

Mekanisme Resistensi Isoniazid & Mutasi Gen KatG Ser315Thr (G944C) *Mycobacterium tuberculosis* Sebagai Penyebab Tersering Resistensi Isoniazid

Mara Imam Taufiq Siregar

Bagian Farmakologi & Terapi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi

email: imam.siregar@yahoo.co.id

ABSTRACT

Resistance to anti-tuberculosis drugs mainly occurs due to a mutation in the genes of *Mycobacterium tuberculosis*. Mutations can be induced by inadequate therapeutic levels of drug, mainly due to non-compliance for taking the drug. Therefore, the use of anti-tuberculosis drugs inappropriately and irregularly can lead to mutation in the gene encoding the target of anti-tuberculosis drugs. Inadequate therapeutic levels of drug due to non-compliance of patients taking isoniazid was the most frequent causing mutations in KatG (Ser315Thr) gene. Therefore, concluded that this mutation was the commonest cause of INH resistance and could be a potential genetic marker for predicting MDR-TB.

ABSTRAK

Resistensi terhadap obat anti tuberkulosis (OAT) terutama terjadi karena mutasi pada gen *Mycobacterium tuberculosis*. Mutasi dapat diinduksi oleh inadekuatnya kadar terapeutik obat, terutama akibat ketidakpatuhan selama mengkonsumsi obat. Karenanya, penggunaan OAT yang tidak tepat dan teratur dapat menimbulkan mutasi pada gen yang mengkode target OAT. Inadekuatnya kadar terapeutik obat akibat ketidakpatuhan pasien tuberkulosis (TB) paru mengkonsumsi isoniazid (INH) paling sering menyebabkan mutasi pada gen KatG Ser315Thr (G944C). oleh sebab itu, disimpulkan bahwa mutasi pada kodon ini merupakan penyebab tersering terjadinya resistensi INH dan sangat potensial menjadi marker genetik untuk memprediksi MDR-TB.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh basil *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulosis biasanya menyerang paru (TB paru) tetapi dapat juga organ selain paru (TB ekstraparu).¹ Perkiraan jumlah kasus TB dunia pada 2014 terjadi di Asia 56% dan Afrika 29%, proporsi yang lebih kecil terjadi di wilayah timur Mediterania 8%, Eropa 4% dan Amerika 3%.² Pengendalian TB di

dunia saat ini menghadapi tantangan yang ditimbulkan oleh penyebaran secara global strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap obat anti tuberkulosis (OAT) standar. Hal ini menyebabkan terjadinya penyebaran *multi-drugs resistance tuberculosis* (MDR-TB) di dunia.³ MDR-TB merupakan resistensi terhadap setidaknya isoniazid dan rifampisin yang merupakan dua obat anti tuberkulosis paling efektif.^{3,4,5}

Berdasarkan pada *Global Tuberculosis Report: Drug Resistant TB Surveillance and Response* yang dikeluarkan *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2014, diperkirakan ± 300.000 penderita MDR-TB terdiagnosa dan terjadi di seluruh dunia, Indonesia menyumbang ± 6.800 penderita. Yang terbanyak adalah India ± 62.000, China ± 54.000 dan Rusia ± 41.000 penderita.⁶Data di Departemen Ilmu Penyakit Paru FK USU / RSUP. H. Adam Malik Medan yang merupakan pusat rujukan untuk diagnostik dan pengobatan MDR-TB di Sumatera Utara, pada bulan Januari – Maret tahun 2015 sebanyak 178 pasien menjadi suspek MDR-TB dan 53 diantaranya positif menderita MDR-TB menggunakan metode *Gene Expert*.⁷

Resistensi terhadap obat anti tuberkulosis (OAT) terutama terjadi karena mutasi pada gen *M. tuberculosis*.^{4,8,9,10,11} Mutasi sering disebabkan oleh inadekuatnya kadar terapeutik obat, terutama akibat ketidakpatuhan dalam proses mengkonsumsi obat.^{12,13,14} Lina et al pada tahun 2009 dalam penelitiannya menyatakan bahwa resistensi dapat terjadi karena penggunaan obat yang tidak tepat dan tidak teratur, sehingga menimbulkan mutasi pada gen yang mengkode/menyandi target OAT seperti gen *KatG* untuk isoniazid.¹⁵

Akibat dampak dari peningkatan MDR-TB dan relatif terbatasnya jumlah agen terapeutik yang ada, maka dilakukan upaya untuk menentukan dasar molekuler resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT. Agar resistensi tertentu terhadap obat anti tuberkulosis dapat segera diketahui dan

penderita dapat diterapi dengan pengobatan yang sesuai secara cepat dan tepat.

Didapati bahwa resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT adalah karena mutasi genomik tertentu pada beberapa gen spesifik *M. tuberculosis*. Sampai saat ini didapat sembilan mutasi gen yang diketahui terkait dengan resistensi terhadap OAT lini pertama. *KatG*, *InhA*, *AphC*, dan *KasA* untuk resistensi isoniazid; *RpoB* untuk resistensi rifampisin; *RpsL* dan *Rss* untuk resistensi streptomisin; *EmmB* untuk resistensi etambutol; dan *PncA* untuk resistensi pirazinamid. MDR-TB adalah akibat akumulasi dari mutasi-mutasi tersebut.^{4,9}

Isoniazid (INH) merupakan salah satu anti tuberkulosis lini pertama yang penting. *Mycobacterium tuberculosis* sangat peka terhadap INH.⁸ Isoniazid masuk kedalam sel *M. tuberculosis* sebagai prodrug 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*.¹⁶

Mutasi gen *KatG* menyebabkan hilangnya aktivitas enzim katalase-peroksidase.¹⁷ Terdapat mutasi 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 lain.^{4,5,11,18} Dan pada kodon 315 ini mutasi yang paling sering muncul adalah AGC

(Serin) menjadi ACC (Treonin). Di tingkat basa, mutasi ini merupakan mutasi poin (*point mutation*) pada urutan ke 944 yaitu G menjadi C (G944C).^{10,11,19,20,21,22}Oleh sebab itu, disimpulkan bahwa mutasi ini merupakan penyebab tersering resistensi *M. tuberculosis* terhadap INH. Bostanabad et al (2008) dan Marahatta et al (2011) pada penelitiannya juga menyimpulkan bahwa mutasi pada kodon 315 Ser (AGC)→Thr (ACC) / basa 944 G→C gen katG *M. tuberculosis* ini dapat menjadi marker genetik yang sangat potensial untuk menentukan strain *M. tuberculosis* resisten INH.^{10,11}

PEMBAHASAN

A. MIKOBACTERIUM

Mycobacterium tuberculosis complex

Tuberkulosis adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis complex*, termasuk *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canettii*.²³

Patogenesis mikobakterium

Terdapat perbedaan yang bermakna dalam kemampuan berbagai mikobakterium untuk menyebabkan lesi pada berbagai macam spesies penjamu. Manusia dan marmut sangat sensitif terhadap infeksi *M. tuberculosis*, sementara unggas dan sapi resisten terhadap *M. tuberculosis* dan *M. bovis*. Pada negara maju, *M. bovis* saat ini sangat jarang muncul. Beberapa mikobakterium "atipikal" (misalnya, *Mycobacterium kansasii*) menyebabkan penyakit pada manusia yang

tidak dapat dibedakan dari tuberkulosis. Mikobakterium yang lain (misalnya, *M. fortuitum*) hanya menyebabkan lesi pada permukaan atau berfungsi sebagai oportunist.²⁴

Morfologi dan struktur *Mycobacterium tuberculosis*

Mikobakteria berbentuk batang ramping yang sering menunjukkan bentuk koloni filamen bercabang menyerupai miselium jamur. Maka nama "mikobakteria" artinya adalah bakteri yang seperti jamur. Dalam kultur cair mereka membentuk cetakan seperti kulit tipis (pelikel).²⁵

Mikobakteria adalah genus basil gram-positif yang menunjukkan karakteristik pewarnaan tahan asam. *Mycobacterium tuberculosis* adalah agen etiologi tuberkulosis yang paling penting. Tuberkulosis merupakan salah satu penyakit tertua dan penyebab utama kematian akibat penyakit infeksi di seluruh dunia saat ini.²⁶

Mycobacterium tuberculosis termasuk genus *Mycobacterium* dari familia *Mycobacteriaceae*, ordo *Actinomycetales*. Bersifat non-motil, aerob obligat yang tidak membentuk spora. Dinding sel terdiri dari peptidoglikan dan mirip dengan organisme gram-positif lainnya yang banyak mengandung polisakarida rantai cabang, protein dan lipid.²⁶

Genetika biosintesis dinding sel mikobakterium

Patogenitas *M. tuberculosis* terhadap manusia sebagian disebabkan karena dinding selnya yang atipikal, merupakan struktur berlapis yang

mengandung peptidoglikan, arabinogalaktan (AG), asam mikolat, glikolipid dan kapsul polisakarida yang berada dibagian luar membran plasma. Struktur ini bersifat impermiabel sehingga berperan sebagai pelindung alami terhadap serangan, baik dari sistem imunitas tubuh host maupun dari banyak antibiotik. Dengan demikian, dinding sel memainkan peran penting dalam kelangsungan hidup *M. tuberculosis*.²⁷

Dinding sel mikobakteria sangat kaya lipid (sampai dengan 60% dari total massa dinding sel), dan dari urutan genom *M. tuberculosis* terungkap bahwa sebagian besar gen dikhususkan untuk produksi dan metabolisme lipid. Beberapa komponen dinding sel *M. tuberculosis* seperti *cord factor* lipoarabinomannan (LAM) dan asam mikolat menjadi salah satu faktor pendukung proses virulensi dan gangguan respon imun dari host, sedangkan komponen lain, misalnya Arabinogalaktan dan peptidoglikan memiliki peran lebih pada struktur *M. tuberculosis*. Hal ini menunjukkan pentingnya regulasi dinding sel baik untuk pertumbuhan, virulensi dan bahkan basil ini mampu mengubah komposisi dinding sel mereka sebagai respon terhadap perubahan lingkungan.²⁸

Komponen utama dari dinding sel mikobakteria adalah lapisan *mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan*. Struktur dinding sel ini terdiri dari beberapa komponen yang saling berhubungan, peptidoglikan terletak di luar membran plasma yang secara kovalen terkait dengan arabinogalaktan (AG), pada akhirnya akan

teresterifikasi dengan asam mikolat. Polimer ini (*mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan*) membentuk kerangka struktural dari dinding sel serta membentuk barier hidrofobik yang bertanggung jawab atas resistensi intrinsik mikobakteria ke sejumlah antibiotik. Lapisan ini merupakan bagian penting dari struktur sel, dan telah terbukti terdapat sejumlah enzim penting dalam proses sintesisnya.^{29,30} Sejumlah studi terbaru mengidentifikasi enzim yang terlibat dalam biosintesis struktur arabinogalaktan. Biosintesis arabinogalaktan sebagian besar dikatalisis oleh enzim yang dikode dalam fragmen 50kb dari Rv3779 ke Rv3809c, fragmen ini disebut “AG biosintesis gen cluster”.³¹

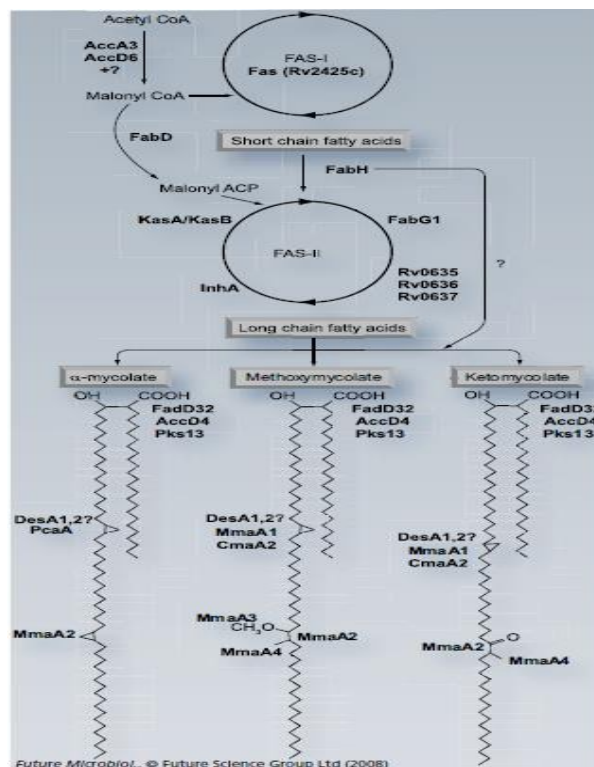
Asam mikolat dinding sel *M. tuberculosis*

Asam mikolat merupakan asam lemak α -alkil- β -hidroksi kompleks yang sangat panjang (C₆₀-C₉₀). Ditemukan baik terikat secara kovalen pada dinding sel atau dalam bentuk trehalosa monomikolat (TMM) atau trehalosa dimikolat (TDM). Lapisan ini menyebabkan permeabilitas yang sangat rendah dari dinding sel mikobakteria dan menjelaskan ketahanan alami mikobakteria terhadap antibiotik. Asam mikolat juga terlibat dalam virulensi *M. tuberculosis*. Biosintesis asam mikolat melibatkan produksi asam lemak rantai panjang (meromikolat) dan derivat asam lemak karboksilat yang lebih pendek, kemudian diikuti oleh kondensasi untuk membentuk molekul akhir. Dinding sel *M. tuberculosis* terdiri dari tiga jenis asam mikolat (α , metoksi dan keto), perbedaan

ketiganya hanya dalam kelompok-kelompok fungsional yang ditemukan dalam rantai meromikolat.²⁸

Sintesis rantai asam lemak dimulai oleh asetil-KoA karboksilase, terdiri dari subunit α (AccA3) dan β (AccD6) yang mengatur aktivasi malonil-KoA untuk berperan sebagai perantara bagi *Fatty Acid Synthase* (FAS). Mikobakteria memiliki dua sistem FAS, yaitu sistem FAS tipe I (FAS-I) dan tipe 2 (FAS-II) (Gambar 1). FAS-I dikode oleh *fas* (Rv2524c). FAS-I adalah enzim multidomain berukuran besar (326kDa), yang melakukan beberapa aktivitas katalitik. Enzim ini bertanggung jawab untuk sintesis *de novo* asam lemak rantai pendek, studi terbaru menunjukkan

bahwa ia juga bertanggung jawab dalam produksi heksakosanoil-S-KoA pendek yang berperan dalam tahap kondensasi akhir dengan rantai meromikolat. Kemudian asam lemak yang disintesis oleh FAS-I diperpanjang oleh sistem FAS-II untuk menghasilkan asam meromikolat. FAS-II adalah sistem yang multiprotein, terdiri dari empat aktivitas enzimatik untuk memperpanjang asam lemak dengan dua unit karbon pada setiap siklusnya. Pada setiap siklus terjadi aktivitas yang berurutan, yaitu dari β -ketoacyl-ACP reductase (FabG1), *trans*-2-enoil-ACP reductase (*inhA*), (3*R*)-hydroxyacyl-ACP dehydratase dan β -ketoacyl-ACP synthetase.²⁸



Gambar 1. Biosintesis asam mikolat *M. tuberculosis* dan skema 3 tipe asam mikolat yang ditemukan pada *M. tuberculosis*. FAS-I memproduksi asam lemak rantai pendek, yang selanjutnya diperpanjang oleh FAS-II untuk sintesis meromikolat atau digunakan sebagai cabang α asam mikolat. Berbagai enzim yang terlibat pada masing – masing reaksi ditunjukkan dengan cetak tebal.²⁸

Genom *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis memiliki sebuah kromosom sirkular dengan jumlah DNA 4.411.532 bp dengan 4.031 gen pengkode dan 4109 transkrip gen. Keseluruhan genom ini mengandung 65.5 % G (guanin) dan C (sitosin). Menurut data terakhir dari *The Sanger Centre* pemetaan sekuens genomnya telah lengkap dianalisa.^{32,33}

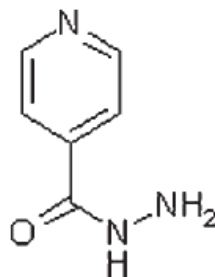
Enzim katalase – peroksidase *Mycobacterium tuberculosis*

Katalase – peroksidase adalah enzim hasil ekspresi gen *KatG* *M. tuberculosis* yang terdiri dari 740 asam amino. Merupakan enzim yang memiliki dua fungsi (*bifunctional enzyme*) dengan

aktivitas katalase dan peroksidase yang luas (*broad-spectrum*). Berperan dalam aktivitas oksidasi NADH sebagai ekuivalen pereduksi dan pemasangan isoniazid aktif dengan NADH membentuk *isonicotinic acyl-NAD complex*. Terbentuknya kompleks ini akan menghambat terbentuknya asam mikolat pada dinding sel *M. tuberculosis* dan menyebabkan dinding sel dapat dengan mudah mengalami lisis. Enzim katalase-peroksidase kemungkinan juga berperan dalam survival intraseluler *M. tuberculosis* dan mungkin terlibat dalam repair DNA. Persamaan aktivitas katalitiknya adalah, donor + H₂O₂ = donor teroksidasi + 2 H₂O, juga 2H₂O₂ = O₂ + 2H₂O. Mengikat 1 heme B (iron-protoporphyrin IX) sebagai ko-faktornya.³⁴

B. ISONIAZID (INH)

Penemuan dan struktur



Gambar 2. Struktur Isoniazid.³⁵

Isoniazid disintesis oleh Meyer dan Mally di *University of Prague* Jerman pada tahun 1912. Pada tahun 1952 secara independen dilakukan *rediscovery* oleh *Bayer Laboratories* di Jerman, *Hoffman-La Roche Laboratories* di Switzerland / USA, dan *Squibb Laboratories* di USA, masing-masing bekerja tanpa sepengetahuan satu sama lain.³⁶ Nama generiknya adalah Isoniazid / *Isonicotinic acid hydrazide* (INH)

/ *4-Pyridinecarboxylic acid hydrazide* dengan struktur seperti terlihat pada gambar 2.³⁵

Mekanisme Kerja

Isoniazid hanya aktif terhadap mikobakteria. Efeknya terutama terhadap *M. tuberculosis complex*, dan pada tingkat lebih rendah terhadap beberapa spesies mikobakteria lain misalnya, *M. kansasii*.

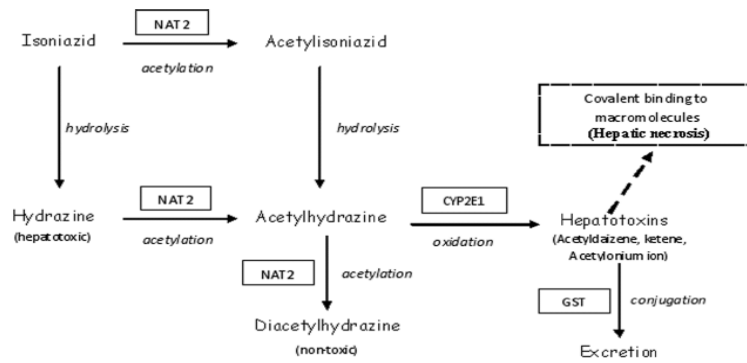
Minimum Inhibition Concentration (MIC) *M. tuberculosis* adalah 0.025-0.05 mg/L dalam kaldu dan 0.1-0.2 mg/L dalam piring agar, hal ini menunjukkan ketidakpastian seputar penentuan MIC. Isoniazid memiliki awal aktivitas bakterisidal yang paling ampuh dibandingkan semua OAT lain. Menambahkan obat lain tidak akan meningkatkan aktivitas INH tersebut. Dengan demikian, segera dapat diamati penurunan kemampuan mikobakteria dalam penularan selama pengobatan tahap intensif, kemungkinan besar ini disebabkan aktivitas bakterisidal dari isoniazid yang baik tersebut.³⁶

WHO merekomendasikan rentang dosis 4-6 mg/kg, dengan dosis harian maksimum tidak melebihi 300 mg. Dosis maksimum 300 mg juga digunakan untuk terapi pencegahan pada populasi dengan resiko tinggi. Pada dosis ini umumnya INH ditoleransi dengan baik.³⁵

Pada proses kinetiknya, INH cepat diserap melalui saluran cerna pada pemberian per-oral dan mencapai hati melalui sistem vena porta.^{35,37,38} Sebelum mencapai sirkulasi sistemik INH akan mengalami metabolisme lintas awal (*first pass metabolism*) dihati dan terjadi pengurangan bioavailabilitasnya. Sekitar 75% - 95% dari INH diekskresikan oleh ginjal dalam 24 jam pertama, terutama sebagai metabolit berbentuk asam asetilisoniazid dan asam isonikotinat.³⁷ Dalam jumlah yang kecil INH diekskresikan melalui feses, dan terbuang pada proses hemodialisa.³⁸

Rute metabolik utama asetilasi isoniazid menjadi asetilisoniazid oleh enzim

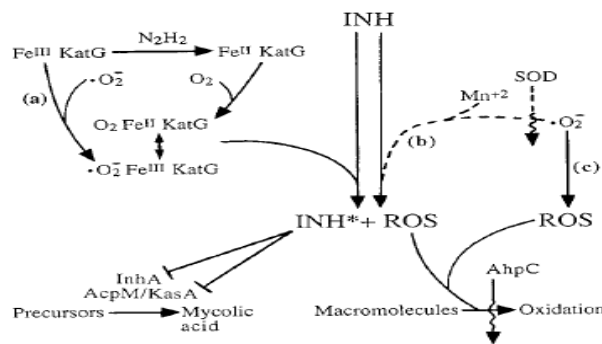
N-asetiltransferase 2 (NAT2) ditemukan di hati dan usus halus. Dalam hati, INH dimetabolisme menjadi asetilisoniazid oleh N-asetiltransferase 2 (NAT2), diikuti oleh proses hidrolisis untuk menjadi asetilhidrazin dan kemudian dioksidasi oleh sitokrom P4502E1 (CYP2E1) menjadi senyawa intermediet yang bersifat hepatotoksik. Metabolit ini dapat merusak sel hepatosit, baik dengan cara mengganggu homeostasis sel atau dengan memicu reaksi imunologis dimana metabolit yang bersifat reaktif ini terikat pada protein plasma sel hepatosit dan bertindak sebagai hapten. Jalur metabolisme lain yang berperan untuk menghasilkan metabolit toksik adalah hidrolisis langsung INH menjadi hidrazin (hepatotoksin yang poten). N-asetiltransferase 2 (NAT2) juga bertanggung jawab untuk mengkonversi asetilhidrazin menjadi diasetilhidrazin (komponen nontoksik). Glutation S-transferase (GST) merupakan enzim detoksifikasi penting pada fase II, berperan protektif sebagai pemungut/pengikat radikal bebas intraseluler, melalui reaksi konjugasi glutation dengan metabolit toksik yang dihasilkan dari CYP2E1. Konjugasi sulfhidril memfasilitasi pengeluaran metabolit dari tubuh dan mengurangi efek toksik. Dalam beberapa tahun terakhir, semakin banyak penelitian yang menunjukkan bahwa polimorfisme genetik pada gen NAT2, CYP2E1 dan GST berkaitan dengan kerentanan terhadap kejadian hepatotoksisitas yang diinduksi obat (*drug-induced hepatotoxicity*) selama pengobatan TB (Gambar 3).³⁷



Gambar 3. Alur metabolisme INH dan enzim – enzim utama yang terlibat (terdapat didalam tanda kotak).³⁷

Isoniazid masuk ke dalam sel *M. tuberculosis* dengan berdifusi pasif. Isoniazid merupakan prodrug yang diaktivasi oleh enzim katalase-peroksidase (KatG) yang berada didalam sel *M. tuberculosis*. Enzim KatG memasangkan *isonicotinic acyl* (bentuk aktif INH) dengan NADH untuk membentuk *isonicotinic acyl-NAD complex*. Kompleks ini berikatan erat pada *enoylacyl-acyl carrier protein (ACP) reductase* yang dikenal sebagai *InhA* sehingga memblokade substrat alaminya

(*enoyl-AcpM*) untuk dapat berikatan dan memblokade aktivitas sintesis asam lemak. Proses ini menghambat sintesis asam mikolat yang diperlukan untuk dinding sel mikobakteria.³⁹ Kompleks *AcpM-KasA* yang terlibat dalam sintesis asam mikolat berikatan dengan INH aktif.⁴⁰ Mekanisme kerja isoniazid secara detail masih tetap sulit untuk dipahami, hanya mekanisme kerjanya secara umum yang telah dipahami dengan baik (gambar 4).³⁶



Gambar 4. Potensi keterlibatan superoksida dalam aktivitas INH . INH sebagai *prodrug* yang diaktifkan oleh protein KatG (katalase - peroksidase) atau oleh Mn^{2+} . Di sebelah kiri gambar adalah skema yang menunjukkan bentuk KatG non-aktif (Fe^{III} KatG) yang diubah menjadi bentuk aktif oleh dua jalur, salah satunya (a) membutuhkan superoksida (O_2^-). Di sebelah kanan adalah skema yang menunjukkan aktivasi INH oleh jalur dependen Mn^{2+} yang juga melibatkan superoksida (b), jalur ini dapat dihambat oleh superoksida dismutase (SOD). Jalur ini ditunjukkan dengan garis putus-putus karena mungkin tidak signifikan secara *in vivo*. INH aktif (INH^*) menghambat sintesis asam mikolat dengan cara menonaktifkan *InhA* dan *ACPM - KasA*. Spesies oksigen reaktif (ROS) timbul selama aktivasi INH atau akibat kehadiran superoksida (c). Protein *AhpC* muncul untuk membatasi akumulasi kerusakan oksidatif makromolekul yang diharapkan timbul dari aktivasi INH atau adanya superoksida. Garis bergelombang menunjukkan penghambatan jalur, dan jalur dengan bar tegak lurus menunjukkan penghambatan enzim.⁴⁰

C. RESISTENSI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* TERHADAP INH

Mutasi dan mekanisme resistensi

Mutasi adalah perubahan pada materi genetik suatu makhluk hidup yang terjadi secara tiba-tiba dan acak, merupakan dasar bagi sumber variasi organisme hidup yang bersifat terwariskan (*heritable*). Menurut kejadiannya, mutasi dapat terjadi secara spontan (*spontaneous mutation*) dan juga dapat terjadi melalui induksi (*induced mutation*). Mutasi spontan adalah mutasi yang terjadi akibat adanya sesuatu pengaruh yang tidak jelas, baik dari lingkungan luar maupun dari internal organisme itu sendiri. Sedangkan mutasi terinduksi adalah mutasi yang terjadi akibat paparan dari sesuatu yang jelas misalnya paparan sinar UV, senyawa kimia mutagenik, obat – obatan dll. Secara mendasar tidak terdapat perbedaan antara mutasi yang terjadi secara alami dan mutasi hasil induksi.⁴¹

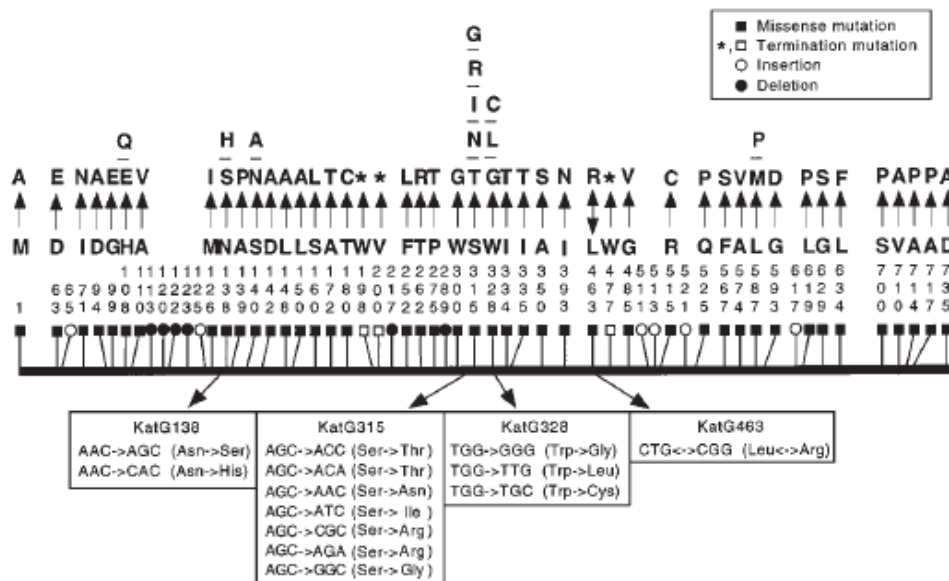
Resistensi terhadap OAT terutama terjadi karena mutasi pada gen *M. tuberculosis*. Penyebaran resistensi *M. tuberculosis* terjadi paska amplifikasi kuman resisten yang diinduksi oleh inadekuatnya obat disekitar kuman.¹³ Beberapa mutasi gen pada *M. tuberculosis* yang berperan sebagai penyebab resistensi INH telah dapat diidentifikasi. Mutasi yang terpenting berlokasi di gen KatG. Kepekaan terhadap

INH tergantung pada keberadaan enzim katalase-peroksidase yang dikode oleh gen KatG. Mutasi pada gen ini menyebabkan tingginya angka kejadian resistensi INH.³⁶

Gen KatG dan mutasi kodonnya

Gen KatG berada di posisi antara 2,153,445 – 2,156,555 dari keseluruhan genom *M. tuberculosis*, dengan panjang 2223 bp dan merupakan bagian dari pengkode protein katalase – peroksidase.^{22,33}

Beberapa dekade terakhir, studi isolat *M. tuberculosis* pasien TB mencatat bahwa terdapat hubungan antara resistensi INH dan hilangnya aktifitas enzim katalase-peroksidase. Pengamatan ini mengarahkan untuk dilakukannya kloning dan skuensing struktur gen KatG yang mengekspresikan enzim tersebut. Studi genetika molekuler menegaskan bahwa KatG berperan dalam memediasi kepekaan terhadap INH. Mutasi pada kodon tertentu akan mengekspresikan protein katalase - peroksidase mutan dan akan menyebabkan terbentuknya *M. tuberculosis* strain resisten isoniazid. Peneliti – peneliti dari beberapa benua melaporkan bahwa terdapat beragam mutasi KatG yang unik terjadi pada strain *M. tuberculosis* resisten INH (gambar 5).¹⁶ Mutasi pada kodon 315 merupakan mutasi yang paling sering terjadi. Mutasi pada kodon lain, seperti kodon 463, 328, 138, 131, 128, 126, 101, 91, 68 dan kodon yang lain sangat jarang terjadi.^{16,42}



Gambar 5. Polimorfisme protein *KatG* pada *M. tuberculosis* INH^R. Varian asam amino diberi nomor secara vertikal. Dipakai singkatan asam amino satu huruf. Tampak dibawah skema perubahan nukleotida dan asam amino yang muncul pada kodon dengan 2 atau lebih varian kodon. A: alanin; C: sistein; D: asam aspartat; E: asam glutamat; F: fenilalanin; G: glisin; H: histidin; I: isoleusin; M: metionin; N: asparagin; P: prolin; Q: glutamin; R: arginin; S: serin; T: treonin; W: triptofan; V: valin.¹⁶

Mutasi kodon Ser315Thr (AGC→ACC) sebagai mutasi yang paling sering muncul

Pergantian asam amino yang terletak pada posisi kodon 315Ser adalah yang paling banyak terjadi.^{10,11,19,20,21,22,33} Seperti penelitian Moaddab et al (2011) yang mendapatkan 56% mutasi pada lokus KatG315, 20% mutasi pada lokus KatG463 dan 24% tanpa mutasi dari 25 strain resisten INH.⁴³

Contoh varian mutasi kodon 315 gen *KatG* *M. tuberculosis* ini yaitu Ser315Thr (AGC→ACC), Ser315Thr (AGC→ACA), Ser315Asn (AGC→AAC), Ser315Ile (AGC→ATC), Ser315Arg (AGC→CGC), Ser315Arg (AGC→AGA), Ser315Gly (AGC→GGC) dan lain - lain,¹⁶ tetapi mutasi terbanyak adalah tipe mutasi Ser315Thr (AGC→ACC).^{10,11,19,20,21,42} Seperti penelitian Bostanabad et al di Belarusia tahun 2008 terhadap 163 isolat DNA *M. tuberculosis* yang berasal dari

sputum penderita TB paru aktif didapatkan mutasi KatG 315Ser(AGC) sebagai mutasi yang paling sering muncul yaitu pada 40 isolat (24,54%), diikuti dengan mutasi pada kodon lain yang jarang. Dari 40 isolat yang mengalami mutasi pada kodon ini, didapatkan 4 tipe mutasi yaitu AGC→ACC 36 isolat (85%), AGC→AGG 1 isolat (2,3%), AGC→AAC 2 (4,7%) dan AGC→GGC 1 (2,3%).¹⁰

KESIMPULAN

Isoniazid (INH) merupakan salah satu anti tuberkulosis lini pertama yang penting karena *Mycobacterium tuberculosis* sangat peka terhadap INH.

INH berdifusi pasif ke dalam sel *M. tuberculosis* dan diaktifkan oleh enzim katalase-peroksidase yang diekspresikan oleh gen *KatG*. INH aktif kemudian akan menghambat biosintesis asam mikolat (*long chain α-branched β-hydroxylated fatty*

acids) dinding sel *M. tuberculosis*. Mutasi gen KatG menyebabkan hilangnya aktivitas enzim katalase-peroksidase.

Mutasi terbanyak ditemukan pada kodon 315 dan yang paling sering muncul adalah AGC (Serin) menjadi ACC

(Treonin). Oleh sebab itu, disimpulkan bahwa mutasi pada kodon ini merupakan penyebab tersering terjadinya resistensi INH dan sangat potensial menjadi marker genetik untuk memprediksi MDR-TB.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization (WHO). 2013. Definition and reporting framework for tuberculosis – 2013 revision. <http://www.who.int>. 22 November 2012 (14:01).
2. World Health Organization (WHO). 2014. Global Tuberculosis Report 2014. WHO Press. Switzerland.
3. Falzon, D., E. Jaramillo, H.J. Schu"nnemann, M. Arentz, M. Bauer, J. Bayona, L. Blanc, J.A. Caminero, C.L. Daley, C. Duncombe, C. Fitzpatrick, A. Gebhard, H. Getahun, M. Henkens, T.H. Holtz, J. Keravec, S. Keshavjee, A.J. Khan, R. Kulier, V. Leimane, C. Lienhardt, C. Lu, A. Mariandyshev, G.B. Migliori, F. Mirzayev, C.D. Mitnick, P. Nunn, G. Nwagboniwe, O. Oxlade, D. Palmero, P. Pavlinac, M.I. Quelapio, M.C. Raviglione, M.L. Rich, S. Royce, S. Ru"sch-Gerdes, A. Salakaia, R. Sarin, D. Sculier, F. Varaine, M. Vitoria, J.L. Walson, F. Wares, K. Weyer, R.A. White, dan M. Zignol. 2011. WHO Guidelines for The Programmatic Management of Drug-Resistant Tuberculosis: 2011 Update. *European Respiratory Journal*. 38(3):516-528.
4. Rie, A.V., R. Warren, I. Mshanga, A. M. Jordaan, G. D. Van der Spuy, M. Richardson, J. Simpson, R. P. Gie, D. A. Enarson, N. Beyers, P. D. Van Helden dan T. C. Victor. 2001. Analysis for a Limited Number of Gene Codons Can Predict Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a High-Incidence Community. *J. Clin. Microbiol* 39(2):636-641.
5. Abe, C., I. Kobayashi, S. Mitarai, M. Wada, Y. Kawabe, T. Takashima, K. Suzuki, L-H Sng, S. Wang, H H Htay, dan H. Ogata. 2008. Biological and Molecular Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates with Low-Level Resistance to Isoniazid in Japan. *J. Clin. Microbiol* 46(7):2263-2268.
6. World Health Organization (WHO). 2014. Global Tuberculosis Report 2014: Drug Resistant TB Surveillance and Response. <http://www.who.int>. 3April 2015 (09:00).
7. Departemen Ilmu Penyakit Paru Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara / Rumah Sakit Umum Pusat H. Adam Malik. 2015. Rekapitulasi Penderita MDR-TB Bulan Januari – Maret Tahun 2015. Medan.
8. Rattan, A., A. Kalia dan N. Ahmad. 1999. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Ind. J. Tub.* 46(51):51-68.
9. Meissner, PE., P. Musoke, A. Okwera, J. E. G. Bunn dan J. B. S. Coulter. 2002. The value of urine testing for verifying adherence to anti-tuberculosis chemotherapy in children and adults in Uganda. *Int J Tuberc Lung Dis*. 6(10):903–908.
10. Bostanabad, S. Z., L. P. Titov, A. Bahrmand dan S. A. Nojumi. 2008. Detection of mutation in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from tuberculosis patients in Belarus. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 26(2):143-147.

11. Marahatta, S.B., S. Gautam, S. Dhital, N. Pote, A. K. Jha, R. Mahato, S. Mishra, B. H. Poudel, P. Ramasoota, J. Kaewkungwal dan P. Singhasivanon. 2011. KatG (SER 315 THR) Gene Mutation in Isoniazid Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Kathmandu Univ Med J.* 9(1):19-23.
12. Kardas, P dan W. R. Bishai. 2006. Compliance in anti-infective medicine. *Adv Stud Med.* 6(7): S652-S658.
13. Sjahrurachman, A. 2010. Diagnosis "Multidrug Resistant Mycobacterium" Tuberculosis. *Jurnal Tuberkulosis Indonesia.* 7(2):8-11.
14. Munoz, E. B., M. F. Dorado, J. E. Guerreroc dan F. M. Martinez. 2014. The effect of an educational intervention to improve patient antibiotic adherence during dispensing in a community pharmacy. *Aten Primaria.* 46(7):367-375.
15. Lina, M. R., B. Bela dan A. Yasmon. 2009. Deteksi mutasi gen KatG *Mycobacterium tuberculosis* dengan metode PCR (polymerase chain reaction) - Hibridisasi dot blot menggunakan pelacak oligonukleotida bertanda ³²P. *Scientific Journal for The Applications of Isotopes and Radiation.* 5(1):54-67.
16. Ramaswamy, S dan J. M. Musser. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung Disease.* 79(1):3-29.
17. Musser, J. M. 1995. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. *Clinical Microbiology Review.* 8(4):496-514.
18. Ramaswamy, S. V., R. Reich, S-J. Dou, L. Jasperse, X. Pan, A. Wanger, T. Quitugua dan E. A. Graviss. 2003. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(4):1241-1250.
19. Ahmad, S., E. Fares, G. F. Araj, T. D. Chugh dan A. S. Mustafa. 2002. Prevalence of S315T mutation within the katG gene in isoniazid-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Dubai and Beirut. *Int J Tuberc Lung Dis.* 6(10):920-926.
20. Mokrousov, I., T. Otten, M. Filipenko, A. Vyazovaya, E. Chrapov, E. Limeschenko, L. Steklova, B. Vyshnevskiy dan O. Narvskaya. 2002. Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by a Multiplex Allele-Specific PCR Assay Targeting katG Codon 315 Variation. *Journal of Clinical Microbiology.* 40(7):2509-2512.
21. Guo, H., Q. Seet, S. Denkin, L. Parsons dan Y. Zhang. 2006. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *Journal of Medical Microbiology.* 55:1527-1531.
22. Genbank. 2015. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, complete genome. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000962.3?report=genbank. 16 juni 2015. (15.12).
23. Public Health Agency of Canada. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* complex: Pathogen Safety Data Sheet – Infectious Substances. <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/tuber-eng.php>. 27 Oktober 2013 (22.34).
24. Brooks, G. F., K.C. Carrol, J. S. Butel, S. A. Morse, Jawetz, Melnick dan Adelberg. 2007. *Medical Microbiology.* 24th ed. McGraw-Hill Companies, Inc. USA.
25. Ananthanarayan, R dan C. K. J. Paniker. 2005. *Textbook of Microbiology.* 7th ed. Orient Longman Private Ltd. Hiderabad.
26. Ryan, K.J. dan C.G. Ray. 2010. *Sherris Medical Microbiology.* 5th ed. McGraw-Hill Companies, Inc. USA.

27. Briken, V., S. A. Porcelli, G. S. Besra dan L. Kremer. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular Microbiology*. 53(2):391-403.
28. Goude, R dan T. Parish. 2008. The genetics of cell wall biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol*. 3(3):299-313.
29. Sacco, E., A. S. Covarrubias, H. M. O'Hare, P. Carroll, N. Eynard, T. A. Jones, T. Parish, M. Daffe, K. Backbro dan A. Quemard. 2007. The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(37):14628–14633.
30. Amin, A. G., R. Goude, L. Shi, J. Zhang, D. Chatterjee dan T. Parish. 2008. EmbA is an essential arabinosyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology: Society for General Microbiology Journals*. 154(1): 240-248.
31. Mikusová, K., M. Belánová, J. Korduláková, K. Honda, M. R. McNeil, S. Mahapatra, D. C. Crick dan P. J. Brennan. 2006. Identification of a Novel Galactosyl Transferase Involved in Biosynthesis of the Mycobacterial Cell Wall. *Journal of Bacteriology*. 188(18):6592-6598.
32. Portillo, P. D., A. Reyes, L. Salazar, M. D. C. Menendez dan M. J. Garcia. 2007. Genomics and Proteomix. Tuberculosis 2007, From Basic Science to Patient Care. www.tuberculosisistextbook.com. 14 Desember 2012 (14:33).
33. Ensembl Genomes. 2015. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. http://bacteria.ensembl.org/mycobacterium_tuberculosis_h37rv_asm19595v2. 16 juni 2015. (15.00).
34. Uniprot. 2015. Catalase-peroxidase - katG - *Mycobacterium tuberculosis* (strain ATCC 25618 / H37Rv) Version 4. <http://www.uniprot.org/uniprot/P9WIE5>. 25 Juli 2015. (13.28).
35. Becker, C., J. B. Dressman, G. L. Amidon, H.E. Junginger, S. Kopp, K.K. midha, V. P. Shah, S. Stavchansky dan D.M. Barends. 2006. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Isoniazid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 96(3):522-531.
36. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD). 2002. *Interventions for Tuberculosis Control and Elimination*. Paris.
37. Teixeira, R. L. F., M. Q. P. Lopes, P. N. Suffys dan A. R. Santos. 2013. Tuberculosis Pharmacogenetics: State of The Art. <http://dx.doi.org/10.5772/54984>. 23 Oktober 2013 (20.33).
38. Sweetman, S. C. 2009. *Martindale. The Complete Drug Reference*. 36th ed. Pharmaceutical Press. London.
39. FAD (Food and Drug Administration). 2013. Chemistry and Toxicology Devices, Strip Test, Isoniazid – unclassified. *Clinical Chemistry and Clinical Toxicology Devices Panel of the Medical Devices Advisory Committee Meeting Announcement*. 25-26 April: 1-23.
40. Wang, J. Y., R. M. Burger dan K. Drlica. 1997. Role of Superoxide in Catalase-Peroxidase-Mediated Isoniazid Action against Mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42(3):709-711.
41. Warianto, C. 2013. Mutasi. <http://www.konseptbiologi.wordpress.com>. 2 Mei 2014 (20.25).
42. J. Tomasz, M. Grzeszczuk¹, M. Kamiński, K. Roeske, A. Napiórkowska, R. Stachowiak, E. Augustynowicz-Kopeć, Z. Zwolska, J. Bielecki. 2013. Identification and analysis of mutations in the katG gene in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *Pneumonol. Alergol. Pol*. 81: 298-307.
43. Moaddab, S. R., S. Farajnia, D. Kardan, S. Zamanlou dan M. Y. Alikhani. 2011. Isoniazid MIC and KatG Gene Mutations among Mycobacterium tuberculosis isolates in Northwest of Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 14(6): 540-545.