

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Tuberkulosis

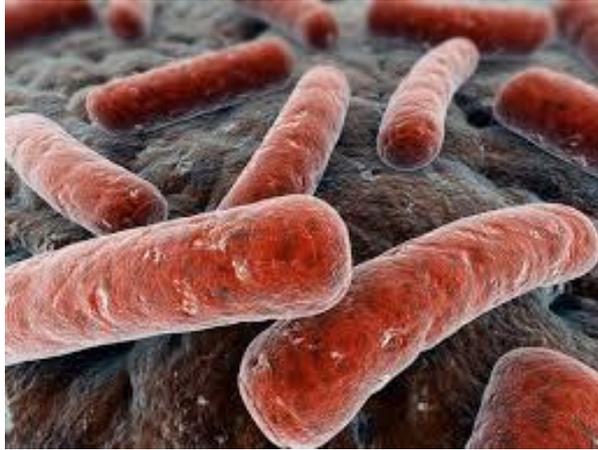
Tuberkulosis adalah suatu penyakit menular yang disebabkan oleh kuman dari kelompok mikobakteri yaitu *Mycobacterium tuberculosis* (Agustin, RA, 2018).

Gejala utama pasien TB paru yaitu batuk berdahak selama 2 minggu atau lebih. Batuk dapat diikuti dengan gejala tambahan yaitu dahak bercampur darah, batuk darah, sesak nafas, badan lemas, nafsu makan menurun, berat badan menurun, malaise, berkeringat malam hari tanpa kegiatan fisik, demam meriang lebih dari satu bulan (Kemenkes RI, 2018).

a. *Mycobacterium tuberculosis*

1) Morfologi dan Struktur

Mycobacterium tuberculosis adalah mikobakteri penyebab utama tuberkulosis pada manusia. *Mycobacterium tuberculosis* terkadang disebut sebagai *tubercle bacillus*. Bakteri berbentuk batang ini bersifat nonmotil (tidak dapat bergerak sendiri) dan memiliki panjang 1-4 μm dan lebar 0,3-0,56 μm . *Mycobacterium tuberculosis* merupakan organisme *obligate aerob* yang berarti membutuhkan oksigen untuk tumbuh. Oleh karena itu, kompleks MTB banyak ditemukan di lobus paru-paru bagian atas yang dialiri udara dengan baik. Selain itu, bakteri ini merupakan parasit intraseluler fakultatif, yaitu patogen yang dapat hidup dan memperbanyak diri di dalam sel hospes maupun diluar sel hospes (sel fagositik), khususnya makrofag dan monosit (Irianti; dkk, 2016).

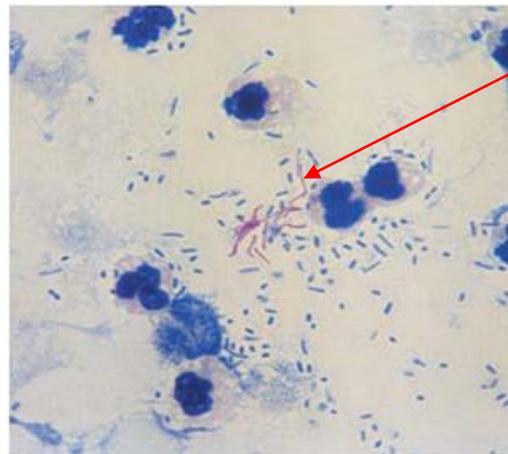


Sumber : <http://web.rshs.or.id/mtb-si-kuman-sehat/>

Gambar 2.1 Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

Taksonomi *Mycobacterium tuberculosis*, ialah (Irianti,dkk, 2016) :

- Kingdom : Bacteria
- Phylum : Actinobacteria
- Ordo : Actinomycetales
- Subordo : Corynebacterineae
- Keluarga : Mycobacteriaceae
- Genus : Mycobacterium
- Spesies : *Mycobacterium tuberculosis*



Sel Bakteri
M.tuberculosis

Sumber : <https://ilmuveteriner.com/agen-penyebab-tuberkulosis-tb-dan-sifatnya/>

Gambar 2.2 *Mycobacterium tuberculosis* pada sediaan sputum pewarnaan ZN

2) Sifat

Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* memiliki sifat tahan asam dalam pewarnaan dengan metode *Ziehl Neelsen*, memerlukan media khusus untuk biakan seperti *Lowenstein Jensen*, Ogawa. Kuman TB berbentuk batang dengan warna merah dalam pemeriksaan dibawah mikroskop. Memiliki

ketahanan terhadap suhu rendah sehingga dapat bertahan hidup dalam jangka waktu lama pada suhu antara 4°C sampai -70°C. Kuman ini juga sangat peka terhadap panas, sinar matahari dan sinar ultraviolet. Dalam dahak pada suhu 30-37°C kuman akan mati dalam waktu kurang lebih satu minggu serta dapat bersifat *dormant* (“tidur”/tidak berkembang) (Agustin, RA, 2018).

b. *Multi Drug Resistant* (MDR)

1) Pengertian

Multi Drug Resistant Tuberculosis (TB MDR) adalah resisten terhadap isoniazid dan rifampisin dengan atau tanpa OAT lini pertama yang lain (Kementrian Kesehatan RI, Direktur Jenderal PP dan PL, 2014). Tuberkulosis paru dengan resistensi dicurigai kuat jika kultur basil tahan asam (BTA) tetap positif setelah terapi 3 bulan atau kultur kembali positif setelah terjadi konversi negatif (Agustin, RA, 2018).

Berdasarkan penelitian Riyanto, *et al* (2006) menyebutkan beberapa gambaran demografik dan riwayat penyakit dahulu dapat memberikan kecurigaan TB paru resisten obat, yaitu: TB aktif yang sebelumnya mendapat terapi, terutama jika terapi yang diberikan tidak sesuai standar terapi, kontak dengan kasus TB resistensi ganda, gagal terapi atau kambuh, infeksi *human immunodeficiency virus* (HIV) dan riwayat inap dengan wabah TB MDR (Agustin, RA, 2018).

2) Patofisiologi

Patofisiologi *Multi drug resistant tuberculosis* (TB MDR) paling banyak didahului oleh infeksi tuberkulosis yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan mengalami kekebalan obat akibat dua faktor yaitu:

a) Faktor Mikroorganisme

Kuman *Mycobacterium tuberculosis* memiliki protein yang dapat menimbulkan apoptosis makrofag yang seharusnya memfagosit kuman. Hal ini akan menimbulkan kerusakan jaringan yang semakin luas. Kuman ini juga dapat mensintesis protein dan menimbulkan perubahan struktur kuman sehingga kuman menjadi lebih resisten terhadap pemberian antibiotik yang sebelumnya sudah digunakan.

b) Faktor Klinis

Mekanisme terjadinya TB MDR terjadinya akibat faktor penyelenggara kesehatan, faktor obat dan faktor pasien. Faktor penyelenggara kesehatan antara lain disebabkan oleh keterlambatan diagnosis, petugas yang kurang terlatih, pemantauan pengobatan yang tidak sesuai serta adanya fenomena *addition syndrome* yaitu suatu obat yang ditambahkan pada satu paduan yang telah gagal, jika kegagalan ini terjadi akibat kuman yang telah resisten pada paduan yang pertama maka penambahan obat ini akan meningkatkan resistensi. Faktor obat antara lain paduan, dosis dan lama pengobatan yang tidak sesuai, serta toksisitas dan efek samping yang mungkin terjadi. Faktor pasien yang berperan dalam TB MDR ini adalah ketidaktaatan pasien dalam mengkonsumsi obat, ketiadaan PMO (Pengawas Minum Obat), kurangnya pengetahuan pasien terhadap infeksi tuberkulosis dan adanya gangguan penyerapan obat (Tarigan, JB, 2017).

c. Diagnosis

1) Pemeriksaan sputum

Sampai saat ini pemeriksaan sputum begitu penting karena dengan ditemukannya kuman TB, diagnosa TB sudah bisa dipastikan. ISTC mengatakan bahwasannya semua pasien (dewasa, remaja dan anak-anak) yang diduga terinfeksi TB paru menjalani pemeriksaan dahak secara mikroskopis minimal 2 kali dan sebaiknya 3 kali secara SPS (sewaktu datang, pagi besoknya dan sewaktu antar spesimen). Dan dianjurkan minimal 1 spesimen dahak pagi hari.

Kriteria sputum BTA positif adalah bila ditemukan sekurang-kurangnya 3 kuman BTA pada satu sediaan yaitu sama dengan diperlukannya 5000 kuman dalam 1 ml sputum. Pembacaan hasil pemeriksaan sediaan sputum BTA dibaca dengan skla IUALTD yaitu:

- a) Tidak ditemukan BTA dalam 100 lapangan pandang (negatif)
- b) Menyebutkan jumlah yang ditemukan. Terdapat 1-9 BTA per 100 lapangan pandang
- c) Disebut + atau 1+. Terdapat 10-99 BTA per 100 lapangan pandang
- d) Disebut ++ atau 2+. Terdapat 1-10 BTA per lapangan pandang

e) Disebut +++ atau 3+. Terdapat >10 BTA per lapangan pandang (Bahar dan Amin, 2014).

2) Pemeriksaan dengan menggunakan teknik kultur atau biakan

Dengan pemeriksaan dengan kultur atau biakan, setelah 4-6 minggu penanaman sputum dalam media biakan, koloni kuman TB mulai nampak. Apabila setelah 8 minggu koloni belum juga nampak maka biakan dinyatakan negatif (Bahar dan Amin, 2014).

Pada dasarnya metode kultur merupakan gabungan antara media cair dan media padat yang disebut kombinasi bifasik (padat dan cair), dimana media padat digunakan untuk memaksimalkan deteksi kuman. Tingkat sensitifitas metode kultur dalam mendiagnosis TB lebih dari 80% sedangkan spesifitasnya dapat melebihi angka 98% (Massi, MN, 2012).

Namun, dalam melakukan pemeriksaan kultur memiliki hambatan utamanya yakni perlunya tempat yang steril dalam melakukan dekontaminasi, biaya kebutuhan untuk kondisi biosafety yang sesuai, centrifuge, rawannya kasus kontaminasi terhadap media yang digunakan dan teknik molekuler dengan berbiaya tinggi untuk mendeteksi lebih cepat *Mycobacterium tuberculosis* (Massi, MN, 2012).

3) Pemeriksaan dengan *Xpert assay*

Teknik GeneXpert MTB/RIF merupakan pemeriksaan molekuler secara otomatis untuk mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* dan sekaligus mendeteksi resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap rifampisin. Pemeriksaan ini menggunakan metode *nested real-time polymerase chain reaction (PCR) assay* untuk mendeteksi mutasi pada regio hot spot *rpoB* (Boehme *et al*, 2010). Primer PCR yang digunakan mengamplifikasi sekitar 81 bp daerah inti gen *rpoB* MTB kompleks, sedangkan *probe* dirancang untuk membedakan sekuen *wild type* dan mutasi pada daerah inti yang berhubungan dengan resistensi terhadap rifampisin (Kemenkes RI, 2015).

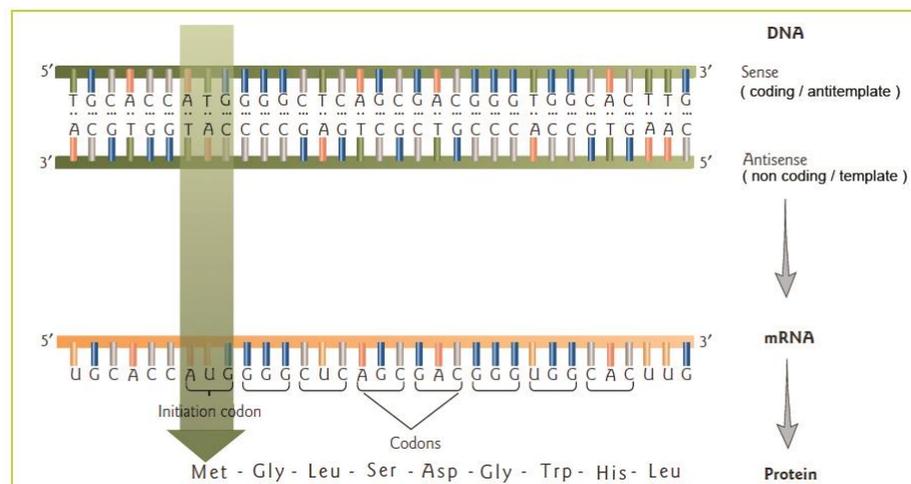
Pengujian dilakukan pada platform *GeneXpert* MTB/RIF, mengintegrasikan sampel yang akan diolah dalam *cartridge* plastik sekali pakai. *Cartridge* ini berisi semua reagen yang diperlukan untuk dapat

melisiskan bakteri, ekstraksi asam nukleat, amplifikasi, dan deteksi gen yang sudah diamplifikasi. Hasil pemeriksaan dapat diperoleh dalam waktu 2 jam (Nurlina, dkk, 2013).

2. Sintesis Protein

Eksresi dari informasi yang disimpan di dalam bahan genetik merupakan suatu proses yang rumit/kompleks yang berdasarkan pada konsep aliran informasi di dalam sel. Awal dari proses ekspresi adalah transkripsi dari informasi genetik yang disimpan di dalam molekul DNA yang menghasilkan 3 jenis molekul RNA (asam ribonukleat): RNA duta (mRNA), RNA transfer (tRNA), dan RNA ribosomal (rRNA). Hanya molekul mRNA yang diterjemahkan (ditranslasikan) ke dalam protein (Suharsono, 2005).

Bahan genetik bertanggung jawab terhadap munculnya variasi baru dari suatu organisme melalui proses mutasi. Perubahan komposisi kimia DNA dapat mengubah proses transkripsi dan translasi, yang pada akhirnya dapat mengubah protein yang disintesis. Dengan terjadinya perubahan protein, maka akan mengubah proses metabolisme di dalam sel/organisme, yang akan mengakibatkan perubahan penampakan organismenya (Suharsono, 2005).

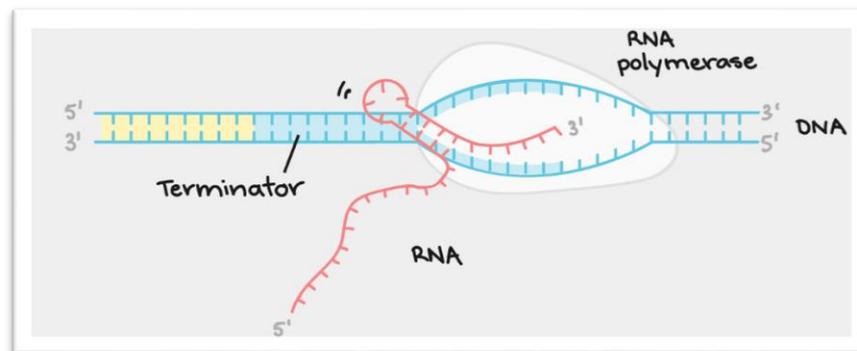


Sumber : Allison, 2007

Gambar 2.3 Untaian DNA

a. Transkripsi

Transkripsi adalah proses mensintesis molekul mRNA dari *template*-DNA. Enzim RNAP harus menempel pada urutan nukleotida tertentu dari serangkaian nukleotida DNA. Kemudian terjadi denaturasi pada pita DNA. Pita DNA menjadi terpisah dan tidak berpilin. Setelah RNAP menempel maka RNAP akan bergerak melewati sepanjang pita DNA dan pita RNA mulai dirakit, proses ini berjalan dari arah 5' ke 3' sama dengan replikasi DNA. Setiap basa dari pita DNA akan berpasangan dengan basa RNA komplementer. Hasil akhir produk pita transkripsi disebut mRNA, pada mRNA tidak memiliki T (timin) melainkan U (urasil) (Adrianto, H, 2017).



Sumber : <https://www.edubio.info/2019/09/sintesis-protein-transkripsi-Gambar 2.4 Proses Transkripsi>

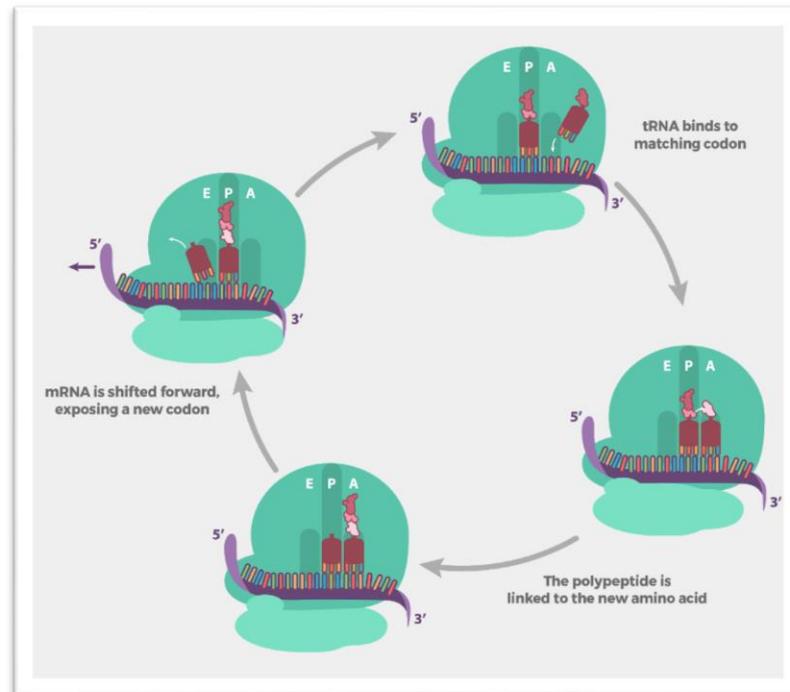
b. *Editing* mRNA

mRNA yang sudah dihasilkan dari proses transkripsi dilanjutkan ke proses pemasakan atau *editing* agar RNA menjadi siap pakai. Proses editing mRNA masih di inti sel atau nukleus. Apabila mRNA sudah termodifikasi dan teredit menjadi mRNA matang/fungsional, maka mRNA akan keluar menembus pori-pori nukleus dan menuju ke sitoplasma bergabung dengan ribosom untuk melanjutkan proses berikutnya (Adrianto, H, 2017).

c. Translasi

Translasi adalah proses terakhir menerjemahkan bahasa RNA menjadi protein (polipeptida). Dalam translasi ini menerjemahkan satuan 3 nukleotida (kodon) mRNA ke 1 jenis asam amino. mRNA akan menempel pada ribosom, kemudian tRNA inisiator datang membawa asam amino metionin masuk ke ribosom. tRNA menempel pada kodon AUG (kodon *start* yang mengkode asam amino metionin). Tahapan pemanjangan

diawali ketika tRNA ke dua membawa asam amino ke dua dan menempel ke sisi ribosom dengan menempelnya tRNA pada tiap kodon ke kodon akan dihasilkan asam amino satu persatu. Proses terminasi ditandai dengan kodon *stop* Mrna (UAA, UAG atau UGA) kodon ini tidak membawa asam amino. Kemudian rantai polipeptida yang dibentuk dari ribosom lepas dan menjadi protein fungsional, tRNA dan mRNA lepas (Adrianto, H, 2017).



Sumber : <https://www.edubio.info/2019/09/sintesis-protein-transkripsi->

Gambar 2.5 Proses Translasi

d. Kodon (Kode Genetika)

Kode genetik ialah suatu cara untuk menetapkan jumlah serta urutan nukleotida yang berperan dalam menentukan posisi yang tepat dari tiap asam amino dalam rantai peptida yang bertambah panjang (Redana, DN, 2011). Antikodon adalah urutan 3 nukleotida dalam tRNA (transfer Ribonucleic Acid), tRNA adalah jenis RNA yang bentuknya mirip dengan daun semanggi dan memiliki bagian di ujungnya yang disebut antikodon. Kodon akan berpasangan dengan antikodon saat proses translasi (Panji, 2019).

Tabel 2.1 Tabel Standar Kode Genetik DNA

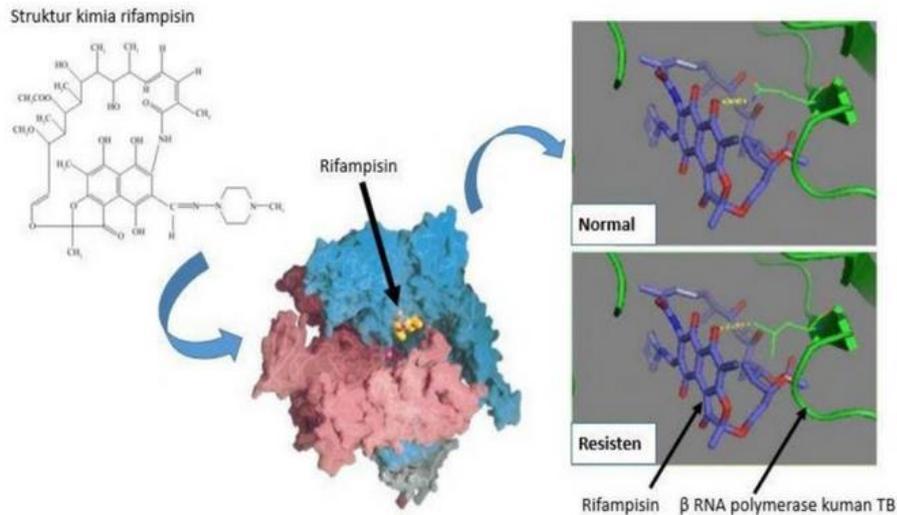
1 st base	2 nd base				3 rd base				
	T	C	A	G					
T	TTT	Phe	TCT	Ser	TAT	Tyr	TGT	Cys	T
	TTC		TCC		TAC		TGC		C
	TTA	Leu	TCA		TAA	Stop	TGA	Stop	A
	TTG		TCG		TAG	Stop	TGG	Trp	G
C	CTT	Leu	CCT	Pro	CAT	His	CGT	Arg	T
	CTC		CCC		CAC		CGC		C
	CTA		CCA		CAA	CGA	A		
	CTG		CCG		CAG	CGG	G		
A	ATT	Ile	ACT	Thr	AAT	Asn	AGT	Ser	T
	ATC		ACC		AAC		AGC		C
	ATA	ACA	AAA		AGA	A			
	ATG	Met	ACG		AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GTT	Val	GCT	Ala	GAT	Asp	GGT	Gly	T
	GTC		GCC		GAC		GGC		C
	GTA		GCA		GAA	GGA	A		
	GTG		GCG		GAG	Glu	GGG		G

Sumber : Adrianto, H, 2017

3. Resistensi Rifampisin pada *Mycobacterium tuberculosis*

a. Rifampisin

Rifampisin adalah turunan semisintetik rifamisin B yaitu salah satu anggota dari kelompok antibiotik makrosiklik yang disebut rifamisin. Termasuk kedalam kelompok zat yang dihasilkan oleh *Streptomyces mediterranei*. Turunan dari rifampisin lainnya yaitu rifabutin dan rifapentin (Istiantoro dan Setiabudi R, 2012).



Sumber : Adrianto H, 2017

Gambar 2.6 Mekanisme rifampisin dalam mengikat *Rna Polymerase*

Target rifampisin pada *Mycobacterium tuberculosis* adalah subunit β dari RNA polimerase, rifampisin mengikat dan menghambat pemanjangan RNA kurir. Karakteristik penting dari rifampisin adalah aktif melawan pertumbuhan aktif dan metabolisme basil (tidak tumbuh) secara perlahan (Silva dan Palomina, 2011).

Mutasi di luar “hot spot region” *rpoB* telah dilaporkan walaupun lebih jarang terjadi. Resistensi silang dengan rifampisin lain juga dapat terjadi. Monoresisten adalah resistensi terhadap 1 obat lini pertama saja. Hampir semua strain resisten rifampisin juga resisten obat lain, khususnya isoniazid. Hal ini adalah alasan mengapa resistensi rifampisin dianggap sebagai surrogate marker (suatu pengukuran laboratorium atau tanda fisik digunakan pada percobaan terpetik sebagai pengganti endpoint klinis bermakna yang berfungsi sebagai ukuran langsung tentang bagaimana pasien merasa, berfungsi atau bertahan dan diharapkan dapat memprediksi efek terapi) untuk MDR-TB (Irianti; dkk, 2016).

b. Mekanisme resistensi antibiotik

Berdasarkan molekuler biologi mikobakteria, mekanisme penyebab munculnya strain resisten dapat dibagi menjadi 2, yaitu mekanisme *acquired resistance* dan mekanisme resistensi intrinsik (Smith, *et al*, 2013).

2) Mekanisme resistensi antibiotik yang di dapat (*acquired resistance*)

Bakteri patogen termasuk *Mycobacterium tuberculosis* mampu mengalami resistensi terhadap antibiotik umum dimana sebelumnya bakteri sensitif terhadap antibiotik tersebut. Konsep resistensi ini disebut sebagai “*acquired antibiotic resistance*”. Jenis resistensi ini dapat terjadi akibat mutasi. Namun, semua “*acquired resistance*” yang diketahui saat ini terjadi akibat adanya mutasi kromosomal (Smith, *et al*, 2013).

3) Mekanisme resistensi intrinsik

Mekanisme ini memungkinkan terjadinya netralisasi aktifitas antibiotik. Resistensi jenis ini menghasilkan tingginya *background* resistensi yang membatasi penggunaan antibiotik pada pasien TB dan menghambat perkembangan obat baru. Resistensi intrinsik ini dapat dibagi menjadi 2 kategori, yaitu resistensi pasif dan resistensi khusus (Smith, *et al*, 2013).

a) Mekanisme resistensi pasif

Mekanisme ini melibatkan karakteristik dinding sel mikobakteri, dinding sel mikobakteri yang impermeable berfungsi sebagai suatu barier efektif terhadap penetrasi antibiotik. Mikobakteria memiliki dinding sel yang sangat tebal dan terdiri dari banyak lapisan dengan hidrofobitas bervariasi. Lapisan ini membentuk suatu ruang antar lapisan yang serupa dengan periplasma dinding sel bakteri Gram negatif. Peptidoglikan sacculus ditutupi oleh lapisan arabinogalaktan dan keduanya bersifat hidrofobik sehingga mencegah transport molekul hidrofobik. Dua lapisan ini dihubungkan secara kovalen ke lapisan luar asam mikolat yaitu suatu asam lemak rantai panjang yang membentuk barier waxy atau non fluid, yang mencegah penetrasi molekul hidrofobik maupun hidrofilik (Irianti; dkk, 2016).

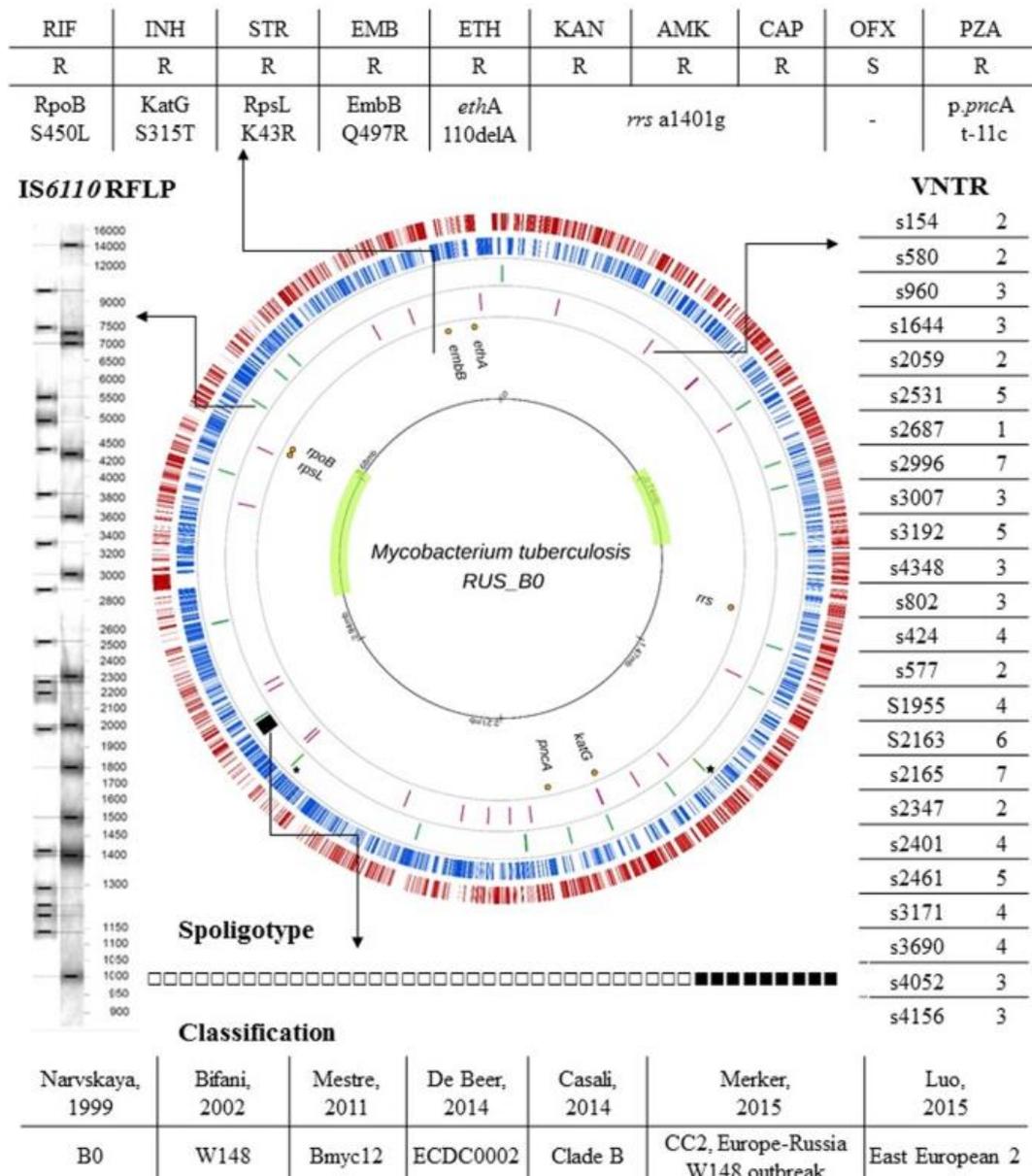
b) Mekanisme resistensi khusus atau terspesialisasi

Selain barier dinding sel sebagai penyebab perlambatan penetrasi antibiotik, *Mycobacterium tuberculosis* dan mikobakteri lainnya juga menjalankan mekanisme resistensi khusus yang memungkinkan detoksifikasi aktif obat ketika mereka mencapai ruang sitoplasma. Mekanisme resistensi ini dapat dikelompokkan melalui 5 mekanisme, yaitu modifikasi target obat,

modifikasi kimia obat, degradasi enzimatis pada obat, peniruan molekuler suatu target obat, pengeluaran obat dengan pompa efflux (Smith, *et al*, 2013).

c. Mutasi gen *rpoβ*

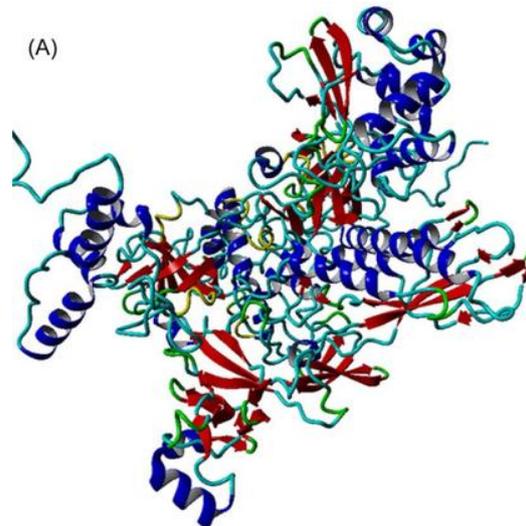
Genom *Mycobacterium tuberculosis* yang dihasilkan melingkar mempunyai ukuran 4,4 Mb dengan kandungan G (guanin) dan C (sitosin) rata-rata 65,6%. Memiliki satu set gen rRNA dan 45 tRNA yang teridentifikasi dalam genom, serta 4.115 gen penyandi protein dan 138 pseudogen (Bespyatykh, J, *et al*, 2019).



Sumber : Bespyatykh, J, *et al*, 2019

Gambar 2.7 Peta Genom *Mycobacterium tuberculosis*

Dari gambar diatas, dua lingkaran luar menunjukkan urutan pengkodean pada untai plus (merah) dan minus (biru), lingkaran ketiga menggambarkan lokus CRISPR (hitam) dan situs integras IS6110 (hijau), lingkaran keempat menunjukkan posisi VNTR, lingkaran kelima menunjukkan gen resistensi obat dan lingkaran keenam menunjukkan skala dalam genom dengan daerah terbalik sehubungan dengan genom H37Rv (Bespyatykh, J, *et al*, 2019).



Sumber : Kumar, S dan Jena, L, 2014

Gambar 2.8 Struktur 3D gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis*

Gen *rpoβ* mengkode *sub unit β* dari bakteri *Rna polymerase*. *RNA polymerase* tersusun atas 4 subunit berbeda (α , β , β' dan σ) dan dikode oleh gen *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* dan *rpoD* (Borner,T, *et al*, 2015). Studi luas pada gen *rpoB* pada isolate *Mycobacterium tuberculosis* resisten RIF mengidentifikasi berbagai mutasi dan penghapusan atau delesi pendek di gen *rpoB*. Terdapat total 69 perubahan nukleotida tunggal, 3 penyisipan/insersi, 16 delesi dan 38 perubahan nukleotida ganda yang dilaporkan. Mutasi gen *rpoB* yaitu gen yang menghasilkan RNA polimerase subunit β (Irianti; dkk, 2016).

Dalam bakteri yang tidak terjadi mutasi di *rpoβ*, rifampisin mengikat di situs sub unit β dan mencegah *polymerase* mentranskrip lebih dari dua atau tiga pasangan basa dari setiap Rna dan menghentikan produksi protein dalam sel, sedangkan untuk bakteri yang mengalami mutasi akan resisten terhadap efek ini (Alifano, P, *et al*, 2014).

Jika bakteri mengalami mutasi maka akan terjadi perubahan asam amino penyusun protein yang mengkode sub unit β *RNA polimerase*, maka akan mengakibatkan terjadinya perubahan konformasi ikatan obat rifampisin yang dapat mempengaruhi afinitasnya. Hal ini akan menyebabkan proses transkripsi masih dapat berlangsung karena kerja rifampisin menjadi tidak optimal, sehingga *Mycobacterium tuberculosis* menjadi resisten (Silva dan Palomina, 2011).

Sekitar 95% isolat resisten RIF disebabkan akibat adanya mutasi gen *rpoB* di wilayah 81 bp yang diapit oleh kodon 507 dan 533. Wilayah ini dikenal dengan nama RRDR. Resistensi ini biasanya terjadi karena mutasi dimana basa dalam DNA diganti dengan yang lain dan kode urutan baru untuk asam amino dengan rantai berukuran besar yang menghambat kerja molekul rifampisin dalam mengikat polimerase (Koch, A, *et al*, 2014).

Mutasi yang paling sering terjadi yakni pada kodon 531, 526 dan 516, ini biasanya terjadi pada resisten terhadap rifampisin level tinggi (MIC >32 ug/ml). Namun, mutasi yang menyebabkan perubahan asam amino pada kodon 511, 513, 518 dan 522 biasanya disebut resistensi terhadap rifampisin level rendah (Massi MN, 2012).

Tabel 2.2 Daftar mutasi nukleotida dan asam amino gen *rpoB*

Kodon Mutasi	Perubahan Nukleotida dan asam amino
Mutasi di area RRDR	
510	CAG (Gln) → CCG (Pro)
513	CAA (Gln) → GAA (Glu)
516	GAC (Asp) → TAC (Tyr)
516	GAC (Asp) → GCA (Ala)
516	GAC (Asp) → GTC (Val)
518	AAC (Asn) → TAC (Tyr)
526	CAC (His) → CTC (Leu)
526	CAC (His) → AAC (Asn)
529	CGA (Arg) → CAA (Gln)
531	TCG (Ser) → TTG (Leu)
531	TCG (Ser) → TGG (Trp)
531	TCG (Ser) → TTG (Leu)
511, 526, 528	CTG (Leu) → CTA (Leu), GAC (Asp) → GTC (Val)

Keterangan : RRDR (*Rifampicin Resistance Determining Region*)

Sumber : Adrianto H, 2017

4. Pemeriksaan Molekuler

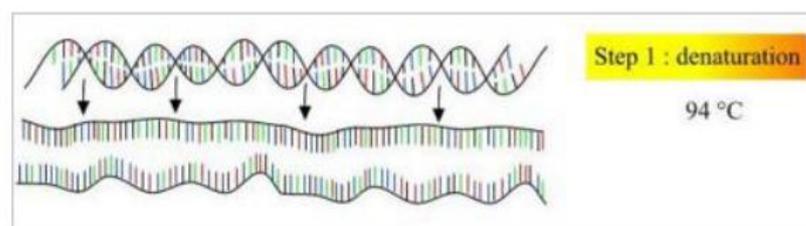
a. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Diagnosis MDR TB saat ini banyak menggunakan pemeriksaan molekuler yaitu PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi secara *in vitro*. PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Metode konvensional perbanyakan DNA dengan PCR terdiri dari tiga langkah yang diulang untuk suatu siklus tertentu yaitu :

1) Denaturasi untai ganda

Tahap pertama pada sistem amplifikasi PCR adalah denaturasi DNA sampel dengan menaikkan suhu dalam tabung reaksi sampai 95°C. Tabung reaksi ini berisi DNA target, dua primer oligonukleotida dalam jumlah berlebih, Taq DNA polymerase yang tahan panas, keempat deoksiribonukleotida dan buffer yang mengandung Mg. Selama proses denaturasi yang berlangsung dalam beberapa menit, untai ganda DNA (dsDNA) mencair dan ikatannya terbuka sehingga terjadi pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal DNA (ssDNA).



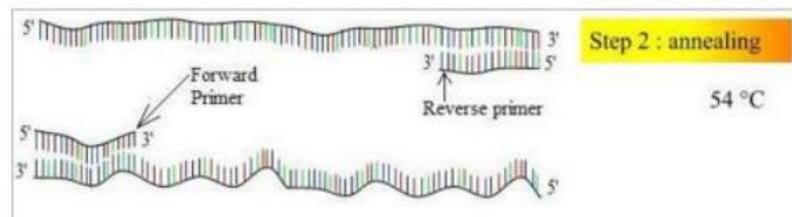
Sumber : Nurhayati B dan Darmawati, S, 2017

Gambar 2.9 Tahap Denaturasi

2) *Annealing*

Tahap kedua pada sistem amplifikasi PCR adalah primer annealing. Primer Annealing merupakan pengenalan (annealing) suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi

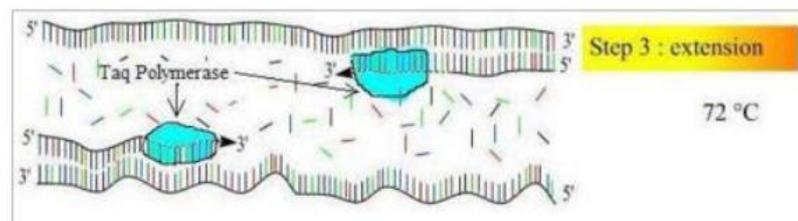
primer itu sendiri. Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30–45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi suhunya. Kisaran suhu penempelan yang digunakan adalah antara 37°C sampai dengan 60°C. Pada tahap ini, primer menempel pada sekuen komplementernya pada DNA target.



Sumber : Nurhayati B dan Darmawati, S, 2017
Gambar 2.10 Tahap *Annealing*

3) Ekstensi/Elongasi

Tahap ketiga pada sistem amplifikasi PCR adalah DNA Polymerase extension. Pada tahap extension ini terjadi proses pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target yang akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Adapun temperatur ekstensi berkisar antara 70-72°C.



Sumber : Nurhayati B dan Darmawati, S, 2017
Gambar 2.11 DNA *Polymerase extension*

Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi biologi sel dan molekuler yang cukup pesat, menimbulkan pengaruh terhadap pengembangan teknologi analisis biomolekuler termasuk pengembangan PCR. Dibawah ini merupakan jenis-jenis teknik PCR :

1) PCR Konvensional

PCR konvensional adalah PCR dimana tahap perbanyak materi genetik dan tahap deteksi produk PCR dilakukan secara berturut-turut, yaitu tahap

deteksi dilakukan bila tahap perbanyak materi genetik telah selesai. Tahap deteksi dapat dilakukan dengan beberapa cara (format), salah satunya menggunakan elektroforesis gel kemudian dilanjutkan dengan hibridisasi pada membran menggunakan reagen pelacak atau hibridisasi dalam tabung reaksi (Nurhayati B dan Darmawati, S, 2017).

2) *Real time-PCR (Q-PCR)*

Teknik ini dapat digunakan untuk mengamplifikasi sekaligus menghitung jumlah target molekul DNA hasil amplifikasi tersebut. Maksud dari kata real time pada metode ini adalah data fluoresensi yang dihasilkan dari proses amplifikasi dapat diamati secara langsung pada saat proses amplifikasi masih berjalanan tanpa harus menunggu seluruh siklus amplifikasi selesai (Nurhayati B dan Darmawati, S, 2017).

3) *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

Metode ini digunakan untuk amplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuens dari sel atau jaringan RNA. Metode ini dibantu oleh *reverse transcriptase* (mengubah RNA menjadi cDNA), mencakup pemetaan, menggambarkan kapan dan dimana gen diekspresikan (Yusuf, ZK, 2010).

4) *Nested PCR*

Proses ini memungkinkan untuk mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. Dua set primer digunakan untuk mendukung metode ini (Yusuf, ZK, 2010).

5) *Multiplex-PCR*

Multiplex PCR merupakan beberapa set primer dalam campuran PCR tunggal untuk menghasilkan amplicon (hasil amplifikasi PCR) dari berbagai ukuran yang spesifik untuk sekuens DNA yang berbeda (Nurhayati B dan Darmawati, S, 2017).

6) *PCR-Elisa*

PCR-ELISA merupakan metode yang digunakan untuk menangkap asam nukleat yang meniru prinsip dari Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yang terkait. Di dalam suatu pengujian hibridisasi hasil produk dari PCR akan terdeteksi dengan metode ini. Dengan metode ini

dapat dilakukan pengukuran sekuen internal pada produk PCR (Nurhayati B dan Darmawati, S, 2017).

7) *Touchdown-PCR*

Sebuah modifikasi dari PCR yang mencegah amplifikasi sekuen nonspesifik dengan memvariasikan suhu annealing. Sebuah varian dari PCR yang bertujuan untuk mengurangi latar belakang spesifik secara bertahap menurunkan suhu annealing selama PCR berlangsung (Nurhayati B dan Darmawati, S, 2017).

8) *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

Metode ini digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan analisis model derivat dari perbedaan DNA (Yusuf, ZK, 2010).

9) *Inverse-PCR*

Metode ini digunakan ketika hanya satu sekuen internal yang diketahui. Template didigesti dengan enzim restriksi yang memotong bagian luar daerah yang akan diamplifikasi, fragmen restriksi yang dihasilkan ditempelkan dengan ligasi dan diamplifikasi dengan menggunakan sekuen primer yang memiliki titik ujung yang memiliki jarak yang jauh satu sama lain dengan segmen eksternal yang telah tergabung (Yusuf, ZK, 2010).

10) *Quantitative-PCR*

Metode ini digunakan untuk pengukuran berulang dari hasil produk PCR. Metode ini secara tidak langsung digunakan untuk mengukur kuantitas, dimulai dari jumlah DNA, cDNA atau RNA. Hasil dari metode ini juga menampilkan copy dari sampel (Yusuf, ZK, 2010).

11) *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*

Metode ini bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA dengan cara mengkombinasikan teknik PCR menggunakan primer-primer dengan sekuen acak untuk keperluan amplifikasi lokus acak dari genom (Yusuf, ZK, 2010).

b. Sekuensing

Sekuensing adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, yang merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena

mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup (Rogers, K, 2011). Di bawah ini adalah beberapa metode-metode sekuensing :

1) Maxam-Gilbert

Pada mulanya, metode ini cukup populer karna menggunakan DNA hasil pemurnian. Sedangkan metode Sanger memerlukan kloning untuk membentuk DNA untai tunggal. Namun, seiring perkembangan zaman metode ini menjadi tidak populer karna kerumitan teknisnya, menggunakan bahan kimia berbahaya dan kesulitan dalam *scale-up*. Pemotongan DNA terjadi secara kimia sehingga reagen kimia tertentu harus ditambahkan ke dalam sistem reaksi (Aminasari, 2016).

2) Metode Sanger

Metode ini menggunakan ddNTPS (Dideoxynucleotides Triphosphates) yang memiliki gugus hidrogen pada karbon-3 dari gula ribosa. Normalnya memiliki OH pada dNTPs (Deoxynucleotides Triphosphates). Dideoxynucleotides merupakan penghenti rantai (Aminasari, 2016).

Pada metode terminasi rantai (metode Sanger), perpanjangan atau ekstensi rantai DNA dimulai pada situs spesifik pada DNA cetakan dengan menggunakan oligonukleotida pendek yang disebut *primer* yang komplementer terhadap DNA pada daerah situs tersebut. *Primer* tersebut diperpanjang menggunakan DNA polimerase, enzim yang mereplikasi DNA. Bersama dengan *primer* dan DNA polimerase, diikutsertakan pula empat jenis basa deoksinukleotida (satuan pembentuk DNA), juga nukleotida pemutus atau penghenti rantai (*terminator* rantai) dalam konsentrasi rendah (biasanya **di**-deoksinukleotida). Penggabungan nukleotida pemutus rantai tersebut secara terbatas kepada rantai DNA oleh polimerase DNA menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang berhenti bertumbuh hanya pada posisi pada DNA tempat nukleotida tertentu tersebut tergabungkan. Fragmen-fragmen DNA tersebut lalu dipisahkan menurut ukurannya dengan elektroforesis gel poliakrilamida (Sanger, 1975).

3) *Sequencer*

Seiring perkembangan zaman, dengan bantuan teknologi semua dapat dilakukan dengan otomatis dan cepat dengan bantuan mesin *sequencer*, dengan divariansi

menggunakan perwarna berfluoresensi pada ddNTP dan dideteksi menggunakan detector yang terhubung dengan computer sehingga langsung dapat diolah (Brown, 2010). Dengan ditemukannya mesin *Automated Capillary Sequencer*, proses pemisahan fragmen dan pembacaan urutan basa DNA dapat dilakukan dengan lebih mudah, cepat dan otomatis. Hasil pembacaan mesin sekuenser disebut elektroferogram, yaitu peak-peak berwarna yang menunjukkan urutan basa DNA-nya (Brown, 2010).

B. Variabel Penelitian

