

**KARAKTERISASI BAKTERI *Mycobacterium tuberculosis*
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETRI *FOURIER TRANSFORM INFRARED***

Dewi Astriany, Sri Gustini Husein, Reta Julan Mentari

Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia

Abstrak

Tuberkulosis merupakan salah satu penyakit yang sampai saat ini masih menjadi penyebab utama kematian di dunia. *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai karakteristik unik karena dinding selnya kaya akan lipid dan lapisan tebal peptidoglikan yang mengandung arabinogalaktan, lipoarabinomanan dan asam mikolat. Asam mikolat tidak biasa dijumpai pada bakteri lain. Spektrofotometri *Fourier Transform Infrared* (FT-IR) dapat digunakan untuk karakterisasi mikroorganisme karena spektrum yang dihasilkan merupakan refleksi dari keseluruhan komposisi molekuler. Adapun penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pola spektrum bakteri tersebut. Terdapat kesamaan pola spektrum bakteri *Mycobacterium tuberculosis* hasil lisis menggunakan pemanasan dan sonikasi yang ditandai dengan munculnya *free-OH absorption band*, regang simetris CH₂, *bending* NH₃, *bending* CH₃ dan *a asymmetric stretching* P=O. Analisis sampel dialisis *Mycobacterium tuberculosis* hasil pemanasan menunjukkan perbedaan dengan sampel hasil sonikasi yaitu dengan munculnya amida II dan vibrasi C-O-C dan C-O serta tidak munculnya *free-OH absorption band* dari asam mikolat.

Kata kunci : Tuberkulosis, *Mycobacterium tuberculosis*, spektrum FT-IR.

Abstract

Tuberculosis (TB) is one of diseases that is still the main cause of death in the world. Mycobacterium tuberculosis has unique characteristics because its cell walls are rich in lipids and thick layers of peptidoglycan containing arabinogalactan, lipoarabinomannan, and mycolic acid. Mycolic acid is not common in other bacteria. Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrophotometry can be used to characterize microorganisms because the resulting spectrum is a reflection of the overall molecular composition. The purpose of this research is to determine the pattern of spectrum of bacteria. There are similar pattern of Mycobacterium tuberculosis spectrum using heating and sonication which is characterized by the appearance of free-OH absorption band, symmetric stretching CH₂, bending NH₃, bending CH₃ and a asymmetric stretching P=O. Analysis of dialysis heating samples of Mycobacterium tuberculosis showed differences with sonication samples results with the appearance of amide II and vibration C-O-C and C-O and the absence of free-OH absorption band from mycolic acid.

Keywords : Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, FT-IR spectrum

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit yang telah lama dikenal dan sampai saat ini masih menjadi penyebab utama kematian di dunia. *World Health Organization* (WHO) menyatakan terdapat 22 negara dikategorikan sebagai *high-burden countries* terhadap TB. Indonesia termasuk peringkat keempat setelah India, China, dan Afrika Selatan dalam menyumbang TB di dunia. Menurut WHO estimasi rata-rata kejadian untuk pemeriksaan dahak adalah terdapatnya basil tahan asam (BTA) positif sebanyak 183 per 100.000 penduduk (Kemenkes RI, 2015).

Prevalensi TB di Indonesia dan negara-negara sedang berkembang lainnya cukup tinggi. Pada tahun 2006, kasus baru di Indonesia berjumlah lebih dari 600.000 dan sebagian besar diderita oleh masyarakat yang berada dalam usia produktif (15–55 tahun). Angka kematian karena infeksi TB berjumlah sekitar 300 orang per hari dan terjadi lebih dari 100.000 kematian per tahun (Kemenkes RI, 2015).

Berdasarkan hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001 TBC menduduki ranking ketiga sebagai penyebab kematian (9,4 % dari total kematian) setelah penyakit sistem sirkulasi dan sistem pernafasan. Hasil survei prevalensi tuberkulosis di Indonesia tahun 2004 menunjukkan bahwa angka prevalensi tuberkulosis Basil Tahan Asam (BTA) positif secara nasional adalah 110 per 100.000 penduduk (Depkes RI, 2008).

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri aerob obligat, tidak memiliki endospora dan kapsul, tidak motil, Gram-positif, tahan asam, bakteri batang dengan ukuran 0,2-0,4 x 2-10 µm, tumbuh pada suhu 37⁰C dengan pertumbuhan yang lambat yaitu 2-60 hari (Holt *et al.*, 1994).

Genus ini mempunyai karakteristik unik karena dinding selnya kaya akan lipid, dan lapisan tebal peptidoglikan yang mengandung asam mikolat, arabinogalaktan, dan lipoarabinomanan. Asam mikolat tidak dijumpai pada bakteri lain dan hanya dijumpai pada dinding sel *mycobacterium*. *Mycobacterium tuberculosis* bersifat tahan asam sehingga dikenal juga sebagai Basil Tahan Asam (BTA) (Poeloengan dkk., 2007).

Salah satu upaya pemberantasan TBC ialah dengan cara diagnosis dini. Uji diagnostik penyakit TBC dapat dilakukan dengan beberapa cara di antaranya adalah tes Mantoux, rontgen foto thorax, pemeriksaan mikrobiologis, pemeriksaan serologi, dan uji molekular berbasis *Polymerase Chain Reaction* (Chagas, 2010).

Tes Mantoux merupakan uji tuberkulin kulit dengan menyuntikkan *Purified Protein Derivate* (PPD) ke dalam kulit sehingga dapat dilihat reaksi hipersensitivitas berupa benjolan pada kulit, bila diameter lebih dari 10 mm menunjukkan hasil positif. Saat ini tes Mantoux cenderung kurang tepat, selain itu juga hasilnya baru kita baca dan evaluasi setelah

48 hingga 72 jam kemudian. Penggunaan foto rontgen thorax pun tidak mampu menunjukkan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* secara akurat (Kenyorini dkk., 2006).

Selain kedua uji diatas, saat ini kriteria terpenting untuk diagnosis TB adalah berdasarkan pewarnaan tahan asam. Walau demikian, metode ini kurang sensitif karena baru memberikan hasil positif bila terdapat lebih dari 103 organisme/mL sputum. Kultur memiliki peran penting untuk menegakkan diagnosis TB karena mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik daripada pewarnaan tahan asam. Kultur Lowenstein-Jensen (LJ) merupakan baku emas metode identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* dengan sensitivitas dan spesifisitas masing-masing 99% dan 100%. Akan tetapi, waktu yang diperlukan untuk memperoleh hasil kultur cukup lama, yaitu sekitar 8 minggu. Hal ini tentu saja akan menyebabkan keterlambatan yang bermakna untuk menegakkan diagnosis dan memulai terapi (Saptawati, 2012).

Pada dekade ini berkembang penggunaan spektrofotometri inframerah yang telah terbukti menjadi alat yang ampuh untuk studi biologi molekuler. Sistem biologis termasuk lipid, protein, peptida, *biomembrane*, asam nukleat, sel mikroba, dan sampel klinis semuanya telah berhasil dipelajari dengan menggunakan spektrofotometri inframerah. Teknik mikroskopik dikombinasikan dengan

metode canggih lainnya, memungkinkan untuk menyelidiki sampel kompleks dengan ukuran micron (Stuart, 2004).

Kemajuan dalam pengembangan teknologi inframerah telah menciptakan minat baru dalam mengevaluasi metode spektrofotometri seperti spektrofotometri *Fourier Transform Infrared* (FT-IR) sebagai metode akurat dan selektif untuk mengidentifikasi berbagai kontaminan mikroba dalam makanan. Sidik jari unik dari inframerah pada sel mikroba utuh didasarkan pada komposisi biokimia dari sel tersebut, termasuk lapisan polisakarida, protein, lipid dan asam nukleat dan setiap jenis bakteri akan menghasilkan spektrum yang berbeda (Mauer & Davis, 2010).

Berdasarkan uraian diatas maka dilakukan penelitian untuk mengkarakterisasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan spektrofotometri *Fourier Transform Infrared* (FT-IR).

METODOLOGI

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Spektrofotometer FT-IR (Termo Scientific Nicolet IS5), Sonikator (Elmasonic E), timbangan analitik (Mettler Toledo), sentrifugator (Hettich), *Biocontained-centrifuge* (Eppendorf), tabung falcon, botol McCartney, *magnetic stirrer*, autoklaf, inkubator, kantong selofan, serta alat-alat gelas Laboratorium Mikrobiologi.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Mycobacterium*

tuberculosis berbentuk suspensi susu skim, NaCl fisiologis, Na₂EDTA, *phosphate buffer saline*, L-asparagin, *potato meal*, gliserol, *malachite green* 2%, gliserol, dan telur bebek.

Bakteri *Mycobacterium Tuberculois* diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat. Alat dan bahan yang digunakan dalam pengujian disterilisasi terlebih dahulu menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Pembuatan Media, Pemiakan dan Preparasi Sampel Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

Media Lowenstein-Jensen dibuat dengan cara melarutkan garam-garam, L-Asparagin dan *potato meal* dalam 600 mL akuades, lalu ditambahkan 12 mL gliserol, dan 20 mL larutan *malachite green* 2%. Setelah tercampur sempurna, media disterilkan dalam otoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C kemudian didinginkan sampai suhu 50⁰C. Setelah dingin ditambahkan 1L telur yang telah dihomogenkan, diaduk secara perlahan untuk menghindari terbentuknya gelembung. Sebanyak 6-8 mL media dituangkan ke dalam botol McCartney steril kemudian botol ditutup dengan longgar dan letakkan pada kemiringan 30⁰.

Bakteri dibiakkan dengan cara memipet 100 µl sedimen ke dalam media Lowenstein-Jensen kemudian botol ditutup, tetapi jangan terlalu rapat. Sampel disebarkan secara merata di atas permukaan

media dengan cara menggerak-gerakkan botol. Botol-botol diletakkan pada rak dengan kemiringan 30⁰ selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 35-37⁰C. Setelah 24 jam, tutup botol dikencangkan dan diletakkan pad arak tabung dengan posisi tegak dan inkubasi dilanjutkan.

Preparasi sampel bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan dengan beberapa metode, yaitu :

a. Preparasi dengan pemanasan

Hasil biakan bakteri di dalam botol McCartney dipindahkan ke dalam tabung falcon 15 mL lalu ditambahkan larutan NaCl fisiologis. Larutan NaCl fisiologis yang berisi bakteri dipanaskan pada suhu 95°C selama 30 menit lalu dilisis menggunakan *ultrasonic bath* Elma T 60H dengan frekuensi 35 kHz selama 15 menit untuk inaktivasi sel kemudian dipisahkan menggunakan *Biocontained-centrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pelet dan supernatan dipisahkan. Seluruh prosedur inokulasi sampai proses lisis bakteri dilakukan dalam *Biological safety cabinet* kelas III.

b. Preparasi dengan sonikasi

Sebelum bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dilisis menggunakan sonikator, biakan bakteri dalam media Lowenstein-Jensen dipindahkan ke dalam tabung falcon 50 mL, diresuspensikan dalam *phosphate buffer saline* sebanyak 20 mL kemudian dilakukan lisis menggunakan sonikator dengan frekuensi 35 kHz selama 15 menit. Hasil lisis disentrifugasi dengan kecepatan

3000 rpm selama 10 menit. Pelet dan supernatan dipisahkan.

Pemisahan dengan Dialisis

Massa yang terbentuk dari lisis sampel dengan pemanasan dan sonikasi kemudian masing-masing didialisis menggunakan membran selofan. Membran selofan dipotong sesuai dengan kebutuhan dan dikembangkan terlebih dahulu dengan menggunakan Na₂EDTA. Membran dibilas dengan akuades dan diisi dengan massa sel. Membran selofan yang telah terisi oleh massa dimasukkan ke dalam *phosphate buffer saline* pH 7,4 diaduk dengan bantuan *magnetic stirrer* selama 30 menit. Hasil dari dialisis disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, pelet, dan supernatan dipisahkan.

Analisis dengan spektrofotometri FT-IR

Pelet dan supernatan yang diperoleh dari hasil preparasi sampel kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer FT-IR pada rentang 4000 cm⁻¹ dan 600 cm⁻¹.

HASIL DAN PEMBAHASAN

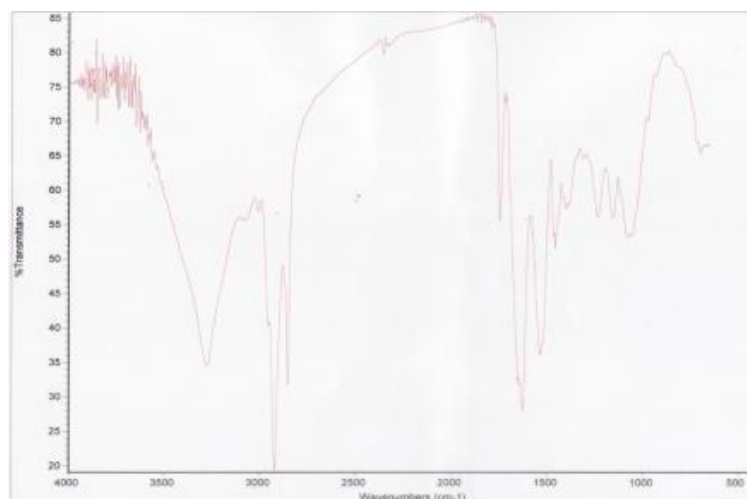
Analisis spektrofotometri FT-IR dilakukan terhadap sampel pelet (Gambar 1) dan supernatan (Gambar 2) hasil lisis sel bakteri *Mycobacterium tuberculosis* melalui proses pemanasan dan sonikasi.

Berdasarkan hasil analisis FT-IR pada Tabel 1 dan Tabel 2, muncul serapan yang *repeatable* pada wilayah 4000 cm⁻¹ sampai 600 cm⁻¹.

Serapan yang muncul di sekitar 2921 cm⁻¹ menunjukkan *Asymmetric stretching* C-H dari asam lemak. Serapan yang muncul di sekitar 2852 cm⁻¹ menunjukkan regang simetris dari CH₂ diduga sebagian besar berasal dari asam lemak dan sebagian kecil berasal dari protein yang terbentuk dari membran dalam dinding sel. Sidik jari sampel pelet bakteri *Mycobacterium tuberculosis* hasil lisis terdapat di sekitar 697 cm⁻¹ sedangkan pada sampel supernatan berada di sekitar 666 cm⁻¹ (Naumann, 2000).

Spektrum dari sampel hasil dialisis menggunakan selofan dilakukan terhadap sampel dari dua preparasi yang berbeda, yaitu lisis menggunakan pemanasan (Gambar 3) dan sonikasi (Gambar 4).

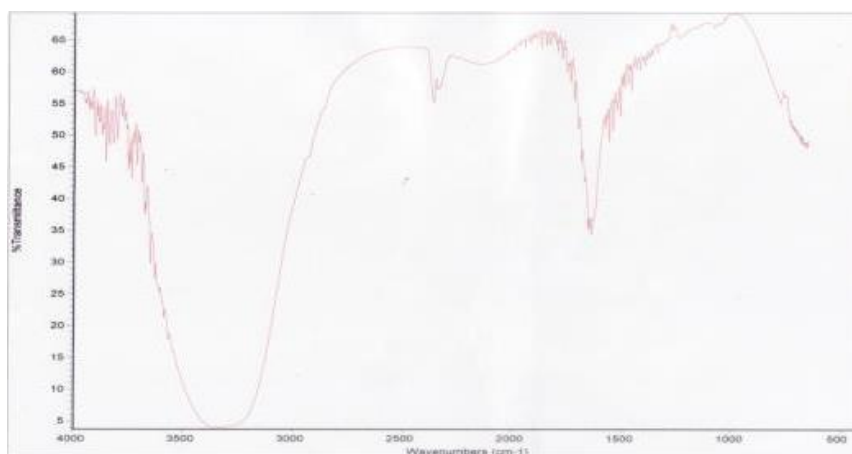
Spektrum serapan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dianalisis pada rentang bilangan gelombang 4000 cm⁻¹ dan 600 cm⁻¹. Daerah serapan dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4. Serapan muncul disekitar 3616 cm⁻¹ menunjukkan *free-OH absorption band* dari asam mikolat (Toubiana *et al.*, 1979). Serapan yang muncul disekitar 2922 cm⁻¹ menunjukkan *asymmetric stretching* C-H dari asam lemak (Dieter Naumann, 2000). Serapan yang muncul disekitar 2852 cm⁻¹ menunjukkan adanya regang simetris dari CH₂ diduga sebagian besar berasal dari asam lemak dan sebagian kecil berasal dari protein serta karbohidrat yang terbentuk dari membran dalam dinding sel bakteri (Naumann, 2000).



Gambar 1. Spektrum FT-IR sampel pelet *Mycobacterium tuberculosis*

Tabel 1. Daerah serapan FT-IR sampel pelet *Mycobacterium tuberculosis*

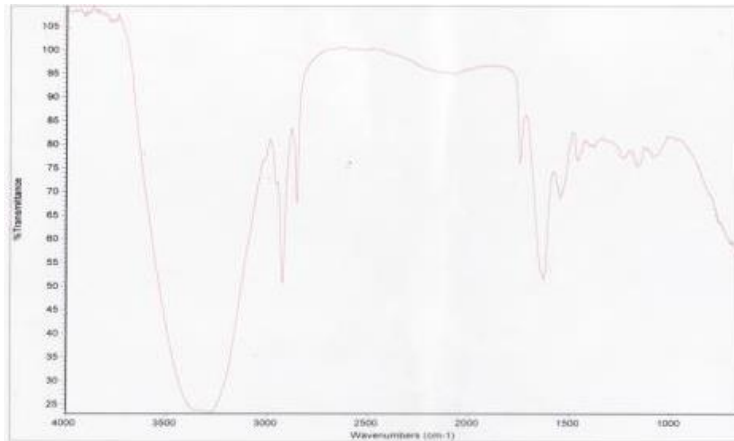
Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
3625	Regang N-H dari protein (Mariswamy <i>et al.</i> , 2012)
3616	<i>Free -OH absorption band</i> dari asam mikolat (Toubiana <i>et al.</i> , 1979)
3274	<i>Stretching</i> N-H dari protein (Mauer & Davis, 2010)
2921	<i>Asymmetric stretching</i> C-H dari asam lemak (Naumann, 2000)
2852	Regang simetris CH ₂ dari asam lemak dan protein (Naumann, 2000)
1625	<i>Bending</i> NH ₃ dari asam amino (Barth, 2000)
1455	<i>Bending</i> CH ₃ dari asam amino (Barth, 2000)
1233	<i>Asymmetric stretching</i> P=O dari phosphodiester (Naumann, 2000)
1156	<i>Vibrations</i> C-O-C, C-O dari karbohidrat (Naumann, 2000)
697	<i>Fingerprint</i>



Gambar 2. Spektrum FT-IR sampel supernatan *Mycobacterium tuberculosis*

Tabel 2. Daerah serapan FT-IR sampel supernatan *Mycobacterium tuberculosis*

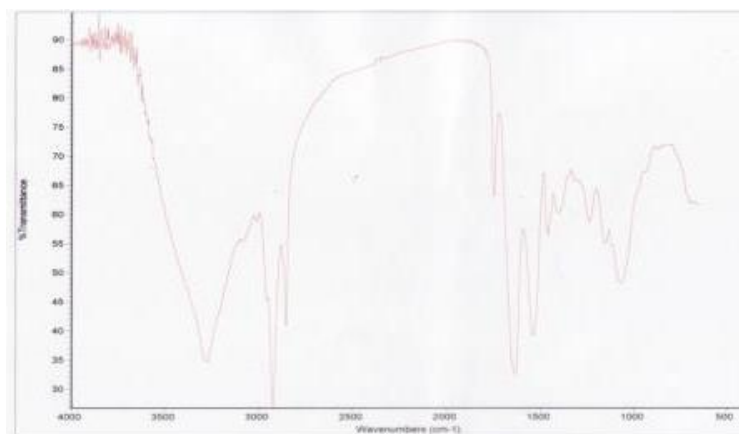
Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
3343	<i>Stretching</i> N-H dari protein (Mauer & Davis, 2010)
2923	<i>Asymmetric stretching</i> C-H dari asam lemak (Naumann, 2000)
2853	Regang simetris CH ₂ dari asam lemak dan protein (Naumann, 2000)
1715	<i>Stretching</i> C=O dari ester, asam nukleat (Naumann, 2000)
1635	Regang C=O komponen amida I dari protein (Al-Qadiri, 2008)
1240	<i>Asymmetric stretching</i> P=O dari phospholipids (Maurer & Davis, 2010)
666	<i>Fingerprint</i>



Gambar 3. Spektrum FT-IR sampel dialisis *Mycobacterium tuberculosis* hasil pemanasan

Tabel 3. Daerah serapan FT-IR sampel dialisis *Mycobacterium tuberculosis* hasil pemanasan

Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
2922	<i>Asymmetric stretching</i> C-H dari asam lemak (Naumann, 2000)
2852	Regang simetris CH ₂ dari asam lemak dan protein (Naumann, 2000)
1743	<i>Stretching</i> C=O dari ester lemak (Maurer & Davis, 2010)
1625	<i>Bending</i> NH ₃ dari asam amino (Barth, 2000)
1545	Regang C-N dan N-H <i>bending</i> komponen amida II dari protein (Naumann, 2000)
1162	<i>Vibrations</i> C-O-C, C-O dari karbohidrat (Naumann, 2000)
1082	Fosfat dan gula (Heryanto, 2005)
694	<i>Fingerprint</i>



Gambar 4. Spektrum FT-IR sampel dialisis *Mycobacterium tuberculosis* hasil sonikasi

Tabel 4. Daerah serapan FT-IR sampel dialisis *Mycobacterium tuberculosis* hasil sonikasi

Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
3616	<i>Free-OH absorption band</i> dari asam mikolat (Toubiana <i>et al.</i> , 1979)
3274	<i>Stretching</i> N-H dari protein (Maurer & Davis, 2010)
2922	<i>Asymmetric stretching</i> C-H dari asam lemak (Naumann, 2000)
2852	Regang simetris CH ₃ dari asam lemak dan protein (Naumann, 2000)
1743	<i>Stretching</i> C=O dari ester lemak (Maurer & Davis, 2010)
1628	<i>Bending</i> NH ₃ dari asam amino (Barth, 2000)
1234	<i>Asymmetric stretching</i> P=O dari fosfodiester (Naumann, 2000)
697	<i>Fingerprint</i>

Serapan di sekitar 1743 cm^{-1} menunjukkan *stretching* C=O dari ester lemak (Maurer & Davis, 2010). Serapan yang muncul disekitar 1628 cm^{-1} menunjukkan *bending* NH_3 dari asam amino (Barth, 2000) yang berasal dari peptidoglikan di dinding sel. Serapan yang muncul disekitar 1234 cm^{-1} menunjukkan *asymmetric stretching* P=O dari phosphodiester (Naumann, 2000) dan sidik jari sampel bakteri *Mycobacterium tuberculosis* hasil dialysis berada di sekitar 697 cm^{-1} .

SIMPULAN

Dari hasil analisis spektrum FT-IR pada bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, terdapat kesamaan pola spektrum bakteri *Mycobacterium tuberculosis* hasil lisis menggunakan pemanasan maupun sonikasi yang ditandai dengan munculnya *free-OH absorption band*, regang simetris CH_2 , *bending* NH_3 , *bending* CH_3 , dan *asymmetric stretching* P=O.

Analisis pada sampel hasil dialisis *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan spektrofotometri FT-IR melalui pemecahan sel menggunakan pemanasan dan sonikasi menunjukkan perbedaan dengan munculnya amida II dan vibrasi C-O-C, C-O hanya pada sampel dialisis melalui pemanasan serta *free-OH absorption band* dari asam mikolat yang merupakan spektrum khas dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis* hanya muncul pada spektrum sampel hasil

dialisis melalui pemecahan sel menggunakan sonikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Qadiri, H.M., Lin, M., Al-Holy, M.A., Cavinato, A.G., Rasco, B.A. 2008. "Detection of Sublethal Thermal Injury in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and *Listeria monocytogenes* Using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy ($4000\text{ to }600\text{ cm}^{-1}$)". *Journal of Food Science*. 73(2) : M54-61.
- Barth, A. 2000. "The Infrared Absorption of Amino Acid Side Chains." *Biophys. J* 74: 141-173.
- Chagas, M. da Silva, R.M., Bazzo, M.L. and dos Santos, J.I. 2010. "The use of polymerase chain reaction for early diagnosis of tuberculosis in *Mycobacterium tuberculosis* culture." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 43(6): 543-548.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Pedoman Nasional : Penanggulangan Tuberkulosis*. Cetakan ke-2. Jakarta: Depkes RI. Hal. 8-14.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. London: Williams & Wilkins. p. 695-698.
- Kementerian Kesehatan RI. 2015. *Standar Pelayanan Laboratorium Tuberkulosis*.

- Jakarta: Kementerian Kesehatan RI. Hal. 10-12.
- Kenyorini, K., Suradi, S., Surjanto, E. 2006. Uji Tuberkulin. *Jurnal Tuberkulosis Indonesia*. 3(2) : 1-5.
- Mariswamy, Y., Gnanaraj, W.E. Antonisamy, J.M. 2012. "FTIR Spectroscopic Studies on *Aerva Lanata* (L.) Juss. Ex Schult". *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 5(2): 82-86.
- Mauer, L.J. and Davis, R. 2010. "Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy : A Rapid Detection and Analysis of Foodborne Pathogenic Bacteria." *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2 : 1582-1594.
- Naumann, D. 2000. Infrared Spectroscopy in Microbiology. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R.A. Meyers (Ed.). Chichester : John Wiley & Sons Ltd. p. 102–131.
- Poeloengan, M., Komala, I., Noor, S.M. 2007. "Bahaya dan penanganan TBC." *Prosiding Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis*. Hal. 207-215.
- Saptawati L., Mardiasuti, Karuniawati, A., Rumende, C.M. 2012. "Evaluasi Metode Fast Plaque TBTM untuk Mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* pada Sputum di Beberapa Unit Pelayanan Kesehatan di Jakarta - Indonesia." *Jurnal Tuberkulosis Indonesia*. 8: 1-6.
- Stuart & Barbara. 2004. *InfraRed Spectroscopy : Fundamental and Application*. Jhon Wiley & Sons, Ltd. p. 137.
- Toubiana, R., Berlan, J., Sato, H., and Strain, M. 1979. "Three Types of Mycolic Acid from *Mycobacterium tuberculosis* Brevanne : Implications for Structure-Function Relationships in Pathogenesis". *Journal of Bacteriology* : 205-211.