

**Laporan  
Hibah Penelitian Strategis Nasional  
Tahun Anggaran 2009**



**Mekanisme Resistensi Isoniazid Pada *Mycobacterium tuberculosis* : Analisis Mutasi Gen *katG* dan Kaitannya Dengan Sifat Biokimia Enzim Katalase-Peroksidase Mutan Rekombinan**

**Peneliti :**  
**Purkan, S.Si., M.Si**  
**Dr. Wiwin Retnowati, M.Kes**  
**Dessy Natalia, Ph.D**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional Nomor: 276/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

**Universitas Airlangga  
Desember 2009**

Laporan  
Hibah Penelitian Strategis Nasional  
Tahun Anggaran 2009

lck  
lckC  
LP. 51/10  
Por  
M



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**Mekanisme Resistensi Isoniazid Pada *Mycobacterium tuberculosis* : Analisis Mutasi Gen *katG* dan Kaitannya Dengan Sifat Biokimia Enzim Katalase-Peroksidase Mutan Rekombinan**

Peneliti :  
Purkan, S.Si., M.Si  
Dr. Wiwin Retnowati, M.Kes  
Dessy Natalia, Ph.D

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional Nomor: 276/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

Universitas Airlangga  
Desember 2009

UNIVERSITY OF SINGAPORE

Faculty of Science  
Department of Chemistry  
100 Science Centre Road



UNIVERSITY OF SINGAPORE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
100 SCIENCE CENTRE ROAD

Department of Chemistry  
University of Singapore  
100 Science Centre Road  
Singapore 117570

Dr. A. R. Katnam  
Department of Chemistry  
University of Singapore  
100 Science Centre Road

Department of Chemistry  
University of Singapore  
100 Science Centre Road  
Singapore 117570

Department of Chemistry  
University of Singapore

# HALAMAN PENGESAHAN

1. JUDUL : Mekanisme Resistensi Isoniazid Pada *Micobacterium tuberculosis* : Analisis Mutasi Gen *katG* dan Kaitannya Dengan Sifat Biokimia Enzim Katalase-Peroksidase Mutan Rekombinan
2. Ketua Peneliti :
- a. Nama lengkap : Purkan, S.Si., M.Si
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. NIP : 132161176
- d. Pangkat / Golongan / : Pembina Tk I/ IVa
- e. Jabatan : Lektor Kepala
- f. Bidang Keahlian : Molekuler Biologi dan Enzim
- g. Fakultas / Jurusan / Puslit : F.Saintek / Kimia/ Unair
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga


## Tim Peneliti

NO.	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS / JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1	Dr. Wiwin Retnowati, M.Kes	Mikrobiologi	Kedokteran/ Mikrobiolgi	Unair
2	Dessy Natalia, Ph.D	Molekuler Biologi dan Enzim	MIPA/ Kimia	ITB

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian :
- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun
- b. Biaya yang diusulkan : Rp 200.000.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun I : Rp 100.000.000,-

Surabaya, 30 Oktober 2009  
Ketua Peneliti,



  
Purkan, S.Si., M.Si  
NIP. 132 161 176

Mengetahui  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
  
Dr. Bambang Sektiari L., DEA., drh  
NIP. 131837004



## RINGKASAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan menyebabkan kematian banyak penduduk dunia. Resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat dapat mempersulit pengobatan TB. *Multidrug resistant* (MDR) TB merupakan galur *M. tuberculosis* yang resisten terhadap minimal dua obat TB lini pertama, yaitu isoniazid dan rifampisin. Munculnya sifat MDR dapat dihasilkan dari akumulasi mutasi gen-gen yang menjadi target obat anti TB. Beberapa isolat klinis *M. tuberculosis* menunjukkan resisten isoniazid, tetapi penyebab resistensi tersebut masih belum diketahui. Penelitian ini bertujuan utama untuk mengungkap penyebab dan mekanisme resistensi isoniazid pada isolat klinis yang dimaksud melalui penentuan mutasi gen *katG* pada tingkat genotipe dan karakterisasi enzim katalase-peroksidase mutan pada tingkat protein; serta mempelajari keterkaitan antara mutasi gen *katG* dan aktivitas katalase-peroksidase mutan dengan tingkat resistensi isoniazid. Pada tahun pertama ini, penelitian telah diarahkan untuk mengidentifikasi keragaman mutasi gen *katG* pada koleksi isolat-isolat klinis dan menganalisis kaitan antara mutasi gen tersebut dengan tingkat resistensi secara *in silico*. Tahapan kerja pada penelitian tahun pertama terdiri atas amplifikasi gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis dan *wild type*, cloning gen pada vector pGemT, analisis restriksi DNA rekombinan pGemT-*katG* dan sekuensing gen *katG*, analisis mutasi, subkloning gen *katG* pada vector pET20b, dan resequensing gen *katG*. Gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis resisten isoniazid (L8, L19, L10, L21, R2 dan R9) yang berukuran 2,2 kb berhasil diamplifikasi dengan PCR menggunakan pasangan primer FG dan RG. Karakterisasi molekuler gen *katG* melalui tahapan kloning dan subkloning dapat menunjukkan adanya varian nukleotida pada gen *katG* isolat-isolat klinis tersebut. Mutasi nukleotida yang ditemukan pada gen *katG* isolat-isolat klinis ditengarai sebagai penyebab munculnya resistensi isoniazid. Hasil translasi *in silico* terhadap urutan nukleotida gen *katG* isolat-isolat klinis yang dipelajari menunjukkan bahwa mutasi asam amino pada bagian domain N protein KatG lebih cenderung meningkatkan efek resistensi isoniazid daripada mutasi yang terjadi pada bagian domain C. Mutasi yang mengubah residu asam amino yang dekat dengan residu-residu kritis protein KatG cenderung lebih meningkatkan efek resistensi daripada mutasi asam amino yang letaknya jauh dari sisi kritis. Mutasi yang mengubah residu amino di kedua domain N dan C protein KatG lebih cenderung meningkatkan efek resistensi isoniazid daripada mutasi pada salah satu domain. Makin banyak jumlah mutasi yang terdapat pada gen *katG*, kecenderungan meningkatkan tingkat resistensi isoniazid juga semakin tinggi. Perlu dilakukan penelitian lanjutan yang mengungkap aspek aktivitas enzim katalase-peroksidase *M. tuberculosis* terkait dengan ekspresi, purnaman dan karakterisasi protein KatG. Hal ini menjadi penting dalam upaya untuk mendapatkan konsep mekanisme resistensi isoniazid secara lebih komprehensif

## SUMMARY

Tuberculosis is an infectious disease which caused by *Mycobacterium tuberculosis* and kills many people in the world. Drug resistant of *M. tuberculosis* is serious problem on TB therapy. *Multi drug resistant* (MDR) TB mean as *M. tuberculosis* which has resistant phenotype toward two first line drugs, rifampin and isoniazid. The MDR phenotype of the strains comes from accumulation of mutation of anti TB drug-targeted genes. Some clinical isolates of *M. tuberculosis* have isoniazid resistant phenotype, but their causative have unknown yet. The aims of the research are to know the causative and mechanism of isoniazid resistance to clinical isolates by determining of *katG* mutation on genotype level and characterizing of mutant catalase-peroxidase activity on protein level, moreover to know the correlation between *katG* mutation profile as well as catalase-peroxidase activity with isoniazid resistance. In the first year, the work is oriented to identify mutation of *katG* gene belong to clinical isolates and analyze the correlation of *katG* mutation with isoniazid resistance through in silico analysis. The work steps for the research in the first year consist of amplifying of *katG* genes, cloning of *katG* gene on pGemT vector, restriction analyzing of recombinant DNA pGemT-*katG*, *katG* sequencing, mutation analyzing, subcloning of *katG* gen in the pET20b vector, and resequencing of *katG* in the last work. The *katG* gene of isoniazid resistant *M. tuberculosis* clinical isolates (L8, L19, L10, L21, R2 and R9) have 2.2 kb in size, had amplified well by PCR technique using a pair of primer FG and RG. Molecular characterization of *katG* gene through cloning and subcloning showed the variant on *katG* nucleotides of clinical isolates. Nucleotide mutations which found on *katG* gene of clinical isolate are assumed as prime causative of the isoniazid resistance appearance. In silico translation yield toward *katG* nucleotides sequence of clinical isolates showed the amino acid mutations in N domain of KatG protein are inclined increasing Isoniazid resistance comparing to mutation in C domain. Mutation which change amino acids near to critical residues of KatG protein is also inclined increasing Isoniazid resistance comparing to mutation in far region of critical sides. The mutations located in *katG* gene, which alter amino acid residues in both N and C domains of protein KatG leading to increase levels of isoniazid resistance in *M. tuberculosis* comparing to mutation in one of the domains. The increasing of the number of mutation in *katG* gene is inclined enhancing of Isoniazid resistance. Further research which explore the aspect of KatG protein activity related to expression, purification and characterization of KatG protein is needed to obtain the comprehensive mechanism of Isoniazid resistance.

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT. yang telah melimpahkan rahmat-Nya sehingga penelitian Hibah Penelitian Setrategis Nasional Tahun Anggaran 2009 yang berjudul “Mekanisme Resistensi Isoniazid Pada *Micobacterium Tuberculosis* : Analisis Mutasi Gen *katG* dan Kaitannya Dengan Sifat Biokimia Enzim Katalase-Peroksidase Mutan Rekombinan ” dapat diselesaikan.

Pada kesempatan yang sama, peneliti mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dirjen Dikti, Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini
2. Direktur Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Dikti yang telah memberi kesempatan untuk melakukan penelitian Hibah Bersaing XIII.
3. Rektor dan Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga yang telah memberi dukungan penuh
4. Dekan, Pimpinan Jurusan Kimia dan Kepala Laboratorium Biokimia F.Saintek Unair yang telah memberi dukungan penuh, fasilitas instrumen dan laboratorium
5. Dekan FMIPA, Pimpinan Program Studi Kimia dan Kepala Laboratorium Biokimia FMIPA ITB yang telah memberi izin atas penggunaan instrumen dan laboratorium

Semoga penelitian ini dapat bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, terutama bidang Bioteknologi dan kesehatan.

Surabaya, 30 Oktober 2009

Peneliti

## DAFTAR ISI

	Hal
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
<b>A. LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR IAMPIRAN	ix
<b>I PENDAHULUAN</b>	1
1.1. Latar belakang Penelitian	1
<b>II TINJAUAN PUSTAKA</b>	3
2.1 Kasus tuberkulosis	3
2.2. <i>M. tuberculosis</i> resisten obat anti TB	3
2.3. mutasi katG pada isolate klinis <i>M. tuberculosis</i> resisten Isoniazid	5
2.4. Enzim katalase-peroksidase <i>M. tuberculosis</i> dan kaitannya dengan resistensi isoniazid	7
<b>III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I</b>	9
3.1. Tujuan Penelitian	9
3.2. Manfaat Penelitian	9
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b>	11
4.1. Stategi penelitian	12
4.2. Prosedur Penelitian	12
4.2.1. Kultivasi isolat-isolat klini <i>M. tuberculosis</i>	12
4.2.2. Perancangan primer	12
4.2.3. Isolasi DNA genom <i>M. tuberculosis</i>	13
4.2.4. Amplifikasi gen katG <i>M. tuberculosis</i> dengan PCR	13
4.2.5 Kloning gen katG <i>M. tuberculosis</i> pada vektor T	14
4.2.6. Isolasi dan karakterisasi DNA plasmid rekombinan	15
4.2.7. Analisi restriksi plasmid rekombinan	15
4.2.8 Penentuan urutan nukleotida dan analisi mutasi secara <i>in silico</i>	15
4.2.9 Subkloning gen katG pada vektor pET20b	16
<b>V. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	17
5.1. Amplifikasi Gen <i>katG</i> penyandi Enzim Katalase-Peroksidase <i>M. tuberculosis</i>	17
5.1.1. Perancangan primer PCR	17
5.1.2. Hasil amplifikasi <i>katG M. tuberculosis</i> isolat klinis dan wild type	20
5.2. Kloning gen <i>katG</i> hasil PCR pada vektor pGemT	22
5.3. Hasil penentuan urutan nukleotida gen <i>katG</i>	23
5.4. Penentuan keragaman mutasi gen-gen <i>katG M. tuberculosis</i> isolat klinis resisten isoniazid	27
5.5. Subkloning gen <i>katG</i> pada vektor ekspresi pET20b	29
5.6. Keterkaitan antara mutasi gen <i>katG</i> dengan tingkat resistensi isoniazid	31



<b>V1 KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>34</b>
<b>6.1. Kesimpulan</b>	<b>34</b>
<b>6.2. Saran</b>	<b>34</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>35</b>
<b>LAMPIRAN</b>	<b>37</b>
<b>B. DAFTAR ARTIKEL ILMIAH</b>	

## DAFTAR TABEL

No	Judul	Hal
1	Gen-gen yang terlibat dalam pemunculan sifat resistensi obat pada <i>M. tuberculosis</i>	4
2	Jenis dan posisi mutasi yang ditemukan pada gen <i>katG</i> isolat <i>M. tuberculosis</i> resisten isoniazid	6
3	Jenis dan urutan nukleotida primer hasil perancangan secara <i>in silico</i>	17
4	Hasil analisis restriksi gen <i>katG M. tuberculosis H37Rv</i> secara <i>in silico</i> . Terdapat 143 Enzim restriksi yang tidak memotong gen <i>katG</i>	18
5	Urutan nukleotida primer yang digunakan untuk sekuensing gen <i>katG</i>	24
6	Profil mutasi gen <i>katG</i> dan proteinnya pada 6 isolat klinis <i>M. tuberculosis</i> resisten isoniazid yang dipelajari	26

## DAFTAR GAMBAR

No	Keterangan gambar	Hal
4.1	Diagram alir penelitian.	11
5.1	Peta plasmid pET20b	19
5.2	Skema penempelan primer PCR	19
5.3	Hasil amplifikasi gen <i>katG</i> dengan PCR pada suhu annealing 54 °C	20
5.4	Hasil amplifikasi <i>katG</i> dengan PCR pada suhu annealing 57 °C.	21
5.5	Hasil amplifikasi <i>katG</i> dengan PCR pada suhu annealing 56 °C.	21
5.6	Hasil analisis restriksi DNA rekombinan pGemT- <i>katG</i>	23
5.7	Hasil karakterisasi DNA rekombinan pGemT- <i>katG</i> dengan PCR.	23
5.8	Skema penentuan urutan nucleotida gen <i>katG</i> pada DNA rekombinan pGemT- <i>katG</i>	24
5.9	Elektroforegram hasil penentuan urutan nukleotida gen <i>katG</i> <i>M. tuberculosis wild type</i> (H37RV) dengan primer FG	25
5.10	Elektroforegram hasil penentuan urutan nukleotida gen <i>katG</i> <i>M. tuberculosis</i> isolat klinis L19 dengan primer FG	25
5.11	Urutan nukleotida hasil sekuensing gen <i>katG</i> <i>M. tuberculosis wild type</i> (H37RV) pada DNA rekombinan pGemT- <i>katG</i> dengan primer FG	26
5.12	Urutan nukleotida hasil sekuensing gen <i>katG</i> <i>M. tuberculosis</i> isolat klinis L19 pada DNA rekombinan pGemT- <i>katG</i> dengan primer FG	26
5.13	Elektroforegram hasil pensejajaran urutan nukleotida gen <i>katG</i> <i>M. tuberculosis</i> (H37RV gene bank, H37RV isolat perlakuan dan isolat klinis L19 resisten isoniazid)	27
5.14	Hasil analisis restriksi DNA rekombinan pET20b- <i>katG</i>	30
5.15	Profil residu-residu asam amino domain N dalam struktur kristal protein KatG yang berperan dalam aktivitas enzim katalase-peroksidase	32

## DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1 Hasil pensejajaran <i>katG M. tuberculosis wild type</i> dan isolat klinis	37

## I. PENDAHULUAN

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

### 1.1. Latar Belakang Penelitian

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit endemik yang menyerang hampir seluruh negara di dunia. Sebanyak 2 milyar manusia atau setara dengan sepertiga penduduk dunia terinfeksi tuberkulosis dan menyebabkan kematian sebanyak 4400 jiwa setiap hari [WHO report, 2007]. Indonesia merupakan negara terbesar ketiga di dunia setelah India dan Cina yang memiliki kasus tuberkulosis. Setiap tahun di negara ini, ditemukan sekitar 539.000 kasus baru TB dengan tingkat kematian sebanyak 101.000 jiwa. TB juga menjadi penyebab kematian terbesar ketiga di Indonesia setelah penyakit kardiovaskuler dan penyakit pernafasan, serta menjadi nomor satu dalam kelompok penyakit infeksi [Depkes, 2006]. Laju kematian penderita TB mengalami peningkatan semenjak munculnya kasus resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat anti TB (OAT). Kasus resistensi ini pada akhirnya dapat menyebabkan terjadinya epidemi TB sulit ditangani. Penelitian yang mengungkap penyebab resistensi obat pada isolat klinis *M. tuberculosis* sangat diperlukan untuk pengembangan terapi TB yang lebih tepat dan akurat.

*Multidrug resistant* (MDR) TB merupakan fenotipe resistensi *M. tuberculosis* terhadap minimal dua obat TB lini pertama, yaitu isoniazid dan rifampisin. Sifat MDR pada *M. tuberculosis* terutama dihasilkan dari akumulasi mutasi pada gen-gen yang menjadi target OAT [Rattan *et al.*, 1998]. Sebanyak 60-70% isolat klinis *M. tuberculosis* resisten isoniazid (*isonicotinic acid hydrazide*, INH) mengalami mutasi gen *katG* penyandi enzim katalase-peroksidase. Jenis dan posisi mutasi *katG* pada isolat-isolat klinis resisten isoniazid sangat beragam, selain ditemukan pada kodon-kodon domain N (kodon 55-422), juga ditemukan pada kodon-kodon domain C (423-735). Substitusi basa G944C yang mengubah kodon S315T merupakan jenis mutasi gen *katG* yang dominan pada isolat klinis resisten isoniazid tersebut, dengan frekuensi sekitar 50% [Smulevich *et al.*, 2006]. Noviana (2007) telah melaporkan pola resistensi isolat-isolat klinis lokal *M. tuberculosis* terhadap obat anti TB. Beberapa diantara isolat-isolat klinis tersebut dilaporkan bersifat MDR dan resisten isoniazid. Penyebab dan mekanisme resistensi isoniazid pada isolat-isolat klinis lokal ini masih belum diketahui, sehingga diperlukan penelitian yang lebih mendalam. Analisis keragaman mutasi gen-gen *katG* pada isolat-

isolat klinis lokal ini sangat diperlukan untuk mengetahui kaitan antara besarnya tingkat resistensi isoniazid dengan tingkat mutasi yang terdapat pada gen *katG*.

Katalase-peroksidase *M. tuberculosis* yang dikode oleh gen *katG*, merupakan satu-satunya enzim yang dapat mengoksidasi isoniazid (*prodrug*) menjadi bentuk aktifnya (*drug*) yang selanjutnya berfungsi sebagai senyawa anti mikobakteri. Meskipun perubahan aktivitas katalase-peroksidase akibat mutasi gen *katG* sering dikaitkan dengan munculnya resistensi isoniazid, akan tetapi belum banyak hasil riset yang menerangkan keterkaitan tersebut secara jelas. Karakterisasi terhadap aktivitas enzim katalase-peroksidase mutan sangat diperlukan untuk dapat mengungkap mekanisme resistensi isoniazid pada isolat klinis *M. tuberculosis*. Wengenack *et al* (2004) telah membandingkan karakter enzim KatG *native* yang berasal dari isolat klinis *M. tuberculosis* dengan enzim KatG rekombinan hasil ekspresi pada sel *Escherichia coli*. Dilaporkan bahwa KatG rekombinan memiliki karakter yang hampir sama terhadap KatG *native*-nya. Hal ini menunjukkan bahwa KatG rekombinan dapat digunakan sebagai model dalam mempelajari KatG *native* *M. tuberculosis*. Penelitian ini akan dilakukan untuk mendapatkan suatu konsep yang dapat menerangkan mekanisme resistensi isoniazid pada isolat klinis lokal *M. tuberculosis* MDR resisten isoniazid, terkait dengan mutasi gen *katG* sebagai penyebabnya dan perubahan aktivitas enzim katalase-peroksidase mutan pada tingkat protein, serta hubungan antara keduanya. Informasi tentang mutasi *katG* dan pengaruhnya terhadap aktivitas katalase-peroksidase, serta kaitan antara aktivitas enzim KatG mutan dengan resistensi isoniazid yang diperoleh dalam penelitian ini, diharapkan dapat memberi sumbangan pengetahuan yang berarti untuk dapat memahami mekanisme resistensi obat dan juga untuk keperluan disain obat tuberkulosis yang lebih potensial.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Kasus Tuberkulosis

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit endemik yang menyerang hampir seluruh negara di dunia. Penyakit ini disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Sebanyak 2 milyar manusia atau setara dengan sepertiga penduduk dunia terinfeksi tuberkulosis dan menyebabkan kematian sebanyak 4400 jiwa setiap hari. Diperkirakan 95% kasus TB dunia dan 98% kematian yang diakibatkannya terjadi pada negara-negara sedang berkembang. Munculnya pandemik HIV/AIDS di dunia menambah permasalahan TB, sebab koinfeksinya dengan HIV dapat meningkatkan risiko kematian dalam periode yang pendek. Pada saat yang sama, resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat anti TB (*multidrug resistant*) semakin menjadi masalah akibat kasus yang tidak berhasil disembuhkan. Keadaan tersebut pada akhirnya akan menyebabkan epidemi TB sulit ditangani [WHO report, 2007]. Indonesia merupakan negara terbesar ketiga di dunia setelah India dan Cina yang memiliki kasus tuberkulosis. Setiap tahun ditemukan sekitar 539.000 kasus baru TB di Indonesia dengan tingkat kematian sebanyak 101.000 jiwa. Selain itu, TB menjadi penyebab kematian terbesar ketiga di Indonesia setelah penyakit kardiovaskuler dan penyakit saluran pernafasan, serta menjadi nomor satu dalam kelompok penyakit infeksi tunggal [Depkes, 2006].

### 2.2. *M. tuberculosis* resisten obat anti TB

Kasus resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat anti TB (OAT) merupakan persoalan yang mempersulit pengobatan TB. Pola resistensi OAT terbagi menjadi dua macam, yaitu resistensi tunggal (satu obat) dan resistensi multi (lebih dari satu obat). *M. tuberculosis* yang resisten terhadap minimal dua obat anti TB lini pertama, yaitu isoniazid dan rifampisin dikenal sebagai galur *multidrug resistant* (MDR). Sebagian besar hasil riset menunjukkan bahwa penyebab resistensi *M. tuberculosis* terhadap antibiotik adalah adanya mutasi pada DNA kromosom mikobakteri tersebut. Gen-gen *M. tuberculosis* yang menjadi target obat anti TB dan yang bertanggung jawab terhadap munculnya sifat resistensi telah banyak diidentifikasi, diantaranya adalah *katG*, *rpoB*, *embB*, *gyrA*, *pncA* dan *rpsL* [Shi et al., 2005] (table 1).

**Table 1. Gen-gen yang terlibat dalam pemunculan sifat resistensi obat pada *M. tuberculosis*.**

Obat	Gen	Produk	Strain resisten yang dilaporkan* (%)	Rujukan
Rifampisin	<i>rpoB</i>	subunit $\beta$ RNA polymerase	>95	P, Rt, Sh
Isoniazid	<i>katG</i>	Katalase-peroksidase	60-70	Rt, Sh, Sm
	<i>oxyR-ahpC</i>	Alkil hidro-reduktase	~20	
INH-Etionamid	<i>inhA</i>	Enoil-ACP reduktase	<10	P, Rt
Streptomisin	<i>rpsL</i>	Ribosomal protein S12	60	P, Rt, Sh, Sm
	<i>rrs</i>	16s rRNA	<10	
Fluoroquinolon	<i>gyrA</i>	DNA girase	>90	Rt, Sh
Pirazinamid	<i>pncA</i>	Amidase	70-100	Rt, Sh
Etambutol	<i>embCAB</i>	EmbCAB	69	Rt, Sh,

\* Jumlah keseluruhan strain yang diteliti tidak disebutkan.

Keterangan : H = [Heym *et al.*, 1999]; P = [Parka *et al.*, 2005]; Rm = [Ramasmawy *et al.*, 1998]; Rt = [Rattan *et al.*, 1998]; Sh = [Shi *et al.*, 2005]; Sm = [Smulevich *et al.*, 2006]

Mutasi gen *rpoB* penyandi subunit  $\beta$  RNA polimerase (RNAP) dapat menyebabkan terjadinya resistensi terhadap rifampisin. Akibat mutasi ini, RNAP tidak dapat menjalankan proses transkripsi. Mutasi gen *rpoB* banyak ditemukan pada daerah 81 pb RRDR (*rifampicin resistant determining region*) dengan frekuensi paling sering terjadi pada kodon *rpoB526* dan *rpoB531*. Sekitar 60-70% galur *M. tuberculosis* resisten isoniazid disebabkan oleh mutasi gen *katG*, dan selebihnya disebabkan oleh adanya mutasi pada gen-gen *inhA*, *ahpC* dan *kasA* (Shi *et al.*, 2005). Mutasi gen *katG* penyandi enzim katalase-peroksidase pada galur *M. tuberculosis* resisten isoniazid dilaporkan paling sering terjadi pada kodon Ser315, dengan frekuensi sebesar 50% [Smulevich *et al.*, 2006]. Resistensi terhadap etambutol disebabkan oleh mutasi operon *embCAB* penyandi arabinosil transferase. Sebanyak 69 % isolat *M. tuberculosis* resisten EMB mengalami mutasi gen *embB*. Fluoroquinolon yang memiliki target di DNA gyrase, berperan penting dalam penanganan MDR-TB. Mutasi di gen *gyrA* penyandi subunit A DNA gyrase, sebuah topoisomerase II menghasilkan resisten FQ. Mutasi gen *pncA*



penyandi pirazinamidase/ nicotinamidase menghasilkan resisten pirazinamida. Sekitar 72-90% isolate klinis *M. tuberculosis* resisten PZA menunjukkan perubahan pada gen *pncA*. Antibiotik streptomycin (SM) menunjukkan pengaruhnya pada pembacaan proses translasi (*translational proof-reading*), yang menghasilkan penghambatan dalam proses sintesis protein. Mutasi yang berkaitan dengan *M. tuberculosis* resisten STR telah diidentifikasi dalam gen penyandi protein ribosomal S12 (*rpsL*) dan 16SrRNA (*rrs*) [Shi *et al.*, 2005].

Karakter fenotipe dan genotipe dari empat puluh dua isolat klinis MDR *M. tuberculosis* galur lokal telah dilaporkan oleh Noviana (2007). Profil fenotipe isolat-isolat klinis tersebut menunjukkan spesifikasi 7 isolat resisten rifampisin-isoniazid, 9 isolat resisten rifampisin-isoniazid yang disertai dengan resisten OAT lain (streptomisin, kanamisin, pirazinamid dan etambutol), dan 26 isolat resisten rifampisin-isoniazid dengan disertai 1-3 OAT lain. Karakterisasi genotipe telah dilakukan dengan mengidentifikasi mutasi nukleotida pada fragmen pada fragmen gen *rpoB* (450 pb) dan juga fragmen gen *katG* (292-450 pb) menggunakan teknik PCR multiplex dan penentuan urutan nukleotida. Sebanyak 16 isolat klinis *M. tuberculosis* MDR dilaporkan mengalami mutasi *rpoB526*, 15 isolat *rpoB531* dan 3 isolat *rpoB531+rpoB526*. Terdapat 26 isolat klinis resisten isoniazid tidak mengalami mutasi nukleotida pada kodon 315 gen *katG*. Mutasi di luar kodon 315 pada gen *katG* tersebut belum diidentifikasi, sehingga penyebab resistensinya terhadap isoniazid belum dapat diketahui. Identifikasi mutasi terhadap total gen *katG* yang berukuran 2.223 pb dari isolat-isolat ini diperlukan untuk mengetahui penyebab resistensinya terhadap isoniazid.

### 2.3. Mutasi *katG* pada isolat klinis *M. tuberculosis* resistensi isoniazid

Kajian molekuler gen *katG* menunjukkan bahwa sejumlah galur *M. tuberculosis* resisten isoniazid mengalami mutasi pada gen ini. Jenis dan posisi mutasi pada gen *katG* sangat beragam. Mutasi *katG* dapat ditemukan pada bagian yang menyandi domain N maupun domain C. Di antara mutasi pada *katG* ini, mutasi titik merupakan jenis yang dominan dibanding dengan mutasi delesi dan insersi. Mutasi G944C yang mengubah kodon S315T menunjukkan frekuensi terbesar, yaitu sekitar 50% [Smulevich *et al.*,

2006]. Beberapa jenis mutasi gen *katG* yang telah ditemukan pada isolat klinis *M. tuberculosis* resisten isoniazid dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Jenis dan posisi mutasi yang ditemukan pada gen *katG* isolat *M. tuberculosis* resisten isoniazid (Cardoso *et al.*, 2004)

Σ isolat*	Mutasi		MIC INH (µg/ml) & Σ isolat	Mutasi tambahan juga ditemukan pada gen
	Posisi dan jenis nukleotida	Asam amino		
1	Inseri A pada posisi 17	Frameshift	32	
1	T → C posisi 271	W <sub>91</sub> R	>32	
1	A → G posisi 290	H <sub>97</sub> R	8	
1	C → T posisi 326	A <sub>109</sub> V	16	<i>oxyR-ahpC</i>
1	C → T posisi 329	A <sub>110</sub> A	16	<i>inhA P</i>
1	C → T posisi 431	A <sub>144</sub> V	1	
2	A → G posisi 598	K <sub>200</sub> E	8, >32	<i>inhA P, oxyR-ahpC</i>
1	C → G posisi 695	P <sub>323</sub> R	32	<i>inhA P</i>
1	G → T posisi 761	R <sub>254</sub> L	NG	<i>kasA</i>
1	G → T posisi 817	G <sub>273</sub> C	>32	<i>oxyR-ahpC</i>
1	G → A posisi 836	G <sub>279</sub> D	>32	<i>inhA P, oxyR-ahpC</i>
1	C → G posisi 877	L <sub>293</sub> V	16	<i>inhA P</i>
1	G → A posisi 895	G <sub>299</sub> S	>32	<i>oxyR-ahpC, kasA</i>
1	A → C posisi 904	S <sub>302</sub> R	8	<i>oxyR-ahpC</i>
1	A → G posisi 943	S <sub>315</sub> G	8	<i>inhA P</i>
1	A → C posisi 943	S <sub>315</sub> R	>32	
49	G → C posisi 944	S <sub>315</sub> T	4 (23), 8 (15), 16 (5), 32 (3), >32 (3)	<i>inhA P, kasA</i>
7	G → A posisi 944	S <sub>315</sub> N	4 (3), 16, >32 (3)	<i>inhA P</i>
1	G → T posisi 944	S <sub>315</sub> I	16	
1	C → G posisi 945	S <sub>315</sub> R	32	
1	G → C posisi 1022	W <sub>341</sub> S	>32	<i>inhA P</i>
1	G → T posisi 1255	D <sub>419</sub> Y	16	<i>inhA P</i>
2	A → C posisi 1256	D <sub>419</sub> A	2, 8	<i>inhA P</i>
1	C → A posisi 1257	D <sub>419</sub> E	>32	<i>inhA, oxyR-ahpC</i>
1	Inseri T pada posisi 1311	Frameshift	>32	<i>oxyR-ahpC</i>
1	Inseri A pada posisi 1329	Frameshift	16	
1	C delesi pada posisi 1339	Frameshift	16	
1	G → T posisi 1388	R <sub>463</sub> L	>32 (2)	
1	G → A posisi 1468	G <sub>490</sub> S	16	
1	C → T posisi 1833	L <sub>611</sub> L	4	<i>inhA P</i>
1	Delesi setelah posisi 1845	NA	>32	<i>oxyR-ahpC, kasA</i>
1	T → G posisi 1985	L <sub>662</sub> R	32	
1	C delesi pada posisi 2139	Frameshift	>32	<i>oxyR-ahpC</i>
1	G → A posisi 2176	A <sub>726</sub> T	16	<i>inhA P</i>

\* Total isolat yang diteliti sebanyak 97 *M. tuberculosis* INH<sup>R</sup>. MIC INH untuk *Mtb* wt : 0,02 – 0,06 µg/mL

#### 2.4. Enzim Katalase-Peroksidase *M. tuberculosis* dan kaitannya dengan resistensi isoniazid

Katalase-peroksidase *M. tuberculosis* yang dikode oleh gen *katG* merupakan satu-satunya enzim yang dapat mengoksidasi isoniazid menjadi bentuk aktifnya berupa senyawa radikal reaktif. Dalam bentuk aktif ini, selanjutnya isoniazid (INH) bereaksi dengan NADH membentuk kompleks *adduct* INH-NAD. Komplek *adduct* yang terbentuk ini kemudian menghambat secara permanen kerja enzim enoil ACP-reduktase (*InhA*), yaitu salah satu enzim yang terlibat dalam biosintesis asam mikolat sebagai komponen dinding sel mikobakteri. Kerja enzim katalase-peroksidase yang demikian mengantarkan munculnya sifat sensitif *M. tuberculosis* terhadap isoniazid, sedangkan hilang atau berkurangnya aktivitas katalase-peroksidase dalam mengoksidasi isoniazid akibat mutasi gennya dapat memperantari munculnya sifat resistensi *M. tuberculosis* terhadap antibiotik tersebut.

Studi komplementasi gen *katG* pada mikobakteri *deficient katG* menunjukkan bahwa katalase-peroksidase berperan penting dalam pemunculan sifat resistensi isoniazid. Ekspresi gen *katG* pada *M. tuberculosis deficient katG* dapat mengembalikan fungsi enzim katalase-peroksidase dan mengubah sifat resisten menjadi sensitif isoniazid. Meskipun perubahan aktivitas katalase-peroksidase akibat mutasi gennya sering dikaitkan dengan munculnya resistensi isoniazid, akan tetapi belum banyak hasil riset yang dapat menerangkan keterkaitan tersebut secara jelas

Ekspresi mutan *katG* (T275P, S315T) pada *M. tuberculosis deficient katG* dapat memberi efek resistensi isoniazid, mutan *katG* (A139V) memberi efek sensitif. Mutan  $KatG^{T275P}$  tidak memiliki aktivitas katalase-peroksidase, mutan  $KatG^{S315T}$  mengalami penurunan sebagian aktivitas katalase-peroksidase, dan mutan  $KatG^{A139V}$  memiliki aktivitas enzim yang hampir sama dengan  $KatG^{WT}$ . Aktivitas katalase-peroksidase mutan  $KatG^{T275P}$  dan  $KatG^{A139V}$  berhubungan dengan tingkat resistensi isoniazid, tetapi sebaliknya untuk mutan  $KatG^{S315T}$  [Pym *et al.*, 2002]. Penurunan aktivitas katalase-peroksidase sangat berhubungan dengan peningkatan resistensi isoniazid [Rouse *et al.*, 1996]. Mutan *KatG* (R104L, H108Q, N138S, L148R, H270Q, T275P, W321G, D381G) hasil ekspresi di *M. bovis BCG deficient katG* memiliki aktivitas katalase-peroksidase yang setara dengan hasil ekspresi vektornya, tetapi lebih rendah dari aktivitas *wild type*-

nya. Penurunan aktivitas enzim ini sebanding dengan peningkatan daya hambat transforman BCG yang membawa mutan-mutan tersebut terhadap isoniazid. Sementara itu, mutan KatG (S140N, A350T, R463L, R463G dan L587M) yang memiliki aktivitas katalase-peroksidase lebih tinggi dari KatG<sup>WT</sup> dapat memberi efek sensitif isoniazid. Mutan KatG (S315T) memiliki penotipe antara, memiliki aktivitas peroksidase dan katalase serta menunjukkan daya hambat isoniazid yang sesuai dengan turunnya sebagian aktivitasnya.

Hubungan katalase-peroksidase dengan kemampuannya mengaktivasi isoniazid tidak menunjukkan pola yang konsisten. Hal ini dinyatakan oleh Wei *et al.*, (2003) setelah mengkarakterisasi mutan buatan KatG (A110V, A139P, S315N, L619P, L634F, dan D735A) hasil ekspresi pada sel *Escherichia coli*. Perbandingan sifat katalitik mutan <sup>RM</sup>KatG (*resistance mutant* KatG: R104L, H108Q, S315T) dengan mutan <sup>WTP</sup>KatG (*wild type phenotype* KatG: Y229F, R418L) hasil ekspresi pada sel *E. coli* terhadap *wild type*-nya, dan kaitan antara aktivitas mutan-mutan tersebut dengan resistensi isoniazid telah dilaporkan oleh Ghiladi *et al.*, 2005, yang menunjukkan bahwa tidak ada korelasi antara aktivitas katalase-peroksidase dengan resistensi isoniazid diantara mutan <sup>RM</sup>KatG dan <sup>WTP</sup>KatG. Keterkaitan aktivitas katalase-peroksidase mutan KatG dengan resistensi isoniazid pada koleksi isolat lokal klinis *M. tuberculosis* galur MDR masih belum diketahui, sehingga memerlukan kajian lebih lanjut.

### III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I

#### 3.1. Tujuan Penelitian

Pada intinya penelitian yang dilakukan ini memiliki tujuan utama untuk mengungkap penyebab dan mekanisme resistensi isoniazid pada isolat klinis lokal *M. tuberculosis* MDR melalui penentuan mutasi gen *katG* pada tingkat genotipe dan karakterisasi enzim katalase-peroksidase mutan pada tingkat protein; mempelajari pengaruh mutasi gen *katG* terhadap aktivitas enzim katalase-peroksidase mutan; serta mempelajari keterkaitan antara mutasi gen *katG* terhadap aktivitas enzim katalase-peroksidase mutan dan tingkat resistensi isoniazid. Tujuan utama penelitian ini akan dicapai dengan cara :

1. mengamplifikasi gen *katG* isolat-isolat klinis *M. tuberculosis* galur MDR dengan PCR
2. mengklon gen *katG* mutan pada sel *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  menggunakan vektor T
3. menentukan urutan nukleotida gen *katG* isolat-isolat klinis *M. tuberculosis* resisten isoniazid
4. mengidentifikasi keragaman mutasi gen *katG* pada isolat-isolat klinis *M. tuberculosis* galur MDR secara *in silico*
5. mensubklon dan mengekspresi gen *katG* mutan pada sel *Escherichia coli* UM262 *deficient katG* menggunakan vektor pET20b
6. mengkarakterisasi protein KatG mutan berkaitan dengan aktivitas katalase-peroksidase dan kemampuannya dalam mengoksidasi isoniazid
7. menganalisis keterkaitan antara mutasi gen *katG* dan aktivitas enzim katalase-peroksidase mutan dengan tingkat resistensi isoniazid (MIC<sup>INH</sup>) isolat klinis *M. tuberculosis* yang dipelajari

Tujuan nomor satu sampai lima menjadi target penelitian tahun pertama, sedang nomor enam dan tujuh menjadi target penelitian pada tahun kedua.

#### 3.2. Manfaat Penelitian

Informasi tentang mutasi *katG* dan pengaruhnya terhadap aktivitas katalase-peroksidase, serta kaitan antara aktivitas enzim KatG mutan dengan resistensi isoniazid

yang diperoleh dari penelitian ini, diharapkan dapat memberi sumbangan pengetahuan yang berarti untuk dapat memahami mekanisme resistensi obat dan juga untuk keperluan disain obat tuberkulosis yang lebih potensial. Pada tahun pertama, penelitian yang dilakukan ini memiliki keutamaan sebagai berikut :

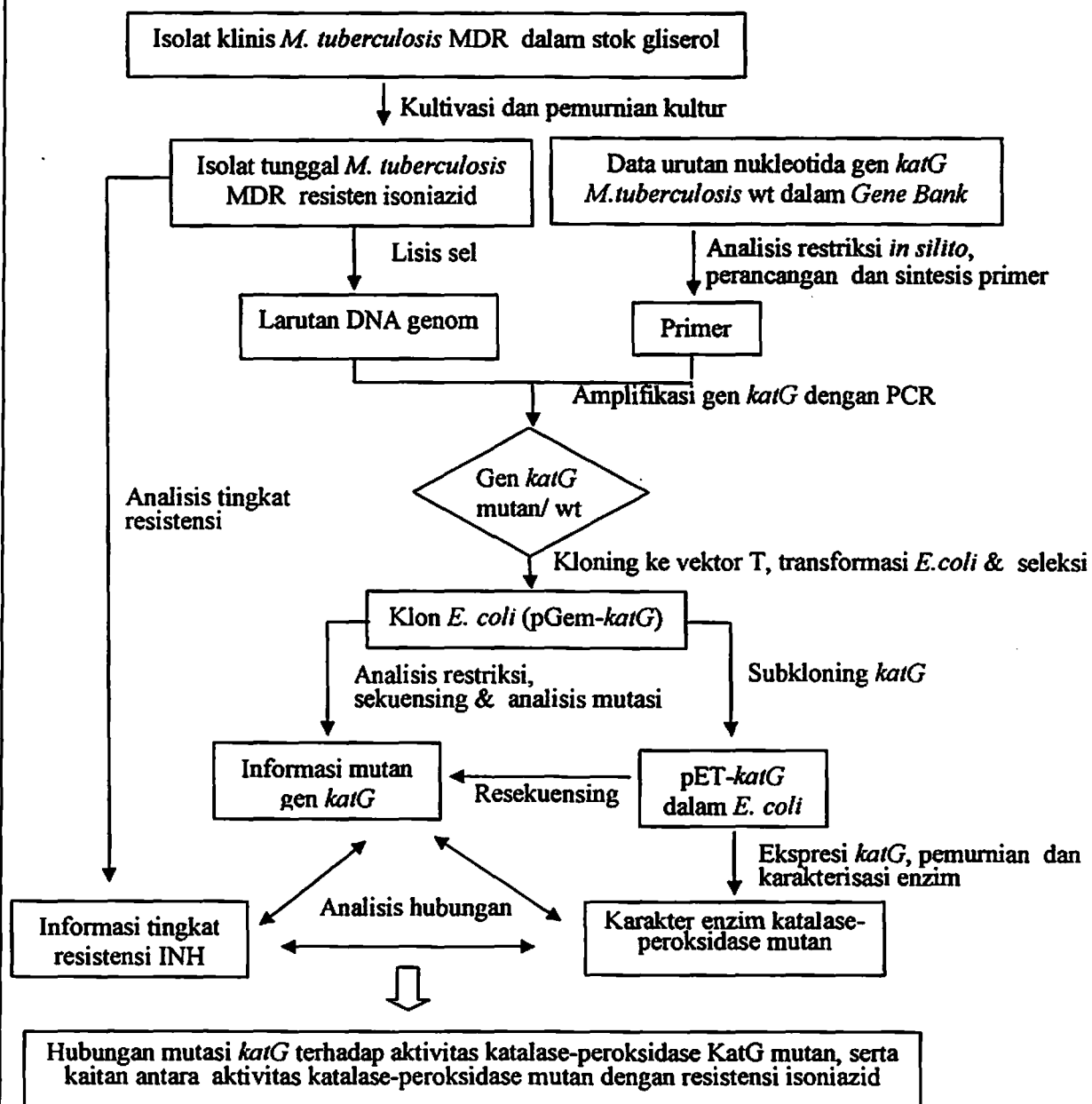
1. penelitian yang mengungkap penyebab resistensi obat pada isolat klinis *M. tuberculosis* sangat diperlukan untuk pengembangan terapi TB yang lebih tepat dan akurat.
2. analisis keragaman mutasi gen-gen *katG* pada isolat klinis lokal *M. tuberculosis* sangat diperlukan untuk mengetahui kaitan antara besarnya tingkat resistensi isoniazid pada isolat-isolat klinis yang dipelajari terhadap tingkat mutasi gen *katG*. Analisis keterkaitan antara mutasi gen *katG* dengan tingkat resistensi isoniazid sangat diperlukan untuk mendapatkan suatu konsep ilmu yang dapat menerangkan mekanisme resistensi isoniazid pada isolat klinis *M. tuberculosis* yang dipelajari.

## IV. METODE PENELITIAN

Untuk mencapai tujuan penelitian yang telah ditetapkan, dalam bab ini akan diuraikan strategi dan prosedur penelitian secara detail.

### 4.1 Strategi penelitian

Tahapan singkat penelitian yang akan dilakukan tercantum pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Diagram alir penelitian. Tahap yang dilakukan pada tahun pertama adalah kloning dan subkloning gen *katG* serta penentuan mutasi gen *katG*.

## 4.2 Prosedur Penelitian

Pada subbab ini diuraikan cara kerja yang dilakukan dalam tahap penelitian tahun pertama. Tahapan-tahapan tersebut terdiri atas perancangan primer, kultivasi isolat klinis *M. tuberculosis*, isolasi DNA genom, amplifikasi gen dengan teknik PCR, kloning gen dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  menggunakan vektor T, isolasi DNA plasmid, analisis restriksi, penentuan urutan nukleotida gen *katG*, analisis mutasi, subkloning gen *katG* dalam *E. coli* TOP10 menggunakan vektor pET20b, dan karakterisasi DNA rekombinan pET20b-*katG* melalui analisis restriksi dan resekuensing.

### 4.2.1. Kultivasi isolat-isolat klinis *M. tuberculosis*

Kultivasi ini dilakukan untuk mendapatkan sel *M. tuberculosis* dalam jumlah yang cukup banyak untuk sumber DNA genom. Sel *M. tuberculosis* yang berasal dari koloni tunggal dibiakkan pada media padat Lowenstein Jensen secara sebaran suspensi. Media padat miring Lowenstein Jensen tersusun atas larutan garam [0,4% (b/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,04% (b/v) MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1% (b/v) Mg-sitrat; 2% (b/v) gliserol; dan 0,1% (b/v) zat warna hijau malakit] dan larutan telur dengan perbandingan volume 1 : 2. Sebaran sel *M. tuberculosis* selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2-4 minggu. Sel-sel *M. tuberculosis* yang tumbuh selanjutnya digunakan sebagai sumber untuk isolasi DNA genom.

### 4.2.2. Perancangan Pimer

Sepasang primer yang akan digunakan untuk mengamplifikasi gen *katG*, dirancang secara langsung dari urutan nukleotida gen *katG* wild type *M. tuberculosis* H37Rv yang ada pada website ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) dengan Gene ID: 885638. Perancangan primer dilakukan secara *in silico* menggunakan program *DNA Star* dan *Clone Manager*. Terhadap urutan nukleotida gen *katG* *M. tuberculosis* yang diperoleh dari database, dilakukan analisis restriksi secara *in silico* dan digunakan sebagai templat dalam perancangan primer. Pasangan primer dirancang dengan mengikuti kaidah umum seperti perbandingan persen GC, homologi nukleotida kedua primer terutama pada ujung 3' dan panjang primer (18-28 basa).



The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all activities. It emphasizes that these records are essential for ensuring transparency and accountability in the organization's operations. The document also highlights the need for regular audits and reviews to identify any discrepancies or areas for improvement. Furthermore, it stresses the importance of clear communication and collaboration between all departments to ensure that everyone is working towards the same goals and objectives.

In addition, the document outlines the specific responsibilities of each department and the individuals within those departments. It provides a detailed overview of the organizational structure and the roles of key personnel. The document also discusses the various policies and procedures that govern the organization's operations, including those related to human resources, finance, and legal affairs. It emphasizes the need for all employees to adhere to these policies and procedures to ensure the organization's success and compliance with applicable laws and regulations.

The document concludes by reiterating the organization's commitment to excellence and its dedication to providing high-quality services to its customers. It expresses confidence in the organization's ability to overcome any challenges and achieve its long-term goals. The document is signed by the CEO and dated as of the date of the meeting. It is intended to serve as a guide for all employees and to ensure that everyone is on the same page regarding the organization's vision, mission, and values.

#### 4.2.3. Isolasi DNA genom *M. tuberculosis*

DNA genom *M. tuberculosis* diperlukan untuk templat pada proses amplifikasi gen *katG* dengan PCR. Penyediaan DNA genom *M. tuberculosis* galur MDR dan *wild type* H37Rv dilakukan dengan 2 cara, yaitu lisis sel dengan detergen dan metode lisis alkali menggunakan *wizard genomic DNA purification kit* (promega). Pada cara yang pertama, larutan DNA genom *M. tuberculosis* disediakan dengan melisis biakan sel *M. tuberculosis* yang berasal dari koloni tunggal dengan bufer yang mengandung tween-20 dan enzim proteinase-K selama 1 jam pada suhu 50 °C, kemudian dilanjutkan pada suhu 95 °C selama 5 menit.

Pada metode lisis alkali, Pelet sel *M. tuberculosis* diresuspensikan dengan EDTA 50 mM, ditambah lysozim dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah itu disentrifugasi selama 2 menit dan supernatan dibuang. Terhadap pelet sel ditambahkan larutan *Nucleic lysis Solution* dan *Protein Precipitation solution*. Setelah disentrifugasi selama 3 menit, terhadap supernatan ditambahkan isopropanol (suhu kamar) sehingga terbentuk endapan DNA. Endapan DNA yang terbentuk dicuci dengan etanol 70 %, lalu disentrifugasi selama 2 menit. Etanol dibuang dan pelet DNA yang ada dilarutkan dengan larutan *DNA Rehydration Solution* yang mengandung *RNase*. Hasil isolasi DNA kromosom dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa.

#### 4.2.4. Amplifikasi Gen *katG* *M. tuberculosis* dengan PCR

Amplifikasi gen *katG* telah dilakukan dengan teknik PCR. Campuran reaksi PCR dikerjakan dengan volume 25 µL yang mengandung 25 pmol baik primer maju maupun primer balik, 5 µL larutan templat, 1,25 unit *Taq*-DNA polymerase, bufer PCR 1x (10 mM Tris HCl pH 9; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl), dan dNTP (dGTP, dATP, dCTP, dan dTTP) dengan konsentrasi masing-masing 200 µM. Proses PCR dilakukan dengan mesin *DNA-thermal Cycler* (Perkin Elmer-Cetus) sebanyak 25 siklus, dengan masing-masing siklus terdiri atas tahap denaturasi pada suhu 94 °C 2 menit; tahap *annealing* pada suhu optimum selama 1 menit; dan tahap polimerisasi pada 72 °C selama 3 menit. Kondisi predenaturasi proses PCR ini akan dilakukan pada suhu 94 °C selama 7 menit, dan proses *extention* pada suhu 72 °C selama 7 menit. Hasil amplifikasi selanjutnya akan dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1% [0,4 gram agarosa

dalam 40 ml bufer TAE (1x) (tris-asetat 0,04 M; Na<sub>2</sub>EDTA 0,001 M, pH 8)] yang mengandung 0,6 mg/mL etidium bromida. Visualisasi hasil elektroforesis akan dilakukan dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 205 nm, dan didokumentasi dengan kamera. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap gen *katG Mtb H37Rv* (*wild type*, sensitif).

#### **4.2.5. Kloning gen *katG M. tuberculosis* hasil PCR dalam *E. coli* DH5 $\alpha$ menggunakan vektor T**

Kloning gen hasil PCR ini akan dilakukan melalui tahapan: pemurnian DNA hasil PCR, reaksi ligasi, transformasi *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , dan seleksi sel transforman untuk mendapatkan klon positif. Gen *katG* dalam larutan hasil PCR dimurnikan dengan *GFX PCR DNA Gel Band Purification kit* menurut prosedur yang ada pada buku manual sistem kit tersebut. Larutan hasil PCR dipisahkan terlebih dahulu dengan elektroforesis gel agarosa. Setelah visualisasi hasil elektroforesis, fragmen DNA yang berukuran 2.223 pb diekstraksi dari gel dengan cara sebagai berikut: gel yang mengandung fragmen DNA yang diinginkan dipotong secara preparatif, kemudian dilarutkan dalam bufer *capture* (asam asetat dan *chaotropic agent*) dengan perbandingan volume bufer : berat gel adalah 1  $\mu$ L : 1 mgr. Proses pelarutan dibantu dengan vortek selama 30 detik dan dipanaskan 65 °C selama 5-10 menit sampai larut sempurna. Larutan DNA 600  $\mu$ l yang mengandung agarosa dimasukkan ke dalam kolom GFX yang berisi matrik *fiber glass*, kemudian disentrifugasi satu menit. Matrik dicuci dengan bufer pencuci (campuran bufer Tris-HCl pH 8, Na<sub>2</sub>EDTA 2 mM dan etanol absolut) dan disentrifugasi ulang pada kondisi yang sama. Setelah itu gen *katG* dalam matriks dielusikan dengan penambahan bufer TE sebanyak volume tertentu.

Reaksi ligasi antara gen *katG* hasil pemurnian dengan vektor pGemT akan dilakukan menurut prosedur yang ada pada manual sistem vektor tersebut, dengan perbandingan molar DNA sisipan dan vektor adalah 8 : 1. Reaksi akan dilakukan dengan mencampurkan 5  $\mu$ L bufer ligasi 2x; 1  $\mu$ L (50 ng) vektor pGemT; 1  $\mu$ L enzim T4 DNA ligase 3 unit/ $\mu$ L; DNA sisipan sebanyak 150 ng; dan akuabides sampai volume akhir 10 mL. Campuran reaksi ligasi ini akan diinkubasi semalam pada suhu 4 °C, dan selanjutnya digunakan untuk mentransformasi *E. coli* DH5 $\alpha$  yang sebelumnya telah dibuat menjadi

sel kompeten menggunakan larutan  $\text{CaCl}_2$  dingin. DNA plasmid rekombinan akan dimasukkan ke dalam sel *E. coli* DH5 $\alpha$  kompeten dengan kejutan panas pada suhu 42 °C [Sambrook *et al.*, 1989]. Sel transforman yang membawa DNA rekombinan pGem-*katG* akan diseleksi dalam media selektif yaitu LB padat yang mengandung ampisilin, IPTG dan X-gal.

#### **4.2.6. Isolasi dan karakterisasi DNA plasmid rekombinan**

DNA plasmid rekombinan akan diisolasi dari koloni tunggal sel transforman yang berwarna biru. Koloni tunggal sel terlebih dahulu ditumbuhkan dalam 5 ml media LB cair yang mengandung ampisilin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lalu diinkubasi dalam *shaker* 150 rpm semalam pada suhu 37 °C. Suspensi biakan *E. coli* ini selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 g, suhu 4 °C selama 5 menit. Pelet sel yang diperoleh akan digunakan untuk isolasi DNA plasmid rekombinan pGem-*katG*. Proses isolasi DNA plasmid ini akan dilakukan dalam skala kecil dengan metode lisis alkali [Sambrook *et al.*, 1989]. Karakterisasi DNA plasmid dilakukan melalui pemotongan DNA plasmid rekombinan dengan beberapa enzim restriksi dan penentuan urutan nukleotida gen *katG*.

#### **4.2.7. Analisis restriksi plasmid rekombinan**

Sebanyak 2  $\mu\text{L}$  larutan DNA hasil PCR (setara dengan 300 ng DNA) dalam tabung *micro centrifuge* ditambahkan 2  $\mu\text{L}$  buffer restriksi 10X, dan 1  $\mu\text{L}$  enzim restriksi endonuklease yang sesuai 5 unit/ $\mu\text{L}$ . Campuran ini ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sampai mencapai volume 20  $\mu\text{L}$ . Campuran reaksi diinkubasi pada suhu optimum enzim (37 °C) 1 jam sampai 16 jam. Hasil reaksi pemotongan selanjutnya dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa.

#### **4.2.8. Penentuan urutan nukleotida dan analisis mutasi secara *in silico***

Urutan nukleotida gen *katG* hasil PCR akan ditentukan dengan metode dideoxy-Sanger menggunakan beberapa primer yang sesuai. Penentuan urutan nukleotida ini akan dilakukan melalui jasa analisis di Macrogen Inc, Seoul-Korea. Penentuan keberadaan mutasi pada gen *katG* isolat kinis *M. tuberculosis* MDR dilakukan dengan program *DNA Star* melalui penjajaran (*alignment*) antara urutan nukleotidanya dengan urutan

nukleotida gen *katG* *M.tuberculosis* H37Rv (*wild type*) dan gen *katG* isolat *M. tuberculosis* MDR resisten isoniazid.

#### 4.2.9. Subkloning gen *katG* dalam *E. coli* TOP10 menggunakan vektor pET20b

Penyiapan vektor linier dan DNA sisipan *katG* akan dilakukan dengan memotong baik vektor pET20b maupun DNA plasmid rekombinan pGem-*katG* dengan dua enzim restriksi yang sama, yaitu *EcoRI* dan *NotI*. Prosedur pemotongan ini adalah sama dengan yang ada pada tahap sebelumnya. Hasil pemotongan selanjutnya akan dielektroforesis, dan dimurnikan menggunakan metode *GFX PCR DNA Gel Band Purification kit*. Fragmen DNA yang berukuran 2.223 pb hasil pemotongan DNA plasmid rekombinan pGem-*katG* dengan *EcoRI* dan *NotI* lalu disambung dengan vektor pET20b linier menggunakan enzim T4 DNA ligase. Reaksi ligasi akan dilakukan sesuai dengan prosedur dalam manual *pET system*, dimana perbandingan molar antara DNA sisipan dengan vektor adalah 20 : 1. Hasil reaksi ligasi yang diperoleh, selanjutnya akan digunakan untuk mentransformasi sel inang *E. coli* TOP10. Seleksi transforman dilakukan dengan cara penumbuhan sel hasil transformasi dalam media LB padat yang mengandung ampisilin 100 µg/mL. Untuk karakterisasi lebih lanjut maka dilakukan pemotongan plasmid rekombinan pET-*katG* dengan beberapa enzim restriksi endonuklease dan juga penentuan kembali urutan nukleotida gen *katG*. Analisis restriksi dan penentuan urutan nukleotida gen *katG* ini, dikerjakan dengan mengikuti prosedur pada tahap sebelumnya.

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Amplifikasi Gen *katG* penyandi Enzim Katalase-Peroksidase *M. tuberculosis*

#### 5.1.1. Perancangan primer PCR

Amplifikasi gen katalase-peroksidase memerlukan sepasang primer. Sepasang primer dirancang sedemikian rupa, sehingga proses amplifikasi gen *katG M. tuberculosis* baik resisten maupun sensitif isoniazid (*wild type*) yang dilakukan dengan teknik PCR, dapat menghasilkan fragmen DNA yang merupakan seluruh bagian *ORF* gen *katG M* mulai *start* kodon tetapi tanpa kodon terminasi. Pasangan primer ini dirancang secara langsung dari urutan nukleotida gen *katG wild type M. tuberculosis H37Rv* sensitif yang ada pada database (*Gene ID: 885638*). Perancangan primer yang dilakukan secara *in silico* dengan program *DNA Star* dan *Clone Manager* telah menghasilkan pasangan primer FG dan RG dengan urutan nukleotida sebagaimana terlihat pada tabel 3.

Tabel 3. Jenis dan urutan nukleotida primer hasil perancangan secara *in silico*

Nama Primer	Urutan 5'→3'	Ukuran nukleotida	Arah	Tm	Urutan pengenalan enzim restriksi	Urutan adapter
FG	<u>GTTATTGAATTC</u> <u>GATGCCCGAGC</u> <u>AACACCCAC</u>	32	maju	60 °C	G↓AATTC ( <i>EcoRI</i> )	GTTATT
RG	<u>TTCATAGCGGCC</u> <u>GCGCGCACGTC</u> <u>GAACCTGTC</u>	32	balik	60 °C	GC↓GGCCGC ( <i>NotI</i> )	TTCATA

Bagian nukleotida pada primer FG dan RG yang bergaris bawah merupakan bagian nukleotida yang berasal dari gen *katG M. tuberculosis wild type*, dan yang ditulis miring merupakan bagian nukleotida dari sisi pengenalan enzim restriksi *EcoRI* dan *NotI*. Sedangkan nukleotida yang dicetak tegak merupakan oligonukleotida adapter yang ditambahkan pada masing-masing primer. Penambahan urutan pengenalan *EcoRI* pada primer FG dan *NotI* pada RG dilakukan untuk mengatur ketepatan penyisipan gen *katG* hasil PCR ke dalam plasmid pET20b, yang akan digunakan sebagai vektor ekspresi. Penyisipan sebuah basa G pada urutan ke 13 dari urutan nukleotida primer FG juga dilakukan pada perancangan primer ini, dengan tujuan untuk mengatur ketepatan ekspresi

gen *katG* secara benar (*in frame*). Penggantian *start* kodon GTG gen *katG M. tuberculosis wild type* menjadi ATG pada perancangan primer FG dilakukan untuk disesuaikan dengan *codon usage* dari *Escherichia coli* yang akan digunakan sebagai sel inang dalam ekspresi gen tersebut.

Hasil analisis restriksi gen *katG H37RV* secara *in silico* menggunakan program MapDraw, DNASTar menunjukkan bahwa enzim restriksi *EcoRI* dan *NotI* tidak memotong gen *katG* (tabel 4). Kedua enzim restriksi tersebut memiliki situs pemotongan pada MCS (*Multiple Cloning Sites*) plasmid pET20b (gambar 5.1). Oleh karena itu situs kedua enzim restriksi tersebut dapat dimanfaatkan sebagai linker pada primer FG dan RG.

**Tabel 4. Hasil analisis restriksi gen *katG M. tuberculosis H37Rv* secara *in silico*. Terdapat 143 Enzim restriksi yang tidak memotong gen *katG***

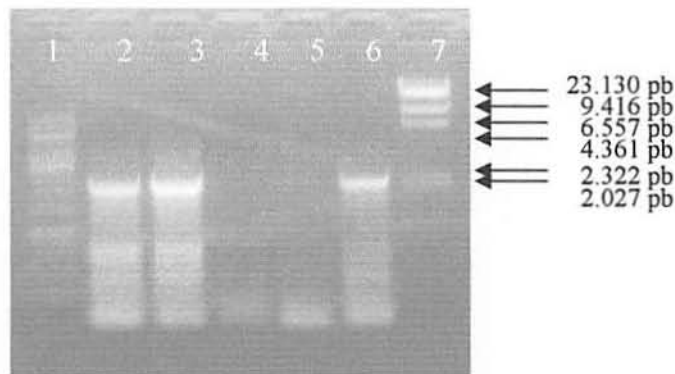
Aaq I	Bcu I	BspH I	Dra III	Spe I	Sna I
Aar I	Bfi I	BspJ106 I	Drd I	M.NgoB IX	SnaB I
Abe I	BfrB I	BspLU11 I	Drd II	Mfe I	Srf I
Aca I	Bgl II	BspLU11 II	Eca I	Mun I	Sru57 I
Acc65 I	Bli49 I	BsrBR I	EciA I	Ncr I	Sru8 I
Acs I	Blp I	BsrD I	EciE I	Not I	Sse232 I
Ade I	Bma I	BsrG I	EclHK I	Nsi I	Sse8387 I
Afl IV	BmeT I	Eco VIII	EcoA I	Pac I	Sse8647 I
Alo I	Bmr I	Eco31 I	EcoD I	Pfu I	Sso I
Alw44 I	Bpl I	Eco72 I	EcoD XXI	Pme I	Ssp I
Apa I	Bpu10 I	Eco82 I	EcoDR 3	Ppe I	StyLT I
ApaL I	Bsa I	BssS I	EcoE I	Ppi I	StyLT III
Apo I	Bsa XI	Bst1107 I	EcoR I	Ppu10 I	StySK I
Ase I	BsaK I	Bst29 I	EcoR V	Psi I	StySQ
Asp52 I	BsaM I	BstE II	EcoR124 I	Psp1406 I	Swa I
AtuC I	BscJ I	BstHP I	EcoRD 2	PspOM I	Syn II
Ava III	Bse59 I	BstX I	EcoRD 3	Pvu I	Taq II
Avr II	BseM I	BstZ2 I	Ecoprr I	Rhc I	Tth111 II
Bbr I	BseR I	Bsu36 I	Fse I	RleA I	Uba1221 I
BbvC I	BshL I	CciN I	Hal I	Sca I	Uba1382 I
Bce83 I	BsiW I	CfrA I	Hind III	Sdi I	Vsp I
Bci VI	BsmG I	Csp I	Hpa I	Sfi I	Xba I
Bcl I	Bsp87 I	Csp45 I	Kpn I	Sgf I	Xmn I
Bco63 I	BspG I	Dra I	M.Mxa879 I	SmaA I	





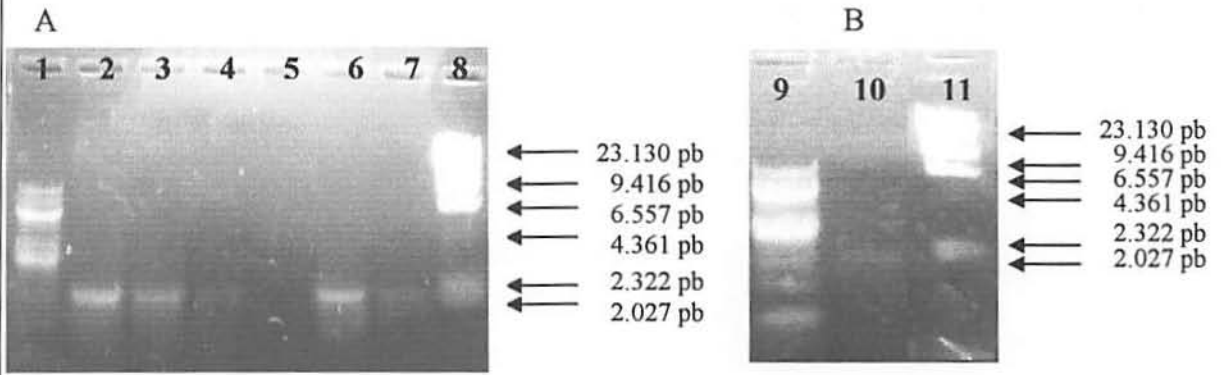
### 5.1.2. Hasil amplifikasi *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis dan wild type dengan PCR

Amplifikasi gen-gen *katG* dilakukan menggunakan DNA templat, berupa larutan DNA hasil lisis isolat *M. tuberculosis wild typed* dan isolat-isolat klinis resisten isoniazid. Beberapa isolat klinis telah diamplifikasi gen *katG*-nya. Hasil amplifikasi gen-gen *katG* dengan PCR menggunakan pasangan primer FG dan RG dapat menghasilkan pita DNA berukuran 2,2 kb (5.3-5.5). Hasil ini menandakan bahwa seluruh tahap dalam proses PCR berlangsung dengan baik. Optimasi suhu *annealing* dalam proses amplifikasi dilakukan dengan suhu 54-57 °C. Gambar 5.3, menunjukkan hasil amplifikasi gen *katG* dengan suhu annealing 54 °C. Beberapa pita DNA dihasilkan pada gel elektroforesis.



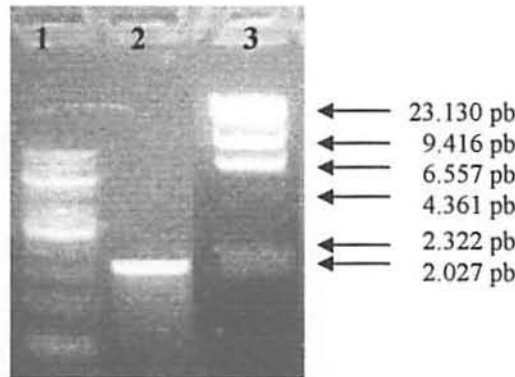
**Gambar 5.3. Hasil amplifikasi gen *katG* dengan PCR pada suhu annealing 54 °C.** Lajur 1, marker 1 kb ladder; lajur 2, 3 dan 4, hasil amplifikasi menggunakan templat larutan DNA *Mtb* H37RV; lajur 5, hasil amplifikasi menggunakan templat larutan DNA isolat klinis L21; Lajur 6, hasil amplifikasi menggunakan templat larutan DNA isolat klinis R9; lajur 7, marker DNA  $\lambda$ /*Hind*III. Gen *katG* hasil PCR memiliki ukuran 2,2 kb.

Oleh karena banyak pita DNA yang dihasilkan pada proses amplifikasi dengan suhu 54 °C, maka dilakukan PCR dengan suhu annealing pada suhu 57 °C untuk meningkatkan sensitifitas penempelan primer. Hasil PCR pada kondisi ini dapat menghasilkan data elektroforegram pada gambar 5.4 a dan b.

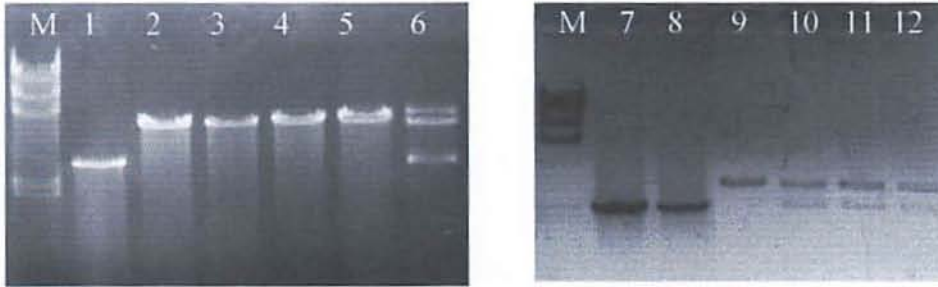


**Gambar 5.4. Hasil amplifikasi *katG* dengan PCR pada suhu annealing 57 °C.** Lajur 1 dan 9, Marker 1kb leader, lajur 2, hasil amplifikasi menggunakan templat larutan DNA *Mtb* H37RV; lajur 3, hasil amplifikasi menggunakan templat larutan DNA *Mtb* isolat klinis L8; lajur 4, hasil amplifikasi menggunakan templat larutan DNA *Mtb* isolat klinis L10; lajur 5, hasil amplifikasi menggunakan templat larutan DNA *Mtb* isolat klinis L18; lajur 6, hasil amplifikasi menggunakan templat larutan DNA *Mtb* isolat klinis L19; lajur 7, hasil amplifikasi menggunakan templat larutan DNA *Mtb* isolat klinis L21; dan lajur 8 dan 11, marjer DNA  $\lambda$ *Hind*III; lajur 10, hasil amplifikasi menggunakan templat larutan DNA *Mtb* isolat klinis R2.

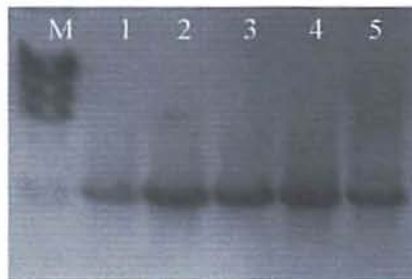
Pada gambar 5.4 dapat diketahui bahwa amplifikasi gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis L10 kurang berlangsung optimal pada suhu *annealing* 57 °C. Penggunaan suhu *annealing* 56 °C pada amplifikasi gen tersebut dapat menghasilkan pita gen *katG* yang cukup tebal pada elektroforesis gel agarosa (gambar 5.5).



**Gambar 5.5. Hasil amplifikasi *katG* dengan PCR pada suhu annealing 56 °C.** Lajur1, Marker 1kb leader, lajur 2, hasil amplifikasi menggunakan templat larutan DNA *Mtb* isolat klinis L10; lajur 3, DNA  $\lambda$ *Hind*III.



**Gambar 5.6. Hasil analisis restriksi DNA rekombinan pGemT-*katG*.** Lajur M, pita DNA  $\lambda$ /Hind III; lajur 1 dan 9, pita pGemT/NdeI (3.0 kb); lajur 2-6, pita pGemT-*katG* (H, L8,L19, R2 dan R9)/ EcoRI; lajur 7-8, pita gen *katG* hasil PCR untuk kontrol ( $\pm$  2.2 kb); lajur 10-12, pita pGem-*katG* / EcoRI + Not I (isolat H, L8 & L10).



**Gambar 5.7. Hasil karakterisasi DNA rekombinan pGemT-*katG* dengan PCR.** Lajur M, pita DNA  $\lambda$ /Hind III; lajur 1-5 : pita gen *katG* (isolat L8, L10, L19, L21, R2) hasil PCR menggunakan templat DNA rekombinan pGem-*katG*

Hasil analisis restriksi pada ke dua gambar 5.6 dan 5.7 di atas menunjukkan bahwa masing-masing gen *katG* (2.2 kb) baik dari isolat klinis maupun *wild type M. tuberculosis* telah terinsersi pada vektor pGem T.

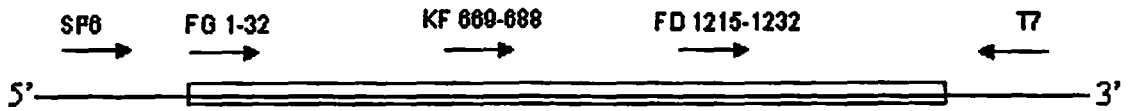
### 5.3. Hasil penentuan urutan nukleotida gen *katG*

Penentuan urutan nukleotida gen-gen *katG M. tuberculosis* isolat klinis dan *wild type* yang terdapat pada DNA rekombinan pGemT-*katG*, dilakukan dengan 5 jenis primer menurut skema pada gambar 5.8. Sekuensing ini dilakukan pada Macrogen Inc, Korea Selatan. Urutan nukleotida kelima jenis primer untuk sekuensing ini dapat dilihat pada tabel 5.

## 5.2. Kloning gen *katG* hasil PCR pada vektor pGemT

Fragmen DNA *katG* hasil PCR memiliki nukleotida A pada ujung 5'-nya, sedang vektor pGemT memiliki nukleotida T pada ujung 3'. Insersi *katG* ke vektor pGemT dapat membentuk pasangan yang komplemen. Fragmen DNA *katG* hasil PCR setelah dimurnikan dengan *GFX purification kit*, diinsersikan ke vektor pGemT menggunakan enzim T4 DNA ligase. Pada penelitian ini, reaksi ligasi gen *katG* dengan vektor pGemT dilakukan dengan perbandingan mol sebanyak 8:1. Hasil reaksi ligasi ini kemudian digunakan untuk menstransformasi *E. coli* DH5 $\alpha$ . Seleksi transforman dilakukan dengan penumbuhan sel hasil transformasi pada media LB padat yang mengandung ampisilin, IPTG dan X-Gal. Koloni putih dan biru *E. coli* dapat diperoleh pada transformasi ini. Penentuan klon *E. coli* positif yang membawa DNA plasmid rekombinan (pGemT-*katG*) dilakukan dengan cara mengisolasi DNA plasmid rekombinan dari koloni-koloni putih, dan dilanjutkan dengan pemotongan DNA plasmid dengan beberapa enzim restriksi. Selain itu, karakterisasi DNA plasmid rekombinan juga dilakukan dengan PCR.

Hasil insersi gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis dan *wild type* ke dalam vektor pGemT dapat diterangkan melalui gambar 5.6. Pemotongan tunggal DNA rekombinan pGemT-*katG* dengan enzim restriksi *EcoRI*, dapat menghasilkan sebuah pita DNA berukuran 5,2 kb (lajur 2-5). Fragmen DNA ini dapat terbentuk oleh karena adanya gabungan antara gen *katG* yang berukuran 2,2 kb (lajur 7-8) dengan vektor pGemT yang berukuran 3,0 kb (lajur 1 atau 9). Sedangkan pemotongan ganda DNA rekombinan yang berukuran 5,2 kb tersebut, dengan enzim *EcoRI* dan *NotI* dapat menghasilkan dua pita DNA berukuran 2,2 kb dan 3,0 kb. Kedua pita DNA tersebut sesuai dengan ukuran gen *katG* dan vektor pGemT. Karakterisasi DNA plasmid rekombinan pGemT-*katG* yang telah dilakukan dengan PCR menggunakan primer FG dan RG mampu menghasilkan sebuah pita DNA tebal berukuran 2,2 kb (lajur 1-5 pada gambar 5.7). Munculnya produk PCR ini menunjukkan bahwa gen *katG* telah terinsersi ke dalam vektor pGemT.

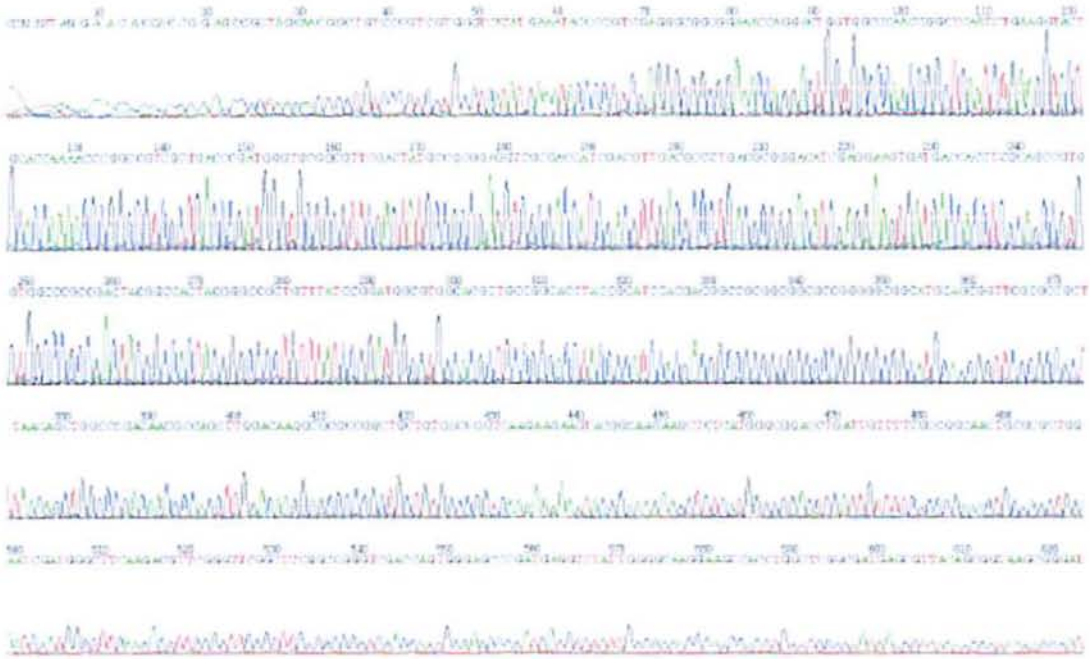


**Gambar 5.8.** Skema penentuan urutan nukleotida gen *katG* pada DNA rekombinan pGemT-*katG*. Nukleotida gen *katG* ditentukan urutannya menggunakan dua primer eksternal (SP6 dan T7) serta tiga primer internal (FG, KF dan FD).

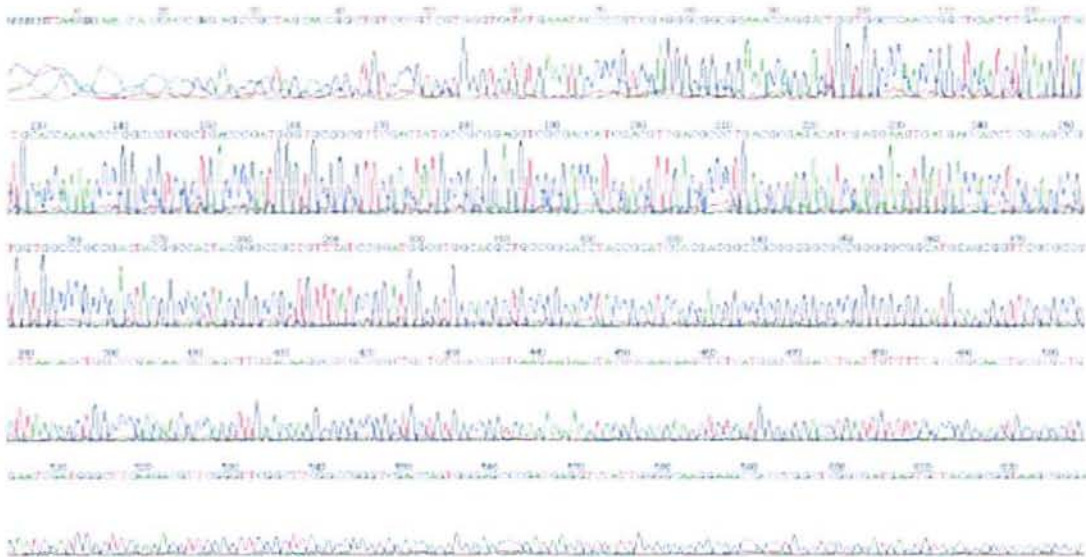
**Tabel 5.** Urutan nukleotida primer yang digunakan untuk sekuensing gen *katG*

No	Name of Primer	Nucleotide sequence of primers (5' → 3')
1.	SP6 promoter	CATACGATTTAGGTGACACTATAG
2.	T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
3.	FG	GTTATTGAATTCGATGCCCGAGCAACACCCAC
4.	KF	GCAGATGGGGCTGATCTACG
5.	FDPRK	CGACGAGTTCGCCAAGGC

Gabungan kelima jenis primer di atas dapat membaca sebanyak  $\pm 2.300$  nukleotida, yang didalamnya terdapat urutan nukleotida gen *katG* sebanyak 2.223 nukleotida. Gen *katG* dari enam isolat klinis dan sebuah isolat *wild type* telah berhasil ditentukan urutan nukleotidanya. Setiap reaksi sekuensing menghasilkan sebuah elektroforegram. Banyak data elektroforegram telah diperoleh pada tahap sekuensing ini. Sebagai perwakilan, maka ditampilkan data elektroforegram hasil sekuensing gen *katG M tuberculosis wild type* dan isolat klinis resisten isoniazid (L19) dengan primer FG (gambar 5.9 dan 5.10).



Gambar 5.9. Elektroforegram hasil penentuan urutan nukleotida gen *katG* *M. tuberculosis* wild type (H37RV) dengan primer FG. Nukleotida C diwakili warna biru, G (hitam), A (hijau) dan T (merah).



Gambar 5.10. Elektroforegram hasil penentuan urutan nukleotida gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis L19 dengan primer FG

Kedua elektroforegram hasil sekuensing gen *katG* diatas memiliki urutan nukleotida dalam format *text file* sebagaimana pada gambar 5.11.dan 5.12

```
>090128-17_023_pGEM-katG_H-FG.ab1 908
CCNNTTANGAACACCACCGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCGTCGTGGGTTCATATGAAATACCCCGTCGA
GGGCGGCGGAAACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGTAAGTGCACCAAACCCGGCCGTCG
CTGACCCGATGGGTGCGGCGTTTCGACTATGCCGCGGAGGTTCGCGACCATCGACGTTGACGCCCTGACGCGG
GACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCCGACTACGGCCACTACGGGCGCGTGT
TATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGACGGCCGCGGGCGCCGGGGCGGCA
TGCAGCGGTTTCGCGCCGCTTAACAGCTGGCCGACAACGCCAGCTTGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGG
CCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACCTGATTGTTTTTCGCCGGCAACTGCGCGCT
GGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTTCGGGTTTCGGCTTCGGCCGGGTTCGACCAGTGGGAGCCCAGTGGTCT
ATTGGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGGCGATGAGCGTTACAGCGGTAAGCGGGATCTGGAGAACCCGCTG
GCCGCGGTGCAGATGGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGGGGCCGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCCGC
GGCGGTTCGACATTCGCGAGACGTTTCGGCGCATGGCCATGAACGACGTCGAAACAGCGGGCGCTGATCGTCG
GCGGTACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGGTTCGGCCCCGAACCCGAGGCTGCT
CCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCCGGAACCGGTA
```

**Gambar 5.11. Urutan nukleotida hasil sekuensing gen *katG* *M. tuberculosis* wild type (H37RV) pada DNA rekombinan pGemT-*katG* dengan primer FG**

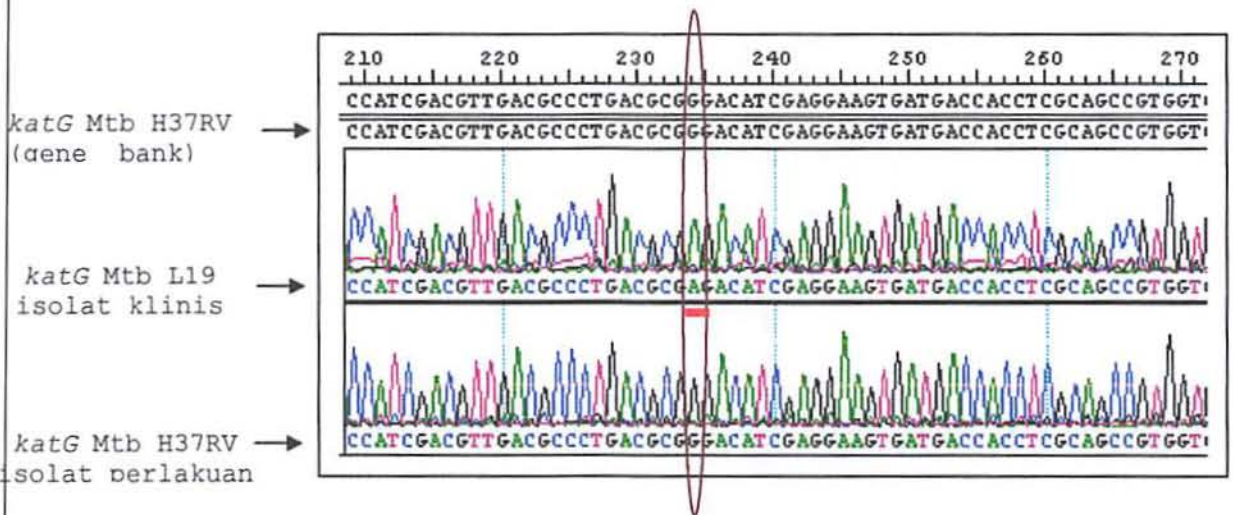
```
>090128-17_J24_pGEM-katG_L19-FG.ab1 894
NNNNNTTAANGGAAACACCACCGNGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCGTCGTGGGTTCATATGAAATACCC
CGTCGAGGGCGGCGGAAACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGTAAGTGCACCAAACCCGG
CCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTTCGACTATGCCGCGGAGGTTCGCGACCATCGACGTTGACGCCCTG
ACGCGAGACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCCGACTACGGCCACTACGGGCC
GCTGTTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGACGGCCGCGGGCGCCGGGG
GCGGCATGCAGCGGTTTCGCGCCGCTTAACAGCTGGCCGACAACGCCAGCTTGACAAGGCGCGCCGGCTG
CTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACCTGATTGTTTTTCGCCGGCAACTG
CGCGCTGGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTTCGGGTTTCGGCTTCGGCCGGGTTCGACCAGTGGGAGCCCAGT
AGGTCTATTGGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGGCGATGAGTGTACAGCGGTAAGCGGGATCTGGAGAAC
CCGCTGGCCGCGGTGCAGATGGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGGGGCCGAACGGCAACCCGGACCCCAT
GGCCGCGGCGGTTCGACATTCGCGAGACGTTTCGGCGCATGGCCATGAACGACGTCGAAACAGCGGGCGCTGA
TCGTTCGGCGGTACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCGCCGATCTGGTTCGGCCCCGAACCCGAG
GCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCG
```

**Gambar 5.12. Urutan nukleotida hasil sekuensing gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis L19 pada DNA rekombinan pGemT-*katG* dengan primer FG**

Urutan-urutan nukleotida gen-gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis dan *wild type* yang diperoleh pada tahap sekuensing ini, selanjutnya digunakan untuk proses pensejajaran dalam upaya menentukan keragaman mutasi pada gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis resisten isoniazid.

#### 5.4. Penentuan keragaman mutasi gen-gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis resisten isoniazid

Untuk menentukan adanya mutasi pada gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis resisten isoniazid, maka dilakukan pensejajaran urutan nukleotida gen-gen *katG* isolat klinis tersebut terhadap urutan nukleotida gen *katG* *M. tuberculosis* *wild type*. Dalam pensejajaran ini juga digunakan pembandingan urutan nukleotida gen *katG* yang berasal dari *gene bank*. Proses pensejajaran dilakukan menggunakan *software SeqMan Program DNA Star*. Hasil pensejajaran gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis terhadap gen *katG* *wild type* secara lengkap dicantumkan pada bagian lampiran. Elektroforegram pada gambar 5.13 merupakan contoh hasil pensejajaran gen *katG* isolat klinis L19 terhadap *katG* *wild type*.



Gambar 5.13. Elektroforegram hasil pensejajaran urutan nukleotida gen *katG* *M. tuberculosis* (H37RV *gene bank*, H37RV *isolat perlakuan* dan *isolat klinis* L19 resisten isoniazid)

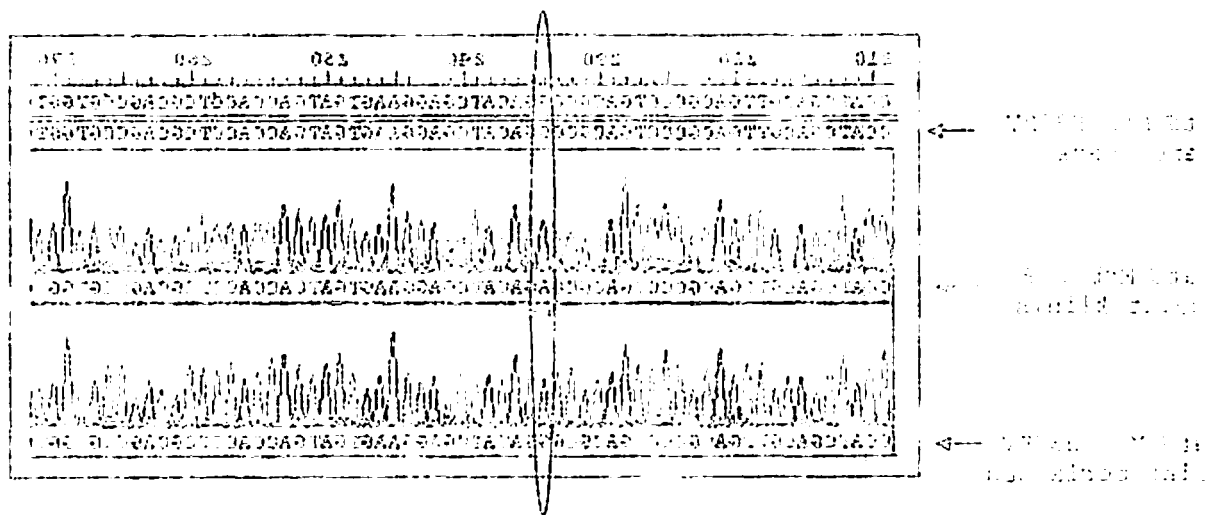


1. Untuk membandingkan hasil penelitian mengenai pengaruh faktor-faktor tersebut terhadap kemampuan adaptasi organisme terhadap lingkungan yang berubah-ubah, maka dilakukan percobaan dengan menggunakan media kultur yang berbeda-beda. Hasil penelitian tersebut akan disajikan dalam bab 4.4.4.

#### 4.4.4. Penelitian mengenai pengaruh faktor-faktor tersebut terhadap kemampuan adaptasi organisme terhadap lingkungan yang berubah-ubah

Untuk mengetahui pengaruh faktor-faktor tersebut terhadap kemampuan adaptasi organisme terhadap lingkungan yang berubah-ubah, maka dilakukan percobaan dengan menggunakan media kultur yang berbeda-beda. Hasil penelitian tersebut akan disajikan dalam bab 4.4.4. Penelitian mengenai pengaruh faktor-faktor tersebut terhadap kemampuan adaptasi organisme terhadap lingkungan yang berubah-ubah, maka dilakukan percobaan dengan menggunakan media kultur yang berbeda-beda. Hasil penelitian tersebut akan disajikan dalam bab 4.4.4.

100



Gambar 4.4.4. Penelitian mengenai pengaruh faktor-faktor tersebut terhadap kemampuan adaptasi organisme terhadap lingkungan yang berubah-ubah (hasil penelitian)

Elektroforegram pada gambar 5.13 menunjukkan adanya perbedaan nukleotida gen-gen *katG* yang disejajarkan. Nukleotida gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis L19 adalah A, sedangkan pada *M. tuberculosis* H37RV *gene bank* dan isolat perlakuan adalah G. Varian nukleotida pada gen *katG* isolat klinis L19 ini dimungkinkan menjadi pemicu munculnya sifat resistensi terhadap isoniazid. Translasi secara *in silico* juga dilakukan terhadap gen-gen *katG* mutan yang berasal dari isolat klinis. Hal ini dilakukan untuk mengetahui efek mutasi nukleotida ini terhadap perubahan residu asam aminonya. Proses translasi *in silico* telah dilakukan dengan *software* EditSeq Program DNA Star. Hasil translasi *in silico* terhadap gen *katG* isolat klinis L19 menunjukkan bahwa mutasi G234A pada gen *katG* isolat tersebut tidak menyebabkan perubahan pada level asam amino (*silent mutation*). Dengan cara tersebut, semua urutan nukleotida gen *katG* dari 6 isolat klinis dan sebuah isolat *wild type* telah berhasil dianalisis. Hasil analisis ini menghasilkan data profil mutasi nukleotida dan asam amino dari gen-gen *katG* isolat klinis resisten isoniazid seperti pada tabel 6.

Atas dasar data pada tabel 6, maka diduga bahwa sifat resistensi isoniazid yang ada pada isolat klinis *M. tuberculosis* L8, L10, L19, L21 R2 dan R9, terjadi oleh karena adanya mutasi pada gen-gen *katG*. Untuk membuktikan kebenaran dari dugaan ini, maka perlu kiranya untuk melakukan penelitian lanjutan yang mengkarakterisasi aktivitas protein KatG, sehingga mekanisme resistensi pada isolat klinis *M. tuberculosis* yang dipelajari ini dapat terungkap lebih jelas.

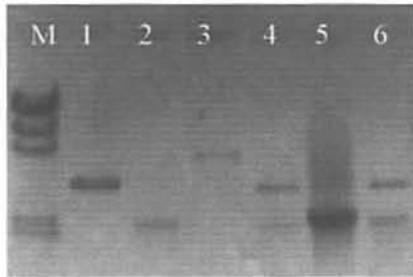
**Tabel 6. Profil mutasi gen *katG* dan proteinnya pada 6 isolat klinis *M. tuberculosis* resisten isoniazid yang dipelajari**

Gen	Isolat klinis <i>M. tuberculosis</i> INH <sup>R</sup>	Mutasi				Tingkat NH <sup>R</sup> isolat <i>Mtb</i> [µg/mL]
		Σ	Nukleotida	Σ	Asam amino	
<i>katG</i>	L19	2	G <sub>234</sub> A C <sub>625</sub> T	1	R <sub>78</sub> R (mutasi bisu) R <sub>209</sub> C	0.2
	L8	1	A <sub>713</sub> G	1	N <sub>238</sub> S	1
	L10	5	T <sub>1310</sub> C G <sub>1388</sub> T G <sub>1481</sub> A T <sub>1553</sub> C A <sub>1660</sub> G	5	L <sub>437</sub> P R <sub>463</sub> L G <sub>494</sub> D I <sub>518</sub> T K <sub>554</sub> E	1
	L21	5	T <sub>898</sub> C G <sub>1388</sub> T T <sub>1997</sub> C C <sub>2035</sub> T G <sub>2203</sub> – (delesi)	3	W <sub>300</sub> R R <sub>463</sub> L I <sub>666</sub> T Q <sub>679</sub> stop kodon D <sub>735</sub> ( <i>frameshift</i> )	3
	R9	5	G <sub>944</sub> C A <sub>1205</sub> G G <sub>1537</sub> – (delesi) C <sub>1808</sub> T T <sub>2142</sub> C	3	S <sub>315</sub> T E <sub>402</sub> G <i>Frameshift</i> P <sub>603</sub> L D <sub>714</sub> D (mutasi bisu)	3
	R2	4	C <sub>1061</sub> T G <sub>1261</sub> A G <sub>1388</sub> T G <sub>2161</sub> A	4	T <sub>354</sub> I G <sub>421</sub> S R <sub>463</sub> L V <sub>721</sub> M	10

### 5.5. Subkloning gen *katG* pada vektor ekspresi pET20b

Gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis dan wild type yang telah diperoleh pada DNA rekombinan pGemT-*katG*, selanjtnya disubklon pada vektor ekspresi pET20b. Hal ini dilakukan untuk kepentingan ekspresi gen-gen tersebut menjadi proteinnya pada penelitian tahap yang kedua. Untuk subkloning ini maka dilakukan pemotongan DNA rekombinan pGemT-*katG* dan juga vektor pET20b dengan dua enzim restriksi *EcoRI* dan *NotI*. Terhadap fragmen DNA berukuran 2.2 kb hasil pemotongan DNA rekombinan pGemT-*katG* dan juga fragmen berukuran 3.7 kb hasil pemotongan vektor pET20b dengan dua enzim tersebut dimurnikan dengan *GFX purification kit*. Kedua fragmen

kemudian diligasi dengan enzim T4 DNA ligase, dan hasilnya digunakan untuk menstransformasi *Escherichia coli* Top10. Seleksi klon positif dilakukan dalam media LB padat yang mengandung ampisilin. Karakterisasi DNA plasmid rekombinan pET20b-*katG* dilakukan dengan analisis restriksi, PCR dan resequensing. Hasil analisis restriksi DNA rekombinan pET20-*katG* dan juga karakterisasi dengan PCR dapat dilihat pada gambar 5.14.



**Gambar 5.14. Hasil analisis restriksi DNA rekombinan pET20b-*katG*.** Lajur M, pita DNA  $\lambda$ /HindIII; lajur 1, pita pET20b/*EcoRI* + *NotI* ( $\pm$  3.7 kb); lajur 2, pita gen *katG* yang diinsersikan ( $\pm$  2.2 kb); lajur 3, pita pET20b-*katG*/ *EcoRI*; lajur 4 dan 6, pita pET20b-*katG*/ *EcoRI* + *NotI*; lajur 5, pita gen *katG* hasil PCR menggunakan templat DNA rekombinan pET20b-*katG*

Pemotongan tunggal DNA rekombinan pET-*katG* dengan enzim restriksi *EcoRI*, dapat menghasilkan sebuah pita DNA berukuran 5,9 kb (lajur 3, gambar 5.14). Fragmen DNA ini dapat terbentuk oleh karena adanya gabungan antara gen *katG* yang berukuran 2,2 kb (lajur 2) dengan vektor pET20b yang berukuran 3,7 kb (lajur 1). Sedangkan pemotongan ganda DNA rekombinan yang berukuran 5,9 kb tersebut, dengan enzim *EcoRI* dan *NotI* dapat menghasilkan dua pita DNA berukuran 2,2 kb dan 3,7 kb (lajur 4 dan 6). Kedua pita DNA tersebut sesuai dengan ukuran gen *katG* dan vektor pET20b. Karakterisasi DNA plasmid rekombinan pET-*katG* yang telah dilakukan dengan PCR menggunakan primer FG dan RG mampu menghasilkan sebuah pita DNA tebal berukuran 2,2 kb (lajur 5). Munculnya produk PCR ini menunjukkan bahwa gen *katG* telah terinsersi kedalam vektor pET20b.

Resequencing juga dilakukan terhadap gen *katG* yang terdapat pada DNA rekombinan pET20b-*katG* ini untuk mengkonfirmasi ulang ketepatan profil mutasi yang diperoleh dari sekuensing pertama (hasil sekuensing gen *katG* pada DNA rekombinan pGemT-*katG*). Hasil resequencing menunjukkan data yang sama dengan sekuensing pertama.



## 5.6. Keterkaitan antara mutasi gen *katG* dengan tingkat resistensi isoniazid

Katalase-peroksidase yang disandi oleh gen *katG* merupakan satu-satunya enzim *M. tuberculosis* yang mengubah/ mengoksidasi isoniazid menjadi bentuk aktifnya berupa senyawa radikal reaktif yang selanjutnya memiliki aktivitas anti mikobakteri. Melalui kerja katalitik yang demikian, enzim katalase-peroksidase dapat mengantarkan munculnya sifat sensitif isoniazid pada bakteri *M. tuberculosis*. Mutasi gen *katG* dapat menyebabkan perubahan struktur protein KatG (enzim katalase-peroksidase), yang selanjutnya dapat mempengaruhi fungsinya dalam mengkatalisis proses oksidasi isoniazid. Mutasi gen *katG* yang mengarah pada hilang atau berkurangnya aktivitas katalase-peroksidase dapat memperantari sifat resistensi *M. tuberculosis* terhadap isoniazid.

Protein KatG *M. tuberculosis* telah berhasil dikristalkan dan ditentukan strukturnya (Bertrand *et al.*, 2004). Fungsi residu-residu asam amino dalam protein KatG (enzim katalase-peroksidase) yang berperan untuk proses katalitik, pengikatan substrat maupun heme telah terpetakan. Profil residu-residu asam amino domain N dalam struktur kristal protein KatG yang berperan dalam aktivitas enzim katalase-peroksidase dapat dilihat pada gambar 5.15. Residu asam amino Arg104, His108, His270, Trp321 dan Asp381 dalam protein KatG berperan aktif sebagai sisi katalitik enzim. Sementara Asp137, Val231, Asn232, Pro232 dan Ser315 merupakan residu-residu yang berperan untuk pengikat substrat. Dengan berdasar pada gambaran struktur primer protein KatG ini maka dilakukan analisis keterkaitan antara mutasi gen *katG* pada isolat-isolat klinis *M. tuberculosis* dengan tingkat resistensinya terhadap isoniazid.

mtCP	Ntr	24	GHMKYPVEGG	GNQDWWPNRL	NLRVLRQNPA	VADPMGAAFD	YAAEVATIDV	D--ALTRDIE	EVMTTSQPWW
CCP	1CCP	2	-----	-----	-----	--TPLVHVAS	VEKGRSYEDF	Q--KVYNAIA	LKLRE---DD
sAPX	1OAF	1	-----	-----	-----	-----SGKS	YPTVSADYQK	AVEKAKKKLR	GFIA-----
sAPX	1APX	2	-----	-----	-----	-----GKS	YPTVSPDYQK	AIEKAKKKLR	GFIA-----
ERPC	1ATJ	1	-----	-----	-----	-----QLT	PTFFDNSCPN	VSNIVRDTIV	NELR-----
mtCP	Ntr	92	PADYG-HYGP	LFIDMAVFAA	GTYRIHDGRG	GAGGGMQRFA	-----PLNS	WFINAS-LDK	ARRLLWPVKK
CCP	1CCP	35	EYDNYIGYGP	VLVLAFTIIS	GTWDKHDNTG	GSYGGTYRF-	-----KKEFN	DESNAG-LQN	GFKFLEPIHK
sAPX	1OAF	29	----EKRCAP	LMLLAVISA	GTFDKGTKTG	GPF-GTIKHP	-----AELA	HSENNG-LDI	AVRLLLEPLKA
sAPX	1APX	29	----EKKCAP	LILLAVISA	GTFFDSKTKTG	GPF-GTIKHQ	-----AELA	HSENNG-LDI	AVRLLLEPIKE
ERPC	1ATJ	28	---SDPRIAA	SILLHEDDC	FV-----N	GCD-ASILLD	NTTSFTEKD	AFNNANS-AR	GFPVIDRMKA
mtCP	Ntr	154	KYG----KKL	SWADLIVFAG	NCALESMSGFK	T-FGFGFGRV	DQWEP-DEVY	WGKEATWLGD	ERYSGKRDLK
CCP	1CCP	98	EFF----W-I	SSGDLFSLGG	VTAVQEMQGP	KI-PWRCGRV	DTPEDTT---	-----	-----
sAPX	1OAF	87	EFF----I-L	SYADFYQLAG	VVAVEVTGGP	EV-PFHGRE	DKPEP-----	-----	-----
sAPX	1APX	87	QFP----I-V	SYADFYQLAG	VVAVEITGGP	E-VFPHGRE	DKPEP-----	-----	-----
ERPC	1ATJ	86	AVESACPRTV	SCADLLTIAA	QQSVTLAGGP	S-NRVPLGRR	DSLQAFI---	-----	-----
mtCP	Ntr	218	NPLAAVQVGL	IYVNEGPNQ	NPDFMAAAVD	IRETFRR-MA	MN-DVETAAL	IVGGTFGKT	H-----
CCP	1CCP	139	-----PDNGR	LVAADK---	-----DAGY	VRTFFQR-LN	MN-DREVVVAL	MGAALGKT	H-----
sAPX	1OAF	126	-----PPEGR	LEAATK---	-----GSDH	LRDVFGKAMG	LT-DQDIVAL	SG-GTIGAA	H-----
sAPX	1APX	126	-----PPEGR	LEAATK---	-----GSDH	LRDVFGKAMG	LS-DQDIVAL	SGG-TIGAA	H-----
ERPC	1ATJ	132	----DLANAN	LEAATK---	-----TLPQ	LKDSFRN-VG	LNRSDDLVAL	SG-GTFGKN	C-----
mtCP	Ntr	277	-----	-----	-----	GADPALLAGP	HPDAAALQD	GLDNDSDIPL	GTWEDITSG
CCP	1CCP	182	-----	-----	-----	L-----	-----	-----	-----KNSG
sAPX	1OAF	170	-----	-----	-----	K-----	-----	-----	-----ERBG
sAPX	1APX	170	-----	-----	-----	K-----	-----	-----	-----ERBG
ERPC	1ATJ	186	-----	-----	-----	SAL-----	-----	-----	-----
mtCP	Ntr	317	IEVVITN-TP	TKWDNSFLEI	LYG--YEWEL	TKSPAGANQY	TAKDGAGAST	IPDPFGGFR	SPTMLATILS
CCP	1CCP	187	YEGFAGA-AN	NVFTNEFYLN	LLN--EDWKL	EKNDANNEQW	DSK-----	-----S	GYMMLPTIYS
sAPX	1OAF	175	FEGEITS-NP	LIFDINSYFTE	LLS--GE---	-----	-----	-----KE	GLLQLPSKA
sAPX	1APX	175	FEGEITS-NP	LIFDINSYFTE	LLT--GE---	-----	-----	-----KD	GLLQLPSKA
ERPC	1ATJ	219	--VDLRTPT	TIFDNKYVYN	LEEOK-----	-----	-----	-----	--GLIOSQOE
mtCP	Ntr	384	LRV---DPIY	ERITRRWLEH	P-EELADEFA	KAWYKLIHRD	MGPVARYLGP	LVPKQTLWQ	
CCP	1CCP	238	LIQ---DPKY	LSIVKEYAND	Q-DKFFKDFS	KAFKLELLENG	ITFFPKDAPSP	FIFKTLLEEQQ	L
sAPX	1OAF	211	LLS---DPVF	RPLVDKYAAD	E-DAFFADYA	EAHQKLSSELG	FADA		
sAPX	1APX	211	LLT---DSVF	RPLVEKYAAD	E-DVFFADYA	EAHLKLSSELG	FAEA		
ERPC	1ATJ	250	LFSSFNATDT	IPLVRSFANS	-TQTFNFAFV	EAMDRMGNTI	PLTGTGGQIR	LNCRRVNS	

**Gambar 5.15.** Profil residu-residu asam amino domain N dalam struktur kristal protein KatG yang berperan dalam aktivitas enzim katalase-peroksidase (Bertrand et al., 2004). Warna hijau merupakan residu asam amino sisi katalitik, warna biru muda adalah residu asam amino sisi pengikatan substrat (isoniazid), warna kuning adalah residu asam amino yang terlibat dalam pembentukan ikatan silang, warna merah adalah residu-residu sisipan yang ditemukan pada *M. tuberculosis* tetapi tidak ditemukan pada protein KatG dari spesies lain.

Isolat klinis *M. tuberculosis* L8 yang membawa mutan protein KatG (N238S) memiliki tingkat resistensi 50 kali lebih tinggi dari isolat klinis L19 yang membawa mutan KatG (R209C). Dalam struktur primer protein KatG, residu N238 terletak pada bagian yang dekat dengan residu sisi pengikatan substrat. Efek mutasi gen *katG* yang mengubah asam amino N238S cenderung mengganggu aktivitas katalase-peroksidase daripada mutasi R209C yang terdapat pada isolat L19. Hal ini dimungkinkan oleh karena residu R209 dalam protein KatG terletak cukup jauh dari sisi katalitik maupun pengikatan

subtrat. Meskipun isolat klinis L10 mengemban mutasi KatG yang lebih banyak daripada isolat L8, tetapi kedua isolat tersebut memiliki tingkat resistensi yang sama. Hal ini dapat terjadi oleh karena semua mutasi KatG pada isolat L10 terjadi di bagian domain C, sedangkan pada isolat klinis L8 terjadi di bagian domain N yang merupakan domain katalitik enzim. Domain C tidak memiliki fungsi katalitik, sehingga mutasi pada bagian ini tidak banyak memberikan efek yang berarti. Faktor jumlah mutasi nampak menjadi pemicu tingginya tingkat resistensi isoniazid isolat klinis L10 daripada isolat L19. Walaupun mutasi KatG pada isolat L19 terjadi pada domain N, tetapi posisi mutasinya terletak jauh dari sisi kritis enzim. Mutasi delesi nukleotida gen *katG* sebagaimana pada isolat L21 dan R9 dapat menyebabkan pergeseran pembacaan residu asam amino. Mutasi KatG tipe ini nampak menimbulkan efek resistensi isoniazid yang cukup tinggi. Isolat klinis R2 mengemban mutasi KatG pada kedua domain N dan C. Mutasi pada kedua domain nampak memberikan efek resistensi isoniazid lebih tinggi daripada mutasi yang terjadi pada salah satu domain maupun mutasi *frameshift*.

Berdasar pada hasil penelitian ini, maka disusun kaitan antara mutasi gen *katG* isolat-isolat klinis *M. tuberculosis* dengan tingkat resistensi isoniazid, yang dapat dinyatakan bahwa mutasi asam amino pada bagian domain N protein KatG lebih cenderung meningkatkan efek resistensi isoniazid daripada mutasi yang terjadi pada bagian domain C. Mutasi yang mengubah residu asam amino yang dekat dengan residu-residu kritis protein KatG cenderung lebih meningkatkan efek resistensi daripada mutasi asam amino yang letaknya jauh dari sisi kritis. Mutasi yang mengubah residu amino di kedua domain N dan C protein KatG lebih cenderung meningkatkan efek resistensi isoniazid daripada jika mutasi hanya terjadi pada salah satu domain. Makin banyak jumlah mutasi yang terdapat pada gen *katG*, kecenderungan meningkatkan tingkat resistensi isoniazid juga semakin tinggi.



## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. Kesimpulan

Gen *katG* *M. tuberculosis* isolat klinis resisten isoniazid (L8, L19, L10, L21, R2 dan R9) yang berukuran 2,2 kb berhasil diamplifikasi dengan PCR menggunakan pasangan primer FG dan RG. Karakterisasi molekuler gen *katG* melalui tahapan kloning dan subkloning dapat menunjukkan adanya varian nukleotida pada gen *katG* isolat-isolat klinis tersebut. Mutasi nukleotida yang ditemukan pada gen *katG* isolat-isolat klinis ditengarahi sebagai penyebab munculnya resistensi isoniazid. Hasil translasi *in silico* terhadap urutan nukleotida gen *katG* isolat-isolat klinis yang dipelajari menunjukkan bahwa mutasi asam amino pada bagian domain N protein KatG lebih cenderung meningkatkan efek resistensi isoniazid daripada mutasi yang terjadi pada bagian domain C. Mutasi yang mengubah residu asam amino yang dekat dengan residu-residu kritis protein KatG cenderung lebih meningkatkan efek resistensi daripada mutasi asam amino yang letaknya jauh dari sisi kritis. Mutasi yang mengubah residu amino di kedua domain N dan C protein KatG lebih cenderung meningkatkan efek resistensi isoniazid daripada mutasi pada salah satu domain. Makin banyak jumlah mutasi yang terdapat pada gen *katG*, kecenderungan meningkatkan tingkat resistensi isoniazid juga semakin tinggi

### 6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan yang mengungkap aspek aktivitas enzim katalase-peroksidase *M. tuberculosis* isolat-isolat klinis yang telah dipelajari, terkait dengan ekspresi, pemurnian dan karakterisasi protein KatG. Hal ini menjadi penting dalam upaya untuk mendapatkan konsep mekanisme resistensi isolat klinis terhadap isoniazid secara lebih komprehensif, sehingga dapat lebih bermakna dalam memberikan sumbangan untuk pengembangan terapi dan sintesis obat tuberkulosis yang lebih potensial.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bertrand, T., Eady, A.J.N., Jones, N.J., Jesmin, Nagy, M.J., Gregoire, J.N., Rave, L.E., Brown, A.K., (2004), Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase., *J. Biol. Chem.*, vol 279, issue 37, 38991-38999
- Cardoso, R.F., Robert C. Cooksey, Glenn P. Morlock, Patricia Barco, Leticia Cecon, Francisco Forestiero, Clarice Q. F. Leite, Daisy N. Sato, Maria de Lourdes Shikama, Elsa M. Mamizuka, Rosario D. C. Hirata, and Mario H. Hirata., (2004), Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil., *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Vol. 48, No. 9., p. 3373-3381
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia., (2006), Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis , Edisi 2, Percetakan Negara RI, Jakarta
- Ghiladi, R.A., Katalin F. M., Frank M. R., and Paul R. O. M., (2005), Articles: Correlation Between Isoniazid Resistance and Superoxide Reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* KatG, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 13428-13442
- Innis, M.A., Gelfand, D. H., Shinski, J. J., White, T. J., (1990), PCR Protokols, A Guide to Methods and Application, Academic Press, Inc, London
- Ni, J., Yoshito, S., Shinji, T., Atsushi, S., and Yasutaka, T., (2002), Conversion of A Typical Catalase from *Bacillus* sp. TE124 to a Catalase-Peroxidase by Directed Evolution., *Journalo F Bioscienciaen Db Ioengineering* Vol. 93, No. 1, 31-36.2002
- Noviana, H., (2007), Hubungan *Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis* dengan Gen-gen Terkait dan Pengaruh Mutasi terhadap Tingkat Resistensi Rifampin dan Isoniazid, *Disertasi*, FMIPA(Kimia) ITB, Bandung
- Pane, E. R., (2007), Beberapa mutasi gen katG isolate klinis *Mycobacterium tuberculosis* resisten isoniazid, Thesis, FMIPA (Kimia) ITB, Bandung
- Pym, S.A, Brigitte, Saint-Joanis, and Stewart T. C., (2002), Effect of *katG* Mutations on the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the Implication for Transmission in Humans, *Infection And Immunity*, 70.9.4955-4960
- Rattan, A., Awdhesh, K., and Nishat, A., (1998), Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* : Molecular Prespective, *Emerging Infection Disease.*, vol 4., no 2., 195-206.
- Rouse, D.A., DeVito, J.A., Li, Z., Byer, H., and Morris, S.L. 1996. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: Effects on

catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol. Microbiol.* 22: 583–592.

Sambrook, J. F., and Maniatis, T., (1989), *Molecular Cloning Laboratory Manual*, Second Edition, Volume 3, Cold Spring Harbour Laboratory, Press, USA

Shi, R., Koji, O., Hiroyuki, Y., Taiga, T., Isamu, S., (2006), Temperature-Mediated Heteroduplex Analysis for The Detection of Drug-Resistant Gene Mutations in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by Denaturing HPLC, SURVEYOR Nuclease, *Microbes and Infection*, 8 , 128–135

Shoeb, H.A., Shoeb, Bernard U. B, Jr., Abramo C. O., and Merola, A. J., (1985), Evidence for the Generation of Active Oxygen by Isoniazid Treatment of Extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra., *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Mar., p. 404-407

Smulevich, G., Christa, J., Enrica, D., Christian, O., (2006), Review Article: Probing The Structure and Bifunctionality of Catalase-Peroxidase (KatG)., *Journal of Inorganic Biochemistry* 100 ,568–585

Syahrani, P., (2007), Mutasi Gln menjadi Leu pada kodon 513 gen *rpoB Mycobacterium tuberculosis* L1 resisten rifampisin, Thesis, FMIPA (Kimia) ITB, Bandung

Wei, J., Benfang, L., James M. M., and Shiao-Chun T. C., (2003), Isoniazid Activation Defects in Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG) Mutants Evident in *InhA* Inhibitor Production *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Feb, p. 670–675 Vol. 47, No. 2

Wengenack, N.L., Brian, D.L., Preston, J.H., James, R.U., Gudrun, S.L.R., Leslie, H., Glenn, D.R., Franklin, R.C III., Patrick, J.B., Kenton, R.R., John, J.B., and Frank. R., (2004), Purification and Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* KatG, KatG(S315T), and *Mycobacterium bovis* KatG(R463L), *Protein Expression and Purification.*, 24, 232-243

Who Report., (2007), *Global Tuberculosis Control : Tuberculosis Facts*

## LAMPIRAN

**Lampiran 1. Hasil pensejajaran *katG* *M. tuberculosis* wild type dan isolat klinis**

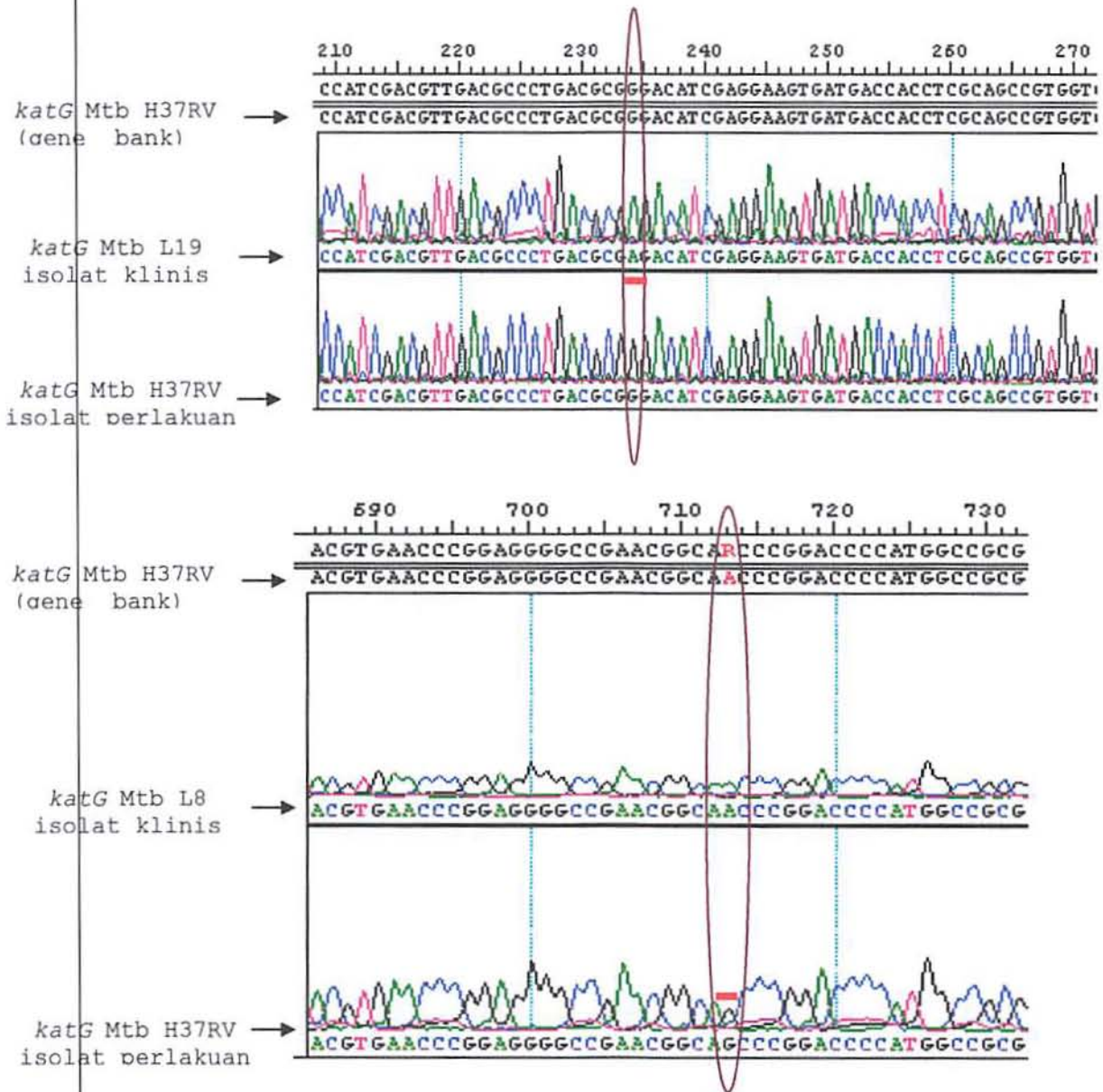
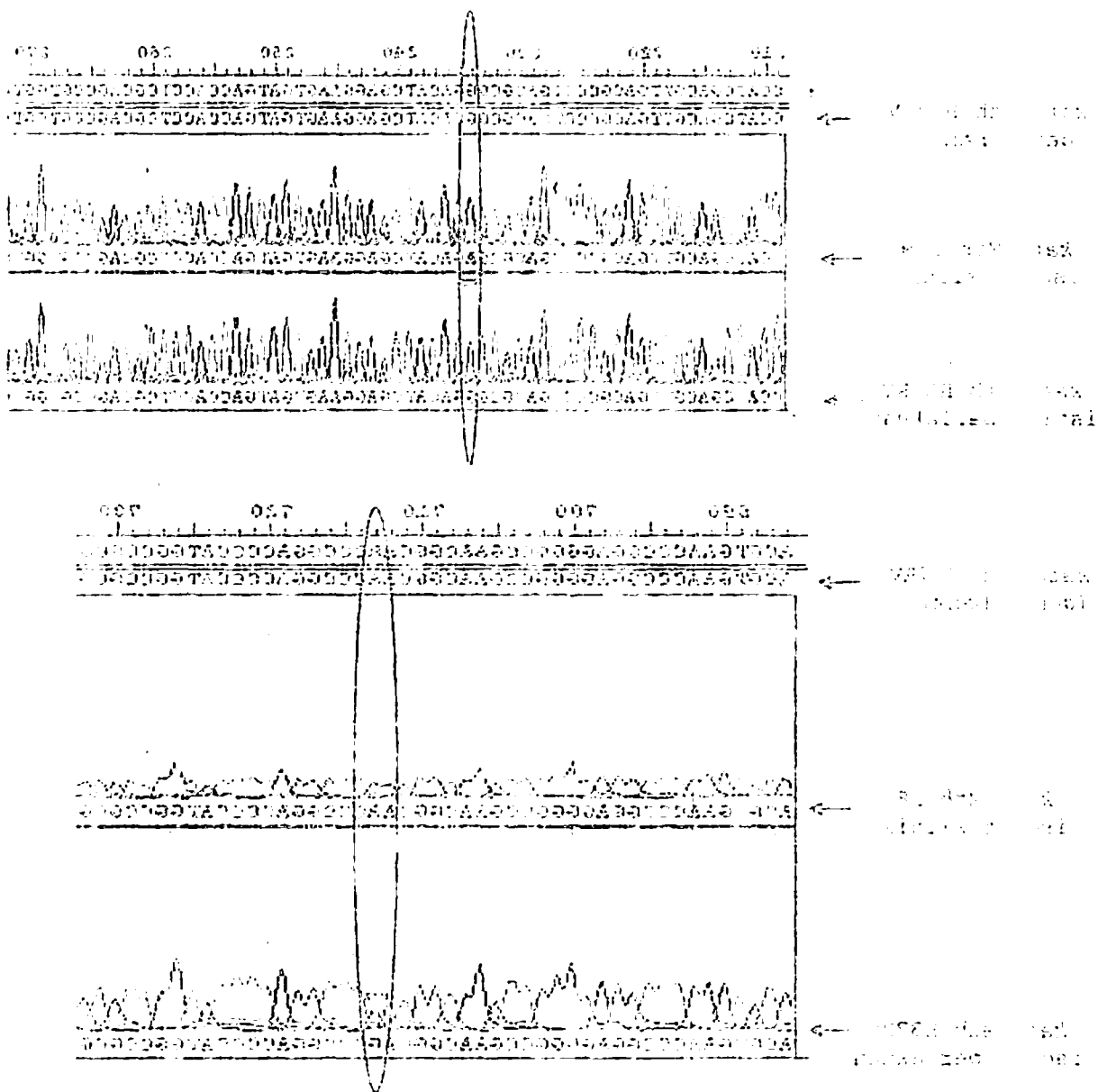
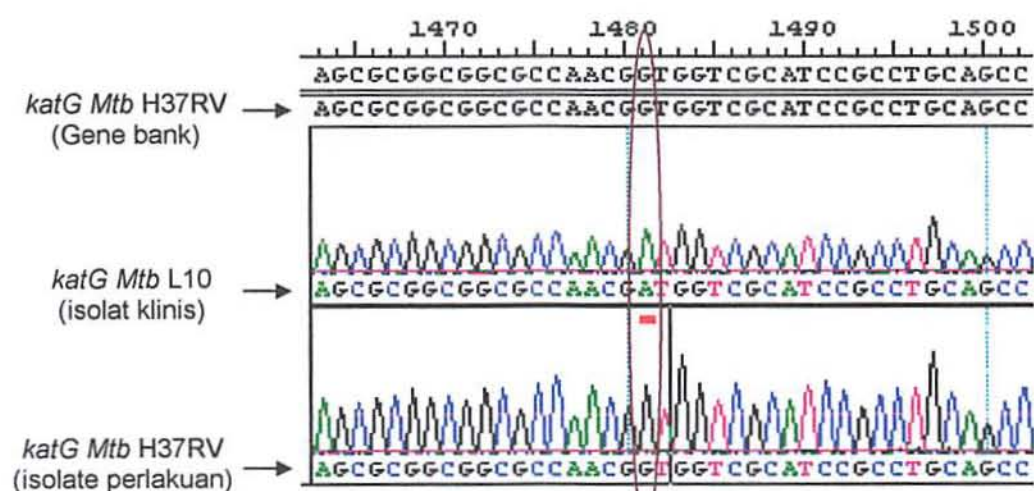
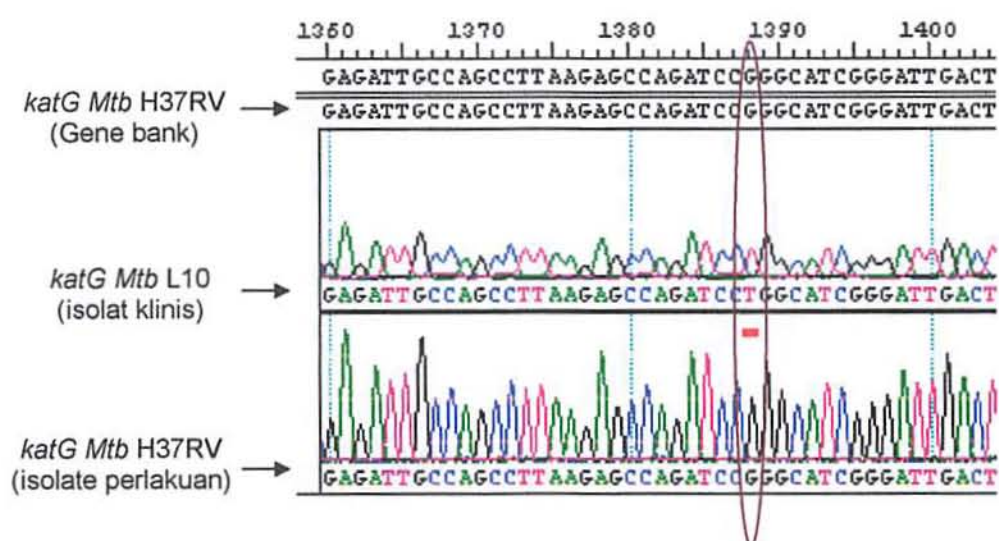
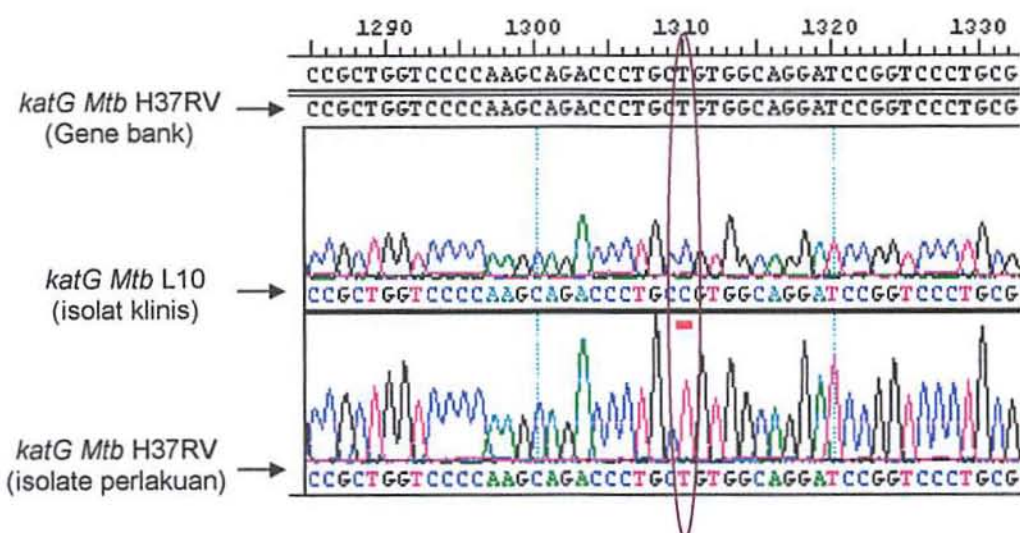
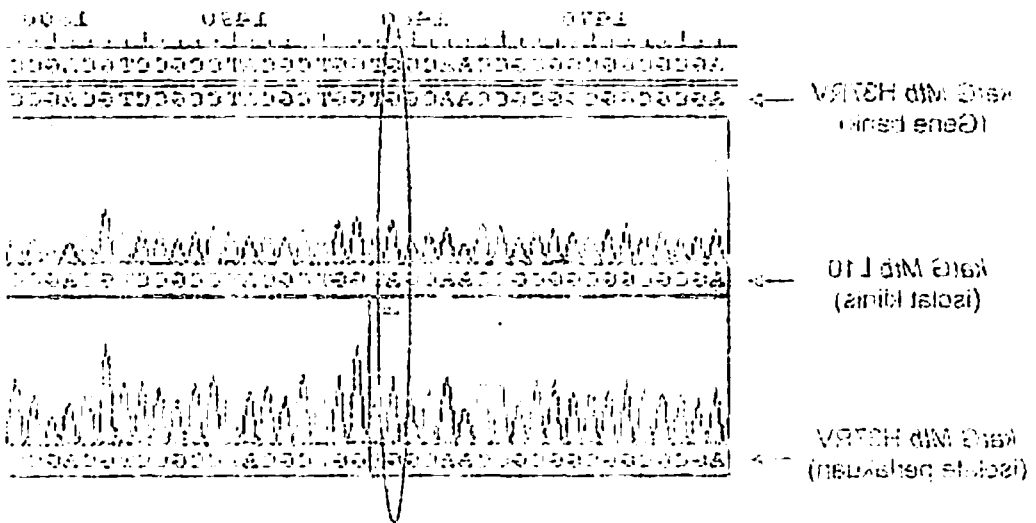
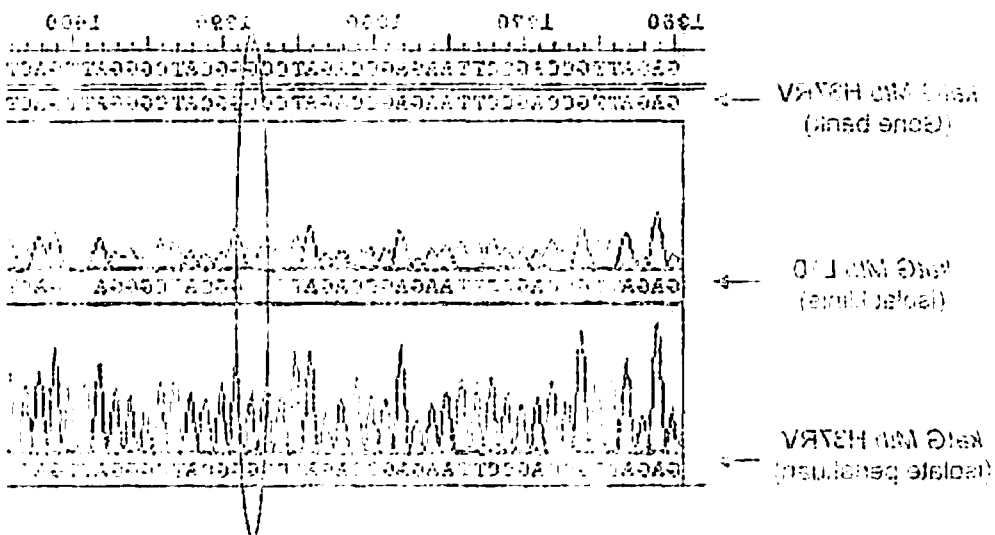
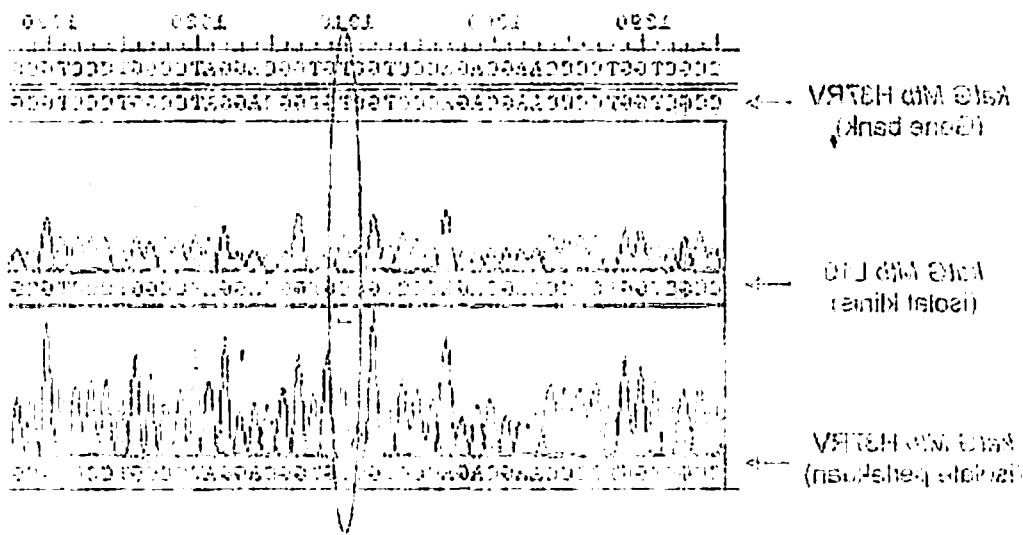


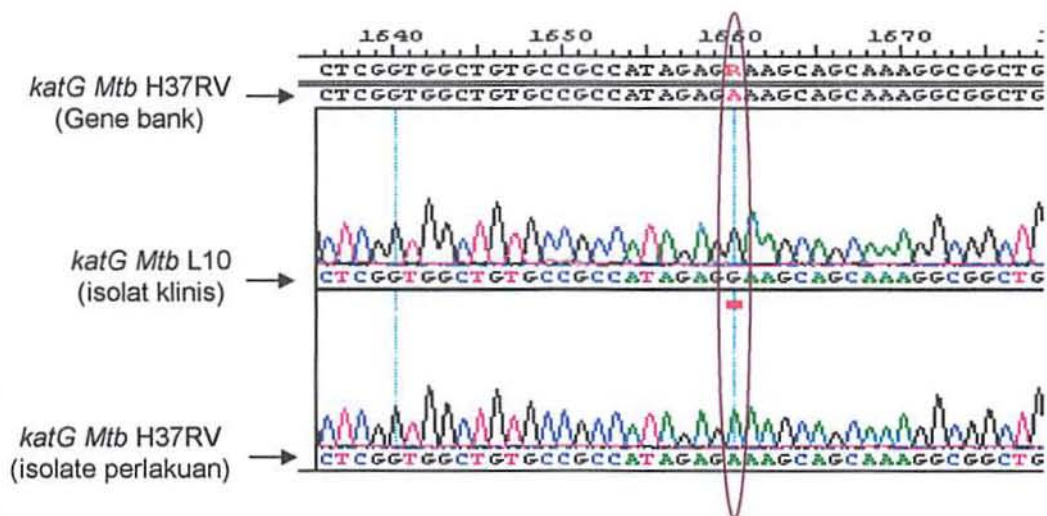
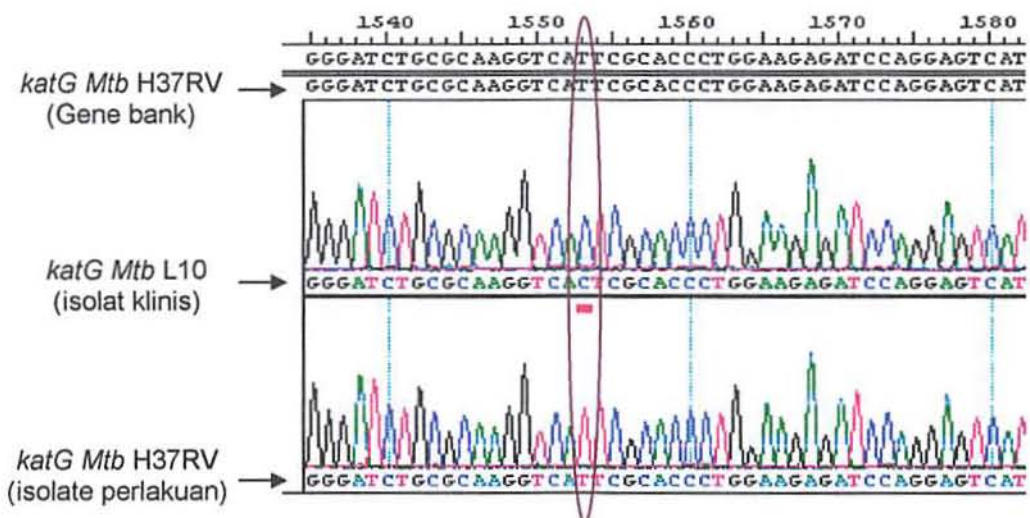
EXHIBIT 1

Figure 1. Typical power spectrum of the signal recorded at the site.

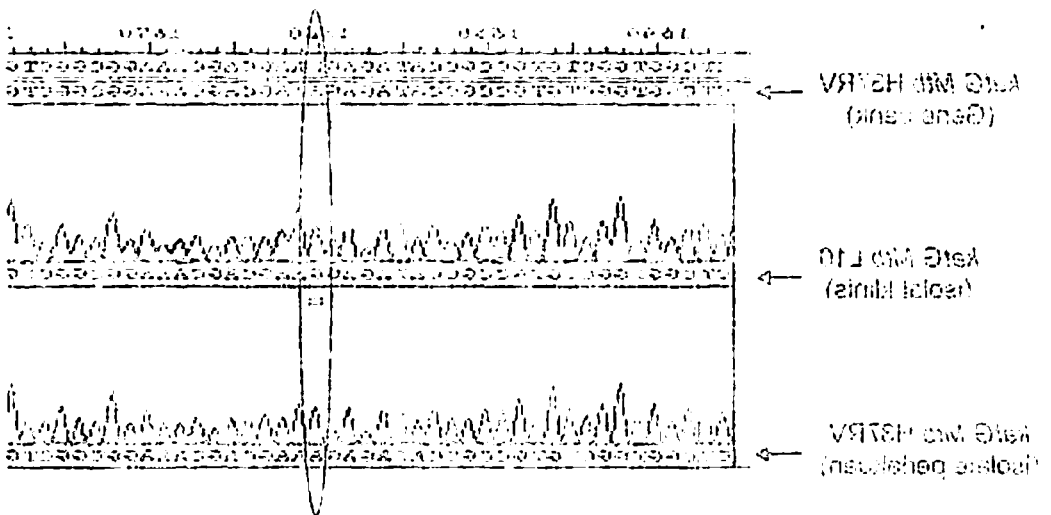
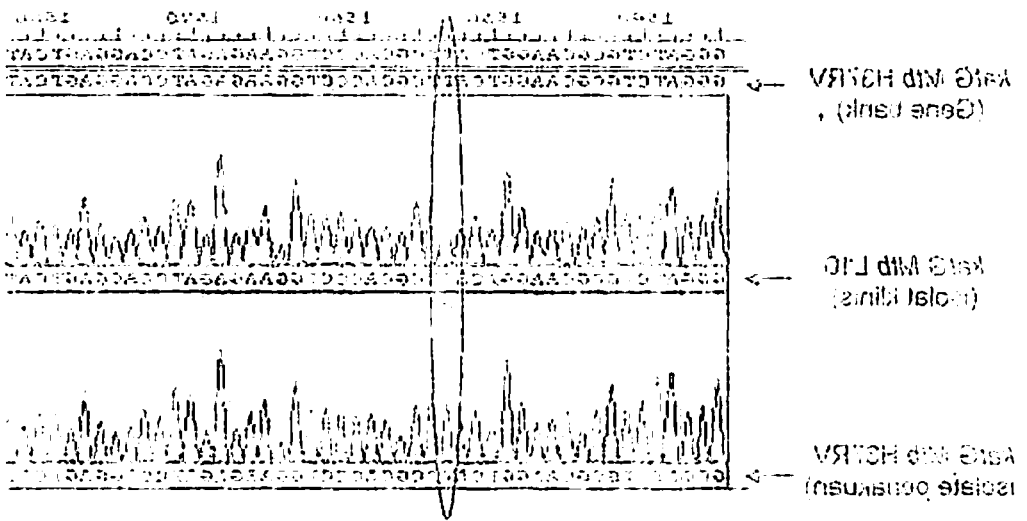












## DAFTAR ARTIKEL ILMIAH

Sebagian hasil dari penelitian ini telah diseminarkan pada :

1. **International Conference on Biotechnology : Biotechnology for better life, ITB'S Golden Anniversary.**, Bandung 15th-16th of June, 2009 : *Single amino acid residue substitution in two isolates of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase.*, by Purkan, Wiwin Retnowati, Ihsanawati, Debbie Soefie Retnoningrum, Dessy Natalia, and Achmad Saifuddin Noer
2. **Seminar Kimia Bersama UKM-ITB VIII, Fakultas Sains dan Teknologi, UKM, Bangi-Malaysia.**, 9-11 Juni 2009 : *Mutations at both N and C domain of protein KatG could be a factor that increase the level of isoniazid resistance in M. tuberculosis.*, by Purkan, Wiwin Retnowati, Ihsanawati, Debbie Soefie Retnoningrum, Dessy Natalia, and Achmad Saifuddin Noer

