



DETEKSI *Mycobacterium tuberculosis* DARI KULTUR MGIT BERDASARKAN GEN *katG*

Prima Nanda Fauziah^{1*} · Sitti Romlah² · Arif Khozinul Asrori²

¹Prodi Analisis Kesehatan, Fakultas Kesehatan, Universitas Mohammad Husni Thamrin, DKI Jakarta, Indonesia

²Prodi Analisis Kesehatan, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Jenderal Achmad Yani Cimahi, Jawa Barat, Indonesia

e-Mail : primanandafauziah@gmail.com

Abstract

Tuberculosis (TB) is a respiratory disease caused by infection of *Mycobacterium tuberculosis*. Currently, many *M. tuberculosis* strains have resistant toward to two or more anti-tuberculosis drugs (known as MDR-MTB). One of the gene marker to MDR-MTB is the *katG* gene. Mutation of *katG* can be causes the activity of the *M. tuberculosis* catalase-peroxidase enzyme so that the bacteria become resistant isoniazid (INH) OAT. The aimed of this research was to know the presence of *KatG* gene in isolate *M. tuberculosis* from MGIT culture. The sample used was MGIT isolate with 20 samples and then amplified using PCR method. The result showed that there were 4 samples the presence of DNA bands suspected *KatG* genes \pm 317 bp from the MGIT cultured sample. In conclusion, the *KatG* gene was successfully amplified by PCR method with primer forward and reverse visualization by electroforesis. Sequencing analysis needs to be done on the PCR result in order to see the mutations that occur and to confirm the sample homology with data contained in GenBank on the genes of the *KatG*, and then to know the presence or absence of mutations in *katG* genes.

Keywords : *katG* gene, MGIT, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR

Abstrak

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi pada saluran pernapasan yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Saat ini banyak ditemukan galur *M. tuberculosis* yang resisten terhadap dua atau lebih obat anti tuberkulosis (OAT) yang dikenal sebagai galur *Multi Drugs Resistance M. tuberculosis* (MDR-MTB). Salah satu gen penanda untuk MDR-MTB adalah gen *katG*. Mutasi gen *katG* menyebabkan hilangnya aktivitas enzim katalase-peroksidase *M. tuberculosis* sehingga bakteri ini menjadi resisten terhadap OAT isoniazid (INH). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya gen *katG* pada isolat *M. tuberculosis* dari kultur MGIT. Sampel yang digunakan adalah isolat MGIT dengan jumlah 20 sampel kemudian dilakukan amplifikasi menggunakan metode PCR. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 4 sampel DNA yang diduga gen *katG* berukuran \pm 317 pb dari sampel dikultur MGIT. Berdasarkan hasil dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa gen *katG* berhasil diamplifikasi dengan metode PCR dengan primer forward dan primer reverse yang divisualisasi dengan elektroforesis. Pada penelitian selanjutnya, analisis sekuensing perlu dilakukan terhadap hasil PCR guna untuk melihat mutasi yang terjadi. Hal ini dimaksudkan untuk mengkonfirmasi homologi sampel dengan data yang terdapat pada GenBank pada bagian gen *katG* tersebut. Serta mengetahui ada tidaknya mutasi pada gen *katG*.

Kata Kunci : gen *katG*, MGIT, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi pada saluran pernapasan. Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2017, terdapat 6,1 juta kasus TB Paru. Dari jumlah kasus tersebut, 5,7 juta adalah orang-orang yang baru didiagnosis dan 0,4 juta lainnya sudah dalam pengobatan. Meskipun prevalensi TB Paru menurun secara signifikan dalam beberapa tahun terakhir, namun jumlah penderita penyakit TB Paru di Indonesia masih terbilang tinggi karena jumlah penderita TB di Indonesia menempati peringkat keempat terbanyak diseluruh dunia setelah China, India dan Afrika Selatan (WHO, 2018). Infeksi TB disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Solo *et al.*, 2020).

Mycobacterium tuberculosis penyebab TB dapat disembuhkan dengan pemberian anti tuberkulosis yang tepat. Namun, akhir-akhir ini banyak ditemukan galur *M. tuberculosis* resisten terhadap dua atau lebih obat anti tuberkulosis (OAT) yang dikenal sebagai galur *Multi Drugs Resisten M. tuberculosis* (MDR-MTB). 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).

Angka MDR-TB diperkirakan sebesar 2% dari seluruh kasus TB baru. Diperkirakan terdapat sekitar 6.300 kasus MDR TB setiap tahunnya (Kemenkes, 2011). MDR-TB terjadi karena adanya mutasi pada gen *M. tuberculosis*. Dalam perkembangan keilmuan mengenai mutasi tersebut, telah dilakukan penelitian pada beberapa gen yang bertanggung jawab terhadap resistensi *isoniazid* (INH) (Kapata *et al.*, 2013). Adanya mutasi pada salah satu atau beberapa gen, seperti *katG*, *kasA*, *oxyR-ahpc*, *furA*, *iniA*, *iniB*, *iniC*, *ndh*, dan *inhA* merupakan penyebab resistensi terhadap INH (Unissa *et al.*, 2016).

Akibat dampak dari peningkatan MDR-TB dan terbatasnya jumlah agen terapeutik, maka dilakukan upaya untuk menentukan dasar molekuler resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT. Hal ini bertujuan agar resistensi terhadap obat anti tuberkulosis dapat segera diketahui dan penderita dapat diterapi dengan pengobatan yang sesuai secara cepat dan tepat (Aye *et al.*, 2016).

Berdasarkan data penelitian, mutasi dengan frekuensi tinggi terjadi pada gen *katG* (50-95%) dan gen *inhA* (8-43%), sedangkan pada gen lainnya terjadi mutasi dengan frekuensi lebih rendah (Unissa *et al.*, 2016). Isoniazid (INH) merupakan salah satu anti tuberkulosis lini pertama yang penting. *M. tuberculosis* sangat peka terhadap INH. INH masuk ke dalam sel *M. tuberculosis* sebagai *prodrug* (obat yang diberikan kurang dari bentuk aktif sepenuhnya) dengan berdifusi secara pasif, INH kemudian diaktifkan oleh enzim katalase-peroksidase yang diekspresikan oleh gen *katG* *M. tuberculosis* untuk menjadi bentuk aktifnya. INH aktif kemudian akan menghambat biosintesis asam mikolat (*long chain α -branched β -hydroxylated fatty acids*) dinding sel *M. tuberculosis* (Bollela *et al.*, 2016).

Mutasi gen *katG* menyebabkan hilangnya aktivitas enzim katalase-peroksidase. Mutasi terjadi pada beberapa kodon gen *katG*, dan mutasi terbanyak ditemukan pada kodon 315, yaitu antara 61% - 90% dari keseluruhan bentuk-bentuk mutasi gen *KatG* pada kodon yang lainnya. Pada kodon 315 di gen *katG*, mutasi yang paling sering muncul adalah AGC (Serin) menjadi ACC (Treonin). Ditingkat basa, mutasi ini merupakan mutasi poin (*point mutation*) pada urutan ke 944 yaitu G menjadi C. Oleh sebab itu, banyak peneliti menyimpulkan bahwa mutasi ini merupakan penyebab utama resistensi *M. tuberculosis* terhadap INH. Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa mutasi pada kodon 315 Ser (AGC) Thr (ACC) basa 944 GAC di gen *katG* *M. tuberculosis* sehingga ini dapat menjadi marker genetik yang sangat potensial untuk menentukan strain *M. tuberculosis* resisten INH (Aye *et al.*, 2016). Identifikasi gen *katG* pada bakteri *M. tuberculosis* yang dikultur di *Mycobacteria growth indicator tube* (MGIT) dilakukan sebagai langkah awal untuk mengetahui

kasus MDR-MTB pada pasien tuberkulosis, sehingga dapat dilakukan penanganan lebih cepat dan tepat.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel kultur MGIT yang ditumbuhi oleh *M. tuberculosis*, gel agarosa THERMO 00270341, *buffer* TAE, *master mix* THERMO 0034433, *primer forward* 5'-GAAGTACGGCAAGAAGCTCTC-3' dan *primer reverse* 5'-CGTGATCCGCTCATAGATCG-3', dan media *Mycobacteria growth indicator tube* (MGIT) BD BACTEC.

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif di laboratorium untuk melihat adanya gen *katG* dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis* pada kultur MGIT. Penelitian ini terdiri dari empat tahap penelitian, yaitu:

1) isolasi DNA *M. tuberculosis* dari kultur MGIT

Sebanyak 100 μ l diambil suspensi kultur MGIT positif, kemudian dipanaskan pada suhu 95° C selama 15 menit. Untuk memisahkan supernatan dan endapan dilakukan sentrifugasi selama 15 menit pada 12000 rpm. Supernatan diambil untuk cetakan pada saat PCR.

2) Perhitungan konsentrasi DNA dengan nanodrop

Alat nanodrop dinyalakan dan disambungkan dengan komputer. Selanjutnya TE buffer diambil 2 μ l untuk dijadikan blanko untuk pengukuran sampel. Setelah blanko menunjukkan nilai 0 ng maka dilakukan pengukuran konsentrasi sampel DNA. Sampel DNA diambil 2 μ l dan diteteskan di tempat pembacaan kemudian tutup alat dan tombol enter pada komputer yang telah terhubung dengan program nanodrop ditekan. Konsentrasi DNA dilihat pada layar komputer.

3) Amplifikasi DNA dengan metode PCR

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Prinsip metode ini adalah: menggandakan DNA dengan bantuan enzim. Untuk mendapatkan potongan DNA, diperlukan primer yang

berfungsi untuk menandai DNA yang akan digandakan. Primer *forward* untuk menandai ujung depan untai DNA sedangkan primer *reverse* untuk menandai dari ujung belakang. Primer *forward* 5'-GAAGTACGGCAAGAAGCTCTC-3' dengan kondisi Tm 55,4% dan 52,4%. Primer *reverse* 5'-CGTGATCCGCTCATAGATCG-3' dengan Tm 55% dan GC content 55% dapat dilihat pada lampiran 3. Secara prinsip PCR merupakan proses yang diulang-ulang dengan beberapa siklus. Setiap siklus terdiri atas 3 tahap yaitu tahap *Denaturasi*, *Annealing*, dan *Extension*.

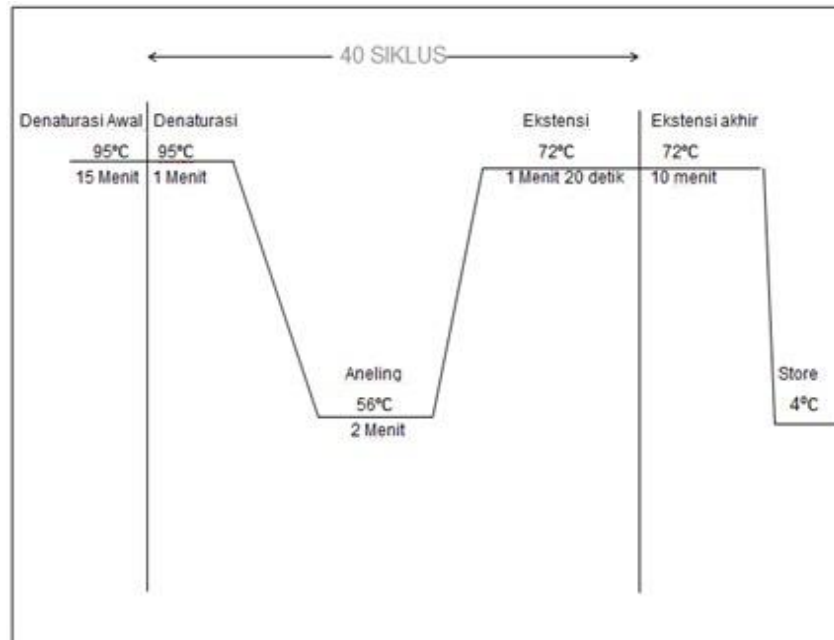
4) Elektroforesis

Elektroforesis DNA dilakukan berdasarkan prinsip sebagai berikut: molekul-molekul yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak menuju kutub positif (anoda), sedangkan molekul-molekul yang bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda). Adapun cara kerja pada isolasi DNA adalah: Agarosa ditimbang 1 gr kedalam 50 mL buffer TAE. Kemudian dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan stirrer. Biarkan agarosa sampai suhu 45°C selanjutnya dimasukkan ke dalam cetakan. Setelah agar membeku keluarkan dari cetakan, disimpan pada wadah elektroforesis. Diambil 5 µl produk PCR homogenkan dengan loading dye 1 µL, Dimasukkan ke dalam well / sumur gel agarosa. Lakukan elektroforesis dengan voltase 50 volt selama 60 menit. Setelah di elektroforesis, gel dikeluarkan dan direndam dalam larutan Etidium bromide selama 5 menit lalu cuci dengan menggunakan aquades dengan cara direndam selama 5 menit. Lakukan pengamatan pada alat uv transluminator.

HASIL

Pada penelitian ini diperoleh 20 sampel bakteri kultur *Mycobacteria growth indicator tube* (MGIT). Dari kultur MGIT, dilakukan perhitungan konsentrasi DNA menggunakan nanodrop, dari 25 sampel didapatkan rentang 0.5-840 ng/µL dan kemurnian dengan rentang 0,26-1,8. Selanjutnya dilakukan

PCR dengan siklus sesuai pada Gambar 1 dengan menggunakan primer forward dan primer reverse gen katG untuk memperbanyak gen katG dari *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 2 dan Gambar 3.



Gambar 1. Siklus PCR untuk identifikasi gen katG



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk PCR sampel 1-10 (kode Sp.11-20)



Gambar 3. Hasil elektroforesis produk PCR sampel 11-20 (kode Sp.21-30)

Berdasarkan Gambar 1 dan 2, didapatkan hasil positif pada sampel dengan kode Sp 7, Sp 13, Sp 24, Sp 29. Hasil dikatakan positif karena terlihat satu pita yang berada diantara marker yang berukuran 300-400 bp, yang diduga adalah gen *katG*, sedangkan pada lajur lainnya memberikan hasil negatif, karena tidak menunjukkan adanya pita.

DISKUSI

Pada penelitian ini dilakukan perhitungan konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan nanodrop. Dari 20 sampel didapatkan hasil konsentrasi DNA pada rentang 0,5-840 ng/mL dan kemurnian DNA berkisar antara 0,26-1,8. Kemurnian DNA diperoleh dari perbandingan absorban A260/280. Molekul DNA dikatakan murni jika rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1,8-2,0. Jika DNA dengan rasio berkisar angka tersebut berarti telah memenuhi persyaratan kemurnian yang telah dibutuhkan dalam analisis molekuler. Jika terdapat kontaminasi protein dan bahan organik lainnya ditandai dengan nilai rasio yang rendah dari A260/280, sebaliknya jika terdapat kontaminasi fenol ditandai dengan nilai rasio yang tinggi dari A260/280. Hasil ekstraksi DNA pada penelitian ini ada beberapa sampel mempunyai nilai rasio di bawah 1,8 yang menunjukkan adanya kontaminasi protein (Poudel *et al.*, 2012).

Berdasarkan data yang diperoleh, terdapat hasil kultur MGIT negatif namun pada saat dilakukan PCR hasil menunjukkan positif. Jumlah sampel yang positif sebanyak 2 sampel (8% dari total sampel). Racheal *et al.* (2015) menunjukkan bahwa sensitivitas PCR adalah 92% dan spesifisitas 70%. Sensitivitas dan spesifisitas PCR pada pasien TB dewasa adalah 74,4% dan 97,3%. Data hasil meta analisis yang mengevaluasi studi tentang PCR untuk diagnosis TB pada pasien TB dewasa dengan BTA negatif menunjukkan bahwa sensitivitas PCR memiliki rentang 9-100%, dan spesifisitas berkisar antara 25-100%. Oleh karena itu maka sensitifitas PCR jauh lebih baik dibandingkan dengan diagnostik menggunakan kultur MGIT.

Dari hasil penelitian didapatkan hasil positif karena terlihat satu pita yang berada diantara marker yang berukuran 300-400 pb, yang diduga adalah gen katG, sedangkan pada lajur lainnya memberikan hasil negatif, karena tidak menunjukkan adanya pita. Hal ini sesuai dengan penelitian Zhan *et al.* (2020) yang menyatakan bahwa mutasi gen katG yang berkaitan dengan resistensi terhadap INH dari hasil PCR-sekuensing terlihat pada 29 isolat MTB 2 isolat tersebut mengalami *complete katG deletion*, dinyatakan dengan tidak adanya produk PCR untuk katG. Dan dari 187 spesimen sputum dengan BTA dan kultur positif MTB hanya 161 sampel positif katG.

Diagnosis tuberkulosis yang cepat dan pasti pada pemeriksaan klinik rutin sangat sulit ditegakkan. Hal ini disebabkan karena melakukan pemeriksaan kultur diperlukan waktu 3-6 minggu. Namun pemeriksaan PCR dapat membantu mengurangi lama waktu diagnosis tuberkulosis dengan metode kultur. Selama pemeriksaan ini dilakukan dengan menggunakan metode PCR ini dapat dikembangkan untuk *M.tuberculosis* dengan mengacu pada prosedur kerja yang terstandar sehingga hasil yang diperoleh tepat. Tekwu *et.al.* (2014) melaporkan bahwa sensitivitas PCR adalah 98% dan persentase ini jauh lebih tinggi dari pemeriksaan dengan metode kultur yang hanya sebesar 75%. Pemeriksaan dengan PCR ini memiliki validitas yang tinggi karena sama dengan melakukan 3 proses konfirmasi pemeriksaan TB dengan metode kultur.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam menentukan penanda awal pada saat penyakit tuberkulosis telah berkembang menjadi Multi Drugs Resistant Tuberculosis (MDR-MTB), dan untuk mengetahui lebih awal resistensi terhadap obat anti tuberkulosis.

KESIMPULAN

Diperoleh gen katG menggunakan metode PCR yang ditandai dengan adanya pita DNA berukuran ± 317 pb.

KONFLIK KEPENTINGAN

Seluruh penulis tidak memiliki konflik kepentingan dalam penelitian ini.

REFRENSI

- Aye, K.S., Nakajima, C., Yamaguchi, T., Win, M.M., Shwe, M.M., Win, A.A. (2016). Genotypic characterization of multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Myanmar. *J Infect Chemother.*
- Bollela, V.R., Namburete, E.I., Feliciano, C.S., Macheque, D., Harrison, L.H., Caminero, J.A. (2016). Detection of katG and inhA mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.*
- Hidayat Syarif AR. (2012). Perbandingan Metode Kultur Medium Middlebrook, Middlebrook Modifikasi, dan Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) untuk Mendeteksi Mycobacterium tuberculosis Pada Penderita Suspek TB Di Makasar. Makasar. Universitas Hasanudin.
- Kapata, N., Chanda-Kapata, P., Bates, M., Mwaba, P., Cobelens, F., Grobusch, M.P. (2011). Multidrug-resistant TB in Zambia: review of national data from 2000 to 2011. *Trop Med Int Health.*
- Poudel, A., Nakajima, C., Fukushima, Y., Suzuki, H., Pandey, B.D., Maharjan, B. (2012). Molecular characterization of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolated in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother.*
- Racheal, S., Dhlamini, Z., Mutetwa, R., Duri, K., Stray-Pedersen, B., Mason, P. (2015). Diagnosis of multi-drug resistant tuberculosis mutations using

Hain line probe assay and GeneXpert: a study done in Zimbabwe. *Br J Med Med Res*.

- Solo, E.S., Nakajima, C., Trevor, K. (2020). Mutations in *rpoB* and *katG* genes and the *inhA* operon in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Zambia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*.
- Tekwu, E.M., Sidze, L.K., Assam, J.P., Tedom, J.C., Tchatchouang, S., Makafe, G.G. (2014). Sequence analysis for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from the Central Region of Cameroon. *BMC Microbiol*.
- Unissa, A.N., Subbian, S., Hanna, L.E., Selvakumar, N. (2016). Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol*.
- World Health Organization (WHO). (2018). Global tuberculosis report 2018. Geneva, Switzerland: WHO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274453>.
- Zhan, L., Wang, J., Liang, W., Chuan, Q. (2020). The correlation of drug resistance and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biosafety and Health*.
-