

# DETEKSI MUTASI GEN *kasA* KODON G312S PADA ISOLAT *Mycobacterium tuberculosis* SEBAGAI PENANDA RESISTENSI ISONIAZID

Elshinta Latuheru<sup>1\*</sup> · Nurfitri Arfani<sup>2</sup> · Ayusti Dirga<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> D-IV Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Teknologi Kesehatan, Universitas Megarezky  
Makassar, Sulawesi Selatan, Indonesia  
e-Mail : [elshintalatuheru5@gmail.com](mailto:elshintalatuheru5@gmail.com)  
No Tlp WA : 0823 1115 6606

## Abstract

*Tuberculosis is a disease caused by the bacterium Mycobacterium tuberculosis which is still a public health problem throughout the world, especially in Indonesia. Handling and controlling of tuberculosis (TB) disease is becoming increasingly difficult with the increasing cases of resistance of Mycobacterium tuberculosis to anti-tuberculosis drugs such as isoniazid. Resistance can occur due to medicines that encode or code for OAT targets such as the kasA gene (β-Ketoacyl-Acyl) for isoniazid. The study aimed to detect the presence of kasA gene mutations codon G312S from TB patients undergoing treatment using the Multiplex Allele Specific-Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) method in as many as 15 samples. The results showed that there were 6 (40%) isolate samples that experienced kasA gene mutations due to substitutions in the G312S codon and 9 (60%) isolate samples that did not experience mutations (Wild Type) characterized by the appearance of a band at 197 bp. So it can be concluded that there is a mutation of the kasA gene codon G312S in Mycobacterium tuberculosis isolates from patients who are undergoing treatment with OAT isoniazid.*

**Keywords:** INH, *kasA* G312S, MAS-PCR, *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis

## Abstrak

Tuberkulosis adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia terutama di Indonesia. Penanganan dan pengendalian penyakit tuberkulosis (TB) menjadi semakin sulit dengan meningkatnya kasus resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap obat anti tuberkulosis (OAT) seperti isoniazid. Resistensi dapat terjadi karena penggunaan obat yang tidak tepat dan tidak teratur, sehingga menimbulkan mutasi pada gen yang mengkode atau menyandi target OAT seperti gen *kasA* (*β-Ketoasil-Asil*) untuk isoniazid. Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi adanya mutasi gen *kasA* kodon G312S dari penderita TB yang sedang menjalani pengobatan. Metode pemeriksaan yang digunakan adalah *Multiplex Allele Specific-Polymerase Chain Reaction* (MAS-PCR) dengan jumlah sampel sebanyak 15 sampel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 6 (40%) sampel isolat yang mengalami mutasi gen *kasA* karena adanya substitusi pada kodon G312S dan 9 (60%) sampel isolat yang tidak mengalami mutasi (*Wild Type*) yang ditandai dengan munculnya pita pada 197 bp. Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat mutasi gen *kasA* kodon G312S pada isolat *Mycobacterium tuberculosis* dari pasien yang sedang menjalani pengobatan dengan OAT isoniazid.

**Kata Kunci :** INH, *kasA* G312S, MAS-PCR, *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberkulosis

## PENDAHULUAN

Tuberkulosis adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang telah menjadi masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia (Kamrin *et al.*, 2023). Tuberkulosis adalah penyakit menular yang dapat menyerang berbagai organ, terutama paru-paru. Bila pengobatannya tidak tuntas, penyakit ini dapat mengakibatkan komplikasi berbahaya hingga kematian (Muhammad & Fadli, 2019).

Berdasarkan data dari *World Health Organization* (WHO), total kasus TB di dunia pada tahun 2023 mencapai 10,6 juta kasus, 6 juta diantaranya laki-laki, 3,4 juta perempuan dan 1,2 juta anak-anak. Dua negara yang memberikan kontribusi terbesar terhadap peningkatan jumlah penderita TB secara global adalah India dan Indonesia yaitu sebesar 56% antara tahun 2021 dan 2022 (WHO, 2023).

Kementerian Kesehatan RI mencatat kasus Tuberkulosis di Indonesia mencapai 1.060.000 kasus pada tahun 2023 dan diperkirakan 150.000 orang meninggal karena TB (Kemenkes RI, 2024). Jumlah kasus TB di Sulawesi selatan yang tersebar di 24 kabupaten/kota tahun 2023 adalah 47.075 kasus (Dinkes Sulawesi Selatan, 2023). Jumlah penderita TB di kota Makassar pada tahun 2023 sebanyak 5.444 kasus (Dinkes Kota Makassar, 2023).

Salah satu usaha yang dilakukan pemerintah Indonesia dalam penanggulangan kasus TB yaitu dengan pemberian terapi pengobatan terhadap pasien TB (Siregar, 2019). Obat anti-TB yang digunakan sebagai lini pertama pengobatan TB adalah Rifampicin (RIF), Isoniazid (INH), Ethambutol (EMB), Streptomisin dan Pirazinamid (PZA) (Umar, 2023).

Saat ini, tantangan penting dalam pengendalian dan pengobatan TB adalah munculnya berbagai resistensi obat di antara isolat *Mycobacterium tuberculosis*. *Indonesian Tuberculosis Roadmap Overview* oleh USAID menyebutkan bahwa sebanyak 8.268 orang didiagnosis menderita TB yang resisten terhadap obat (TB-DR) dan 5.234 orang (63%) menjalani pengobatan (USAID, 2023). Dibandingkan dengan kasus yang rentan terhadap obat, pengobatan untuk TB yang resisten terhadap obat lebih lama dan kurang berhasil (Bakhtiyariniya *et al.*, 2022)

INH adalah obat pro yang digunakan untuk mencegah bakteri *M.tuberculosis* berkembang biak dalam tubuh dengan cara menghambat biosintesis asam mikolat, penyusun dinding sel mikobakteri penting, yang menyebabkan kematian sel mikobakteri (Anton, 2021). INH memerlukan aktivasi oleh Gen *kasA* yaitu gen target potensial dari INH (Jayaraman *et al.*, 2019). Mutasi pada kodon tertentu dalam Gen *kasA* dapat menyebabkan hilangnya aktivitas enzim ini, sehingga menyebabkan pertumbuhan bakteri yang resisten terhadap obat (Rudraraju *et al.*, 2022). Oleh karena itu, resistensi INH dapat diketahui dengan mendeteksi mutasi gen (Siregar, 2015).

Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti tertarik untuk mendeteksi adanya mutasi *kasA* kodon G312S pada penderita TB yang telah mengonsumsi OAT dari golongan INH dengan menggunakan metode *Multiplex Allele Specific-Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR)*.

## BAHAN DAN METODE

Sampel isolat diambil di Laboratorium *Hasanuddin University Medichal Research Center (HUM-RC)* Makassar pada bulan Juli 2024. Lokasi penelitian bertempat di Laboratorium HUM-RC pada bulan Juli 2024.

Bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah isolat *Mycobacterium tuberculosis*, kit ekstraksi DNA (gSYNC™ DNA Extraction Kit), Primer gen *kasA* Primer Forward [5'-GTCAGATCGTGATGGGCGAC-3'], dan Primer Reverse [5'-GTCTCGATGAGCATCAGC-3'], isolat *M.tuberculosis* strain H37Rv, ddH<sub>2</sub>O, Buffer Tris-Borate EDTA (TBE), agarose (OmniPur Agarose), tabung eppendorf, GS column, ethidium bromide, satu set alat elektroforesis (*Biorad*), collection tube, tip.

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dengan pendekatan *cross sectional study* untuk mendeteksi adanya mutasi gen *kasA* pada isolat *Mycobacterium tuberculosis*.

Penelitian ini terdiri dari empat tahap penelitian yaitu:

## 1. Ekstraksi DNA *M. tuberculosis*

Prosedur ekstraksi DNA mengikuti protokol *gSYNC™ DNA Extraction Kit*. Sebanyak 200 µL sampel isolat dipipet ke dalam tabung mikrosentrifus steril 1,5 mL dan ditambahkan 20 µL proteinase K dan dihomogenkan melalui pipetting kemudian diinkubasi pada suhu 60 °C selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan 200 µL GSB buffer, campuran tersebut kemudian di vorteks sebelum diinkubasi kembali pada suhu yang sama selama 5 menit. Setelah inkubasi tambahkan 200 µL etanol absolut (96%) dan kemudian di vorteks selama 10 detik. Campuran kemudian dipindahkan ke spin column dan disentrifuge pada 10.000 RPM selama 1 menit. Buang sisa pada GS column ganti dengan collection tube yang baru. Tambahkan 400µl w1 buffer kemudian sentrifuge dengan kecepatan 10.000 RPM. Buang cairan bagian bawah tabung, tambahkan 600 µL wash buffer yang telah ditambahkan etanol 96%, sentrifuge dengan kecepatan 10.000 RPM selama 30 detik, kemudian dibuang cairan pada collection tube, dilakukan sentrifuge lagi dengan kecepatan 10.000 RPM selama 3 menit. Setelah di sentrifuge, masukkan spin column ke dalam tabung eppendorf atau mikrosentrifuge untuk mengumpulkan DNA yang diekstraksi, tambahkan *buffer elution* sebanyak 100 µL yang telah dipanaskan, diamkan selama 3 menit agar elusi buffer dapat menyerap pada bagian tengah *spin column*, dilanjutkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan yang sama selama 30 detik. DNA hasil ekstraksi yang terkandung dalam cairan yang terkumpul di dalam tabung mikrosentrifuge, buang spin column dan hasil elusi DNA dilanjutkan ke tahapan MAS-PCR (Harini *et al.*, 2019).

## 2. Amplifikasi MAS-PCR

DNA hasil ekstraksi dipipet ke dalam PCR Mix yang terdiri dari 12,5 µL Enzim *Taq Polymerase (HS Bionline)*, 0,5 µL Primer *kasA*, 0,5 Primer *katG*, 5 µL sampel DNA, 5,5 µL NFW, kontrol positif (K+) menggunakan *H37Rv*, kontrol negatif (-) menggunakan ddH<sub>2</sub>O. Tahapan amplifikasi MAS-PCR terdiri dari beberapa fase diantaranya fase pradenaturasi pada suhu 95 °C selama 15

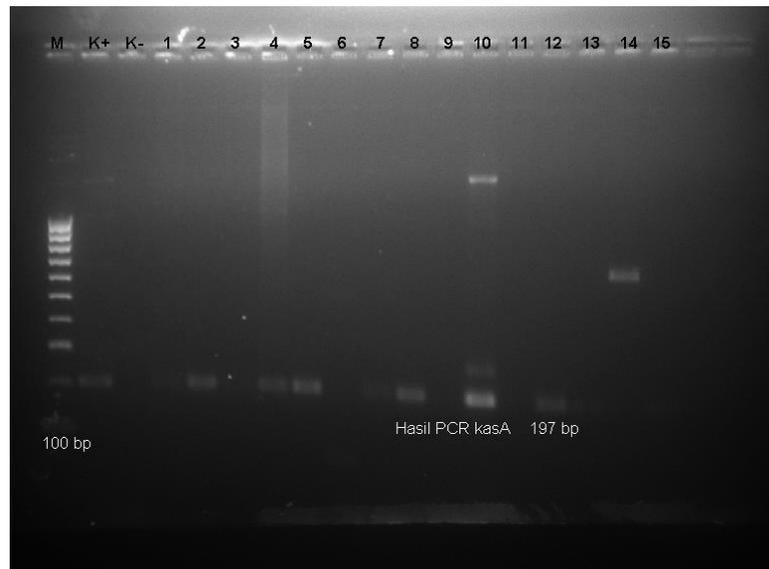
menit, fase denaturasi pada suhu 95 °C selama 50 detik, kemudian fase annealing pada suhu 57 °C selama 20 detik, dan fase extension pada suhu 72 °C selama 1 menit. Pengulangan dilakukan sebanyak 34 siklus. Siklus terakhir ialah final extension pada suhu 72 °C selama 7 menit. Kemudian DNA hasil dari amplifikasi dilanjutkan dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 2% yang mengandung *ethidium bromide*. Selanjutnya hasil gel elektroforesis kemudian divisualisasikan di bawah sinar UV.

### 3. Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis

Gel agarose 2% dibuat dengan mencampurkan 2 gram serbuk agarose ke dalam 100 mL TBE buffer di botol schott kemudian dipanaskan ke dalam microwave selama 2 menit hingga mendidih. Campuran tersebut lalu ditambahkan 3 µL ethidium bromide. Cairan gel lalu didinginkan di suhu kamar. Setelah agak dingin, cairan gel dituang ke cetakan gel elektroforesis dan digunakan 17 sumur yang terdiri dari 1 sumur marker, 1 sumur kontrol negatif, 1 sumur kontrol positif dan 15 sumur hasil amplifikasi DNA. Masing-masing 5µL hasil amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel agarose 2% yang terendam dalam tangki yang berisi TBE Buffer 0,5x. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan selama 40 menit dengan tegangan konstan 100 volt. Setelah 40 menit elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati pada mesin *gel doc*.

## HASIL

Hasil penelitian dapat dilihat pada Gambar 1. dibawah ini.



**Gambar 1.** Hasil Visualisasi Gen *kasA* kodon G312S dengan metode MAS-PCR. Keterangan M=Marker; K-=Kontrol Negatif; K+ = Kontrol Positif; 1-15 = Sampel

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 1, yaitu munculnya pita pada ukuran 197 bp pada 9 sampel sementara 6 sampel lainnya tidak menunjukkan adanya pita.

**Tabel 1.** Interpretasi Hasil Pemeriksaan

No	Keterangan Sampel	Hasil PCR
1	Kontrol Positif	Positif
2	Kontrol Negatif	Negatif
3	Sampel 1	<i>Wild Type</i>
4	Sampel 2	<i>Wild Type</i>
5	Sampel 3	<i>Mutasi</i>
6	Sampel 4	<i>Wild Type</i>
7	Sampel 5	<i>Wild Type</i>
8	Sampel 6	<i>Mutasi</i>
9	Sampel 7	<i>Wild Type</i>
10	Sampel 8	<i>Wild Type</i>
11	Sampel 9	<i>Mutasi</i>
12	Sampel 10	<i>Wild Type</i>
13	Sampel 11	<i>Mutasi</i>
14	Sampel 12	<i>Wild Type</i>
15	Sampel 13	<i>Wild Type</i>

No	Keterangan Sampel	Hasil PCR
16	Sampel 14	Mutasi
17	Sampel 15	Mutasi

Hasil distribusi pasien TB berdasarkan hasil pemeriksaan dengan *Multiplex Allele Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR)* yang diinterpretasikan ke dalam Tabel 1. yaitu dari 15 sampel isolat didapatkan hasil mutasi pada 6 sampel yaitu pada sampel 3, 6, 9, 11, 14, 15 sedangkan 9 sampel lainnya didapatkan hasil *Wild Type* yaitu pada sampel 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13.

**Tabel 2.** Distribusi Hasil Pemeriksaan Mutasi Gen *kasA* kodon G312S

Hasil	Jumlah	Persentase
Mutasi	6	40%
<i>Wild Type</i>	9	60%
Total	15	100%

Hasil penelitian yang diinterpretasikan ke dalam Tabel 2, yaitu dari 15 sampel didapatkan hasil mutasi sebanyak 6 sampel (40%) dan 9 sampel (60%) sampel didapatkan hasil *Wild Type*.

## DISKUSI

Deteksi mutasi gen *kasA* dimulai dari tahapan ekstraksi DNA untuk mendapatkan DNA murni dengan menggunakan metode *Spin Column*. Prosedur ekstraksi mengikuti protokol gSYNC™ DNA Extraction Kit. Setelah itu dilanjutkan dengan metode MAS-PCR dengan menggunakan primer spesifik yang akan mengenali secara spesifik keberadaan suatu *Allele* dari ujung 5'-3' dari primer spesifik yang akan menempel pada DNA cetakan yang mengalami mutasi, setelah itu dilanjutkan dengan tahapan elektroforesis, yaitu pemisahan molekul berdasarkan muatan.

Primer yang digunakan dalam penelitian ini didesain khusus untuk mengenali area *Wild Type*. Pada Gambar 1, keberadaan pita menunjukkan bahwa sampel termasuk dalam kategori *Wild Type*, sedangkan tidak adanya pita mengindikasikan adanya mutasi atau perubahan basa nukleotida pada sampel tersebut. Jika urutan target tidak mengalami mutasi, maka primer *Wild Type* akan mengikat dengan baik, dan produk PCR yang dihasilkan akan menunjukkan pita pada elektroforesis. Jika terjadi mutasi pada lokasi yang dikenali oleh primer *Wild Type*, primer ini tidak

akan dapat mengikat dengan baik, dan pita tidak muncul pada elektroforesis, menunjukkan adanya mutasi pada lokasi tersebut (Bertolotti & Cirillo, 2018).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 6 (40%) sampel isolat yang mengalami mutasi gen *kasA* karena adanya substitusi pada kodon G312S dan 9 (60%) sampel isolat yang tidak mengalami mutasi (*Wild Type*) yang ditandai dengan munculnya pita pada 197 bp. Mutasi terjadi pada 6 sampel yaitu sampel 3, 6, 9, 11, 14, dan 15. Mutasi yang terjadi menandakan adanya resistensi terhadap antibiotik golongan INH (Bakhtiyariniya et al., 2022).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh *Bakhtiyariniya et al.*(2022), menunjukan bahwa dari 15 isolat resisten INH, terdapat 4 isolat yang mengalami mutasi pada gen *kasA*. Salah satu titik mutasi pada gen *kasA* adalah mutasi pada kodon 312 (GGC→AGC). Mutasi gen *kasA* ini dianggap sebagai mutasi yang berhubungan dengan resistensi INH (Bakhtiyariniya et al., 2022).

Sampel yang tidak mengalami mutasi (*Wild Type*) menandakan bahwa sampel tersebut tidak mengalami resistensi terhadap antibiotik jenis INH yang dapat disebabkan oleh beberapa faktor salah satu diantaranya yaitu pengobatan yang telah diberikan sudah adekuat dan sesuai standar. Hal ini erat kaitannya dengan patomekanisme resistensi yang menandakan semua aktivitas enzim, proses metabolisme, dan efektivitas antibiotik pada *M. tuberculosis* sudah berjalan sesuai dengan fungsi dan peran dari antibiotik itu sendiri (Siregar, 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Inaya et al.(2020), menyatakan bahwa ada hubungan antara fungsi pengawas konsumsi obat (PMO) dan hasil pengobatan pasien TB yang berhasil. Keterlibatan PMO dalam memfasilitasi pemulihan pasien TB paru merupakan salah satu variabel yang dapat mempengaruhi efektivitas pengobatan. Pengobatan TB paru adalah proses yang panjang, dan untuk menjaga konsistensi pengobatan, organisasi manajemen pasien (PMO) diperlukan untuk mendukung pasien selama fase pengobatan agar tidak terjadi hal-hal yang tidak diinginkan seperti resistensi antibiotik.

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa dari 15 sampel yang diperiksa terdapat 6 (40%) sampel isolat yang mengalami mutasi gen *kasA* kodon G312S.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Megarezky Makassar khususnya kepada Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis atas dukungan moral dan kesempatan yang diberikan untuk menjalankan penelitian ini, serta kepada Laboratorium HUM-RC yang telah menyediakan fasilitas laboratorium yang memadai, serta bimbingan yang sangat membantu dalam proses penelitian ini.

## KONFLIK KEPENTINGAN

Seluruh penulis tidak memiliki konflik kepentingan dalam penelitian ini.

## REFRENSI

- Anton, R. M. (2021). Jenis-Jenis Mutasi Gen Mycobacterium tuberculosis Terhadap Penyebab Resistansi Isoniazid (Studi Pustaka). Diploma Thesis, Poltekkes Tanjungkarang.
- Bakhtiyariniya, P., Khosravi, Dokht, Hashemzadeh, A., Mohammad, & Mohammad Savar. (2022). Detection and Characterization of Mutations in Genes Related to Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates from Iran. *Molecular Biology Repair*, 49(7).
- Bertolotti, & Cirillo, D. (2018). Mycobacterium tuberculosis: Drug resistance and genetic diversity. *Microbiology and Molecular Biology*, 82(3).
- Harini, S., Hafsan, Sahara, Aziz, I. R., & Rahim, R. (2019). ICOST 2019: 1st International Conference on Science and Technology. European Alliance for Innovation (Vol. 004). Retrieved from [http://www.geneaid.com/sites/default/files/GS15\\_0.pdf](http://www.geneaid.com/sites/default/files/GS15_0.pdf)
- Inaya, F., Agnes, M., Dedy, E., & Sagita, S. (2020). Hubungan Pengawasan Menelan Obat Terhadap Keberhasilan Pengobatan Tuberculosis Di Kupang. *Cendana Medical Journal*, 20(2), 206-207.

- Jayaraman, M., Rajendra, S. K., & Ramadas, K. (2019). Structural Insight Into Conformational Dynamics of Non-Active Site Mutations in KasA: A Mycobacterium tuberculosis Target Protein. *Gene*, 7(20).
- Kamrin, Huwriyati, J., Rahayu, Syanti, D. Y., Naningsi, A., Ulva, S. M., ... Ramadhani, T. (2023). *Epidemiologi Penyakit Menular*. (T. B. T. Satoto & R. Tosepu, Eds.), Correspondencias & Análisis (1st ed.). Jawa Tengah: EUREKA MEDIA AKSARA.
- Muhammad, M., & Fadli, F. (2019). Analisis Faktor Penyebab Multi-Drug Resistance (Mdr) Pada Penderita Tuberkulosis. *Jurnal Publikasi Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 6(2), 62-67. <https://doi.org/10.20527/jpkmi.v6i2.7454>
- Rudraraju, R. S., Daher, S. S., Gallardo-Macias, R., Wang, X., Neiditch, M. B., & Freundlich, J. S. (2022). Mycobacterium tuberculosis KasA as a drug target: Structure-based inhibitor design. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12(September), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1008213>
- Siregar, M. I. T. (2015a). Mekanisme Resistensi Isoniazid & Mutasi Gen KatG Ser315Thr (G944C) Mycobacterium tuberculosis Sebagai Penyebab Tersering Resistensi Isoniazid. *JMJ*, 3(2).
- Siregar, M. I. T. (2015b). Mekanisme Resistensi Isoniazid & Mutasi Gen KatG Ser315Thr (G944C) Mycobacterium tuberculosis Sebagai Penyebab Tersering Resistensi Isoniazid. *Jmj*, 3(2), 119-131.
- Siregar, S. R. (2019). Extensively Drug Resistant Tuberculosis ( XDR TB ). *Jurnal Averrous*, 5(2).
- Umar, F. (2023). *Kajian Mekanisme Resistensi Intrinsik dan Resistensi Genetik Terhadap Obat Anti Tuberkulosis* (1st ed.). Jawa Barat: PT. Toko Buku Indonesia.
- USAID. (2023). *Indonesian Tuberculosis Roadmap Overview, Fiscal Year 2023*. USAID From The American People.
- WHO. (2023). *Global Tuberculosis Report 2023*. World Health Organization.