

Genetic Variation Analysis of *katG* Gene Sequence in *Mycobacterium tuberculosis* Using RFLP *In Silico*

Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen *KatG* Pada *Mycobacterium tuberculosis* Menggunakan RFLP Secara *In Silico*

Siti Nurfalinda¹, Ony Nattasha Aulia¹, Fadila Sirwati¹, Rezeki Rival Alridho¹, Afifatul Achyar^{1*}

¹ Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Correspondence author: afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id

Abstract

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that is the leading cause of death in Indonesia. This infection is caused by *Mycobacterium tuberculosis*. In Indonesia in 2021, there were approximately 824,000 cases of TB. A total of 8,268 TB cases were associated with resistance of *M. tuberculosis* to anti-tuberculosis drugs (OAT). MDR-TB is a strain that is resistant to two of the most important anti-tuberculosis drugs in first-line TB therapy, namely Rifampicin (RIF) and Isoniazid (INH). The most common mechanism of INH resistance is the *katG* gene mutation, found (95%) at codon 315. In the *katG* gene there is a change in the amino acid Ser (AGC) → Thr (ACC). Genetic variation in a population will affect the survival ability of an individual. This study used *BamHI* restriction enzyme. This study aims to analyze genetic variation in the *katG* gene sequence in *M. tuberculosis* NCBI popset 2363230696 by using RFLP *in silico*. The results showed that there were genetic variations in the *KatG* gene sequence and two allelic variations contained in 7 *katG* gene sequences using the *BamHI* restriction enzyme.

Key words : *M. tuberculosis*, *BamHI*, *KatG*, Genetic Variation, RFLP *in silico*.

Abstrak

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi penyebab utama kematian di Indonesia. Infeksi ini disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Di Indonesia pada tahun 2021, tercatat sekitar 824.000 kasus TB. Sebanyak 8.268 kasus TB dikaitkan dengan resistensi *M. tuberculosis* terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT). MDR-TB ialah strain yang resistensi terhadap dua Obat Anti Tuberkulosis (OAT) yang paling penting dalam terapi TB lini pertama, yaitu Rifampisin (RIF) dan Isoniazid (INH) Mekanisme resistensi INH yang paling sering terjadi yaitu mutasi gen *katG*, ditemukan (95%) pada kodon 315. Pada gen *katG* terjadi perubahan asam amino *Ser* (AGC) → *Thr* (ACC). Variasi genetik pada suatu populasi akan berpengaruh terhadap kemampuan bertahan hidup suatu individu. Penelitian ini menggunakan enzim restriksi *BamHI*. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis variasi genetik pada sekuen gen *KatG* pada *M. tuberculosis* NCBI popset 2363230696 dengan menggunakan RFLP *in silico*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat variasi genetik pada sekuen gen *KatG* dan dua variasi alel yang terdapat dalam 7 sekuen gen *KatG* menggunakan enzim restriksi *BamHI*.

Kata kunci: *M. tuberculosis*, *BamHI*, *KatG*, Variasi Genetik, RFLP *in silico*.

Pendahuluan

Keragaman genetik atau variasi genetik merupakan variasi yang terjadi pada suatu organisme akibat adanya perbedaan pada urutan basa nukleotida (adenin, timin, guanin dan sitosin) yang membentuk DNA di dalam sel (Harrison *et al*, 2004). Analisis variasi genetik menggunakan data sekuen DNA tertentu merupakan salah satu cara untuk mempelajari keanekaragaman genetik dan hubungan kekerabatan genetik suatu

spesies. Informasi tentang keragaman genetik yang diperoleh dari analisis DNA juga berguna untuk menentukan kekerabatan antar individu atau populasi yang diteliti. Informasi ini dapat digunakan sebagai dasar untuk meningkatkan kualitas genetik (Yuliani *et al*, 2017).

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi penyebab utama kematian di Indonesia. Infeksi ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Di Indonesia pada tahun 2021, tercatat sekitar 824.000 kasus TB (Kementerian Kesehatan, 2021). Indonesia memiliki jumlah kasus TB tertinggi kedua di dunia, yaitu 9,2%, di bawah India (28%) dan di atas Cina (7,4%). Pada tahun 2022, diperkirakan terdapat 969.000 kasus TB dan 93.000 kematian akibat TB (WHO, 2023). Sebanyak 8.268 kasus TB dikaitkan dengan resistensi *M. tuberculosis* terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) (WHO, 2021). OAT merupakan obat yang diberikan kepada pasien tuberkulosis yang terbagi menjadi beberapa lini. Lini pertama pengobatan OAT terdiri dari Rifampisin (RIF), Isoniazid (INH), Pirazinamid (PZA), Ethambutol (EMB), dan Streptomisin (S) (Fortuna *et al*, 2022). Pemberian OAT dapat membunuh *M. tuberculosis*, namun bisa juga memunculkan bakteri yang resisten terhadap obat tersebut. Terjadinya resistensi terhadap lebih dari satu OAT dikenal dengan istilah Multidrug Resistensi (MDR) (WHO, 2021). MDR-TB ialah strain yang resistensi terhadap dua Obat Anti Tuberkulosis (OAT) yang paling penting dalam terapi TB lini pertama, yaitu Rifampisin (RIF) dan Isoniazid (INH) (Aristiana & Wartono, 2018). Kemungkinan terjadi resistensi tunggal sangat jarang. Tercatat data global, resistensi tunggal terhadap INH hanya 7,1% tidak diikuti resistensi rifampisin (RIF) pada kasus TB baru dan 7,9% pada kasus TB yang telah diobati. Analisis sistematis sebelumnya menunjukkan bahwa resistensi terhadap INH mengurangi kemungkinan keberhasilan pengobatan dan meningkatkan risiko terkena resistensi terhadap obat lini pertama yang penting seperti RIF, sehingga meningkatkan risiko TB yang resisten terhadap banyak obat (MDR) (Jhun & Koh, 2020).

Mekanisme resistensi INH yang paling sering terjadi yaitu mutasi gen *katG*, ditemukan (95%) pada kodon 315. Pada gen *katG* terjadi perubahan asam amino *Ser* (AGC) → *Thr* (ACC). Selain mutasi *katG*, resistensi isoniazid disebabkan oleh mutasi regio promotor *inhA*, yang menyebabkan dosis optimum meningkat untuk mencapai penghambatan bakteri yang komplit. Terdapat sekitar 12% kasus MDR-TB di Indonesia disebabkan oleh pengobatan TB yang tidak tepat, sehingga memiliki tingkat kematian pasien MDR-TB di Indonesia sangat tinggi (Sahiratmadja *et al*, 2020).

Keragaman genetik pada tingkat populasi/ individu/ spesies di analisis dengan penanda yang berbeda. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) merupakan penanda (marka) yang sering digunakan. Selain itu ada juga *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Random Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Simple Sequence Repeats* (SSRs), *isozyme* dan *allozyme*. Pada tingkat sekuen DNA deteksi variasi genetik dapat dilakukan dengan cara RFLP (*Random Fragment Length Polymorphism*) (Anggraini *et al*, 2021).

Metode yang digunakan untuk menganalisis variasi genetik menggunakan sekuensing DNA, pohon filogenetik, dan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Achyar *et al*, 2021). RFLP adalah penanda molekuler yang mengenali sekuens DNA dengan menggunakan enzim restriksi (Kanaya, 2023). Kekhususan enzim restriksi, yang hanya memotong DNA untai ganda pada situs pemotongan yang ditentukan, digunakan dalam prosedur ini. Fragmen DNA dengan panjang yang berbeda akan dihasilkan oleh pemotongan enzim restriksi, dan elektroforesis dapat digunakan untuk memvisualisasikan hasil dari fragmen-fragmen tersebut (Nariska *et al*, 2022). Sebelum melakukan RFLP di laboratorium, restriksi dan visualisasi fragmen-fragmen restriksi dapat dilakukan secara *in silico* dengan tujuan untuk memprediksi hasil genotipe (Kanaya *et al*, 2023). Percobaan atau pengujian yang dilakukan melalui simulasi komputer dikenal dengan uji *in silico* (Yeriska *et al*, 2021). Peroleh suatu primer untuk amplifikasi secara *in silico* dalam mendesain/merancang primer dengan program komputer (Safitri & Achyar, 2023).

Berdasarkan uraian yang diberikan di atas dan data urutan gen dari basis data bioinformatika NCBI. Maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk menganalisis variasi genetik pada sekuen gen *katG* pada *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan RFLP secara *in silico*.

Bahan dan Metode

A. Bahan

Pada penelitian ini menggunakan sekuen gen *katG* (*catalase-peroxidase*) dengan nomor identitas Popset 2363230696 yang di unduh dalam format fasta dari NCBI. Nama organisme dari nomor Popset ini yaitu *Mycobacterium tuberculosis*, dengan acc number OM287938 yang dipublikasi oleh Magana-Arachchi, D.N. and Madamarandawala, P.S. Popset ini memiliki 7 sekuen (Tabel. 1)

Tabel 1. Sampel sekuen gen *katG* *Mycobacterium tuberculosis*

No	ACC Number
1	OM287944.1
2	OM287943.1
3	OM287942.1
4	OM287941.1
5	OM287940.1
6	OM287939.1
7	OM287938.1

B. Metode

1. Skrining Kandidat Enzim Retriksi

Situs yang digunakan untuk skrining kandidat enzim restriksi yaitu <http://insilico.ehu.es/restriction>. File fasta yang berisi sekuen gen *katG* yang telah di unduh sebelumnya dari NCBI kemudian diunggah pada menu *compare restriction pattern of many sequences*. Hasil alignment akan terlihat, lalu klik *only restriction enzymes whit known bases* (no N,R,Y) kemudian klik *get lint of restriction enzymes*. selanjutnya memilih jenis enzim restriksi yang akan digunakan.

2. RFLP secara *In-silico*

Situs yang digunakan untuk RFLP secara *In-silico* yaitu <https://www.benchling.com/>. File fasta yang berisi sekuen gen *katG* diunggah dalam folder proyek pada situs *benchling*. Restriksi *in silico* dilakukan dengan mengklik simbol gunting pada pojok kanan layar. Kemudian menu "*find enzyme*" dipilih dan nama enzim restriksi yang sudah ditentukan sebelumnya pada saat skrining, diketikkan pada kolom yang tersedia. Selanjutnya, menu "*run digest*" diklik untuk melakukan restriksi. Adapun gambar elektroforegram diperoleh dengan mengklik menu "*virtual digest*" (Achyar *et al*, 2021)

Hasil dan Pembahasan

Skrinning Kandidat Enzim Restriksi

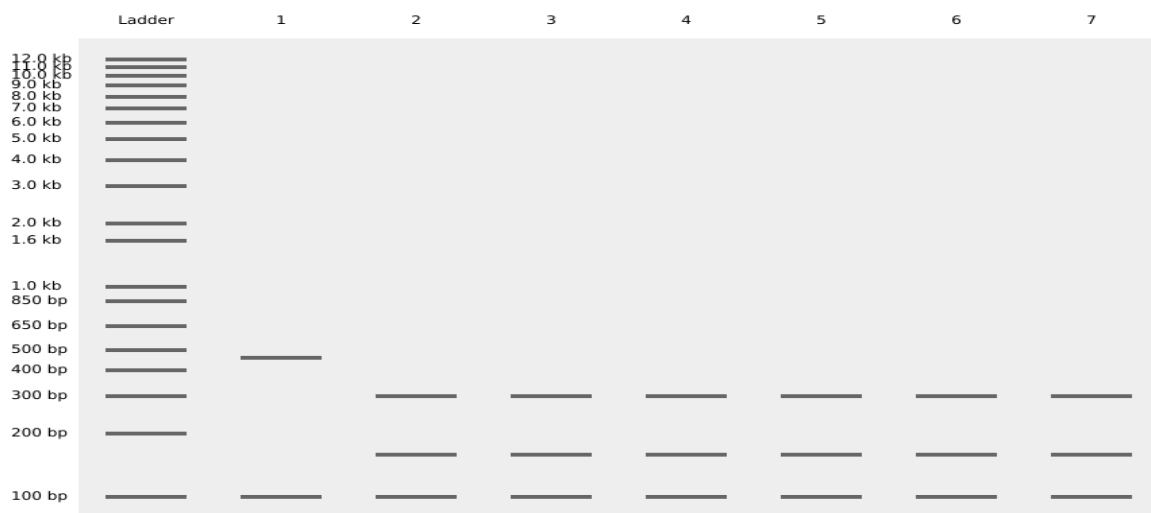
Hasil yang diperoleh dari skrinning enzim, didapatkan dan dipilih enzim restriksi *BamHI* pada sisi pengenalan 5'-G'GATC_C- 3'. *BamHI* adalah enzim restriksi tipe II dari *Bacillus amyloliquefaciens*. Seperti semua endonuklease restriksi tipe II, Endonuklease bersifat dimer dan tempat pengenalannya bersifat palindromik dan panjangnya 6 basa yang mengenali urutan DNA G'GATCC, membuat GATC kompatibel dengan banyak enzim lainnya (Viadiu, 2000).

Enzim restriksi merupakan enzim yang dapat memotong genom DNA sehingga diperoleh rangkaian DNA dengan cara memotong genom DNA menjadi fragmen-fragmen oleh enzim yang dapat memutus ikatan rantai fosfodiester DNA. Enzim restriksi yang dihasilkan oleh bakteri disebut juga *endonuclease*. Enzim ini dapat mengenali urutan nukleotida spesifik 4 hingga 8 bp. Kondisi optimal diperlukan agar enzim restriksi dapat membelah sepenuhnya dan menghasilkan fragmen restriksi yang benar (Putri *et al*, 2017). Urutan Nukleotida spesifik ini disebut situs restriksi, yang biasanya merupakan urutan palindromik pendek dan pola urutan yang sama saat membaca dalam arah 5' → 3' (Muthiadin, 2014)

RFLP secara *in silico*

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) merupakan teknik yang umum digunakan untuk menentukan genotipe (*genotyping*) dengan cara memotong sekuens DNA dengan enzim restriksi (Achyar, 2021). RFLP adalah metode analisis yang menggunakan enzim restriksi untuk memotong urutan nukleotida yang khas pada posisi tertentu yang berbeda, menghasilkan fragmen dengan panjang yang berbeda (Theodore, 2000). RFLP cocok untuk mendeteksi mutasi pada tingkat sekuens DNA dengan memanfaatkan kekuatan enzim restriksi pada DNA. Metode RFPL ini dapat digunakan untuk mengetahui kemiripan atau variabilitas genetik (Wahyudi, 2015). Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi saat ini sangat bermanfaat dalam bidang ilmu pengetahuan seperti genetika. Adanya beragam alat bioinformatika membuat proses skrining enzim restriksi dan visualisasi fragmen restriksi dapat dilakukan secara komputas (*in silico*). Studi *in silico* dilakukan untuk melihat hasil analisis sikuen dan analisis struktur protein dari suatu gen (Damayanti & Putri, 2019)

Studi *in silico* merupakan studi pertama sebelum melanjutkan ke metode lain seperti metode *in vivo* dan *in vitro* untuk memprediksi dan membuat hipotesis aktivitas suatu senyawa atau ligan. Hal ini karena menentukan mekanisme ligan untuk menjelaskannya secara sederhana bisa jadi sulit dan memerlukan tujuan. Waktu yang lebih banyak dan biaya yang tidak murah.



Gambar 1. Elektroforegram hasil restriksi sekuens *Mycobacterium tuberculosis* pada gen *KatG* menggunakan enzim restriksi *BamHI* secara *in silico*. Ket: Kiri (Ladder Bioline hyperladder 1 kb), (1) OM287938.1. (2) OM287939.1. (3) OM287940.1. (4) OM287941.1. (5) OM287942.1. (6) OM287943.1. (7) OM287944.1.

Restriksi dengan enzim restriksi *BamHI* pada 7 sekuens gen *KatG* Pada *Mycobaceterium tuberculosis* menghasilkan dua variasi alel, yaitu alel A1 yang menghasilkan dua pita DNA berukuran 459 bp dan 93 bp yang terdapat pada isolate *M. tuberculosis* sampel 1 (Gambar 1). Sedangkan pada alel A2 menghasilkan tiga pita DNA berukuran 300 bp, 159 bp dan 93 bp pada isolate *M. tuberculosis* sampel 2-7 (Gambar 1). Frekuensi alel pada *M. tuberculosis* sekuens gen *KatG* dengan enzim restriksi *BamHI* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Frekuensi Alel Gen *KatG* *M. tuberculosis* NCBI Berdasarkan Hasil RFLP *In Silico*

Enzim Restriksi	Situs Pengenalan Restriksi	Ukuran Fragment (bp)	Alel	Jumlah Kehadiran Fragment (N = 7)	Persentase Kehadiran Fragment (%)	Frekuensi Alel
<i>BamHI</i>	'GATC_C	459 bp dan 93 bp	A1	1	14.28	0.1428
		300 bp, 159 bp dan 93 bp	A2	6	85.71	0,8571

Dapat kita ketahui dari Tabel 2 bahwa alel A2 mendominasi populasi pada Popset 2363230696. Dari 7 sampel sequence, jumlah DNA yang mengalami pemotongan ada 7 sampel. Alel A1 memiliki jumlah kehadiran fragment terbanyak yaitu 1 kali dengan persentase 14,28%, kemudian diikuti oleh alel A2 sebanyak 6 kali dengan persentase 85,71%. Selain itu, Terdapat dua variasi alel yang muncul dalam RFLP, alel 1 (A1) muncul dengan frekuensi sebesar 0,1428 dan alel 2 (A2) muncul dengan frekuensi sebesar 0,8571

Nilai persentase dan frekuensi alel A1 dan A2 ini menunjukkan tingkat variasi genetik yang rendah. Berdasarkan hasil dari dilakukannya RFLP *in silico* dapat disimpulkan bahwa terdapat variasi genetik, dengan memunculkan 2 variasi alel pada 7 sekuen gen *KatG* yang terdapat pada padi NCBI dengan nomor popset 2363230696.

Daftar Pustaka

- Achyar A, Atifah Y, Putri DH. 2021. In silico study of developing a method for detecting pathogenic bacteria in refillable drinking water samples. *Journal of Physics: Conference Series*. 1940 (1): 1-6.
- Kanaya ON & Achyar A. (2023). Analysis of Genetik Variations in PHT1 Gene Sequences in Rice (*Oryza sativa*) NCBI Popset 240028097 Using In-Silico RFLP. *Jurnal Serambi Biologi*. 8(1), 5-9.
- Damayanti NA & Putri DH. Studi in silico Peran Gen IL10RB Homo sapiens (reseptor subunit beta interleukin 10) pada Infeksi Hepatitis B. *Majalah Kesehatan PharmaMedika*. 10 (2):85-91.
- Safitri F & Achyar A. 2023. Desain Primer Secara In Silico Untuk Amplifikasi Gen ND5 Ayam Dengan Real Time Polymerase Chain Reaction (rtPCR). *Serambi Biologi*. 8 (3): 476-479.
- Achyar A, Hindayageni A, Humaira F, Wijaya NN, Aqsha N, Zultsatunni'mah. 2021. Analysis of Genetic Variations in POLY Gene Sequences in Dengue Virus 2 Using In-Silico RFLP. *Bioscience*. 5 (1): 80-86.
- Nariska H, Lestari P, & Karima R. (2022). Optimasi Metode Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) untuk Deteksi Polimorfisme Gen MTHFR (C677T) pada Pasien Leukemia Limfoblastik Akut (LLA) Anak. *Prosiding Asosiasi Institusi Pendidikan Tinggi Teknologi Laboratorium Medik Indonesia*, 1-13.
- Yeriska F, Umar MZ, Hijriah NW, Fadhlurrohman R, & Achyar A. (2021). Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen Pengkode Protein Spike Virus MERS-CoV (PopSet: 1843801421) Menggunakan RFLP Secara In Silico. *In Prosiding Seminar Nasional Biologi*. 1 (2): 898-906.
- Anggraini SF, Kusuma AR, Bunga D, Pela M, Jannah VF, Putri P, & Achyar A. 2021. Analysis of Genetic Variant Of NADH Dehydrogenase Subunit 4-Like Gene Sequences of *Aedes Aegypti* Popset: 1831566147 Using In Silico RFLP. *Prosiding Semnas Bio*, Vol 1 : 102-110.
- Yuliani, Yani., Alice Yuniaty, & Agus Hery Susanto. 2017. Variasi Sekuen DNA yang Diampifikasi Menggunakan Primer ATPB-RBCL Pada Beberapa Kultivar Kacang Tanah. *Scripta Biologica*. 4 (1).
- Harrison I, Laverty M, & Sterling E. 2004. *Genetic Diversity*. Connexions module: m12158.
- Fortuna TA, Rachmawati H, Hasmono D, & Karuniawati H. 2022. Studi Penggunaan Obat Anti Tuberkulosis (OAT) Tahap Lanjutan pada Pasien Baru BTA Positif The Study of Continuation Phase Anti Tuberculosis Drugs (OAT) in New Patient with Smear-Positive. *In Jurnal Farmasi Indonesia*. 19 (1). <http://journals.ums.ac.id/index.php/pharmacon>
- Jhun BW, & Koh WJ. 2020. Treatment of isoniazid-resistant pulmonary tuberculosis. In *Tuberculosis and Respiratory Diseases* (Vol. 83, Issue 1, pp. 20-30). *Korean National Tuberculosis Association*. <https://doi.org/10.4046/trd.2019.0065>

- Aristiana CD, & Wartono M. 2018. Faktor-faktor yang mempengaruhi terjadinya Multi Drug Resistance Tuberculosis (MDR-TB). *Jurnal Biomedika Dan Kesehatan*. 1(1). <https://doi.org/10.18051/JBiomedKes.2018>
- Viadiu H, Aggarwal AK. 2000. Struktur BamHI terikat pada DNA nonspesifik: model geser DNA., *Mol Cell*, 5(5):889-95.
- Putri IARDN, Sagung CY, dan Wirajana IN. 2017. Optimasi Digesti Enzim Restriksi SacII Pada Isolat Mycobacterium tuberculosis H37Rv Untuk Deteksi Mutasi Promoter inhA Pada Kasus MDR-TB Dengan Metode PCR-RFLP. *Jurnal Metamorfosa*. 4 (1): 87-9.
- Muthiadin C. 2014. *Pengantar Rekayasa Genetika*. Universitas Islam Negeri Alauddin. Makassar.
- Theodore G. Schurr. 2000. Mitochondrial DNA and the Peopling of the New World Genetic variations among Native Americans provide further clues to who first populated the Americas and when they arrived. *American Scientist Online* (The Magazine of Sigma Xi, The Scientific Research Society).
- Wahyudi, Ivan Arie. 2015. Resensi Biologi Molekular Adalah Ilmu yang Menyenangkan dan Mudah. *Jurnal Teknosains*, Vol 4 : 101-198.
- WHO. 2021. *Global Tuberculosis Report 2021*. France: World Health Organization.
- WHO. 2023. *Global tuberculosis report 2023*. Geneva: World Health Organization.
- Sahiratmadja E, Mega GS, Andriyoko B, & Parwati I. 2020. Performance of Xpert® MTB/RIF in Detecting Multidrug-Resistance Tuberculosis in West Java, Indonesia. *Majalah Kedokteran Bandung*. 52 (2): 99-106.