagi dunia medis maupun sains pemerintah dalam menentukan kebijakan pengelolaan dan pengendalian penyakit TB.

2.4 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Dalam penelitian Arimurti (2018), PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan metode melipatgandakan suatu sekuen nukleotida tertentu yang dilakukan diluar tubuh organisme (*in vitro*). Teknik ini merupakan suatu proses enzimatik, karena dalam prosesnya memerlukan enzim *Taq polymerase*. Keuntungan dari metode PCR, yaitu menghasilkan DNA dalam jumlah banyak dalam waktu relatif singkat.

PCR dapat digunakan untuk menduga jumlah suatu sekuens yang ada pada suatu sampel. Teknik ini berguna untuk menentukan level ekspresi dari suatu gen. Pada sel, masing-masing gen diekspresikan melalui produksi mRNA (*messenger RNA*), yang kemudian digunakan untuk menghasilkan protein yang berhubungan dengan gennya. Jumlah mRNA dari suatu gen di dalam sel mencerminkan seberapa aktif gen tersebut (Kusnadi dan Arumingtyas, 2020).

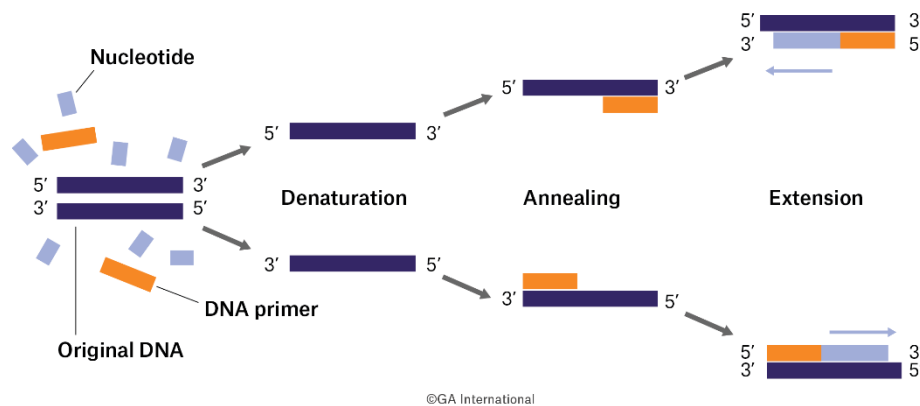
Menurut Surzycki (2000), ada empat komponen utama yang digunakan dalam metode PCR yaitu:

1. *Template DNA*, yaitu fragmen DNA yang sebagai tempat terjadinya sintesis protein.
2. *Primer*, konsentrasi *primer* yang optimal digunakan dalam PCR berkisar 0,1-1,0 pmol.
3. dNTP (*Deoksiribonukleotida trifosfat*), yaitu reagen yang terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP.
4. *DNA polymerase*, adalah enzim yang mengkatalis reaksi sintesis rantai DNA. Contoh *DNA polymerase* adalah *Taq polymerase*.

Tahapan PCR terlihat pada Gambar 2.10. PCR dilakukan berulang selama beberapa siklus dan tiap siklus terdiri dari tiga tahapan utama yaitu:

1. Denaturasi, merupakan proses pemisahan untai ganda DNA *template* menjadi untai tunggal. Suhu yang dipakai pada proses denaturasi 95°C.
2. *Annealing*, merupakan penempelan primer yang berupa oligonukleotida pada sekuens target di untai tunggal DNA *template*. Suhu optimal annealing tiap spesies berbeda-beda dan juga dipengaruhi oleh primer yang digunakan. Suhu yang digunakan yaitu 35-60°C.
3. Elongasi, adalah pemanjangan primer yang menempel pada DNA *template*. Suhu yang digunakan yaitu 27°C.

Selain ketiga tahapan utama PCR tersebut, ada juga tahap pre-denaturasi, yaitu tahap awal sebelum denaturasi dan post-elongasi, yaitu tahap sesudah elongasi (Arimurti, 2018).



Gambar 2.10 Tahapan PCR (Goldberg, 2019).

Metode PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10^6 - 10^7 kali. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap n siklus PCR akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah

menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non target (Fatchiyah, *et al.*, 2018)

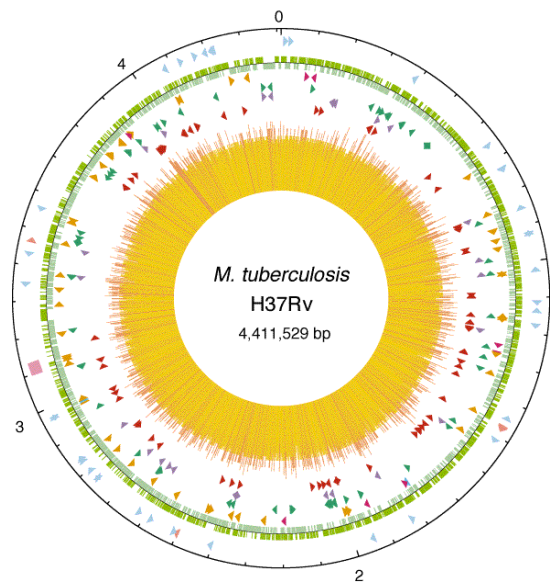
Keberhasilan dalam proses PCR tergantung dari primer yang digunakan, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Dalam merancang dan menentukan primer terbaik diperlukan beberapa kriteria yang harus dipenuhi. Perancangan primer merupakan suatu langkah awal untuk memperoleh primer terbaik yang dapat digunakan dalam proses PCR. Perancangan primer ini menggunakan metode *in silico* berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dengan urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari database GenBank (Sasmhita, *et al.*, 2018).

2.5 Genom dan Gen *Mycobacterium tuberculosis*

2.5.1 Genom *Mycobacterium tuberculosis*

Strain bakteri yang paling umum digunakan untuk studi TB adalah *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, strain virulen laboratorium yang urutan genomnya lengkap dan telah diterbitkan oleh *Sanger Center* dan *Institute Pasteur* sejak 1998. Secara definisi, genom adalah keseluruhan informasi genetik yang dimiliki oleh individu, mulai dari virus, bakteri, jamur, tumbuhan, hewan dan bahkan manusia pada setiap sel tunggalnya (Sari, 2023). Ketersediaan sekuens genom yang lengkap telah memberi peneliti banyak informasi baru terkait pengetahuan dan pemahaman tentang organisme ini. Urutan asli dan anotasi strain H37Rv memiliki total 4.411.529 bp (*base pair*) yang terdiri dari 3974 gen, 3924 protein dikodekan dan 50 RNA stabil (Lamichhnae dan Milic, 2018). Namun,

database terbaru yang telah diperbarui menunjukkan bahwa strain H37Rv terdiri dari total 4008 gen yang mengkode total 3906 protein dan 70 RNA stabil (NCBI, 2022). Konstruksi terintegrasi peta gen diperoleh dari peta fisik kromosom dengan teknik elektroforesis gel seperti yang terlihat pada Gambar 2.11. Pemetaan fisik tersebut bertujuan untuk membantu memperkirakan ukuran genom dan organisasi patogen *Mycobacterium tuberculosis*.



Gambar 2.11 Peta melingkar kromosom *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv (Lamichhnae dan Milic, 2018).

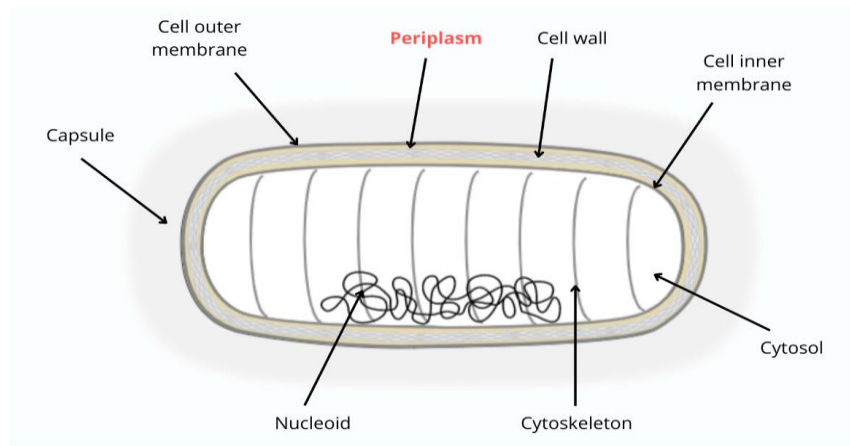
Keseluruhan genom memiliki setidaknya 91% kapasitas pengkodean dengan sekitar 65,6% konten G-C (*Guanin-Cytosin*). Di antara total pengkodean gen hanya 59% dari gen yang ditemukan ditranskripsi, dengan ekspresi yang lebih tinggi diperoleh melalui mengkoordinasikan transkripsi dan replikasi, mencerminkan tingkat pertumbuhannya yang lambat. Di antara semua strain *Mycobacterium tuberculosis*, hanya strain H37Rv yang paling dikenal dan dipahami. Evaluasi ulang urutan genom dan CDS (*coding sequens*) yang ada merupakan sebuah proses berkelanjutan yang telah menambahkan 82 urutan CDSs (*coding DNA sequences*) (Lamichhnae dan Milic, 2018).

2.5.2 Gen *fbpA* sebagai Gen Target

Berdasarkan data dari Uniprot (2022), menjelaskan bahwa gen *fbpA* merupakan salah satu gen yang terkait dengan protein Ag85A (*Antigen 85 complex A*) atau DGAT (*Diacylglycerol acyltransferase*) pada *Mycobacterium tuberculosis*. Protein Ag85A memiliki beberapa peran penting dalam patogenesis TB. Pertama, Ag85A bertanggung jawab atas afinitas tinggi mikobakteri terhadap fibronektin, yaitu sebuah glikoprotein perekat besar yang memfasilitasi perlekatan *Mycobacterium tuberculosis* ke AMs (*makrofag alveolar*) pada tikus. Ini memungkinkan bakteri untuk berinteraksi dan menembus sel-sel imun, seperti AMs, yang merupakan salah satu jalur penyebaran utama *Mycobacterium tuberculosis* dalam jaringan tubuh.

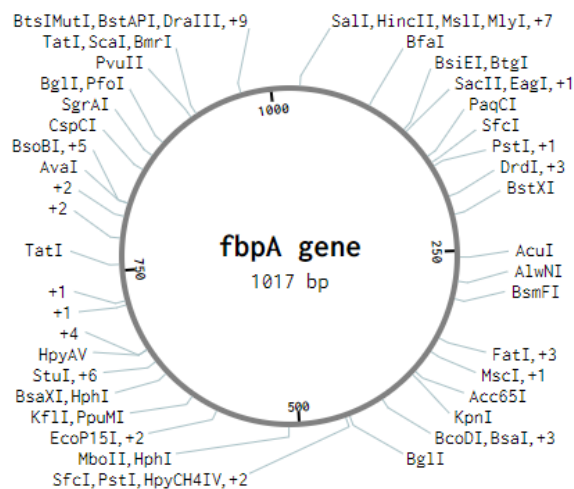
Protein Ag85A diyakini memiliki peran penting lain dalam patogenesis TB melalui aktivitas *mycolyltransferase*. Enzim ini diperlukan untuk menjaga integritas selubung sel bakteri dengan mengkatalisis transfer asam mikolat ke arabinogalaktan pada dinding sel. Asam mikolat merupakan komponen penting dalam pembentukan selubung sel yang melindungi *Mycobacterium tuberculosis* dari respons imun inang. Selain itu, Ag85A juga terlibat dalam sintesis alpha TDM (*Trehalose dimycolate*). Alpha TDM adalah salah satu dari beberapa lipida yang disekresikan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan berkontribusi pada resistensi bakteri terhadap pembunuhan oleh sel imun, serta terlibat dalam pembentukan granuloma TB.

Secara keseluruhan, protein Ag85A merupakan protein penting dalam patogenesis TB dengan berbagai peran, termasuk dalam perlekatan bakteri ke sel imun, pemeliharaan integritas selubung sel bakteri, dan produksi lipida yang berkontribusi pada resistensi bakteri dan pembentukan granuloma (Uniprot, 2022).



Gambar 2.12 Lokasi protein Ag85A (gen *fbpA*) di ruang periplasma pada sel bakteri (SwissBioPics-Uniprot, 2022).

Gen *fbpA* terdapat pada lokus Rv3804c tepatnya di ruang periplasma membran sel bakteri seperti yang terlihat pada Gambar 2.12. Periplasma pada bakteri Gram negatif terdapat diruang antara membran dalam dan membran luar sedangkan periplasma pada bakteri Gram positif dan jamur ukurannya lebih kecil dan ditemukan antara membran dalam dan lapisan peptidoglikan (Uniprot, 2022). Gen *fbpA* memiliki ukuran 1017 bp berdasarkan hasil desain peta plasmid pada situs Benchling menggunakan *bases* (urutan nukleotida) gen *fbpA* *Mycobacterium tuberculosis* strain C01 yang memiliki *CDS complete* dari situs NCBI. Peta plasmid sirkular gen *fbpA* dapat dilihat pada Gambar 2.13.

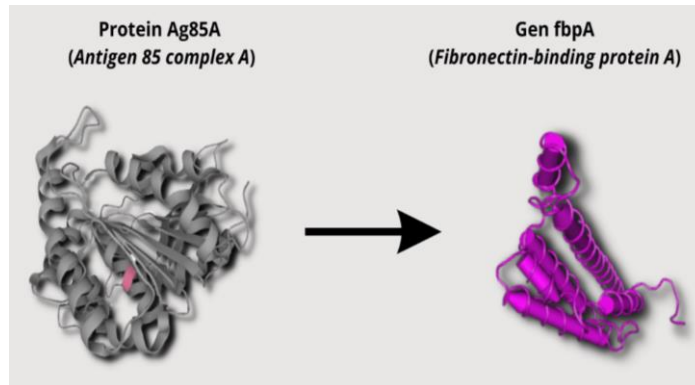


Gambar 2.13 Peta plasmid melingkar gen *fbpA* (Benchling, 2022).

Penggunaan strain yang memiliki *CDS complete* dalam penentuan panjang gen *fbpA* sebagai 1017 bp penting karena itu adalah panjang yang telah ditentukan dan diketahui untuk gen *fbpA* pada *Mycobacterium tuberculosis*. Melalui penelitian dan analisis sekuens DNA, peneliti telah mengidentifikasi bahwa gen *fbpA* pada strain tertentu memiliki panjang 1017 bp. Dalam penelitian dan analisis genetika, menggunakan strain dengan *CDS complete* memungkinkan peneliti untuk mempelajari dan memahami fungsi dan struktur gen dengan lebih baik. Panjang gen yang telah ditetapkan secara konsisten dapat membantu dalam penelitian komparatif antarstrain dan juga dalam penentuan lokasi dan fungsi spesifik dari sekuens DNA dalam gen tersebut.

Gen *fbpA* pada *Mycobacterium tuberculosis* memiliki fungsi sebagai enzim transferase (*acyltransferase*). Fungsi utama enzim ini adalah mengkatalisis transfer gugus asil (RCO-) dari donor asil, seperti asil-KoA rantai panjang, ke senyawa akseptor lain. Selain itu, gen *fbpA* juga memediasi pembentukan TAG (triasilgliserol) dengan menggunakan asil-KoA rantai panjang sebagai donor asil, dan 1,2-dipalmitoil-sn-gliserol (1,2-dipalmitin) sebagai akseptor asil. TAG adalah senyawa lipid yang terdiri dari tiga gugus asil yang terikat pada molekul gliserol. Fungsi TAG dalam sel bakteri, termasuk *Mycobacterium tuberculosis*, meliputi penyimpanan energi, isolasi termal, dan perlindungan membran. Kekurangan gen *fbpA* dapat menyebabkan dinding sel bakteri yang bermikoloilasi. Mikolat adalah komponen penting dalam pembentukan selubung sel *Mycobacterium tuberculosis*, yang melindungi bakteri dari respon imun inang. Oleh karena itu, kekurangan gen *fbpA* dapat berdampak pada pembentukan dinding sel yang terganggu dan menghasilkan komponen dinding sel yang bermikoloilasi. (Uniprot, 2022). Menurut Murray *et al.* (2020), asam mikolat pada dinding sel *Mycobacterium*

tuberculosis diketahui berfungsi sebagai pertahanan bakteri dari kekeringan serta menjadi salah satu faktor virulensi dari penyakit TB. Bentuk struktur 3D dari gen *fbpA* dapat dilihat pada Gambar 2.14.



Gambar 2.14 Struktur 3D dari gen *fbpA* (Uniprot, 2022).

Dalam penelitian Lamichhnae dan Milic (2018), menjelaskan bahwa Fbps (*Fibronectin-binding proteins*) adalah protein utama yang disekresikan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan dikodekan oleh tiga gen independen: *fbpA*, *fbpB*, dan *fbpC*. Protein Fbps ini memiliki kemampuan untuk berinteraksi dengan fibronektin, yang merupakan glikoprotein perekat, dan berkontribusi pada perlekatan *Mycobacterium tuberculosis* ke jaringan sel inang. Dalam genom *Mycobacterium tuberculosis* terdapat empat gen *fbp* yang berbeda: *fbpA*, *fbpB*, *fbpC*, dan *fbpD*. Namun, alasan mengapa Fbps ini memiliki spesifisitas substrat yang sama secara *in vitro* pada mikobakteri tidak diketahui dengan pasti. Untuk menyelidiki peran masing-masing gen *fbp* dalam mikolilasi dinding sel, penelitian telah dilakukan dengan menggunakan galur mutan *Mycobacterium tuberculosis* yang tidak aktif pada *fbpA* dan *fbpB*, serta galur mutan yang terganggu pada *fbpC*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kedua mutan tersebut menghasilkan dinding sel yang bermikolilasi secara normal.

Namun, ketika produksi gen *fbpA*, *fbpB*, atau *fbpC* dieksaserbasi dalam galur mutan yang diinaktivasi pada *fbpC*, terjadi pemulihan terhadap cacat mikolat terkait dinding sel dan properti penghalang permeabilitas selubung luar. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga enzim tersebut (*fbpA*, *fbpB*, dan *fbpC*) terlibat dalam mikolilasi dinding sel, dengan *fbpC* memainkan peran yang lebih penting daripada yang lain. Penelitian juga menunjukkan bahwa inaktivasi gen *fbpC* pada *Mycobacterium tuberculosis* menghasilkan penurunan sebesar 40% dalam jumlah mikolat yang terkait dengan dinding sel, serta perubahan dalam permeabilitas selubung sel *Mycobacterium tuberculosis*. Selain itu, telah diidentifikasi bahwa gen *fbpD*, yang memiliki struktur yang mirip dengan *Ag85A*, juga ada dalam genom *Mycobacterium tuberculosis* setelah selesainya urutan genomnya. Gen *fbpD* ini mengkodekan protein MPT51 (*Mycobacterial Protein Tuberculosis 51*) yang memiliki kesamaan struktural dengan protein *Ag85A*.

Sementara dalam penelitian Solyman *et al.* (2022), disebutkan bahwa gen *fbpA* tersebar di seluruh genom dan dikodekan dalam sebuah operon dan berada di bawah kendali *negative regulatory* serapan besi (*fur*). Berdasarkan pencarian data transporter ABC dari KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), gen *fbpA*, *fbpB*, dan *fbpC* diidentifikasi sebagai ortolog dengan gen *Am069*, *Am240*, dan *Am392* yang berasal dari *Anaplasma marginale* yang diperkirakan terlibat dalam transpor besi.

Dalam konteks transpor besi, gen-gen *fbpA*, *fbpB*, dan *fbpC* pada *Mycobacterium tuberculosis* telah dikaitkan dengan sistem transpor besi *siderophore-independent*. Sistem transpor ini tidak bergantung pada siderofor,

senyawa yang digunakan oleh banyak bakteri Gram negatif untuk mengambil besi dari lingkungan ekstraseluler. Sebaliknya, sistem transpor ini mungkin memiliki kemampuan untuk mengambil besi secara langsung dari lingkungan atau menggunakan jalur lain yang tidak melibatkan siderofor. Penelitian juga menyebutkan bahwa gen-gen *fbpABC* yang terlibat dalam sistem transpor besi ini banyak ditemukan pada bakteri Gram negatif, baik yang bersifat ekstraseluler maupun intraseluler fakultatif.