

BIOINFORMATIKA SEBAGAI METODE AWAL ANALISIS PREKURSOR PEPTIDOGLIKAN ENDOPEPTIDASE PADA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Maharani Pertiwi Koentjoro^{1*} dan Endry Nugroho Prasetyo²
Fakultas Kesehatan, Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya, Surabaya*
Departemen Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya²
*E-mail: maharani@unusa.ac.id

Abstract

Mycobacterium tuberculosis has a cell membrane sheath which plays an important role in the pathological process, namely the plasma membrane, cell wall, and capsules. Peptidoglycan (PG) are one of the cell wall components that specifically functions in the formation of cell structures and osmotic protection, consequently it becomes the target of antibacterial drugs. β -lactam antibiotics, such as penicillin, inhibit PG biosynthesis caused cell death. The formation of PG is regulated by a series of ripA and ripB protein coding genes. This study aims to apply bioinformatics under DNA-based molecular technique to design primers that is capable to detecting and characterizing the *M. tuberculosis* ripA gene. In this study, step 1 begins on the collection of *M. tuberculosis* H37rv isolates, total genome extraction through the CTAB method. Step 2 are the design and analysis of primers, amplification of DNA fragments, detection of PCR products, sequencing of nucleotides and characterization of ripA genes with the MEGA5 program. The ripA gene primary design was carried out using a database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and the primer-BLAST program. From the results of sequence analysis with phylogenetic analysis (BLAST), it was obtained that the ripA gene has an amplification length of 912 bp and 100% of genes derived from *M. tuberculosis*. The result of gene analysis showed that bioinformatics became one of the methods to manage and analyze biological data (DNA sequences and amino acids) from *M. tuberculosis*. Specific primers designed in this study are expected to be efficient for use as detection primers for the PCR.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, Peptidoglycan, ripA, Bioinformatic, Primer.

Abstrak

Mycobacterium tuberculosis memiliki selubung membran sel yang berperan penting dalam proses patologis, yaitu plasma membran, dinding, dan kapsul. Peptidoglikan (PG) menjadi salah satu komponen dinding sel yang secara khusus berfungsi dalam pembentukan struktur dan perlindungan osmotik sel, sehingga menjadi target obat antibakteri. Antibiotik β -laktam, seperti penisilin, menghambat biosintesis PG yang menimbulkan kematian sel. Pembentukan PG diatur oleh serangkaian gen penyandi protein ripA dan ripB. Penelitian ini bertujuan mengaplikasikan teknik bioinformatika berbasis DNA molekuler untuk merancang primer yang mampu mendeteksi dan mengkarakterisasi gen ripA *M. tuberculosis*. Tahapan penelitian dimulai dari tahap 1, yaitu koleksi isolat *M. tuberculosis* H37rv,

ekstraksi total genom melalui metode CTAB. Tahap 2 yaitu desain dan analisis primer, amplifikasi fragmen DNA, deteksi produk PCR, sekuensing nukleotida dan karakterisasi gen ripA dengan program MEGA5. Desain primer gen ripA dilakukan menggunakan database dari National Center for Biotechnology Information (NCBI) dan program primer-BLAST. Analisis data secara deskriptif dengan melihat hasil dari proses ekstraksi DNA, amplifikasi DNA, elektroforesis, sekuensing DNA, penyejajaran sekuens (sequence alignment) untuk menentukan analisis filogenetik. Gen ripA yang diperoleh memiliki panjang amplifikasi 912 bp. Analisis BLAST menunjukkan 100% gen berasal dari M. tuberculosis. Hasil analisis menunjukkan bahwa bioinformatika menjadi salah satu metode dalam mengelola dan menganalisis informasi biologis (sekuens DNA dan asam amino) dari M. tuberculosis. Primer spesifik yang dirancang dalam penelitian ini diharapkan efisien untuk digunakan sebagai marka deteksi dengan PCR.

Kata kunci: *Mycobacterium tuberculosis, Peptidoglikan, ripA, Bioinformatic, Primer.*

1. PENDAHULUAN

Mycobacterium tuberculosis adalah bakteri Gram-positif yang menunjukkan karakteristik pewarnaan tahan asam, dan menjadi penyebab penyakit Tuberkulosis (TB) paru-paru. Patogenitas *M. tuberculosis* terhadap manusia disebabkan oleh selubung membran sel yang tersusun dari tiga komponen, yaitu plasma membran, dinding, dan kapsul. Dinding sel *M. tuberculosis* menyerupai dinding sel bakteri Gram positif dengan lapisan lipid ester asam mikolat, arabinogalaktan (AG), glikolipid, dan peptidoglikan (PG) yang berperan dalam fisiologis dan patogenitas (Botella et al., 2017).

PG terdiri dari untaian glycan dari N-acetylglucosamine dan asam N-acetyl/N-glycolylmuramik dengan ikatan silang interpeptida yang rapat. Struktur dinding sel ini bersifat impermeabel dan menjadikan *M. tuberculosis* dapat bertahan hidup dan berkembang biak dalam sel fagosit dan bertahan dari sistem imunitas sel inang ataupun antibiotik (Vincent et al., 2018). Lapisan PG secara khusus berfungsi dalam pembentukan struktur dan perlindungan osmotik sel, sehingga menjadi target dalam

biosintesis obat antibakteri (Chao et al., 2013).

Antibiotika golongan β -laktam merupakan antimikroba yang secara luas digunakan untuk mengendalikan infeksi *M. tuberculosis*. Sebagai contoh antibiotika penisilin mampu menghambat biosintesis dari PG dengan menonaktifkan kerja enzim pengikat penisilin (penicillin binding proteins, PBP). Enzim ini mengikat PBP yang menyebabkan sel bakteri tidak dapat menyusun selubung selnya ketika proses pembelahan sel terjadi. Antibiotika dengan kerja pengikatan PBP telah banyak dikembangkan, tetapi enzim ini kurang sensitif terhadap biosintesis peptidoglikan seperti transglukosilase dan endopeptidase.

Upaya eksploitasi dan pengembangan obat anti-*M. tuberculosis* diperlukan untuk mengatasi kelemahan antimikroba yang telah ada dan mengingat munculnya strain yang resistan terhadap obat. Dinding sel *M. tuberculosis* menjadi target sasaran pengembangan antibiotik yang tepat, karena perannya dalam pendukung proses virulensi. Lapisan PG *M. tuberculosis* disandi oleh serangkaian gen *ripA* dan *ripB* (Martinelli dan Pavelka, 2016; Botella et al., 2017).

Bagaimana peran dua protein ini dalam fisiologi dinding sel masih kurang jelas dipahami karena belum ada mutan tunggal dari kedua gen yang telah diteliti. Gen *ripA* dan *ripB* dikode oleh operon bisistronik dengan *ripA* proksimal terletak di depan promotor, yang keduanya dikendalikan oleh dua komponen sistem MtrAB.

Penelitian ini bertujuan mengaplikasikan teknik bioinformatika berbasis DNA molekuler untuk merancang primer yang mampu mendeteksi dan mengkarakterisasi gen *ripA* *M. Tuberculosis*.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

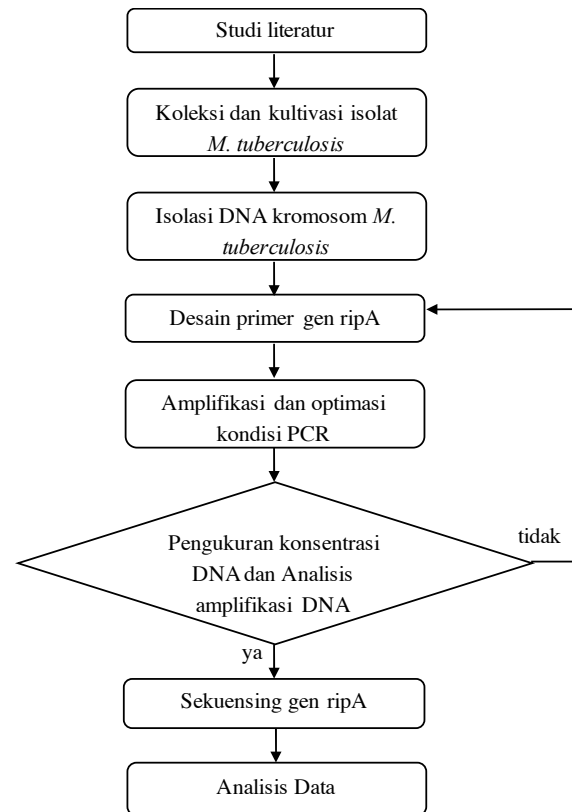
Koleksi isolat *M. tuberculosis* H37Rv diperoleh dari koleksi Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya. Isolasi total genom dan analisis molekuler sampel di Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Kesehatan–Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya. Sekuensing nukleotida sampel dengan bantuan jasa lembaga Genetica Science dilakukan di Singapura. Alur penelitian disajikan pada Gambar 1.

2.2 Koleksi, Kultivasi, dan Isolasi Total Genom Isolat *M. tuberculosis*

Isolat *M. tuberculosis* dibiakkan dalam medium agar miring Lowenstein–Jensen (BBLK) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 hari.

Isolasi total genom *M. tuberculosis* menggunakan Metode Sambrook & David, (1989). Isolat bakteri yang telah tumbuh dipanen dengan cara sentrifugasi pada 4,000 rpm di 4°C selama 5 menit. Selanjutnya, pelet yang berupa sel bakteri di cuci dengan larutan fisiologis NaCl steril 0.9%. Pelet selanjutnya dilarutkan dalam buffer TE (Tris–EDTA) 0.01 M, pH 8.0. Proses lisis sel dilakukan dengan menggunakan 1/10 volume lisozim

(10 mg/ml), diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C. Ekstraksi DNA dilakukan dengan larutan jenuh Tris–Fenol/Kloroform–Isoamilalkohol (1:1).



Gambar 1. Tahapan Penelitian

Suspensi dihomogenkan dengan cara di goyang selama 10 menit dan disentrifugasi kembali. Supernatan yang diperoleh selanjutnya dipindahkan ke tabung ependorf steril dan ditambahkan larutan klorofom dengan volume yang sama. Tabung dihomogenkan selama 5 menit. Fase air yang terbentuk dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada 10,000 rpm selama 15 menit. DNA dipresipitasi dengan penambahan 1/25 volume 5.0 M NaCl dan 2.5 volume ethanol absolut dingin. Pelet DNA dicuci 2 kali dengan etanol 70%, disentrifugasi dengan cara di atas selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan DNA dilarutkan ke dalam 10 mM buffer TE, pH 8.0. Konsentrasi DNA hasil isolasi

selanjutnya diukur secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm. DNA hasil isolasi selanjutnya di *running* dalam gel elektroforesis untuk menguji kualitasnya.

2.3 Desain Primer Gen *ripA*, Amplifikasi dan Optimalisasi Kondisi *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Desain primer akan dilakukan mengacu pada gen *ripA M. tuberculosis* dari *database GeneBank (The National Center for Biotechnology Information)* dan beberapa literatur lainnya. *Alignment* urutan DNA dilakukan menggunakan program MEGA5. Desain primer menggunakan primer-BLAST. Daerah spesifik untuk gen *ripA* diamati satu persatu agar dapat mendesain primer spesifik.

Amplifikasi gen *ripA* dilakukan menggunakan primer hasil desain. Sebanyak dua setengah mikroliter DNA sampel diamplifikasi dalam campuran 36,85 μ l H₂O, 5 μ l 10x buffer, 1 μ l MgCl₂, 4 μ l dNTP, 0,15 μ l Taq DNA polymerase dan masing-masing 0,25 μ l *primer reverse* dan *primer forward*. Amplifikasi dilakukan sebanyak 45 siklus dengan temperatur PCR 94°C selama 1 menit (denaturasi), 58°C selama 1 menit (*annealing*), 72°C selama 1 menit (elongasi). Pada akhir siklus, proses elongasi diperpanjang selama 10 menit.

Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi ditentukan dengan rumus: $[DNA] = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$. Dimana A_{260} = nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm; 50 = larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 50 μ g untai ganda DNA per ml. Kemurnian DNA diketahui dengan mengukur perbandingan rasio absorbansi (OD) pada panjang gelombang 260 dan 280 (Sambrook dan David, 1989).

DNA *M. tuberculosis* hasil amplifikasi dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarose. Gel agarose dibuat dengan menggunakan 1% (b/v) agarose yang dilarutkan dalam buffer TBE (0.09M Tris-Borate, 0.2 mM EDTA, pH 8). Sebanyak 20 μ l larutan DNA dan 2 μ l *loading buffer* (gliserol 50% dan bromofenolblue 0.025%) dimasukkan ke dalam agarose. *Marker* DNA yang digunakan adalah pUC 18 DNA *marker* (SIGMA) dan OXI74 DNA *marker* (PHARMACIA). Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan tegangan listrik 100 volt selama 60 menit. Selanjutnya lempeng agarose disinari dengan ultraviolet menggunakan UV Transilluminator. Pengambilan gambar dilakukan dengan kamera digital.

Produk PCR yang didapatkan selanjutnya disekuensing untuk dianalisis urutan basa nukleotidanya. Sekuensing dilakukan pada Lembaga Genetica Science di Singapura.

2.4 Analisis Data

Data hasil sekuensing berupa ABI file dari gen *ripA* dilakukan pengeditan secara manual menggunakan program BioEdit versi 7.0.9. Hasil pengeditan sekuens dimasukkan dalam software *nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* dari NCBI untuk melihat homologi dengan spesies terdekat.

Pohon filogenetik diperoleh dengan menggunakan Metode *Neighbor-joining*, dimana kalkulasi matrik jarak genetic dengan model Kimura-2 parameter yang diimplementasikan pada *pairwise distance calculation* dengan *Bootstrap* 1000 ulangan dalam program *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software* versi 7. Sekuen sampel yang dibandingkan dengan beberapa koleksi *GenBank M. tuberculosis*.

3. HASIL DAN DISKUSI

3.1 Isolasi DNA

Proses isolasi total genom DNA merupakan tahap mempersiapkan total DNA genom yang akan digunakan sebagai cetakan pada proses amplifikasi gen *ripA*. Hasil total genom *M. tuberculosis* yang diisolasi tidak dapat terdeteksi menggunakan elektroforesis. Hal ini dapat disebabkan konsentrasi DNA pada sampel yang terlalu rendah. Walaupun demikian, hasil pengamatan spektrofotometer menunjukkan DNA memiliki tingkat kemurnian dengan nilai 1.57. Selanjutnya, untuk membuktikan apakah sampel mengandung DNA, maka hasil isolasi digunakan sebagai cetakan PCR.

3.2 Karakterisasi Struktur dengan *X-Ray Diffraction* (XRD)

Keberhasilan dalam melakukan desain primer pada PCR ditentukan oleh analisis Bioinformatika (Robertson dan Phillips, 2008). Desain primer gen *ripA* diperoleh dari sekuens gen *ripA* *M. tuberculosis* yang

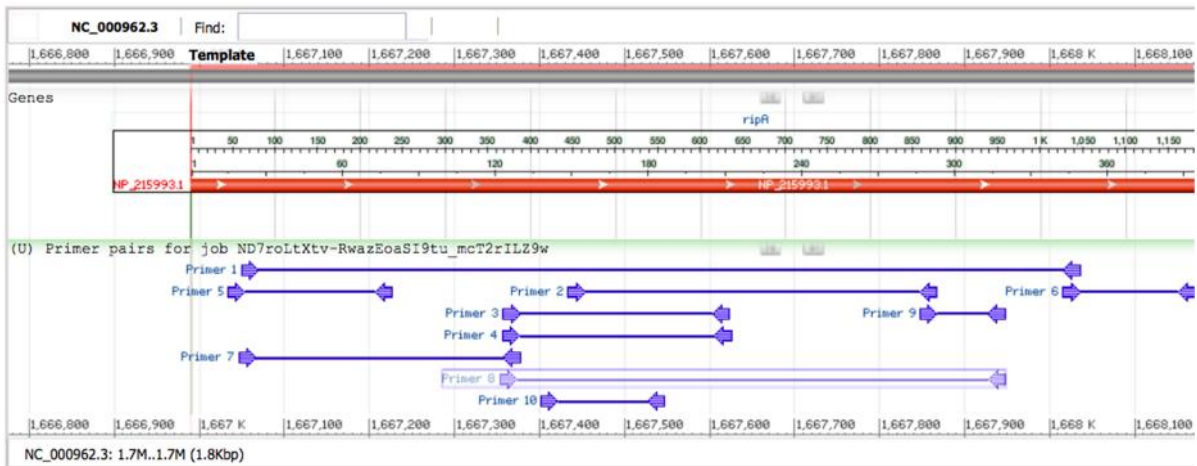
terdapat di dalam NCBI. Gambar 2 menunjukkan beberapa pasang kandidat primer. Beberapa pasang primer ini selanjutnya dipilih berdasarkan pada panjang primer, jumlah basa G dan C (*GC content*). Tabel 1, merupakan pasangan primer yang dipilih karena memiliki panjang optimal primer PCR, yaitu 20 basa, dan jumlah basa G dan C nya berkisar antara 40–60% (Ye et al., 2012). Perhitungan ini penting dalam menentukan primer, karena di dalam untai DNA, pasangan nukleotida G dan C memiliki tiga ikatan hidrogen. Sedangkan, pasangan basa A dan T memiliki dua ikatan hidrogen. Apabila jumlah basa G dan C mendekati angka 80%, maka ketika proses *melting* (suhu lele) PCR berjalan, untai ganda DNA akan sulit terpisah atau terdenaturasi. Hal ini dapat menyebabkan kegagalan proses PCR. Lorenz (2012) menyebutkan bahwa suhu ketika DNA mengalami denaturasi berperan penting dalam spesifitas dan kestabilan proses penempelan primer.

Tabel 1. Primer *ripA* Hasil Analisis

Posisi	Urutan Basa
<i>Forward</i>	5'-ATTCCGTCGGCTTTGAGTGT-3
<i>Reverse</i>	5'-CGGCGGATCACGTATTCAGA-3'

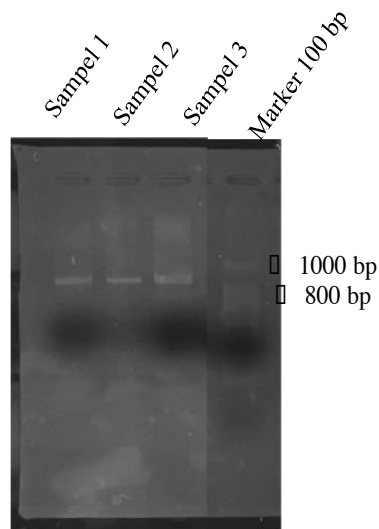
Primer yang didesain selanjutnya diuji cobakan pada sampel total genom DNA *M. tuberculosis*. Beberapa optimasi kondisi PCR dilakukan untuk memperoleh kondisi yang optimal. Jika kondisi PCR berjalan dengan baik, maka hasilnya dapat divisualisasikan

seperti yang disajikan pada Gambar 2. Elektroforesis gen *ripA* hasil PCR menunjukkan adanya pita tunggal pada beberapa sampel yang diamplifikasi dengan panjang sekitar 912 bp.



Gambar 2. Hasil Analisis Primer-BLAST Gen *ripA* *M. tuberculosis*

Semua pita pada Gambar 3 terlihat tebal, bentuk rapi dan sangat jelas. Hal ini menandakan bahwa primer dan suhu annealing yang digunakan sudah tepat. Pita berada di kisaran 912 bp, sesuai dengan analisis primer-BLAST yang dilakukan. Hasil amplifikasi ini selanjutnya diuji ke tahap sekuensing.



Sampel (mikro)	10	10	10	5
MQ water (mikro)	0	0	0	5
LD 6x	3	3	3	3
Jumlah volume	13	13	13	13

Gambar 3. Hasil Elektroforesis gen *ripA* dengan Primer Spesifik Sebanyak Tiga Pengulangan Menunjukkan Adanya Pita Tunggal. *Marker* 100 bp DNA *Ladder*.

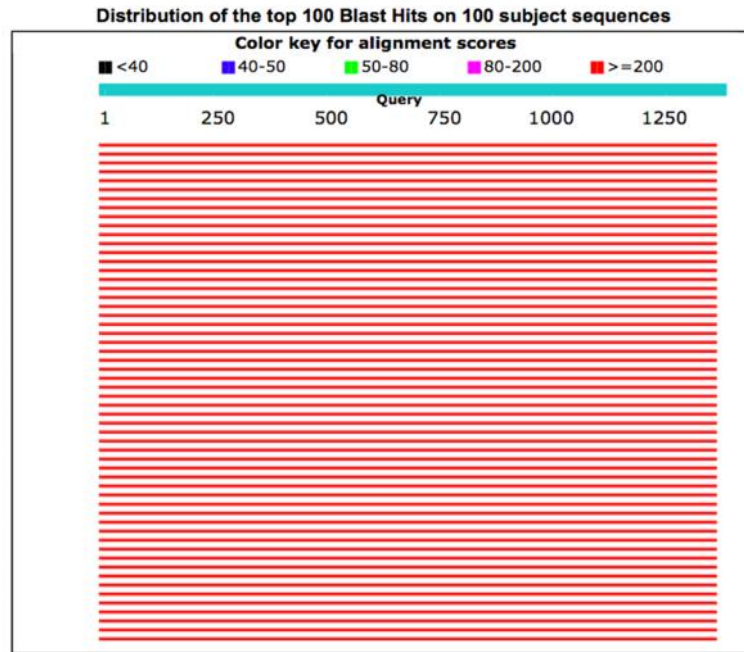
3.3 Sekuensing Hasil Amplifikasi Gen *Rip A* dan Analisis Urutan Nukleotida

Gen *ripA* merupakan protein penyusun dinding sel lapisan peptidoglikan dan menjadi bagian dari faktor virulensi pada *M. tuberculosis* (Forrellad et al., 2013). Kedua fragmen produk PCR yang disekuensing (*forward* dan *reverse*) selanjutnya dianalisis menggunakan prosedur bioinformatika. Tahap pertama adalah mengetahui kemiripan (*similarity*) sekuens sampel dengan urutan sekuens DNA yang ada di dalam NCBI.

Untuk mengetahui apakah hasil desain primer menyandi gen *ripA* *M. tuberculosis*, maka dilakukan analisis BLAST. Gambar 4 dan 5. merupakan hasil sekuensing gen *ripA* dibandingkan dengan beberapa sekuens DNA yang ada pada NCBI. Data sekuens yang didapat disejajarkan (*multiple alignment*) dengan data yang tersimpan dalam NCBI. Proses ini berfungsi untuk mencari similaritas suatu nukleotida. Analisis ini juga memberikan informasi mengenai spesies bakteri lain yang memiliki kesamaan urutan DNA dengan gen *ripA* *M. tuberculosis*. Informasi dari analisis BLAST antara lain *Score* dan *Query*. *Score* menunjukkan jumlah kemiripan segmen gen *ripA* hasil sekuensing dengan urutan *database* dari NCBI. Nilai ini

menggambarkan keakuratan nilai penjumlahan urutan nukleotida gen *ripA*. Semakin tinggi nilai *Score* yang diperoleh, maka semakin tinggi homologi dari sekuens yang didapat

(Altschul, 2005). Gambar 4 memperlihatkan bahwa distribusi urutan DNA hasil sekuensing memiliki nilai atau tingkat keakuratan tertinggi (≥ 200).



Gambar 4. Distribusi Hasil Analisis BLAST Hasil Sekuensing Gen *ripA* pada Isolat *M. tuberculosis*

Hasil pengamatan BLAST-NCBI menunjukkan bahwa 100% sekuens DNA berasal dari *M. tuberculosis*. Hal ini

menunjukkan bahwa desain *primer sensitive* untuk mengamplifikasi gen *ripA* isolat *M. tuberculosis*.

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
[-] Mycobacterium	100	15	
[-] Mycobacterium tuberculosis complex	99	14	
[-] Mycobacterium tuberculosis	72	14	Mycobacterium tuberculosis hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant bovis	9	9	Mycobacterium tuberculosis variant bovis hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG	5	7	Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. Tokyo 172	2	1	Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. Tokyo 172 hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. ATCC 35743	1	1	Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. ATCC 35743 hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. Korea 1168P	1	1	Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. Korea 1168P hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. Mexico	1	1	Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. Mexico hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. Moreau RDJ	1	1	Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. Moreau RDJ hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. Pasteur 1173P2	1	1	Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG str. Pasteur 1173P2 hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant bovis AF2122/97	1	1	Mycobacterium tuberculosis variant bovis AF2122/97 hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant caprae	1	1	Mycobacterium tuberculosis variant caprae hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant africanum	2	2	Mycobacterium tuberculosis variant africanum hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant africanum GM04 1182	1	1	Mycobacterium tuberculosis variant africanum GM04 1182 hits
[-] Mycobacterium tuberculosis variant microti	1	1	Mycobacterium tuberculosis variant microti hits
[-] Mycobacterium sp. 3/86Rv	1	1	Mycobacterium sp. 3/86Rv hits

Gambar 5. Hasil Sekuensing Gen *ripA* Dibandingkan dengan Beberapa Sekuen DNA yang Ada pada NCBI

3.4 Rekonsruksi Pohon Filogenetik

Konstruksi pohon filogenetik merupakan tahap terakhir dalam studi ini. Analisis ini diperlukan untuk menentukan

hubungan isolat *M. tuberculosis* satu dengan yang lain. Konstruksi pohon filogenetik atau dendogram dilakukan langsung dari analisis BLAST. Hasil ini diperoleh dengan

menggunakan Metode *Bootstrap* sebanyak 1000 kali ulangan.

Berdasar pada Gambar 6 diketahui isolat *M. tuberculosis* H37rv yang digunakan

memiliki kekerabatan dengan beberapa isolat *M. bovis*.



Gambar 6. Pohon Filogenetik Berdasarkan Sekuen *ripA* yang Menunjukkan Kekerabatan Isolat *M. tuberculosis*

4. KESIMPULAN

Desain primer yang diperoleh menggunakan Metode Bioinformatika berhasil mengamplifikasi gen *ripA* dengan panjang 912 bp. Analisis BLAST menunjukkan 100% gen berasal dari *M. tuberculosis*. Hasil analisis menunjukkan bahwa bioinformatika menjadi salah satu metode dalam mengelola dan menganalisis informasi biologis (sekuens DNA dan asam amino) dari *M. tuberculosis*. Primer spesifik yang dirancang dalam penelitian ini diharapkan efisien untuk digunakan sebagai marka deteksi dengan PCR.

Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah uji coba primer menggunakan sampel *M. tuberculosis* yang diperoleh dari isolat klinis.

Penghargaan/Ucapan Terima Kasih

Terimakasih disampaikan kepada Universitas Nadlatul Ulama Surabaya yang telah membiayai penelitian ini dan kepada

mahasiswi kami, Cahya Maulita dan Maulyna Megbie dari Mahasiwa D-IV Analiss Kesehatan, Fakultas Kesehatan UNUSA yang banyak membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Altschul SF. 2005. BLAST Algorithm. Encyclopedia of Life Science, John Willwy and Sons.
- Botella H, Vaubourgeix J, Lee MH, Song N, Xu W, Makinoshila H, and Glickman MS, Ehrt S. 2017. Mycobacterium tuberculosis protease MarP activates a peptidoglycan hydrolase during acid stress. The EMBO Journal, 36(4): 536–548.
- Chao MC, Kieser KJ, Minami S, Mavrici D, Aldridge BB, Fortune SM, Alber T, and Rubin EJ. 2013. Protein complexes and proteolytic activation of cell wall hydrolase RipA regulate septal resolution in Mycobacteria. PloS Pathogen, 9(2):

- doi:10.1371/journal.ppat.1003197.g008.
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffre A, Garcia JS, Morbidoni HR, Santangelo MP, Cataldi AA, Bigi F. 2013. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4(1): 3–66.
- Martinelli DJ and Pavelka MS. 2016. The *ripA* and *ripB* peptidoglycan endopeptidases are individually nonessential to *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 198(9): 1464–1475.
- Robertson, AL. and Phillips AR. 2008. Integrating PCR theory and bioinformatics into a research-oriented primer design exercise. *CBR life Sciences Education*, 7 (1): 89–95.
- Sambrook J and David WR. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Vincent AT, Nyongesa S, Morneau I, Reed MB, Tocheva EI, and Veyrier FJ. 2018. The mycobacterial cell envelope: a relict from the past or the result of recent evolution. *Frontiers in Microbiology*, 9:2341. doi: 10.3389/fmicb.2018.02341.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, and Madden TL. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13 (134): doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

HALAMAN INI SENGAJA DIKOSONGKAN