

Identifikasi Mutasi Gen *rpoB* Pada Daerah Hulu RRDR *Mycobacterium Tuberculosis* Multidrug Resistent Isolat P10 (Pratiwi, M. A., Ratnayani, K., Yowani, S.C.)

Identifikasi Mutasi Gen *rpoB* Pada Daerah Hulu RRDR *Mycobacterium Tuberculosis* Multidrug Resistent Isolat P10

Pratiwi, M. A.¹⁾, Ratnayani, K.^{2,3)}, Yowani, S.C.^{1,3)}

¹⁾ Jurusan Farmasi-Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Universitas Udayana

²⁾ Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Universitas Udayana

³⁾ Kelompok Studi MDR & XDR-TB-Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Universitas Udayana

Korespondensi: Pratiwi, M. A.

Jurusan Farmasi-Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Universitas Udayana

Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 0361-703837

Email: amaliapратиwi12@yahoo.com

ABSTRAK

Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) merupakan tuberculosis yang disebabkan oleh strain *M.tuberculosis* yang resistan sekurang-kurangnya terhadap obat antituberculosis lini pertama yaitu rifampisin dan isoniazid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mutasi dan perubahan asam amino pada isolat MDR-TB P10 fragmen daerah hulu RRDR (*Rifampisin Resistance Determining Region*) (125-421) Gen *rpoB*. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan metode *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (*Multiplex PCR*) dengan menggunakan sepasang primer FrL2 5'CTAAGCTGC GCGAACCACTTGA3' dan RevL2 5'TGATGAACTCGGCGGTGAC GAA3'. Produk PCR, disekuensing untuk mendapatkan urutan nukleotida. Analisis mutasi dilakukan dengan menggunakan program MEGA4.

Dari penelitian yang dilakukan didapatkan bahwa metode *multiplex PCR* telah berhasil mengamplifikasi fragmen target yang berukuran 0,3kb dan 0,5kb. Proses sekuensing yang dilakukan menghasilkan pembacaan nukleotida sebanyak 254 basa. Analisis mutasi nukleotida menunjukkan bahwa ternyata pada isolat P10 tidak terdapat mutasi pada daerah hulu RRDR.

Kata kunci: MDR-TB; Gen *rpoB*; multiplex PCR; Isolat P10

1. PENDAHULUAN

Mycobacterium tuberculosis merupakan salah satu basil yang dapat menyebabkan penyakit menular yang disebut tuberculosis (TB). Berdasarkan data WHO pada tahun 2012 diperkirakan terdapat 8.800.000 kasus TB. Sebagian besar kasus ini terjadi di Asia (59%) dan Afrika (26%), sisanya terdapat di Mediterania Timur (7%), Eropa (5%), serta Amerika (3%). Lima negara dengan kasus TB terbesar, yaitu India (2.000.000-2.500.000), Cina (900.000-1.200.000), Afrika Selatan (400.000-590.000), Indonesia (370.000-540.000), dan Pakistan terdapat 330.000-480.000 kasus TB (WHO, 2012).

Program pemberantasan tuberculosis menjadi kompleks akibat munculnya resistensi terhadap obat anti tuberculosis (OAT), terutama dengan adanya kejadian *Multi-drug Resistent TB* (MDR-TB). Banyak ditemukan galur *M. tuberculosis* resisten terhadap dua atau lebih OAT (Obat Anti Tuberculosis) yang dikenal sebagai galur *Multi-Drug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) (Retnoningrum, 2004). Sebagian besar isolat *M. tuberculosis* yang resisten terhadap rifampisin mengalami mutasi *missense*, insersi, dan delesi pada *81 pb core region* gen *rpoB* kodon 507-533 yang mengkode 27 asam amino dan disebut sebagai RRDR (*Rifampisin Resistance Determining Region*) (Ramaswamy, 1998).

Identifikasi Mutasi Gen *rpoB* Pada Daerah Hulu RRDR *Mycobacterium Tuberculosis* Multidrug Resistent Isolat P10 (Pratiwi, M. A., Ratnayani, K., Yowani, S.C.)

Pengembangan berbagai metode berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah dirancang untuk mempercepat deteksi mutasi terkait masalah resistensi terhadap agen antimikroba. Metode PCR yang dilanjutkan dengan sekuensing DNA merupakan metode yang sensitif dan spesifik dalam mendeteksi mutasi gen *rpoB* pada isolat MDR-TB (Heep, et. al, 2001).

Identifikasi *M. tuberculosis* dan analisis mutasi gen *rpoB* penyebab resistensi ganda dengan menggunakan metode PCR telah dilakukan pada beberapa sampel klinis di Indonesia. Mutasi pada kodon 531 telah terbukti menyebabkan resistensi terhadap rifampisin pada isolat yang diteliti (Syarifudin, 2007). Beberapa penelitian yang dilakukan di berbagai negara, di antaranya di India ditemukan mutasi pada kodon 511, 513, 518, 519, 528, 529. Mutasi di luar RRDR yaitu pada kodon 145,170 dan 173 (Lingala, et. al, 2010). Berdasarkan data diatas maka dilakukan penelitian lebih lanjut pada daerah hulu RRDR (125-421) gen *rpoB M.tuberculosis*.

Hasil amplifikasi PCR selanjutnya disekuensing dan sekuen nukleotida dibandingkan dengan gen *rpoB M. tuberculosis* yang terdapat pada database URL://www.ncbi.nlm.nih.gov.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan dan Peralatan

Sepasang primer FrL2 5' CTA AGC TGC GCG AAC CAC TTGA 3' dan RevL2 5' TGA TGA ACT CGG CGG TGA CGAA 3'. Isolat P10, PCR mix (Promega), agarosa (Promega), *Ethidium Bromida* (Promega). Mesin PCR (Veriti® *Thermal Cycler*), horizontal elektroforesis (Power Pac Basic™, USA), Gel Doc (Bio-Rad).

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 Isolasi DNA dari isolat *M. tuberculosis multi-drug resistant*

Tahap isolasi DNA sampel (isolat P10 MDR-TB hasil subkultur) dilakukan dengan menggunakan metode Boom yang dimodifikasi (Boom, et. al, 1989).

2.2.2 Amplifikasi fragmen 0,3kb dan 0,5 kb gen *rpoB* MDR-TB dengan metode multiplex PCR

Amplifikasi fragmen 0,3 dan 0,5kb MDR-TB dilakukan dengan menggunakan metode *multiplex* PCR dengan menggunakan sepasang primer oligonukleotida yang terdiri dari primer FrL2 5'CTAAGCTGCGCGAACCACCTTGA3' dan RevL2 5'TGATGAACTCGGCGGTGACGAA3'. Proses PCR dilakukan pada kondisi sebagai berikut: predenaturasi pada suhu 95°C selama 15 menit, siklus PCR 45 kali yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 58°C selama 2 menit, elongasi pada suhu 72°C selama 1,5 menit, serta elongasi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

2.2.3 Deteksi produk PCR

Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% b/v. Sampel dimasukkan sebanyak 3 µL kedalam sumur gel agarosa 1,5%. Marker yang digunakan adalah 100 pb DNA ladder. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan *running buffer* TBE (Tris-Boric Acid-EDTA) 1x pada tegangan 65 volt selama 35 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi pada alat UV Transiluminator (Gel Doc).

2.2.4 Sekuensing produk PCR

Proses sekuensing dilakukan oleh PT. Diastika Genetika Jakarta dengan menggunakan primer FrL2.

Identifikasi Mutasi Gen *rpoB* Pada Daerah Hulu RRDR *Mycobacterium Tuberculosis* Multidrug Resistent Isolat P10 (Pratiwi, M. A., Ratnayani, K., Yowani, S.C.)

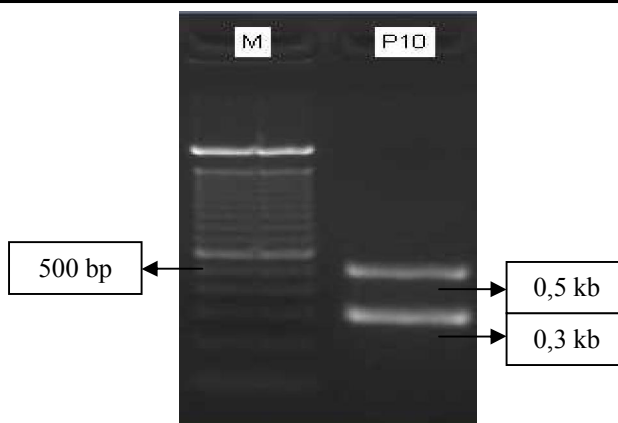
2.2.5 Analisis data penelitian

Analisis homologi sekuens dilakukan dengan menggunakan program BLASTN secara *on-line*. Analisis mutasi dilakukan dengan menggunakan program MEGA4.

3. HASIL

3.1 Amplifikasi Fragmen 0,3kb dan 0,5 kb Gen *rpoB* MDR-TB dengan Metode *Multiplex* PCR

Berdasarkan hasil multiplex PCR yang dideteksi dengan elektroforesis diperoleh pita pada isolat P10 yang menunjukkan bahwa primer yang digunakan berhasil mengamplifikasi sekuens DNA templat yang diinginkan.



Gambar 1 Elektrogram hasil multiplex PCR

3.2 Analisis Hasil Penelitian

Berdasarkan analisis homologi dengan menggunakan program BLASTN ditunjukkan pada tabel 1. Hasil analisis BLASTN akan memberikan informasi mengenai spesies yang memiliki kesamaan dengan sekuens DNA sampel sehingga dapat digunakan untuk identifikasi.

Tabel 1. Hasil Analisis Homologi Isolat P10

Deskripsi	Query cover	E value	Ident
<i>Mycobacterium tuberculosis str. Beijing/NITR203, complete genome</i>	93%	0,0	99%
<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome</i>	93%	0,0	99%
<i>Mycobacterium tuberculosis CCDC5180, complete genome</i>	93%	0,0	99%
<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv RNA-polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds</i>	93%	0,0	99%

Keterangan:

Query cover :Persentase sekuens nukleotida fragmen gen *rpoB* isolat yang diuji (P10) yang sesuai dengan sekuens nukleotida subjek.

E value :Jumlah sekuens subjek lain yang diperkirakan akan sesuai dengan sekuens nukleotida fragmen gen *rpoB* isolat yang diuji.

Ident :Persentase tingkat kesamaan antara sekuens nukleotida fragmen gen *rpoB* isolat yang diuji dengan sekuens nukleotida subjek sepanjang daerah cakupan (*query coverage*).

Identifikasi Mutasi Gen *rpoB* Pada Daerah Hulu RRDR *Mycobacterium Tuberculosis* Multidrug Resistent Isolat P10 (Pratiwi, M. A., Ratnayani, K., Yowani, S.C.)

4. PEMBAHASAN

4.1 Amplifikasi fragmen 0,3kb dan 0,5 kb gen *rpoB* MDR-TB dengan metode multiplex PCR

Produk hasil multiplex PCR yang dideteksi dengan elektroforesis agarosa dan divisualisasi dengan Photo Illumerase. Pita yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar 1. kedua pita yang tampak menunjukkan ukuran yang sesuai dengan target yang diinginkan yaitu 0,3kb dan 0,5kb.

4.2 Analisis Hasil Penelitian

Hasil sekuensing gen *rpoB* isolat P10 fragmen 0,3kb yang dilakukan menghasilkan pembacaan nukleotida sebanyak 254 basa, selanjutnya dilakukan analisis homologi dengan menggunakan program BLASTN. Hasil analisis homologi isolat P10 dapat dilihat pada tabel 1.

Berdasarkan hasil analisis pada Tabel 3.1 menunjukkan bahwa sekuen nukleotida memiliki sekuen yang identik dengan sekuen *M. tuberculosis* str. Beijing, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* CCDC dan *M. tuberculosis* RNA polymerase yang ditunjukkan dengan presentase identik 99%. Analisis mutasi dilakukan dengan menggunakan program MEGA4. Dari hasil analisis didapatkan bahwa pada isolat P10 tidak terdapat mutasi nukleotida dan perubahan asam amino.

Pada beberapa penelitian serupa di beberapa Negara menyebutkan bahwa terdapat mutasi di daerah hulu RRDR adalah pada kodon 176 (Lingala, et. al, 2010; Tan, et. al, 2012; tamura, et. al, 2007). Mutasi di daerah RRDR dan hulu dari RRDR menunjukkan terjadinya *low level resistency*. Sedangkan, mutasi yang ditemukan hanya pada daerah RRDR saja menunjukkan terjadinya *high level resistency*.

5. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan serta analisis pustaka, dapat disimpulkan bahwa pada isolat P10 tidak ditemukan mutasi pada daerah hulu RRDR MDR-TB. Sehingga isolat tersebut dapat dikatakan sebagai isolat yang *high level resistency*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Kepala Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah yang telah menyediakan isolat MDR-TB, dan kepada seluruh staf Laboratorium Biomolekuler Fak. Kedokteran Universitas Udayana yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Boom, R *et al.* Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1989, Vol 28 No.3 hal: 495-503. Depkes RI. 2012. *Penanggulangan TB Alami Kemajuan*. (Cited 2014 Januari,18). Available from:
URL:<http://www.bppsdmk.depkes.go.id>
- WHO. 2012. *WHO Report: Global Tuberculosis Control 2011*. Available from : http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564380_eng.pdf. Accessed on November 8th, 2013.
- Lingala, M. A. L., A. Srikantam, S. Jain, K. V. S. M. Rao dan P. V. Ranganadha Rao. 2010. Clinical and Geographical Profiles of *rpoB* Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Hyderabad and Koraput in India *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 2(2): 13-18.

Identifikasi Mutasi Gen *rpoB* Pada Daerah Hulu RRDR *Mycobacterium Tuberculosis* Multidrug Resistent Isolat P10 (Pratiwi, M. A., Ratnayani, K., Yowani, S.C.)

Syaifudin, M., Rosilawati, M.L., Irawan, H., dan Bela, B. *Identifikasi Mycobacterium*

Tuberculosis dan Analisis Mutasi Gen rpoB dan kat-G Penyebab Resistensi Ganda dengan Teknik Molekuler. Laporan Penelitian. Balitbang BATAN, 2007.

Retnoningrum, D.S., dan Roga F.K. Mekanisme Tingkat Molekul Resistensi Terhadap Beberapa Obat pada *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. 2004, 29(1): 92-95.

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.

Heep, M., B. Brandstätter, U. Rieger, N. Lehn, E. Richter, S. Rüscher-Gerdes dan S.

Niemann. 2001. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampicin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 39(1):107.

Tan, Y., Zuqiong H., Yanlin Z., Xinghan C., Chunming L., Calrong Z., and Xin Liu. 2012. The Beginning of the *rpoB* Gene in Addition to the Rifampicin Resistance Determination Region Might Be Needed for Identifying Rifampicin/Rifabutin Cross-Resistance in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Southern China. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 50 No. 1 pp:81-85.

Tamura, K., Dudley J., Nei M., and Kumar S., 2007, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, *Molecular Biology and Evolution*, 24, p. 1596-1599.