

**ANALISIS MUTASI GEN RV1419 *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* PADA PENDERITA
TUBERKULOSIS AKTIF DI SULAWESI SELATAN**

**MUTATION ANALYSIS OF THE RV1419 GENE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN
ACTIVE TUBERCULOSIS PATIENTS SOUTH SULAWESI**

WA ODE SITI PURNAMASARI

P062192014



PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK

SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDI

MAKASSAR, INDONESIA

2024

**ANALISIS MUTASI GEN RV1419 *MYCOBAKTERIUM TUBERCULOSIS* PADA PENDERITA
TUBERKULOSIS AKTIF DI SULAWESI SELATAN**

WA ODE SITI PURNAMASARI

P062192014



PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK

SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDI

MAKASSAR, INDONESIA

2024

**ANALISIS MUTASI GEN RV1419 *MYCOBAKTERIUM TUBERCULOSIS* PADA PENDERITA
TUBERKULOSIS AKTIF DI SULAWESI SELATAN**

Tesis

Sebagai Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

WA ODE SITI PURNAMASARI

P062192014

Kepada

PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK

SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDI

MAKASSAR

2024

LEMBAR PENGESAHAN TESIS**ANALISIS MUTASI GEN RV1419 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PADA PENDERITA
TUBERKULOSIS AKTIF DI SULAWESI SELATAN**

Disusun dan diajukan oleh

**WA ODE SITI PURNAMASARI
P062192014**

Telah dipertahankan dihadapan panitia ujian yang dibentuk dalam rangka penyelesaian
Studi Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal, 27 Desember 2023
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

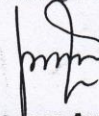
Menyetujui,

Pembimbing Utama



Prof. dr. Muh. Nasrum Massi., Ph.D. Sp.MK
NIP. 19670910 199603 1 001

Pembimbing Pendamping



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

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik

Prof. dr. Rahmawati M., Ph.D., Sp.PD-KHOM., FINASIM
NIP. 19680218 199903 2 002

Dekan Sekolah Pascasarjana
Universitas Hasanuddin

Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed
NIP. 19661231 199503 1 009

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Analisis Mutasi Gen Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis* Pada Penderita Tuberkulosis Aktif di Sulawesi Selatan" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Prof.dr.Muh Nasrum Massi.,Ph.D.Sp.MK(K) sebagai pembimbing utama dan Dr.Rosana Agus.,M.Si sebagai pembimbing pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di jurnal (Malaysian Of Mycobiology Journal) sebagai artikel dengan judul "Analysis Mutation Gene Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis* in Active Tuberculosis isolates South Sulawesi". Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada universitas Hasanuddin.

Makassar, 18 januari 2024



WA ODE SITI PURNAMASARI
NIM.P062192014

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas rahmat dan karunianya sehingga penelitian yang dilakukan dapat dilaksanakan dengan sukses dan tesis ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi serta arahan Prof.dr. Muh. Nasrum Massi.,Ph.D. Sp.MK(K) selaku pembimbing utama dan Dr.Rosana Agus.,M.Si selaku pembimbing pendamping. Penulis mengucapkan banyak terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada pembimbing. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada:

1. Prof.dr. Budu, Ph.D.,Sp.M(K),M.Med.Ed selaku dekan yang telah memberika arahan dan bimbingan dalam menyelesaikan studi Magister.
2. Prof.dr.Rahmawati M., Ph.D, Sp.PD-KHOM, FINASIM, selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik atas dukungan dan nasehatnya selama masa studi Magister.
3. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K), dr. Rizalinda Sjahril, M. Sc, Ph.D, Sp.MK, dan dr. Firdaus Hamid, Ph.D, Sp.MK selaku penguji atas saran, masukan, dan arahannya.
4. Ibu Handayani selaku staf dari HUMRC dan Ibu Marina ali serta Nursamsi selaku staf laboran Bagian Mikrobiologi FK UNHAS atas bimbingan dan bantuannya selama penelitian.
5. Orang tua penulis, Ayahanda La Ode Mahala dan ibu Munadiyah serta saudara kandung penulis, terima kasih atas doa, pengorbanan dan motivasi selama menempuh pendidikan.
6. Serta semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat disebutkan satu per satu. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat dan Karunia-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian tesis ini.

Penulis menyadari kekurangan dan keterbatasan yang ada, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran.

Penulis,

Wa Ode Siti Purnamasari

ABSTRAK

Wa Ode Siti Purnamasari. **Analisis Mutasi Gen Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis* pada penderita Tuberkulosis Aktif di Sulawesi Selatan** (dibimbing oleh Muhammad Nasrum Massi and Rosana Agus)

Tuberkulosis adalah penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Diagnosis pasti ditegakkan dengan menemukan bakteri TB namun hingga saat ini masih dilakukan pencarian metode diagnostik terbaik dan cepat sebagai *true gold standar*. Pemanfaatan antigen *Mycobacterium tuberculosis* spesifik dan imunogenik dalam uji serodiagnostik dapat mengarah pada diagnosis yang tepat dan cepat. Antigen sMTL-13 dikode oleh gen Rv1419 merupakan antigen imunodominan yang menstimulasi proliferasi limfosit Th1 spesifik antigen. Penelitian ini bertujuan mendeteksi adanya mutasi pada Gen Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis* sebagai kandidat diagnostik tuberkulosis. DNA Mtb diekstraksi dari 30 sampel isolat klinis sputum penderita TB pada laboratorium Mikrobiologi HUMRC. PCR dilakukan untuk mengamplifikasi gen Rv1419 dengan target band 474 bp. Hasil positif PCR dilanjutkan dengan sekuensing untuk mendeteksi mutasi melalui program BioEdit dan BLAST. Hasil PCR menunjukkan 15 sampel positif gen RV1419. Analisis hasil sekuensing dari 15 sampel tersebut menunjukkan 2 sampel *wild type*, 12 sampel memiliki persen identitas 99% dengan 1% merupakan sekuens gaps. Satu sampel memiliki persen identitas 94% dengan 25 titik substitusi nukleotida. Gen Rv1419 masih berpotensi digunakan sebagai serodiagnosis terhadap penderita TB aktif karena terdapat 1 sampel yang mengalami mutasi dari 15 sampel yang diperiksa.

Kata Kunci: *Mycobacterium Tuberculosis*, sMTL-13, mutasi.

ABSTRACT

Wa Ode Siti Purnamasari. **Analysis of Mutation Gene Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis* in Active Tuberculosis isolate South Sulawesi** (guided by Muhammad Nasrum Massi and Rosana Agus)

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A definitive diagnosis is made by finding the Mtb, but searching for the best and fastest diagnostic method is still ongoing. Using specific and immunogenic Mtb antigens in serodiagnostic tests can lead to accurate and rapid diagnosis. The sMTL-13 antigen encoded by the Rv1419 gene is an immunodominant antigen that stimulates the proliferation of antigen-specific Th1 lymphocytes. This study aimed to detect mutations in the Rv1419 Mtb gene as a diagnostic candidate for tuberculosis. Mtb DNA was extracted from 30 clinical isolate samples of TB patient sputum at the HUMRC Microbiology laboratory. PCR was carried out to amplify the Rv1419 gene with a target band of 474 bp. Positive PCR results were followed by sequencing to detect mutations using the BioEdit and BLAST programs. PCR results showed that 15 samples were positive for the RV1419 gene. Analysis of the sequencing results from the 15 samples showed that 2 samples were wild type, 12 samples had a percent identity of 99%, with 1% being sequence gaps, and one sample had a percent identity of 94% with 24 nucleotide substitution points. The Rv1419 gene still has the potential to be used as a serodiagnosis for active TB patients because only one sample, out of 15 PCR-positive samples, contained a mutant gene.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, sMTL-13, mutation.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN PENGAJUAN.....	ii
PENGESAHAN TESIS.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah.....	2
I.3 Tujuan Penelitian	3
I.3.1. Tujuan Umum.....	3
I.3.2 Tujuan khusus	3
I.4 Manfaat Penelitian	3
I.4.1. Manfaat Teoritis.....	3
I.4.2. Manfaat Aplikatif.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Mycobacterium tuberculosis.....	4
1. Klasifikasi Mycobacterium tuberculosis	4
2. Morfologi Mycobacterium tuberculosis.....	4
II.2 Tuberkulosis	6
1. Penyakit TB	6
2. Gejala TB Paru	6
4. Epideomologi.....	9
5. Patogenesis.....	10
II.3 Diagnosis dan Pemeriksaan Penunjang Tuberkulosis.....	11
II.4 Respon Imun Terhadap penyakit TB.....	13
II.5 Antigen Rv1419 Mycobacterium tuberkulosis	14
II.6 Mutasi Gen.....	15
II.7 PCR (Polymerase Chain Reaction).	18

II.8 Sequensing DNA.....	20
II.9 Kerangka Teori.....	22
II.10 Kerangka Konsep.....	23
II.11 Defenisi Operasional	23
BAB III METODE PENELITIAN.....	25
III.1. Rancangan Penelitian.....	25
III.2. Waktu dan Tempat penelitian	25
III.3. Populasi, Sampel, Teknik Sampling	25
III.4. Kriteria Inklusi Dan Eksklusi.....	26
III.5. Izin Etik Penelitian	26
III.6. Alat dan Bahan	26
III.7 Prosedur Kerja	26
1. Isolasi DNA	26
2. Amplifikasi PCR gen Rv1419 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
3. Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis	27
4. DNA Sequencing.....	27
II.8 Analisis Data	28
III.9 Alur Kerja Penelitian	28
BAB IV HASIL.....	29
IV.1 Hasil Isolasi DNA <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
IV.2 Hasil Produk PCR Gen Rv1419 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
IV.3 Hasil Sequencing Gen Rv1419 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
BAB V PEMBAHASAN	35
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	38
V.1 Kesimpulan	38
V.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	45

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Similaritas Hasil BLAST antara Gen Rv1419 dengan MTB strain H37RV.....	32
Tabel 2. Hasil Mapping Basa Nukleotida.....	32
Tabel 3. Rincian Perubahan Kodon Asam Amino.....	34

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 1.	Pemindaian oleh Mikroskop Elektron untuk <i>MTB</i>	4
Gambar 2.	Pengamatan <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
Gambar 3.	Mekanisme Infeksi M. Tuberculosis.....	10
Gambar 4.	Peta Genom <i>M. Tuberculosis</i>	14
Gambar 5.	Letak Gen Rv 1419 pada Genome <i>MTB</i>	15
Gambar 6.	Mutasi dan DNA Repair.....	16
Gambar 7.	Kesalahan dalam Replikasi dan Mutagen.....	17
Gambar 8.	Siklus PCR.....	19
Gambar 9.	Kerangka Teori.....	22
Gambar 10.	Kerangka Konsep.....	23
Gambar 11.	Bagan Alur Penelitian.....	28
Gambar 12.	Hasil Ekstraksi sampel isolat klinis Tuberculosis.....	29
Gambar 13.	Hasil Amplifikasi Gen Rv1419.....	30
Gambar 14.	Hasil Alignment BioEdit.....	31
Gambar 15.	Hasil Translasi prediksi Protein Sampel 20.....	33
Gambar 16.	Hasil BLAST prediksi Protein Sampel 20.....	34

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tuberkulosis disebabkan oleh agen pembawa penyakit *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) yang menyerang paru secara umum. Gejala yang timbul berupa batuk berdahak atau darah, nyeri pada dada, lemas, bobot badan menurun, demam yang disertai keringat di malam hari. Penularan penyakit terjadi melalui udara yang masuk disaluran pernapasan dan menginfeksi paru-paru dan organ lainnya (Adigun & Rahukumar, 2023). Timbulnya penyakit tuberkulosis dipengaruhi oleh interaksi antara komponen pejamu (*host*), penyebab (*agent*), dan lingkungan (*environment*) (Kemenkes RI, 2018).

Kemampuan tubuh dalam melawan infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dipengaruhi oleh faktor genetik, paparan primer dan sekunder terhadap individu. Mekanisme kuman melawan kekebalan tubuh (Makrofag) ditentukan oleh vaktor virulensi yang dimiliki, seperti kandungan yang tinggi pada asam mikolat dan kandungan tryhalose dimycolate (cord faktor) yang menyebabkan terjadinya fagositosis dan kerusakan makrofag alveolar. Beberapa penelitian menunjukkan *Mycobacterium tuberculosis* dapat mencegah terbentuknya fagolisosom yang membuat eliminasi kuman tidak terjadi (Adigun & Rahukumar, 2023).

Tuberkulosis merupakan penyebab masalah kesehatan masyarakat secara global yang menjadi tujuan pembangunan kesehatan berkelanjutan (SDGs) (o'Garra, A. *et al*, 2013). Tahun 2021 kasus TB mencapai 10,6 juta dan menyebabkan kematian 1,6 juta (WHO, 2023). Dari jumlah tersebut terdapat 6 juta dialami oleh pria dewasa, 3.4 juta oleh wanita dewasa dan 1.2 juta terjadi pada anak-anak (WHO,2022). *World Health Organization* (WHO) melakukan berbagai upaya untuk mengakhiri tuberkulosis didunia namun penurunan infeksi dan kematian akibat tuberkulosis relatif lambat dan masi jauh dari target. Banyak tantangan yang dihadapi dalam upaya pencegahan dan pengendalian tuberkulosis seperti kurangnya akses layanan diagnostik, pengobatan, dan adanya penularan jenis tuberkulosis resisten obat dinegara-negara endemik, terutama negara-negara diasia (Noviani *et al.*, 2021).

Salah satu negara diasia tenggara dengan beban tuberkulosis yang cukup tinggi adalah indonesia. Indonesia masuk dalam 3 indikator beban tinggi/high burden countries (HBC) pada penderita tuberkulosis menurut *World Health Organization* (WHO). Indikator tersebut ialah tuberkulosis, tuberkulosis/HIV, dan MDR-tuberkulosis yang berarti Indonesia memiliki permasalahan besar dalam menghadapi penyakit Tuberkulosis (WHO, 2017). Tuberkulosis di indonesia pada tahun 2020 mencapai 824.000 kasus. Ditahun 2021 diperkirakan mengalami peningkatan mencapai 969.000 (Kemenkes, 2023). Tingginya angka kejadian TB di Indonesia menunjukkan tingginya prioritas pencegahan dan pengendalian TB. Salah satu provinsi di Indonesia yang memiliki prevalensi TB yang cukup tinggi diatas rata-rata adalah Sulawesi Selatan (Kemenkes, 2022).

Gejala tuberkulosis yang timbul masi kurang spesifik terutama pada pasien tahap awal yang menampilkan gejala ringan atau tanpa gejala. Sekitar 3,6 juta jiwa dengan beban penyakit tuberkulosis tidak terdiagnostik setiap tahunnya. Penegakan diagnostik didasarkan pada penemuan bakteri penyebab TB, namun pencarian diagnostik yang baik serta cepat masi dilakukan sampai saat ini. Pencarian tersebut dilakukan agar dapat menjadi acuan sebagai kategori *true gold standar*. Berdasarkan Pusat Pengendalian dan Pencegahan Penyakit 2016, Tuberkulosis dapat ditemukan melalui berbagai pengujian dan diagnosis. Diagnosis penyakit

tuberkulosis dilakukan dengan menggunakan uji tuberkulin dan tes darah (Noviani *et al.*, 2021). Uji tuberkulin memiliki hanya bisa menentukan seseorang pernah terinfeksi bakteri TB namun tidak diketahui apakah masi berlangsung atau sudah tidak aktif, hasil positif atau negatif tidak dapat dibedakan karena infeksi baru atau disebabkan oleh imunisasi BCG dan adanya overdiagnosis yang diikuti dengan overtreatment (Rahajoe, *et al.*, 2005 and Kaswandani, *et al.*, 2010). kesalahan diagnosis menyebabkan peningkatan morbiditas dan mortalitas pada pasien dan memungkinkan penularan TB lebih lanjut. Diagnosis dini sangat diperlukan sebagai salah satu strategi dalam mengendalikan penyakit tuberkulosis (Noviani *et al.*, 2021).

Diagnosis tuberkulosis berbasis kekebalan berguna untuk mendeteksi cepat adanya kuman *Mycobacterium tuberculosis* dengan pemanfaatan antigen spesifik dan imunogenik. Sebuah lektin dapat menentukan interaksi antara *Mycobacterium tuberculosis* dan sel-sel sistem imun bawaan atau fagositik. Lektin juga memiliki kemampuan untuk mengikat secara spesifik pada karbohidrat sehingga lektin dapat ikut berperan dalam beberapa mekanisme seluler seperti adesi, apoptosis dan agregasi (Munari, 2021). Salah satu protein yang dihasilkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* adalah lektin 13-kDa (sMTL-13) yang dikode oleh gen Rv1419. Analisis bioinformatika memperlihatkan bahwa sMTL-13 termasuk dalam tipe Risin β -*trefoil* yang mengandung peptida sinyal tipe-Sec dalam lingkungan *Mycobacterium tuberculosis*, namun tidak ada pada non *Mycobacterium tuberculosis* (Nogueira. 2012). Jalur Sec berperan sebagai translokasi protein yang melintasi membrane sel yang memiliki fungsi dasar penargetan protein (Morales 2014). Domain risin rantai B telah terbukti mengikat glikolipid permukaan sel dan glikoprotein yang mengandung gugus galaktosa dan manosa terkait β -1, oleh karena itu gen Rv1419 memiliki peran penting dalam siklus hidup bakteri MTB,

Antigen M.tb yang imunodominan digunakan dalam uji diagnosis yang berbasis IFN- γ dapat memodulasi respon imun bawaan. Gen Rv1419 pada *Mycobacterium tuberculosis* mengkode sekresi lektin berperan dalam interaksi host-Mycobacteria dan menimbulkan respon imun spesifik. Respon yang ditimbulkan yakni merangsang sistem imun berupa sitokin IFN- γ dengan memperlihatkan titer serum IgG yang tinggi pada pasien TB aktif. Antigen sMTL-13 dikode oleh gen Rv1419 merupakan antigen imunodominan yang menstimulasi proliferasi limfosit Th1 spesifik antigen yang menunjukkan bahwa sMTL-13 dapat bertindak sebagai pola molekuler yang terkait dengan patogen (Nogueira *et al.* 2010).

Kecacatan pada suatu gen dapat terjadi yang disebabkan oleh banyak faktor, salah satunya adalah terjadi perubahan/mutasi pada tingkat sekuen basa nukleotidanya karena beberapa hal sehingga menyebabkan terjadi kesalahan pada proses sintesis protein dan kerusakan gen. Berdasarkan penjelasan diatas, peneliti tertarik dan ingin mengetahui apakah pada penderita tuberkulosis paru terdapat mutasi pada gen Rv1419 dengan harapan pencarian gen spesifik sebagai antigen yang baik untuk diagnosis TB aktif.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka dapat dirumuskan permasalahan yang menjadi acuan pembahasan adalah:

- I.2.1. Apakah gen Rv1419 yang mengkode protein sMTL-13 pada sampel isolat klinis M.tb telah mengalami mutasi
- I.2.1 Bagaimana mutasi yang terjadi pada gen Rv1419 yang mengkode protein sMTL-13 pada isolat klinis M.tb

I.3 Tujuan Penelitian

I.3.1. Tujuan Umum

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya mutasi yang terjadi pada gen Rv1419 pada sampel isolat klinis M.tb pada penderita TB Aktif sebagai sebagai gen yang consert dalam kuman *Mycobacterium tuberculosis*.

I.3.2 Tujuan khusus

- a) Untuk mengetahui adanya Mutasi gen Rv1419 yang mengkode protein sMTL-13 pada Tuberkulosis Aktif.
- b) Untuk mengetahui apakah pola mutasi yang terjadi dapat merubah kodon pada pada gen Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis* pada Tuberkulosis Aktif.

I.4 Manfaat Penelitian

I.4.1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi pertimbangan untuk perkembangan penelitian dimasa depan terkait dengan mutasi Gen Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis* terhadap tuberkulosis aktif.

I.4.2. Manfaat Aplikatif

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan kontribusi dalam mengidentifikasi penderita tuberkulosis aktif dengan adanya gen Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis*.

BAB II

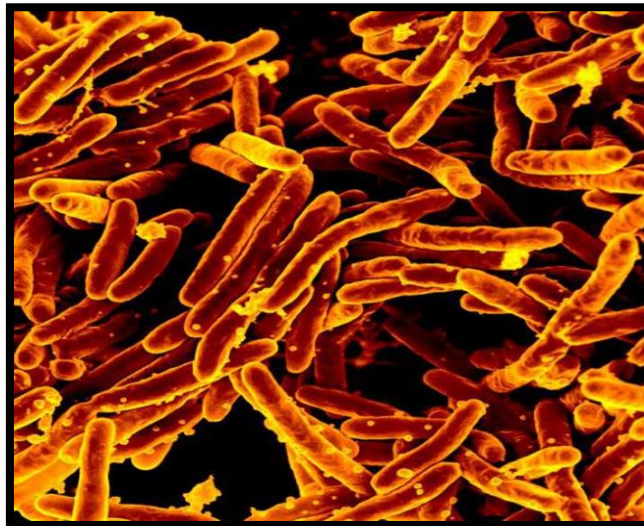
TINJAUAN PUSTAKA

II.1 *Mycobacterium tuberculosis*

1. Klasifikasi *Mycobacterium tuberculosis*

Menurut data Informasi dari *Taxonomy Work Goup* (TWG), klasifikasi dari spesies *Mycobacterium tuberculosis* pada setiap tingkatan didasarkan pada aturan nomenklatur binomial, spesies ditempatkan dalam kelompok yang menjadi bagian dari kelompok-kelompok yang lebih komprehensif (*www.itis.gov* and Campbell, *et al.*, 2008);

Kingdom : Bacteria
Subkingdom : Posibacteria
Phyllum : Actinobacteria
SubClass : Actinobacteriidae
Ordo : Actinomycetales
SubOrdo : Corynebacterineae
Familia : Mycobacteriaceae
Genus : *Mycobacterium*
Species : *Mycobacterium tuberculosis*



Gambar 1. Pemindaian oleh Mikroskop Elektron untuk *Mycobacterium tuberculosis* pada Kasus TB

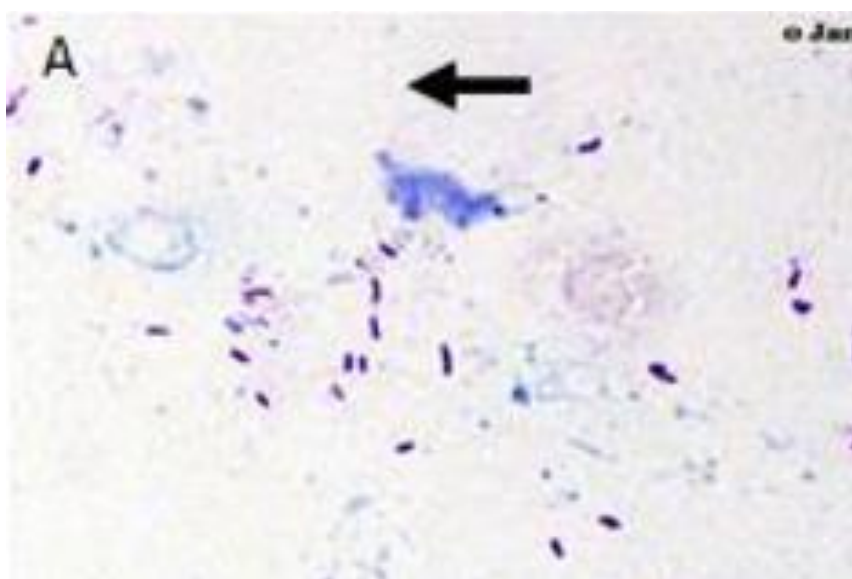
Sumber: NCBI, 2022.

2. Morfologi *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis adalah bakteri intraseluler obligat-aerob, nonmotil dan tidak berbentuk spora, katalase-negatif, dan fakultatif (Jilani *et al.* 2022). Basil tuberkulosis memiliki pertumbuhan yang lambat, dormansi, memiliki selubung sel kompleks, pathogenesis intraseluler

serta memiliki homogenitas genetik (Cole *et al.* 1998). *Mycobacterium tuberculosis* membutuhkan waktu yang cukup lama untuk membelah yaitu sekitar 16-20 jam, jauh lebih lambat dibandingkan dengan bakteri lain yang kurang dari 1 jam (Jilani *et al.* 2022). Kekebalan tubuh yang menurun disebabkan oleh penuaan atau penekanan kekebalan mengakibatkan aktifnya kembali bakteri yang sebelumnya tidak aktif setelah infeksi awal (Cole *et al.* 1998). Adanya kandungan lipid pada MTB memberi karakteristik unik, termasuk resisten terhadap antibiotik dan kemampuan bertahan hidup dalam lingkungan yang ekstrim (Jilani *et al.* 2022).

Mycobacterium tuberculosis memiliki ukuran dengan lebar 0,3 – 0,6 μm dan panjang 1–4 μm . Penyusun utama dinding sel *M. tuberculosis* ialah asam mikolat, lilin kompleks (*complex-waxes*), trehalosa dimikolat yang disebut *cord factor*, dan *mycobacterial sulfolipids* yang berperan dalam virulensi (PDPI, 2006). Amplop sel *Mycobacterium tuberculosis* yang kaya akan guanin dan sitosin serta termasuk bakteri gram positif, mengandung lapisan tambahan di luar peptidoglikan yang sangat kaya akan lipid, glikolipid, dan polisakarida. Jalur biosintetik baru menghasilkan komponen dinding sel seperti asam mycolic, asam mycocerosic, phenolthiocerol, *lipoarabinomannan* (LAM) dan arabinogalactan. Diantara senyawa tersebut dapat berperan sebagai faktor umur bakteri, inflamasi dan pathogenesis (Cole *et al.* 1998). Adanya lipid pada dinding sel membuat bakteri ini lebih tahan terhadap asam sehingga disebut bakteri tahan asam yaitu apabila sekali diwarnai akan tetap tahan terhadap upaya penghilangan zat warna tersebut dengan larutan asam – alkohol (Price dan Wilson, 1995).



Gambar 2. Pengamatan *Mycobacterium tuberculosis* dibawah Mikroskop
Sumber: (Widodo, *et al.*, 2016)

Komponen antigen ditemukan di dinding sel dan sitoplasma yaitu komponen lipid, polisakarida dan protein. Karakteristik antigen *M. tuberculosis* dapat diidentifikasi menggunakan antibody monoklonal. Saat ini dikenal dengan *purified antigens* dengan berat molekul 14 kDa, 19 kDa, 38 kDa, 65 kDa yang memeberikan sensitivtif dan spesifisiti yang bervariasi dalam mendiagnosis TB. Ada juga yang menggolongkan antigen *M. tuberculosis* dalam kelompok antigen yang disekresikan hanya dihasilkan oleh basil yang hidup, contohnya antigen 30.000 α , protein MTP 40 dan lain-lain (PDPI, 2016). Terdapat *peptidoglikan* (PG) yang berikatan kovalen dengan *arabinogalactan* (AG). *Arabinogalactan* melekat pada asam mikolat dengan *meromycolate* panjang dan rantai pendek. Kompleks dinding sel ini disebut dengan *mycolyl arabinogalactan-peptidoglikan* (mAGP). Selain itu terdapat komponen lain berupa protein

phosphatidylmyo inositol mannoside (PIMs), *phthiocerol lipid*, *lipomannan* (LM), *lipoarabinomannan* (LAM). Bagian dalam terdiri dari komponen lipid bilayer, beberapa mengandung asam lemak pendek dengan rantai panjang (Brennan, 2003).

II.2 Tuberkulosis

1. Penyakit TB

Tuberculosis merupakan penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulosis aktif adalah penyakit yang dapat menyerang berbagai organ yang disebabkan oleh infeksi primer atau sebagai reaktivasi dari tuberkulosis laten. Tuberkulosis dapat berupa TB aktif atau reaktivasi tuberkulosis. Tuberkulosis primer terjadi ketika sistem kekebalan tubuh tidak dapat melawan kuman penyebab penyakit. Reaktivasi Tb adalah bentuk tuberkulosis aktif yang paling umum, mewakili 90% kasus. Organ yang sering terkena adalah paru-paru dan organ lainnya seperti sistem pencernaan, sistem muskuloskeletal, sistem limforetikuler, kulit, hati, dan sistem reproduksi (Talha N. et al., 2023).

Komponen kompleks dari MTB memberi dampak pertahanannya dalam melawan kekebalan tubuh sehingga dapat resisten terhadap beberapa obat antibiotik dan kemampuan untuk bertahan hidup dalam kondisi ekstrim. Bakteri ini juga membutuhkan waktu yang lama untuk membelah (sekitar 16 hingga 20 jam), jauh lebih lambat dibandingkan bakteri lain, yang biasanya membutuhkan waktu kurang dari satu jam. *M. tuberculosis* merupakan bakteri intraseluler obligat-aerobik, nonmotil, tidak membentuk spora, katalase-negatif, dan fakultatif serta memiliki Kandungan lipid yang tinggi (Talha N. et al., 2023).

Spesies *Mycobacterium* terdiri dari *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. leprae* dan sebagainya yang juga dikenal sebagai Bakteri Tahan Asam (BTA). Kelompok bakteri *Mycobacterium* selain *Mycobacterium tuberculosis* yang bisa menimbulkan gangguan pada saluran pernapasan dikenal sebagai MOOT (*Mycobacterium Other Than Tuberculosis*) yang terkadang bisa mengganggu penegakan diagnosis dan pengobatan TB. Untuk itu pemeriksaan bakteriologis yang mampu melakukan identifikasi terhadap *Mycobacterium tuberculosis* menjadi sarana diagnosis ideal untuk TB (Kemenkes RI, 2014).

2. Gejala TB Paru

Gejala klinik tuberkulosis dapat dibagi menjadi 2 golongan, yaitu gejala respiratorik dan gejala sistemik. Bila organ yang terkena adalah paru maka disebut sebagai gejala *local* atau respiratorik, namun jika gejala yang dirasakan diseluruh tubuh dan tidak spesifik pada satu organ maka disebut gejala sistemik. Gejala Tuberkulosis adalah sebagai berikut (Putra, 2012):

- a) Gejala Respiratorik.
 - Batuk \geq 3 minggu.
 - Batuk darah.
 - Sesak napas.
 - Nyeri dada.

Gejala respiratorik ini sangat bervariasi, mulai dari tidak adanya gejala sampai gejala yang cukup berat. Biasanya penderita terdiagnosis pada saat *medical check up*. Bila bronkus belum terlibat dalam proses penyakit, maka penderita mungkin tidak ada gejala batuk. Batuk

yang pertama terjadi karena iritasi bronkus dan selanjutnya batuk diperlukan untuk membuang dahak ke luar.

b) Gejala Sistematis

- Demam.
- Anoreksia.
- Keringat Malam.
- Berat badan menurun.

Pada anak-anak gejala TB terbagi 2, yakni gejala umum dan gejala khusus. Gejala umum, meliputi berat badan turun selama 3 bulan berturut-turut, demam lama atau berulang tanpa sebab yang jelas (bukan tifus, malaria atau infeksi saluran nafas akut) dapat disertai dengan keringat malam, pembesaran kelenjar limfesuperficialis yang tidak sakit, batuk lebih dari 30 hari (setelah disingkirkan sebab lain dari batuk), nyeri dada, diare berulang yang tidak sembuh dengan pengobatan diare, dan benjolan (massa) di abdomen. Gejala Khusus, sesuai dengan bagian tubuh yang diserang, misalnya TB kulit atau skrofuloderma, TB tulang dan sendi, meliputi tulang punggung (spondilitis), TB otak dan saraf (Depkes RI., 2005).

3. Klasifikasi TB

Klasifikasi TB dapat dibedakan sebagai berikut (Kementrian kesehatan, 2009):

a) Berdasarkan Lokasi TB

- TB paru, yaitu penyakit yang dapat menyerang jaringan paru terkecuali pleura dan kelenjar hilus.
- TB Ekstra Paru, yaitu penyakit yang dapat menyerang organ tubuhalain selain paru (seperti selaput otak, kelenjar limfe, pleura, perikardium, persendian, tulang kulit, usus, saluran kemih, ginjal, alat kelamin dan lainnya).

b) Berdasarkan Pemeriksaan Bakteriologi

1. TB paru BTA Positif, yakni jenis TB dengan pemeriksaan dahak menunjukkan hasil positif dengan kriteria:
 - Sekurang-kurangnya 2 dari 3 spesimen dahak SPS hasilnya BTA positif.
 - Satu spesimen dahak SPS hasilnya BTA positif dan foto toraks dada menunjukkan gambaran TB.
 - Satu Spesimen dahak SPS hasilnya BTA positif dan biakan kuman TB positif
 - Satu atau lebih spesimen dahak hasilnya positif setelah 3 spesimen dahak SPS pada pemeriksaan sebelumnya hasilnya BTA negatif dan tidak ada perbaikan setelah pemberian antibiotik non OAT.

2. TB Paru BTA Negatif adalah jenis TB dengan pemeriksaan dahak menunjukkan hasil BTA negatif. Kasus yang tidak memenuhi defenisi pada TB paru BTA positif. Kriteria diagnostik TB paru BTA negatif meliputi
 - Setidaknya 3 spesimen dahak SPS hasilnya BTA negatif
 - Foto toraks abnormal menunjukkan gambaran TB
 - Tidak ada perbaikan setelah pemberian antibiotik non OAT.

- Ditentukan atau dipertimbangkan oleh dokter untuk diberi pengobatan

c) Berdasarkan tingkat keparahan

TB paru BTA negatif foto toraks Positif, dibagi berdasarkan tingkat keparahan penyakitnya, yaitu bentuk berat dan ringan.

- Bentuk berat yang digambarkan foto toraks paru dengan kerusakan luas atau keadaan umum penderita buruk, misalnya meningitis, milier, perikarditis, peritonitis, pleuritis eksudativa bilateral, TB tulang belakang, TB usus, TB saluran kemih, dan alat kelamin.
- Bentuk ringan yang digambarkan seperti TB kelenjar limfe, pleuritis eksudativa unilateral, tulang (terkecuali tulang belakang), sendi dan kelenjar adrenal.

d) Berdasarkan riwayat pengobatan

Terdapat beberapa tipe penderita TB paru berdasarkan riwayat pengobatan, yaitu:

- Kasus baru merupakan penderita yang belum pernah mendapat pengobatan dengan OAT atau pernah mengonsumsi OAT kurang dari 1 bulan.
- Kasus kambuh (relaps) yakni sebelumnya penderita TB sudah pernah menjalani pengobatan TB paru dan dinyatakan sembuh dengan pengobatan lengkap dan kemudian kembali berobat dengan hasil pemeriksaan dahak positif BTA.
- Kasus setelah putus berobat (default) atau drop out merupakan penderita yang telah berobat selama 1 bulan atau lebih dan tidak meminum obat selama 2 bulan berturut-turut atau lebih sebelum pengeobatannya selesai.
- Kasus gagal (failure) merupakan penderita BTA positif yang masih positif atau kembali menjadi positif pada akhir bulan ke-5 atau akhir pengobatan.
- Kasus pindahan (Transfer In) merupakan penderita yang dipindahkan dari sarana pelayanan kesehatan yang memiliki register TB lain untuk melanjutkan pengobatannya.
- Lainnya adalah semua kasus yang tidak memenuhi ketentuan diatas, termasuk kasus kronik, yaitu penderita dengan pemeriksaan BTA positif setelah selesai pengobatan ulang.

e) Berdasarkan penularannya

Tb dapat dibagi berdasarkan penularannya yakni (Tabrani, 2010):

- TB Primer, adalah penderita TB yang dialami oleh anak-anak setelah tertular 6-8 minggu yang kemudian membentuk mekanisme imunitas tubuh, sehingga pada tes tuberkulin positif.
- Reaktivasi dari TB Primer, adalah 10% dari infeksi TB primer akan terjadi reaktivasi, terutama setelah 2 tahun dari infeksi primer. Reaktivasi dapat disebut sebagai TB post primer.
- Tipe Reinfeksi, adalah infeksi baru yang terjadi setelah infeksi primer. Infeksi ini jarang terjadi. Infeksi ini dapat terjadi apabila imunitas tubuh menurun atau penularan terjadi secara terus menerus oleh kuman penyebab TB dalam satu keluarga.

4. Epideomologi

Tahun 1882, Robert Koch menemukan bakteri penyebab tuberkulosis yaitu bakteri berbentuk batang. Tuberkulosis mempunyai penyebaran global, dan lebih dari dua miliar orang (sekitar 30% populasi dunia) diduga terinfeksi *M. tuberculosis*. Pada tahun 2003, kejadian tuberkulosis global mencapai puncaknya namun terus menurun secara perlahan. Sebagian besar kasus baru penyakit ini pada tahun 2016 dilaporkan dari Asia (sekitar 45%), diikuti oleh Afrika (sekitar 25%). WHO melaporkan pada tahun 2016 bahwa sekitar 10,4 juta orang terinfeksi TBC, dan sekitar 1,7 juta di antaranya meninggal (Talha N. *et al.*, 2023).

Meskipun terjadi secara global, epidemiologi tuberkulosis sangat bervariasi tergantung wilayahnya.

- India, Afrika sub-Sahara, Mikronesia, dan pulau-pulau di Asia Tenggara mempunyai angka tertinggi (100 per 100.000 orang atau lebih tinggi).
- Tiongkok, Eropa Timur, Amerika Tengah, dan Selatan, serta Afrika bagian utara mempunyai angka kasus sedang (26 hingga 100 kasus per 100.000 orang)
- Amerika Serikat, Kanada, Jepang, Eropa Barat, dan Australia mencatat angka terendah (kurang dari 25 kasus per 100.000 orang)

Orang dewasa muda mempunyai tingkat tuberkulosis aktif tertinggi secara global, namun di negara-negara maju, orang lanjut usia mempunyai tingkat penyakit tertinggi. Orang dewasa dari semua kelompok umur berisiko mengalami penyakit aktif. Faktor risiko tertular penyakit aktif antara lain (Talha N. *et al.*, 2023):

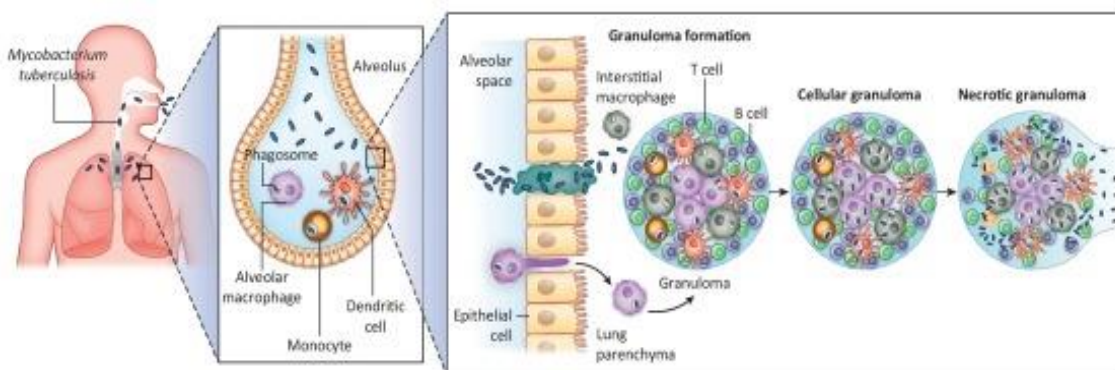
- Koinfeksi dengan HIV mempunyai kemungkinan 20 hingga 30 kali lebih besar untuk berkembang menjadi tuberkulosis aktif.
- Adanya keadaan imunokompromais lainnya, termasuk agen immunosupresif seperti kortikosteroid jangka panjang dan obat anti-TNF.
- Penyakit paru-paru kronis.
- Penggunaan produk tembakau.
- Malnutrisi menunjukkan risiko yang lebih tinggi untuk berkembang menjadi penyakit aktif, sehingga menjadikan tuberkulosis sebagai salah satu penyakit utama kemiskinan.
- Diabetes juga memiliki peningkatan risiko berkembang menjadi TBC aktif dan mengalami hasil pengobatan yang lebih buruk.
- Penggunaan alkohol (lebih dari 40 g per hari).
- Penyalahgunaan obat-obatan terlarang.
- Polusi dalam ruangan.
- Silikosis
- Penyakit ginjal stadium akhir.
- Operasi bypass usus atau gastrektomi.

- Sindrom malabsorpsi kronis

5. Patogenesis

Penularan penyakit TB diawali dengan adanya basil *M. tuberculosis* yang tersebar di lingkungan oleh orang yang terinfeksi melalui batuk atau bersin yang menyebabkan bakteri tersebar disekitar. Bakteri *M. tuberculosis* kemudian secara tidak sengaja dihirup oleh orang-orang terdekat, sehingga bakteri masuk melalui saluran pernapasan dan akhirnya menetap di inang alveoli. Selanjutnya, respon imun bawaan terjadi dan makrofag akan menuju ke daerah yang terinfeksi dan akan memfagosit bakteri tersebut. Biasanya makrofag sanggup menghancurkan sebagian besar bakteri *M. tuberculosis*. Akan tetapi, pada sebagian kecil kasus makrofag tidak mampu menghancurkan bakteri TB dan bakteri akan bereplikasi dalam makrofag. Bakteri TB dalam makrofag yang terus berkembang biak akhirnya akan membentuk koloni di daerah tersebut (Ferraris *et al*, 2018).

Proses ini menyebabkan respon imun akan membentuk struktur infeksi khas yang disebut granuloma yang akan melindungi makrofag yang terinfeksi dari serangan lebih lanjut. Granuloma dapat melindungi bakteri infeksi selama beberapa dekade dan menyebabkan homeostasis antara respon imun inang dan bakteri patogen yang menyerang akan terganggu setiap kali terjadi immunosupresif. Oleh karena itu, pasien HIV positif berisiko tinggi terkena TB (Ferraris *et al*, 2018).



Gambar 3 Mekanisme Infeksi *M. tuberculosis*
Sumber: Koch & Valerie, 2018

Menurut Queiroz & Lee (2017), *M. tuberculosis* memasuki paru-paru dan bertemu dengan ruang udara alveolar. Ruang udara alveolar dibentuk oleh tipe I dan II pneumosit. Pneumosit tipe I mencakup sekitar 96% dari luas permukaan alveolar, sedangkan sel tipe II menutupi sekitar 4%. Diperkirakan bahwa *M. tuberculosis* difagosit oleh makrofag setelah memasuki paru-paru, tetapi dari ruang alveolar menunjukkan bahwa *M. tuberculosis* kemungkinan besar akan berinteraksi dengan pneumosit terlebih dahulu. Kemudian makrofag dan limfosit bermigrasi ke tempat infeksi dan membentuk granuloma.

Kemampuan *M. tuberculosis* untuk bertahan dalam inang tampaknya bergantung pada siklus metabolisme beta-oksidasi dan glioksilatnya. Pada tikus, bakteri menggunakan asam lemak sebagai sumber karbon eksklusif. Selama siklus beta-oksidasi, bahkan asam lemak rantai dikatabolisme menjadi asetil koenzim A (asetil-KoA), dan asam lemak rantai ganjil menjadi asetil-KoA dan propionil-KoA. Basil mencegah akumulasi toksik propionil-CoA dengan mensintesis lipid berbasis methylmalonyl-CoA [phthiocerol dimycocerosate (PDIM), sulpholipid-1 (SL-1), dan polyacyltrehalose] (Queiroz & Lee, 2017).

Siklus Glyoxylate mengubah molekul asetil-KoA yang berasal dari oksidasi beta asam lemak menjadi intermediet siklus asam tricarboxylic. Selain itu, asetil-KoA adalah substrat untuk asam mikolik (MA), lipid berbasis malonil-CoA. *M. tuberculosis* menyesuaikan metabolisme lipidnya karena mengalami pembatasan kondisi nutrisi yang dipaksakan oleh inang. Mengaktifkan dua jalur secara alternatif, bakteri mensintesis lipid berbasis methylmalonyl dan malonyl yang memungkinkan *M. tuberculosis* melakukan persistensi (Queiroz & Lee, 2017).

II.3 Diagnosis dan Pemeriksaan Penunjang Tuberkulosis

a. Diagnosis Tuberkulosis

American Thoracic Society dan WHO menyatakan bahwa diagnosis pasti dari tuberkulosis adalah dengan menemukan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam sputum atau jaringan paru secara biakan. Namun tidak semua pasien memberikan sediaan atau biakan sputum yang positif karena kelainan paru yang belum berhubungan dengan bronkus atau pasien tidak bisa membatukkan sputumnya dengan baik. Kelainan baru jelas setelah penyakit berlanjut.

Penerapan diagnosis di Indonesia masih agak sulit karena fasilitas laboratorium yang sangat terbatas untuk pemeriksaan biakan. Diagnosis tuberkulosis paru masih banyak ditegakkan berdasarkan kelainan klinis dan radiologis saja. Kesalahan dalam diagnosis dengan cara ini cukup banyak sehingga memberikan efek terhadap pengobatan yang sebenarnya tidak diperlukan. Oleh sebab itu dalam diagnosis tuberkulosis paru sebaiknya dicantumkan data dari status klinis, status bakteriologis, status radiologis dan kemoterapi (Sudoyo, *et al.*, 2009).

WHO memberikan kriteria pasien tuberkulosis paru yaitu:

- a. Pasien dengan sputum BTA positif
 - Pasien yang pada pemeriksaan sputumnya secara mikroskopis ditemukan BTA, sekurang-kurangnya pada 2x pemeriksaan.
 - Satu sediaan sputumnya positif disertai kelainan radiologis yang sesuai dengan gambaran TB aktif.
 - Satu sediaan sputumnya positif disertai biakan yang positif.
- b. Pasien dengan sputum BTA negatif
 - Pasien yang pada pemeriksaan sputumnya secara mikroskopis tidak ditemukan BTA sedikitnya pada 2x pemeriksaan tetapi gambaran radiologis sesuai dengan TB aktif.
 - Pasien yang pada pemeriksaan sputumnya secara mikroskopis tidak ditemukan BTA sama sekali, tetapi pada biakannya positif.

b. Pemeriksaan Penunjang

a) Pemeriksaan Bakteriologis

Pemeriksaan mikrobiologis yang dilakukan terdiri dari 2 macam yaitu pemeriksaan mikroskopis hapusan langsung untuk menemukan basil tahan asam (BTA) dan pemeriksaan biakan bakteri *M. tuberculosis*. Bahan untuk pemeriksaan bakteriologis ini dapat berasal dari dahak, cairan pleura, bilasan bronkus, liquor *cerebrospinal* bilasan lambung, kurasan bronkoalveolar, urin, feses dan jaringan biopsi.

Pemeriksaan dahak berfungsi untuk menegakkan diagnosis, menilai keberhasilan pengobatan dan menentukan potensi penularan. Pemeriksaan dahak untuk penegakan

diagnosis pada semua *suspek* TB dilakukan dengan mengumpulkan 3 spesimen dahak yang dikumpulkan dalam dua hari kunjungan yang berurutan berupa dahak Sewaktu-Pagi-Sewaktu (SPS) (Kemenkes RI, 2009):

- S (Sewaktu) : Dahak dikumpulkan pada saat *suspek* TB datang berkunjung pertama kali. Pada saat pulang, *suspek* membawa sebuah pot dahak untuk mengumpulkan dahak pagi pada hari kedua.
- P (Pagi) : Dahak dikumpulkan di rumah pada pagi hari kedua, segera setelah bangun tidur. Pot dibawa dan diserahkan sendiri kepada petugas.
- S (Sewaktu) : Dahak dikumpulkan di UPK pada hari kedua, saat menyerahkan dahak pagi.

Tipe interpretasi pemeriksaan mikroskopis menurut WHO, dibacakan dengan skala IUATLD (*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*):

1. Tidak ditemukan BTA dalam 100 lapangan pandang, disebut negatif.
2. Ditemukan 1-9 BTA dalam 100 lapangan pandang, ditulis jumlah bakteri yang ditemukan.
3. Ditemukan 10-99 BTA dalam 100 lapangan pandang, disebut + (+1).
4. Ditemukan 1-10 BTA dalam 1 lapangan pandang, disebut ++ (+2).
5. Ditemukan >10 BTA dalam 1 lapangan pandang, disebut +++ (+3).

b) Serodiagnostik

Serodiagnostik merupakan uji reaksi antigen-antibodi secara in-vitro. Uji ini satu dari beberapa prosedur laboratorium yang dilakukan pada sampel serum darah untuk tujuan mendeteksi antibodi atau antigen secara khusus dalam hubungannya dengan penyakit tertentu. Beberapa uji serologi yang digunakan antara lain uji Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), uji hemaglutin inhibitor, uji netralisasi, uji Mycodot (LAM), dan lain-lain. Serodiagnostik yang digunakan untuk pemeriksaan diagnosis TB metode direct atau indirect. Metode direct terdiri dari deteksi LAM pada sputum dan deteksi antigen pada cairan tubuh. Metode indirect biasanya untuk mendeteksi antibodi terhadap antigen Mtb. Metode ini menggunakan respon imun seluler dan humoral yang spesifik dari host untuk melawan infeksi atau penyakit. Tes serodiagnostik TB telah dilakukan sejak tahun 1898, menggunakan preparat sel *M. tuberculosis* atau *M. bovis* (Buchari, 2019).

Pada metode indirect dapat dilakukan dengan uji rapid dan ELISA. Rapid test merupakan salah satu teknik baru uji cepat dalam menegakkan diagnosis TB dengan menggunakan Immunochromatography Tuberculosis (ICT-TB) yang merupakan uji serologi untuk mendeteksi antibodi *M. tuberculosis* dalam serum. Uji ICT-TB ini menggunakan 5 antigen spesifik yang berasal dari membran sitoplasma *M. tuberculosis*, diantaranya antigen *M. tuberculosis* 38 kDa. Antigen *M. tuberculosis* 38 kDa yang di sekresikan oleh *M. tuberculosis* diendapkan dalam bentuk garis melintang pada membran immunokromatografi strip tes, tes ini mendeteksi adanya antibodi immunoglobulin G (IgG) terhadap antigen tersebut. Prinsip kerja ICT-TB adalah reaksi antigen pada alat yang akan berikatan dengan anti-TB dari sampel penderita yang dikonjugasikan ke partikel halus berwarna, yaitu colloidal gold (merah) sebagai pelabel. Partikel tersebut sangat halus (1–20 nm) sehingga daya migrasinya kuat sehingga dalam waktu yang sangat singkat dapat mencapai garis atau antigen pengikat dan menimbulkan sinyal warna yang spesifik (Buchari, 2019).

Metode indirect pada uji ELISA dapat mendeteksi respon humoral yaitu berupa proses antigen-antibodi yang terjadi yang memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi dengan

berlabel enzim sebagai penanda reaksi. Terdapat beberapa metode prinsip uji ini yang dapat untuk mendeteksi Ag atau antibodi dengan solid phase. Prinsip dari pemeriksaan ELISA adalah reaksi antigen-antibodi (Ag-Ab) dimana setelah penambahan konjugat, yaitu antigen atau antibodi yang dilabel enzim dan substrat, akan menghasilkan perubahan warna. Perubahan warna ini yang akan diukur intensitasnya dengan alat pembaca yang disebut sebagai ELISA reader dengan menggunakan panjang gelombang tertentu (Buchari, 2019).

c) Pemeriksaan Radiologis

Pemeriksaan ini dikenal dengan foto toraks pada paru-paru. pemeriksaan lain atas indikasi: foto *lateral*, *top-lordotik*, *oblik*, *CT-Scan*. Gambaran *rontgen* pada TB tidak khas. Pada pemeriksaan foto toraks, TB dapat memberikan gambaran bermacam-macam bentuk (*multiform*). gambaran radiologis yang dicurigai sebagai lesi TB aktif ialah adanya bayangan berawan/nodular di segmen *apical* dan *posterior lobus* atas paru dan segmen *superior lobus* bawah serta *kaviti*, terutama lebih dari satu, dikelilingi oleh bayangan opak berawan atau nodular, bayangan bercak *milier*, *efusi* pleura unilateral (umumnya) atau bilateral (jarang).

Gambaran radiologis yang dicurigai lesi TB inaktif berupa: *fibrosis*, *kalsifikasi*, *schwarte*, atau penebalan pleura. Luluh paru apabila terjadi kerusakan jaringan paru yang berat sulit untuk menilai lesi hanya berdasarkan Gambaran radiologis sehingga perlu pemeriksaan bakteriologis untuk memastikan aktifasi penyakit. Kelainan radiologis tersebut bisa juga dijumpai pada penyakit lain. Foto *rontgen* paru yang normal (tidak terdeteksi) tidak dapat menyingkirkan diagnosis TB jika pemeriksaan klinis dan pemeriksaan penunjang lain mendukung.

II.4 Respon Imun Terhadap penyakit TB

Terdapat ada 2 macam respon imun yang dimiliki oleh tubuh terhadap infeksi TB yaitu respon imun seluler (sel T dan makrofag yang teraktivasi) dan pertahanan secara humoral (*antibodi-mediated*). Respon imun seluler lebih banyak memegang peranan dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi tuberkulosis. Sedangkan pertahanan secara humoral lebih digunakan ke penegakkan diagnosis. Respon pertama terjadi diferensiasi limfosit B menjadi satu populasi sel plasma yang memproduksi dan melepaskan anti bodi spesifik ke dalam darah yang dinamakan imunoglobulin. Pembentukan imunoglobulin (Ig) oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat adanya kontak dengan antigen. Antibodi yang terbentuk secara spesifik ini akan mengikat antigen baru lainnya yang sejenis (Bothamley GH. 1995).

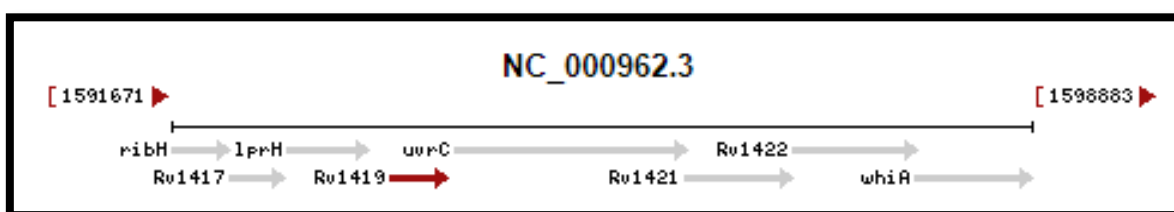
Sel dendritik (DC) dan makrofag merupakan garis pertahanan pertama melawan TB dan berperan dalam pembersihan bakteri infeksi. DC menginternalisasi bakteri infeksi dan menyajikan antigen ke sel T sehingga menyebabkan terjadinya aktivasi dan memulai timbulnya respon imun adaptif. Selanjutnya makrofag memfagosit bakteri patogen yang menyerang dengan menginternalisasi dan memaparkannya pada lingkungan fagosom yang bersifat asam dan aktif secara hidrolitik. Makrofag bersama dengan sel-sel epiteloid dan sel raksasa berinti banyak (juga dikenal sebagai sel raksasa Langhans) dan limfosit T juga merupakan konstituen seluler utama granuloma. Pembentukan infeksi M. tuberculosis memerlukan kontrol ketat atas produksi sitokin proinflamasi dan antiinflamasi. TNF α , IFN- γ , dan IL-1 β sangat penting untuk meningkatkan fungsi dari granuloma, sedangkan IL-10 adalah salah satu regulator negatif utama dari respon inflamasi. TNF α adalah sitokin proinflamasi yang memperlihatkan pembentukan granuloma, sementara IFN- γ memperlihatkan presentasi antigen dan perekrutan CD4+ T limfosit atau limfosit T sitotoksik, dengan demikian memediasi pembunuhan mikobakteri. IL-1 β adalah sitokin proinflamasi yang sebagian besar diproduksi oleh monosit, makrofag, dan DC dan terlibat dalam respon imun inang terhadap M. tuberculosis. IL-1 β terbukti

sel dan imunitas bawaan serta memainkan peran penting dalam interaksi host pathogen terdapat 11 *Mycobacterium tuberculosis* yang mensekresikan lektin seperti molekul dengan analisis bioinformatik. Rv1419 berada diantaranya sebagai lektin dengan berat molekul rendah dan disekresikan selama proliferasi (Liang, dkk., 2016).

Lektin adalah protein pengikat gula yang secara khusus mengenali dan mengikat struktur karbohidrat yang beragam tanpa memodifikasi sehingga lektin dapat ikut berperan dalam beberapa mekanisme seluler seperti adhesi, apoptosis dan agregasi (Munari, 2021). Meskipun awalnya ditemukan pada tumbuhan, namun lektin sekarang dikenal ada pada semua bentuk kehidupan (Patra *et al* 2010).

Lektin hadir dalam filtrat kultur dari MTB H37Rv, tetapi bukan dari mycobacteria non-tuberculosis. Dalam analisis bioinformatika menemukan bahwa protein Rv1419 menjadi antigen imunodominan tipe Th1 yang mengandung banyak epitop sel T dan merangsang IFN- γ dari sel mononuklear darah perifer (PBMC) pada pasien dengan tuberkulosis aktif. IFN- γ adalah unggulan di antara sitokin untuk pengendalian TB dan resistensi terhadap infeksi mikobakteri. Protein Rv1419 diprediksi Salah satu dari protein khusus MTB yang dikonservasi, dan mungkin menjadi target obat TB potensial sesuai dengan analisis bioinformatika (Liang, dkk., 2016).

Ciri khas infeksi mycobacteria adalah pembentukan respon kekebalan yang kuat terhadap antigen yang disekresikan. Sejumlah antigen yang disekresikan oleh MTB telah diusulkan berfungsi sebagai faktor virulensi dan dapat mempengaruhi hasil klinis TB. Rv1419 mengandung domain ricin rantai-B yang mengikat karbohidrat dan termasuk dalam keluarga protein ricin *type- β* trefoil, yang tersusun dari 3 kelompok homolog serta keberadaan pola Q-W, bahwa Rv1419 ORF menampilkan identitas 100% dengan homolognya dari strain klinis MTB CDC1551 (nomor akses gen bank: AE000516.2), *Mycobacterium bovis* BCG (nomor akses gen bank: AM408590.1), dan 78% identitas untuk *Mycobacterium marinum* (nomor akses gen bank: CP000854.1) serta *Mycobacterium ulceran* (nomor akses gen bank: CP000325.1) gen homolog. Data-data ini menunjukkan adanya protein pengikat karbohidrat yang sebelumnya tidak berkarakter yang disekresikan dari Mtb dan sekuens terkait di mycobacteria lain (Nogueira, 2010).



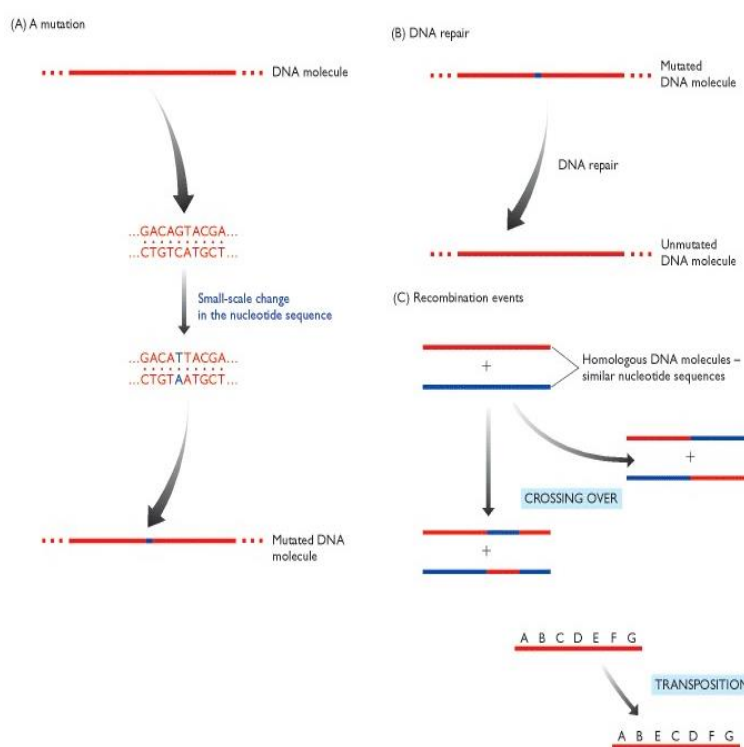
Gambar 5 Letak Gen Rv 1419 pada Genome *Mycobacterium tuberculosis*
Sumber: (NCBI, 2022)

II.6 Mutasi Gen

Mutasi adalah perubahan urutan nukleotida pada wilayah pendek suatu genom. Banyak mutasi merupakan mutasi titik yang menggantikan satu nukleotida dengan nukleotida lainnya; yang lain melibatkan penyisipan atau penghapusan satu atau beberapa nukleotida. Mutasi diakibatkan oleh kesalahan replikasi DNA atau akibat efek merusak dari mutagen, seperti bahan kimia dan radiasi, yang bereaksi dengan DNA dan mengubah struktur nukleotida individu. Semua sel memiliki enzim perbaikan DNA yang berupaya meminimalkan jumlah mutasi yang terjadi. Enzim ini bekerja dalam dua cara. Beberapa bersifat pra-replikasi dan mencari nukleotida dengan struktur yang tidak biasa dalam DNA, yang

digantikan sebelum replikasi terjadi; yang lain melakukan pasca-replikasi dan memeriksa kesalahan DNA yang baru disintesis, mengoreksi kesalahan apa pun yang mereka temukan. Oleh karena itu, definisi mutasi yang mungkin adalah defisiensi dalam perbaikan DNA.

Rekombinasi menghasilkan restrukturisasi bagian genom, misalnya dengan pertukaran segmen kromosom homolog selama meiosis atau dengan transposisi elemen bergerak dari satu posisi ke posisi lain dalam kromosom atau antar kromosom. Berbagai peristiwa lain yang telah kami pelajari, termasuk peralihan tipe perkawinan pada ragi dan konstruksi gen imunoglobulin, juga merupakan hasil rekombinasi. Rekombinasi adalah proses seluler yang, seperti proses seluler lainnya yang melibatkan DNA (misalnya transkripsi dan replikasi), dilakukan dan diatur oleh enzim dan protein lain.

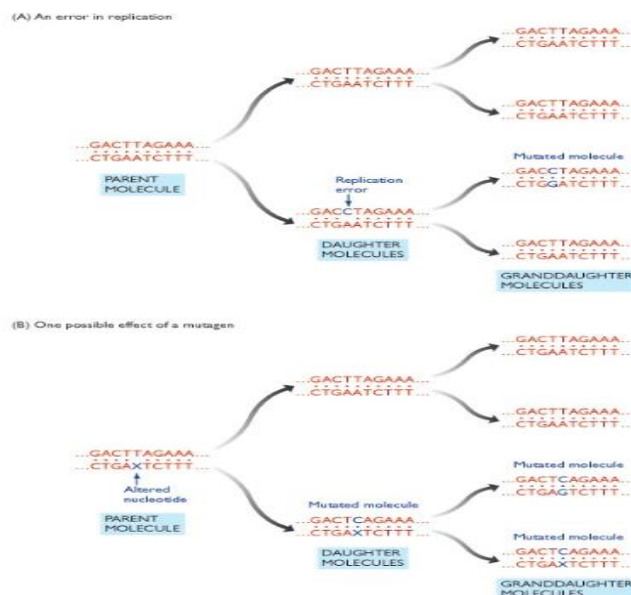


Gambar 6. Mutasi dan DNA Repair

Baik mutasi maupun rekombinasi dapat menimbulkan efek dramatis pada sel tempat terjadinya. Mutasi pada gen kunci dapat menyebabkan sel mati jika protein yang dikode oleh gen mutan rusak, dan beberapa peristiwa rekombinasi menyebabkan perubahan tertentu dalam kemampuan biokimia sel, misalnya dengan menentukan jenis perkawinan sel ragi atau sifat imunologis limfosit B atau T mamalia. Peristiwa mutasi dan rekombinasi lainnya memiliki dampak yang kurang signifikan terhadap fenotip sel dan banyak yang tidak berdampak sama sekali. Semua peristiwa yang tidak mematikan berpotensi berkontribusi terhadap evolusi genom, namun agar hal ini terjadi, peristiwa tersebut harus diwariskan ketika organisme bereproduksi. Pada organisme bersel tunggal seperti bakteri atau ragi, semua perubahan genom yang tidak mematikan atau reversibel diwarisi oleh sel anak dan menjadi fitur permanen dari garis keturunan yang diturunkan dari sel asli tempat perubahan tersebut terjadi. Dalam organisme multiseluler, hanya kejadian yang terjadi pada sel germinal yang relevan dengan evolusi genom. Perubahan pada genom sel somatik tidak penting dalam pengertian evolusi, namun perubahan tersebut akan memiliki relevansi biologis jika mengakibatkan fenotip berbahaya yang mempengaruhi kesehatan organisme.

Mutasi muncul dalam dua cara:

- Beberapa mutasi merupakan kesalahan spontan dalam replikasi yang menghindari fungsi pemeriksaan DNA polimerase yang mensintesis polinukleotida baru pada garpu replikasi. Mutasi ini disebut ketidakcocokan karena merupakan posisi di mana nukleotida yang dimasukkan ke dalam polinukleotida anak tidak cocok, melalui pemasangan basa, dengan nukleotida pada posisi yang sesuai dalam DNA cetakan. Jika ketidakcocokan tetap ada pada heliks ganda anak, maka *salah* satu molekul cucu yang dihasilkan selama putaran replikasi DNA berikutnya akan membawa versi mutasi beruntai ganda yang permanen.
- Mutasi lain muncul karena mutagen bereaksi dengan DNA induk, menyebabkan perubahan struktural yang mempengaruhi kemampuan pasangan basa dari nukleotida yang diubah. Biasanya perubahan ini hanya mempengaruhi satu untai heliks ganda induk, jadi hanya satu molekul anak yang membawa mutasi, namun dua molekul cucu yang dihasilkan selama putaran replikasi berikutnya akan mengalami mutasi tersebut.



Gambar 7. Kesalahan dalam Replikasi dan Mutagen

Jika dianggap murni sebagai reaksi kimia, pasangan basa komplementer tidak terlalu akurat. Belum ada seorang pun yang menemukan cara untuk melakukan sintesis DNA yang bergantung pada cetakan tanpa bantuan enzim, tetapi jika proses tersebut dapat dilakukan hanya sebagai reaksi kimia dalam tabung reaksi maka polinukleotida yang dihasilkan mungkin akan mengalami mutasi titik pada 5–10 posisi dari setiap seratus. Ini mewakili tingkat kesalahan 5–10%, yang sama sekali tidak dapat diterima selama replikasi genom. Oleh karena itu, polimerase DNA yang bergantung pada cetakan yang melakukan replikasi DNA harus meningkatkan keakuratan proses beberapa kali lipat. Peningkatan ini dicapai melalui dua cara:

- DNA polimerase menjalankan proses pemilihan nukleotida yang secara dramatis meningkatkan keakuratan sintesis DNA yang bergantung pada cetakan. Proses seleksi ini mungkin terjadi pada tiga tahapan berbeda selama reaksi polimerisasi, diskriminasi terhadap nukleotida yang salah terjadi ketika nukleotida pertama kali berikatan dengan DNA polimerase, ketika nukleotida tersebut dipindahkan ke situs aktif enzim, dan ketika

nukleotida tersebut melekat pada DNA polimerase. 3' ujung polinukleotida yang sedang disintesis.

- Keakuratan sintesis DNA akan semakin meningkat jika DNA polimerase memiliki aktivitas eksonuklease 3'→5' sehingga mampu menghilangkan nukleotida yang salah sehingga menghindari proses pemilihan basa dan melekat pada ujung 3' polinukleotida baru (disebut proofreading), namun namanya keliru karena prosesnya bukan merupakan mekanisme pemeriksaan aktif. Sebaliknya, setiap langkah dalam sintesis polinukleotida harus dilihat sebagai persaingan antara fungsi enzim polimerase dan eksonuklease, polimerase biasanya menang karena lebih aktif daripada eksonuklease, setidaknya ketika nukleotida terminal 3' menjadi basa. -dipasangkan ke templat. Namun aktivitas polimerase menjadi kurang efisien jika nukleotida terminal tidak berpasangan dengan basa, sehingga terjadi jeda dalam polimerisasi yang memungkinkan aktivitas eksonuklease mendominasi sehingga nukleotida yang salah dihilangkan.

Tidak semua kesalahan dalam replikasi merupakan mutasi titik. Replikasi yang menyimpang juga dapat mengakibatkan sejumlah kecil nukleotida tambahan dimasukkan ke dalam polinukleotida yang sedang disintesis, atau beberapa nukleotida dalam templat tidak disalin. Penyisipan dan penghapusan sering disebut mutasi frameshift karena bila terjadi dalam wilayah pengkode, hal ini dapat mengakibatkan pergeseran kerangka pembacaan yang digunakan untuk translasi protein yang ditentukan oleh gen. Akan tetapi, penggunaan 'frameshift' untuk mendeskripsikan semua penyisipan dan penghapusan tidaklah akurat karena dapat terjadi di mana saja, tidak hanya pada gen, dan tidak semua penyisipan atau penghapusan pada daerah pengkode menghasilkan pergeseran bingkai: penyisipan atau penghapusan tiga nukleotida, atau kelipatan. dari ketiganya, cukup menambah atau menghapus kodon atau bagian dari kodon yang berdekatan tanpa mempengaruhi kerangka pembacaan.

Mutasi penyisipan dan penghapusan dapat mempengaruhi seluruh bagian genom tetapi sangat umum terjadi ketika DNA cetakan berisi rangkaian pendek yang berulang, seperti yang ditemukan pada mikrosatelit. Hal ini karena urutan yang berulang dapat menyebabkan slippage replikasi, di mana untai templat dan salinannya menggeser posisi relatifnya sehingga bagian dari templat tersalin dua kali atau terlewat. Hasilnya adalah polinukleotida baru memiliki jumlah unit berulang yang lebih besar atau lebih kecil. Inilah alasan utama mengapa rangkaian mikrosatelit sangat bervariasi, selip replikasi terkadang menghasilkan varian panjang baru, menambah kumpulan alel yang sudah ada dalam populasi.

II.7 PCR (Polymerase Chain Reaction).

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu tehnik sintesis dan amplifikasi DNA secara invitro. Tehnik ini ditemukan oleh Kary B. Mullis dan F. Faloona pada tahun 1985. PCR didasarkan pada amplifikasi enzimatik fragmen DNA dengan menggunakan dua oligonukleotida primer yang komplementer dengan ujung 5' dari kedua untai sekuensi target. Oligonukleotida ini digunakan sebagai primer (primer PCR) untuk memungkinkan DNA template dicopy oleh DNA polymerase (Nasir, 2002). PCR melibatkan tiga tahap siklus temperatur yang berurutan yaitu denaturasi template (94 – 95⁰C), annealing (penempelan) pasangan primer pada untai ganda DNA target (50 – 60⁰C) dan pemanjangan (72⁰C) (Retnoningrum, 2001).

Tiga tahapan penting dalam Proses PCR menurut Muladno (2000) :

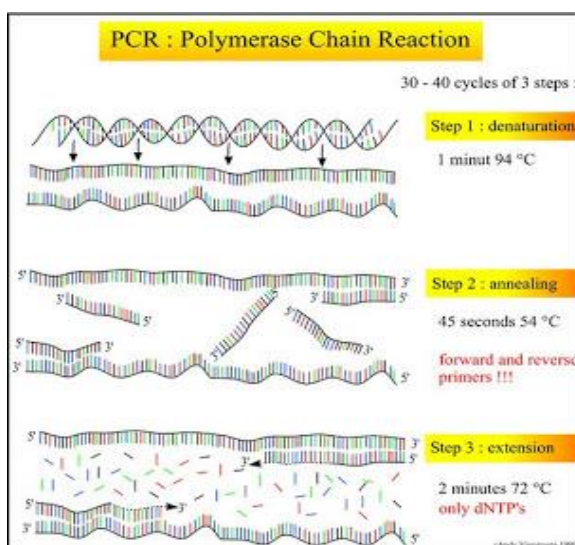
a. Denaturasi

Di dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polimerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5; 95 dan 97,5⁰C.

b. Annealing (penempelan primer)

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18–25 basa, mengandung 50–60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR.

Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30–45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36⁰C sampai dengan 72⁰C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60⁰C



Gambar 8. Siklus PCR. (1) Denaturasi pd 94-960C (2) Annealing pada 680C (3) Elongasi 720C (P = Polimerase) **Sumber:** Yuwono dan Tribowo, 2006

c. Pemanjangan Primer (Extention)

Selama tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72⁰C diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda.

Apabila ketiga tahap dalam proses PCR telah dilakukan maka setiap satu segmen DNA pita ganda diamplifikasikan menjadi dua segmen DNA pita ganda yang identik, sehingga jumlahnya menjadi dua kali lebih banyak dari jumlah semula. Siklus diulang kembali, mulai lagi dengan denaturasi, penempelan dan ekstensi primer (Mordechai, 1999).

Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan yang tinggi karena DNA polymerase mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk. Masalah yang berkenaan dengan PCR yaitu biaya PCR yang masih tergolong tinggi (Mordechai, 1999).

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama:

- DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 10⁵ – 10⁶ molekul. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.
- Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (18 – 28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA yang mempunyai kandungan G + C sebesar 50 – 60% untuk kestabilan penempelan primer.
- Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion Mg²⁺ sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion. Komponen ini yang diperlukan untuk reaksi polimerasi.
- Enzim DNA Polimerase yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini diperoleh dari Eubacterium yang disebut *Thermus aquaticus*, spesies ini diisolasi dari taman Yellowstone pada tahun 1969. Enzim polimerase Taq tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder.
- Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung 10 – 50mM Tris-HCl pH 8,3-8,8 (suhu 20⁰C); 50 mM KCl; 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); Tween 20 sebanyak 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1% disamping itu perlu ditambahkan 1,5 mM MgCl₂.

Pada proses PCR menggunakan menggunakan alat termosiklus. Sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung reaksi dan mengatur temperatur untuk tiap tahapan reaksi.

II.8 Sequencing DNA

Teknik sequencing DNA (DNA sequencing) adalah cara menentukan urutan basa-basa nukleotida suatu fragmen DNA. Teknik ini merupakan salah satu teknik yang sangat penting dalam bidang biologi molekuler, yang dapat dimanfaatkan untuk menentukan urutan basa nukleotida suatu gen atau sekuen genom total suatu sel atau organisme (Radji M, 2011).

Teknik pengurutan basa DNA terdiri dari 2 macam cara yang dikembangkan hampir secara bersamaan yaitu: 1). Cara degradasi kimiawi oleh A.Maxam dan W. Gilbert di Amerika. Cara terminasi rantai oleh F. Sanger dan A.R. Coulson di Inggris (Radji M, 2011)

1. Teknik Maxam – Gilbert

Teknik pengurutan basa yang pertama kali dikenal adalah teknik kimia yang dikembangkan A.Maxam dan W. Gilbert pada tahun 1977. Fragmen DNA yang akan diurutkan

dilabel dengan radioaktif (^{32}P) pada salah satu ujung 5'. Teknik Maxam – Gilbert, dapat diterapkan baik untuk urutan DNA untai ganda maupun DNA untai tunggal (Radji M, 2011).

Molekul DNA dipotong terlebih dahulu secara parsial dengan piperidin. Pengaturan lama inkubasi atau konsentrasi piperidin yang digunakan dapat menghasilkan potongan fragmen DNA dalam berbagai ukuran. Selanjutnya basa DNA dimodifikasi dengan menggunakan senyawa kimia tertentu. Dimetilsulfat digunakan untuk metilasi basa G, asam fosfat untuk menghidrolisis basa A dan G, sedangkan hidrazin digunakan untuk menghidrolisis basa C dan T. Dengan demikian akan dihasilkan empat jenis fragmen DNA yang memiliki ukuran berbeda dengan masing-masing memiliki ujung G, ujung C, ujung A dan ujung T (Radji M, 2011).

Fragmen-fragmen DNA yang dihasilkan selanjutnya di elektroforesis dengan gel poliakrilamida. Berdasarkan pola migrasi pada gel elektroforesis dapat ditentukan urutan basa-basa DNA dari molekul DNA yang ditentukan urutan basa-basanya (Radji M, 2011).

2. Teknik Sanger – Coulson

Teknik Sanger-Coulson merupakan teknik yang saat ini sering digunakan untuk menentukan urutan basa DNA. Teknik Sanger-Coulson lebih praktis dari Maxam–Gilbert, sehingga teknik Sanger lebih banyak dikembangkan dan digunakan untuk sequencing DNA (Radji M, 2011).

Teknik Sanger-Coulson pada dasarnya memanfaatkan sifat enzim DNA polimerase yaitu fragmen klenow, yang memiliki kemampuan mensintesis DNA dengan adanya dNTP dengan ddNTP. Molekul dNTP, tidak memiliki gugus hidroksil (OH), pada atom C nomor 2 pada cincin gula pentosa, sedangkan molekul ddNTP, tidak memiliki 2 gugus PH pada posisi atom C nomor 2 dan nomor 3 pada cincin gula pentosa (Radji M, 2011).

Teknik sequencing DNA menggunakan teknik dideoksinukleotida dilakukan pada 4 tabung reaksi yang berbeda, dimana pada setiap tabung reaksi berisi campuran reagen yang terdiri dari cetakan DNA untai tunggal yang disekuens, primer oligonukleotida, DNA polimerase, campuran dNTP dan larutan buffer (Radji M, 2011).

DNA cetakan akan disekuensing adalah DNA untai tunggal sehingga biasanya diklon terlebih dahulu dalam vektor M13. Sedangkan molekul ddNTP yang dilabeli dengan senyawa radioaktif atau non-radioaktif, hanya ditambahkan pada campuran reaksi yang sesuai yaitu untuk tabung A hanya ditambahkan ddATP, untuk tabung C hanya ditambahkan ddCTP, untuk tabung G ditambahkan ddGTP, sedangkan untuk tabung T ditambahkan ddTTP (Radji M, 2011).

Pada proses pemanjangan untai DNA, selain menggunakan dNTP, secara acak juga menggunakan ddNTP, maka jika ddNTP terikat, polimerisasi lebih lanjut basa-basa DNA tidak terjadi atau terhenti, pada langkah-langkah dasar proses pengurutan basa-basa DNA (Radji M, 2011).

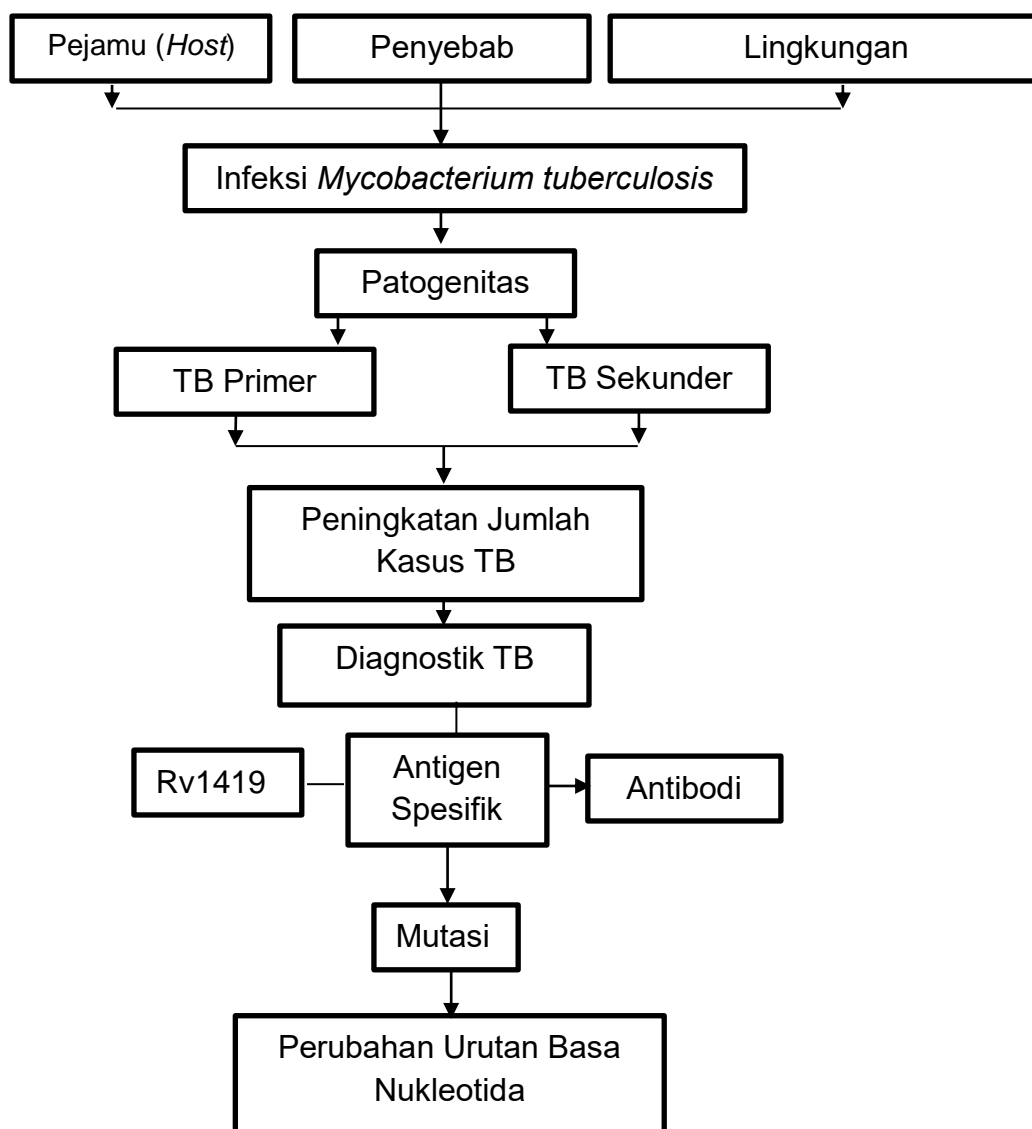
Disiapkan 4 tabung reaksi yang mengandung masing-masing DNA untai tunggal yang akan disekuens, primer oligonukleotida, empat jenis dNTP, enzim DNA polimerase dan larutan buffer. Kemudian kedalam tabung No.1 ditambahkan ddGTP, tabung No.2 ditambahkan ddCTP, tabung No.3 ditambahkan ddATP, dan tabung No.4 ditambahkan ddTTP. DNA cetakan dalam masing-masing tabung kemudian diamplifikasi secara *in vitro* dengan teknik PCR. Dengan demikian dalam setiap reaksi akan dihasilkan sejumlah fragmen DNA dengan ukuran bervariasi dimana setiap fragmen DNA tersebut memiliki gugus ddNTP yang telah dilabel dengan radioaktif pada setiap ujung 3'nya. Untuk mengetahui ukuran fragmen-fragmen DNA

yang terbentuk dilakukan elektroforesis menggunakan gel poliakrilamida, kemudian dideteksi dengan alat autoradiografi (Radji M, 2011)

Berdasarkan perbedaan-perbedaan migrasi masing-masing fragmen DNA akan dapat ditentukan urutan basa-basa DNA-nya. Hasil sequencing DNA merupakan urutan basa yang komplementer terhadap urutan basa-basa yang terbaca pada hasil elektroforesis (Radji M, 2011).

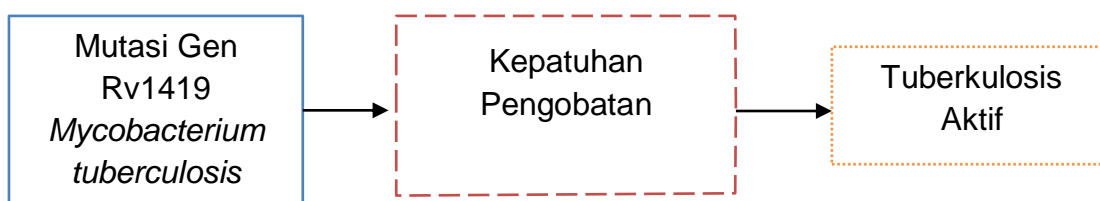
Sistem pelabelan yang semula dilakukan dengan radioisotop, telah dikembangkan dengan sistem pelabelan senyawa fluoresen yang berbeda warna pendarannya untuk setiap dNTP terminal. Perbedaan emisi cahaya senyawa fluoresen ketika tereksitasi oleh sinar laser, akan terbaca dengan jelas oleh alat pendeteksi optik (detektor) yang terdapat pada mesin DNA sekuensing, sehingga urutan basa-basa DNA dapat terdeteksi pada sistem elektroforesis kapiler (Radji M, 2011).

II.9 Kerangka Teori





Gambar 9. Kerangka Teori

II.10 Kerangka Konsep



Keterangan:

 = Variabel Bebas

 = Variabel Antara

 = Variabel Tergantung

Gambar 10. Kerangka Konsep

II.11 Defenisi Operasional

1. *Mycobacterium tuberculosis* termasuk bakteri gram positif yang bersifat aerob obligat dan tahan asam. Bakteri tersebut dapat menyebabkan penyakit tuberculosis yang menyerang paru-paru.
2. Isolate adalah biakan murni dari mikroorganisme yang diharapkan berasal dari satu jenis mikroorganisme
3. Mutasi adalah suatu perubahan frekuensi dan kombinasi alel gen, atau kromosom secara genetika atau kromosom secara seketika (spontan).
4. Rv1419 adalah gen dengan open reading frame (ORF) yang mengandung 474 nukleotida dan pengkodean protein hipotetis dengan 157 asam amino dan peptida sinyal yang diprediksi dengan 33 Asam amino N-terminal. Gen Rv 1419 pada *Mycobacterium tuberculosis* mengkode sekresi lektin yang berperan dalam interaksi host-Mycobacteria dan menimbulkan respon imun spesifik. Respon yang ditimbulkan yakni merangsang

sistem imun berupa sitokin IFN- γ , mendorong peningkatan produksi IFN- γ dan memperlihatkan titer serum dengan IgG yang tinggi pada pasien TB aktif.

5. *Polymerase Chain Reaction* adalah metode molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi Gen *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil positif yang diperoleh dengan adanya kesesuaian pita dengan control positif dari gen. Sequencing adalah penentuan urutan basa dalam fragmen DNA.
6. Teknik sequencing DNA (DNA sequencing) adalah cara menentukan urutan basa-basa nukleotida suatu fragmen DNA.