

**DESAIN DIAGNOSTIK CEPAT *Mycobacterium tuberculosis*  
YANG RESISTEN TERHADAP ISONIAZID BERBASIS *LOOP-  
MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)***

**SKRIPSI**

*Diajukan Sebagai Salah Satu Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Sains*



**ONY NATTASHA AULIA  
20032080/2020**

**DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
2024**

## SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ony Nattasha Aulia

NIM/TM : 20032080/2020

Program Studi : Biologi

Departemen : Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul “Desain Diagnostik Cepat *Mycobacterium tuberculosis* Yang Resisten Terhadap Isoniazid Berbasis *Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)*” adalah benar merupakan karya sendiri, bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya yang ditulis dan diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan rasa tanggung jawab sebagai anggota masyarakat ilmiah.

Padang, 21 Februari 2024

Mengetahui  
Ketua Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S. Si., M. Biomed  
NIP. 197508152006042001

Saya yang menyatakan



28AKX798753718  
Ony Nattasha Aulia  
NIM. 20032080

## PERSETUJUAN SKRIPSI

### DESAIN DIAGNOSTIK CEPAT *Mycobacterium tuberculosis* YANG RESISTEN TERHADAP ISONIAZID BERBASIS *LOOP- MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)*

Nama : Ony Nattasha Aulia  
NIM : 20032080  
Program Studi : Biologi  
Jurusan : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 16 Februari 2024

Mengetahui:  
Kepala Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S. Si., M. Biomed  
NIP. 197508152006042001

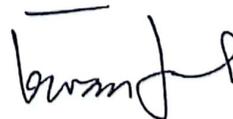
Disetujui Oleh:

Pembimbing I



Dr. Dwi Hilda Putri, S. Si., M. Biomed  
NIP. 197508152006042001

Pembimbing II



Dr. Irvan Faizal, M.Eng  
NIP. 197005181997031005

## PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Ony Nattasha Aulia  
NIM : 20032080  
Program Studi : Biologi  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

### **DESAIN DIAGNOSTIK CEPAT *Mycobacterium tuberculosis* YANG RESISTEN TERHADAP ISONIAZID BERBASIS *LOOP- MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)***

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi  
Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Negeri Padang

Padang, 21 Februari 2024

#### Tim Penguji

Nama  
Ketua : Dr. Dwi Hilda Putri, S. Si., M. Biomed  
Anggota : Dezi Handayani, M. Si.  
Anggota : Afifatul Achyar, M. Si.

Tanda tangan



# DESAIN DIAGNOSTIK CEPAT *Mycobacterium tuberculosis* YANG RESISTEN TERHADAP ISONIAZID BERBASIS *LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION* (LAMP)

Ony Nattasha Aulia

## ABSTRAK

Tuberkulosis (TB), yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), tetap menjadi salah satu penyebab utama kematian di Indonesia. Keterbatasan alat diagnostik untuk TB, termasuk Tuberkulosis Resistensi Obat (TB-MDR), turut berkontribusi pada peningkatan jumlah kasus. MDR-TB merupakan bentuk TB yang resisten terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT), seperti Isoniazid (INH). Merespons hal ini, metode cepat tanpa peralatan yang mahal seperti *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) merupakan salah satu metode deteksi MDR TB yang direkomendasikan WHO. Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer, menguji spesifisitas primer dan mengoptimasi metode LAMP untuk mendeteksi *M. tuberculosis* yang resisten terhadap Isoniazid.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan menggunakan pendekatan bioinformatika untuk merancang primer LAMP. Desain primer dilakukan menggunakan aplikasi *PrimerExplorerV5*. Optimasi metode LAMP melibatkan parameter suhu dan waktu, dengan enam perlakuan suhu dan sepuluh perlakuan waktu. Optimasi reaksi LAMP menggunakan genome *M. tuberculosis* sebagai cetakan DNA

Penelitian ini berhasil mendesain tiga pasang primer untuk reaksi LAMP, yaitu F3, B3, FIP, BIP, LF, dan LB. Suhu optimum untuk reaksi LAMP dalam mendeteksi mutasi gen *katG* adalah 60°C, sementara untuk gen *inhA* adalah 65°C. Waktu optimum reaksi LAMP untuk gen *katG* dan gen *inhA* adalah 50 menit.

Kata kunci: Bioinformatika, Metode LAMP, TB-MDR, Optimasi, Desain primer

# RAPID DIAGNOSTIC DESIGN FOR ISONIAZID-RESISTANT MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BASED ON LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)

Ony Nattasha Aulia

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), remains one of the leading causes of death in Indonesia. Limitations in diagnostic tools for TB, including Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB), contribute to the increasing number of cases. MDR-TB is a form of TB that is resistant to Anti-Tuberculosis Drugs (ATDs), such as Isoniazid (INH). In response to this, rapid and cost-effective methods such as Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) are recommended by WHO for MDR-TB detection. This research aims to design primers, test primer specificity, and optimize the LAMP method for detecting INH-resistant *M. tuberculosis*.

This study is a descriptive research using a bioinformatics approach to design LAMP primers. Primer design was conducted using the PrimerExplorerV5 application. Optimization of the LAMP method involved temperature and time parameters, with six temperature treatments and ten time treatments. LAMP reaction optimization used the *M. tuberculosis* genome as the DNA template.

This research successfully designed three pairs of primers for LAMP reactions, namely F3, B3, FIP, BIP, LF, and LB. The optimum temperature for LAMP reactions in detecting mutations in the *katG* gene was 60°C, while for the *inhA* gene, it was 65°C. The optimum reaction time for the *katG* gene and *inhA* gene was 50 minutes.

**Keywords:** *Bioinformatics, LAMP method, MDR-TB, Optimization, Primer design*

## KATA PENGANTAR



Puji dan syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “**Desain Diagnostik Cepat *Mycobacterium tuberculosis* Yang Resisten Terhadap Isoniazid Berbasis *Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)***”. Sholawat beserta salam untuk Nabi Muhammad SAW sebagai junjungan umat seluruh alam.

Penulisan skripsi ini bertujuan untuk, memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Sains Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, M.Biomed. sebagai ketua Departemen Biologi serta sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan pikiran, waktu dan tenaga untuk membimbing penulis dalam menyelesaikan skripsi.
2. Bapak Dr. Irvan Faizal, M.Eng. sebagai pembimbing kedua dari Badan Riset Inovasi Nasional (BRIN) yang telah memberikan kesempatan dan kepercayaan kepada saya untuk melakukan penelitian Tugas Akhir di LAPTIAB BPPT serta membimbing penulis dalam menyelesaikan skripsi.
3. Ibu Dezi Handayani, M.Si dan ibu Afifatul Achyar, M.Si, sebagai tim dosen penguji yang telah memberikan arahan serta saran dalam penulisan skripsi ini.
4. Bapak Prof. Abdul Razak, M.Si. sebagai Pembimbing Akademik (PA).

5. Bapak/Ibu dosen staf Departemen Biologi yang telah membantu untuk kelancaran penulisan skripsi ini.
6. Kedua orang tua saya bapak Sutrisno dan ibu Rinawati yang telah memberikan do'a, dukungan finansial dan mental serta selalu mengiringi setiap perjalanan penulis.
7. Kakak kandung saya Trisna Ayu Satwika, S. Kom, MTA yang selalu memberikan semangat dalam proses penulisan beserta mentor saya Angelina Gill, S.Biotek yang telah melatih dan membentuk mental saya dari awal di BRIN hingga saat ini.
8. Semua peneliti, staff dan teman-teman BRIN yang telah membantu dalam proses penelitian hingga penyusunan artikel.
9. Semua teman-teman sepembimbingan *squad* (Didil, Sucayy, Linda, Ayu, Silvy, Jihan, Rika), terima kasih atas semua bantuan dukungan dan kerjasamanya.
10. Sahabat rantau (Boru Panggoaran, Markoneng, Bujang Bayung, Supek Tebo, Boru Sasada, Pudan, Rini, Dede) dan keluarga besar Biologi 2020 yang selalu memberikan dukungan serta do'anya serta pemilik BA5504E yang telah menemani perjalanan akhir untuk mendapatkan gelar S.Si ini.

Semoga bantuan yang Bapak/Ibu serta rekan-rekan berikan, bernilai ibadah dan mendapatkan pahala dari Allah SWT. Penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi semua orang yang membacanya.

Padang, 21 Februari 2024

Penulis

## DAFTAR ISI

ABSTRAK .....	i
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Manfaat Penelitian .....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
B. Obat Anti Tuberkulosis (OAT).....	9
C. Mekanisme Resisten Terhadap INH .....	13
D. <i>Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)</i> .....	15
E. Desain Primer dengan Pendekatan Bioinformatika .....	17
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	19
A. Jenis Penelitian.....	19
B. Waktu dan Lokasi Penelitian .....	19
C. Alat dan Bahan Penelitian.....	19
D. Prosedur Penelitian.....	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	28
A. Hasil Penelitian .....	28
B. Pembahasan.....	36
PENUTUP.....	40
A. Kesimpulan .....	40
B. Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA .....	41
LAMPIRAN.....	45

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data Sekuens Untuk Mendesain Primer LAMP .....	22
2. Primer yang Akan Dirancang.....	22
3. Komposisi PCR.....	24
4. Siklus PCR.....	24
5. Komposisi Campuran Reaksi LAMP.....	25
6. Hasil Desain Primer LAMP .....	28
7. Konsentrasi dan Kemurniaan DNA Genom Hasil Isolasi.....	30
8. Perhitungan Optimasi Suhu Reaksi LAMP Gen Target <i>katG</i> dan <i>InhA</i> Menggunakan Aplikasi <i>ColorGrab</i> .....	32
9. Perhitungan optimasi waktu (menit) reaksi LAMP gen <i>katG</i> dan gen <i>inhA</i> menggunakan aplikasi <i>ColorGrab</i> .....	35

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>M. tuberculosis</i> .....	6
2. Alur Diagnosis TB (Kemenkes, 2022).....	9
3. Struktur Kimia INH (Imam <i>et al.</i> , 2015).....	12
4. Mekanisme Kerja Beberapa OAT.....	13
5. Mutasi pada Gen <i>katG</i> Penyebab Resistensi INH (Imam <i>et al.</i> , 2015). ....	14
6. Proses Deteksi Infeksi Menggunakan Metode LAMP (Soroka <i>et al.</i> , 2021).....	15
7. Primer yang diperlukan dalam reaksi LAMP (Soroka <i>et al.</i> , 2021).....	16
8. Hasil Uji Primer LAMP .....	29
9. Hasil Visualisasi Elektroforesis Primer .....	31
10. Visualisasi Optimasi Suhu Reaksi LAMP Gen <i>katG</i> dan Gen <i>inhA</i> .....	32
11. Visualisasi Optimasi Waktu (Menit) Reaksi LAMP Gen <i>katG</i> dan Gen <i>inhA</i> .....	34

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil <i>alignment</i> sekuen gen <i>katG</i> dan <i>inhA</i> .....	45
2. Hasil nanofotometer isolasi DNA genom <i>M. tuberculosis</i> .....	45

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi penyebab utama kematian di Indonesia. Berdasarkan data dari WHO (2021), estimasi jumlah orang terdiagnosis TB tahun 2021 secara global sebanyak 10,6 juta kasus atau naik sekitar 600.000 kasus dari tahun 2020. Dari 10,6 juta kasus tersebut, terdapat 6,4 juta (60,3%) orang yang dilaporkan menjalani pengobatan.

Obat Anti Tuberkulosis (OAT) merupakan jenis obat yang diberikan kepada pasien TB. Jenis OAT yang paling umum digunakan yaitu Rifampisin (RIF), Isoniazid (INH), Pirazinamid (Z), Ethambutol (E), dan Streptomisin (S). Kelompok OAT ini sering disebut sebagai OAT lini pertama. Secara farmakologis, pengobatan TB lini pertama dilakukan selama 6 bulan dan dibagi menjadi dua tahap. Tahap intensif berlangsung selama 4 bulan pertama, pasien mengkonsumsi seluruh jenis OAT lini pertama (RIF/INH/Z/E/S). Sementara tahap lanjutan berlangsung selama 2 bulan, pasien hanya mengkonsumsi 2 jenis OAT (RIF dan INH) (Fortuna *et al.*, 2022).

Salah satu masalah dalam pengobatan TB adalah munculnya bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (bakteri penyebab TB) yang resisten terhadap OAT. *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap satu jenis OAT disebut dengan resisten tunggal, sedangkan resisten bakteri terhadap lebih dari satu OAT dikenal dengan istilah *Multi-Drugs Resistance* (MDR) (WHO, 2021). Kombinasi INH dan RIF merupakan OAT utama pada pengobatan awal infeksi *M.*

*tuberculosis*, maka MDR didefinisikan sebagai bakteri *M. tuberculosis* yang resisten minimal terhadap RIF dan INH (Aristiana & Wartono, 2018).

*World Health Organization* (2021) menetapkan resisten RIF sebagai indikator terjadinya MDR. Hal ini disebabkan oleh 95% resisten RIF selalu diiringi resisten OAT lainnya. Menurut Johnson *et al.* (2006) kemungkinan terjadinya resisten tunggal bakteri terhadap RIF jarang dibandingkan dengan INH.

Resisten RIF umum ditemukan pada MDR, namun penelitian lain oleh Jhun & Koh (2020) mencatat bahwa ditemukan 7,1% resisten tunggal terhadap INH pada kasus TB baru tanpa adanya resisten terhadap RIF. Resistensi terhadap INH mengurangi kemungkinan kesuksesan pengobatan dan meningkatkan risiko berkembangnya resisten terhadap obat-obatan lini pertama lainnya.

Mekanisme resisten INH yang paling umum terjadi adalah karena mutasi pada gen *katG*, khususnya pada kodon 315 (95%). Mutasi pada gen *katG* mengakibatkan perubahan asam amino dari Serine (AGC) menjadi Threonine (ACC). Selain mutasi pada gen *katG*, resisten terhadap INH juga dapat disebabkan oleh mutasi pada region promotor *inhA* posisi-15 yang mengakibatkan perubahan basa Sitosin menjadi Timin (C→T) dan mutasi pada kodon 94 (Serine → Alanin) (Klein *et al.*, 2016).

Banyak metode deteksi MDR sudah dikembangkan berbasis deteksi mutasi pada gen *rpoB* penyebab resisten RIF. Salah satu deteksi MDR yang banyak digunakan adalah *Gene-Xpert* (*catridge based nucleic acid amplification test*) (Prakash *et al.*, 2017). Beberapa teknik molekular lainnya yang biasa digunakan untuk mendeteksi mutasi ini yaitu sekuensing, hibridisasi dan PCR. Penggunaan teknik molekular ini masih menggunakan alat khusus dengan biaya deteksi yang

relatif mahal. Untuk mengatasi masalah resistensi *M. tuberculosis*, WHO (2016) merekomendasikan metode diagnostik yang tidak memerlukan peralatan canggih dan dapat dilakukan secara cepat. Salah satu metode yang banyak dikembangkan saat ini adalah *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP).

Metode deteksi LAMP adalah metode yang akan mengamplifikasi DNA dengan spesifisitas, efisiensi, dan kecepatan tinggi dalam kondisi isothermal. Teknik ini hemat biaya karena dilakukan pada suhu konstan dan tidak memerlukan alat *thermal cycler* atau peralatan mahal lainnya.

*Loop-Mediated Isothermal Amplification* hanya memerlukan waktu yang lebih singkat jika dibandingkan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Reaksi PCR umumnya memerlukan waktu 2-3 jam, sedangkan reaksi LAMP hanya memerlukan waktu kurang dari 1 jam, bahkan reaksi positif dapat terlihat setelah 30-40 menit inkubasi (Soliman & El-Matbouli, 2006). Sepuluh tahun terakhir, LAMP telah berkembang menjadi alternatif untuk PCR konvensional. Metode LAMP unggul secara kecepatan, sensitivitas, spesifisitas serta efisiensi biaya jika dibandingkan dengan PCR konvensional (Moore *et al.*, 2021).

Penelitian Sumual *et al.* (2017) telah mengembangkan deteksi LAMP untuk mendeteksi *M. tuberculosis* pada sampel sputum. Belum diketahui penelitian yang mengembangkan deteksi LAMP untuk mutasi gen *katG* dan *inhA* penyebab resisten terhadap INH (Moore *et al.*, 2021). Secara umum, reaksi LAMP pada setiap gen membutuhkan enam primer, terdiri dari dua primer dalam (FIP dan BIP), dua primer luar (F3 dan B3) dan dua primer *loop* (LF dan LB). Semua primer dirancang untuk mendeteksi daerah unik pada DNA target (Moore *et al.*,

2021). Deteksi mutasi gen *katG* dan *inhA* berbasis LAMP membutuhkan primer spesifik. Belum ditemukan penelitian yang sudah merancang primer untuk hal ini.

Berdasarkan masalah yang sudah diuraikan, dilakukan penelitian dengan judul “Desain Diagnostik Cepat *Mycobacterium tuberculosis* yang Resistan terhadap Isoniazid Berbasis *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP)”.

### **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang masalah, maka dapat dirumuskan permasalahan pada penelitian ini:

1. Bagaimana desain primer untuk mendeteksi mutasi pada gen *katG* dan *inhA* *M. tuberculosis* penyebab resisten terhadap INH dengan metode LAMP?
2. Bagaimana spesifisitas primer yang didesain untuk mendeteksi mutasi pada gen *katG* dan *inhA* *M. tuberculosis* penyebab resisten terhadap INH dengan metode LAMP secara *in silico*?
3. Bagaimana kondisi optimum reaksi LAMP untuk mendeteksi mutasi pada gen *katG* dan *inhA* *M. tuberculosis* penyebab resisten terhadap INH?

### **C. Tujuan Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah, maka penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mendesain primer untuk mendeteksi mutasi pada gen *katG* dan *inhA* *M. tuberculosis* penyebab resisten terhadap INH dengan metode LAMP.
2. Menguji spesifisitas primer yang didesain untuk mendeteksi mutasi pada gen *katG* dan *inhA* *M. tuberculosis* penyebab resisten terhadap INH dengan metode LAMP secara *in silico*.
3. Mengoptimasi kondisi reaksi LAMP untuk mendeteksi mutasi pada gen *katG* dan *inhA* *M. tuberculosis* penyebab resisten terhadap INH.

**D. Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi primer yang dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi pada gen *katG* dan *inhA* *M. tuberculosis* penyebab resisten terhadap INH dengan metode LAMP.
2. Memberikan informasi suhu dan waktu optimum untuk mendeteksi mutasi pada gen *katG* dan *inhA* *M. tuberculosis* penyebab resisten terhadap INH dengan metode LAMP.