

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, sejenis kuman patogen berbentuk batang yang bersifat aerobik, tahan asam, dan hidup di dalam sel (intraseluler) yang terutama menyerang paru-paru. *M. tuberculosis* mampu hidup di udara bebas selama beberapa jam dan mampu bertahan dalam keadaan dorman (tidak aktif) selama bertahun-tahun. TB merupakan pembunuh nomor dua pada orang dewasa dan diklasifikasikan sebagai penyakit menular yang paling mematikan (Ma *et al.*, 2015). TB telah menjadi masalah nasional di Indonesia, sehingga memerlukan semua komponen bangsa dalam penyelesaiannya. Tingginya insiden TB yang resistan terhadap berbagai obat menimbulkan masalah kesehatan yang serius karena pasien memiliki tingkat kesembuhan yang lebih rendah dan kematian yang lebih tinggi daripada pasien dengan TB yang rentan terhadap obat.

Kuman *M. tuberculosis* dapat menginfeksi semua organ, tetapi yang utama adalah paru-paru. *M. tuberculosis* dapat mencapai paru-paru melalui udara yang terhirup. Dalam paru-paru, *M. tuberculosis* ditangkap oleh sel makrofag. Kontak *M. tuberculosis* dengan makrofag melibatkan interaksi antara komponen permukaan sel mikobakteri seperti lipoarabinomanan (LAM), protein porin OmpA dan heme aglutin HbhA dengan reseptor makrofag seperti reseptor manosa, protein surfaktan SP-A dan CD14. Selama kontak dengan reseptor tersebut, *M. tuberculosis* mengeluarkan senyawa virulen ke sel makrofag. Studi hasil eksperimen menunjukkan bahwa protein ESAT-6, CFP-10 dan PZAse *M. tuberculosis* berfungsi sebagai senyawa patogen intrasel (Ernst *et al.*, 2007).

Munculnya kasus resistensi bakteri tuberkulosis terhadap obat anti TB menimbulkan permasalahan baru dalam pengobatan pasien TB, sebab penderita akan semakin sulit diobati. Selama ini penyakit TB diatasi dengan penggunaan antibiotik seperti Rifampisin (RIF), Isoniazid (INH), etambutol (EMB), streptomisin dan pirazinamid (PZA). Dalam perkembangannya ditemukan banyak penderita telah menunjukkan resistensi terhadap obat TB. Sejak tahun 1980-an, kasus tuberkulosis di seluruh dunia mengalami peningkatan karena kemunculan MDR-TB (*Multi Drug Resisten Tuberculosis*) (Chan *et al.*, 2002).

Bakteri penyebab MDR-TB adalah strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap obat anti-TB *first-line* seperti isoniazid dan rifampisin. MDR-TB mendorong penggunaan obat lini kedua yang lebih toksik seperti etionamid, sikloserin, kanamisin dan kapreomisin (Tripathi *et al.*, 2005). Namun *extensively drug-resisten tuberculosis* (XDR-TB) menyebabkan bakteri TB resisten terhadap obat lini kedua (WHO, 2010).

Selama terapi, pasien dengan TB aktif umumnya diberikan isoniazid (INH), rifampisin (RIF), pirazinamid (PZA) dan etambutol (EMB) selama 2 minggu yang merupakan fase intensif (Kuswandi, 2016). Kemudian terapi dilanjutkan dengan pemberian isoniazid dan rifampisin selama 4 bulan lagi (fase lanjutan) untuk memusnahkan sisa bakteri yang telah masuk kedalam kondisi dormant. Tujuan awal dari terapi kombinasi tersebut adalah untuk meminimalkan perkembangan resistensi terhadap streptomisin setelah obat tersebut diperkenalkan pertama kali. Standar terapi untuk infeksi TB sensitif obat sangat efektif dalam pembersihan bakteri (Hoagland *et al.*, 2016).

Kasus resistensi juga ditemukan pada obat anti tuberkulosis (TB) pirazinamid. Sebanyak 53% isolat dari total 127 isolat klinis *M. tuberculosis* resisten obat anti tuberkulosis (TB) menunjukkan resistensi terhadap PZA pada konsentrasi kritis 100 µg/ml PZA (Louw *et al.*, 2006).

Pirazinamid merupakan *Pro-Drug* yang digunakan sebagai terapi kombinasi dengan obat anti tuberkulosis (TB) lainnya. PZA memerlukan

perubahan menjadi bentuk aktifnya yaitu asam pirazinoat (POA) oleh enzim Pirazinamidase agar dapat membunuh bakteri. Pyrazinamide (PZA) merupakan obat andalan yang digunakan untuk mengobati TB, karena kemampuannya membunuh populasi basil tuberkel semidorman yang berada di lingkungan asam tanpa dipengaruhi oleh obat TB lain. (Ma *et al.*, 2015).

PZA adalah bagian dari rejimen pengobatan jangka pendek yang saat ini digunakan (Y Zhang, 2003). PZA, analog nikotinamida, adalah prodrug yang diubah oleh enzim pirazinamidase (PZAse) menjadi bentuk aktif, asam pirazinoat (POA) untuk mempengaruhi basil tuberkel (SJ Cheng, 2000). *Mycobacterium tuberculosis* Strain yang tidak memiliki aktivitas PZAse, resisten terhadap PZA (K Konno, 1967). Korelasi hilangnya PZAse dengan resistensi PZA masih belum jelas, karena *pncA* defisiensi pada resisten terhadap PZA *M. tuberculosis* galur yang menghilangkan aktivitas PZAse sepenuhnya jarang terjadi. Meskipun penyisipan, penghapusan, dan pada pergeseran bingkai *pncA* gen dapat menyebabkan hilangnya produk gen fungsional, kemudian dikaitkan dengan tingkat resistensi PZA yang tinggi, tetapi sebagian besar mutasi yang diidentifikasi pada isolat klinis adalah mutasi titik tunggal yang menghasilkan resistensi PZA di tingkat menengah (Zhan, 2003).

Mutasi gen *pncA* penyandi enzim pirazinamidase/nikotonamidase telah ditemukan pada beberapa isolat klinis *M. tuberculosis* resisten PZA. Meskipun telah ditemukan adanya mutasi pada gen *pncA*, akan tetapi belum ada penjelasan tentang aktivitas protein PZAse yang dihasilkan terutama dalam mendukung resistensi obat PZA tersebut. Berkaitan dengan ini maka diperlukan studi aktivitas protein PZAse dengan cara mengekspresi gen-gen mutan *pncA* dari isolat klinis yang ada. Sejumlah gen *pncA* mutan dari isolat klinis *M. tuberculosis* telah terklon dalam vektor kloning pGemT-easy (Purkan, 2013). Untuk bisa diekspresikan menjadi proteinnya, maka gen *pncA* tersebut perlu disubklon dalam vektor ekspresi yang memiliki perangkat seperti promotor, ribosom *binding site*, maupun *regulator site*. Pada penelitian ini telah dilakukan penyisipan gen *pncA* ke dalam vektor

ekspresi pET-30a untuk pembentukan DNA rekombinan sebagai tahap awal dari upaya mendapatkan protein PZAse dari gennya.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pembentukan DNA rekombinan dapat dihasilkan melalui penyisipan gen *pncA* ke dalam vektor ekspresi pET-30a?
2. Bagaimana pola restriksi DNA rekombinan pET-30a-*pncA* yang dipotong dengan beberapa enzim restriksi?
3. Bagaimana homologi urutan nukleotida gen *pncA* yang dihasilkan?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini sebagai berikut:

1. Membentuk DNA rekombinan melalui penyisipan gen *pncA* ke dalam vektor ekspresi pET-30a
2. Menentukan pola restriksi DNA rekombinan pET-30a-*pncA* setelah dipotong dengan beberapa enzim restriksi
3. Menentukan homologi urutan nukleotida gen *pncA* pada DNA rekombinan

1.4. Manfaat Penelitian

Keberhasilan pembentukan DNA rekombinan pET30a diharapkan dapat mendukung over ekspresi gen, sehingga dapat dimanfaatkan untuk berbagai kebutuhan seperti penyediaan enzim PZAse untuk studi mekanisme resistensi PZA di level protein, maupun konstruksi vaksin baru dari *M. tuberculosis* isolat klinis lokal. Selain itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai referensi ilmu dalam riset-riset studi resistensi obat TB maupun pengembangan obat baru TB serta vaksin yang potensial.