

**DETEKSI *Mycobacterium abscessus* Complex (MABC) PADA
Macaca fascicularis SERTA KARAKTERISASI MOLEKULAR
KANDIDAT GEN SPESIFIK UJI TB PRIMATA**

ALIFIAN GIGIH PANGESTU



**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Deteksi *Mycobacterium abscessus* Complex (MABC) pada *Macaca fascicularis* serta Karakterisasi Molekular Kandidat Gen Spesifik Uji TB Primata” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, September 2024

Alifian Gigih Pangestu
P05012120031



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Perpustakaan IPB University

RINGKASAN

ALIFIAN GIGIH PANGESTU. Deteksi *Mycobacterium abscessus* Complex (MABC) pada *Macaca fascicularis* serta Karakterisasi Molekular Kandidat Gen Spesifik Uji TB Primata. Dibimbing oleh HUDA SALAHUDIN DARUSMAN dan UUS SAEPULOH.

Mycobacterium abscessus Complex (MABC) merupakan kelompok mycobacteria yang berhubungan dengan penyakit infeksi pada paru selain tuberkulosis (TB). Hewan primata, khususnya *Macaca fascicularis* berpotensi menjadi inang infeksi dan menjadi hal yang penting dalam pelaksanaan deteksi serta penanggulangan infeksi. Penggunaan *Mamalian Old Tuberculin* (MOT) untuk deteksi tuberkulosis pada primata hingga saat ini masih memiliki kendala baik pada sensitivitas uji, prosedur yang rumit, hingga biaya yang mahal. Pengembangan kit deteksi TB dengan sensitivitas lebih baik secara mandiri kemudian penting untuk mendorong pendeteksian TB yang lebih mudah dan akurat. Salah satu target gen yang memiliki potensi untuk mendeteksi dan membedakan infeksi mycobacterium adalah gen Rv1984c dan Rv2626c. Kedua gen ini diduga memiliki kemampuan dalam peningkatan respon imun dan dapat dimanfaatkan dalam target deteksi berbasis antigen-antibodi. Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi adanya infeksi mycobacterium melalui amplifikasi *heat shock protein-65* (*hsp65*) pada berbagai koleksi spesimen primata kemudian mengkarakterisasi protein Rv1984c dan Rv2626c sebagai kandidat gen potensial pengembangan uji TB primata.

Penelitian ini diawali dengan ekstraksi DNA sampel asal *broncoalveolar lavage*, *oropharyngeal swab* dan *nasopharyngeal swab* dari *Macaca fascicularis*. Deteksi molekular TB dengan target gen *hsp65* berhasil mengidentifikasi adanya indikasi infeksi MABC yang dikonfirmasi melalui metode PCR. Sebanyak 9 dari 19 sampel menunjukkan hasil positif dan dilakukan analisis sekuensing. Hasil BLASTn sekuensing mengarah pada *hsp65* kelompok bakteri *Mycobacterium abscessus* (Mab) yang selanjutnya dilakukan pembentukan pohon filogenetik dilengkapi dengan *hsp65* kelompok mycobacterium.

Hasil amplifikasi sampel positif kemudian dilanjutkan untuk karakterisasi protein Rv1984c dan Rv2626c serta membandingkan sekuen yang diperoleh terhadap sekuen dari *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Karakterisasi yang dilakukan meliputi penyejajaran sekuen, pembentukan prediksi struktur tiga dimensi (3D) protein dan analisis epitop melalui imunoinformatika. Hasil penyejajaran sekuen menunjukkan Rv1984c_Mab yang tergolong pada kelompok protein mirip cutinase menunjukkan kemiripan dengan Rv1984_Mtb sebesar 50,72%; RMSD=0,490 Å. Kemiripan lebih rendah didapati pada Rv2626c yaitu sebesar 27,27%; RMSD=9,206 Å. Prediksi struktur 3D protein dan permukaan epitop protein menunjukkan Rv1984c_Mtb tidak jauh berbeda dengan Rv1984c_Mab. Kemiripan motif pelipatan protein antara Rv1984c_Mab dan Rv1984c_Mtb juga diprediksi menjadi alasan aktivitas imunogenik oleh Rv1984c. Eksplorasi awal dan karakterisasi molekular yang dilakukan ini menegaskan dasar informasi yang terarah bagi tahapan penelitian berikutnya untuk pengembangan kit deteksi TB ataupun kandidat multi-epitop vaksin.

Kata Kunci: bioinformatika, diagnosis, primata, *tuberculin*, tuberkulosis



SUMMARY

ALIFIAN GIGIH PANGESTU. Detection of *Mycobacterium abscessus* Complex (MABC) in *Macaca fascicularis* and Molecular Characterization Potential Target Gene TB Detections in Primates. Supervised by HUDA SALAHUDIN DARUSMAN and UUS SAEPULOH.

Mycobacterium abscessus Complex (MABC) is a group of non-tuberculosis mycobacteria that are associated with pulmonary diseases other than tuberculosis (TB). Primates, especially *Macaca fascicularis*, have potential to be a host transmission and its becomes important to detect and examine the infections. The use of Mammalian Old Tuberculin (MOT) for TB detection still has problems such as lack of sensitivity, complex procedures, also high-cost procurement. Therefore, the development of detection tools with better sensitivity independently is crucial to enhance accurate detection. The target genes that have the potential to detect and differentiate mycobacterium infection are Rv1984c and Rv2626c. These two genes are scientifically explored to increase immune responses and are utilized as antigen-antibody based detection targets. Our research aims to detect mycobacterium infection through amplification of heat shock protein-65 (hsp65) in different sample collections from captive primates, then characterize the Rv1984c and Rv2626c proteins as potential candidate genes to detect TB in primates.

The first step of this research is extracting DNA from bronchoalveolar lavage, oropharyngeal swab and nasopharyngeal swab of *Macaca fascicularis*. Molecular detection using hsp65 target gene successfully identified the indicated infection of MABC, confirmed by the conventional PCR method. A total of 9 out of 19 sample tests indicated positive results and were then nucleotide sequenced. The BLASTn hit was close to *Mycobacterium abscessus* (Mab), then a phylogenetic tree was constructed aligned with hsp65 gene from mycobacterium.

This research further analyzed to characterize the Rv1984c and Rv2626c protein of *Mycobacterium abscessus* (Mab) compared with the *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) sequence based on bioinformatics analysis. Characterization protein included sequence alignment, 3D structure protein prediction, and epitope analysis using immunoinformatics. As alignment result indicated that Rv1984c_Mab which belongs to the cutinase-like proteins family shows 50,72% similarity with Rv1984c_Mtb (RMSD=0,490 Å). Lower similarity was obtained in Rv2626c (27,27% similarity; RMSD=9,206 Å). The 3D protein models and epitope surface prediction showed similarities between Rv1984c_Mtb and Rv1984c_Mab. The similarities of epitope surface were also predicted to be a reason of Rv1984c immunogenic activity. This preliminary research exploration and molecular characterization confirm the basic needs for directional information to the next research stages such as developing TB detection kit or multi-epitope vaccine candidate.

Keywords: bioinformatics, diagnose, primates, tuberculin, tuberculosis



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2024
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DETEKSI *Mycobacterium abscessus* Complex (MABC) PADA *Macaca fascicularis* SERTA KARAKTERISASI MOLEKULAR KANDIDAT GEN SPESIFIK UJI TB PRIMATA

ALIFIAN GIGIH PANGESTU

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains pada
Program Studi Bioteknologi

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Penguji pada Ujian Tesis:
Dr. drh. Ni Luh Putu Ika Mayasari

Perpustakaan IPB University



Judul Tesis : Deteksi *Mycobacterium abscessus* Complex (MABC) pada
Macaca fascicularis serta karakterisasi molekular kandidat gen
spesifik uji TB primata

Nama : Alifian Gigih Pangestu

NIM : P0501212031

Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Dr. drh. Huda Salahudin Darusman, M.Si.



Pembimbing 2:

Dr. Uus Saepuloh, S.Si., M.Biomed.



Diketahui oleh

Ketua Program Studi Bioteknologi:

Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si.

NIP. 196204191989031001

Dekan Sekolah Pascasarjana:

Prof. Dr. Ir. Dodik Ridho Nurrochmat, M.Sc.F.Trop., IPU

NIP.197003291996081001



Tanggal Ujian : 23 Agustus 2024

Tanggal Lulus :



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Perpustakaan IPB University



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Juli 2023 sampai bulan Januari 2024 ini ialah Ilmu Kesehatan dan Hewan dengan judul Deteksi *Mycobacterium abscessus* Complex (MABC) pada *Macaca fascicularis* serta Karakterisasi Molekular Kandidat Gen Spesifik Uji TB Primata”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Dr. drh. Huda Salahudin Darusman, M.Si. dan Dr. Uus Saepuloh, S.Si., M.Biomed. yang telah membimbing dan banyak memberikan saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Ketua Program Studi Bioteknologi Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si., Sekretaris Program Studi Bioteknologi Dr. Prayoga Suryadarma, S.T.P., M.T., moderator seminar dan penguji luar komisi pembimbing sehingga karya tulis ini dapat terselesaikan. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan juga kepada tendik dan staf Laboratorium Bioteknologi, Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) yang telah membantu kelancaran proses penelitian, terkhusus pada Yuliana, Bella FDZ, Ellis Dwi A, dan Ramdhan. Terima kasih penulis ucapkan kepada rekan-rekan Direktorat Kemahasiswaan, khususnya kepada seluruh staf Pengembangan Reputasi dan Prestasi Mahasiswa yang telah memberikan banyak dukungan. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada Subandi (ayah), Menik Sri Mulyati (Ibu), serta seluruh keluarga yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayang yang berharga sehingga penelitian ini terselesaikan dengan baik.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, September 2024

Alifian Gigih Pangestu



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Perpustakaan IPB University

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR LAMPIRAN	iv
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
1.5 Ruang Lingkup	3
II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Infeksi <i>Non-Tuberculosis Mycobacteria</i> (NTM) pada Primata	5
2.2 <i>Mycobacterium abscessus</i> Complex (MABC)	6
2.3 Gen Potensial Deteksi <i>Mycobacterium abscessus</i>	7
2.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) untuk Deteksi TB Primata	9
III METODE	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Sampel Penelitian	11
3.3 Alat dan Bahan	11
3.5 Prosedur Kerja	11
3.3.1 Ekstraksi DNA Sampel dari <i>Macaca fascicularis</i>	11
3.3.2 Amplifikasi PCR deteksi TB dari <i>Macaca fascicularis</i>	12
3.3.3 Amplifikasi PCR Gen Rv1984c dan Rv2626c	12
3.3.4 Sekuensing, Penyejajaran Sekuen dan Prediksi 3D Model Protein	12
3.3.5 <i>Superimpose</i> Permodelan Protein Gen Rv1984c dan Rv2626c	13
3.3.6 Analisis Imunogenitas dan Visualisasi Prediksi Epitop Protein	13
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Deteksi <i>Mycobacterium abscessus</i> sampel asal <i>Macaca fascicularis</i>	15
4.2 Amplifikasi PCR dan Sekuensing Gen Rv1984c dan Rv2626c	17
4.3 Penyejajaran Sekuen dan Prediksi 3D Protein Rv1984c dan Rv2626c	17
4.4 Analisis I-TASSER dan <i>Superimpose</i> Permodelan Protein	19
4.5 Analisis Imunoinformatika dan Visualisasi Prediksi Epitop Protein	20
VI SIMPULAN DAN SARAN	25
5.1 Simpulan	25
5.2 Saran	25
DAFTAR PUSTAKA	27
RIWAYAT HIDUP	39



DAFTAR TABEL

1	Primer Deteksi TB dengan Target Gen <i>hsp65</i>	12
2	Primer Karakterisasi Gen Rv1984c dan Rv2626c	12
3	Hasil BLASTn Sekuen DNA Indikasi Infeksi TB dari <i>Macaca fascicularis</i>	16
4	Prediksi Energi Pengikatan Rv1984c Terhadap MHC-I	21
5	Prediksi Tingkat Immunogenik Rv1984c Terhadap MHC-II	22
6	Prediksi Tingkat Immunogenik, Alergenik dan Toksisitas Rv1984c	23

DAFTAR GAMBAR

1	Potensi Deteksi TB pada Fase Laten dan Aktif.	8
2	Elektroforegram Deteksi TB pada Berbagai Sampel.	15
3	Hasil Analisis Filogenetik Sekuen Gen <i>hsp65 M. Abscessus Complex</i> .	16
4	Elektroforegram Amplifikasi Gen Rv1984c dan Rv2626c.	17
5	Hasil Penyejajaran Sekuen dan Prediksi Protein Mtb_Rv1984c (Sekuensing) dan Mab_Rv1984c (PDB).	18
6	Hasil Penyejajaran Sekuen dan Prediksi Protein Mtb_Rv2626c (Sekuensing) dan Mab_3937 (PDB).	19
7	Visualisasi 3D Model Protein Hasil Permodelan I-TASSER.	19
8	Visualisasi <i>Superimpose</i> Protein.	20
9	Grafik Tingkat Immunogenitas Rv1984c melalui <i>Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0</i> dengan <i>Threshold Score</i> >50,0.	22
10	Visualisasi 3D Sekuen Rv1984c_Mab yang Memiliki Sifat Immunogenik.	23

DAFTAR LAMPIRAN

1	Urutan DNA Hasil Sekuensing dan Prediksi Residu Asam Amino Rv1984c_Mtb	35
2	Urutan DNA Hasil Sekuensing dan Prediksi Residu Asam Amino Rv2626c_Mtb	36
3	Hasil Permodelan Prediksi Struktur 3D Protein oleh I-TASSER	37
4	Prediksi Tahapan (<i>Processing Prediction</i>) MHC-I Epitop Rv1984c	38