

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang Permasalahan

Tuberkulosis (TBC) merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Menurut WHO 2020, total kasus TBC di Indonesia berada pada peringkat 2 setelah India, dengan *rate* kasus 391 per 100.000 penduduk. Penyakit ini merupakan salah satu penyebab kematian terbesar ketiga di Indonesia setelah penyakit kardiovaskuler dan penyakit pernafasan (Depkes, 2007).

Bagian organ utama yang bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) serang adalah paru-paru. Dalam mekanisme infeksi pada paru-paru, bakteri *M. tuberculosis* mengalami kontak dengan sel makrofag, yang melibatkan interaksi antara komponen permukaan sel mikobakteri seperti lipoarabinomannan (LAM), protein porin OmpA dan heme aglutinin HbHA dengan reseptor makrofag seperti reseptor manosa, protein surfaktan SP-A dan CD14. Saat kontak terjadi, bakteri *M. tuberculosis* mengeluarkan senyawa virulen ke sel makrofag. Melalui studi eksperimen, didapatkan hasil, bahwa yang berfungsi sebagai senyawa patogen intrasel pada bakteri *M. tuberculosis* adalah protein ESAT-6, CFP-10 dan PZase (Ernst et al., 2007).

*Multidrug-resistant tuberculosis* (MDR-TB) adalah bentuk penyakit TBC yang disebabkan oleh bakteri yang kebal terhadap 2 obat anti-TBC yang paling efektif, yakni isoniazid dan rifampisin, secara bersama-sama atau disertai resisten terhadap obat anti TBC lainnya seperti etambutol, streptomisin dan pirazinamid (WHO, 2021; TBC Indonesia, 2021). Pada tahun 2015, *Multidrug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB)/*Resisten Rifampisin* (RR) TB di dunia diperkirakan sebesar 3,3% dari kasus baru. Sebesar 9,7% dari MDR-TB/RR-TB berpotensi menjadi *Extensive Drug-Resistant Tuberculosis* (XDR TB) (WHO, 2015), yang menyebabkan pasien menjadi lebih sulit disembuhkan dan memperbesar peluang peningkatan angka kematian. Adanya MDR-TB akan mengakibatkan meningkatnya potensi terjadinya MDR-TB apabila tidak ditangani dengan baik dan

juga dapat membuat waktu penyembuhan penderita lebih lama dengan keberhasilan pengobatan yang belum pasti. Pada tahun 2017, kasus TBC di Indonesia yang tercatat di program TBC Indonesia ada sebanyak 442.000 kasus. Dari kasus tersebut diperkirakan ada 8.600-15.000 MDR/RR TB, (perkiraan 2,4% dari kasus baru dan 13% dari pasien TBC yang diobati sebelumnya), dan cakupan yang diobati baru sekitar 27,36% (TBC Indonesia, 2018). Menurut WHO (2021) pada tahun 2018, secara keseluruhan daerah di bumi, tingkat keberhasilan pengobatan pasien MDR/RR TB adalah 59%, dan WHO memperkirakan ada 23.000 kasus MDR/RR di Indonesia. Sesuai dengan pedoman WHO, deteksi MDR/RR-TB memerlukan konfirmasi bakteriologis TBC dan pengujian resistensi obat menggunakan uji molekuler cepat, metode kultur atau teknologi sekuensing.

Beberapa faktor yang dapat memberikan kontribusi dalam meningkatnya jumlah penderita MDR-TB yakni, minimnya tingkat pengetahuan penderita dan keluarga terhadap penyakitnya, penderita memiliki tingkat kepatuhan minum obat yang buruk, pemberian terapi tunggal yang tidak adekuat, pemberian monoterapi atau regimen obat yang tidak efektif, keteraturan berobat yang rendah, dosis tidak adekuat, motivasi penderita kurang, bioavailabilitas yang buruk dan kualitas obat memberikan kontribusi terhadap terjadinya resistensi obat sekunder (Syahrezki, 2015).

Salah satu obat yang digunakan untuk mengobati TBC adalah pirazinamid (PZA). PZA adalah prodrug yang diubah oleh enzim pirazinamidase (PZase) menjadi bentuk aktifnya, yakni asam pirazinoat (POA) untuk mempengaruhi basil tuberkel dan membunuh bakteri (Zhang *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2000).

Strain *M. tuberculosis* yang tidak memiliki aktivitas enzim PZase diketahui resisten terhadap PZA (Konno *et al.*, 1967). Hubungan antara hilangnya aktivitas enzim PZase dengan resistensi PZA masih belum diketahui secara jelas, karena mutasi pada gen *pncA* pada strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap PZA yang mengakibatkan hilangnya aktivitas PZase sepenuhnya jarang terjadi. Meskipun mutasi (penyisipan, penghapusan, dan pergeseran) *frame* pada gen *pncA* dapat menyebabkan hilangnya produk gen fungsional dengan tingkat resistensi PZA yang tinggi, tetapi sebagian besar mutasi yang diidentifikasi dalam isolat klinis

adalah mutasi titik tunggal yang menghasilkan resistensi PZA di tingkat menengah (Cheng *et al.*, 2000; Zhang & Mitchison, 2003).

Mutasi pada gen *pncA* yang berhubungan dengan resistensi PZA memiliki tipe yang sangat beragam meliputi jenis dan posisi mutasi pada gen *pncA* yang berukuran  $\pm 560$  pb. Menurut Zhang dan Yew (2009), melaporkan bahwa terdapat beberapa jenis mutasi yang diketahui dan merupakan jenis dan posisi mutasi tersering pada gen *pncA* pada *M. tuberculosis* resisten PZA, yakni yang pertama 13 dari 53 isolat daerah Portugal mengalami mutasi titik pada posisi dan jenis nukleotida T359C, yang kedua masing-masing 3 dari 29 isolat dari Brazil mengalami mutasi pada posisi dan jenis nukleotida insersi 5 pb pada 182; T464G; C512A berturut-turut, kemudian yang ketiga 9 dari 24 isolat dari Afrika Selatan mengalami mutasi pada posisi dan jenis nukleotida A35G, yang keempat 20 dari 53 isolat dari Quebec, Kanada mengalami mutasi delesi 8 pb pada 446, dan yang terakhir 3 dari 34 isolat di Swedia mengalami mutasi pada posisi/jenis nukleotida A139G.

Purkan (2013) telah mengidentifikasi adanya gen *pncA* penyandi pirazinamidase (PZase) dari beberapa *M. tuberculosis* isolat klinis lokal resisten pirazinamida. Penjelasan mutasi gen *pncA* ini belum cukup untuk menjelaskan dasar resistensi PZA pada isolat-isolat klinis tersebut, sebab korelasi dengan aktivitas protein PZase belum terungkap. Dalam rangka untuk mengungkap penyebab resistensi PZA pada level protein, maka diperlukan kloning gen *pncA* pada vektor ekspresi, sehingga gen *pncA* mutan tersebut dapat diekspresi menjadi proteinnya.

Ekspresi gen memerlukan sebuah vektor yang yang tidak hanya dapat bereplikasi sendiri, tetapi juga memiliki sinyal-sinyal ekspresi sehingga gen yang dibawa dapat ditranskripsi menjadi mRNA dan kemudian ditranslasi menjadi protein (Brown, 2010). Vektor ekspresi harus memiliki elemen ekspresi seperti promotor, operator, RBS, terminator, marker, *start* dan *stop codon* (Pranoto, 2015). Vektor ekspresi yang digunakan pada penelitian ini adalah vektor plasmid pET30a yang memiliki 5.422 pasang basa, dengan penanda resisten kanamisin, promotor T7 dan *inducible regulator lac Z*. Penyisipan gen *pncA* ke dalam vektor ekspresi

pET30a pada penelitian ini dilakukan dalam rangka membentuk DNA rekombinan yang membawa sisipan gen tersebut dan juga sebagai tahap awal dalam menghasilkan enzim pirazinamidase rekombinan di sel inang *E. coli*.

### 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka permasalahan penelitian ini dirumuskan sebagai berikut:

1. Apakah gen *pncA* dapat disisipkan kedalam vektor ekspresi pET30a ?
2. Bagaimana pola restriksi DNA rekombinan yang dihasilkan setelah dipotong dengan beberapa enzim restriksi ?
3. Bagaimana urutan nukleotida gen *pncA* yang dihasilkan ?

### 1.3. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini dituliskan sebagai berikut :

1. Menyisipkan gen *pncA* ke dalam vector ekspresi pET30a.
2. Menentukan pola restriksi DNA rekombinan yang dihasilkan setelah dipotong dengan beberapa enzim restriksi.
3. Menentukan urutan nukleotida gen *pncA* yang dihasilkan.

### 1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan dalam menghasilkan DNA rekombinan pET30a-*pncA* sehingga gen tersebut dapat diekspresikan menjadi proteinnya, dan dapat mengungkap aktivitas PZAse dalam mengungkap resistensi PZA pada *M. tuberculosis*. Penyediaan DNA rekombinan pET30a-*pncA* juga penting sebagai awal riset pengembangan vaksin TBC berbasis protein rekombinan. Secara ilmu, penelitian ini diharapkan mampu menyediakan sumber referensi bagi riset-riset pengembangan obat TBC yang potensial.