

**DESAIN *IN SILICO* DNA PROBE PENDETEKSI MUTASI DAERAH RESISTENSI
QUINOLON Gen *gyrA* DAN *gyrB* *Mycobacterium tuberculosis***

**IN SILICO DNA PROBE DESIGN FOR MUTATION DETECTION OF QUINOLON
RESISTANCE AREA *gyrA* AND *gyrB* GENE *Mycobacterium tuberculosis***

Tasya Pramiswari, Jennifer Tamara, Ni Made Febrianti, Sagung Chandra Yowani
Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas
Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia, 80361
Email: tasyapramiswari13@gmail.com

ABSTRAK

Fluorokuinolon (FQ) merupakan obat utama yang digunakan pada terapi MDR-TB sehingga resistensi terhadap FQ dapat menyebabkan kematian dan resiko kegagalan terapi pada pasien MDR-TB. Mutasi pada gen *gyrA* dan gen *gyrB* dari *Mycobacterium tuberculosis* bertanggung jawab terhadap terjadinya resistensi FQ. Mutasi region QRDR pada gen *gyrA* paling tinggi ditemukan pada kodon 94, sedangkan region QRDR pada gen *gyrB* ditemukan pada kodon 500. Penyakit *M. tuberculosis* yang resisten terhadap FQ dapat dideteksi menggunakan metode *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dengan DNA probe. Penelitian ini akan mendesain urutan nukleotida probe berjenis *TaqMan* menggunakan program *Clone Manager Suite 9.2*. Hasil rancangan DNA probe kemudian dianalisis 2 tahap yaitu berdasarkan kriteria probe secara umum dan berdasarkan kriteria pelabelan *TaqMan probe*. Rancangan DNA probe mutan menggunakan program menghasilkan 1 probe untuk mutasi spesifik Asp94Ala pada gen *gyrA* dan 33 probe untuk mutasi spesifik Asp500Ala pada gen *gyrB*. Setelah dianalisis dengan kedua kriteria, didapat probe A94MA1 dengan urutan 5'-TCGATCTACGCCAGCCTGGT-3' dan probe B500MA12 dengan urutan 5'-TACCACAAGCTCGTGCTGATGGC-3'. Hasil probe tersebut memenuhi kedua kriteria dan dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi pada kodon 94 gen *gyrA* dan kodon 500 gen *gyrB* *Mycobacterium tuberculosis*.

Kata kunci: MDR-TB, gen *gyrA*, gen *gyrB*, *TaqMan probe*, *Real-Time PCR*

ABSTRACT

Fluoroquinolone (FQ) is the main drug used in MDR-TB therapy resistance to FQ can cause death and increase the risk of treatment failure in MDR-TB patients. Mutations in *gyrA* gene and *gyrB* gene from *Mycobacterium tuberculosis* are responsible for the occurrence of FQ resistance. The highest mutation of *gyrA* gene in QRDR was found in codon 94, while mutations in *gyrB* gene was found in codon 500. *M. Tuberculosis* which resistant to FQ can be detected using the *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) method with DNA probe. This study will design the nucleotide sequence of the *TaqMan* type probe using the *Clone Manager Suite 9.2* program. The results of the DNA probe design were then analyzed in two stages, which is based on the probe criteria in general and based on the *TaqMan* probe labeling criteria. The design of the mutant probe DNA using the program produced 1 probe for Asp94Ala specific mutations in the *gyrA* gene and 33 probes for Asp500Ala specific mutations in the *gyrB* gene. After being analyzed by the two criteria, it was obtained the A94MA1 probe with the 5'-TCGATCTACGCCAGCCTGGT-3' sequence and B500MA12 probe with the order of 5'-TACCACAAGCTCGTGCTGATGGC-3'. The results of these probes meet both criteria and can be used to detect mutations in codon 94 *gyrA* genes and codons 500 *gyrB* genes of *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: MDR-TB, *gyrA* gene, *in silico*, *TaqMan probe*, *Real-Time PCR*

PENDAHULUAN

XDR-TB (*Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*) didefinisikan sebagai TB resisten Isoniazid (INH) dan Rifampisin (RIF) (MDR-TB) serta setidaknya resisten terhadap salah satu dari dua golongan obat antituberkulosis (OAT) lini kedua yang penting dalam pengobatan MDR-TB yaitu fluorokuinolon (FQ) dan OAT lini kedua dalam bentuk injeksi yaitu kapreomisin, kanamisin, atau amikasin. Pada 2017, terdapat 558.000 kasus MDR-TB ditingkat global dengan prevalensi terbanyak pada negara China, India dan Russia. Dari 127 negara anggota WHO, 113 negara menyatakan terjadi peningkatan penderita MDR-TB menjadi XDR-TB sebanyak 8,5% (WHO, 2018).

Pasien MDR-TB memerlukan waktu terapi sekitar 18-24 bulan (Nugrahaeni dan Malik, 2015). FQ adalah obat lini kedua utama dari pengobatan MDR-TB sehingga adanya resistensi terhadap FQ merupakan salah satu penanda dari kondisi XDR-TB yang dapat menyebabkan kematian dan meningkatkan risiko kegagalan pada pasien MDR-TB (Kaswa et al., 2014). FQ bekerja dengan menghambat DNA *gyrase* bakteri *M. tuberculosis* (Rinanda, 2015).

DNA *gyrase* dikode oleh dua subunit yaitu gen *gyrA* dan gen *gyrB*. Mutasi pada kedua gen dapat menyebabkan terjadinya resistensi FQ. *Quinolone Resistance Determining Region* (QRDR) adalah daerah penentu terjadinya resistensi FQ pada gen *gyr* (Zhang et al., 2014). QRDR gen *gyrA* berada pada daerah kodon 67 hingga 106 (Matrat et al., 2008) sedangkan gen *gyrB* memiliki QRDR yang terletak pada daerah kodon 500 hingga 540 (Disratthakit et al., 2016).

Mutasi paling tinggi ditemukan pada QRDR gen *gyrA* *M. tuberculosis* kodon 94 sebanyak 32,6%. Mutasi pada kodon 94 dapat menyebabkan perubahan asam amino yang bervariasi yaitu Asp94His, Asp94Tyr, A94Asn, Asp94Ala, Asp94Gly, dan Asp94Cys (Zhang et al., 2014). Mutasi pada QRDR gen *gyrB* *M. tuberculosis* paling sering terjadi pada kodon 500 dan 538 (Disratthakit et al., 2016). Mutasi gen *gyrB* pada kodon 500 dapat menyebabkan perubahan asam amino yang bervariasi yaitu Asp500Asn dan Asp500Ala. Salah satu cara mengetahui resistensi pada MDR-TB dapat dilakukan dengan pendeteksian cepat agar dapat memberikan terapi yang tepat. Deteksi *M. tuberculosis* yang resisten terhadap FQ dapat dilakukan menggunakan metode *real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR) dengan DNA *probe* mutan. Salah satu sistem deteksi DNA *probe* mutan yang dapat digunakan untuk RT-PCR adalah *TaqMan probe* (Navarro et al., 2015). Deteksi mutasi dan skiring subtype spesifik dari mikroba patogen dapat juga menggunakan *TaqMan probe*. *TaqMan probe* merupakan oligonukleotida yang memiliki pewarna *reporter* fluoresen pada ujung 5' dan pewarna *quencher* pada ujung 3'.

Desain DNA *probe* mutan dibuat menggunakan *software Clone Manager Suite 9.2*. Perancangan dengan *software* dapat mengoptimalkan hasil desain dibandingkan perancangan manual, memaksimalkan probabilitas keberhasilan hibridisasi DNA *probe* dengan urutan DNA target serta mampu meminimalkan waktu yang diperlukan (Yilmaz et al., 2011).

Desain DNA *probe* mutan yang dihasilkan digunakan untuk mendeteksi mutasi pada kodon 94 gen *gyrA* dan kodon

500 gen *gyrB*. *Tuberculosis* sehingga dapat menentukan rejimen obat yang sesuai. Mutasi pada kedua gen ini menunjukkan adanya resistensi terhadap FQ, yang merupakan salah satu obat dalam rejimen lini kedua OAT bagi penderita MDR-TB. DNA *probe* mutan dapat mendeteksi adanya mutasi lebih awal sehingga penggunaan FQ pada pasien dapat dihentikan dan digantikan dengan obat lini ketiga.

MATERI DAN METODE

Alat yang diperlukan seperti laptop (*Windows 10 32 bit*), modem dan program *Clone Manager Suite 9.2* untuk perancangan serta analisis DNA *probe*. Bahan yang digunakan yaitu urutan nukleotida gen *gyrA* dan *gyrB* *M. tuberculosis* H37Rv (*wild-type*) (*Accession No.* NC_000962) yang diperoleh dari *database* www.ncbi.nlm.nih.gov dan sepasang *primer*. *Primer* digunakan untuk menganalisis hasil rancangan *probe* yang mana terdiri dari *primer forward* serta *reverse*.

Primer gen *gyrA* terdiri dari *primer forward* (gen-*gyrA-F*) dengan urutan 5'-GCAGCTACATCGACTATGC-3' dan *primer reverse* (gen-*gyrA-R*) dengan urutan 5'-GGCTTCGGTGTACCTCATC-3' sedangkan *primer* gen *gyrB* terdiri dari *primer forward* (gen-*gyrB-F*) dengan urutan 5' GAGAGTTGGTGCGGCGTAA 3' dan *primer reverse* (gen-*gyrB-R*) dengan urutan 5' GCGGTCCGAGTATGCGAAT-3'.

Penentuan urutan nukleotida target

Urutan DNA *probe* mutan terpilih yaitu kodon 94 *gyrA* dan 500 *gyrB* gen *M. tuberculosis*. Hal ini didasarkan pada

prevalensi mutasi tertinggi yang terjadi pada gen *gyrA* dan gen *gyrB*. DNA *probe* mutan dirancang di dalam daerah amplifikasi pada posisi nukleotida no 77-396 untuk gen *gyrA* dan posisi nukleotida no. 1271-1755 untuk gen *gyrB*. Daerah amplifikasi dibatasi oleh sepasang *primer* untuk masing-masing gen.

Analisis primer

Primer yang digunakan diperoleh dari studi pustaka pada penelitian Sasmitha (2017) dan Dewi (2018). *Primer* gen *gyrA* terdiri dari *primer forward* (gen-*gyrA-F*) dengan urutan 5'-GCAGCTACATCGACTATGC-3' dan *primer reverse* (gen-*gyrA-R*) dengan urutan 5'-GGCTTCGGTGTACCTCATC-3' sedangkan *primer* gen *gyrB* terdiri dari *primer forward* (gen-*gyrB-F*) dengan urutan 5' GAGAGTTGGTGCGGCGTAA 3' dan *primer reverse* (gen-*gyrB-R*) dengan urutan 5' GCGGTCCGAGTATGCGAAT 3'.

Perancangan DNA probe

Perancangan DNA *probe* mutan dilakukan secara *in silico* menggunakan *software Clone Manager Suite 9.2*. Urutan nukleotida gen *gyrA* dan *gyrB* diinput ke dalam *software* untuk diolah sehingga didapatkan hasil berupa urutan nukleotida *probe* mutan. Pada tahap ini dihasilkan beberapa rancangan urutan nukleotida DNA *probe* mutan.

Analisis hasil perancangan DNA probe

Hasil rancangan DNA *probe* yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *software Clone Manager Suite 9.2* sesuai dengan kriteria DNA *probe* mutan secara umum dan kriteria pelabelan *TaqMan probe*. Kriteria pelabelan *TaqMan probe* meliputi tidak terdapat basa G pada

ujung 5', dan mengandung basa C lebih banyak daripada basa G (McPherson and Moller, 2006).

HASIL

Hasil DNA *probe* mutan dianalisis sesuai dengan kriteria *probe* secara umum dan kriteria pelabelan *TaqMan probe*. Hasil analisis *probe* berdasarkan kriteria secara umum menghasilkan 1 buah DNA *probe* mutan *gyrA* sedangkan terdapat 33 buah DNA *probe* mutan *gyrB*. Hasil dapat dilihat pada Tabel 1. Setelah itu dilakukan analisis kembali sesuai kriteria pelabelan *TaqMan probe* dan didapat DNA *probe* yang sesuai kriteria yaitu *probe* A94AM1 dengan urutan 5'-CGATCTACGCCAGCCTGGT-3' untuk mendeteksi mutasi pada kodon 94 gen *gyrA* dan *probe* B500MA12 dengan urutan 5'TACCACAAGCTCGTGCTGATGGC-3' untuk mendeteksi mutasi pada kodon 500 gen *gyrB*.

PEMBAHASAN

DNA *probe* mutan dirancang pada kodon 94 *gyrA* dan kodon 500 *gyrB* *M. tuberculosis*. Primer yang digunakan diperoleh dari studi pustaka. Perancangan DNA *probe* mutan dilakukan dengan menggunakan urutan nukleotida *wild-type* dari gen *gyrA* dan *gyrB* *M. tuberculosis* H37Rv Accession No. NC_000962 dari database www.ncbi.nlm.nih.gov.

Probe adalah urutan nukleotida yang memiliki afinitas kuat dengan target spesifik sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi adanya mutasi. Desain *probe* berjenis *TaqMan* memiliki spesifisitas yang tinggi, kemampuan untuk reaksi *multiple* tetapi memerlukan biaya yang tinggi (Anonim, 2006). Perancangan DNA *probe* mutan menggunakan *software Clone Manager Suite 9.2*.

Analisa DNA *probe* mutan dilakukan melalui dua tahap yaitu analisis sesuai dengan kriteria *probe* secara umum dan pelabelan *TaqMan Probe*. Analisa tahap awal dilakukan berdasarkan kriteria DNA *probe* secara umum. Kriteria umum dapat dilihat pada Tabel 1.

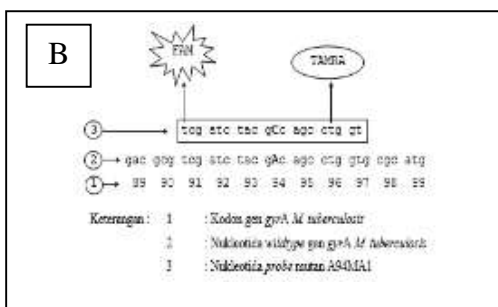
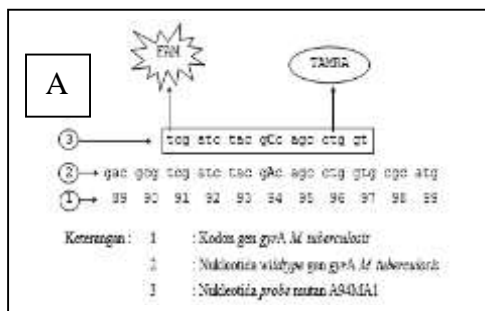
Tabel 1. Kriteria *Probe* Umum

Kriteria	Keterangan
Panjang	18-30 basa
%GC	40-60%
T _m	5-10°C ≥ T _m primer (optimal 70°C)
Dimer	Tidak ada
Runs	≤ 4
Repeats	≤ 4
Hairpin	Tidak ada

Tabel 1. memperlihatkan hasil analisis kriteria *probe* secara umum yang mana semua memenuhi kriteria DNA *probe* secara umum. Setelah itu dilakukan analisis sesuai kriteria *TaqMan probe*. *TaqMan probe* merupakan *probe* yang memiliki pewarna *reporter* fluoresen yang melekat pada ujung 5' dan pewarna *quencher* pada ujung 3'.

Kriteria pertama dari pelabelan *TaqMan probe* yaitu tidak boleh ada basa G pada posisi nukleotida pertama dan kedua dari ujung 5' (Rychlik, 2010). Kriteria kedua yaitu DNA *probe* mengandung jumlah basa C lebih banyak atau sama dengan basa G (McPherson and Moller, 2006). DNA *probe* mutanyang memenuhi kedua kriteria yaitu *probe* A94MA1, B500MA4, B500MA7, B500MA12, B500MA13, B500MA14, B500MA15, B500MA16, B500MA18, B500MA24, B500MA25, B500MA26, B500MA27, B500M32 dan *probe* B500MA33. *Probe* dapat ditempelkan label

yang terdiri dari *reporter* dan *quencher*. Label yang biasanya digunakan untuk *TaqMan probe* adalah FAM sebagai *reporter* dan TAMRA sebagai *quencher* (Behlke *et al.*, 2005; Didenko, 2006). Kedua label *reporter* dan *quencher* ditempelkan pada ujung berlawanan pada urutan nukleotida *probe* mutan (Livak *et al.*, 1995). Pelabelan pewarna direkomendasikan agar dilekatkan pada basa C atau T, tetapi umumnya dilekatkan pada basa T (Bishop *et al.*, 2015). Dari ke-14 DNA *probe* pada gen *gyrB* yang memenuhi kriteria pelabelan *TaqMan*, dipilih salah satu DNA *probe* mutan yaitu B500MA12 karena memiliki posisi mutasi ada ditengah urutan *probe*.



Gambar 1. Pelabelan desain DNA *probe* (A) DNA Probe A94MA1 dan (B) DNA Probe B500MA12 spesifik terhadap perubahan A → C pada kodon 94 dan 500.

Berdasarkan desain yang telah dilakukan, dihasilkan DNA *probe* mutan pada *gyrA* yaitu 5'-TCGATCTACGCCAGCCTGGT-3' yang dapat mendeteksi mutasi pada

kodon ke-94 dengan perubahan nukleotida GAC menjadi GCT sedangkan desain yang dilakukan pada gen *gyrB* menghasilkan urutan 5'-TACCACAAGCTCGTGCTGATGGC-3' dapat mendeteksi adanya mutasi nukleotida ke-500 dengan perubahan nukleotida GAT menjadi GCT.

KESIMPULAN

Rancangan DNA *probe* mutan menggunakan *software* menghasilkan 1 *probe* untuk mutasi spesifik Asp94Ala pada gen *gyrA* dan 33 *probe* untuk mutasi spesifik Asp500Ala pada gen *gyrB*. Setelah dianalisis dengan kedua kriteria, didapat *probe* A94MA1 dengan urutan 5'-TCGATCTACGCCAGCCTGGT-3' dan *probe* B500MA12 dengan urutan 5'-TACCACAAGCTCGTGCTGATGGC-3'. Hasil *probe* tersebut memenuhi kedua kriteria dan dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi pada kodon 94 gen *gyrA* dan kodon 500 gen *gyrB* *Mycobacterium tuberculosis*.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim a. 2006. Real-Time PCR Applications Guide. *Bulletin* 5279.USA: Bio-Rad Laboratories Inc. (Diakses pada 19 Juni 2019).

Behlke, M. A., L. Huang, L. Bogh, S. Rose, and E. J. Devor. 2005. *Fluorescence and Fluorescence Applications*. United States: Integrated DNA Technologies.

Bishop, J. L., Campbell, S. A., Farrell, P., Fitzgerald, M., Haugen, M., Kocmond, W., Madden, D. E., Murray, W. E., and Persing, D. H. 2015. *Designing Real-Time Assays on the SmartCycler® II System*, United States: Cepheid Technical

- Support.pp 1-8. (Diakses pada 19 Juni 2019).
- Borah, P. 2011. Primer Designing for PCR. *Science Vision*. 11: 134-136.
- Dewi, D.S.W. 2018. Identifikasi Mutasi Gen *gyrA* dan *gyrB* pada Isolat Klinik *Multidrug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) sebagai Penanda *Extensively Drug-Resistant Tuberculosis* (XDR-TB) dengan Metode *Multiplex Polymerase Chain Reaction*. *Skripsi*. Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Udayana.
- Didenko, V. V. 2001. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. *Journal Biotechniques*. 31. pp 1106-1121.
- Disratthakit, A., T. Prammananan, C. Tribuddharat, I. Thaipisuttkul, N, M. Leechawengwongs, dan A. Chalprasert. 2016. Role of *gyrB* Mutation in PreExtensively and Extensively Drug Resistant Tuberculosis in Thai Clinical Isolates. *American Society for Microbiology*. 60(9): 5189-5197.
- Kaswa, M. K., Aloni, M., Nkuku, L., Bakoko, B., Lebeke, R., Nzita, A. 2014. Pseudo-Outbreak of Pre-Extensively Drug-Resistant (Pre-XDR) Tuberculosis in Kinshasa: Collateral Damage Caused by False Detection of Fluoroquinolone Resistance by GenoType MTBDRsl. *Journal of Clinical Microbiology*. 52: 2876-2880.
- Livak, K. J., Flood, S. J. A., Marmaro, J., Glusti, W., and Deetz, K. 1991. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *Journal Genome Research*. 4. pp 357-362.
- Matrat, S., A. Aubry, C. Mayer, V. Jarlier, and E. Cambau. 2008. Mutagenesis in the $\alpha 3\alpha 4$ GyrA Helix and in the Toprim Domain of GyrB Refines the Contribution of Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase to Intrinsic Resistance to Quinolones. *Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(8): 2909-2914.
- McPherson, M. dan S. Moller. 2006. *PCR*. Edisi 2. New York: Taylor and Francis Group. 1-30.
- Navarro, E., G. S. Heras, M. J. Castano, dan J. Solera. 2015. Real-Time PCR Detection Chemistry. *Journal Clinica Chimica Acta*. 439 (1). pp 231-250.
- NCBI. 2018. *Mycobacterium tuberculosis H37Rv Complete Genome*. Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov. (Cited 13 September 2018).
- Nugrahaeni, D. K. dan U. S. Malik. 2015. Analisis Penyebab Resistensi OAT (Obat Anti Tuberkulosis). *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 11(1): 8-15.
- Rinanda, T. 2015. Kajian Molekuler Mengenai Mekanisme Resistensi *Mycobacterium tuberculosis*, *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. 15(3): 162-167.
- Rychlik, W. 2010. *OLIGO Primer Analysis Software Version 7*. USA: Molecular Biology Insights, Inc.
- Sasmitha, L. V. 2017. Eksplorasi Mutasi Gen *gyrA* sebagai Penanda *Extensively Drugs Resistant Tuberculosis* pada Isolat Klinik *Multidrug-Resistant Tuberculosis* di Bali menggunakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

- Skripsi*. Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Udayana.
- Walker, J. M. and Rapley, R. 2005. *Medical Biomethods of Handbook*. New Jersey: Humana Press Inc.
- World Health Organization. 2018. *Global of Tuberculosis Report 2018*. Prancis: WHO.
- Yilmaz, L. S., S. Parnerkar, dan DD. R. Noguera. 2011. mathFISH. a Web Tool That Uses Thermodynamics-Based Mathematical Models for *In Silico* Evaluation of Oligonucleotide Probes for Fluorescence In Situ Hybridization. *Journal Applied and Environmental Microbiology*. 77(3). pp 1118-1122.
- Zhang, Z., J. Lu, Y. Wang, Y. Pang, dan Y. Zhao. 2014. Prevalence and Molecular Characterization of Fluroquinolone-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in China, *Jornal ASM org*. 58(1): 364-369.