

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI	vi
PRAKATA.....	vii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xvii
INTISARI.....	xx
ABSTRACT.....	xxii
BAB I PENDAHULUAN.....	24
A. Latar Belakang	24
B. Permasalahan.....	28
C. Tujuan.....	29
D. Manfaat Penelitian.....	30
E. Keaslian Penelitian.....	31
F. Ruang Lingkup Penelitian.....	32
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	33
A. Tinjauan Pustaka	33
1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	33
2. Gambaran Pneumonia di Indonesia	36
3. <i>Whole genome sequencing S. pneumoniae</i>	37
4. Resistensi Antibiotik pada <i>S. pneumoniae</i>	40
5. Struktur dan Fungsi Kapsul Polisakarida (CPS) <i>S. pneumoniae</i>	50
6. Metode <i>CRISPR/Cas9 Targeted sequencing</i>	58
7. Bioinformatika	62
B. Kerangka Teori.....	64
C. Landasan Teori.....	65
BAB III METODE PENELITIAN.....	69
A. Tempat Penelitian dan Waktu Penelitian	69
B. Alat.....	69

C. Bahan.....	69
1. Sampel Penelitian.....	69
2. Bahan Kimia.....	74
D. Rancangan Penelitian dan Alur Penelitian	75
1. Analisis transposon dan resistensi antibiotik dari Data WGS <i>S. pneumoniae</i>	76
2. Pengembangan Metode Identifikasi Serotipe <i>S. pneumoniae</i>	77
E. Cara Kerja	78
1. Pembuatan Medium <i>Blood Agar Plate</i> (BAP).....	78
2. Kultur Bakteri <i>S. pneumoniae</i>	78
3. Uji Kepekaan Terhadap <i>Optochin</i> dan Persiapan Isolasi DNA	78
4. Isolasi DNA Genom <i>S. pneumoniae</i>	80
5. WGS <i>S. pneumoniae</i>	81
6. Pengembangan Metode Identifikasi Serotipe <i>S. pneumonaie</i> dengan Metode <i>CRISPR/Cas9 Targeted Sequencing</i>	89
7. Pengembangan <i>Pipeline</i> untuk Identifikasi Serotipe <i>S. pneumoniae</i> dengan menggunakan data <i>CRISPR/Cas9 Targeted Sequencing</i>	99
8. Validasi Hasil Sekuensing Metode <i>CRISPR/Cas9 Targeted Sequencing</i>	100
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	102
A. Gambaran Umum Genom <i>S. pneumoniae</i> Isolat Indonesia	102
B. Identifikasi Resistensi Antibiotik pada <i>S. pneumoniae</i>	105
C. Identifikasi Serotipe (<i>Serotyping</i>) <i>S. pneumoniae</i> Berdasarkan Data WGS Illumina	106
D. Identifikasi Jenis Transposon pada <i>S. pneumoniae</i> Berdasarkan Data WGS	107
D.1 Tn916	110
D.2 Tn5253	115
D.3 Tn6002	120
D.4 Tn2009 dan Tn2010	125
E. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (<i>Minimum Inhibitory Concentration/MIC</i>) pada Serotipe 19F	131
F. Mekanisme Resistensi Makrolida	136

F.1	<i>Alignment</i> Gen <i>mefA</i> dan Asam Amino <i>mefA</i>	139
F.2	Karakteristik Protein Makrolida-efluks.....	141
F.3	Struktur Protein Protein Makrolida-efluks.....	142
F.4	<i>Molecular Docking</i> <i>mefA</i> dan Eritromisin	144
F.5	<i>Molecular Dynamics Simulation</i> (MDS) Efluks yang disebabkan oleh Protein makrolida-efluks	145
F.6	Hasil <i>Molecular Dynamics Simulation</i> Protein Makrolida-efluks	146
G.	Pengembangan Metode Identifikasi Serotipe <i>S. pneumoniae</i> Berbasis CRISPR/Cas9 Targeted Sequencing	150
G.1	Pemilihan Target dan Desain <i>crRNA</i>	151
G.2	<i>Ligation Sequencing</i> gDNA - Cas9 Enrichment dan Multiplexing	153
H.	Pengembangan Pipeline Bioinformatika	157
H.1	Hasil Identifikasi Serotipe <i>S. pneumoniae</i> dengan CRISPR/Cas9 Targeted Sequencing	158
H.2	Perbandingan Lokus <i>cps</i> <i>S. pneumoniae</i> dari Data WGS dan CRISPR/Cas9 Targeted Sequencing.....	159
BAB V	PEMBAHASAN UMUM	165
BAB VI	SIMPULAN DAN SARAN.....	175
A.	Simpulan.....	175
B.	Saran.....	176
RINGKASAN		177
SUMMARY		181
DAFTAR PUSTAKA		185
DAFTAR LAMPIRAN		210

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Karakter morfologis <i>S. pneumoniae</i>	34
Gambar 2. Skematik sel pneumokokus dan faktor virulensi pneumokokus	35
Gambar 3. Proporsi penyebab kematian neonatal dan balita di Indonesia	37
Gambar 4. Model sirkuler kromosom <i>S. pneumoniae</i> AP200.	39
Gambar 5. Gambaran umum pergerakan transposon konjugasi	42
Gambar 6. <i>Mobile element</i> penyebab resistensi makrolida pada pneumokokus...	44
Gambar 7. Struktur eritromisin	48
Gambar 8. Struktur eritromisin yang berikatan dengan ribosom subunit besar 50S <i>Deinococcus radiodurans</i> (PDB ID: 1JZY)	49
Gambar 9. Perbandingan stuktur <i>cps</i> serotipe 9A, 9V, 9L, 9N.....	53
Gambar 10. Ribonucleoprotein complex (RNP).....	59
Gambar 11. Kerangka teori	65
Gambar 12. <i>Per base sequence quality</i>	71
Gambar 13. <i>Per sequence quality scores</i>	72
Gambar 14. <i>Per base sequence content</i>	73
Gambar 15. <i>Per Sequence GC Content</i>	74
Gambar 16. Alur penelitian analisis transposon	76
Gambar 17. Alur penelitian pengembangan metode identifikasi serotipe	77
Gambar 18. Morfologi pertumbuhan <i>S. pneumoniae</i> pada agar darah	79
Gambar 19: <i>Grid</i> untuk proses <i>molecular docking</i> antara protein makrolida-efluks dan eritromisin.....	85
Gambar 20. Prediksi orientasi protein makrolida-efluks pada membran.....	86
Gambar 21. Membran kompleks hasil membrane builder yang terdiri atas DPPE, DPPG dan PMCL1	87
Gambar 22. Membran kompleks setelah penambahan molekul air (TIP3)	88
Gambar 23. Desain probe <i>crRNA</i>	90
Gambar 24. Alur kerja PneumoCRISPR.....	100
Gambar 25. Visualisasi genom melingkar <i>S. pneumoniae</i> isolat Indonesia	103
Gambar 26. Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs).....	104
Gambar 27. Prediksi resistensi tetrasiklin, kloramfenikol dan makrolida berdasarkan Pathogenwatch.	106
Gambar 28. Distribusi serotipe dari 90 isolat <i>S. pneumoniae</i>	107
Gambar 29. Jenis-jenis Tn yang berkaitan dengan resistensi antibiotik serta distribusi Tn pada serotipe-serotipe <i>S. pneumoniae</i>	109
Gambar 30. Jaringan (<i>network</i>) antara transposon dan serotipe	110
Gambar 31. Struktur Tn916 yang membawa gen <i>tetM</i>	111
Gambar 32. Posisi integrasi Tn916 pada genom <i>S. pneumoniae</i>	114

Gambar 33. Perbandingan Tn5253 (EFU09422) dengan transposon pada isolat MA096A, MA0126A, dan MA015B.	115
Gambar 34. Struktur Tn5253	117
Gambar 35. Organisasi genetik gen <i>iga</i> dan <i>rbgA</i> pada <i>S. pneumoniae</i>	118
Gambar 36. Integrasi Tn5253 ke dalam genom <i>S. pneumoniae</i>	120
Gambar 37. Struktur Tn6002 yang membawa gen <i>tetM</i> dan <i>ermB</i>	121
Gambar 38. Posisi integrasi Tn6002 pada genom <i>S. pneumoniae</i>	124
Gambar 39. Perbandingan Tn2009 dengan Tn2010 (AB426620).	126
Gambar 40. Perbandingan Tn2010 (nomor akses AB426620)	127
Gambar 41. Struktur genetik ORF penyandi <i>Bacteriocin-associated integral membrane protein</i> pada <i>Streptococcus pneumoniae</i>	130
Gambar 42. Integrasi transposon Tn2009 dan Tn2010 dalam genom <i>S. pneumoniae</i>	131
Gambar 43. <i>Heatmap</i> dari nilai MIC (dalam skala log ₂).	136
Gambar 44. Struktur 2009 dan Tn2010	138
Gambar 45: <i>Multiple alignment</i> gene <i>mefA</i> <i>S. pneumoniae</i> isolate Indonesia	140
Gambar 46. Multiple alignment sekuen asam amino <i>mefA</i>	141
Gambar 47. Topologi protein makrolida-efluks pada membran sel	142
Gambar 48. Homologi modeling protein makrolida-efluks dengan menggunakan Swiss Model	143
Gambar 49. Karakteristik protein makrolida-efluks	144
Gambar 50: Hasil <i>molecular docking</i> eritromisin dan protein makrolida-efluks	145
Gambar 51. RMSD protein makrolida-efluks.....	147
Gambar 52. RMSF protein makrolida-efluks.....	148
Gambar 53. Visualisasi hasil MDS selama 28,5 ns	150
Gambar 54. Posisi probe <i>Cas9</i> pada lokus <i>cps</i>	152
Gambar 55. Posisi probe <i>Cas9</i> di lokus <i>cps</i>	153
Gambar 56. Perbandingan antara alur kerja sampel tunggal dan multi sampel ..	155
Gambar 57. Grafik ukuran basa setiap barcode	156
Gambar 58. Perbandingan data dari 22 hasil sekuensing <i>S. pneumoniae</i> menggunakan metode <i>CRISPR/Cas9 Targeted sequencing</i>	156
Gambar 59. <i>Mapping reads</i> Isolate MA0134A terhadap serotipe 35C	160
Gambar 60. Hasil perbandingan isolat MA0134A dengan serotipe 35A, 35C, dan 42 menggunakan BlastP.	161

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Keaslian dan Kebaharuan penelitian.....	32
Tabel 2. Karakteristik umum genom <i>S. pneumoniae</i> AP200	38
Tabel 3 Perbandingan beberapa metode identifikasi serotipe <i>S. pneumoniae</i> yang umum digunakan.	57
Tabel 4. Karakterisasi dan profil kerentanan antimikroba dari isolat <i>S. pneumoniae</i> serotipe 19F yang diperoleh dari beberapa wilayah di Indonesia.	133
Tabel 5. Desain crRNA pada lokus <i>cps S. pneumoniae</i>	153
Tabel 6. Perbandingan hasil identifikasi serotipe <i>S. pneumoniae</i> pada Illumina dan ONT.....	159

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data umum ke-90 isolat <i>S. pneumoniae</i> asal Indonesia	210
Lampiran 2. <i>Script Pipeline</i>	214
Lampiran 3. <i>Quality Control</i> ke-90 data WGS isolate <i>S. pneumoniae</i> asal Indonesia	216
Lampiran 4. Kode NCBI <i>Sequence Read Archive</i> (SRA), Bioproject dan Biosample dari 90 data WGS isolat yang disekuensing dengan <i>platform</i> Illumina	221
Lampiran 5. Kode NCBI <i>Sequence Read Archive</i> (SRA), Bioproject dan Biosample dari 22 data isolat yang disekuensing dengan metode <i>Cas9 Targeted</i> sekuensing pada <i>platform</i> ONT	223
Lampiran 6 . Hasil <i>assembly</i> secara <i>de novo</i> data WGS ke 90 isolat.....	224
Lampiran 7 . Hasil anotasi data WGS ke 90 isolat	226
Lampiran 8 . Hasil klasifikasi taksonomi data WGS ke 90 isolat.....	228
Lampiran 9 . Hasil mapping terhadap genom referensi data WGS ke 90 isolat terhadap <i>S. pneumoniae</i> R6	230
Lampiran 10 . QC hasil sekuensing dengan ONT.....	232
Lampiran 11. <i>Script</i> untuk Visualisasi Cluster Gen Penyusun Transposon.....	233
Lampiran 12. Dokumentasi Penelitian di Laboratorium Pusat Sekuensing Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)	235