

SKRIPSI

**DETEKSI GEN Rv 1926 ISOLAT KLINIS *Mycobacterium tuberculosis*
SEBAGAI SERODIAGNOSTIK TUBERKULOSIS LATEN**

Disusun dan diajukan oleh

**JESIKA BANGKARAN
(H041171317)**



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

DETEKSI GEN Rv 1926 ISOLAT KLINIS *Mycobacterium tuberculosis*
SEBAGAI SERODIAGNOSTIK TUBERKULOSIS LATEN

Disusun dan diajukan oleh

JESIKA BANGKARAN

11041171317

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 14 Juli 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan.

Menyetujui,

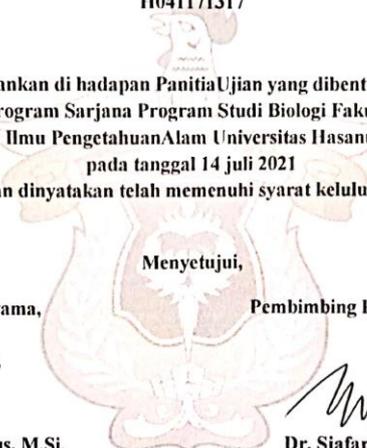
Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping



Dr. Rosana Agus, M.Si.

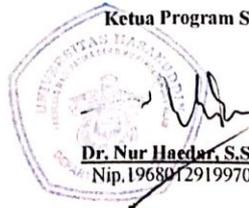
NIP. 196509051991032003



Dr. Sjafar Anan, M.Si.

NIP. 195808161987032001

Ketua Program Studi,



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

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Jesika Bangkaran

NIM : H0411317

Program Studi : Biologi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul "Deteksi Gen Rv 1926 Isolat Klinis *Mycobacterium tuberculosis* Sebagai Serodiagnostik Tuberkulosis Laten". 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 saksi.

Makassar, Juni 2021

Yang Menyatakan


(Jesika Bangkaran)

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena dengan hidayah dan berkah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Deteksi Gen Rv 1926 Isolat Klinis *Mycobacterium tuberculosis* Sebagai Serodiagnostik Tuberkulosis Laten**” dapat selesai dengan baik. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar. Tidak lupa pula penulis kirimkan puji syukur kepada Tuhan yang Maha Esa, keluarga, dan para sahabatnya yang telah membimbing menuju jalan kebenaran sehingga dapat tetap berada di jalan-Nya.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan karena menyadari segala keterbatasan yang ada. Oleh karena itu, demi sempurnanya skripsi ini, penulis sangat membutuhkan dukungan dan sumbangsih pikiran yang berupa kritik dan saran yang bersifat membangun. Selama proses perwujudan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan doa yang tulus untuk penulis.

Secara khusus dan istimewa skripsi ini didedikasikan sebagai wujud rasa terimakasih penulis yang tak terhingga kepada kedua orang tua penulis yakni, Bapak Rony Sattu dan Ibu Nuryanti Sumarwi yang telah merawat, membesarkan, mendukung dan memotivasi diri penulis untuk menuntut ilmu dan doa dari mereka yang tak henti-hentinya diberikan untuk penulis. Pada kesempatan ini,

penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih yang sedalam-dalamnya kepada semua pihak. Kepada Ibu Dr. Rosana Agus, M.Si. selaku Pembimbing Utama dan Ibu Dr. Sjafaraenan, M.Si. selaku Pembimbing Pertama, penulis menghaturkan banyak ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya atas segala bantuan yang beliau-beliau berikan baik berupa kritik, saran, maupun motivasi yang membantu penulis selama proses penulisan skripsi ini hingga selesai. Tanpa beliau penulis tidak akan dapat menyelesaikan skripsi ini.

Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Dwia Aries Tina P., M.A., selaku Rektor Universitas Hasanuddin.
2. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin
3. Bapak Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si. selaku Wakil Dekan 3 yang banyak membantu mahasiswa dalam kegiatan organisasi kampus
4. Ibu Dr. Nur Haedar M.Si. selaku ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, terima kasih atas ilmu, masukan serta saran kepada penulis.
5. Ibu Dr. Nur Haedar M.Si. selaku Pembimbing Akademik sekaligus penguji dan Bapak Dr. Eddyman W. Ferial, S.Si., M.Si., selaku penguji. Terima kasih atas waktu yang telah diluangkan kepada penulis serta saran dan masukan untuk perbaikan skripsi ini.
6. Kepada seluruh dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses perkuliahan.

7. Kepada staf pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis baik dalam menyelesaikan administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.
8. Seluruh analis HUM-RC beserta staff RS. Universitas Hasanuddin yang telah member bimbingan dan pengarahan selama proses penelitin.
9. Kepada keluarga besar penulis yang selalu memotivasi sehingga skripsi ini dapat tersusun dan selesai.
10. Kepada Julian Aldo Saputra yang selama ini telah menemani dari awal kuliah sampai selesai hingga mendapat gelar S.Si. terima kasih sudah menjadi salah satu penyemangat selama pengerjaan skripsi ini hingga selesai.
11. Untuk sahabat-sahabat seperjuanganku dari semester satu sampai akhir semester ini yaitu Paula Natasha, kezya Tangketasik dan widar Laili terima kasih untuk kebersamaan, canda tawa, dukungan serta bantuan selama perkuliahan ini.
12. Kepada sahabat seperjuanganku TB squad yaitu Paula Natasha, Kezuya Tangketasik, Dian Ramadhani dan Ferdinando Silang terima kasih untuk kerja samanya yang sangat luar biasa ini dan telah membantu selama penelitian.
13. Untuk sahabat saya yaitu Grayce Toliansa dan Teresia Nancy terima kasih karna selalu menguatkan dan mengingatkan untuk menyerahkan semuanya di dalam tangan Tuhan.
14. Kepada teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2017 terima kasih atas, kebersamaan, canda tawa, dukungan, motivasi, serta bantuan yang tidak dapat penulis jabarkan satu per satu.

15. Dan untuk semua pihak yang belum penulis tulis satu persatu. Terima kasih untuk semuanya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Dengan ini saya mengucapkan banyak terima kasih untuk semua pihak yang telah terlibat, semoga kedepannya skripsi ini dapat berguna sebagai referensi tambahan bagi banyak orang.

Makassar, Juni 2021

Penulis

ABSTRAK

Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Penyakit tuberkulosis masih menjadi masalah utama kesehatan. TB menjadi penyebab kematian kedua terdapat penyakit menular di dunia. *Mycobacterium tuberculosis* dapat dideteksi pada sputum dengan pemeriksaan mikroskopis, teknik Polymerase Chain Reaction (PCR), dan kultur bakteri. Telah dilakukan penelitian berjudul “Deteksi Gen Rv 1926 Isolat Klinis *Mycobacterium tuberculosis* Sebagai Serodiagnostik Tuberkulosis Laten”. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen Rv 1926 sebagai serodiagnostik tuberkulosis laten. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2021 sampai bulan Mei 2021 di Laboratorium Tuberkulosis *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC). Penelitian ini diawali dengan pengambilan sampel sputum *Mycobacterium tuberculosis* di Laboratorium Tuberkulosis *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC) sebanyak 8 sampel. Metode yang digunakan pada penelitian ini meliputi amplifikasi DNA, elektroforesis, dan visualisasi pada PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan menggunakan primer forward 5'-CAG CAG GAT CCC GCC TAT CCC ATC ACC GGA-3' untuk reverse 5'-GCC CAA GCT TCG GCT CCC AAA TCA GCAG-3'. Produk PCR divisualisasi dengan menggunakan gel elektroforesis yang menunjukkan bahwa terbentuknya fragmen pita DNA pada sampel 1,2,3,4,5,6, dan 8 yang berukuran 412 bp, sedangkan pada sampel 7 tidak terbentuk fragmen pita DNA. Pada *Mycobacterium tuberculosis* diperoleh keberadaan gen Rv1926 yang berpotensi dijadikan sebagai serodiagnostik tuberkulosis laten.

Kata Kunci: Deteksi, Rv1926, *Mycobacterium tuberculosis*, Diagnostik, Tuberkulosis Laten, PCR.

ABSRTACT

Tuberculosis is an infectious infectious disease caused by Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis is still a major health problem. TB is the second leading cause of death from infectious diseases in the world. Mycobacterium tuberculosis can be detected in sputum by microscopic examination, polymerase chain reaction (PCR) technique, and bacterial culture. A study entitled "Detection of the Rv gene 1926 Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis as a Serodiagnostic of Latent Tuberculosis has been conducted". This study aims to detect the presence of the Rv 1926 gene as a serodiagnostic of latent tuberculosis. This research was conducted from February 2021 to May 2021 at the Tuberculosis Laboratory of Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC). This research was initiated by taking 8 samples of Mycobacaterium tuberculosis sputum samples at the Tuberculosis Laboratory of Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC). The methods used in this study include DNA amplification, electrophoresis, and visualization in PCR (Polymerase Chain Reaction) using forward primer 5'-CAG CAG GAT CCC GCC TAT CCC ATC ACC GGA-3' for reverse 5'-GCC CAA GCT TCG GCT CCC AAA TCA GCAG-3'. The PCR product was visualized using gel electrophoresis which showed that the formation of DNA band fragments in samples 1,2,3,4,5,6, and 8 measuring 412 bp, while in sample 7 no DNA band fragments were formed. In Mycobacterium tuberculosis, the Rv1926 gene has the potential to be used as a serodiagnostic for latent tuberculosis.

Keyword : Detection, Rv1926, Mycobacterium tuberculosis, Diagnostics, Latent Tuberculosis.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	5
1.3 Manfaat Penelitian	5
1.4 Waktu dan Tempat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
III.1.1. Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
III.1.2. Klasifikasi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
III.1.3. Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
II.2. Patogenesis <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
II.3. Respon Imun terhadap Tuberkulosis	13

II.4 Tuberkulosis Laten	15
II.4.1 Patogenesis terhadap Tuberkulosis Laten	17
II.5 Protein Rekombinan Mycobacterium Tuberculosis (MPT63)	18
II.6 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	20
II.7.1 Langkah-langkah PCR.....	22
BAB III METODE PENELITIAN	25
III.1 Alat Penelitian.....	25
III.2 Bahan Penelitian.....	25
III.3 Prosedur Kerja.....	26
III.3.1 Kultur <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
III.3.2 Isolasi DNA Kromosom.....	26
III.3.3 Amplifikasi Rv1926 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dengan PCR	27
III.3.4 Elektroforesis Produk PCR	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	29
IV.1 Kultur <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
IV.2 Ekstraksi DNA	31
IV.3 Amplifikasi Rv1926 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dengan PCR	33
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	39
V.1 Kesimpulan	39
V.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
2. Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
3. Letak Gen Rv1926 pada <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
4. Penyebaran TB.....	11
5. Hasil pewarnaan Ziehl Neelsen.....	30
6. Hasil BLAST primer forward dan reverse.....	34
7. Hasil Elektroforesis Produk PCR.....	35

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Tabel Deteksi Gen Rv1926	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja.....	46
2. Ekstraksi DNA <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47
3. Amplifikasi DNA dengan Metode PCR.....	48
4. Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis	49
5. Foto sampel dan bahan yang digunakan	50
6. (Lanjutan).....	50

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tuberculosis (TB) merupakan penyakit menular langsung yang disebabkan oleh *mycobacterium tuberculosis*. Sebagian besar *mycobacterium tuberculosis* menyerang paru-paru tapi dapat juga menyerang organ tubuh lainnya. Penyebaran TB oleh penderita TB aktif positif, dapat menyerang siapapun yang berada disekelilingnya. Penderita TB dapat menyebarkan atau menularkan bakteri diudara dalam bentuk percikan dahak yang keluar saat penderita mengalami batuk dan bersin yang disebut (droplet nuclei) (WHO, 2019).

Menurut World Health Organization (2020) Tuberkulosis merupakan penyakit yang sudah lama, manusia menunjukkan peningkatan yang sangat signifikan yang telah mempengaruhi manusia bertahun-tahun hingga saat ini. TB disebabkan oleh basil *Mycobacterium tuberculosis*, yang ditularkan saat orang yang sakit TB mengeluarkan bakteri ke udara misalnya dengan batuk atau bersin. Diseluruh dunia terdapat kurang lebih 10 juta orang masih terserang oleh penyakit TB ini setiap tahun dan lebih banyak menyerang orang dewasa daripada anak-anak serta lebih banyak pria dibandingkan wanita. TB juga merupakan salah satu penyebab utama kematian hingga saat ini dan berada diperingkat atas dari HIV/AIDS.

Tuberkulosis tetap menjadi masalah kesehatan dunia. Secara global pada tahun 2016 terdapat 10,4 juta kasus insiden TB (CI 8,8 juta – 12, juta) yang setara dengan 120 kasus per 100.000 penduduk. Lima negara dengan insiden kasus tertinggi yaitu India, Indonesia, China, Philipina, dan Pakistan. Pada tahun 2017

TB mengalami penurunan menjadi 10 juta. Sebagian besar insiden TB pada tahun 2016-2017 terjadi pada kawasan Asia tenggara sebanyak (45%) Indonesia merupakan salah satunya yang memiliki permasalahan besar dalam menghadapi penyakit TBC (Kemenkes 2018).

Jumlah kasus TB di Indonesia sebanyak 420.994 kasus pada tahun 2017 (data per 17 Mei 2018). Bahkan berdasarkan Survei Prevalensi Tuberkulosis pada laki-laki 3 kali lebih tinggi dibandingkan pada perempuan. Begitu juga yang terjadi di negara-negara lain. Hal ini terjadi karena laki-laki lebih terpapar pada fakto risiko TB misalnya merokok dan kurangnya ketidak patuhan minum obat. Survei ini menemukan bahwa dari seluruh partisipan laki-laki yang merokok sebanyak 68,5% dan hanya 3,7% partisipan perempuan yang merokok (Kemenkes 2018).

Sedangkan di daerah Makassar ada 8 Puskesmas yang mencapai 100% angka keberhasilan pengobatannya yaitu Puskesmas Panambungan (jumlah pasien yang diobati 65 orang), Puskesmas Pattingalloang (jumlah pasien yang diobati 30 orang), Puskesmas Tabaringan (jumlah pasien yang diobati 26 orang), Puskesmas Tamamaung (jumlah pasien yang diobati 25 orang), Puskesmas Antang Perumnas (jumlah pasien yang diobati 18 orang), Puskesmas Barombong (jumlah pasien yang diobati 15 orang), Puskesmas Tamalanrea (jumlah pasien yang diobati 7 orang) dan Puskesmas Kapasa (jumlah pasien yang diobati 1 orang) (Dinkes Kota Makassar, 2018).

Selama ini penyakit infeksi seperti TB diatasi dengan penggunaan antibiotik. Rifampisin (RIF), Isoniazid (INH), etambutol (EMB), streptomisin dan pirazinamid (PZA) telah dimanfaatkan selama bertahun-tahun sebagai anti-TB. Namun, banyak penderita telah menunjukkan resistensi terhadap obat pertama ini.

Sejak tahun 1980-an, kasus tuberkulosis di seluruh dunia mengalami peningkatan karena kemunculan MDR-TB (Multi Drug Resisten Tuberculosis) (Chang *et al.*, 2013).

Menurut World Health Organization (2018) pencegahan penyakit TB aktif dengan pengobatan LTBI merupakan komponen atau strategi yang cukup penting. Infeksi tuberkulosis laten (LTBI) didefinisikan sebagai keadaan respon imun yang menetap terhadap stimulasinya. Sementara ini sekitar 30% populasi dunia diperkirakan terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, dan hanya 10% dari individu yang terinfeksi berkembang menjadi penyakit TB aktif secara klinis dan 90% tetap dalam fase laten. Ini merupakan reservoir besar individu dengan LTBI. Kemanjuran perawatan yang tersedia saat ini berkisar antara 60% hingga 90%, itu sebabnya seluruh populasi pengujian dan pengobatan LTBI tidak cukup baik karena pengujiannya tidak sempurna, terdapat risiko yang serius dan efek samping yang fatal, serta biaya yang tinggi, untuk dampak kesehatan masyarakat yang belum terbukti. Tidak semua orang yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* positif TB aktif. Diperkirakan bahwa risiko dengan LTBI untuk berkembang menjadi TB aktif adalah 5–10% (5). Risikonya sangat tinggi di pada anak-anak di bawah usia 5 tahun dan di antara orang dengan kekebalan tubuh yang menurun. Karena pengobatan pencegahan mengandung risiko yang besar serta biaya yang mahal, oleh karena itu pengobatan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* harus ditargetkan secara selektif untuk berkembang menjadi penyakit TB aktif, yang akan mendapat manfaat paling besar dari pengobatan LTBI.

Gen Rv1926c dari *Mycobacterium tuberculosis* mampu menginduksi respon imun humoral dan bersifat imonoreaktif sehingga memberikan perlindungan

sebagai vaksin DNA. Diketahui bahwa gen Rv1926c yang mengkode protein MPT63 dari *Mycobacterium tuberculosis* merupakan antigen spesifik untuk *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulosis disebabkan oleh bakteri pathogen yang membunuh lebih dari jutaan orang didunia. Rv1926c yang mengkode protein MPT63 merupakan salah satu protein yang disekresikan paling melimpah dari patogen *Mycobacterium tuberculosis*, serta strain M.bovis BCG. Rv1926c yang dihasilkan dari *Mycobacterium tuberculosis* adalah bagian pertama yang berinteraksi dengan sistem kekebalan tubuh inang, sehingga penting dalam mengaktifkan respon imun humoral pada individu yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Samal, 2012).

Salah satu protein *Mycobacterium tuberculosis* yang disekresikan paling banyak yaitu protein MPT63 yang dikode oleh gen Rv1926c (Nagai et al., 1991). MPT63 mampu menginduksi reaktivitas sel Th1 dan juga menginduksi proliferasi dan IFN γ Hal ini yang menyebabkan MPT63 bisa menjadi salah satu kandidat vaksin tuberkulosis. Tuberkulosis disebabkan oleh bakteri pathogen yang membunuh lebih dari jutaan orang didunia.(Werninghaus et al., 2003).

Salah satu alasan gagalnya tuberkulosis masih menjadi masalah kesehatan utama di negara berkembang disebabkan karena belum adanya metode diagnostik baru, untuk mencapai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (V,Tsara et al.2009). Selain itu, deteksi dan pengobatan TB juga sulit dilakukan di negara-negara terbelakang. Diagnosis yang akurat dan tepat waktu sangat penting untuk perawatan yang dapat meminimalkan risiko penularan penyakit. Beberapa teknik tersedia untuk diagnosis TB seperti pemeriksaan pulsan, kultur, metode deteksi

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dan Polymerase Chain Reaction (PCR).

Untuk mengatasi keterbatasan cara diagnostik tersebut sejumlah penelitian telah mengembangkan metode berdasarkan pada amplifikasi DNA menggunakan metode PCR. Diagnosis cepat dan tepat sangat penting untuk menentukan pengobatan dan memutus rantai penularan. Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu metode pemeriksaan yang prinsip kerjanya memperbanyak (amplification) DNA invitro secara enzimatik. Polymerase Chain Reaction (PCR) menunjukkan hasil deteksi yang cepat dan langsung untuk mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* di dalam spesimen klinis. Sensitivitas keseluruhannya adalah 55-90% dengan spesifitas sekitar 99% (Joshi and Deshpande, 2010). Teknik PCR juga telah dikembangkan untuk diagnosis berbagai penyakit infeksi, seperti Hepatitis, HIV, Human Papillomavirus, dan untuk mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis*.

Berdasarkan tinjauan diatas maka perlu dilakukan penelitian untuk mendeteksi gen Rv 1926 isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* untuk memperoleh gen target yang akan digunakan sebagai diagnosis tuberkulosis. Diperolehnya gen target yang dapat memberikan informasi mengenai gen yang dapat dijadikan sebagai diagnosis pada penyakit tuberkulosis.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini yaitu untuk mendeteksi keberadaan gen Rv 1926 sebagai serodiagnostik tuberkulosis laten.

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai efektivitas gen Rv1926 yang mengkode protein MPT63 dari *Mycobacterium tuberculosis* sebagai serodiagnostik.

I.4 Waktu dan Tempat penelitian

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

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

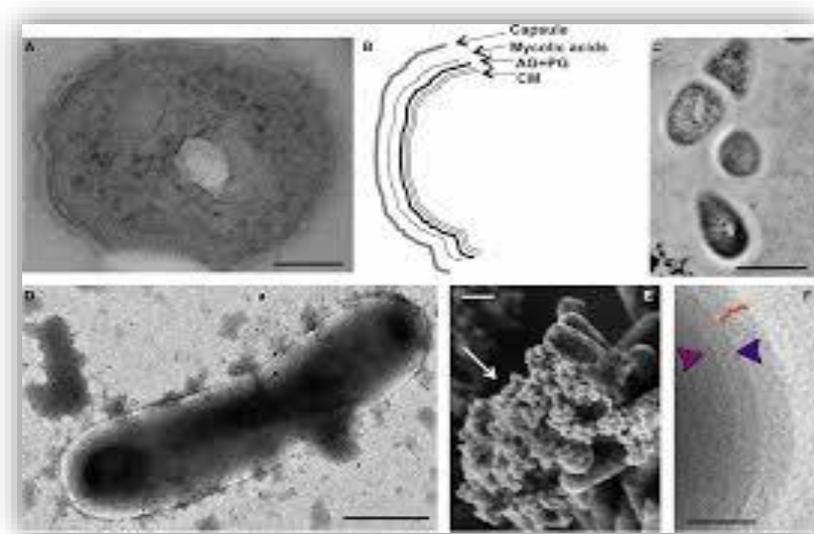
II.1 *Mycobacterium tuberculosis*

II.1.1 Morfologi *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (MTB) merupakan bakteri yang memiliki bentuk batang yang ukurannya berkisar 1-4/um dan tebalnya 0,3-0,6/um. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan basil tahan asam, yang bersifat non-motil dan aerob obligat yang tidak membentuk spora. Bakteri ini dapat bertahan hidup pada udara yang kering maupun udara dingin sehingga bakteri bersifat dorman sehingga dapat hidup kembali dan menjadikan penyakit tuberculosis ini aktif kembali. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri jenis *Bacillus* gram positif yang berukuran sangat kecil, dengan dinding yang tebal dan kaya akan zat lilin (terbuat dari peptidoglikan), hal ini yang mengakibatkan keberadaan bakteri ini bersifat hidrofobik di alam. Mesofil ini juga sangat berbeda dengan bakteri lainnya, bakteri jenis ini dapat tumbuh dengan cepat dalam keadaan asam dan lambat ketika berada di alam (Lamichhane, 2018).

Mycobacterium tuberculosis merupakan salah satu penyebab kematian hampir 1.400.000 orang setiap tahunnya dari kuman tuberculosis ini dan diyakini bahwa onefourth populasi dunia yang secara aktif terinfeksi oleh *Bacillus* ini. Salah satu keunggulan dari *mycobacterium* program kelangsungan hidup adalah kompleksitas amplop sel, yang kaya akan lipid dan polisakarida dan memiliki struktur kimia yang unik. Sel *mycobakterium* amplop terdiri dari empat lapisan utama (Kalscheuer *et al.*, 2019).

1. membran plasma atau membran dalam (IM).
2. peptidoglycan – arabinogalactan kompleks (AGP).
3. membran luar asimetris (OM) atau ' mycomembrane.
4. kapsul Terluar.



Gambar 1. Morfologi *Mycobacterium tuberculosis* (Kalscheuer *et al.*, 2019).

II.1.2 Klasifikasi *Mycobacterium tuberculosis*

Adapun klasifikasi *Mycobacterium tuberculosis* antara lain, sebagai berikut :

- Kingdom : Bacteria
- Subkingdom : Posibacteria
- Phylum : Actinobacteria
- Subclass : Actinobacteridae
- Order : Actinomycetales
- Suborder : Corynebacterineae

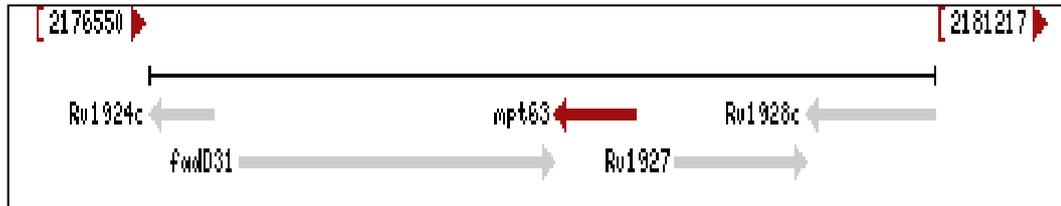
Family : Mycobacteriaceae
Genus : *Mycobacterium*
Species : *Mycobacterium tuberculosis*

II.1.3 Genom *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis H37Rv adalah strain mikobakteri yang paling banyak dipelajari. Urutan genom dari strain ini benar-benar diuraikan pada tahun 1998. Strain H37Rv awalnya dipilih untuk sekuensing karena H37Rv adalah strain laboratorium yang banyak digunakan dan telah dipertahankan keracunannya. H37Rv awalnya berasal dari isolat klinis, H37, diperoleh dari pasien tuberkulosis paru pada tahun 1905. H37Rv telah dipertahankan virulensinya selama 22 tahun dan didistribusikan keseluruh dunia dan digunakan secara meluas sebagai percobaan pada strain Tuberkulosis. Genom lengkap H37Rv telah diurutkan oleh (Zheng et al) yang telah menemukan 272 polimorfisme dibandingkan dengan urutan genom ditentukan oleh (Cole et al) (Loerger, 2010).

Mycobacterium tuberculosis H37Rv adalah patogen yang sangat sukses dan keberhasilannya bergantung pada kemampuannya untuk memanfaatkan makrofag untuk replikasinya dan yang lebih penting makrofag harus tetap dapat menjadi inang Mikobakteri. Terlepas dari kenyataan bahwa fagosit ini biasanya sangat efektif dalam menginternalisasi dan membersihkan sebagian besar bakteri, *M. tuberculosis* H37Rv telah mengembangkan sejumlah strategi untuk bertahan hidup yang sangat efektif, termasuk penghambatan fungsi *phagosome-lysosome*, penghambatan pengasaman *phagosome*, perekrutan dan penyimpanan *tryptophanaspartate* yang mengandung protein mantel pada fagosom untuk

langsung pada sel yang terinfeksi. MPT63 juga mampu secara khusus untuk menginduksi aktivasi makrofag (Samal, 2012).



Gambar 3. Lokus gen Rv1926 *Mycobacterium tuberculosis* (NCBI 2020).

Dihasilkannya antigen tersebut akan dapat memberikan proteksi terhadap penderita TB laten pada usia produktif, mereduksi biaya pembuatan vaksin TB, yang pada akhirnya diharapkan dapat mengurangi angka morbiditas dan mortalitas yang disebabkan oleh TBC. Gen Rv1926c yang mengkode protein MPT63 ini mampu menginduksi reaktivitas sel Th1 dan juga menginduksi proliferasi dan IFN γ (Fu *et al.*, 2009).

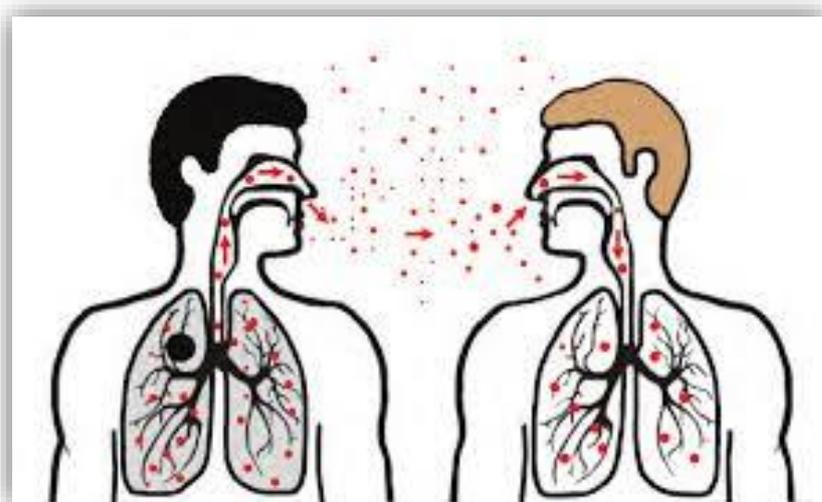
Sifat imunogenik MPT63 dapat disimpulkan dari terdapatnya kepadatan tinggi epitop sel T di wilayah imunodominan terminal-N (Lee dan Marcus, 1999). MPT63 juga telah diusulkan sebagai target untuk desain vaksin dan pengembangan alat diagnostik. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan produksi protein rekombinan MPT63 sebagai kandidat vaksin yang dapat mencegah penyebaran TB (Horwitz *et al.*, 1995).

II.2 Patogenesis *Mycobacterium tuberculosis*

Tuberkulosis adalah penyakit menular berbahaya yang menyebabkan kematian sekitar 2 juta orang setiap tahunnya. Ketidakefektifan metode saat ini untuk mengendalikan situasi epidemi terkait tuberkulosis tidak hanya dengan tidak adanya diagnostik yang efektif, tetapi juga terkait dengan kurangnya

pemahaman tentang mekanisme molekuler patogenesis infeksi *Mycobacterium* ini. Penyelesaian proyek sekuensing dari genom *Mycobacterium* menjadi dorongan menuju identifikasi dan penelitian spesifik fungsi dan sifat target antigenik baru untuk pembuatan vaksin dan alat uji diagnostik (Siromolot, 2018).

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



Gambar 4. Penyebaran TB (CDC 2016)

M. tuberculosis terbawa oleh partikel di udara yang disebut droplet nuklei, dengan diameter 1-5 mikron. Droplet nuklei infeksiosa dihasilkan ketika orang

yang menderita penyakit TB paru atau laring batuk, bersin, berteriak, atau bernyanyi. Tergantung pada lingkungan sekitarnya, partikel kecil ini dapat tetap ada di udara selama beberapa jam. *M. tuberculosis* ditularkan melalui udara dan bukan melalui permukaan kontak. Penularan terjadi bila seseorang menghirup droplet nuklei yang mengandung *M. tuberculosis*, dan inti tetesan melintasi mulut atau saluran hidung, saluran pernapasan bagian atas, dan bronkus untuk mencapai alveoli paru-paru (CDC, 2016).

Biasanya saat penderita batuk inti tetesannya yang kecil, bisa tetap melayang di udara selama beberapa menit hingga beberapa jam. Resiko infeksi tergantung pada beberapa faktor seperti penularan dari sumber penderita, kedekatan kontak, basil beban yang dihirup, dan status kekebalan dari calon inang. Rute utama infeksi melibatkan paru-paru. Inti tetesan yang dihirup menghindari pertahanan bronkus karena ukurannya yang kecil dan tembus ke terminal alveoli di mana mereka ditelan oleh imun atau kekebalan fagositik sel (makrofag dan sel dendritik). *M. tuberculosis* juga dapat menginfeksi sel nonfagositik di ruang alveolar termasuk sel M, endotel alveolar, dan tipe 1 dan tipe 2 sel epitel (pneumosit). Di awal fase infeksi, *M. tuberculosis*, diinternalisasi oleh fagositik sel kekebalan, bereplikasi secara intraseluler, dan bakterialaden sel-sel kekebalan tubuh dapat melewati penghalang alveolar untuk menyebabkan penyebaran sistemik. Replikasi intraseluler dan penyebaran patogen secara simultan ke paru kelenjar getah bening dan ke berbagai luar paru lainnya situs terjadi sebelum perkembangan kekebalan adaptif tanggapan. Ini menunjukkan kemampuan luar biasa *M. tuberculosis* untuk membangun ceruk terlindungi di mana mereka bisa hindari eliminasi oleh sistem kekebalan dan untuk bertahan tanpa batas (Ahmad, 2011).

Infeksi terjadi bila seseorang menghirup droplet nuklei yang mencapai tubercle bacilli yang mencapai alveoli paru-paru. Basil tuberkel ini dicerna oleh makrofag alveolar mayoritas dari ini basil dihancurkan atau dihambat. Sejumlah kecil dapat berkembang biak secara intraseluler dan dilepaskan ketika makrofag mati. Jika hidup, basil ini dapat menyebar melalui saluran limfatik atau melalui aliran darah ke jaringan dan organ yang lebih jauh (termasuk area tubuh yang terkena penyakit TBC kemungkinan besar akan berkembang: kelenjar getah bening regional, puncak paru-paru, ginjal, otak, dan tulang). Ini proses penyebaran sistem kekebalan tubuh untuk respon sistemik. Rincian lebih lanjut tentang patogenesis infeksi tuberkulosis laten (CDC, 2016).

II.3 Respon Imun pada *Mycobacterium tuberculosis*

Tuberkulosis adalah penyakit yang biasanya menyerang paru-paru. Tuberkulosis merupakan salah satu penyakit menular yang melibatkan system kekebalan tubuh (imun) Inhalasi droplet yang mengandung sedikit bakteri akan ditelan makrofag alveolar. Makrofag ini akan menghancurkan pathogen dan mengangkutnya ke saluran limfe yang selanjutnya akan terbentuk lesi granulomatous yang kecil dan berisi bakteri ini. Ini terjadi pada 90% dari semua yang telah terinfeksi (Hermayanti, 2011).

Seseorang yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* akan timbul respons imun, ditandai dengan pembentukan granuloma (Sutherland, 2011). Individu yang terinfeksi kuman TB, sekitar 10% berkembang menjadi TB aktif dan sisanya 90% infeksi TB laten, ditandai dengan respons imun melawan bakteri (tes tuberkulin positif), tanpa disertai infeksi klinis aktif baik secara mikrobiologis maupun radiologis. Tuberkulosis laten mempunyai potensi teraktifasi kembali menjadi

tuberculosis aktif eksaserbasi akut dan menjadi sumber infeksi baru. Orang dengan TB laten dapat sehat selama bertahun-tahun karena sembuh spontan tetapi mempunyai resiko yang tinggi untuk menjadi TB aktif selama hidupnya (Gyoung, 2013).

Salah satu cara untuk terhindar dari terkenanya penyakit TB yaitu sistem pertahanan tubuh yaitu sistem imun. Sistem imun yang berada di tubuh sangat penting dalam pertahanan terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Berbagai manifestasi yang timbul akibat infeksi *M. tuberculosis* menggambarkan adanya keseimbangan antara kuman dengan mekanisme pertahanan tubuh host (host immunity) dimana mekanisme pertahanan tubuh host sangat menentukan hasil akhir yang dapat ditimbulkan. Terdapat peran penting dari makrofag sebagai eksekutor non spesifik dan sel T sebagai mediator spesifik dalam menghancurkan *M. tuberculosis*. Fagositosis, pengenalan oleh sistem imun, produksi sitokin dan mekanisme efektor merupakan peran dari innate immunity. Makrofag yang teraktivasi oleh infeksi *M. tuberculosis* memproduksi sitokin type 1 seperti IL-12, IL-18, IL-23. Sekresi IL-12 dari makrofag merupakan awal dari regulasi respon imun, bertindak sebagai sitokin proinflammatory yang dapat merangsang produksi IFN- γ oleh sel Th1 dan sel NK yang dapat meningkatkan aktivasi makrofag dalam menghadapi infeksi *M. Tuberculosis* (Martino *et al.*, 2019).

Respon imun limfosit T dimulai saat TB menyebar didalam kelenjar getah bening, di dalam kelenjar getah bening, limfosit T menjalani proses aktivasi dan perluasan populasi spesifik untuk antigen MTB (Martino *et al.*, 2019).

II.4 Tuberkulosis Laten

Infeksi tuberkulosis laten (LTBI) adalah adanya tuberkulosis di dalam tubuh tanpa gejala atau bukti radiografi atau pemeriksaan bakteriologisnya. Diperkirakan hingga 13 juta orang di Amerika Serikat adalah TB laten, dan 5-10% orang yang terinfeksi akan menderita dari TB, yang setara dengan 650.000 hingga 1.300.000 (CDC, 2013).

Seseorang dengan LTBI memiliki *Mycobacterium tuberculosis* di tubuh mereka. Akan tetapi mereka dikatakan tidak memiliki penyakit TB dan tidak dapat menularkannya ke orang lain. Kondisi ini sering disebut juga dengan TB laten. Proses LTBI dimulai ketika bacilli ekstraseluler dimakan oleh makrofag dan diperkenalkan ke sel darah putih. Hal tersebut memicu respon imun tubuh. Sel darah putih membunuh atau mengenkapsulasi sebagian besar bacilli. Kemudian granuloma akan terbentuk. Pada kondisi ini, LTBI telah terjadi. LTBI dapat dideteksi dengan menggunakan tuberculin skin test (TST) atau interferon gamma release assay (IGRA). Sistem imun tubuh memerlukan waktu selama 2 hingga 8 minggu setelah infeksi TB awal agar mampu bereaksi terhadap tuberculin, sehingga LTBI tetap dapat dideteksi oleh TST atau IGRA. Satu minggu setelah infeksi, sistem imun biasanya mampu untuk menghentikan perbanyakan tubercle bacilli, sehingga perkembangan penyakit dapat dicegah. Perkembangan LTBI ke penyakit TB dapat terjadi kapanpun, baik segera maupun beberapa tahun kemudian. Cairan tubuh atau jaringan dari area sumber penyakit harus diambil untuk AFB smear dan kultur. Kultur positif dari *M. tuberculosis* mengkonfirmasi diagnosis penyakit TB. Perkembangan penyakit TB dan LTBI dapat dilihat pada gambar 20 (CDC, 2016).

Infeksi tuberkulosis aktif adalah tuberkulosis yang dapat menularkan, penyakit tuberkulosis pada umumnya mengenai paru paru, yang menyebar melalui udara ketika penderita tubekculosis tersebut bersin, batuk yang tidak ditutup dan berbicara (Jordao, 2011). Kuman tuberkulosis dapat menyebar melalui pembuluh darah, kelenjar getah bening, sehingga dapat menginfeksi hampir seluruh organ tubuh seperti paru-paru, otak, ginjal, saluran pencernaan, tulang, kelenjar getah bening (Zhang, 2011).

Sementara ini sekitar 30% populasi dunia diperkirakan terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, hanya 10% dari individu yang terinfeksi berkembang menjadi TB aktif secara klinis dan 90% tetap dalam fase laten. Ini merupakan reservoir besar individu dengan LTBI. Oleh karena itu, mengoptimalkan diagnosis dan pengelolaan LTBI di Asia akan menjadi sangat penting untuk mencapai target 'End TB' WHO. Diperkirakan bahwa jika kita merawat hanya 14% orang dengan LTBI per tahun, ini akan mengurangi kejadian TB dari 1.280 kasus per juta yang tercatat pada tahun 2010 menjadi 20 kasus per juta pada tahun 2050, tanpa intervensi tambahan. Meskipun beban LTBI tinggi pengobatan LTBI saat ini kurang optimal di Asia, dengan variasi regional yang luas dalam penerapan rekomendasi pedoman utama LTBI WHO. Menurut WHO, persentase orang HIV-positif yang baru didiagnosis yang menerima pengobatan LTBI preventif pada tahun 2017 di Kamboja, India, Indonesia, Myanmar, Filipina, Singapura, dan Vietnam adalah 21%, 10%, 16%, 17%, 57 %, <1%, dan 31% (Paton *et al.*, 2019).

II.4.1 Patogenesis LTBI

Infeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* pada sebagian besar infeksi tetap laten. Pada individu tuberkulosis laten terdapat pertahanan kekebalan tubuh oleh inang serta individu yang bebas dapat mengaktifkan kembali yang menyebabkan penyakit aktif pada sepertiga populasi yang ada di dunia terinfeksi secara laten dan infeksi ini dapat bertahan sekitar 10% dari mereka yang terinfeksi seumur hidup.

Setelah infeksi pertama, sel pertahanan tubuh orang sehat (makrofag) akan bergerak menuju tempat infeksi dan memakan bacilli. Namun, tubercle bacilli sangatlah kuat karena struktur dinding selnya. Perlindungan ini membuat tubercle bacilli dapat bertahan meskipun makrofag memakannya. Setelah makrofag memakan tubercle bacilli, bacilli kemudian menginfeksi makrofag. Bacilli hidup di dalam makrofag yang tumbuh seperti biasa. Setelah makrofag ditaklukkan oleh tubercle bacilli, sistem imun tubuh mencoba strategi pertahanan lain. Sejumlah sel pertahanan sampai di kelenjar limfa dan mengelilingi area infeksi. Sel-sel ini membentuk gumpalan sel keras dengan sebutan tubercle. Sel ini membantu untuk membunuh bacilli melalui pembentukan dinding pencegah penyebaran infeksi lebih lanjut (WHO, 2004)

Pada beberapa kasus, sel pertahanan dapat merusak semua tubercle bacilli secara permanen. Pada beberapa kasus, sel pertahanan tidak mampu untuk merusak semua tubercle bacilli. Tubercle bacilli yang bertahan masuk ke dalam status dormant dan dapat bertahan lama. Sepanjang waktu ini, bakteri tertidur. Pasien tidak menunjukkan gejala dan tidak dapat menularkannya ke orang lain. Kondisi tersebut dikenal dengan TB laten. Bakteri dormant dapat bangun kembali

dan merusak dinding sel pertahanan dalam suatu proses. Proses tersebut dikenal sebagai Secondary TB infection. Secondary TB infection dapat terjadi ketika sistem imun tubuh menjadi lemah dan tidak mampu melawan bakteri, atau ketika bakteri mulai untuk memperbanyak diri dan melimpah. Secondary TB infection biasanya terjadi dalam 5 tahun dari primary infection. Secondary TB infection sering dianggap sebagai onset penyakit TB aktif (kondisi ketika bakteri mulai memenangkan perlawanan terhadap sistem pertahanan tubuh dan mulai menyebabkan gejala) (WHO, 2004).

II.5 Protein Rekombinan Mycobacterium Protein Tuberculosis (MPT63)

Pencegahan TB dilakukan dengan cara vaksinasi dan vaksin yang digunakan di seluruh dunia untuk pencegahan TB yaitu vaksin BCG (Bacille Calmette Guerin). Namun, BCG tidak dapat menghentikan epidemi TB secara global, sehingga diperlukan pengembangan kandidat vaksin baru. Salah satu antigen dari Mycobacterium tuberculosis yang berpotensi sebagai kandidat vaksin yakni MPT63. Beberapa antigen dari Mycobacterium tuberculosis diteliti sebagai kandidat vaksin TB, salah satunya yaitu protein MPT63. MPT63 merupakan salah satu protein yang disekresikan Mycobacterium yang ditemukan pada selsel inflamasi di paru-paru pasien yang mengidap TB. Protein ini terakumulasi dalam sel yang terinfeksi akibat adanya aktivitas Mycobacterium. MPT63 memiliki target intraseluler dengan bertindak langsung pada sel yang terinfeksi. MPT63 mampu secara khusus menginduksi aktivasi makrofag (Siromolot, 2018), mampu merangsang sistem imun humoral pada guinea pig (marmut) yang terinfeksi Mycobacterium (Manca, 1997).

MPT63 adalah protein sekretori *Mycobacterium* yang belum diketahui fungsinya. Sasarannya bisa jadi baik sel imun maupun sel jaringan dan organ lain. Sebagai model sel dalam pekerjaan ini telah digunakan nomor garis sel: U937 - sel monosit yang diisolasi dari limfoma histiositik; Garis sel KG-1 diturunkan dari pasien dengan leukemia mieloid sumsum tulang; A431 dan garis sel Vero dengan asal epitel berasal adenokarsinoma manusia dan ginjal monyet hijau Afrika; fibroblas murine 3T3 dan L929; U2149, yang terbentuk dari histiositoma fibrosa ganas, garis sel heterogen yang disajikan oleh sel mirip maprophases dan fibroblast; X63 - sel myeloma tikus dan kultur primer (Siromolot, 2018).

Gen MPT63 *Mycobacterium tuberculosis* diisolasi dengan melakukan pemeriksaan imun perustakaan ekspresi fage DNA dari *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Ini mengkode protein matang dari 130 residu asam amino (aa) (Mr, 13.655) didahului dengan sekresi sinyal peptida. Protein MPT63 memunculkan humoral respon imun pada marmot yang terinfeksi *M. tuberculosis*. Gen MPT63 hanya ditemukan pada mikobakteri dari *M. tuberculosis* kompleks, dan tidak ada reaktivitas silang serologis antara antigen MPT63 dan protein atipikal umum spesies mikobakteri, *Mycobacterium avium*. MPT63 memiliki ciri khusus untuk *M. tuberculosis* complex membuat antigen ini menjadi kandidat untuk diagnosis spesifik kompleks *M. Tuberculosis* (Manca, 1997). Kompleks antigen protein *Mycobacterium tuberkulosis* yang terdiri dari CFP-21, ESAT-6, MPT-63 dan MPT-64, dapat berguna untuk diagnosis MTB (Wang, *et al*, 2005).

II.6 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada sputum dapat dilakukan secara teknik Polymerase Chain Reaction (PCR), pemeriksaan mikroskopik, dan kultur

bakteri. Pemeriksaan mikroskopis dahak adalah komponen kunci dalam program penanggulangan TB untuk menegakkan diagnosis, evaluasi dan tindak lanjut pengobatan dari pemeriksaan 3 spesimen dahak sewaktu pagi sewaktu (SPS). Pemeriksaan dahak secara mikroskopis merupakan pemeriksaan yang paling mudah, murah, efisien, spesifik dan dapat dilaksanakan di semua unit laboratorium. Deteksi kuman TBC dengan teknik PCR mempunyai sensitivitas yang amat tinggi. PCR merupakan cara amplifikasi DNA, dalam hal ini DNA *Mycobacterium tuberculosis*, secara *in vitro*. Proses ini memerlukan DNA cetakan (template) untai ganda yang mengandung DNA target, enzim DNA polymerase, nukleotida trifosfat, dan sepasang primer.

Menurut (Yu *et al.*, 2017) PCR merupakan salah satu teknik dasar dalam biologi molekuler menggandakan dan mengamplifikasi fragmen DNA spesifik yang akan menghasilkan ribuan hingga jutaan salinan urutan DNA. Metode ini dikembangkan oleh Kary B. Mullis tahun 1985 di Amerika Serikat. Pada awal perkembangannya, PCR hanya digunakan untuk melipat gandakan molekul DNA. Tetapi, pada perkembangan selanjutnya dapat digunakan untuk melakukan kuantitasi molekul m-RNA. Prinsip dasar PCR cukup sederhana sesuai dengan namanya yaitu PCR yang merupakan suatu reaksi berantai, satu molekul DNA yang digunakan untuk menghasilkan dua salinan, diikuti dengan empat salinan, delapan salinan dan seterusnya. Pada proses penggandaan dapat terus terjadi karena menggunakan protein spesifik yang dikenal dengan polymerase. Menurut (Joshi and Deshpande, 2011) polymerase merupakan suatu enzim yang mampu merangkai bangunan DNA yang membentuk untaian molekul panjang, pada

proses PCR membutuhkan suatu fragmen DNA yang disebut primer. Primer adalah nukleotida pendek yang berukuran 12-20 basa yang diperlukan sebagai titik pelekak pada enzim polymerase DNA pada proses pembentukan atau pemanjangan DNA (Sasmito *et al.*, 2014).

Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Primer yang digunakan berjumlah sepasang yaitu *primer forward* dan *primer reverse*. Pada proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi sekaligus menyediakan gugus hidroksi yang diperlukan untuk proses ekstraksi DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

II.7.1 Langkah-Langkah PCR

Ada tiga langkah penting yang terlibat dalam teknik pembentukan PCR yaitu denaturasi, annealing, dan ekstensi. Secara teknis perbanyak DNA dengan PCR memerlukan tujuh komponen yaitu DNA *template* atau cetakan DNA yang akan diperbanyak, enzim DNA polymerase tahan panas, satu pasang primer, dNTP, kofaktor MgCl₂, larutan penyangga dan air (Budiarto, 2015). Berikut merupakan ini tahap-tahap dalam reaksi PCR:

1. Denaturasi

Menurut (Herman *et al.*, 2018) pada tahap denaturasi merupakan tahap penguraian utas ganda DNA menjadi utas tunggal pada suhu tinggi, yaitu 94°C sampai 98°C. Pemanasan pada suhu 94°C sampai 98°C dilakukan selama 20–30 detik. Pemanasan dengan suhu tinggi akan mengganggu ikatan hydrogen antara basa komplementer. Suhu denaturasi yang terlalu tinggi akan menurunkan aktivitas polimerase DNA yang akan berdampak pada efisiensi PCR. Selain itu

dapat merusak DNA *template*, sedangkan ketika suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan proses denaturasi DNA *template* tidak bekerja dengan sempurna. Pada umumnya suhu denaturasi yang digunakan adalah 94°C. *Template* DNA yang mengandung G + C dalam jumlah yang lebih tinggi memerlukan suhu yang lebih tinggi juga. Dan jika suhu denaturasi terlalu rendah atau waktunya terlalu pendek, hanya daerah A–T dari DNA cetakan yang akan terdenaturasi (Ehtisham *et al.*, 2016).

2. Penempelan primer (*Annealing*)

Sedangkan pada tahap *Annealing* ini merupakan tahap penempelan pada primer gen target. *Annealing* sangat bergantung pada suhu yang optimum (55–60°C, dan komposisi primer), apabila suhunya terlalu tinggi, maka primer tidak dapat menempel pada gen target, tetapi ketika suhu terlalu rendah maka primer akan menempel pada gen tetapi bukan target (Nakamura *et al.*, 2014). Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik yaitu primer yang berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Waktu *annealing* yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30– 45 detik. Semakin panjang ukuran primernya, maka semakin tinggi temperaturnya. Temperatur penempelan yang digunakan berkisar antara 36°C sampai dengan 72°C, sedangkan suhu yang biasa digunakan antara 50 – 60°C (Yusuf, 2010).

3. Pemanjangan Primer (*Extention*)

Selama berada tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya untuk memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim pada suhu 72°C 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. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai dengan 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA seperti untai ganda (Yusuf, 2010).