

SKRIPSI

**DETEKSI GEN Rv1419 ISOLAT KLINIS *Mycobacterium tuberculosis*
SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN TUBERKULOSIS**

Disusun dan diajukan oleh

DIAN RAMADHANI

H041171305



**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

LEMBAR HALAMAN PENGESAHAN

**DETEKSI GEN Rv1419 ISOLAT KLINIS *Mycobacterium tuberculosis*
SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN TUBERKULOSIS**

Disusun dan diajukan oleh

DIAN RAMADHANI

H041171305

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Program Sarjana Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal 13 Juli 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan.

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

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

Pembimbing Pendamping,

Dr. Sjafaraenan, M. Si
NIP. 19580816 198703 2 001

Ketua Program Studi,



Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si.
NIP. 196801291997022001

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dian Ramadhani

NIM : H041171305

Program Studi : Biologi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul Deteksi Gen Rv1419 Isolat Klinis *Mycobacterium tuberculosis* sebagai Kandidat Vaksin Tuberkulosis adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 13 Juli 2021

Yang Menyatakan



(Dian Ramadhani)

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT, atas segala limpahan rahmat dan karunia-NYA sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul Deteksi Gen Rv1419 Isolat Klinis *Mycobacterium tuberculosis* sebagai Kandidat Vaksin Tuberkulosis sebagai syarat untuk mencapai gelar Sarjana pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Shalawat serta salam senantiasa tercurah kepada baginda Rasulullah Muhammad Shallallahu ‘Alaihi Wassallam yang telah mengantarkan manusia dari zaman kegelapan ke zaman yang terang-benderang ini.

Perjalanan panjang telah penulis lalui dalam rangka menyelesaikan penulisan skripsi ini. Banyak hambatan yang dihadapi dalam penyusunannya, namun berkat kehendak-Nyalah dan juga bantuan dari semua pihak sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, dengan penuh kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih kepada keluarga khususnya kedua orang tua penulis, Ayahanda H. Salman dan Ibunda Hj. Hariyati serta adik saya Muhammad Ihsan dan Tadzkiratul Husna atas doa dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis. Kepada Ibunda Dr. Rosana Agus, M.Si sebagai pembimbing utama dan Dr. Sjafaraenan, M.Si sebagai pembimbing pertama penulis ucapkan terima kasih atas waktu, bimbingan dan motivasi yang telah diberikan kepada penulis selama penulis melakukan penelitian hingga selesainya penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih dan penghargaan juga penulis haturkan kepada:

1. Prof. Dr. Dwia Aries Tina P., M.A., selaku Rektor Universitas Hasanuddin.
2. Dr. Eng Amiruddin, M.Sc selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.
3. Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si., selaku Wakil Dekan III Bidang Kamahasiswaan dan Alumni yang telah memberikan arahan dan bimbingan kepada penulis.
4. Dr. Nur Haedar M.Si. selaku ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin yang telah memberikan masukan dan motivasi kepada penulis.
5. Dr. Rosana Agus, M.Si. selaku dosen Penasehat Akademik yang telah meluangkan waktu untuk berdiskusi dan memberikan masukan serta nasihat kepada penulis selama menempuh kuliah di jurusan Biologi Universitas Hasanuddin.
6. Dr. Juhriah, M.Si. dan Dr. Syahribulan, S.Si., M.Si. selaku dosen penguji. Terima kasih atas waktu yang telah didedikasikan kepada penulis atas saran serta perbaikan untuk skripsi ini.
7. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Biologi Universitas Hasanuddin yang tidak dapat penulis tulis satu persatu atas ilmu yang telah diberikan, motivasi, serta arahan kepada penulis selama mengikuti pendidikan.
8. Staf Tata Usaha dan Akademik Jurusan Biologi Universitas Hasanuddin yang telah banyak membantu mulai dari administrasi pendidikan hingga penyelesaian tugas akhir.
9. Seluruh analis HUM-RC beserta staff RS. Universitas Hasanuddin yang telah memberi arahan serta bimbingannya selama penelitian.

10. Keluarga besar penulis yang selalu memotivasi hingga skripsi ini tersusun.
11. Sahabat penulis yaitu Nur Islami Fahmi, Mutmainna, Nabila Agus, Sitti Nuraini Rahmah, Ainun Regita Cahyani, Wardatullativa, Nur Afny, Wandah Muslimin, A. Nur Fadillah, Putri Utami Haris, Diaz Nadiya Zainal, Kusmira Nur Fadilla, Erviyani, Irmayana, Santika Miftahul Annisa, Sri Ayu, Melisa Yuliyanti, Ersaf Safri, A. Aidil Fajri, Nurul Izzah, Learin Denica, Nurfadilah Yusuf, dan Wahyuddin yang selalu ada serta memotivasi dan membantu penulis selama penyusunan skripsi ini. Terima kasih telah menjadi sahabat terbaik bagi penulis.
12. Sahabat-sahabatku *until Jannah Mts Squad* yaitu Khaerati, Andi Fatwa Ananta, Andriyono Tasakkur, Damayanti Darman, Elsa A., Elvira Dwi Kurnia, Nadiah Mustafa, Nurhidayah, Nurhidayah Haruna Rio, Putri Nur Islami Samad, Vira Yuniar, Andi Abd. Kadir Jaelani, Sri Rahayu, Muhammad Yusril Ilham, Nur Hikmah Hamka, dan Surya Budi yang selalu memberikan dukungan serta semangat yang tiada hentinya.
13. Teman-teman seperjuangan TB Squad yaitu Jesika Bangkaran, Paula Natasha Arincy Selaginella Vierin, Kezya Tangketasik, dan juga paling ganteng Ferdinando S. Silang yang telah banyak membantu selama penelitian.
14. Saudara-saudariku Stroxiiidu 2014 dan Biovergent 2017 yang sudah berjuang bersama-sama hingga sampai di tahap ini.
15. Dan untuk semua pihak yang tidak dapat penulis tulis satu persatu. Terima kasih telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Semoga Allah SWT senantiasa membalas segala kebaikan kalian. Penulis sadari bahwa skripsi ini sangat jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu saran dan

kritik sangat diperlukan untuk perbaikan skripsi ini. Akhir kata, semoga skripsi ini menjadi acuan yang bermanfaat dikemudian hari bagi kegiatan penelitian yang berkaitan dengan judul penelitian ini.

Makassar, 13 Juli 2021

Penulis

ABSTRAK

Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi yang terdapat pada saluran pernafasan disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Penelitian ini berjudul “Deteksi Gen Rv1419 Isolat Klinis *Mycobacterium tuberculosis* sebagai Kandidat Vaksin Tuberkulosis”. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan gen Rv1419 sebagai kandidat vaksin tuberkulosis. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai bulan Mei 2021 di Laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC). Penelitian ini diawali dengan pengambilan sputum pasien positif tuberkulosis dengan jumlah 8 sampel di Laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC). Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah amplifikasi (PCR) menggunakan primer forward 5'- GATCGCTAGCATGGGTGAATTACGGTTG-3', primer reverse 5'-TATCTCGAGCGGCACGCTATCCCA-3' dan visualisasi elektroforesis. Produk PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis yang menunjukkan bahwa terbentuknya fragmen pita DNA yang berukuran 474 bp pada sampel A, B, C, D, E, F, dan H sedangkan pada sampel G tidak terbentuk fragmen pita DNA. Pada *Mycobacterium tuberculosis* diperoleh keberadaan gen Rv1419 sebagai kandidat vaksin tuberkulosis.

Kata kunci : Deteksi, *Mycobacterium tuberculosis*, Rv1419, Vaksin, Tuberkulosis, PCR.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease found in the respiratory tract caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. This research was titled "Detection of the Rv1419 Gene Isolate Clinical *Mycobacterium tuberculosis* as Candidate for Tuberculosis Vaccine". The research aims to detect the presence of the Rv1419 gene as a candidate for tuberculosis vaccine. This research was conducted from February to May 2021 at the Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC) Laboratory. The sputum collection of tuberculosis positive patients with a total of 8 samples at the Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC) Laboratory. The methods used in this research were amplification (PCR) using forward primer 5'- GATCGCTAGCATGGGTGAATTACGGTTG-3', reverse primer 5'-TATCTCGAGCGGCACGCTATCCCA-3' and electrophoresis visualization. The PCR product was visualized using electrophoresis which showed that the formation of DNA band fragments measuring 474 bp in samples A, B, C, D, E, F, and H, while in sample G did not form DNA band fragments. In *Mycobacterium tuberculosis*, the Rv1419 gene was found as a candidate for tuberculosis vaccine.

Keywords: Detection, *Mycobacterium tuberculosis*, Rv1419, Vaccine, Tuberculosis, PCR.

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.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
II.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
II.1.1 Klasifikasi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
II.1.2 Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
II.1.3 Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
II.2 Patogenesis Tuberkulosis.....	8
II.3 Respon Imun terhadap Tuberkulosis	10

II.4 Vaksin <i>Bacille Calmette-Guérin</i> (BCG)	11
II.5 Gen RV1419	14
II.6 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	15
II.7 Elektroforesis.....	19
BAB III METODE PENELITIAN	20
III.1 Alat Penelitian	20
III.2 Bahan Penelitian	20
III.3 Prosedur Penelitian	21
III.3.1 Kultur <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
III.3.2 Isolasi DNA Kromosom	21
III.3.3 Amplifikasi Rv1419 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dengan PCR	22
III.3.4 Elektroforesis Produk PCR	23
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
IV.1 Kultur <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
IV.2 Ekstraksi DNA.....	27
IV.3 Amplifikasi Rv1419 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dengan PCR.	28
BAB V PENUTUP.....	32
V.1 Kesimpulan	32
V.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2. Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
3. Penyebaran TB.....	9
4. Letak Gen Rv1419 pada <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
5. Hasil Pewarnaan Ziehl Neelsen	26
6. Hasil BLAST untuk Primer Forward.....	28
7. Hasil BLAST untuk Primer Reverse.....	28
8. Hasil Elektroforesis Produk PCR.....	29

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Deteksi Gen Rv1419	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja	39
2. Ekstraksi DNA <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	40
3. Amplifikasi DNA dengan Metode PCR.....	41
4. Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis	42
5. Lanjutan	43
6. Lanjutan	44

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TBC atau TB) merupakan penyakit infeksi yang terdapat pada saluran pernafasan disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Sebagian besar penyakit TB ini menyerang paru-paru tetapi juga dapat menyerang organ tubuh yang lain (Aravindan *et al.*, 2019). Penyakit ini juga merupakan penyakit menular yang penyebarannya dari individu yang satu ke individu yang lainnya melalui udara dalam bentuk droplet (percikan dahak) (Cohen *et al.*, 2019). Adapun faktor-faktor yang mengakibatkan terjadinya penularan pada penyakit ini adalah tempat tinggal yang kurang bersih, serumah dengan penderita TB, mengkonsumsi makanan yang kurang gizi seimbang, menderita HIV/AIDS, dan sebagainya (Aini *et al.*, 2017).

Pada tahun 2019 dalam *Global Tuberculosis Report* mengatakan bahwa Tuberkulosis merupakan penyakit menular yang termasuk satu dari 10 penyebab kematian yang ada di dunia. Secara global, sekitar 10 juta (kisaran 9-11,1 juta) orang menderita penyakit TB pada tahun 2018, angka tersebut relatif stabil dalam beberapa tahun terakhir. Sekitar 1,2 juta dari angka tersebut (kisaran 1,1-1,3 juta) penderita TB meninggal antara HIV negatif dan penambahan kematian 251.000 (kisaran 223.000-281.000) antara orang yang positif HIV. Penyakit TB mempengaruhi orang baik dalam segi jenis kelamin maupun umur, pada pria 5,7 juta, pada wanita 3,2 juta, anak-anak yang berumur kurang dari 15 tahun sebanyak

1,1 juta serta diantara semua kasus TB yang ada, sekitar 860.000 orang merupakan penderita HIV (WHO, 2019).

Berdasarkan data WHO, jumlah kasus baru mengenai TB di Indonesia sebanyak 845.000 kasus pada tahun 2018. Berdasarkan dari jenis kelamin, jumlah kasus TB tahun 2018 pada laki-laki 1,4 kali lebih besar dibandingkan pada perempuan. Bahkan berdasarkan Survei Prevalensi Tuberkulosis prevalensi pada laki-laki 3 kali lebih tinggi dibandingkan pada perempuan. Begitu juga yang terjadi di negara-negara lain. Hal ini kemungkinan terjadi karena laki-laki lebih terpapar pada faktor risiko TB misalnya merokok dan serta kurangnya ketidakpatuhan dalam meminum obat. Survei ini menemukan bahwa dari seluruh partisipan laki-laki yang merokok sebanyak 68,5% dan hanya 3,7% partisipan perempuan yang merokok. Berdasarkan Survei Prevalensi Tuberkulosis tahun 2013-2014, prevalensi TB dengan konfirmasi bakteriologis di Indonesia sebesar 759 per 100.000 penduduk berumur 15 tahun ke atas dan prevalensi TB BTA positif sebesar 257 per 100.000 penduduk berumur 15 tahun ke atas (WHO, 2019).

Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Provinsi Sulawesi Selatan merupakan salah satu Provinsi di Indonesia yang menyumbang angka tuberkulosis yang cukup tinggi. Secara kumulatif jumlah kasus tuberkulosis yang dilaporkan di Provinsi Sulawesi Selatan pada tahun 2018 sebanyak 23.427 kasus dari 8.771.970 penduduk yang tersebar pada 24 Kabupaten/Kota yang terdapat di Provinsi Sulawesi Selatan. Berdasarkan data dari Dinas Kesehatan Sulawesi

Selatan data tertinggi terdapat di Kabupaten Takalar kemudian di Kota Pare-pare dan yang ketiga terdapat di Kabupaten Pinrang (Kemenkes RI, 2019).

Sejak ditemukannya penyakit TB sampai sekarang vaksin yang digunakan di seluruh dunia yaitu vaksin Bacille Calmette-Guérin (BCG). Vaksin BCG adalah vaksin yang berisi kuman *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa BCG hanya mampu mencegah penyakit berat, seperti kasus TB milier atau meningitis TB, tetapi tidak dapat mencegah perkembangan fase laten atau reaktivasi (Fitria *et al.*, 2016). Adapun efektivitas dari vaksin BCG yang sudah lama menjadi perdebatan karena vaksin ini dinilai terbatas dalam menangkal TB sedangkan efektivitasnya sendiri sangat bervariasi 0-80% (Rosandali *et al.*, 2016). Penelitian lain pun menunjukkan bahwa BCG berperan dalam mencegah penyebaran kuman TB melalui darah. Dalam artian bahwa vaksin BCG bukan mencegah penyakit TB, melainkan menahan pertumbuhan focus primer pada paru dan kelenjar getah bening dan juga mencegah penularan secara limfohematogenus (Purniti *et al.*, 2015).

Deteksi gen merupakan proses pengidentifikasian suatu gen dengan menggunakan beberapa cara, salah satunya dengan menggunakan teknik PCR (Azyenala dan Marlina, 2016). Rv1419 merupakan gen yang memiliki 474 susunan nukleotida dan mengkode 157 asam amino dan 33 asam amino N-terminal (Liang *et al.*, 2016). Rv1419 merupakan gen yang mengkode protein sMTL-13 dalam *Mycobacterium tuberculosis*. Protein sMTL-13 dapat berperan selama masuknya bakteri dalam makrofag induk yaitu makrofag yang berasal dari manusia (Bafica *et al.*, 2015). Protein sMTL-13 juga berperan dalam

menimbulkan respon imun spesifik. Respon yang ditimbulkan yakni merangsang sistem imun berupa sitokin IFN- γ keluar (Noguera *et al.*, 2010).

Berdasarkan uraian data diatas maka perlu dilakukan penelitian mengenai deteksi gen Rv1419 isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* untuk diperoleh gen target yang dapat digunakan sebagai kandidat vaksin tuberkulosis. Diperolehnya gen target tersebut diharapkan dapat memberikan informasi mengenai gen yang dapat dijadikan sebagai kandidat vaksin pada penyakit tuberkulosis.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini yaitu untuk mendeteksi keberadaan gen Rv1419 sebagai kandidat vaksin tuberkulosis.

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai efektivitas gen Rv1419 yang mengkode protein sMTL-13 dari *Mycobacterium tuberculosis* sebagai kandidat vaksin tuberkulosis.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-Mei 2021 di Laboratorium Tuberkulosis *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 *Mycobacterium tuberculosis*

II.1.1 Klasifikasi *Mycobacterium tuberculosis*

Adapun klasifikasi *Mycobacterium tuberculosis* antara lain, sebagai berikut (Han *et al.*, 2015):

Domain	: Bakteri
Phylum	: Actinobacteria
Classis	: Actinobacteria
Ordo	: Actinomycetales
Familia	: Mycobacteriaceae
Genus	: <i>Mycobacterium</i>
Species	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

II.1.2 Morfologi *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) merupakan bakteri gram positif kecil yang berbentuk batang dengan dinding tebal yang kaya akan zat lilin (terbuat dari peptidoglikan). Hal ini yang mengakibatkan keberadaan bakteri ini bersifat hidrofobik di alam. Bakteri ini berbeda dibandingkan dengan bakteri lain terhadap sifat tahan asam serta sifat pertumbuhannya lambat (Lamichhane dan Natalie, 2018). *Mtb* juga merupakan bakteri Gram-positif dengan genom yang kaya akan G + C, mengandung lapisan tambahan di luar peptidoglikan yang sangat kaya akan lipid, glikolipid, dan polisakarida (Cole *et al.*, 1998). *Mtb* berbentuk batang

dan bersifat tahan asam sehingga dikenal juga sebagai Bakteri Tahan Asam (BTA) (Widayanti *et al.*, 2013). Selubung pada *Mtb* memiliki memiliki tiga komponen penyusun yaitu struktur plasma membran, dinding serta kapsul. Plasma membran berperan dalam proses patologis, dinding yang berperan penting dalam fisiologi dan patogenesis (Widodo *et al.*, 2016).



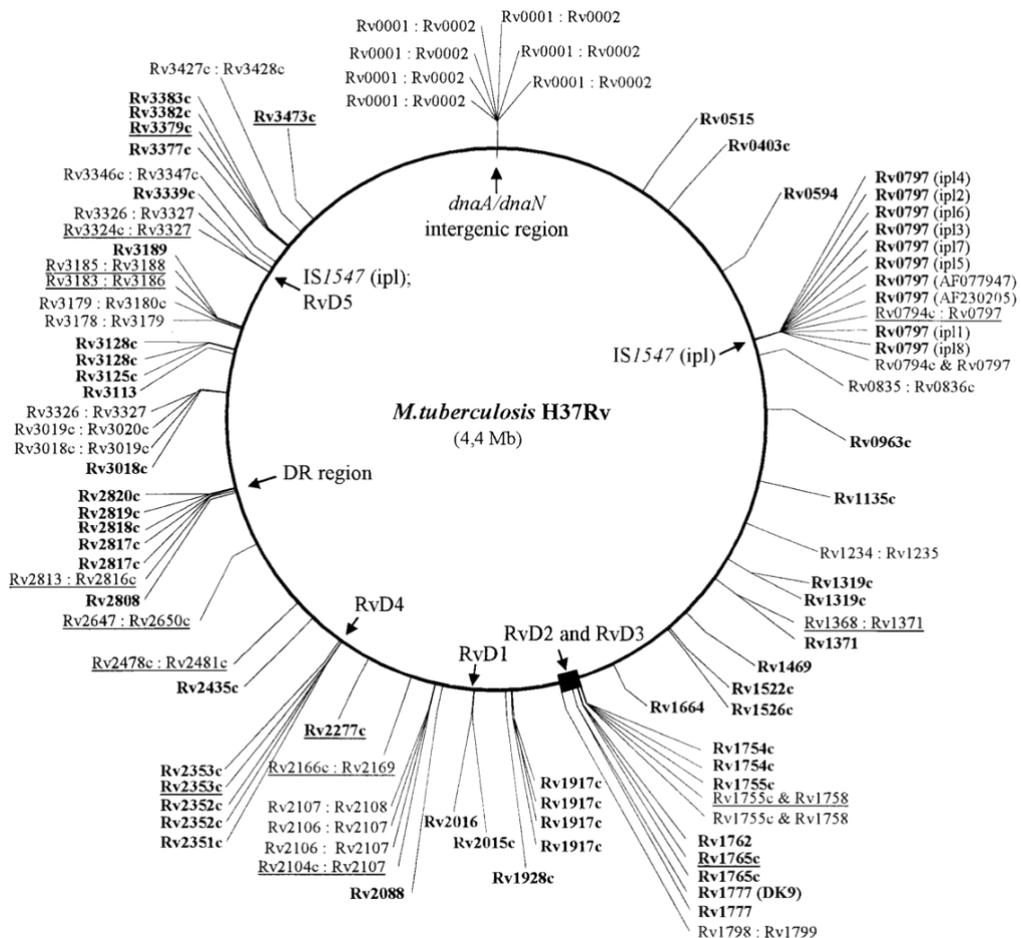
Gambar 1. Morfologi *Mycobacterium tuberculosis* (NCBI, 2020)

II.1.3 Genom *Mycobacterium tuberculosis*

Strain bakteri yang paling umum digunakan untuk studi tentang TB adalah *Mtb* H37Rv, strain ganas laboratorium yang genom lengkapnya telah diterbitkan sejak 1998 oleh Sanger Center dan Institut Pasteur. *Mtb* H37Rv pertama kali diisolasi dari dahak pasien TB pada tahun 1905. Ini dipertahankan virulensi penuh selama 22 tahun dan didistribusikan di seluruh dunia dan digunakan secara luas sebagai percobaan strain tuberkulosis. Genom terbaru yang diperbarui database menunjukkan bahwa strain H37Rv terdiri dari total 4008 gen yang mengkode total 3906 protein dan 70 RNA stabil. Kandungan G + C yang tinggi dari genom mencerminkan hal itu komposisi asam amino dari proteom adalah terwakili

dengan asam amino seperti glycine, alanin, prolin, dan arginin sedangkan asam amino yang dikodekan kaya akan kandungan A + T seperti lysine dan asparagine ditemukan dalam jumlah yang lebih rendah (Lamichhane dan Natalie, 2018).

Genom pada *Mtb* juga merupakan genom terbesar kedua setelah genom *Escherichia coli*. Genom *Mtb* H37Rv memiliki 4.411.529 bp dengan kandungan komponen G + C sebanyak 65,6%. Namun, berdasarkan penelitian ada yang menunjukkan bahwa beberapa daerah memiliki kandungan komponen G lebih tinggi dibanding komponen C. Akan tetapi, kandungan komponen G + C relatif konstan di seluruh genom (Cole *et al.*, 1998).



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

II.2 Patogenesis Tuberkulosis

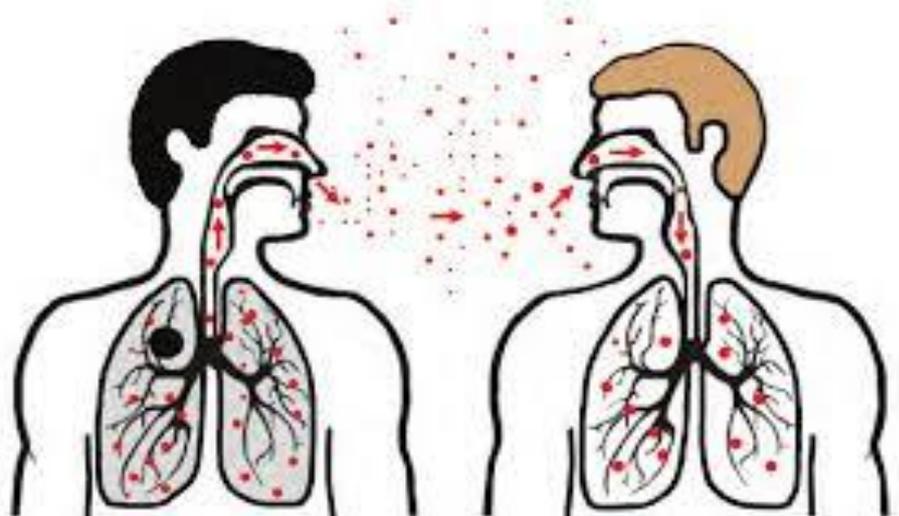
Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyebab utama kematian di dunia. Resistansi obat yang muncul adalah ancaman global yang serius dan dapat menimbulkan tantangan signifikan bagi kesehatan masyarakat (Advani *et al.*, 2019). TB merupakan salah satu masalah kesehatan yang utama bagi masyarakat dunia serta menjadi penyebab kematian kedua di dunia setelah penyakit HIV/AIDS. Antara 10-20% mereka yang terinfeksi akan berkembang menjadi penyakit TB aktif yang dapat berlanjut ke infeksi aktif pada saat immunosupresi. 1953. Namun, TB terus menjadi ancaman kesehatan utama, terutama di antara orang-orang yang kelahiran asing (Singer dan Leshinsky, 2016).

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang merupakan penyebab utama kesehatan yang buruk, salah satu dari 10 penyebab utama kematian di seluruh dunia dan penyebab utama kematian dari satu agen infeksi tunggal. Hal ini disebabkan oleh bacillus *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat menyebar ketika orang yang sakit dengan TB mengeluarkan bakteri ke dalam air misalnya dengan melalui batuk. Ini biasanya mempengaruhi fungsi (TB paru) tetapi juga dapat mempengaruhi situs lain (TB luar paru). Sekitar seperempat dari populasi dunia terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan dengan demikian berisiko terkena penyakit TB (WHO, 2019).

Dengan diagnosis dan pengobatan tepat waktu dengan antibiotik. Lini pertama selama 6 bulan, sebagian besar orang yang menderita TB dapat disembuhkan dan penularan infeksi selanjutnya terus menerus. Jumlah kasus TB yang terjadi setiap tahun (dan dengan demikian jumlah kematian terkait TB) juga

dapat ditekan dengan mengurangi prevalensi faktor risiko terkait kesehatan untuk TB (misalnya merokok, diabetes dan infeksi HIV), menyediakan pengobatan pencegahan untuk orang dengan infeksi TB laten, dan mengambil tindakan multisektoral pada faktor penentu infeksi dan penyakit TB yang lebih luas (misalnya kemiskinan, kualitas perumahan dan kurang gizi) (WHO, 2019).

Pada dasarnya, siklus hidup *Mtb* memiliki tujuan dalam menginfeksi dan menginduksi sistem kekebalan. Periode siklus tersebut, berlangsung selama beberapa dekade yang hingga pada akhirnya dapat mengakibatkan infeksi TB paru aktif baik melalui reaktivasi maupun infeksi ulang yang berlanjut hingga menghasilkan rongga di paru-paru sebelum pada akhirnya ditularkan ke lingkungan Patogenesis TB dimulai dari masuknya kuman sampai timbulnya berbagai gejala klinis (Hunter, 2018).



Gambar 3. Penyebaran TB (CDC, 2016)

Mtb ini dibawa oleh partikel nuklei yang disebut dengan droplet nuklei. *Mtb* ditularkan melalui udara, bukan melalui permukaan kontak. Penularan terjadi bila seseorang menghirup droplet nuklei yang mengandung *Mtb* dan inti tetesan

melintasi mulut atau saluran hidung, saluran pernapasan bagian atas, dan bronkus untuk mencapai alveoli paru-paru (CDC, 2016). Resiko infeksi tergantung pada beberapa faktor seperti penularan dari sumber penderita. Pada fase awal infeksi dimulai dari *Mtb* diinternalisasi oleh fagositik sel kekebalan, bereplikasi secara intraseluler (Ahmad, 2011).

II.3 Respon Imun terhadap Tuberkulosis

Tuberkulosis merupakan salah satu penyakit menular yang melibatkan sistem kekebalan tubuh (imun). Proses respon imun terhadap TB yaitu dengan menggunakan regulasi gen dan kemudian dilakukan skrining untuk mencari target diagnostik. Suatu penelitian juga menunjukkan bahwa mekanisme respon imun dari suatu sel inang memiliki peranan penting dalam proses infeksi terhadap mikroba. Proses *Mtb* menjadi aktif tidak hanya bergantung pada adaptasi miselium melainkan juga disebabkan oleh regulasi gen (Yuan *et al.*, 2018).

Respons imun terhadap *Mtb* lebih banyak diperankan oleh sel T dibandingkan dengan sel B. Pada manusia, peran sel T *cluster of differentiation 4* (CD4⁺) menjadi perhatian pada pasien HIV karena terdapat penurunan jumlah sel T CD4⁺ namun risiko infeksi *Mtb* meningkat. Fungsi utama dari sel T CD4⁺ adalah menghasilkan sitokin tipe 1. Sel T *helper* tipe 1 (Th1) polifungsional yang secara simultan menghasilkan interferon gamma (IFN- γ), *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) dan interleukin-2 (IL-2) bermanfaat dalam mengendalikan infeksi *Mtb*. Sel CD4⁺ Th1 mengaktifkan fungsi efektor pada makrofag yang mengendalikan *Mtb* intraseluler sebagai perlindungan terhadap *Mtb*. Sitokin TNF- α memiliki peran awal dalam proses pengendalian infeksi TB

yang bekerja pada berbagai sel. Sitokin ini bekerja bersinergi dengan IFN- γ yang merangsang produksi *reactive nitrogen intermediates* (RNIs) yang memediasi fungsi tuberkulostatik dari makrofag. Sitokin TNF- α juga merangsang migrasi sel imun ke tempat infeksi dan berkontribusi terhadap pembentukan granuloma, yang mampu mengendalikan perkembangan penyakit (Prasetyo *et al.*, 2019).

Beberapa penelitian melaporkan peranan sel T *helper* 17 (Th17) pada respon imun terhadap infeksi *Mtb*. Sel Th17 yang mampu menghasilkan interleukin-17 (IL-17), terlibat dalam perlindungan kekebalan terhadap *Mtb* terutama karena efek sitokin ini dalam menarik dan mengaktifkan neutrofil. Sel Th17 telah terlibat dalam perlindungan terhadap TB pada tahap awal karena kapasitas mereka untuk merekrut limfosit, monosit dan Th1 ke lokasi pembentukan granuloma. Penelitian sebelumnya oleh Setyobudi dkk tahun 2014 dengan antigen protein 38 kd *Mtb* galur Indonesia sebagai kandidat vaksin menunjukkan hasil peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi IL-2 dan penurunan anti inflamasi IL-4. Sebagai kelanjutan untuk membandingkan dengan protein Ag *Mtb* yang sudah ada kami menguji protein rekombinan fusi ESAT6/CFP10 *Mtb* yang dihasilkan oleh Pusat Biomedis Litbangkes Kemenkes RI dalam menginduksi respons imun seluler berdasarkan produksi sitokin TNF- α dan IL-17 CD4⁺ dan sel T CD4⁺ (Prasetyo *et al.*, 2019).

II.4 Vaksin Bacille Calmette-Guérin (BCG)

Secara umum, vaksin merupakan antigen berupa mikroorganisme yang masih hidup tapi dilemahkan, masih utuh atau bagiannya, yang telah diolah berupa toksin mikroorganisme yang telah diolah menjadi toksoid, protein

kombinan yang bila diberikan kepada seseorang akan menimbulkan kekebalan spesifik secara aktif terhadap penyakit infeksi tertentu (Menkes RI, 2013). Vaksin mengandung suatu agen penginfeksi yang telah dimodifikasi sedemikian rupa sehingga menstimulasi sistem imun tanpa menimbulkan bahaya atau menyebabkan suatu penyakit (Dewi, 2017). Beberapa jenis vaksin yang digunakan untuk vaksinasi yaitu vaksin yang dilemahkan, vaksin yang telah dimatikan, vaksin rekombinan, dan vaksin plasma DNA. Vaksin yang dilemahkan berasal dari keseluruhan organisme atau bagian dari organisme yang dilemahkan namun masih mampu menumbuhkan respon imun. Vaksin yang telah dimatikan berasal dari mikroorganisme yang telah dimatikan akan tetapi respon imun yang timbul lebih lemah daripada vaksin hidup sehingga pada umumnya memerlukan vaksinasi ulang. Vaksin rekombinan memiliki prinsip dengan menyisipkan satu atau lebih gen yang mengkode determinan imunitas yang penting pada mikroorganisme. Vaksin plasma DNA dibuat berdasarkan isolasi DNA mikroba yang mengandung kode antigen yang patogen dan masih dalam perkembangan penelitian yang hasil percobaan pada binatang dapat merangsang respon humoral dan selular yang cukup kuat sedangkan untuk manusia saat ini masih dilakukan (Lestari dan Raveinal, 2020).

Menurut data WHO, secara global kasus TB tiap tahunnya mengalami peningkatan dan Indonesia sendiri masuk dalam 10 besar kasus TB tertinggi di dunia (WHO, 2019). Adapun yang masih menjadi pilihan utama dalam penanganan kasus TB adalah vaksin yakni vaksin Bacille Calmette-Guérin (BCG). Vaksin BCG adalah salah satu vaksin yang paling banyak digunakan di

dunia. Menurut Whitlow *et al.*, (2020), vaksin ini berasal dari strain bakteri *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan. Meskipun dirangkul oleh komunitas tuberkulosis (TB) yang direkomendasikan oleh WHO dan diintegrasikan dalam sebagian besar program pengendalian TB nasional (Gijssels dan Fordham, 2019). Tujuan utama penggunaan BCG adalah untuk pencegahan TB. Namun sayangnya, setelah lebih dari 90 tahun pemberian vaksin, penelitian menunjukkan bahwa efektifitas vaksin telah menunjukkan hasil yang berbeda (Tafreshi, 2016).

Vaksin ini melindungi terhadap penyakit TB aktif pada beberapa populasi, namun khasiatnya kurang optimal (Hawn *et al.*, 2014). Misalnya, vaksin ini mencegah jenis penyakit yang serius pada anak-anak seperti TB meningitis dan TB milier. Akan tetapi, pada orang dewasa efektivitasnya sangat bervariasi. Sementara untuk orang lanjut usia memiliki risiko kematian yang tinggi akibat TB walaupun telah melakukan vaksinasi. Adapun penelitian di Amerika menunjukkan bahwa ditemukannya bukti perlindungan 50-60 tahun setelah divaksinasi BCG. Namun disisi yang lain, vaksinasi ulang BCG belum memberikan perlindungan tambahan. Dalam artian bahwa vaksinasi ulang tidak dianggap sebagai strategi untuk mengendalikan penyakit sehingga WHO dan Pusat Pengendalian dan Pencegahan Penyakit (CDC) AS menekankan untuk perlu mengembangkan vaksin baru pengganti vaksin BCG (Tafreshi, 2016).

BCG biasanya diberikan kepada bayi dan anak-anak yang berusia dibawah 16 tahun akan tetapi vaksin ini tidak akan bekerja untuk orang dewasa yang berusia diatas 30 tahun, karena sebelumnya orang dewasa tidak pernah diberikan tes tuberculin atau TST yang membuat vaksin tersebut tidak bekerja dan tidak

efektif sama sekali terhadap orang dewasa. Dalam sebuah penelitian menunjukkan bahwa vaksin BCG hanya memberi perlindungan kepada anak sampai umur 15 tahun dari infeksi *Mtb* dan gejalanya (Gorish *et al.*, 2018). Penurunan efektifitas BCG yang telah terjadi selama 10 tahun menjadi masalah bagi negara-negara dengan risiko TB yang sangat tinggi, dikarenakan vaksinasi yang telah terjadi saat lahir, mengakibatkan orang-orang tersebut berisiko tinggi dikemudian hari bahkan menjadi yang paling rentan. Vaksin BCG dapat menimbulkan risiko bagi individu *immunocompromised*, yaitu keadaan dimana individu memiliki masalah dengan sistem imun sehingga terjadi kondisi khusus yakni, seperti kelainan imunitas bawaan, penyakit autoimun dan beberapa masalah lain yang ditimbulkan terkait dengan sistem imun (Whitlow *et al.*, 2020).

II.5 Gen Rv1419

Gen Rv1419 merupakan gen salinan tunggal seperti yang didefinisikan dalam urutan *Mtb* Genom H37Rv (Nogueira *et al.*, 2010). Rv1419 juga merupakan gen yang mengkode protein sMTL-13. Protein sMTL-13 ini sebagai antigen mikrobakteri utama yang ditunjukkan pada pasien TB. Pada analisis *in silico* dari protein serta pendeteksiannya pada permukaan *Mtb* menunjukkan bahwa sMTL-13 dapat berpartisipasi selama masuknya bakteri dalam makrofag inang. Hal ini dikonfirmasi oleh eksperimen pengikatan yang dilakukan di makrofag murine atau manusia. Selain itu, kadar TNF yang lebih rendah terdeteksi pada sel yang terinfeksi Rv1419 yang menunjukkan bahwa lektin ini mungkin penting untuk pengenalan patogen. Namun yang penting, Rv1419 menunjukkan pertumbuhan intraseluler yang lebih tinggi daripada bakteri Whey

tahu (WT). Jadi, meskipun pengikatan *Mtb* ke makrofag menurun dengan tidak adanya gen Rv1419, sel yang terpapar *Mtb* menunjukkan tingkat replikasi bakteri dan kematian sel yang lebih tinggi (Bafica *et al.*, 2015).



Gambar 4. Letak gen Rv1419 pada *Mycobacterium tuberculosis* (NCBI, 2020)

Gen Rv1419 menunjukkan kemiripan urutan asam amino sebesar 41% dengan jenis lektin yang mengkode protein sMTL-13. Protein sMTL-13 yang dikodekan oleh Rv1419 dapat berfungsi dalam pengembangan vaksin atau pengobatan pada tuberkulosis. Hal ini dikarenakan lektin tersebut bersifat anti *toxin* terhadap beberapa bakteri yang masuk ke dalam tubuh salah satunya *Mtb* (Kolbe *et al.*, 2019). Sekresi lektin 13 kDa dari *Mtb* menunjukkan respon terhadap salah satu antigen yaitu sMTL-13. sMTL-13 yang digunakan sebagai antigen, terdeteksi di dalam pemeriksaan cairan darah pasien TB aktif. Hal ini menunjukkan bahwa antigen tersebut dapat bereaksi dengan IFN- γ yang dapat dibuktikan dengan meningkatnya produksi IFN- γ (Nogueira *et al.*, 2010).

II.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan dengan menganalisis DNA pada sampel. Teknik analisis DNA ini diklasifikasikan dalam tiga kelompok yaitu kualitatif, kuantitatif, dan semikuantitatif. Beberapa metode kualitatif antara lain PCR, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), dan *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD). Adapun metode kuantitatif seperti *real-time* PCR atau qPCR. Sedangkan

untuk metode semikuantitatif biasanya digunakan teknik PCR yang dimodifikasi (Bahagiawati dan Hadiarto, 2020).

Reaksi polimerase berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu teknik atau metode perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme. Dengan teknik ini, DNA dapat dihasilkan dalam jumlah besar dengan waktu relatif singkat sehingga memudahkan berbagai teknik lain yang menggunakan DNA (Nurhayati dan Darmawati, 2017).

(*Polymerase Chain Reaction*, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama, yaitu DNA cetakan, Oligonukleotida primer, Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), Enzim DNA Polimerase, dan Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. 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. Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat yaitu denaturasi, annealing, dan pemanjangan untai DNA. Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Teknik PCR dapat dimodifikasi ke dalam beberapa jenis diantaranya : PCR-RFLP, PCR-RAPD, nested-PCR, *Quantitative-PCR*, RT-PCR dan *inverse-PCR*. Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya (Yusuf, 2010).

Sejak pertama kali diperkenalkan pada tahun 1985, teknologi PCR telah menghasilkan terobosan-terobosan besar dalam penelitian serta pengembangan kesehatan dan kedokteran untuk memahami berbagai patogenesis maupun diagnosis penyakit. Perkembangan biologi molekuler menjadi semakin cepat dan hingga saat ini berbagai teknik yang memanfaatkan teknologi PCR tersebut telah banyak dilahirkan. Teknik PCR ditemukan tahun 1980 dan mulai dikembangkan pada tahun 1985 oleh Dr. Kary B. Mullis warga negara Amerika yang mendapat penghargaan Nobel pada tahun 1993 untuk bidang Kedokteran (Riuwpassa *et al.*, 2008).

Tujuan PCR adalah menghasilkan sejumlah salinan dari suatu fragmen DNA. Untuk sintesis dan penggandaan DNA tersebut berlangsung di luar organisme, tepatnya di dalam suatu mesin PCR. Dalam proses PCR, materi pokok berupa DNA untai ganda hasil isolasi suatu organisme, di antaranya direaksikan dengan komponen-komponen PCR yang terdiri dari: enzim DNA *polymerase*, *deoxynucleoside triphosphate* (dNTPs), MgCl₂, dan primer (potongan pendek DNA untai tunggal) yang mengawali sintesis DNA. Setelah larutan *mix*PCR tersebut homogen, larutan tersebut siap direaksikan dalam mesin PCR (Nurhayati dan Darmawati, 2017).

Yang penting dalam teknik PCR adalah desain primer untuk amplifikasi DNA yang memerlukan data sekuen dari agen genom yang bersangkutan. Untuk agen yang mempunyai genom RNA, harus dilakukan *reverse transcription* (proses sintesis DNA dari RNA) terlebih dahulu dengan menggunakan enzim *reverse transcriptase*. Setelah DNA diperoleh baru dilakukan dengan PCR. *Reverse*

transcription dan PCR ini bias dilakukan dan biasanya disebut RT-PCR, teknik PCR ini bersifat kualitatif (Riuwpassa *et al.*, 2008).

Prinsip PCR terjadi proses siklus berulang. Pada suhu 90° - 97°C, DNA mengalami denaturasi (pembelahan untai ganda menjadi untai tunggal). Pada teknik PCR, denaturasi optimum terjadi pada temperatur 95°C selama 30 detik. Jika suhunya diturunkan sampai 36-72°C maka primer, molekul DNA untai tunggal yang pendek akan menempel pada DNA yang telah terbelah pada tempat yang spesifik (*annealing*). Selanjutnya, apabila suhu dinaikkan lagi sampai 72°C, maka primer dengan bantuan DNA polymerase akan membentuk untai DNA sesuai dengan urutan DNA yang telah terbelah (polimeralisasi/elongasi). Umumnya, waktu yang diperlukan untuk ekstensi DNA pada PCR yaitu 2 - 3 menit (Feranisa, 2016).

Error PCR bisa dipicu dari berbagai macam sumber. Sumber yang berbeda menghasilkan penyebab eror PCR yang berbeda pula. Secara umum seluruh aktivitas terkait analisa gen menggunakan metode PCR seperti teknik isolasi material genetika, perbanyakan material genetika dan deteksi bisa menjadi pemicu eror (Budiarto *et al.*, 2018). Terdapat beberapa faktor yang dapat menentukan tingkat keberhasilan teknik amplifikasi DNA menggunakan PCR. Faktor-faktor itu antara lain deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP), oligonukleotida primer, DNA cetakan (template), komposisi larutan buffer, jumlah siklus reaksi, enzim yang digunakan, dan faktor teknis dan non-teknis lainnya, seperti kontaminasi. PCR memiliki keunggulan yaitu mampu melipatgandakan suatu fragmen DNA sehingga mencapai 10⁹ kali lipat. Oleh karena itu, adanya kontaminasi dalam

jumlah sangat sedikit sekalipun dapat mengakibatkan terjadinya kesalahan dengan menghasilkan produk amplifikasi yang tidak diharapkan (Feranisa, 2016).

II.7 Elektroforesis

Hasil PCR dapat dilihat dengan melakukan *elektroforesis* pada gel agarosa. *Elektroforesis* merupakan metode standar untuk memisahkan dan mengidentifikasi fragmen DNA sesuai dengan ukurannya. Prinsip dasarnya adalah jika molekul DNA yang bermuatan negatif ditempatkan pada penghantar listrik (buffer), molekul tersebut akan bergerak menuju ke muatan positif. Elektroforesis akan melalui empat tahapan yaitu pembuatan gel, pembuatan DNA *marker*, persiapan *running electrophoresis*, dan tahapan terakhir yaitu *running electrophoresis* (Riuwpassa *et al.*, 2008).

Elektroforesis terdiri dari beberapa komponen utama dalam penggunaannya. Pertama, larutan elektrolit yang berfungsi sebagai pembawa komponen. Secara umum berupa larutan buffer dengan pH tertentu sesuai dengan karakteristik senyawa yang akan dipisahkan. Kedua, media pemisah merupakan tempat proses pemisahan terjadi yang berupa kertas (selulosa asetat, selulosa nitrat), gel kanji, gel polikrilamid, busa poliuretan atau agar-agar. Selanjutnya, elektroda berfungsi sebagai penghubung arus listrik dengan dengan media pemisah dan baterai atau arus listrik sebagai sumber energi pada rangkaian alat (Harahap, 2018).