

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis adalah mikobakteri penyebab tuberkulosis pada manusia. Sebagian besar bakteri *Mycobacterium tuberculosis* menyerang paru, tetapi dapat juga mengenai organ tubuh lainnya (Irianti dkk., 2016). *Mycobacterium tuberculosis* terkadang disebut sebagai *tubercle bacilli* yaitu organisme yang membutuhkan oksigen untuk tumbuh (CDC, 2016). Taksonomi dari *Mycobacterium tuberculosis*:

Kingdom : *Bacteria*

Filum : *Actinobacteria*

Ordo : *Actinomycetes*

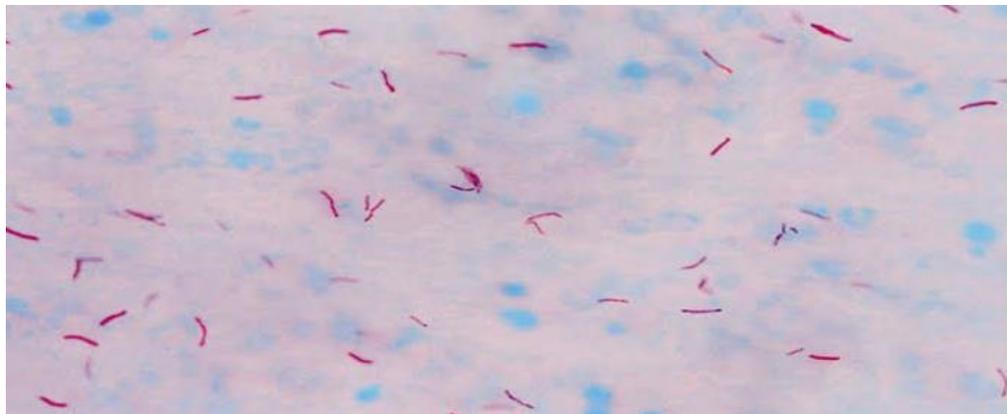
Sub Ordo : *Corynebacterineae*

Famili : *Mycobacteriaceae*

Genus : *Mycobacterium*

Spesies : *Mycobacterium tuberculosis* (Stackebrandt *et al.*, 1997)

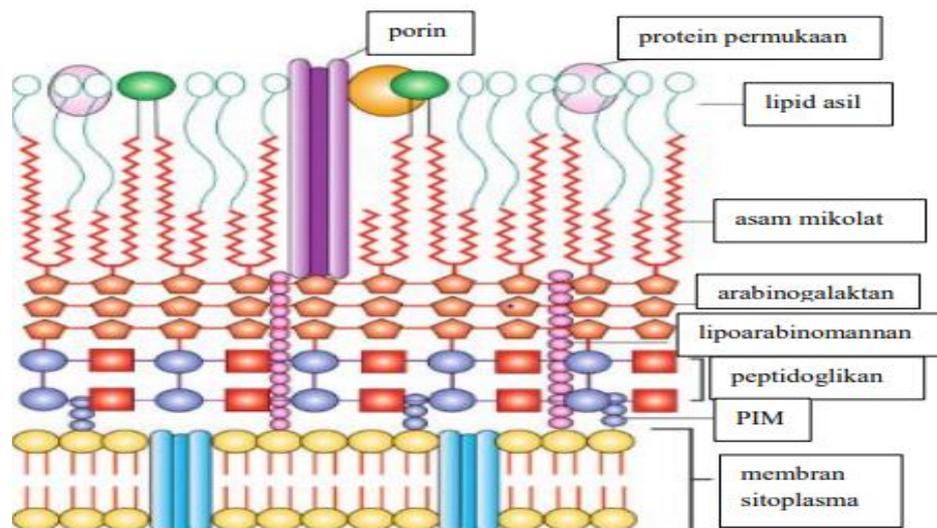
Mycobacterium tuberculosis berbentuk batang lurus atau bengkok, dengan panjang 1-4 μ m dan lebar 0,3-0,56 μ m. *Mycobacterium tuberculosis* dapat hidup tunggal atau bergerombol. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan *obligate aerobe* yang dapat tumbuh dengan baik dalam jaringan dengan kadar oksigen tinggi seperti paru-paru.



Sumber: (Kemenkes RI, 2012)

Gambar 2.1. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dengan pewarnaan Basil Tahan Asam

Mycobacterium tuberculosis diklasifikasikan sebagai bakteri *acid-fast*. Jika pewarnaan gram dilakukan, maka warna gram positif yang muncul sangatlah lemah atau tidak berwarna sama sekali. Namun ketika terwarnai, sebagai bakteri *acid-fast* maka akan mempertahankan pewarna saat dipanaskan dan diberi komponen asam organik. Seperti pada gambar 2.1. pada penggunaan metode Ziehl Neelsen, *strain* bakteri ini akan menunjukkan warna merah muda (Irianti dkk., 2016).



Sumber: Irianti dkk., 2016

Gambar 2.2. Ilustrasi skematik dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*

Pada gambar 2.2. merupakan diagram skematik dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* yang terdiri dari kerangka dinding sel, molekul penyusun dinding sel, lipid dan polipeptida. Kerangka dinding sel memiliki komponen kimia berupa peptidoglikan, arabinogalaktan dan asam mikolat. Asam mikolat adalah suatu asam lemak α -alkil, β hidroksi dengan rantai yang sangat panjang (C30-C90). Sekitar 40% berat kering mikobakteri adalah asam mikolat. Selain bertanggung jawab terhadap *acid fastness*, asam mikolat juga berperan penting dalam impermeabilitas dinding sel termasuk impermeabilitas terhadap anti tuberkulosis. Komposisi dan jumlah asam mikolat mempengaruhi virulensi (keganasan), kecepatan pertumbuhan, morfologi koloni dan permeabilitas *Mycobacterium tuberculosis* (Irianti dkk., 2016).

2. Penyakit Tuberkulosis

Tuberkulosis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Sebagian besar bakteri *Mycobacterium tuberculosis* menyerang paru-paru, tetapi dapat juga mengenai organ tubuh yang lain. Ketika penderita penyakit TB paru aktif (BTA positif dan foto rontgen positif) batuk, bersin, berteriak atau bernyanyi, bakteri terbawa keluar dari paru-paru menuju udara. Bakteri ini akan berada pada gelembung cairan bernama *droplet nuclei*. Partikel kecil ini dapat bertahan di udara selama beberapa jam dan tidak dapat dilihat oleh mata karena memiliki ukuran dengan diameter sebesar 1-5 μm (Irianti dkk., 2016).

a. Patofisiologi dan Patogenesis Penyakit Tuberkulosis

1) Patofisiologi

Mycobacterium tuberculosis ditularkan melalui udara, bukan melalui kontak permukaan. Ketika penderita tuberkulosis paru aktif (BTA positif dan foto rontgen positif) batuk, bersin, bakteri akan terbawa keluar dari paru-paru menuju udara. Bakteri ini akan berada di dalam gelembung cairan bernama *droplet nuclei*. Partikel kecil ini dapat bertahan di udara selama beberapa jam dan tidak dapat dilihat oleh mata karena memiliki diameter sebesar 1-5 μm (CDC, 2016).

Penularan tuberkulosis terjadi ketika seseorang menghirup *droplet nuclei* lalu melewati mulut/saluran hidung, saluran pernafasan atas, bronkus kemudian menuju alveolus (CDC, 2016). Setelah *tubercle bacilli* sampai di jaringan paru-paru, mereka akan mulai memperbanyak diri. Lambat laun, mereka akan menyebar ke kelenjar limfa. Proses ini disebut sebagai *primary TB infection*. Ketika seseorang dikatakan penderita *primary TB infection*, *tubercle bacilli* berada di tubuh orang tersebut. Seseorang dengan *primary TB infection* tidak dapat menyebarkan penyakit ke orang lain dan juga tidak menunjukkan gejala penyakit (Irianti dkk., 2016).

Dosis penularan *droplet nuclei* dilaporkan diantara 1 hingga 200 *bacilli* per orang, dimana satu droplet dapat mengandung 1 hingga 400 *bacilli*, namun belum jelas anggapan dosis relevan ini (Sakamoto, 2012).

Walaupun tuberkulosis biasanya tidak ditularkan saat kontak singkat, siapa saja berbagi udara dengan *strain* TB pada tahap infeksius, maka dia berisiko tinggi tertular (Irianti dkk., 2016).

2) Patogenesis

Setelah infeksi pertama, sel pertahanan tubuh orang sehat (makrofag) akan bergerak menuju tempat infeksi dan memakan *bacilli*. Namun, *tubercle bacilli* sangatlah kuat karena struktur dinding selnya. Perlindungan ini membuat *tubercle bacilli* dapat bertahan meskipun makrofag memakannya. Setelah makrofag memakan *tubercle bacilli*, *bacilli* kemudian menginfeksi makrofag.

Setelah makrofag ditaklukkan oleh *tubercle bacilli*, sistem imun tubuh mencoba strategi pertahanan lain. Sejumlah sel pertahanan sampai di kelenjar limfa dan mengelilingi area infeksi. Sel-sel ini membentuk gumpalan sel keras dengan sebutan *tubercle*. Sel ini membantu untuk membunuh *bacilli* melalui pembentukan dinding pencegah penyebaran infeksi lebih lanjut.

Pada beberapa kasus, sel pertahanan dapat merusak semua *tubercle bacilli* secara permanen. Namun, ada kasus dimana sel pertahanan tidak mampu untuk merusak semua *tubercle bacilli*. *Tubercle bacilli* yang bertahan masuk ke dalam status *dormant* dan dapat bertahan lama. Sepanjang waktu ini, bakteri tertidur. Pasien tidak menunjukkan gejala dan tidak dapat menularkannya ke orang lain. Kondisi tersebut dikenal dengan TB laten.

Bakteri *dormant* dapat bangun kembali dan merusak dinding sel pertahanan dalam suatu proses. Proses tersebut dikenal sebagai *Secondary TB infection*. Keadaan tersebut dapat terjadi ketika sistem imun tubuh menjadi lemah dan tidak mampu melawan bakteri, atau ketika bakteri mulai memperbanyak diri. *Secondary TB infection* sering dianggap sebagai onset penyakit tuberkulosis aktif (kondisi ketika bakteri mulai memenangkan perlawanan terhadap sistem pertahanan tubuh dan mulai menyebabkan gejala) (Irianti dkk., 2016).

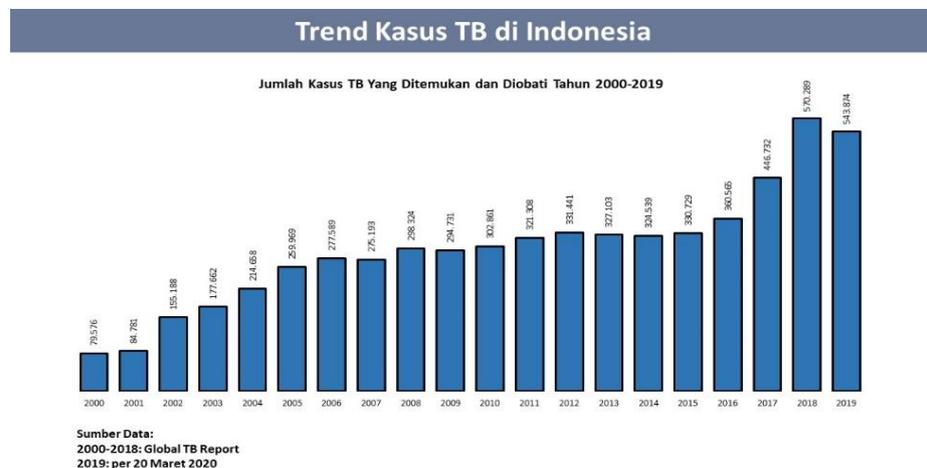
b. Epidemiologi Penyakit Tuberkulosis

1) Epidemiologi Global

Secara global, diperkirakan 10 juta jiwa menderita TB pada tahun 2019 dengan angka kematian sekitar 1,2 juta jiwa pada *strain* TB dengan HIV-negatif dan 208.000 kasus kematian pada *strain* TB dengan HIV-positif. Kasus TB di dunia 56% dialami oleh pria (berumur 15 tahun keatas), lalu wanita (berumur 15 tahun keatas) sebesar 32%, dan anak-anak (berumur 15 tahun kebawah) dengan persentase kejadian sebesar 12%. Di antara semua itu, 8,2% jiwa menderita TB dengan HIV-positif.

Tuberkulosis resistan obat selanjutnya menjadi ancaman kesehatan masyarakat. Tahun 2019 terdapat sekitar 465.000 jiwa mengalami *rifampicin-resistant tuberculosis* (RR-TB), dimana 78% diantaranya mengalami *multi-drug resistant tuberculosis* (MDR-TB). Terdapat sekitar 182.000 kasus kematian akibat MDR/RR-TB di seluruh dunia. Tiga negara dengan persebaran terbesar secara global yaitu India (27%), China (14%) dan Rusia (8%) (WHO, 2020).

2) Epidemiologi di Indonesia

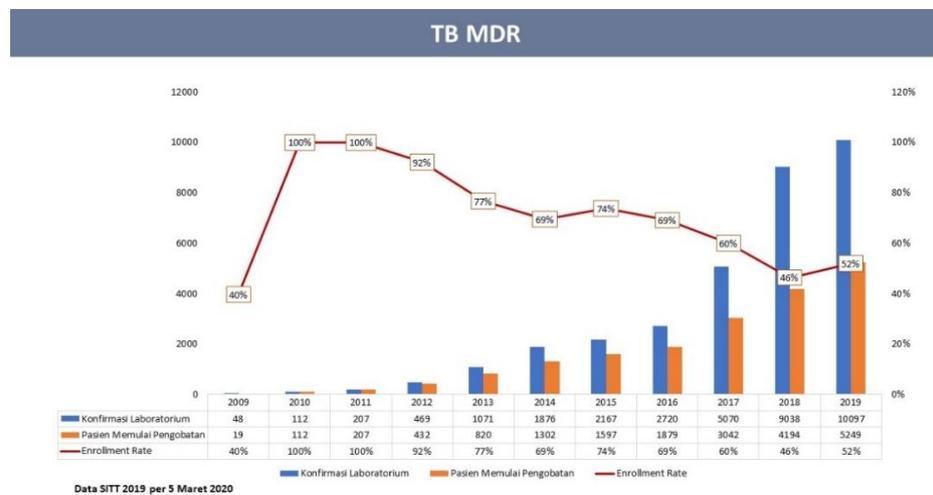


Sumber: Ditjen P2P, 2020

Gambar 2.3. Trend Kasus Tuberkulosis di Indonesia Tahun 2000-2019

Indonesia adalah negara dengan prevalensi TB tertinggi kedua di dunia setelah India. Angka insiden TB di Indonesia sebesar 312 per 100.000 penduduk dengan angka kematian sebesar 11.993 jiwa. Jumlah kasus TB di Indonesia tahun 2019 diperkirakan sebesar 845.000 kasus dimana baru 543.874 jiwa yang ternotifikasi TB dan 35% lainnya tidak

terlaporkan. Dari jumlah tersebut, 63.111 kasus terjadi pada anak-anak dan 11.117 lainnya tercatat TB dengan HIV-positif (Ditjen P2P, 2020).



Sumber: (Ditjen P2P, 2020)

Gambar 2.4. Trend Kasus MDR-TB di Indonesia
Tahun 2009-2019

Penanganan TB di Indonesia mengalami tantangan, dimana terdapat ± 9.875 jiwa ternotifikasi TB RR/MDR. Pada gambar 2.4 menunjukkan bahwa setiap tahun terjadi peningkatan jumlah kasus MDR-TB, kasus tertinggi terjadi pada tahun 2019 dengan 10.097 kasus terkonfirmasi laboratorium sebagai *strain* MDR-TB dan 5.249 kasus (52%) pasien memulai pengobatan (Ditjen P2P, 2020).

c. Multi-Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB)

Multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) ialah *strain* yang resistan terhadap Isoniazid (INH) dan Rifampisin (RIF) dengan atau tanpa resistan terhadap obat lain. MDR-TB merupakan faktor penyulit dalam mengobati penyakit tuberkulosis dan beresiko kematian yang tinggi dalam 5 tahun (50–60%) (Irianti dkk., 2016).

Resistensi terhadap antibiotik dapat terjadi akibat mutasi maupun transfer gen horizontal, hal ini diketahui terjadi akibat adanya mutasi kromosomal. Selain itu, resistansi juga memungkinkan terjadinya netralisasi aktifitas terhadap antibiotik yang diberikan (Smith *et al.*, 2013).

Faktor risiko yang terbukti berpengaruh pada kejadian *Multi-drug resistant tuberculosis* (MDR-TB) adalah motivasi yang rendah pada pasien dalam melakukan pengobatan, ketidakteraturan dalam meminum obat,

pelayanan yang kurang memuaskan dari penyelenggara fasilitas kesehatan, serta kurangnya pengetahuan penderita tentang penyakitnya dan bagaimana mengobatinya (Sarwani Dewi dkk., 2012).

d. Pemeriksaan Laboratorium Tuberkulosis

Pemeriksaan laboratorium untuk diagnosis tuberkulosis meliputi:

1) Pemeriksaan mikroskopis tuberkulosis

Pemeriksaan dahak selain berfungsi untuk menegakkan diagnosis, juga untuk menentukan potensi penularan dan menilai keberhasilan pengobatan.

Metode : Pemeriksaan secara mikroskopis dengan pewarnaan Ziehl Neelsen

Prinsip Kerja : Dinding bakteri yang tahan asam mempunyai lapisan lilin dan lemak yang sukar ditembus cat, proses pemanasan mempermudah masuknya Carbol Fuchsin ke dalam dinding sel, dinding sel tetap mengikat zat warna Carbol Fuchsin walaupun didekolorisasi dengan asam alkohol, kemudian dilakukan pengamatan pada mikroskop dengan perbesaran 1000x dan lakukan pelaporan hasil.

Diagnosis dilakukan dengan mengumpulkan 2 contoh uji dahak yang dikumpulkan berupa dahak Sewaktu-Pagi (SP):

a) S (Sewaktu): dahak ditampung di fasyankes.

b) P (Pagi) : dahak ditampung pada pagi segera setelah bangun tidur.

Pelaporan hasil pemeriksaan mikroskopis dengan mengacu kepada skala *International Union Against Tuberculosis Lung Disease (IUATLD)*:

a) Negatif : tidak ditemukan BTA dalam 100 lapangan pandang

b) Scanty : ditemukan 1-9 BTA dalam 100 lapangan pandang

c) 1+ : ditemukan 10-99 BTA dalam 100 lapangan pandang

d) 2+ : ditemukan 1-10 BTA setiap 1 lapangan pandang
(periksa minimal 50 lapang pandang)

e) 3+ : ditemukan ≥ 10 BTA dalam 1 lapangan pandang (periksa minimal 20 lapang pandang) (Kemenkes RI, 2012).

2) Pemeriksaan Biakan

Pemeriksaan biakan merupakan cara yang paling sensitif dan merupakan baku emas (*gold standar*) untuk mendiagnosis tuberkulosis terutama untuk dahak yang sedikit kumannya dan sulit ditemukan dengan cara mikroskopis. Pemiakan juga penting untuk dapat melakukan tes kepekaan kuman terhadap obat-obatan. Pemeriksaan biakan dilakukan dengan media padat (*Lowenstein-Jensen*) atau media cair *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT) yang merupakan media selektif karena terdapat indikator *malachite green* sehingga hanya golongan genus *Mycobacterium* yang dapat tumbuh pada media tersebut. Pengamatan pertumbuhan dilakukan pada 2-8 minggu setelah ditanam.

Selanjutnya dilakukan uji biokimia untuk memastikan koloni yang tumbuh merupakan spesies *Mycobacterium tuberculosis*, dimana hasil positif pada uji niacin (berwarna kuning), uji nitrat (terbentuk warna kemerahan), dan uji katalase (terdapat gelembung gas) dapat memastikan bahwa koloni tersebut merupakan spesies *Mycobacterium tuberculosis*. (Lisdawati dkk, 2010).

3) Pemeriksaan Molekuler

Pemeriksaan ini dilakukan jika terduga TB adalah kelompok terduga TB resistan obat dan terduga TB dengan HIV positif, maka harus tetap diupayakan untuk dilakukan penegakan diagnosis TB dengan Tes Cepat Molekuler (TCM), dengan cara melakukan rujukan ke layanan TCM terdekat, baik dengan cara rujukan pasien atau rujukan spesimen.

Pemeriksaan TCM dengan Xpert MTB/RIF merupakan metode deteksi molekuler berbasis *nested real-time* PCR untuk diagnosis TB. Prinsip kerja Tes Cepat Molekuler (TCM) yaitu Primer PCR yang digunakan mampu mengamplifikasi sekitar 81 bp daerah inti gen *rpoB* MTB kompleks, sedangkan *probe* dirancang untuk membedakan *sekuen wild type* dan mutasi pada daerah inti yang berhubungan dengan resistansi terhadap rifampisin.

Pemeriksaan tersebut dilakukan dengan alat GeneXpert, yang menggunakan sistem otomatis yang mengintegrasikan proses purifikasi

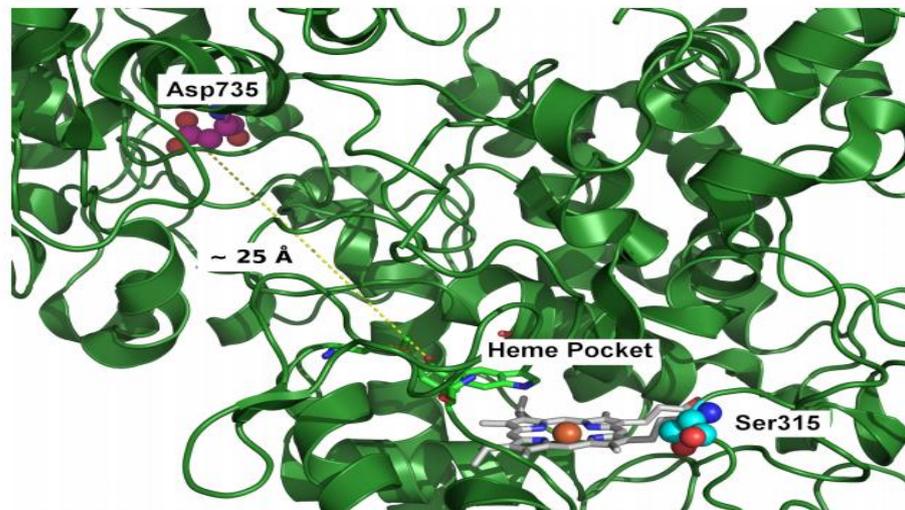
spesimen, amplifikasi asam nukleat, dan deteksi sekuen target (Kemenkes RI, 2017). Pemeriksaan tes cepat molekuler (TCM) merupakan sarana untuk penegakan diagnosis, namun tidak dapat dimanfaatkan untuk evaluasi hasil pengobatan (PMK RI No. 67/2016: VI: B(2), 2016).

3. Resistansi Isoniazid pada *Mycobacterium tuberculosis*

a. Isoniazid (INH/H)

Isoniazid (INH/H) adalah agen kimia andalan untuk pengobatan TB, sejak pertama kali diperkenalkan pada tahun 1951 hingga sekarang (Purkan *et al.*, 2015). INH adalah obat pro yang mengikat dan menghambat *InhA*, enzim yang terlibat dalam biosintesis asam mikolat, penyusun dinding sel mikobakteri penting, yang menyebabkan kematian sel mikobakteri. (Vilchère & Jr, 2019).

1) Mekanisme aksi



Sumber : Vila-Viçosa *et al.*, 2017

Gambar 2.5. Representasi grafis dari kantong heme *katG*

Isoniazid masuk ke dalam sel MTB dalam bentuk *prodrug*. Kemudian, INH akan diaktivasi oleh enzim katalase peroksidase (*katG*) yang dikode oleh gen *katG*. Spesies aktif INH kemungkinan adalah suatu radikal *isonicotinic acyl* yang selanjutnya membentuk *adduct*. *Adduct* ini bersifat toksik di dalam sel bakteri (Irianti dkk., 2016).

Radikal *isonicotinoyl acyl* yang terbentuk, kemudian bereaksi dengan NADH membentuk kompleks INH-NADH pada sisi aktif enzim *enoylACP reductase (InhA)* dan 2-ketoacyl ACP synthase (*KasA*), kemudian menghambat aktivitas dua enzim dalam biosintesis asam mikolat, komponen utama di dinding sel mikobakteri. Gangguan pada biosintesis asam mikolat dapat menyebabkan kematian sel-sel bakteri (Purkan *et al.*, 2015)

2) Efikasi pada manusia

Isoniazid memiliki aktifitas bakterisida cepat. Isoniazid mampu membunuh bakteri sedang tumbuh secara aktif dan menyebabkan penurunan kandungan *bacilli* secara cepat di dalam dahak setelah 2 minggu pertama terapi. Terapi masih dianjurkan untuk pasien dengan resistansi INH pertama yang rendah (<1% resistan *bacilli* untuk 1µg/mL INH). Obat dapat diberikan secara oral, intra vena atau intra muscural (Irianti dkk., 2016).

b. Jenis-Jenis Mutasi

Mutasi adalah peristiwa perubahan pada bahan genetik (DNA maupun RNA), baik pada taraf urutan gen (disebut mutasi titik) maupun pada taraf kromosom dari suatu individu yang bersifat menurun. Jenis-jenis mutasi sebagai berikut:

1) Berdasarkan kejadiannya

a) Spontan (*spontaneous mutation*)

Mutasi spontan adalah mutasi (perubahan materi genetik) yang terjadi akibat adanya sesuatu pengaruh yang tidak jelas, baik dari lingkungan luar maupun dari internal organisme itu sendiri. Mutasi ini terjadi di alam secara alami (spontan), dan secara kebetulan.

b) Induksi (*induced mutation*)

Mutasi terinduksi adalah mutasi yang terjadi akibat paparan dari sesuatu yang jelas, misalnya paparan sinar UV. Secara mendasar tidak terdapat perbedaan antara mutasi yang terjadi secara alami dan mutasi hasil induksi.

3) Berdasarkan perubahan kode genetik

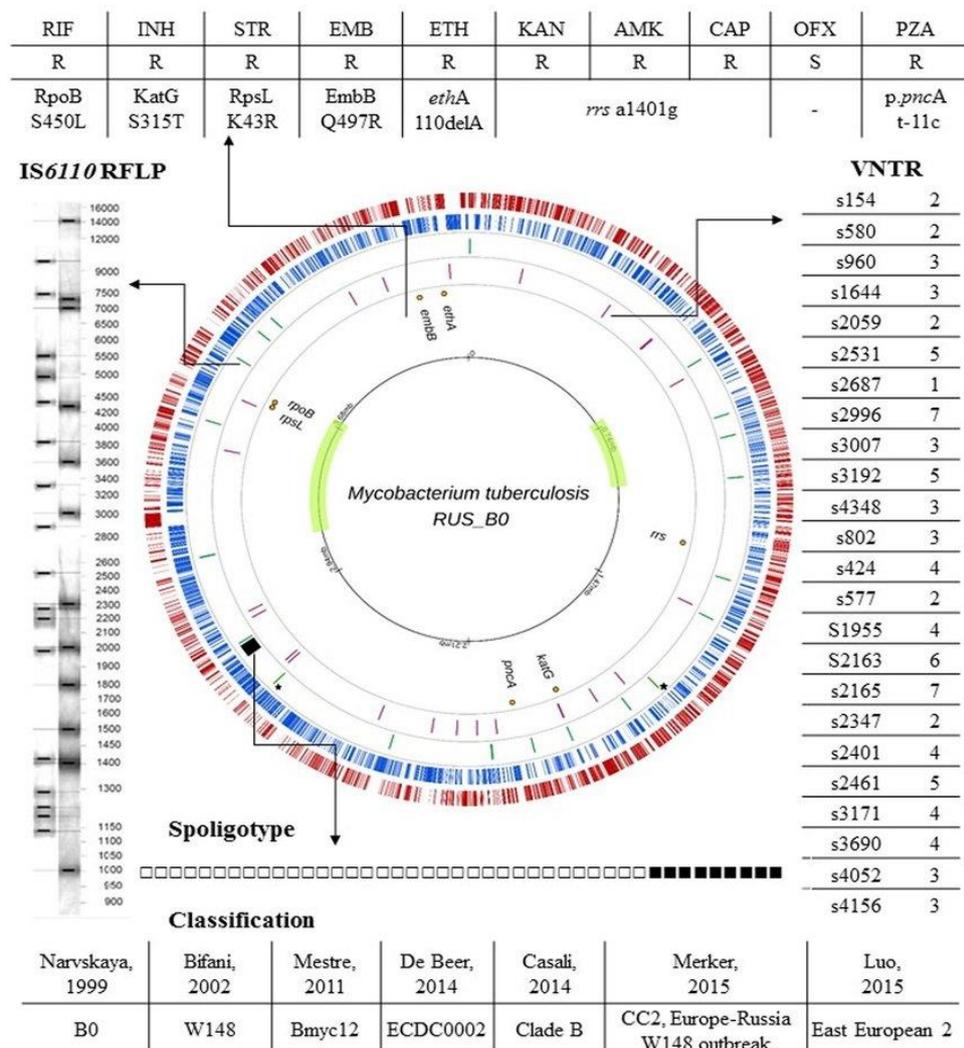
- a) Mutasi salah arti (*missense mutation*), yaitu perubahan suatu kode genetik (umumnya pada posisi 1 dan 2 pada kodon) sehingga menyebabkan asam amino yang terkait pada rantai polipeptida berubah. Perubahan ini menghasilkan fenotip mutan apabila asam amino yang berubah merupakan asam amino esensial bagi protein tersebut. Jenis mutasi ini disebabkan peristiwa transisi dan tranversi.
- b) Mutasi diam (*silent mutation*), yaitu perubahan suatu pasangan basa dalam gen (pada posisi 3 kodon) yang menimbulkan perubahan satu kode genetik tetapi tidak mengakibatkan perubahan atau pergantian asam amino yang dikode. Mutasi diam biasanya disebabkan karena terjadinya mutasi transisi dan tranversi.
- c) Mutasi tanpa arti (*nonsense mutation*), yaitu perubahan kodon asam amino tertentu menjadi kodon stop, yang mengakhiri rantai, dan berakhirnya pembentukan protein sebelum waktunya selama translasi.
- d) Mutasi Pergeseran Kerangka/perubahan rangka baca (*frameshift mutation*). Mutasi ini merupakan akibat penambahan atau kehilangan satu atau lebih nukleotida di dalam suatu gen.

Mutasi gen pada dasarnya merupakan mutasi titik (*point mutation*). Pada mutasi ini terjadi perubahan kimiawi pada satu atau beberapa pasangan basa dalam satu gen tunggal yang menyebabkan perubahan sifat individu tanpa perubahan jumlah dan susunan kromosomnya. Peristiwa tersebut berupa perubahan urutan-urutan DNA pada basa N dari DNA atau RNA. Penggantian/substitusi pasangan basa terjadi karena penggantian satu nukleotida dengan pasangannya di dalam untaian DNA komplementer dengan pasangan nukleotida lain.

Pasangan basa nitrogen (basa N) pada DNA antara timin dengan adenin atau antara guanin dengan sitosin dihubungkan oleh ikatan hydrogen yang lemah. Atom-atom hydrogen dapat berpindah dari satu posisi ke posisi lain pada purin atau pirimidin. Misalnya secara tidak normal, adenin berpasangan dengan sitosin dan timin dengan guanin. Peristiwa itu disebut dengan mutasi gen karena hanya terjadi di dalam gen (Warmadewi, 2017).

c. Mekanisme Resistansi terhadap Isoniazid

Kepatuhan pasien yang rendah dalam pengobatan tuberkulosis menyebabkan strain resistan obat pun muncul. Mekanisme penyebab munculnya strain resistan dapat dibagi menjadi 2, yaitu mekanisme *acquired resistance* dan mekanisme resistansi intrinsik. Mekanisme *acquired resistance* merupakan kemampuan bakteri yang sebelumnya sensitif menjadi resistan terhadap antibiotik akibat terjadi mutasi maupun transfer gen horizontal sedangkan mekanisme resistansi intrinsik merupakan mekanisme yang memungkinkan netralisasi aktifitas antibiotik, hal ini menghasilkan tingginya *background* resistansi yang membatasi penggunaan antibiotik pada pasien TB (Smith *et al.*, 2014).



Sumber: Bespyatykh *et al.*, 2019

Gambar 2.6. Peta dan fitur genetik *Mycobacterium tuberculosis*

Peta dan fitur genetik *Mycobacterium tuberculosis* pada gambar 2.6. menunjukkan bahwa terdapat banyak gen yang menjadi target obat anti tuberkulosis mengalami mutasi. Meskipun berbagai gen terlibat di dalam *Mycobacterium tuberculosis* sebagai penyebab resistansi terhadap INH, ada data yang mendukung bahwa mutasi yang sering difokuskan terutama pada *katG*, *inhA*, dan *ahpC-oxvR* daerah regulator (Seifert *et al.*, 2015). Berikut gen-gen yang bermutasi sehingga menjadi penyebab resistansi isoniazid:

1) Gen *katG*

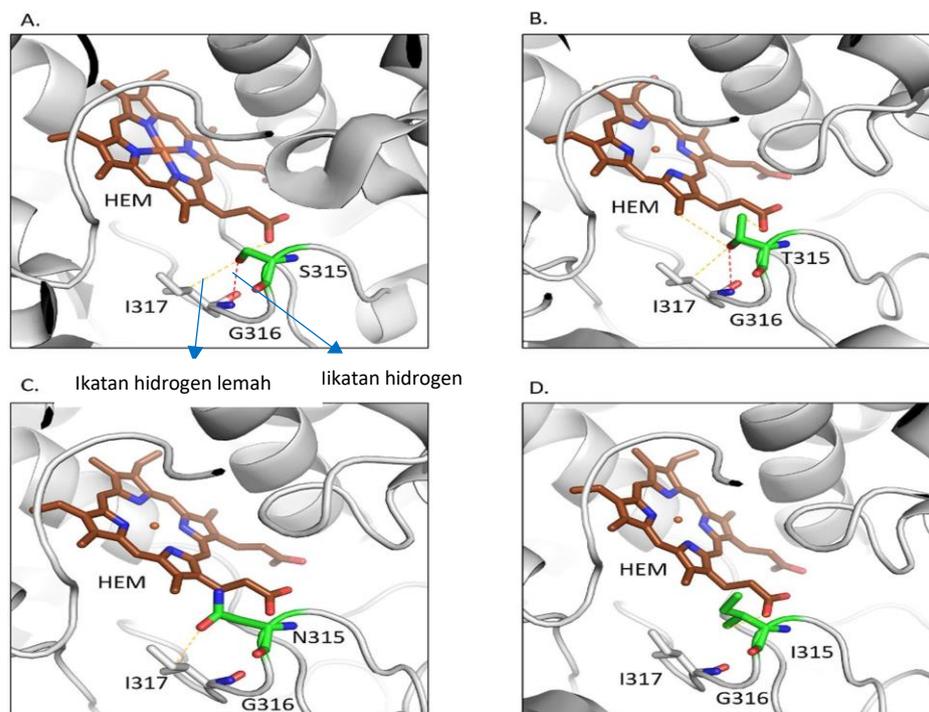
Data yang diterbitkan sebelumnya telah menunjukkan bahwa mutasi *katG* 315 terutama Ser315Thr adalah penyebab utama resistansi INH dengan frekuensi mulai dari 42% hingga lebih dari 90% di berbagai wilayah di seluruh dunia (Seifert *et al.*, 2015).

Berdasarkan Liu *et al* (2018) melaporkan bahwa dominasi pada mutasi *katG* yang terdeteksi pada 86,2% isolat resistan INH, jauh lebih tinggi daripada gen lain. Sebagai perbandingan, substitusi Ser315Thr hanya mengidentifikasi dalam 41,0% (69/168) dari isolat MDR-TB dan 65% (13/20) dari isolat resistan-tunggal INH.

Penemuan ini menunjukkan bahwa mutasi resistansi INH yang lebih kompleks terjadi pada isolat MDR-TB. Memang keragaman yang tinggi dari mutasi *katG* ditunjukkan oleh kedua jenis penghapusan dan substitusi 53 asam amino. Mutasi ini direpresentasikan sebagai 90 jenis mutasi, termasuk 21 mutasi gen tunggal yang berbeda dan 69 mutasi gen gabungan. Kecuali dua gen tersebut hampir semua gen yang berhubungan dengan resistansi INH terjadi dalam kombinasi dengan mutasi *katG* (Liu *et al.*, 2018).

Mutasi tersebut menyebabkan produk isoniazid kurang dalam pembentukan INH-NAD yang diperlukan untuk aktivitas antimikroba INH. Kemampuan *katG* lebih efisien dari enzim mutan dalam upaya perubahan INH (*prodrug*) ke bentuk asam isonikotinat (INH teraktivasi). Sehingga, mutan Ser315Thr merupakan katalase-peroksidase kompeten dengan kemampuan metabolisme INH yang berkurang. Oleh karena itu,

substitusi asam amino pada posisi 315 muncul untuk menghilangkan keseimbangan antara kebutuhan pengaturan aktivitas katalase-peroksidase aktif dalam upaya detoksifikasi radikal antibakteri dari hospes dan pengurangan perubahan produg ke bentuk INH aktif, suatu proses yang akan membunuh bakteri secara normal (Irianti dkk., 2016).

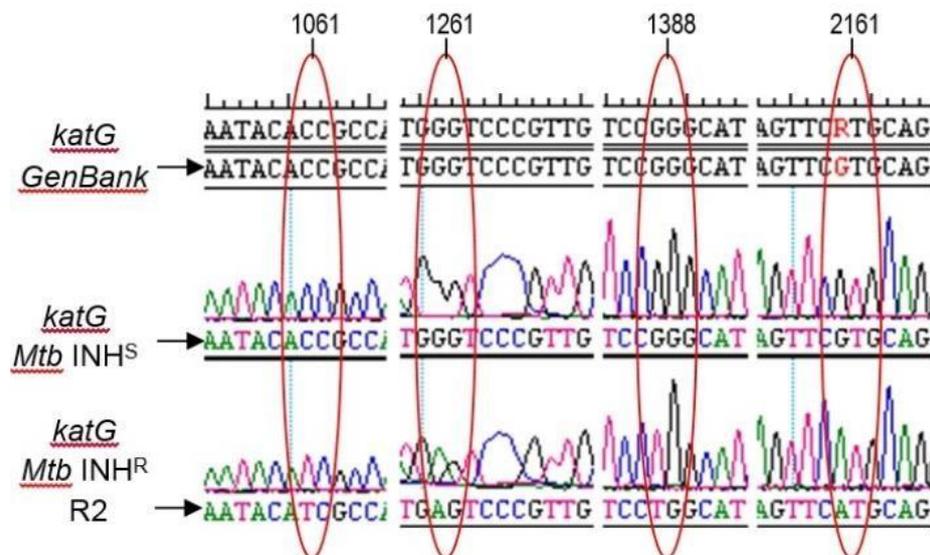


Sumber: Munir *et al.*, 2019

Gambar 2.7. Model Mutasi pada gen *katG*

Pada gambar 2.7. merupakan model mutasi pada gen *katG*. Residu S315 terletak di tepi tersempit saluran akses substrat yang menghubungkan heme ke permukaan molekul. Substitusi serin ke *sidechain* treonin yang lebih besar untuk membatasi saluran dan membatasi aksesibilitas ke *heme*. Substitusi lain dari serine menjadi isoleusin dan asparagine, yang dilaporkan sebelumnya, terdapat pada isolat klinis. Hal ini memprediksi efek mutasi menggunakan SDM dan mCSM dan menganalisis interaksi interatomik *wildtype* dan residu mutan menggunakan *intermezzo*. *Sidechain* dari residu *wildtype* S315 diamati membentuk ikatan hidrogen dengan rantai utama I317 dan ikatan hidrogen lemah dengan *heme* dan *sidechain* I317.

Ketika dimutasi menjadi treonin, *sidechain* memperoleh ikatan hidrogen yang lemah dan interaksi hidrofobik dengan *heme*. Substitusi S315 menjadi hasil asparagin pada hilangnya ikatan hidrogen dengan I317 dan ikatan hidrogen yang lemah dengan *heme*. Ketika dimutasi menjadi isoleusin, residu yang bermutasi kehilangan ikatan hidrogen dan ikatan hidrogen lemah dengan I317 dan memperoleh interaksi hidrofobik dengan *heme*. Sehingga substitusi S315 oleh residu lain menghasilkan afinitas yang lebih lemah *katG* menuju *heme* (Munir *et al.*, 2019).



Sumber: Purkan *et al.*, 2018

Gambar 2.8. Urutan Elektroforetogram *katG* resistan isoniazid (R2) terhadap *katG* H37RV dan *Genbank*

Gambar 2.8. di atas merupakan urutan elektroforetogram *katG* resistan isoniazid (R2) terhadap *katG* H37RV dan *Genbank*. Basis molekuler resistansi isoniazid dalam isolat klinis dari *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid (R2) menunjukkan gen *katG* dari isolat mengalami empat mutasi sesuai dengan penggantian asam amino T354I, G421S, R463L, dan V721M pada proteinnya. Mutasi tersebut disertai dengan penurunan aktivitas katalase-peroksidase *katG* R2. Dari perubahan asam amino, substitusi T₃₅₄I dan G₄₂₁S menciptakan ketidakstabilan yang signifikan di kompleks *adduct triad* (Trp107-Tyr229-Met255), bagian dari situs aktif enzim katalase-peroksidase dalam analisis struktur model. Kejadian tersebut dapat menyebabkan resistansi isoniazid pada isolat klinis R2 (Purkan *et al.*, 2018).

2) Gen *inhA*

Substitusi Ser94Ala menghasilkan penurunan afinitas ikatan *inhA* ke NADH sehingga terjadi penghambatan sintesis asam mikolat. Walaupun mutasi ini dihubungkan dengan resistansi INH, namun mutasi ini jarang dilaporkan pada isolat klinis. Mutasi promotor *inhA* lebih sering dilihat dan terjadi pada posisi -24(G-T), -16(A-G), atau -8(T-G/A) dan -15(CT). Mutasi promotor tersebut menghasilkan ekspresi berlebih *inhA* dan memicu resistansi INH tingkat rendah.

Mutasi spesifik *inhA* atau ekspresi berlebih *inhA* menghasilkan organisme dengan peningkatan KHM (Kadar Hambat Minimum) terhadap INH dan etionamid (ETA). Kadar hambat minimum menjadi 5 kali lebih tinggi dari KHM untuk *wild type*. Sekitar 70- 80% resistansi INH pada isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis* dapat dianggap sebagai akibat mutasi gen *katG* dan *inhA* (Irianti dkk., 2016). Studi akhir-akhir ini menemukan bahwa mutasi pada daerah regulator *inhA* bersama dengan mutasi daerah *coding* dari *inhA* menghasilkan resistansi isoniazid tingkat tinggi (KHM > 1µg/mL) dan juga resistansi silang terhadap etionamid (Machado *et al.*, 2013).

3) Gen *ahpC*

Sebuah penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa mutasi pada *ahpC* adalah perubahan kompensasi yang terjadi karena hilangnya aktivitas katalase-peroksidase. Mutasi dalam *ahpC* terjadi pada frekuensi rendah karena terbatasnya data yang diperoleh dari deteksi sebelumnya (Seifert *et al.*, 2015). Sebagian besar menunjukkan tingkat resistansi yang tinggi dengan hasil MIC di atas 6,4 mg / L. Kombinasi non-315 mutasi terletak di daerah situs pengikatan *heme*, yang merupakan struktur situs aktif untuk fungsi katalase-peroksidase.

Jika ada efek kompensasi yang dihasilkan oleh mutasi *ahpC* tingkat resistansi yang tinggi akan dikaitkan dengan substitusi asam amino non-315 ini. Asam amino tersebut kemungkinan besar menempati posisi kunci *katG* karena mutasi ini dikaitkan dengan hilangnya fungsi *katG* yang lebih besar dan memerlukan ekspresi berlebih *ahpC* untuk

mikobakteri untuk menahan tekanan konsentrasi INH yang tinggi. Selain itu, terjadinya mutasi *ahpC* dikaitkan dengan kekambuhan atau kegagalan pengobatan. Frekuensi yang lebih tinggi mutasi *ahpC* hadir dalam isolasi dari pasien MDR-TB yang kambuh dibandingkan dengan isolasi dari kasus baru (Liu *et al.*, 2018).

4. Pemeriksaan Berbasis Molekuler

Pemeriksaan molekuler digunakan dalam diagnosa serta analisis molekuler terhadap genotipe suatu organisme. Berikut hal-hal yang terkait pada pemeriksaan molekuler:

a. Sintesis protein

Sintesis merupakan proses pembentukan protein yang melibatkan peran DNA dan RNA. DNA sebagai media untuk proses transkripsi suatu gen berada di kromosom dan terikat oleh protein histon. Sintesis protein terdiri dari dua tahap yaitu:

1) Transkripsi

Proses penyalinan DNA oleh RNA polimerase. Di dalam nukleus, RNA polimerase akan memisahkan untaian DNA menjadi dua dengan cara bergerak dari terminator ke promotor. Ketika RNA polimerase sampai di promotor disebut inisiasi. Selanjutnya, terjadi proses elongasi yaitu RNA polimerase akan kembali berjalan menuju ke terminator dan akan membentuk *messenger* RNA (mRNA). Basa nitrogen yang ada pada mRNA merupakan pengan DNA disebut kodon. Setelah itu, terjadi proses terminasi yaitu RNA polimerase sampai pada terminator dari gen, maka transkripsi akan berhenti.

2) Translasi

Translasi adalah proses sintesis protein dengan mRNA sebagai cetaknya dan dicocokkan oleh antikodon. Antikodon adalah deret nukleotida pada RNAt (transfer RNA) yang melengkapi kodon dalam RNA messenger. Antikodon bertugas untuk mencocokkan triplet yang ada pada mRNA dengan protein yang sesuai. Antikodon terdapat di sitoplasma. Proses translasi ini memerlukan (1) mRNA, (2) ribosom, (3)

tRNA dan (4) asam amino. Proses translasi terjadi pada ribosom yang terletak pada permukaan retikulum endoplasma kasar (RE kasar).

Proses translasi dibantu oleh tRNA yang letaknya di dalam sitoplasma. tRNA berfungsi untuk mentransfer asam amino dari sitoplasma ke ribosom. Asam amino yang ada pada sitoplasma setiap sel berasal dari makanan atau minuman yang bentuknya protein. Dalam proses penguraian menjadi asam-asam amino yang dibawa oleh darah dan diedarkan pada setiap sel yang membutuhkan. Asam amino akhirnya sampailah pada sitoplasma yang merupakan bahan untuk sintesis protein.

Urutan nukleotida yang terdapat pada mRNA hanyalah kode, artinya bahwa setiap 3 basa pada mRNA mengkode satu asam amino yang disebut sebagai kodon. Jadi kodon adalah setiap tiga basa pada mRNA yang mengkode satu macam asam amino yang daftarnya dapat dilihat pada daftar treeplet kodon. Setiap asam amino bisa memiliki kodon lebih dari satu, contohnya asam amino serin memiliki kodon sejumlah 4: UCU, UCC, UCA, UCG. Asam amino Isoleucin memiliki 3 kodon yaitu: AUU, AUC, AUD. Asam amino Histidin memiliki 2 kodon (CAU dan CAC). Selain kodon dari asam amino dijumpai pula Star kodon AUG yang kebetulan mengkode asam amino metionin. Setiap sintesis protein diawali dengan asam amino metionin. Selain star kodon dijumpai pula 3 macam Stop kodon yaitu: UAA, UAG, UGA. Ketika enzim polimerase sudah sampai pada salah satu stop kodon tersebut, maka proses elongasi transkripsi akan berhenti (Nurahayati dkk, 2017).

b. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Reaksi polimerase berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction (PCR)* merupakan suatu teknik atau metode perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme. Dengan teknik ini, DNA dapat dihasilkan dalam jumlah besar dengan waktu relatif singkat sehingga memudahkan berbagai teknik lain yang menggunakan DNA.

Teknik amplifikasi DNA menggunakan PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA menjadi ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10^6 - 10^7 kali. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap siklus PCR akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target.

Prinsip dasar PCR adalah proses siklus yang berulang meliputi denaturasi yaitu tahap pertama pada sistem amplifikasi PCR adalah denaturasi DNA sampel dengan menaikkan suhu dalam tabung reaksi sampai 95°C . Selama proses denaturasi yang berlangsung dalam beberapa menit, untai ganda DNA (dsDNA) mencair dan ikatannya terbuka sehingga terjadi pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal DNA (ssDNA).

Tahap kedua yaitu pengenalan (annealing) suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi primer itu sendiri. Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi suhunya. Kisaran suhu penempelan yang digunakan adalah antara 37°C sampai dengan 60°C (Fatchiyah dkk., 2011).

Tahap ketiga pada sistem amplifikasi PCR adalah DNA Polymerase extension/elongasi. Pada tahap extension ini terjadi proses pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target yang akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Pada setiap satu kilobase (1000pb) yang akan diamplifikasi memerlukan waktu 1 menit (Nurhayati & Darmawati, 2017).

c. Jenis-Jenis Teknik PCR

Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi biologi sel dan molekuler yang cukup pesat, menimbulkan pengaruh terhadap pengembangan teknologi analisis biomolekuler termasuk pengembangan PCR. Berikut jenis-jenis teknik PCR, yaitu:

1) PCR Konvensional

PCR konvensional adalah PCR di mana tahap perbanyakkan materi genetik dan tahap deteksi produk PCR dilakukan secara berturut-turut, yaitu tahap deteksi dilakukan bila tahap perbanyakkan materi genetik telah selesai. Kemudian pengamatan dilakukan dengan elektroforesis.

2) *Real Time* PCR (Q-PCR)

Real-Time PCR adalah metode analisis yang dikembangkan dari reaksi PCR. Real time dikenal sebagai *quantitative real time polymerase chain reaction* atau Q-PCR. Teknik ini digunakan untuk mengamplifikasi sekaligus menghitung jumlah target molekul DNA hasil amplifikasi. Pada Q-PCR, data fluoresensi yang dihasilkan dari proses amplifikasi dapat diamati secara langsung saat proses amplifikasi masih berjalan tanpa harus menunggu seluruh siklus amplifikasi selesai.

3) *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

Metode ini digunakan untuk mengamplifikasi cDNA dari mRNA atau dapat langsung dari mikroorganisme yang memiliki materi genetik RNA (seperti virus polio, campak, rubella, influenza dll). RT-PCR mendapatkan kembali dan menyalin utas 5' dan 3' dari mRNA, menghasilkan kumpulan cDNA yang banyak dari mRNA yang sedikit.

4) Nested PCR

Nested PCR adalah suatu teknik perbanyakkan (replikasi) sampel DNA menggunakan bantuan enzim DNA polimerase yang menggunakan dua pasang primer untuk mengamplifikasi fragmen. Dengan menggunakan Nested PCR, jika ada fragmen yang salah diamplifikasi, maka kemungkinan bagian tersebut diamplifikasi untuk kedua kalinya oleh primer yang kedua sehingga sangat spesifik dalam melakukan amplifikasi.

5) Multiplex-PCR

Multiplex PCR merupakan beberapa set primer dalam campuran PCR tunggal untuk menghasilkan ampikon (hasil amplifikasi PCR) dari berbagai ukuran yang spesifik untuk sekuens DNA yang berbeda.

6) PCR-ELISA

PCR-ELISA merupakan metode yang digunakan untuk menangkap asam nukleat yang meniru prinsip dari *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) yang terkait. Dengan metode ini dapat dilakukan pengukuran sekuen internal pada produk PCR.

7) Touchdown PCR

Sebuah modifikasi dari PCR yang mencegah amplifikasi sekuen nonspesifik dengan memvariasikan suhu annealing. Sebuah varian dari PCR yang bertujuan untuk mengurangi latar belakang spesifik secara bertahap menurunkan suhu annealing selama PCR berlangsung (Nurhayati & Darmawati, 2017).

d. Pemeriksaan Tes Cepat Molekuler (TCM) Tuberkulosis

Pemeriksaan ini dilakukan jika terduga TB adalah kelompok terduga TB resistan obat dan terduga TB dengan HIV positif, maka harus tetap diupayakan untuk dilakukan penegakan diagnosis TB dengan TCM TB, dengan cara melakukan rujukan ke layanan TCM terdekat, baik dengan cara rujukan pasien atau rujukan spesimen.

Pemeriksaan TCM dengan Xpert MTB/RIF merupakan metode deteksi molekuler berbasis *nested real-time* PCR untuk diagnosis TB. Prinsip kerja Tes Cepat Molekuler (TCM) yaitu Primer PCR yang digunakan mampu mengamplifikasi sekitar 81 bp daerah inti gen *rpoB* MTB kompleks, sedangkan *probe* dirancang untuk membedakan *sekuen wild type* dan mutasi pada daerah inti yang berhubungan dengan resistansi terhadap rifampisin.

Pemeriksaan tersebut dilakukan dengan alat GeneXpert, yang menggunakan sistem otomatis yang mengintegrasikan proses purifikasi spesimen, amplifikasi asam nukleat, dan deteksi sekuen target. Setiap pemeriksaan menggunakan katrid sekali pakai dan dirancang untuk meminimalkan kontaminasi silang. Katrid Xpert MTB/RIF juga memiliki *Sample Processing Control* (SPC) dan *Probe Check Control* (PCC).

Sample processing control berfungsi sebagai kontrol proses yang adekuat terhadap bakteri target serta untuk memonitor keberadaan penghambat reaksi PCR, sedangkan PCC berfungsi untuk memastikan proses

rehidrasi reagen, pengisian tabung PCR pada katrid, integritas *probe*, dan stabilitas *dye*. Pemeriksaan Xpert MTB/RIF dapat mendeteksi MTB kompleks dan resistansi terhadap rifampisin secara simultan dengan mengamplifikasi sekuen spesifik gen *rpoB* dari MTB kompleks menggunakan lima *probe molecular beacons* (probe A-E) untuk mendeteksi mutasi pada daerah gen *rpoB* (Kemenkes RI, 2017).

Pemeriksaan tes cepat molekuler (TCM) merupakan sarana untuk penegakan diagnosis, namun tidak dapat dimanfaatkan untuk evaluasi hasil pengobatan (PMK RI No. 67/2016: VI: B(2), 2016).

e. *Sequencing DNA*

Keberadaan *strain resistant* tuberkulosis sangat menarik untuk ditelusuri, hal ini dikarenakan varian-varian spesies baru banyak muncul di berbagai wilayah di dunia. Konfirmasi resistansi obat tuberkulosis sangat perlu dilakukan pada setiap daerah mengingat adanya variasi fenotip dan genotip dari *Mycobacterium tuberculosis* di setiap wilayah melalui uji laboratorium seperti uji biologi molekuler. Perkembangan teknik biologi molekuler khususnya metode PCR dan *sequencing* memungkinkan cara baru menemukan susunan DNA dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang resistan obat khususnya isoniazid dari sampel dahak suspek (Kurniawan dkk., 2015).

Sekuensing DNA adalah penemuan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin, dan timin) pada sampel DNA. Sekuensing berguna untuk bioteknologi, biologi molekuler, dan genomika. Metode sekuensing DNA pertama kali digunakan adalah metode sekuensing Maxam-Gilbert yang memanfaatkan bahan kimia untuk separasi dan penandaan urutan basa.

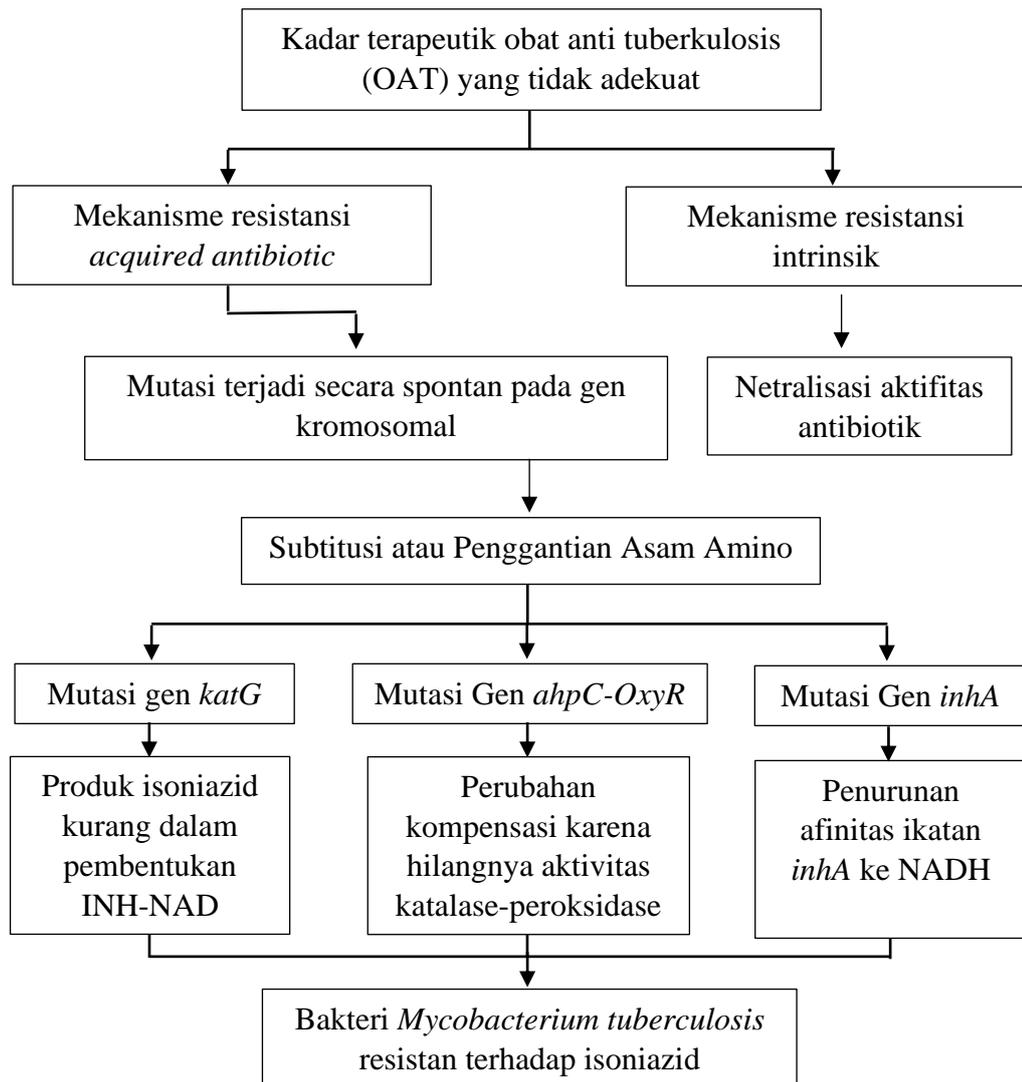
Metode ini memanfaatkan fosfat radioaktif untuk melabeli ujung 3' DNA yang akan disekuensing. Fragmen DNA berlabel di ujung 3' dikenai pembelahan acak pada posisi adenin, timin, guanin, dan sitosin dengan memanfaatkan agen kimia tertentu. Reaksi kimia terhadap komponen basa didasari oleh tiga komponen kunci, yakni modifikasi basa, penghilangan basa yang telah dimodifikasi dari gula, dan pemutusan strand DNA pada posisi gulanya. Empat reaksi produk lalu diseparsi dengan elektroporesis gel poliakrilamit. Sekuen akan mudah untuk dibaca ada empat lajur gel.

Setelah metode sekuensing Maxam-Gilbert, ditemukan metode Sanger (*Sanger dideoxy sequencing*). Sekuensing Sanger terkenal karena akurasi dan panjang pembacaannya (800–1.000 bp) telah mendominasi selama hampir 30 tahun sebagai metode baku untuk analisis genotipe. Metode ini menggunakan DNA templat dan memerlukan primer spesifik untuk reaksi sekuensing. Keterbatasan dalam sekuensing Sanger dapat diatasi dengan metode NGS, antara lain NGS dapat menganalisis urutan dari satu kromosom, *cost effective* untuk sampel dalam jumlah besar, dan juga *high-throughput*.

Generasi kedua teknologi sekuensing setelah generasi pertama Sanger dikenal dengan *next generation sequencing* (NGS). Istilah NGS secara kolektif digunakan untuk mendeskripsikan semua teknologi sekuensing selain teknologi sekuensing Sanger. Teknologi NGS membaca templat DNA secara acak (random) sepanjang seluruh genom dengan membuat potongan-potongan pendek DNA genom, kemudian menyambungkannya dengan adapter (potongan DNA pendek yang didesain khusus untuk tujuan ini) agar dapat dibaca oleh mesin NGS secara random selama proses sintesis DNA. Dengan demikian, teknologi NGS sering disebut dengan sekuensing paralel secara masif. Panjang bacaan sekuen DNA yang dihasilkan mesin NGS jauh lebih pendek dibandingkan bila menggunakan mesin sekuensing dengan metode Sanger.

NGS menghasilkan panjang sekuen DNA antara 50-500 bp. Karena sekuen yang dihasilkan NGS pendek, sekuensing setiap fragmen DNA mesti dilakukan lebih dari sekali ukuran genom (*genome sequence coverage*). Sebagai contoh, bila *sequence coverage* suatu genom 30 kali berarti fragmen-fragmen DNA pada genom tersebut disekuen 30 kali sehingga setiap fragmen DNA dalam genom dibaca mesin 30 kali. Hal ini dilakukan untuk menjaga akurasi data hasil sekuensing (Ravi *et al.*, 2014).

B. Kerangka Teori



C. Kerangka Konsep

