

**IDENTIFIKASI MUTASI GEN katG, inhA DAN ahpC PADA ISOLAT  
*Mycobacterium tuberculosis* RESISTEN ISONIAZID di KOTA  
MAKASSAR**

**Tesis**

**MUHAMMAD AZRON JUNAEDI  
P062202019**



**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2023**

## HALAMAN JUDUL

# IDENTIFIKASI MUTASI GEN katG, inhA DAN ahpC PADA ISOLAT *Mycobacterium tuberculosis* RESISTEN ISONIAZID di KOTA MAKASSAR

IDENTIFICATION OF GENE MUTATIONS katG, inhA AND ahpC IN  
ISONIAZID RESISTANT *Mycobacterium tuberculosis* ISOLATE in  
MAKASSAR CITY

## TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat menyelesaikan  
Program Studi Ilmu Biomedik  
dan mencapai gelar Magister Biomedik

DISUSUN DAN DIAJUKAN OLEH:  
**MUHAMMAD AZRON JUNAEDI**  
**P062202019**

## PEMBIMBING

1. Prof dr. Muh. Nasrum Massi, Sp.MK, Ph.D
2. dr. Rizalinda Sjahril, Sp.MK, M.Sc, PhD

KONSENTRASI MIKROBIOLOGI  
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR

2023

**LEMBAR PENGESAHAN TESIS**

**IDENTIFIKASI MUTASI GEN katG, inhA DAN ahpC PADA ISOLAT  
*Mycobacterium tuberculosis* RESISTEN ISONIAZID di KOTA  
MAKASSAR**

Disusun dan diajukan oleh

**MUHAMMAD AZRON JUNAEDI  
P062202019**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik  
Konsentrasi Mikrobiologi Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin pada  
tanggal 8 Maret 2023  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Sp.MK, Ph.D  
NIP. 19670910 199603 1 001

Pembimbing Pendamping

dr. Rizalinda Sjahril, Sp.MK, M.Sc., Ph.D  
NIP. 19690918 199603 2 001

Ketua Program Studi  
Ilmu Biomedik

Ir. Rahmawati, Ph.D., Sp.PD-KHOM., FINASIM  
NIP. 19680218 199903 2 002



Dekan Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin

Prof. dr. Bidu, Sp.M(K), M.Med.Ed, Ph.D  
NIP. 19564231 199503 1 00

**PERNYATAAN KEASLIAN TESIS  
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**


Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis berjudul "**IDENTIFIKASI MUTASI GEN katG, inhA DAN ahpC PADA ISOLAT *Mycobacterium tuberculosis* RESISTEN ISONIAZID di KOTA MAKASSAR**" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Sp.MK, Ph.D sebagai pembimbing utama dan dr. Rizalinda Sjahril, Sp.MK, M.Sc., Ph.D sebagai pembimbing pendamping.

Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini.

Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Indian Journal of Tuberculosis, alamat doi <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2023.03.019> dengan judul "**Detection of katG, inhA and ahpC gene mutation in clinical isolates of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Makassar City, South Sulawesi, Indonesia**".

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 18 April 2023



Muhammad Azron Junaedi

P062202019

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, berkah dan karunia Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **Identifikasi Mutasi Gen katG, inhA Dan ahpC pada Isolat *Mycobacterium tuberculosis* Resisten Isoniazid di Kota Makassar** sebagai syarat untuk memperoleh gelar magister pada program magister Ilmu Biomedik konsentrasi Mikrobiologi, Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

Awal hingga akhir menjalani kegiatan penelitian hingga penyusunan tesis tentu tak luput dari peranan berbagai pihak yang telah memberikan banyak bantuan, masukan, arahan maupun bimbingan yang sangat berharga sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D., Sp.MK(K) selaku Ketua Komisi Penasihat dan dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc, PhD selaku anggota Komisi Penasihat atas bantuan dan bimbingan yang telah diberikan, mulai dari penyusunan proposal hingga selesainya penulisan tesis ini.
2. Tim penilai/penguji Prof.dr. Rosdiana Natsir, Ph.D., Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D dan dr. Firdaus Hamid, Ph.D, Sp.MK. yang telah banyak memberikan masukan dan saran untuk penyusunan tesis ini.
3. dr. Rahmawati Minhajat, PhD, Sp.PD-KHOM selaku ketua program studi Magister Ilmu Biomedik konsentrasi Mikrobiologi yang telah memberikan arahan.
4. Kedua orang tua penulis Ayahanda Prof. Ir. H. Junaedi Muhidong, M.Sc dan Ibunda Hj. Parida Junaedi atas segala dukungan moril maupun materil selama ini kepada penulis.

5. Kepada istri tercinta Andi Alya Yusriyyah yang telah banyak membantu dan mendukung penulis dalam menyusun tesis ini.
6. Teman-teman tim riset Tuberkulosis, serta seluruh pihak lain yang telah banyak membantu penulis.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis memohon maaf bila ada kesalahan dalam penulisan tesis ini. Kritik dan saran penulis hargai demi perbaikan penulis di masa yang akan datang. Besar harapan penulis, semoga tulisan ini dapat bermanfaat dan bernilai positif bagi semua pihak yang membutuhkan.

Terima kasih

Penulis,

Muhammad Azron Junaedi

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar belakang .....	1
1.3 Hipotesis .....	4
1.4 Tujuan penelitian .....	4
1.4.1 Tujuan umum .....	4
1.4.2 Tujuan khusus .....	5
1.5 Manfaat penelitian .....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 Tuberkulosis .....	6
2.2 Epidemiologi .....	7
2.3 Proses transmisi bakteri <i>M. tuberculosis</i> .....	7
2.4 Terapi tuberkulosis .....	9
2.5 Isoniazid (INH/H) .....	11
2.6 Definisi resistensi OAT (Obat Anti Tuberkulosis) .....	12
2.7 Mekanisme resistensi Obat Anti-Tuberkulosis .....	13
2.7.1 Gen katG terhadap resisten isoniazid .....	13
2.7.2 Gen inhA terhadap resisten isoniazid .....	15
2.7.3 Gen ahpC terhadap resisten isoniazid .....	17

2.8	Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	18
2.9	Elektroforesis .....	19
2.10	Kerangka teori .....	20
2.11	Kerangka konsep.....	21
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN.....</b>		<b>22</b>
3.1	Waktu dan tempat penelitian .....	22
3.2	Rancangan penelitian .....	22
3.3	Teknik pengumpulan sampel.....	22
3.4	Alat dan bahan penelitian .....	22
3.5	Proses subkultur bakteri <i>M. tuberculosis</i> .....	23
3.6	Ekstraksi DNA metode boiling .....	23
3.7	Amplifikasi gen katG, inhA dan ahpC dengan metode PCR .....	24
3.8	Pendeteksian hasil PCR menggunakan elektroforesis gel agarosa	24
3.9	Teknik penyajian data/analisis data .....	25
3.10	Alur penelitian .....	25
3.11	Definisi operasional .....	26
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>28</b>
4.1	Posisi pelekatan primer terhadap genome <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	28
4.2	Hasil amplifikasi gen katG, inhA dan ahpC dengan MAS-PCR .....	29
<b>BAB 5 PENUTUP .....</b>		<b>35</b>
5.1	Kesimpulan .....	35
5.2	Saran .....	35
<b>LAMPIRAN .....</b>		<b>42</b>



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1.</b> Pewarnaan Ziehl-Neelsen pada bakteri <i>M. tuberculosis</i> (Dubei et al, 2012).....	6
<b>Gambar 2.</b> Senyawa tatalaksana obat lini pertama terapi tuberkulosis (Hoagland dkk., 2016).....	9
<b>Gambar 3.</b> Proses pembentukan <i>isonicotinic acyl</i> -NADH dan aktivasi dari INH (Ma et al., 2007).....	12
<b>Gambar 4.</b> Protein katG pada Keadaan polimorfisme yang diidentifikasi pada <i>M. tuberculosis</i> resisten isoniazid .....	15
<b>Gambar 5.</b> Proses terjadinya mutasi pada lokus <i>inhA</i> di isolate <i>M. tuberculosis</i> resisten INH serta resisten ETH. (Ramaswamy dan Musser, 1998). .....	16
<b>Gambar 6.</b> Gambaran skematik struktur senyawa <i>inhA</i> dalam penggantian asam amino (Ramaswamy dan Musser, 1998). .....	17
<b>Gambar 7.</b> Kerangka teori .....	20
<b>Gambar 8.</b> Kerangka konsep.....	21
<b>Gambar 9.</b> Alur penelitian.....	25
<b>Gambar 10.</b> Hasil amplifikasi gen <i>katG</i> , <i>inhA</i> dan <i>ahpC</i> dengan MAS-PCR	30

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 1.</b> Kelompok obat anti-TB (Zumla dkk., 2013) .....	10
<b>Tabel 2.</b> Primer inhA, katG dan ahpC .....	24
<b>Tabel 3.</b> Definisi operasional .....	26
<b>Tabel 4.</b> Pelekatan dan posisi primer inhA, katG dan ahpC pada genome <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	28
<b>Tabel 5.</b> Distribusi resistensi pada isolat klinis <i>M. tuberculosis</i> resisten isoniazid (INH) .....	31
<b>Tabel 6.</b> Distribusi mutasi gen InhA, KatG dan AhpC pada isolat klinis <i>Mycobacterium tuberculosis</i> resisten isoniazid (INH).....	32
<b>Tabel 7.</b> Sensitivitas dan Spesifisitas MAS-PCR dalam mendeteksi mutasi gen InhA, KatG dan AhpC pada isolat klinis <i>M. tuberculosis</i> resisten isoniazid (INH) .....	33

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Hasil Amplifikasi Gen katG, inhA, dan ahpC .....	42
<b>Lampiran 2.</b> Dokumentasi Penelitian .....	47
<b>Lampiran 3.</b> Primer terhadap Genom M. tuberculosis H37Rv.....	49

## ABSTRAK

Muhammad Azron Junaedi. **Identifikasi Mutasi Gen *katG*, *inhA* dan *ahpC* pada Isolat *Mycobacterium tuberculosis* Resisten Isoniazid di Kota Makassar** (dibimbing oleh Muhammad Nasrum Massi dan Rizalinda Sjahril).

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit yang ditularkan melalui udara (*airborne disease*) yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Pengendaliannya di dunia saat ini menghadapi tantangan oleh penyebaran galur *M. tuberculosis* resisten obat anti tuberkulosis. Isoniazid (INH) merupakan salah satu anti tuberkulosis lini pertama dengan kasus resistensi terbanyak. Penelitian ini menggunakan *Multiplex Allele-specific Polymerase Chain Reaction* (MAS-PCR) mendeteksi mutasi gen terkait resistensi isoniazid. Pada penelitian ini digunakan sampel yang berasal dari isolat klinis *M. tuberculosis* yang telah diuji sensitivitas antibiotik lini pertama obat anti tuberkulosis. Proses ekstraksi DNA dengan metode *boiling* lalu di amplifikasi menggunakan metode MAS-PCR menggunakan primer spesifik terhadap gen *inhA*, *katG* dan *ahpC*. Hasilnya kemudian dibaca pada gel elektroforesis dengan interpretasi gen mutasi ketika tidak terbentuk pita DNA sesuai fragmen spesifik alel. Sebanyak 200 isolat diuji pada penelitian ini yang terdiri dari sampel resisten isoniazid dan sensitif, dengan distribusi isolat terbesar mengalami mutasi berasal dari isolat *Multi Drug Resistant* (MDR) dengan total 146 isolat (73%). Mutasi gen terbesar pada gen *ahpC* pada 61 sampel (30,5%) dan mutasi kombinasi gen *katG* + *ahpC* pada 52 sampel (26%). Dengan uji sensitivitas dan spesifisitas mencapai 87% dan 42% dalam mendeteksi resistensi gen isoniazid. Mutasi pada gen *ahpC* memiliki jumlah presentase tertinggi pada penelitian ini. Gen *ahpC* dapat dapat diperhitungkan sebagai salah satu gen utama yang dapat diperiksa sebagai penyebab resistensi isoniazid. Menggunakan MAS-PCR dalam mendeteksi resisten isoniazid sederhana dan mudah, memiliki potensi sebagai metode *screening* pemeriksaan molekuler pada resisten isoniazid.

**Kata kunci:** tuberkulosis, *M. tuberculosis*, resisten isoniazid, mutasi gen

## ABSTRACT

Muhammad Azron Junaedi. **Identification of katg, inhA and ahpc Gene Mutations in Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Makassar City** (supervised by Muhammad Nasrum Massi and Rizalinda Sjahril).

Tuberculosis (TB) is an airborne disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Its control in the world is facing challenges due to the spread of anti-tuberculosis drug-resistant strains of *M. tuberculosis*. Isoniazid (INH) is one of the first-line anti-tuberculosis drugs with the most cases of resistance. This study used Multiplex Allele-specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) to detect isoniazid resistance-related gene mutations. In this study, samples derived from clinical isolates of *M. tuberculosis* were used, which had been tested for the sensitivity of first-line antibiotics to anti-tuberculosis drugs. The DNA extraction process was carried out using the boiling method and then amplified using the MAS-PCR method using specific primers for the inhA, katG, and ahpc genes. The results are then read on the electrophoretic gel with an interpretation of the mutation gene when DNA bands do not form according to the allele-specific fragment. A total of 200 isolates tested in this study consisted of isoniazid-resistant and sensitive samples, with the most extensive distribution of isolates experiencing mutations coming from Multi-Drug Resistant (MDR) isolates with a total of 146 isolates (73%). The most significant gene mutation was the ahpC gene in 61 samples (30.5%) and the combination mutation of the katG + ahpC gene in 52 samples (26%). The sensitivity and specificity tests reached 87% and 42% in detecting isoniazid gene resistance. Mutations in the ahpC gene had the highest percentage in this study. Therefore, the ahpC gene can be considered one of the primary genes that can be examined as a cause of isoniazid resistance. Using MAS-PCR in detecting isoniazid resistance is simple and easy and has the potential as a screening method for molecular examination of isoniazid resistance.

**Keywords:** tuberculosis, *M. tuberculosis*, isoniazid resistance, gene mutation

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar belakang

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit yang menular melalui udara (*airborne disease*) disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Bakteri ini dapat menyerang paru-paru, juga organ lainnya menyebabkan TB *ekstrapulmonal* (WHO, 2018). *M. tuberculosis* dan tujuh spesies mikobakteri terkait (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti*, dan *M. mungi*) dikenal sebagai kompleks *M.tuberculosis*. Sebagian besar spesies bakteri ini ditemukan dapat menyebabkan penyakit pada manusia (CDC, 2021). Orang dengan TB paru aktif menghasilkan *droplet nuclei* yang mengandung *M. tuberculosis* melalui batuk, bernyanyi, berteriak, dan bersin. Paparan dan inhalasi dari droplet dapat menyebabkan seseorang tertular *M. Tuberculosis* (Turner, 2015).

TB adalah penyebab kematian kesembilan di seluruh dunia dengan perkiraan 1,6 juta kematian akibat TB pada tahun 2017. Epidemiologi TB bervariasi secara substansial di seluruh dunia, dengan insiden tertinggi (100 per 100.000 penduduk atau lebih tinggi) yang diamati di Afrika Sub-Sahara, India dan Asia Tenggara (WHO, 2018). Indonesia memiliki beban TB tertinggi ke-3 di dunia, setelah India dan hampir menyamai China. WHO memperkirakan terdapat 845.000 kasus TB pada tahun 2018, dan 93.000 kematian. TB paling umum terjadi pada laki-laki (52% dari total kasus) tetapi juga signifikan pada wanita dan anak-anak (0-14 tahun), dengan 37% dan 11% dari masing-masing kasus. TB dapat menyerang siapa saja, tetapi sebagian besar penderita adalah golongan ekonomi menengah ke bawah. Dua pertiga dari beban kasus TB di Indonesia terdapat di Jawa dan Bali. Faktor Malnutrisi, tahanan, penambang, dan orang-orang dengan sistem kekebalan yang terganggu, termasuk orang-orang dengan HIV dan diabetes, lansia, serta perokok, sangat rentan terhadap TB (Indonesia JEMM, 2020).

Pengendalian TB di dunia saat ini menghadapi tantangan yang ditimbulkan oleh penyebaran secara global *strain M. tuberculosis* yang resisten terhadap obat anti tuberkulosis (OAT) standar. Hal ini menyebabkan terjadinya penyebaran *Multi-Drugs Resistance Tuberculosis* (MDR-TB) di dunia (Falzon et al, 2011). Saat ini banyak ditemukan galur *M. tuberculosis* resisten terhadap dua atau lebih obat anti *tuberculosis* (OAT). Pengobatan awal terhadap TB paru yang disebabkan *M. tuberculosis* biasanya menggunakan isoniazid (INH), rifampisin (RIF), pirazinamid (PZA), dan etambutol (EB) atau streptomisin (SM). Resistensi mendorong penggunaan obat alternatif lain yang lebih toksik yaitu etionamid, asam aminosalisilat, sikloserin, kapreomisin, siprofloksasin atau ofloksasin (Aye et al., 2016). Menurut laporan WHO tahun 2014 insiden kematian akibat MDR - TB mencapai 190.000 kasus. Pada tahun 2015 terdapat 250.000 kematian dan tahun 2016 terdapat 240.000 kematian. Kejadian kasus MDR - TB di Indonesia telah dilaporkan pada tahun 2013 mencapai 1.094 kasus. Tahun 2014 sebanyak 1.752 kasus dan tahun 2015 mencapai 1.860 kasus (Kemenkes RI, 2016).

Isoniazid (INH) merupakan salah satu anti tuberkulosis lini pertama yang paling penting. Bersifat bakterisidal yang paling ampuh dimana *M. tuberculosis* sangat peka terhadap isoniazid. Isoniazid masuk ke dalam sel *M. tuberculosis* sebagai *pro-drug* dengan berdifusi secara pasif, isoniazid kemudian diaktifkan oleh enzim katalase-peroksidase yang diekspresikan oleh gen *katG* *M. tuberculosis* untuk menjadi bentuk aktifnya, setelah INH berubah menjadi bentuk aktifnya, INH ini akan bekerja pada target utamanya yaitu mengganggu enzim *enoxyl – acyl carrier protein reductase* melalui ikatan kovalen INH – NAD. Dengan adanya ikatan ini maka terjadi hambatan aktifitas enzimatik *inhA* sehingga mengganggu sintesis asam mikolat. Terjadinya mutasi pada *inhA* yang berperan mengkode enzim *enoxyl – carrier protein reductase* akan menyebabkan terjadinya resistensi terhadap INH. Resistensi ini terjadi karena adanya mutasi pada gen *inhA* yang menyebabkan terjadinya penurunan terhadap afinitas ikatan INH – NAD. Selain itu juga dapat terjadi

hiperekspresi enzim inhA sehingga menyebabkan resistensi terhadap INH (Rattan et al, 1998). Di China ditemukan 18 struktur gen dan dua promotor yang mengalami mutasi, mutasi tersering pada katG yaitu sebanyak 86.2 %, inhA sebanyak 19.6 % dan oxyR-ahpC sebanyak 1.2 % (Liu et al, 2018). Di Polandia, 78 % mengalami mutasi di katG, dan 16 % nya juga mengalami mutasi di inhA (Jagielsky, 2014).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa mutasi pada gen katG tidak mempengaruhi virulensi bakteri *M. Tuberculosis*. Diyakini bahwa *M.tuberculosis* telah mengembangkan mekanisme lain untuk mengatasi kelemahannya. *Alkil hidropersida reduktase* (AhpC) dianggap mampu menggantikan katG dalam mempertahankan virulensi bakteri. Pada *M. tuberculosis*, delesi katG berdampak pada mutasi ahpC yang mengakibatkan terjadinya produksi enzim berlebihan, dimana pada *M. tuberculosis* normal, enzim ahpC diproduksi secara minimal (Pym et al.,2002; Hillas et al.,2000; Zhang et al., 2005). Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa mutasi katG tidak berpengaruh pada aktivitas ahpC dan tidak terjadi mutasi pada ahpC (Heym et al., 1997; Guimaraes et al., 2005). Pengaruh ahpC pada mutasi katG Ser 315Thr, faktor-faktor yang mempengaruhi produksi ahpC dan hubungannya dengan virulensi *M.tuberculosis* belum diketahui secara pasti.

Pada penelitian Adhistry (2017) terhadap identifikasi mutasi gen penyebab MDR TB menemukan sebanyak 83,87% sampel mengalami mutasi gen katG pada kodon 315 yang mengakibatkan resistensi terhadap INH. Ikhsan (2019) menemukan dari 30 sampel isolat MDR *tuberculosis* resisten isoniazid didapatkan 27 sampel mengalami mutasi pada gen katG dan 3 sampel mengalami mutasi pada gen inhA. Penelitian yang dilakukan oleh Devita, et al (2014) dengan mengamplifikasi *regio promotor* inhA pada 134 isolat MDR-TB menemukan jenis mutasi yang terjadi pada *regio promotor* inhA adalah substitusi transisi dengan perubahan basa sitosin menjadi timin (C->T) pada posisi -15. Dabbousi, et al (2014), penelitian terhadap distribusi mutasi gen katG, inhA dan ahpC di Lebanon dan Syria. Pada 52 isolat Syria, 22



(42,3%) memiliki mutasi pada gen katG, sementara 6 dari 14 isolat dari Lebanon (42,8%) mengalami mutasi ini. Mutasi pada inhA sebanyak 14 isolat dan mutasi ahpC pada 6 isolat klinis strain Syria. Tidak ditemukan mutasi gen inhA dan ahpC pada seluruh sampel isolat klinik strain Lebanon.

Pengobatan yang tidak adekuat meningkatkan resiko 40 kali lipat terjadinya resistensi terhadap OAT dan dapat menyebabkan mutasi pada gen penyandi OAT dan berkontribusi terhadap munculnya resistensi OAT (Tombokan GA, 2015, Nugrahani DK, 2013). Pasien yang tidak patuh meminum OAT berpeluang 6,7 kali lipat resiko terjadinya kasus MDR-TB (Janan, M. 2019).

Jumlah kasus *M. tuberculosis* resisten isoniazid yang semakin meningkat namun data mengenai mutasi gen katG, inhA dan ahpC yang masih kurang di Sulawesi Selatan serta Indonesia sebagai salah satu negara dengan beban MDR-TB tertinggi, maka perlu dilakukan penelitian mendeteksi mutasi pada gen *M. tuberculosis* khususnya penyebab resisten terhadap isoniazid pada isolat klinis MDR-TB.

## **1.2 Rumusan masalah**

Apakah ditemukan mutasi gen katG, inhA dan ahpC pada isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis*.

## **1.3 Hipotesis**

Mutasi gen katG, inhA dan ahpC *Mycobacterium tuberculosis* pada isolat klinis resisten terhadap isoniazid dapat dideteksi dengan menggunakan metode molekuler *Polymerase Chain Reaction*.

## **1.4 Tujuan penelitian**

### **1.4.1 Tujuan umum**

Mendeteksi adanya mutasi pada gen katG, inhA dan ahpC pada isolat klinis *M. tuberculosis*.

#### **1.4.2 Tujuan khusus**

1. Mengidentifikasi mutasi gen *katG*, *inhA* dan *ahpC* pada isolat klinis *M. tuberculosis* resisten obat.
2. Membandingkan hasil resistensi genotipe terhadap isoniazid dengan gen *katG*, *inhA* dan *ahpC* menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

#### **1.5 Manfaat penelitian**

1. Manfaat praktis

Memberi gambaran bagi pembaca mengenai mutasi gen *katG*, *inhA* dan *ahpC* pada isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* yang menjadi penyebab resistensi isoniazid.

2. Manfaat teoritis

Menjadi acuan bagi peneliti selanjutnya untuk melakukan pengembangan penelitian serupa dengan menggunakan beberapa gen yang juga terlibat dalam resistensi obat anti tuberkulosis lainnya.

3. Manfaat klinis

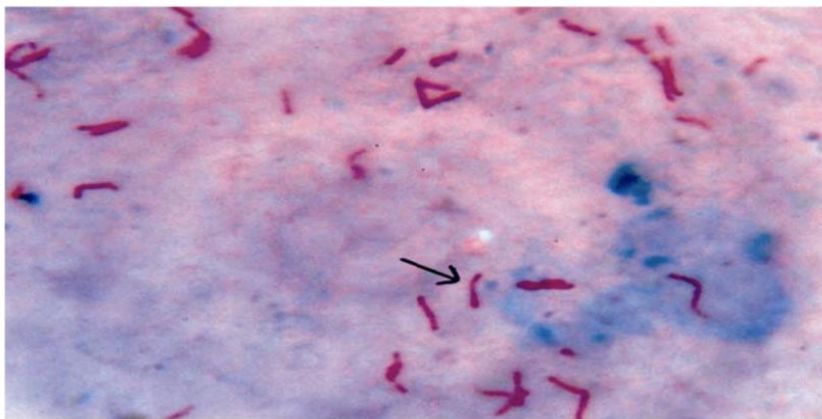
Menjadi bahan evaluasi klinis tambahan bagi tenaga medis dalam menilai perkembangan derajat resistensi obat anti tuberkulosis (OAT).

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tuberkulosis

Tuberkulosis (TB) paru adalah penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *M. tuberculosis*, menyebar ketika penderita TBC mengeluarkan bakteri ke udara, saat pasien bersin atau meludah, bakteri tuberkulosis dilepaskan yang kemudian terbawa ke udara. Kemudian bakteri tuberkulosis masuk ke dalam tubuh orang lain melalui udara yang dihirup. Penyakit ini biasanya menyerang paru-paru (tuberkulosis paru) tetapi dapat juga menyerang tempat lain (TB Ekstra paru) (WHO, 2020).

Menurut Dewi (2019), TB paru adalah infeksi kronis yang disebabkan oleh *M. tuberculosis* yang menyerang jaringan parenkim paru. *M. tuberculosis* adalah bakteri aerob yang sering menginfeksi jaringan dengan kadar oksigen tinggi. Merupakan bakteri basil tahan asam, gram-positif (Gambar 1) dan dapat diidentifikasi dengan pewarnaan asam secara mikroskopis yang disebut Basil Tahan Asam (BTA). Dinding sel *M. tuberculosis* yang kaya akan lipid dan lapisan peptidoglikan yang tebal mengandung asam *mycolic*, yang menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis*.



**Gambar 1.** Pewarnaan Ziehl-Neelsen pada bakteri *M. tuberculosis* (Dubei et al, 2012)

## 2.2 Epidemiologi

Kasus tuberkulosis masih menjadi masalah kesehatan utama bagi masyarakat di seluruh dunia. *World Health Organization* (WHO) di tahun 2015 mencatat terdapat sekitar 10,4 juta kasus baru tuberkulosis. Di antaranya adalah 5,9 juta pria, 3,5 juta wanita, dan 1,0 juta anak-anak. Dengan angka kematian mencapai sekitar 1,4 juta kasus. Angka kematian ini rata-rata menurun sebesar 22 persen dari tahun 2000 hingga 2015 (WHO, 2017). Prevalensi tuberkulosis paru di Indonesia pada tahun 2013 sebesar 0,4%, tahun 2018 sebesar 0,4% dan tahun 2020 sebesar 0,4% di Indonesia. Insiden angka kejadian tuberkulosis di Indonesia telah meningkat menjadi 845.000 dan jumlah kematian lebih dari 98.000. Terdapat 842.000 kasus per tahun dan 569.899 kasus tuberkulosis dilaporkan, sehingga sekitar 32% data masih belum dilaporkan. WHO memperkirakan terdapat 23.000 kasus MDR/RR di Indonesia. Pada tahun 2017, terdapat 442.000 kasus TB terdaftar di Indonesia dimana diperkirakan 8.600–15.000 adalah kasus TB MDR/RR (diperkirakan 2,4% dari kasus baru dan 13% dari pasien TB yang telah diobati sebelumnya), tetapi cakupannya yang baru di tatalaksana hanya sekitar 27,36 %.

## 2.3 Proses transmisi bakteri *M. tuberculosis*

*M. tuberculosis* merupakan bakteri penyebab penyakit tuberkulosis (TB). Menyebar melalui udara (*air borne*) ketika orang yang terinfeksi batuk, bersin, berbicara, atau meludah (Ahmad, 2010). Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, pada tahun 2014 terdapat 4 tingkatan perkembangan alami tuberkulosis pada manusia, yaitu: paparan, infeksi, sakit tuberkulosis dan kematian. Paparan merupakan jumlah kasus di masyarakat yang terinfeksi, kemungkinan kontak dengan kasus terinfeksi, derajat infektivitas sputum sumber infeksi, intensitas batuk yang merupakan salah satu sumber penyebab infeksi, kedekatan kontak dengan sumber infeksi dan juga waktu kontak dengan sumber infeksi. Paparan pasien dengan tuberkulosis merupakan prasyarat terjadinya infeksi tuberkulosis.

Respon imun terjadi setelah 6-14 minggu pasca infeksi. Proses reaksi infeksi terdiri dari reaksi imunologis, dimana bakteri *M. tuberculosis* masuk ke dalam alveoli dan ditangkap oleh makrofag, kemudian terjadi reaksi antigen-antibodi, terjadi reaksi imunologis (umum), yaitu hipersensitivitas lambat (hasil tes tuberkulin+). Lesi akan sembuh sempurna, tetapi bakteri dapat tetap hidup (dorman) pada lesi dan dapat menjadi aktif kembali. Penyebarannya juga dapat melalui aliran darah atau kelenjar getah bening dapat terjadi sebelum proses penyembuhan lesi.

Faktor risiko infeksi tuberkulosis juga bergantung pada konsentrasi/jumlah bakteri yang terhirup, waktu paparan infeksi, faktor usia dan sistem kekebalan tubuh. Seseorang dengan sistem kekebalan yang terganggu, termasuk infeksi HIV/AIDS dan malnutrisi dapat memfasilitasi perkembangan tuberkulosis aktif. Dengan bertambahnya jumlah orang yang terinfeksi HIV, jumlah penderita TB akan meningkat, yang akan meningkatkan penyebaran TB di masyarakat. Sekitar 10% dari mereka yang terinfeksi tuberkulosis berkembang menjadi tuberkulosis. Namun, ketika seseorang HIV+, resiko terkena TB semakin meningkat. Penyebaran lewat aliran darah atau kelenjar getah bening mampu menyebabkan terjadinya *extrapulmonary tuberculosis*. Ketika menyebar secara masif melalui aliran darah, maka *M. tuberculosis* dapat memengaruhi organ mana pun di tubuh.

Kematian akibat tuberkulosis dapat disebabkan oleh diagnosis yang terlambat, pengobatan tidak adekuat, keadaan kesehatan yang buruk, atau memiliki penyakit lainnya. Tuberkulosis yang tidak di tatalaksana memiliki persentase sekitar 50% pasien dapat meninggal, dan kasus TB yang disertai HIV+ juga meningkatkan derajat keparahan. Partikel *M. tuberculosis* yang sangat kecil terbawa udara kemudian terhirup oleh orang yang dekat dengan penderita TB mampu meningkatkan resiko terjadinya infeksi. *M. tuberculosis* berukuran 1–5 µm, membuat bakteri TB mudah masuk ke saluran pernafasan seserong secara langsung, dengan paru-paru sebagai target utamanya (Bañuls, 2015).



terhadap kronisitas penyakit (Cole et al., 1998). Sifatnya meliputi waktu pertumbuhan bakteri, dalam makrofag keadaan bakteri yang tidak aktif dan kompleks disertai permeabilitas serta permukaan sel bakteri yang tebal. Terapi kombinasi harus menjadi satu-satunya pengobatan yang digunakan, selain pencegahan tuberkulosis pada pasien HIV yang dapat diobati dengan obat tunggal berupa isoniazid (WHO, 2011).

**Tabel 1.** Kelompok obat anti-TB (Zumla dkk., 2013)

<p><b>Obat anti-TB lini pertama</b></p>	<p><b>Kelompok 1</b></p> <p>Oral: isoniazid (INH/H), rifampisin/rifampin (RIF/R), pirazinamid (PZA/Z), etambutol (EMB/E), rifapentin (RPT/P) atau rifabutin (RFB)</p>
<p><b>Obat anti-TB lini kedua</b></p>	<p><b>Kelompok 2</b></p> <p>Aminoglikosida injeksi: streptomisin (STM/S), kanamisin (Km), amikasin (Amk), Polipeptida injeksi: kapreomisin (Cm), viomisin (Vim)</p> <p><b>Kelompok 3</b></p> <p>Fluoroquinolon oral dan injeksi: ciprofloksasin (Cfx), levofloksasin (Lfx), moxifloksasin (Mfx), ofloksasin (Ofx), gatifloksasin (Gfx)</p> <p><b>Kelompok 4</b></p> <p>Oral: asam para-aminosalisilat (Pas), sikloserin (Dcs), terizidon (Trd), etionamid (Eto), protionamid (Pto),</p>
<p><b>Obat anti-TB lini ketiga</b></p>	<p><b>Kelompok 5</b></p>

---

Clofazimin (Cfz), linezolid (Lzd), amoksisilin plus klavulanat (Amx/Clv), imipenem plus cilastatin (Ipm/Cln), klaritomisin (Clr).

---

## 2.5 Isoniazid (INH/H)

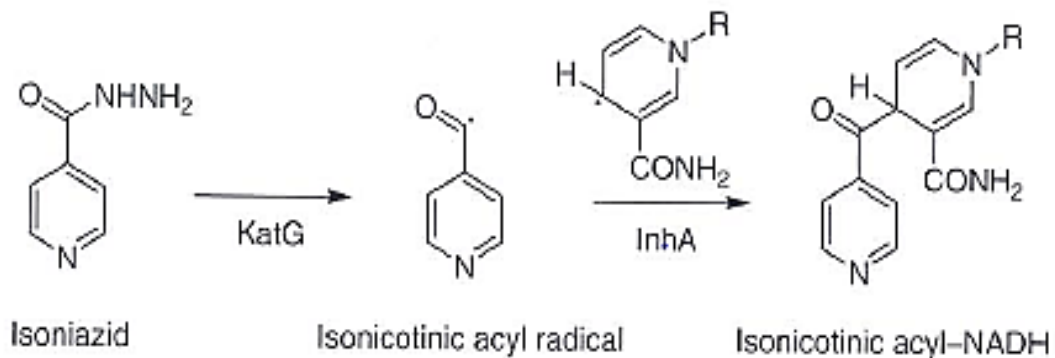
Isoniazid merupakan obat anti tuberkulosis analog tiasetazon yang telah efektif digunakan sejak tahun 1940-an (Vulpo, 1952). Berdasarkan hasil penelitian efektivitas tiasetazon dengan mengganti *fenil ring* dengan *piridin ring* menunjukkan memiliki efek penghambatan pada bakteri *M. tuberculosis*. Menghasilkan senyawa *Isonicotinaldehyde thiosemicarbazone* yang memiliki efek poten dibandingkan dengan thacetazone terhadap *M. tuberculosis*. Sejak INH pertama kali ditemukan, ribuan turunan INH telah disintesis, tetapi tidak satu pun dari senyawa ini yang meningkatkan aktivitasnya. Metabolit INH yaitu N-acetyl-INH, diproduksi pada tubuh manusia, berbentuk tidak aktif, meskipun merupakan turunan N-alkil seperti hydrazones dan iproniazid, termasuk juga verazid menunjukkan efek *in vivo* pada hasilnya (Kakimoto dan Tone, 1965; Fox, 1953) Isoniazid adalah obat tuberkulosis yang paling umum digunakan dan merupakan bagian penting dari pengobatan lini pertama tuberkulosis kasus aktif. Monoterapi INH selama 9 bulan digunakan untuk mengobati infeksi laten. Isoniazid adalah bakteri yang kuat melawan basil replikasi yang aktif secara metabolik (aktif secara metabolik dan mampu bereproduksi) dan terutama bertanggung jawab untuk fase awal bioburden pada tahap awal terapi (Ma et al., 2007).

### 2.5.1 Mekanisme aksi

Isoniazid memasuki sel *M. tuberculosis* sebagai prodrug dan diaktifkan oleh enzim katalase peroksidase (katG) yang dikode oleh gen penyandi katG. Keadaan aktif dari INH merupakan *isonicotin acyl* radikal, yang akan membentuk produk *adduct* (produk adisi yang berasal dari dua atau lebih molekul berbeda, menghasilkan produk reaksi tunggal yang mengandung semua atom dari semua komponen (IUPAC, 1997). Kemudian terbentuk



*isonicotinic acyl*-NADH (Bentuk aktif INH). Keadaan *adduct* ini memberi efek toksik pada sel bakteri *M. tuberculosis* (Ma et al., 2007; Brennan et al., 2008; Zhand et al., 1992) dan biosintesis asam mikolat mempengaruhi target intraseluler serta komponen penting dari sel bakteri (Barry et al., 1998). Target utama INH juga adalah InhA, yang merupakan sebuah reduktase protein pembawa enoyl (ACP) yang bergantung pada NADH yang dikodekan oleh gen *inhA*. Hasil NADH asam isonikotinat (INA) yang berikatan dengan *inhA* akan mencegah sintesis asam mikolat, yang merupakan proses penting bagi integritas dinding sel mikobakteri dan defisiensi biosintesis mikobakteri, menyebabkan hilangnya integritas sel dan kematian bakteri (Barry et al., 1998).



**Gambar 3.** Proses pembentukan *isonicotinic acyl*-NADH dan aktivasi dari INH (Ma et al., 2007)

## 2.6 Definisi resistensi OAT (Obat Anti Tuberkulosis)

Resistensi terhadap OAT terjadi ketika kondisi bakteri *M. tuberculosis* tidak dapat lagi diobati dengan OAT. TB resisten pada dasarnya adalah fenomena “buatan manusia” yang dihasilkan dari perawatan pasien TB yang tidak tepat atau tidak adekuat dan penularan pasien dengan strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap OAT (Carolia, 2016). Ada lima kelas resistensi untuk OAT, yaitu:

- a. Monoresisten: Isolat *M. tuberculosis* resisten terhadap salah satu obat anti tuberkulosis lini pertama.
- b. Poli-resisten: Isolat *M. tuberculosis* resisten terhadap dua atau lebih obat anti tuberkulosis lini pertama selain dari kombinasi rifampisin dan isoniazid.
- c. *Multidrug resistance* atau *multidrug-resistant* tuberkulosis (MDRTB): *M. tuberculosis* resisten minimal terhadap isoniazid dan rifampicin, yang merupakan obat anti-tuberkulosis paling kuat, dapat disertai dengan atau tanpa resistensi terhadap OAT lainnya.
- d. *Extensive Drug-Resistant* (XDR-TB): Resistensi terhadap isoniazid dan rifampisin dengan resistensi terhadap salah satu *fluoroquinolones* dan salah satu dari tiga obat injeksi lini kedua (amikasin, kapreomisin, atau kanamisin).
- e. Resisten rifampisin: Resistensi terhadap rifampisin, ditunjukkan dengan metode fenotipik dan genotipik, dengan atau tanpa resistansi terhadap obat TB lain.
- f. *Totally drug-resistant tuberculosis* (TDR-TB): Tuberkulosis resisten terhadap semua obat tuberkulosis lini I dan II (Carolia et al, 2016).

## 2.7 Mekanisme resistensi Obat Anti-Tuberkulosis

Berdasarkan jenisnya, mekanisme resistensi obat pada isoniazid serta gen terkait dijelaskan sebagai berikut.

### 2.7.1 Gen *katG* terhadap resisten isoniazid

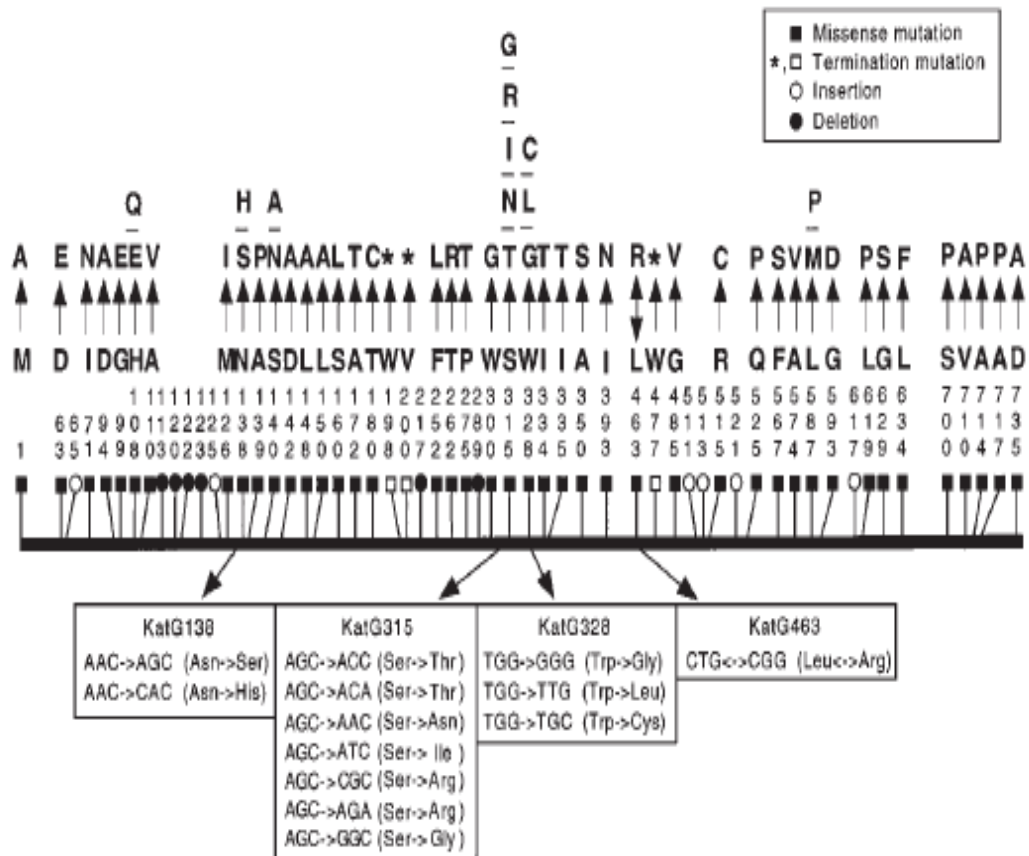
Resistensi *M. tuberculosis* terhadap isoniazid dapat terjadi akibat mutasi pada gen khusus penyandi INH seperti gen *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA* dan *ndh* (Johnson et al., 2005). Gen *katG* dan *inhA* adalah molekul gen yang paling penting dari penyebab resistensi isoniazid. Telah banyak ditemukan bahwa terjadinya mutasi pada kedua gen ini merupakan penyebab tersering dari resistensi isoniazid (Ramaswamy et al., 2003; Hazbon et al., 2006). Mutasi *katG* dapat diamati pada kodon 315 gen *katG* (Slayden dan Barry, 2000) dengan proses mutasi berupa penggantian atau pertukaran asam amino.

Proses penggantian asam amino yang tersering berupa perubahan asam amino Ser315Thr. Substitusi asam amino ini diperkirakan mencapai 30-60% pada isolat resisten isoniazid (Ramaswamy dan Musser, 1998). Mutasi ini mengakibatkan tidak adanya produk isoniazid pada proses pembentukan INH-NAD, yang diperlukan pada proses aktivitas antimikroba dari isoniazid (Vilcèze et al., 2007; Rozwarski et al., 1998).

Kemampuan katG menjadi lebih efisien daripada enzim yang bermutasi dalam mengubah INH (prodrug) menjadi asam isonicotinic (INH teraktivasi). Dengan demikian, mutan Ser315Thr adalah katalase peroksidase yang kompeten dan memiliki kemampuan yang berkurang untuk memetabolisme INH. Oleh karena itu, substitusi posisi 315 pada asam amino tampaknya dapat memecah keseimbangan dan kebutuhan dalam mengatur aktivitas peroksidase katalase aktif untuk menghilangkan radikal antibakteri dari inang dan pengurangan konversi prekursor menjadi bentuk isoniazid aktif pada proses normalnya dalam membunuh bakteri (Ramaswamy dan Musser, 1998). Kasus resistensi ini dihubungkan dengan mutasi pada gen INH dan banyak atau lebih sering terjadi pada strain TB MDR (Hazbon et al., 2006; Cohen-Gonsaud et al., 2000).

Perubahan substitusi asam amino AGC (Ser)--> ACC(Thr) yang paling umum terjadi, tetapi juga perubahan ACA (Thr), ATC (Ile), AGA (Arg), CGC (Arg), AAC (Asp) dan GGC (Gly) telah pernah diidentifikasi (Ramaswamy dan Musser, 1998). Penelitian yang telah pernah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa sebagian besar isolat mengalami perubahan asam amino lain dalam struktur katG (Rouse et al., 1996). Substitusi Arg463Leu terjadi juga pada banyak strain yang rentan terhadap INH, terutama pada organisme *M. tuberculosis* yang berasal dari Cina dan beberapa wilayah Asia lainnya (Lee et al., 1997; Musser, 1997). Protein mengoksidasi INH menjadi bentuk aktifnya (asam isikotinat) dan menunjukkan ketergantungan yang sama pada kadar INH. Namun, strain *Bacillus Calmette-Gurin* (BCG) memberi data yang direkayasa dalam mengekspresikan KatG463Arg dan 463Leu yang patutnya

diperhatikan karena mampu menunjukkan bahwa mungkin terdapat perbedaan yang dapat diabaikan antara kedua protein (Rouse et al., 1996). Rouse et al juga melaporkan terdapat 14 organisme yang resisten terhadap INH katalase-positif tingkat rendah. Dari jumlah tersebut, 9 memiliki leusin pada kodon KatG 463 dan tidak adanya yang memiliki mutasi lainnya di wilayah katG ataupun inhA.

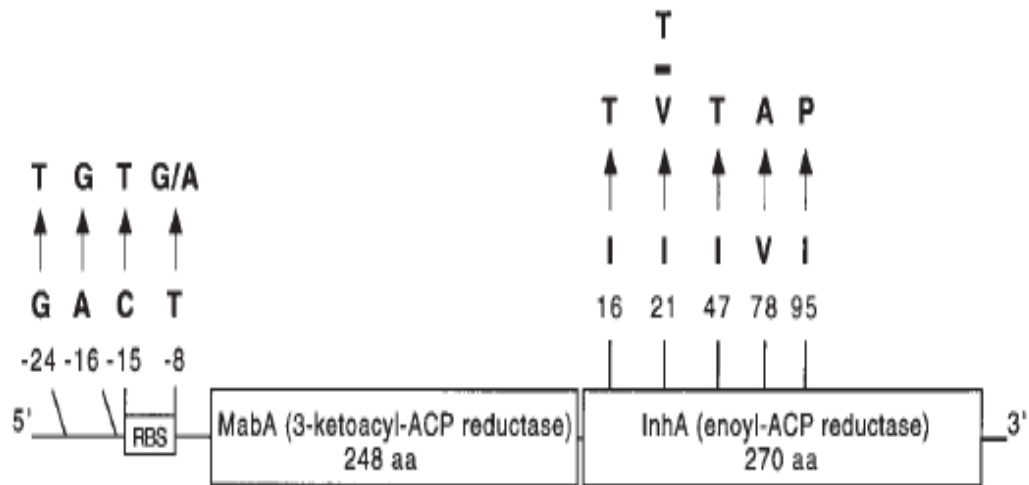


**Gambar 4.** Protein katG pada Keadaan polimorfisme yang diidentifikasi pada *M. tuberculosis* resisten isoniazid

**2.7.2 Gen inhA terhadap resisten isoniazid**

inhA merupakan *enoyl-acyl carrier protein* (ACP) reduktase dan salah satu target utama penyebab terjadinya resistensi pada isoniazid (Banerjee et al., 1994). Gen inhA yang mengalami mutasi tidak hanya memberikan

resistensi terhadap isoniazid, tetapi dapat juga pada obat etionamid (Banerjee et al., 1994). Analog struktural INH lain yaitu etionamid yang juga memiliki peran dengan menghambat terjadinya biosintesis asam mikolat. Terdapat penelitian mendapatkan bahwa resistensi terhadap INH akibat inhA juga berdampingan dengan terjadinya resistensi ETH pada strain tertentu, menunjukkan bahwa INH dan ETH saling berbagi target molekuler yang sama (Hook, 1964). 2 operon utama pada gen inhA yaitu mabA dan inhA, menyandikan produk yang menyebabkan terjadinya resistensi terhadap INH juga ETH (Lefford, 1996). *M. tuberculosis* inhA bergantung pada NADH yang spesifik untuk substrat thioester enoyl rantai panjang dan beberapa bukti menunjukkan bahwa inhA dan mabA terlibat dalam proses biosintesis asam mikolat (Ramaswamy dan Musser, 1998).

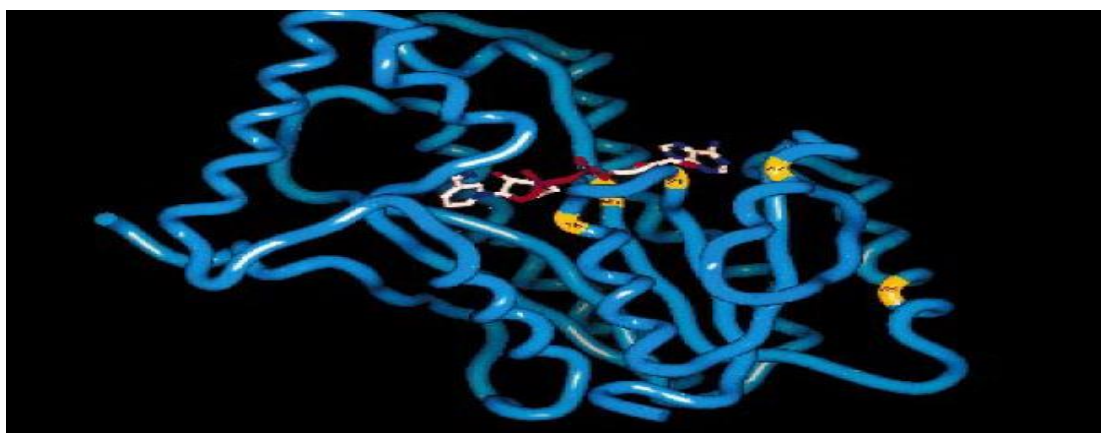


**Gambar 5.** Proses terjadinya mutasi pada lokus inhA di isolate *M. tuberculosis* resisten INH serta resisten ETH. (Ramaswamy dan Musser, 1998).

Bentuk aktif dari isoniazid akan berikatan dengan kompleks inhA-NADH membentuk komponen terner. Kompleks ini akan menginaktivasi *enoi*l reduktase dan mencegah terjadinya biosintesis asam mikolat. Secara singkat, substitusi asam amino di situs pengikatan NADH inhA menyebabkan resistensi

INH dengan mencegah penghambatan biosintesis asam mikolat dari INH (Ramaswamy dan Musser, 1998). Mutasi spesifik pada *inhA* atau melalui proses overekspresi dari *inhA* akan menghasilkan organisme dengan terjadinya peningkatan MIC (*Minimum Inhibitory Value*) dari INH dan ethionamide (ETA). Kasus resistensi INH 70-80% terjadi pada isolat klinis *M. tuberculosis* dikaitkan dengan mutasi pada gen *inhA* dan *katG* (Ramaswamy dan Musser, 1998). Sebuah studi juga mendapatkan mutasi pada wilayah *inhA* menghasilkan resistensi yang tinggi terhadap isoniazid (MIC>1 µg/mL) (Machado et al., 2013).

*Missense mutation* (Perubahan kodon yang mengkodekan asam amino yang berbeda) dalam struktur gen *inhA* menghasilkan substitusi kodon lainnya pada gen *inhA* (Ramaswamy dan Musser, 1998). Berdasarkan analisis struktur senyawa *inhA*, semua substitusi asam amino berada di pengikatan struktur NADH. (Basso et al., 1998).



**Gambar 6.** Gambaran skematik struktur senyawa *inhA* dalam penggantian asam amino (Ramaswamy dan Musser, 1998).

### 2.7.3 Gen *ahpC* terhadap resisten isoniazid

*Alkylhydroperoxidase reductase* (*ahpC*) terlibat dalam proses terjadinya resistensi INH dengan oksigen reaktif sebagai perantaranya (Rinder et al., 1998). Berdasarkan penelitian, hilangnya aktivitas *katG* karena substitusi asam

amino Ser315Thr disertai *over* ekspresi protein ahpC menurunkan kinerja INH dalam tatalaksananya pada *M. tuberculosis* (Sherman et al., 1996). Perubahan nukleotida yang menyebabkan ekspresi berlebih ahpC dan resistensi INH diidentifikasi di wilayah promotor gen ahpC (Ramaswamy dan Musser, 1998). Ekspresi ahpC yang berlebihan mampu melindungi bakteri dari keadaan stress oksidatif tetapi tidak melindungi terhadap isoniazid. Bukti terbaru menunjukkan bahwa mutasi pada promotor ahpC adalah perubahan kompensasi untuk hilangnya aktivitas katG sebagai penyebab resistensi isoniazid (Sherman et al., 1996). Peningkatan aktivitas ahpC dapat mengganti peran hilangnya aktivitas katG dalam mendetoksifikasi organik peroksida (Heyn et al., 1997).

## **2.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Pada tahun 1985, Kary Mullis menemukan PCR, yang merupakan metode yang efektif dalam mengamplifikasi DNA. Menghasilkan lebih dari satu juta kali *copy* DNA asli. Deteksi dilakukan dengan memisahkan molekul berdasarkan berat molekulnya, yang disebut elektroforesis menggunakan gel agarosa (Sudjadi, 2008). Proses amplifikasi DNA dengan PCR melibatkan tiga langkah proses utama, yaitu: Proses pertama memecah DNA beruntai ganda menjadi dua DNA beruntai tunggal dengan mendenaturasinya. Proses denaturasi DNA dilakukan dengan menaikkan suhu menjadi 95°C. Kedua adalah pemasangan atau *annealing* 2 primer pada 2 untai DNA. Primer bertindak sebagai penginduksi pertama untuk amplifikasi segmen DNA. Proses pengikatan DNA dengan primer yang terdeteksi dengan suhu yang optimal sesuai dengan target primer dan menurunkan suhu antara 37°C dan 60°C. Selanjutnya proses pemanjangan *deoxyribonucleotide triphosphate* (dNTP) yang sebelumnya ditambahkan ke reagen membuat primer yang awalnya hanya memiliki 18-24 urutan basa nukleotida untuk mendapatkan lebih banyak basa nukleotida yang terkandung dalam dNTP. Segmen DNA yang kemudian digandakan, didukung oleh enzim yang bekerja optimal pada suhu 72°C. Pada akhir siklus PCR, dilakukan proses final extension selama 5-

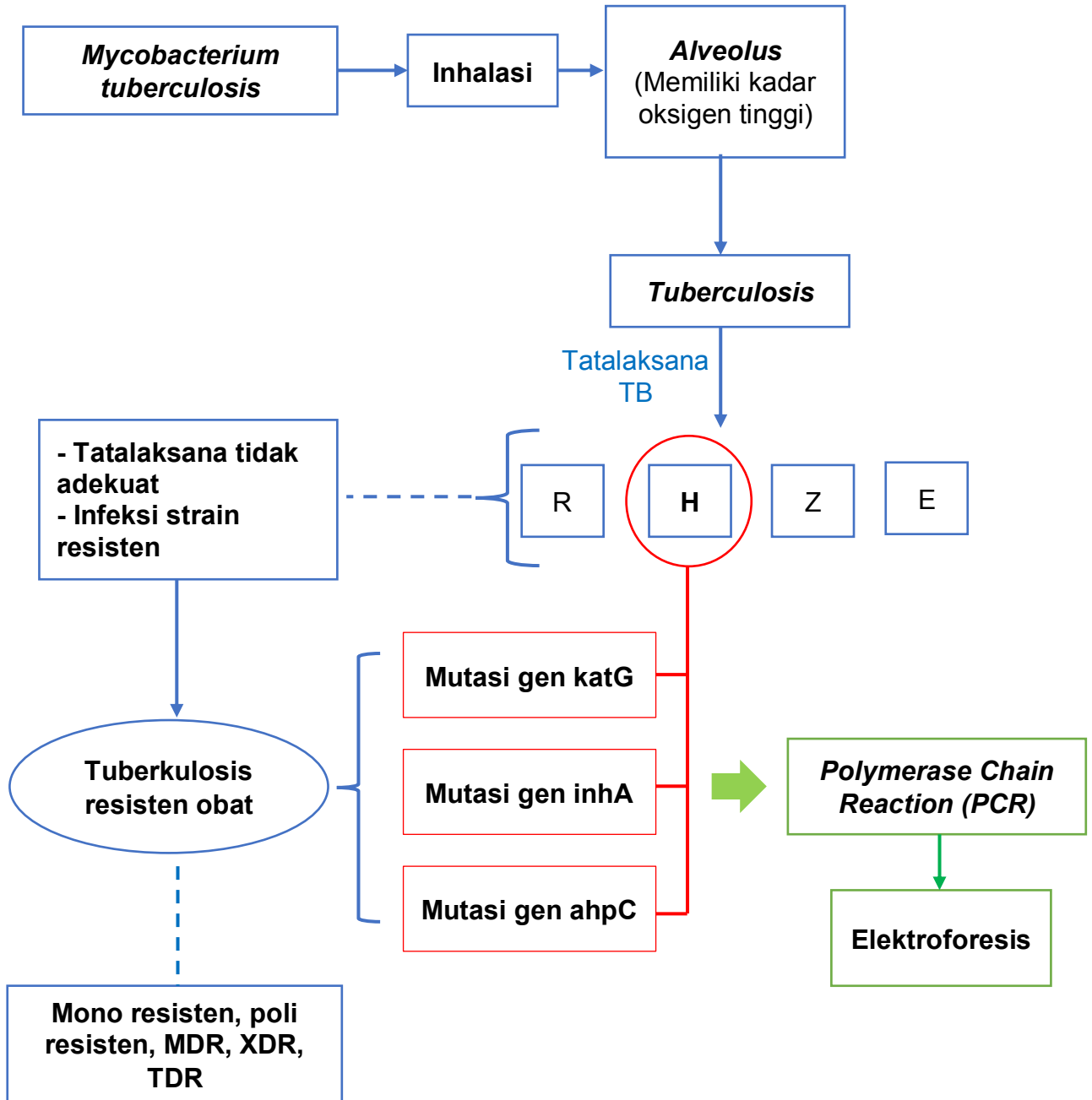
15 menit pada suhu yang sama dengan proses extension untuk memastikan seluruh DNA berantai tunggal terbentuk sempurna. Ketiga proses tersebut diulangi hingga membentuk rangkaian segmen DNA yang diperlukan (Sudjadi, 2008).

## **2.9 Elektroforesis**

Elektroforesis adalah teknik untuk memisahkan molekul pada suatu campuran dengan menggunakan medan listrik. Dengan kecepatan tertentu molekul akan larut pada medan listrik. Elektroforesis gel agarose termasuk sebagai metode standar dalam memisahkan, mengidentifikasi dan memurnikan suatu fragmen DNA. Alga merupakan sumber utama pada pembuatan agarosa dengan struktur D-galaktosa dan 3,6-anhidro-L-galaktosa. Pembuatan gel agarosa dengan cara memanaskannya dalam suatu buffer kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan didinginkan. Setelah agar mengeras, dimasukkan pada wadah elektroforesis dan dialiri dengan medan listrik yang berada pada kedua ujungnya sehingga DNA yang bermuatan negatif mampu bergerak ke pH netral anoda. Molekul DNA bergerak lebih lambat karena terdapatnya lebih banyak gesekan pada prosesnya. Dalam mendeteksi keberadaan DNA, sebelum di pipet pada gel agarosa, terlebih dahulu dilakukan proses pewarnaan, dan pita molekuler pada gel agarosa dapat dilihat ketika diletakkan di bawah sinar ultraviolet (UV). Terlihatnya kelompok molekuler tersebut akan menunjukkan DNA segmen (Sudjadi, 2008).

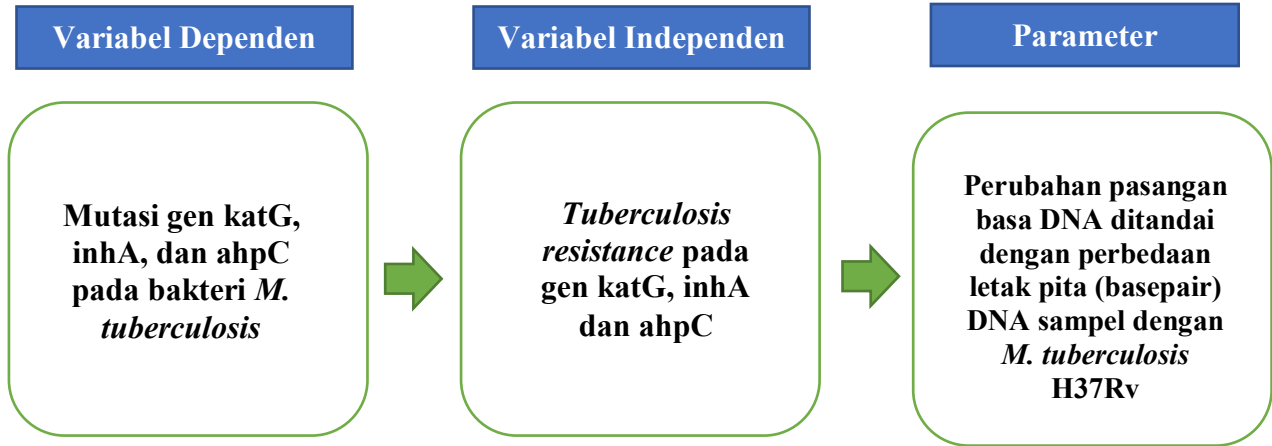


## 2.10 Kerangka teori



Gambar 7. Kerangka teori

## 2.11 Kerangka konsep



Gambar 8. Kerangka konsep