IDENTIFIKASI MUTASI GEN *rpoB* PADA ISOLAT *Mycobacterium tuberculosis MULTIDRUG RESISTANT* DENGAN METODE *NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION*

Made Dharmesti Wijaya[1)], Eka Putri Rusyanthini[1)], Desak Gede Pradnyaniti[1)], Komang Trisna Komalasari[1)], Luh Putu Suci Sri Sunarti[1)]

[1)]Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, email: dharmestiwijaya@ymail.com

Abstract

The rpoB gene has been known to be a surrogate marker for detection of Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB). Mutations of rpoB gene were associated with rifampicin (RMP) resistance occur in 81 bp region called Rifampin Resistance-Determining Region (RRDR). This study was aimed to determine the types of mutations and amino acid differences in isolates of M.tuberculosis MDR compared to M.tuberculosis H37Rv. Amplification of rpoB gene fragments was carried out using nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR). Analysis of mutation using MEGA4 showed two amino acid changes namely, E418D and H526L. The type of mutations determined in isolate was missense mutations.

***Keywords**: MDR-TB, mutation, nested PCR, rpoB*

1. PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi penyebab kematian tertinggi kedua di dunia setelah HIV. Tingginya angka kejadian TB menjadi lebih kompleks akibat munculnya resistensi terhadap obat antituberkulosis (OAT). WHO telah mendefinisikan adanya *multidrug resistant* TB (MDR-TB) yaitu penyakit tuberkulosis yang disebabkan oleh strain *M.tuberculosis* yang resisten sekurang-kurangnya terhadap isoniazid dan rifampisin, OAT lini pertama yang paling efektif (WHO, 2010).

Di Indonesia diperkirakan telah terjadi 5100 kasus MDR-TB dari kasus TB baru yang tercatat pada tahun 2010. Hal ini membuat Indonesia masuk dalam daftar negara dengan masalah MDR-TB yang serius (*high burden MDR-TB country*) (WHO, 2011). Di Bali, MDR-TB semakin kompleks seiring dengan tingginya kasus HIV dimana hingga Juni 2012, Bali menempati posisi kelima tertinggi di Indonesia (Ditjen PP dan PL Kemenkes RI, 2012). MDR-TB adalah salah satu patogen oportunis yang menjadi penyebab kematian penderita HIV.

Lebih dari 90% isolat yang resisten RMP juga resisten terhadap isoniazid (INH), sehingga resistensi terhadap RMP merupakan pertanda yang mewakili terjadinya MDR (Lewis *et al*, 2002; Syaifudin dkk, 2007). Telah diketahui pula bahwa lebih dari 96% resistensi terhadap RMP terjadi akibat mutasi pada segmen 81-bp gen *rpoB* dari kodon 507-533 yang disebut sebagai *Rifampicin Resistance Determining Region* (RRDR) (Ramaswamy dan Musser, 1998; Syaifudin dkk, 2007).

Diagnosis MDR-TB dengan uji sensitivitas obat (*Drug Susceptibility Testing*, DST) memberikan hasil yang sangat sensitif dan spesifik tetapi membutuhkan waktu yang lama (6-9 minggu) mengingat laju pertumbuhan *M.tuberculosis* yang sangat lambat (Ali *et al*, 2011). Saat ini, pemanfaatan berbagai metode molekular berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah dirancang untuk mempercepat deteksi mutasi terkait masalah resistensi agen antimikroba (Yang *et al*, 2011).

Keterbatasan pada uji molekuler yang tersedia saat ini adalah hanya didesain untuk mendeteksi polimorfisme gen *rpoB* yang paling sering muncul pada isolat *M.tuberculosis* yaitu pada kodon 531, 526, dan 516. Hal tersebut membuat metode ini tidak dapat diterapkan secara universal

karena titik-titik mutasi pada *M.tuberculosis* sangat dipengaruhi oleh geografis (Lingala *et al*, 2010).

Besarnya pengaruh geografis menyebabkan diperlukannya suatu *database* mengenai daerah konservatif mutasi yang terjadi pada *M.tuberculosis*. Identifikasi mutasi gen *rpoB* pada beberapa sampel klinis di beberapa daerah di Indonesia telah dilakukan (Syaifudin dkk, 2007; Rosilawati dkk, 2007; Yowani, 2012). Namun, untuk di wilayah Bali penelitian semacam ini masih belum dilakukan.

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi jenis mutasi penyebab resistensi serta perbedaan asam amino yang terjadi pada isolat *M.tuberculosis* MDR di Bali dibandingkan dengan gen *rpoB M.tuberculosis* yang terdapat pada *database* URL://www.ncbi.nlm.nih.gov sebagai langkah awal dalam pengumpulan daerah konservatif mutasi di Bali. Data yang dihasilkan nantinya diharapkan dapat membantu pengembangan teknik-teknik molekular dalam diagnosis MDR-TB di Indonesia pada umumnya, dan Bali pada khususnya.

2. METODE

Isolasi DNA

Isolasi DNA *M.tuberculosis* dilakukan dengan metode Boom yang dimodifikasi. Sel dilisis menggunakan larutan pelisis L6 (guanidin tiosianat (GuSCN), Tris-HCl, EDTA dan Triton-X). Campuran dikocok selama 10 menit dan disentrifus 1 menit dengan kecepatan 14.006 xg. Pelet dicuci dengan buffer L2 dan etanol 70% dingin masing-masing dua kali dan aseton satu kali. Pelet dikeringkan pada suhu 56^0C selama 10 menit kemudian ditambahkan aquadest steril dan diinkubasi 56°C selama 10 menit untuk selanjutnya disentrifus. Supernatan digunakan untuk *template* PCR.

Amplifikasi gen *rpoB* dengan *nested* PCR

Nested PCR dilakukan dengan menggunakan dua pasang primer (*inner* dan *outer*) pada mesin Veriti® *Thermal Cycler*. Amplifikasi pertama menggunakan primer *outer* FNdeR1 5'-GCCATATGATGTCTCC GATCGACCACTTC-3' dan RBamR1 5'-GTGGATCCTGTCGTGCATCACAGTGA TGTAG-3' dilakukan dengan tahap denaturasi awal 95ºC selama 15 menit, 40 siklus amplifikasi (1 menit pada 94°C, 1 menit pada 56°C, 1 menit pada 72°C), dan elongasi akhir pada suhu 72ºC selama 10 menit. Amplifikasi kedua dilakukan menggunakan primer *inner* dengan tahap denaturasi awal 95ºC selama 15 menit, 45 siklus amplifikasi (1 menit pada 94°C, 1 menit pada 60°C, 1 menit pada 72°C), dan elongasi akhir pada suhu 72ºC selama 10 menit.

Deteksi Produk PCR dan Sekuensing

Produk hasil PCR dielektroforesis pada 1.5% agarosa yang dilarutkan dalam 1.0X TBE (Tris-borat-EDTA). Produk divisualisasi menggunakan *GelDoc* transilluminator. Sekuensing dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta dengan menggunakan primer inner *forward*.

Analisis Homologi dan Mutasi

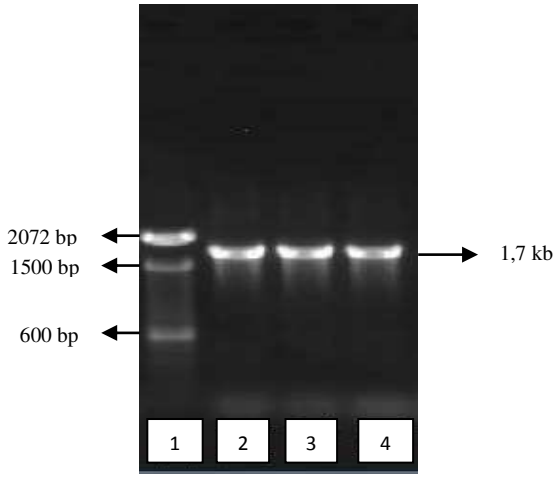
Sekuen yang diperoleh, dilakukan homologi terhadap *database* menggunakan program *on-line* BLASTN (URL:// www.ncbi.nlm.nih.gov) dan *multiple alignment* pada program MEGA4. Sekuen gen *rpoB* galur standar *M.tuberculosis* H37Rv digunakan sebagai kontrol dan dibandingkan dengan sekuen isolat yang diuji. Translasi sekuen nukleotida menjadi asam amino dilakukan dengan bantuan program MEGA4.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

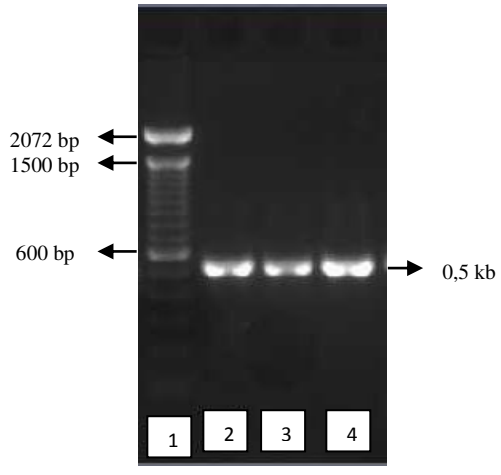
Sampel yang digunakan sebagai templat PCR diperoleh dari hasil isolasi DNA isolat P10 *M.tuberculosis* MDR dari Instalasi Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah Denpasar. Tahap isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan larutan bufer lisis yang terdiri dari GuSCN yang menyebabkan lisis sel pada sampel. Lapisan lipid yang sangat tebal pada dinding sel bakteri ini menyebabkan diperlukannya pelisis yang kuat, salah satunya adalah GuSCN. Selain itu, GuSCN juga dapat menginaktivasi nuklease yang dapat merusak DNA hasil isolasi. DNA yang lisis akan terikat pada

diatom kemudian diendapkan dengan sentrifugasi. Penambahan etanol 70% dan aseton adalah untuk membersihkan DNA kromosom dari pengotor-pengotornya (Faatih, 2009).

Amplifikasi fragmen gen *rpoB* telah berhasil dilakukan dengan metode *nested* PCR. Amplifikasi pertama menggunakan primer *outer* menghasilkan amplikon dengan ukuran 1,7 kb seperti tampak pada elektroforegram (Gambar 1). Produk amplifikasi pertama kemudian digunakan sebagai templat pada amplifikasi kedua menggunakan primer *inner*. Elektroforegram menunjukkan bahwa telah diperoleh pita tunggal yang berukuran 0,5 kb (Gambar 2).



Gambar 1. Elektroforegram hasil *nested* PCR tahap I dengan primer *outer*. (1): Marker DNA *Ladder* 100 bp; (2-4): fragmen 1,7 kb gen *rpoB* pengulangan 1-3.



Gambar 2. Elektroforegram *nested* PCR tahap II dengan *inner* primer. (1): Marker DNA *Ladder* 100 bp; (2-4): fragmen 0,5 kb gen *rpoB* pengulangan 1-3.

Hasil PCR kemudian dikirimkan ke Laboratorium Eijkman Jakarta untuk disekuensing. Produk PCR isolat P10 yang terbaca pada hasil sekuensing menggunakan primer forward adalah 480 basa. Analisis homologi hasil sekuensing isolat terhadap *database* gen *rpoB M. tuberculosis* H37Rv dilakukan menggunakan program BLASTN secara *on line* pada URL:// www.ncbi.nlm.nih.gov. Berdasarkan data *alignment* yang diperoleh dari program tersebut, fragmen gen isolat P10 memiliki kesamaan sebesar 99% dengan gen *rpoB Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Hasil analisis menggunakan program MEGA4 menunjukkan adanya perubahan nukleotida yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino pada gen *rpoB* isolat P10 dibandingkan dengan gen *rpoB M.tuberculosis* H37Rv sebagai *wildtype*. Hal ini menunjukkan bahwa mutasi yang terjadi adalah *missense mutation*. Pada kodon 526, terjadi perubahan nukleotida kedua yaitu dari CAC menjadi CTC. Mutasi tersebut menyebabkan terjadinya perubahan asam amino dari histidin yang bersifat polar menjadi leusin yang bersifat nonpolar. Mutasi ini terjadi pada daerah RRDR (kodon 507-533) dan termasuk salah satu mutasi yang paling umum terjadi. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa mutasi ini memiliki persentase yang cukup tinggi yaitu sekitar 17-32,26% (Lingala dkk, 2010).

Perubahan lainnya terjadi di luar daerah RRDR pada kodon 418 dan merupakan mutasi yang baru ditemukan pada penelitian ini. Perubahan nukleotida dari GAA menjadi GAT menyebabkan terjadinya perubahan struktur asam amino dari asam glutamat dengan gugus samping karboksi etil menjadi asam aspartat dengan gugus samping karboksi metil. Mutasi yang menyebabkan perubahan sifat dan struktur asam amino ini diduga menyebabkan penurunan aktivitas pengikatan serta memiliki peran dalam munculnya fenotip yang resisten (Retnoningrum dan Roga, 2004).

4. KESIMPULAN

Jenis mutasi yang terjadi pada gen *rpoB* isolat *Mycobacterium tuberculosis* MDR dibandingkan dengan *database* gen *rpoB M. tuberculosis H37Rv* adalah *missense mutation* dengan perubahan asam amino yang terjadi adalah pada kodon 418 dari asam glutamat menjadi asam aspartat dan pada kodon 526 dari histidin menjadi leusin.

5. REFERENSI

Ali, A., Rumina H., Kauser J., Nusrat J., Ejaz Q., dan Zahra H. 2011. Characterization of Mutations Conferring Extensive Drug Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Pakistan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 55(12): 5654-5659.

Boom, R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen dan J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. J Clin Microbiol: 495-503.

Ditjen PP dan PL Kemenkes RI. 2012. Statistik Kasus HIV/AIDS di Indonesia. Available at: http://www.spiritia.or.id. Accessed on September 17th, 2012.

Faatih, M. 2009. Isolasi dan Digesti DNA Kromosomal. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*, 10(1): 61-67

Lewis, K., Abigail A. S., Harry W. T., and Richard G. W. 2002. *Bacterial Resistance to Antimicrobials*. New York: Marcel Dekker Inc.

Lingala, M.A.L. 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.

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.

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

Rosilawati, M.L., B. Bela, dan M. Syaifudin. 2007b. Deteksi Gen Target INH pada DNA Sputum Basil Tahan Asam Positif dengan Teknik Polymerase Chain Reaction. Majalah Kedokteran Indonesia, 57: 245-250.

Syaifudin, M., Rosilawati, M.L., Irawan, H., dan Bela, B. 2007. *Identifikasi Mycobacterium tuberculosis dan Analisis Mutasi Gen RpoB dan KatG Penyebab Resistensi Ganda dengan Teknik Molekuler*. Jakarta: Laporan Penelitian Balitbang BATAN.

WHO. 2010. *Multidrug and Extensively Drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 Global Report on Surveillance and Response*. Available from: http://www.who.int/tb/publications/2010/9789245991 91/en/index.html. Accessed on September 8th, 2012.

WHO. 2011. *Tuberculosis Profile – Indonesia*. Available at: http://www.who.int/tb/data. Accessed on September 8th, 2012.

Yang, S., Min Z., Yaoting Z., and Yiwei W. 2011. Rapid detection of rpoB and katG genes from the sputum of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction (PCR)-direct sequencing analysis. *African Journal of Microbiology Research Vol. 5(26), pp. 4519-4523*

Yowani, S.C. 2012. Mutations in 1700 bp Fragment of *rpoB* gene of Multi-Drug Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolate. *Indonesian Journal of Biomedical Sciences*, 6(2).