

**Studi Karakterisasi dan Analisis *in silico* pada Gen *rpoB* dan *katG* :
Studi Resistensi RIF pada RNA Polimerase Subunit- β dan Resistensi INH pada
Gen *katG* pada Pasien Tuberkulosis di Jayapura-Provinsi Papua**

Yohanis Ngili

*Kelompok riset biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Cenderawasih.
Jalan Kamp Wolker Kampus Baru Waena, Jayapura-Indonesia.
e-mail: joe_ngili@yahoo.com*

ABSTRAK

Masalah utama yang terus meningkat dalam pengobatan dan kontrol TB di provinsi Papua adalah isolat *Multidrug-Resistant M. tuberculosis* (MDR-TB), yang didefinisikan oleh badan kesehatan dunia, WHO sebagai isolat *M. tuberculosis* yang resisten RIF dan INH. Pengobatan penderita TB biasanya dilakukan dengan pemberian tiga jenis obat antituberkulosis (AOT) dengan pilihan utama adalah rifampin (RIF) dan isoniazid (INH), kemudian disertai dengan streptomisin atau pirazinamid. Resistensi RIF disebabkan adanya mutasi gen *rpoB*, yaitu gen yang menghasilkan RNA polimerase subunit- β , dan resistensi INH sebagian besar disebabkan adanya mutasi gen *katG*. Seiring meningkatnya jumlah penderita penyakit HIV/AIDS menyebabkan WHO mengategorikan penyakit TB sebagai *re-emerging disease*. Tujuan studi ini adalah memperoleh informasi hubungan MDR-TB dengan gen-gen terkait, serta informasi kombinasi genotipe *M. tuberculosis*. Di sini kami laporkan bahwa sebagian besar isolat MDR-TB tersebut resisten terhadap obat antituberkulosis lainnya, dan frekuensi mutasi *rpoB526* dan *rpoB531* hampir sama tetapi mutasi *katG315* hanya terdapat pada 16 isolat. Studi ini berhasil mendeteksi mutasi selain kodon *rpoB526* atau *rpoB531* yang belum pernah dipublikasikan, di antaranya adalah mutasi C1307T (Asp516Gly), T1374A dan A1376C (Ser539Thr), serta C1413T (Pro552Ser). Adanya perubahan nukleotida C1363A (Pro535His) pada *M. tuberculosis* yang sensitif enam obat antituberkulosis menunjukkan tidak seluruh mutasi *rpoB* menimbulkan sifat resisten. Atas dasar fenomena ini, dapat diusulkan bahwa mekanisme terbentuknya galur MDR-TB diawali dengan mutasi *rpoB* yang diikuti dengan mutasi *katG*. Studi ini memperlihatkan bahwa mekanisme resistensi terhadap suatu OAT yang hanya mempengaruhi satu gen, misalnya rifampin yang mempengaruhi *rpoB*, akan lebih mudah dikontrol daripada OAT yang mempengaruhi beberapa gen, misalnya isoniazid yang mempengaruhi gen-gen lainnya selain *katG*.

Kata Kunci: Karakterisasi, *rpoB* dan *katG*, resistensi RNA polimerase subunit- β , gen *katG*, Provinsi Papua

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi pada manusia yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Penyakit kronis ini ditandai oleh kematian jaringan (nekrosis) yang disebabkan oleh hipersensitivitas tipe lambat, yaitu adanya proses fagositosis dan presentasi epitop (pengenal antigen) oleh sel makrofag di permukaan selnya sehingga terjadi serangkaian proses yang memicu reaksi sel-sel limfosit T (Glynn, et. al.,2002).

Masalah utama yang terus meningkat dalam pengobatan dan kontrol TB adalah isolat *Multidrug-Resistant M. tuberculosis* (MDR-TB), yang didefinisikan oleh badan kesehatan dunia, WHO sebagai isolat *M. tuberculosis* yang resisten RIF dan INH. Pengobatan penderita TB biasanya dilakukan dengan pemberian tiga jenis obat antituberkulosis (AOT) dengan pilihan utama adalah rifampin (RIF) dan isoniazid (INH), kemudian disertai dengan streptomisin atau pirazinamid. Resistensi RIF disebabkan adanya mutasi gen *rpoB*, yaitu gen yang

menghasilkan RNA polimerase subunit- β , dan resistensi INH sebagian besar disebabkan adanya mutasi gen *katG*. Seiring meningkatnya jumlah penderita penyakit HIV/AIDS menyebabkan WHO mengkategorikan penyakit TB sebagai *re-emerging disease* (Mikhailovich, et.al., 2001 dan Pierattelli, et al., 2004).

Penelitian yang berkaitan dengan MDR-TB telah banyak dilakukan. Akibat adanya mutasi *rpoB*, terutama di wilayah *hotspot* atau RRDR (*rifampin resistance-determining region*), maka RIF tidak dapat menghambat kerja RNA polimerase karena tidak dapat mengikat subunit- β , sehingga menyebabkan resistensi RIF. Sementara itu, INH memerlukan proses aktivasi oleh enzim katalase-peroksidase yang dihasilkan *M. tuberculosis*. Sebagian besar resistensi INH terjadi karena mutasi gen *katG*, yaitu gen yang menghasilkan enzim katalase-peroksidase, sehingga INH tidak dapat diubah menjadi bentuk aktif. Sampai saat ini mutasi *katG* yang teridentifikasi menyebabkan resistensi hanya mutasi di kodon 315. Sebagian kecil resistensi INH dapat terjadi karena mutasi gen *inhA*, *ahpC*, dan *kasA*, serta gen-gen lainnya yang berkorelasi (Ramaswamy, et.al, 2004).

Data menunjukkan lebih dari 95% *M. tuberculosis* yang resisten RIF disebabkan oleh mutasi *rpoB* dan 60-70% *M. tuberculosis* yang resisten INH disebabkan oleh mutasi *katG*. Beberapa publikasi juga menyebutkan adanya isolat *M. tuberculosis* yang secara fenotipe bersifat resisten terhadap RIF atau INH tetapi secara genotipe tidak terdapat mutasi pada gen *rpoB* atau *katG*.

MATERIAL DAN METODE

Alat-alat dan bahan yang digunakan pada tahap fenotipe antara lain adalah media Löwenstein-Jensen pada tabung reaksi dan *laminar flow* sebagai tempat steril untuk mengkultur *M. tuberculosis*, pipet dan ose steril, serta inkubator 37 °C sebagai tempat pengeraman kultur. Selain itu, bahan lain yang digunakan pada tahap fenotipe adalah OAT RIF, INH, streptomisin, kanamisin, etambutol, dan pirazinamid.

Isolasi dan identifikasi

Isolasi *M. tuberculosis* dilakukan dengan metode kultur menggunakan media Löwenstein-Jensen. Media yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 4-6 minggu atau sampai terlihat adanya pertumbuhan koloni. Koloni yang tumbuh belum dapat dipastikan *M. tuberculosis* karena mikobakteri lain dapat tumbuh pula pada media ini. Oleh sebab itu, setelah terlihat adanya pertumbuhan koloni dilakukan identifikasi dengan reaksi biokimia, yaitu dengan melakukan pengamatan pertumbuhan dan bentuk koloni, uji niasin (asam nikotinat), uji katalase, serta uji reduksi nitrat (Ubyaan, et. Al, 2004).

Karakterisasi fenotipe

Setelah diperoleh isolat *M. tuberculosis*, tahap selanjutnya adalah uji resistensi terhadap enam jenis OAT. Uji ini dilakukan dengan metode proporsional menggunakan media Löwenstein-Jensen. Suspensi isolat dibuat dengan cara memasukkan koloni *M. tuberculosis* ke dalam tabung steril yang berisi larutan fisiologis dan *glassbead* sehingga mencapai kekeruhan McFarland no.1. Suspensi tersebut kemudian diencerkan menjadi 10x dan 100x. Sebanyak 0,5 ml suspensi bakteri dari pengenceran 10x diambil dan dimasukkan ke dalam media uji, yaitu media Löwenstein-Jensen miring yang telah mengandung OAT yang berbeda di setiap tabungnya. Kontrol dibuat dengan memasukkan suspensi bakteri dari pengenceran 10x dan 100x sebanyak 0,5 ml ke dalam media kontrol (tidak mengandung OAT). Kultur diinkubasi pada 37°C selama 4-6 minggu (Mokrousov, et.al, (2002).

Karakterisasi genotipe

Karakterisasi genotipe dilakukan berdasarkan analisis terhadap empat gen *M. tuberculosis*, yaitu dua gen yang menghasilkan protein membran dan dua lainnya adalah gen *rpoB* dan *katG* yang menyebabkan timbulnya sifat resisten *M. tuberculosis* terhadap RIF dan INH. Karakterisasi genotipe *rpoB* dan *katG* diutamakan pada kodon *rpoB526*, *rpoB531*, dan *katG315* menggunakan metode PCR

multipleks dan penentuan urutan nukleotida, sedangkan analisis pada *efpA* dan Rv1877 hanya menggunakan metode penentuan urutan nukleotida. Analisis gen *efpA*, Rv1877, serta segmen *rpoB* dan *katG* dilakukan dengan metode penentuan urutan nukleotida berdasarkan hasil amplifikasi sepasang primer. Selain itu, analisis *rpoB* dan *katG* dilakukan dengan metode PCR multipleks yang menggunakan tiga buah primer, yaitu primer *forward* (maju), primer *reverse* (balik), dan primer dalam. Primer dalam digunakan untuk mendeteksi mutasi kodon *katG315*, *rpoB531*, dan *rpoB526* sehingga segmen yang dihasilkan oleh primer dalam disebut segmen DNA variabel. Jika terdapat mutasi, maka ujung 3' primer dalam tidak dapat berpasangan dengan komplementnya dan proses amplifikasi segmen DNA variabel tidak dapat terjadi. Primer maju dan balik gen *rpoB* dan *katG* akan mengamplifikasi segmen yang masing-masing berukuran 0,25 kb dan 0,44 kb ([Korzheva, et. Al, 2000 dan Putman, et.,al, 1996). Hasil amplifikasi pasangan primer ini disebut pita non-variabel karena harus selalu ada untuk menandai berjalannya proses PCR multipleks.

Penentuan urutan nukleotida gen *efpA* dan Rv1877 dilakukan untuk melihat keterkaitan gen-gen tersebut pada sifat resisten MDR-TB. Analisis kedua gen ini hanya dilakukan pada 12 isolat MDR-TB yang mewakili golongan tingkat resistensi tinggi dan tingkat resistensi rendah. Sementara itu, penentuan urutan nukleotida *rpoB* dan *katG* hanya dilakukan sebagian, yaitu pada segmen yang diapit oleh primer maju dan balik yang digunakan pada PCR multipleks. Metode lisis sel untuk mengisolasi DNA dapat dilihat pada lampiran C dan penentuan urutan nukleotida ini menggunakan jasa *MacroGen Inc.*, Seoul, Korea Selatan. Seluruh data hasil penentuan urutan nukleotida ini dianalisis menggunakan program *DNA star Seqmen* (Ubyaan, et. al, 2014 dan Zanden, et. al, 2003).

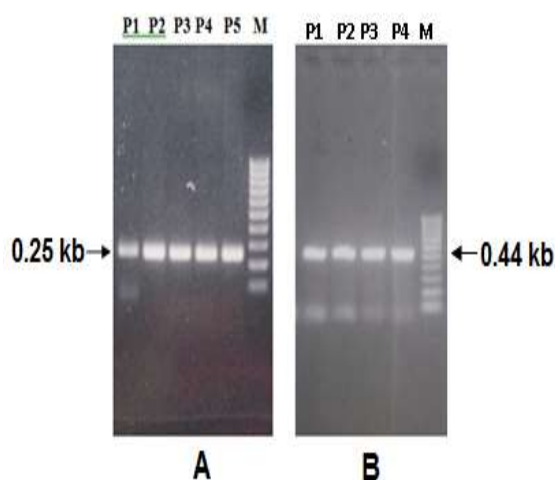
HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah karakterisasi fenotipe 42 isolat MDR-TB, maka dilakukan berbagai uji lanjutan

untuk mengetahui karakteristik genotipenya, yaitu dengan metode PCR multipleks dan penentuan urutan nukleotida. Karakterisasi genotipe *rpoB* ditujukan pada RRDR, terutama kodon *rpoB526* dan *rpoB531*, sedangkan karakterisasi *katG* hanya ditujukan pada kodon *katG315*.

Karakterisasi *rpoB* dan *katG* berdasarkan hasil penentuan urutan nukleotida

Analisis penentuan urutan nukleotida dilakukan dengan menggunakan pita segmen DNA hasil amplifikasi primer maju dan balik pada PCR multipleks. Pasangan primer tersebut mengamplifikasi pita yang panjangnya kira-kira 0,25 kb dan 0,44 kb, berturut-turut untuk *rpoB* dan *katG*. Primer *rpoB* mengapit wilayah antara nukleotida 1521 dan 1730, atau antara kodon 507 dan 576. Jadi, *hotspot* untuk sifat resisten terhadap rifampin atau disebut juga RRDR yang berada di antara kodon 507 dan 533 teramplifikasi seluruhnya.

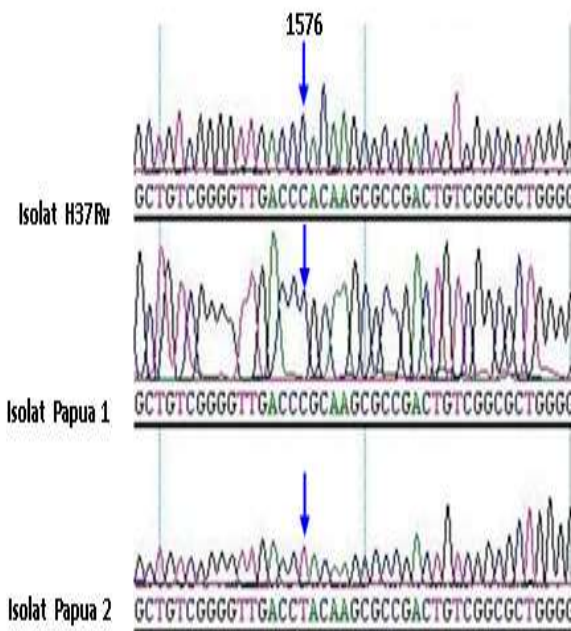


Gambar 1. (A) Hasil amplifikasi fragmen *rpoB* ukuran 0,25 kb. Hasil PCR multipleks yang meragukan pada beberapa isolat, seperti misalnya P1, P5, dan isolat lainnya akan dikonfirmasi dengan penentuan urutan nukleotida. Setelah mencapai konsentrasi yang mencukupi, fragmen sepanjang 0,25 kb kemudian digunakan untuk penentuan urutan nukleotida; (M) pita penanda 100 pb; (B) Hasil amplifikasi fragmen *katG* ukuran 0,44 kb. Hasil PCR multipleks yang meragukan pada beberapa isolat, seperti misalnya R1, R5, dan isolat lainnya akan dikonfirmasi dengan penentuan urutan nukleotida. Setelah mencapai konsentrasi yang mencukupi, fragmen sepanjang 0,44 kb kemudian digunakan

untuk penentuan urutan nukleotida; (M) pita penanda 100 pb

Sementara itu, penentuan urutan nukleotida segmen *katG* dibatasi oleh nukleotida urutan 675 dan 1104. Hasil amplifikasi segmen *rpoB* dan *katG* dapat dilihat pada gambar 1.

Analisis elektroforegram hasil penentuan urutan nukleotida diawali dengan difokuskan pada nukleotida 1578-1580 (*rpoB526*) dan nukleotida 1593-1595 (*rpoB531*). Beberapa isolat yang terdeteksi mengalami mutasi di kodon-kodon tersebut dengan metode PCR multipleks, juga terlihat memberikan hasil yang sama pada elektroforegram (Gambar 2).



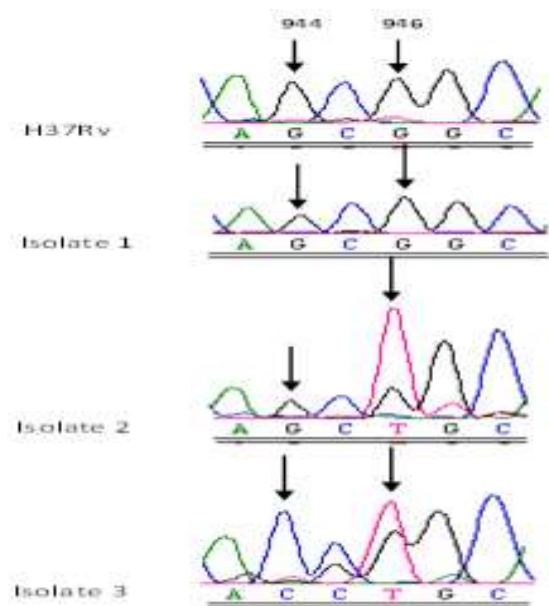
Gambar 2. Elektroferogram *rpoB* beberapa isolat MDR-TB. Pada grafik terlihat adanya perubahan nukleotida isolat P1 dan P2 dibandingkan dengan isolat standar *M. tuberculosis H37Rv*. Mutasi yang terjadi adalah C1576T (isolat P2), dan A1577G (isolat P1). Analisis menggunakan aplikasi DNA star – Seqman.

Elektroferogram hasil penentuan urutan nukleotida segmen *katG* pada isolat MDR-TB menunjukkan hasil yang tidak berbeda dengan PCR multipleks. Isolat yang mengamplifikasi dua pita segmen DNA pada PCR multipleks menunjukkan tidak adanya mutasi di *katG315* atau nukleotida urutan 944.

Begitu pula dengan isolat yang mengamplifikasi pita non-variabel saja, menunjukkan adanya mutasi di urutan nukleotida 944, yaitu kodon *katG315*. Isolat P4 yang merupakan isolat multisensitif ternyata mengalami mutasi di luar RRDR, yaitu urutan nukleotida C1604A (kodon *rpoB535*) yang mengubah asam amino prolin menjadi histidin [Korzheva, et al. 2000, Yue, et al 2003, dan Tanjung, et al, 2016).

Analisa homologi

Analisa homologi menggunakan program Seqman DNASTar membandingkan enam isolat dengan galur normal *M. tuberculosis H37Rv*. Gen *katG* tiga isolat, yang ditunjukkan hanya isolat P1, dibandingkan dengan gen *katG* galur alami H37Rv pada nukleotida 944 dan 946. Selain itu, dibandingkan juga dengan isolat P2 yang sifatnya MDR-TB tetapi tidak mengalami mutasi pada nukleotida 944 dan 946; dan dengan isolat P3 MDR-TB yang mengalami mutasi pada dua nukleotida tersebut. Hasil analisa homologi menunjukkan bahwa tiga isolat (P4, P5, P6) mengalami mutasi pada nukleotida 946, perubahan basa G menjadi T (gambar 3).



Gambar 3. Analisa homologi isolat Papua 2. Isolat 2 mengalami mutasi pada nukleotida 946, C menjadi T, kodon 316, GGC menjadi TGC; dan tidak mengalami mutasi pada nukleotida 944, kodon 315 AGC menjadi ACC.

Dibandingkan dengan H37Rv dan isolat lainnya MDR-TB yang tidak mengalami mutasi di dua posisi tersebut. Perbandingan juga dilakukan dengan isolat 3 yang mengalami mutasi pada posisi 946 dan 944. Garis oranye menunjukkan basa pada kodon 315, garis hijau menunjukkan basa pada kodon 316. Tanda panah menunjukkan posisi nukleotida pada basa 944 dan 946.

Visualisasi protein katalase peroksidase dengan program Pymol

Penelitian sebelumnya telah mengkris-talkan katalase peroksidase *M. tuberculosis* dan telah menentukan struktur tiga dimensi protein tersebut. Data struktur kristal ini dapat dilihat pada situs publik www.ncbi.nlm.nih.gov dengan nama 1SJ2 (Hirano dan Takahashi, 1999, Tanjung, et al, 2016 dan Höfling, et al, 2005). Posisi residu-residu yang mengalami mutasi pada gen *katG* dapat dilihat berdasarkan struktur 1SJ2 dengan menggunakan program Pymol. Visualisasi struktur ruang katalase peroksidase dengan program Pymol menunjukkan residu asam amino 316 berada dekat dengan sisi aktif pengikatan INH. Hasil analisis lanjutan menunjukkan berubahnya permukaan residu 316 akibat mutasi glisin menjadi sistein. Glisin merupakan asam amino yang paling sederhana sedangkan sistein berukuran lebih besar dan dapat membentuk ikatan disulfida dengan sistein lainnya. Tetapi pengaruh mutasi glisin316sistein ini dalam sifat resistensi terhadap INH belum diketahui.

Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa mutasi pada residu 315 mengakibatkan sifat resistensi terhadap INH karena mengakibatkan berubahnya ikatan hidrogen antara heme dan serin315 (Rie, et.al, 2001). Tiga isolat ini tidak mengalami mutasi pada residu 315 sehingga mutasi pada residu 316 diduga kuat menjadi penyebab sifat resistensi.

Residu 278 hingga 312 pada enzim katalase peroksidase *M. tuberculosis* berada dalam daerah *loop*, konformasi ini sama dalam dua struktur katalase peroksidase lainnya yaitu pada *Haloarcula marismortui* dan *Burkholderia pseudomallei*. Dalam katalase peroksidase *Burkholderia pseudomallei*, daerah *loop* ini diperkirakan menjadi sisi

pengikatan substrat tempat INH berinteraksi dengan enzim (Wei, et al,2003). Tetapi penelitian lainnya menyatakan bahwa dalam katalase peroksidase *M. tuberculosis*, daerah *loop* tersebut bukan merupakan sisi pengikatan INH yang terpenting. Mutasi pada residu asam amino 290 berada relatif jauh dari sisi aktifnya dan pengaruhnya terhadap sifat resistensi INH belum diketahui (Maksum, et al, 2013).

Gen *rpoB* dan *katG* masing-masing memiliki panjang 4810 pb dan 3516 pb sedangkan analisis urutan nukleotida segmen *rpoB* dan *katG* dilakukan berturut-turut pada urutan nukleotida 1521-1730 dan 675-1104 untuk segmen *katG*. Pada hasil PCR multipleks *rpoB526*, *rpoB531*, dan *katG315*, selain pita non-variabel dan variabel, juga ditemukan pita non-spesifik segmen DNA di beberapa sampel. Hal ini kemungkinan jumlah DNA cetakan yang ditambahkan pada campuran PCR terlalu banyak sehingga reaksi PCR menunjukkan hasil yang tidak spesifik. Penggunaan tiga buah primer pada PCR multipleks menyebabkan suhu untuk penempelan primer juga lebih dari satu jenis (Siallagan, et al, 2015).

Adanya pita non-spesifik pada hasil PCR multipleks tidak mempengaruhi analisis genotipe untuk *rpoB531*, *rpoB526*, dan *katG315* karena metode ini hanya digunakan untuk mendeteksi keberadaan pita fragmen DNA variabel yang berukuran 0,18 kb dan 0,17 kb untuk kodon *rpoB526* dan *rpoB531*, serta pita ukuran 0,25 kb untuk deteksi kodon *katG315*. Sampel DNA yang digunakan dalam PCR multipleks merupakan hasil lisis sel yang tidak diukur konsentrasinya sehingga menyebabkan konsentrasi DNA pada setiap sampel dalam reaksi PCR multipleks berbeda-beda.

Sifat resisten terhadap RIF terjadi karena adanya mutasi gen *rpoB*, yaitu gen yang menghasilkan RNA polimerase subunit- β . Sekitar 95% isolat resisten RIF disebabkan akibat adanya mutasi gen *rpoB* di wilayah 81 pb yang diapit oleh kodon 507 dan 533. Wilayah ini dikenal dengan nama RRDR [Maksum, et al, 2013 dan Wei, et al, 2003]. Mutasi yang sering terjadi adalah perubahan

Ser531Leu (TCG→TTG) dan His526Asp (CAC→GAC) (Siallagan, et al 2015). Analisis *rpoB* dalam penelitian ini dititikberatkan di wilayah RRDR, khususnya kodon *rpoB526* dan *rpoB531*, untuk menentukan penyebab sifat resisten terhadap RIF pada MDR-TB.

Hasil penelitian ini menunjukkan sekitar 81% isolat MDR-TB diketahui dengan PCR multipleks mengalami mutasi, sedangkan 19% isolat MDR-TB tidak terdeteksi mengalami mutasi *rpoB526* atau *rpoB531*. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan penelitian lainnya yaitu lebih dari 70% sifat resisten terhadap RIF pada *M. tuberculosis* di wilayah Asia disebabkan oleh mutasi *rpoB526* dan *rpoB531* (Höfling, et al, 2005).

Penentuan urutan nukleotida segmen *rpoB* menunjukkan hasil yang sangat bervariasi pada sampel yang mengamplifikasi dua pita segmen DNA untuk PCR multipleks. Sementara itu, hampir seluruh hasil analisis PCR multipleks untuk *rpoB526* dan *rpoB531* menunjukkan hasil yang sama dengan penentuan urutan nukleotida. Hasil yang berbeda diperoleh dari sampel isolat P3, yaitu tidak ada mutasi dengan PCR multipleks *rpoB526* tetapi hasil elektroferogram menunjukkan adanya mutasi A1576G (kodon *rpoB526*). Mutasi *rpoB526* yang tidak terdeteksi dengan PCR multipleks kemungkinan disebabkan oleh amplifikasi segmen lain akibat dari ketidaktepatan penempelan primer. Ketidaktepatan ini menghasilkan pita DNA yang lain tetapi dengan ukuran yang sama.

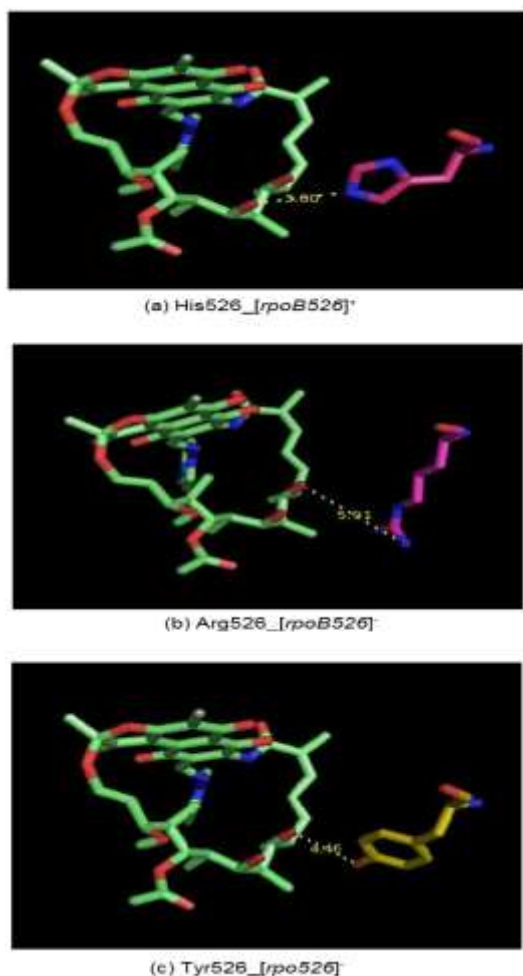
RIF adalah OAT pilihan utama yang digunakan untuk pengobatan penderita TB. Sebanyak 12 residu asam amino pada RNA polimerase subunit- β terlibat pada interaksi langsung dengan RIF. Substitusi 11 dari 12 residu asam amino tersebut akan menimbulkan sifat resisten terhadap RIF (Tanjung dan Ngili, 2016) menyebutkan lebih dari 90% resistensi RIF terjadi karena adanya perubahan genetika di fragmen 81 pb RRDR gen *rpoB* yang mengkode RNA polimerase subunit- β . Sementara itu, beberapa penelitian menyebutkan mutasi gen *rpoB* yang berada di luar RRDR juga dapat menimbulkan sifat resisten.

Sebagian mutasi *rpoB* yang terdeteksi antara nukleotida 1521 dan 1730 merupakan mutasi baru yang belum pernah dipublikasikan. Penelitian ini mendapatkan beberapa isolat yang terdapat mutasi *rpoB* di luar dan di dalam wilayah RRDR yang diapit oleh kodon *rpoB507* dan *rpoB533*. Mutasi *rpoB* yang terdapat di dalam wilayah RRDR selain nukleotida C1592T (*rpoB531*), C1576G dan C1576T (*rpoB526*), di antaranya adalah mutasi urutan nukleotida A1538T (sampel P1), A1534T dan C1536G (Sampel P5), serta C1548T dan C1654T (Sampel P4). Mutasi bisu G1389C terjadi pada isolat R5, R11, dan R12 sehingga diduga mutasi bisu ini adalah bentuk polimorfisme gen *rpoB* *M. tuberculosis*. Selain A1538T pada isolat L1, mutasi-mutasi tersebut belum pernah dipublikasikan pada jurnal penelitian. Mutasi A1538T (*rpoB513*) pada isolat L1 telah dipublikasikan peneliti lainnya (Rie, et al, 2001).

Penelitian bioinformatika yang dilakukan peneliti lainnya, menyebutkan bahwa perubahan residu gen *rpoB* pada RRDR di posisi 511, 512, 515, 521, dan 529 tidak signifikan mempengaruhi MIC (*minimum inhibitory concentration*) RIF, tetapi penelitian ini menunjukkan mutasi *rpoB512* juga dapat menyebabkan tingkat resistensi tinggi. Sementara itu, hasil penelitian mengatakan adanya perubahan pada 12 asam amino di area (*pocket*) protein mengakibatkan area tersebut menjadi tidak kontak langsung dengan RIF. Hal lainnya adalah sebagian besar mutasi yang terjadi pada RNA polimerase subunit- β ditemukan di wilayah I (posisi residu asam amino 505 sampai 537) dan wilayah II (posisi asam amino 562 sampai 572). Hasil analisis model struktur protein RNA polimerase subunit- β yang mengikat RIF pada *T. aquaticus*, menunjukkan hanya beberapa residu asam amino yang berikatan langsung dengan RIF karena memiliki polaritas yang sama dan dapat membentuk ikatan antara nitrogen atau oksigen, dengan gugus hidroksil RIF. Residu asam amino tersebut adalah Glu393 (homolog 513 pada *M. tuberculosis*), Phe394 (homolog 514), His406 (homolog

526), Arg409 (homolog 529), dan Ser411 (homolog 531).

Gambar di bawah ini menunjukkan residu yang membentuk ikatan dengan gugus hidroksil RIF akan memberikan dampak paling besar bila terjadi perubahan residu asam amino. Residu Ser411 (homolog 531 pada *M. tuberculosis*) seperti terlihat pada gambar, memiliki jarak paling dekat dengan RIF dan membentuk ikatan. Perubahan asam amino di residu ini menyebabkan efek yang paling besar pada fenotipe *M. tuberculosis*. Adanya perubahan asam amino serin menjadi leusin menyebabkan perubahan ikatan dan juga jarak antara residu asam amino tersebut dengan RIF. Hal ini terlihat pada tingkat resisten isolat yang mengalami mutasi *rpoB531* relatif lebih tinggi dibandingkan dengan mutasi kodon *rpoB* lainnya.



Gambar 4. Jarak dan kemungkinan jenis ikatan antara RIF dengan residu *rpoB526*⁺ (a) atau *rpoB526*⁻ (b dan c). Pemodelan memperlihatkan jenis ikatan pada *rpoB526*⁺

dan *rpoB526*⁻ tidak berbeda. Hanya jarak ikatan yang menunjukkan perbedaan sehingga peningkatan resistensi akibat mutasi di kodon *rpoB526* tidak sebesar mutasi di kodon *rpoB531*. Struktur warna biru adalah gugus nitrogen, merah adalah oksigen, sedangkan warna hijau, ungu, dan kuning adalah hidrogen

Seperti terlihat pada gambar, residu serin pada *rpoB531*⁺ yang membentuk ikatan dengan RIF, berubah menjadi leusin yang jaraknya lebih dekat tetapi jenis ikatan yang mungkin terjadi dengan RIF lebih lemah daripada sebelumnya [Gambar 4]. Ikatan antara hidrogen dan oksigen pada interaksi RIF dan serin adalah ikatan kovalen polar [*hydropathy index* (HI) -0,8]. Sementara itu, leusin dengan RIF membentuk ikatan karbon dan hidrogen yang merupakan jenis ikatan yang sangat non-polar (HI +3,8). Substitusi yang dilakukan dengan *Pymol* menggunakan asumsi bahwa tidak ada perubahan pada struktur tiga dimensi residu asam amino yang lain.

Mutasi pada *rpoB526* yang terdeteksi pada penelitian ini mengubah asam amino histidin menjadi arginin atau tirosin. Seperti terlihat pada gambar di bawah ini, akibat utama adanya mutasi di residu 526 adalah perubahan jarak residu dengan RIF sehingga menyebabkan ikatan antara residu dengan RIF lebih lemah dibandingkan dengan residu *wild-type*.

Isolat P1 (Papua 1) dan Papua 5 berturut-turut mengalami mutasi yang mengubah asam amino residu Gln513Leu dan Ser512Trp, sedangkan isolat R12 mengalami mutasi ganda residu Asp516Gly dan Pro552Ser. Mutasi pada isolat L1 ditemukan oleh mahasiswa lain dalam kelompok penelitian yang sama (Tanjung and Ngili, 2016) Tingkat resisten yang dimiliki oleh ketiga isolat tersebut sangat tinggi, yaitu ≥ 300 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini memperlihatkan bahwa perubahan asam amino yang jaraknya sangat dekat dengan RIF, yaitu perubahan residu 512, 516, dan 531 menyebabkan isolat *M. tuberculosis* memiliki tingkat resisten yang tinggi terhadap RIF.

Data mengenai mutasi A1534T dan C1536G (kodan *rpoB512*) pada isolat R5,

serta mutasi C1548T (kodon *rpoB516*) dan C1654T (kodon *rpoB552*) pada isolat R12 belum pernah dipublikasikan pada jurnal penelitian sebelumnya. Mutasi A1534T dan C1536G pada isolat R5 yang mengubah residu Ser512Trp, serta mutasi C1548T pada isolat R12 yang mengubah residu Asp516Gly masih membutuhkan analisis lebih lanjut. Mutasi ini hanya diketahui berdasarkan hasil penentuan urutan nukleotida menggunakan primer balik dan belum dikonfirmasi dengan hasil penentuan urutan nukleotida menggunakan primer maju. Sementara itu, mutasi C1654T pada isolat R12 telah dapat diketahui secara pasti karena hasil analisis penentuan urutan nukleotida telah dilakukan menggunakan primer maju dan balik.

Mutasi C1654T pada isolat Papua 12 menyebabkan terjadinya perubahan asam amino prolin menjadi serin. Prolin adalah asam amino non-polar sedangkan serin bersifat polar. Kedua asam amino tersebut cenderung memiliki pH yang netral. Selain itu, penentuan urutan nukleotida isolat R12 menggunakan primer balik mendeteksi adanya mutasi lainnya, yaitu *rpoB516*. Pemodelan interaksi RIF dengan residu *rpoB* memperlihatkan bahwa penggantian residu *rpoB516* menjadi glisin akibat perubahan nukleotida C1548T menyebabkan bertambahnya jarak antara residu tersebut dengan RIF bila dibandingkan dengan residu sebelumnya yaitu asam aspartat.

Glisin adalah asam amino yang memiliki sifat non-polar dengan pH netral sedangkan asam aspartat polar yang cenderung asam. Kedua sifat asam amino ini sangat berbeda sehingga adanya penggantian menyebabkan efek yang sangat besar terhadap interaksi menyeluruh RIF dan RNA polimerase subunit- β . Model pengikatan RIF pada RNA polimerase digunakan dengan bantuan program *software Pymol*.

Selain mutasi C1548T dan C1654T yang mengubah asam amino, isolat R12 juga mengalami beberapa mutasi bisu, yaitu A1617C dan G1632C. Mutasi bisu G1632C tidak hanya terdapat pada isolat P12 tetapi juga terdapat pada isolat P11 dan beberapa mutasi bisu C1668T, G1671T, dan G1695A

pada isolat P5. Isolat P9 mengalami mutasi ganda *rpoB531* dan *rpoB550* yang mengubah residu valin menjadi metionin. Valin dan metionin memiliki sifat yang sama, yaitu non-polar dengan pH netral. Walau demikian, mutasi *rpoB531* pada isolat L9 telah cukup membuat isolat tersebut resisten terhadap RIF dengan tingkat resisten di atas 300 $\mu\text{g/ml}$.

Mutasi di nukleotida C1604A (kodon *rpoB535*) pada isolat P4 mengubah residu Pro535His. Prolin adalah jenis asam amino non-polar dengan pH netral yang membawa gugus imino, sedangkan histidin bersifat polar dengan pH basa karena membawa rantai samping gugus basa [4, 18-20]]. Kedua sifat asam amino ini sangat berbeda dan letak residu asam amino yang tidak terlalu jauh dari RRDR seharusnya mengubah fenotipe isolat S4 menjadi resisten RIF. Kendala ini kemungkinan berasal dari kesalahan pembacaan hasil uji sifat resisten yang hanya memiliki batas perbedaan 1% jumlah pertumbuhan koloni *M. tuberculosis* pada tabung kontrol dan tabung uji yang mengandung RIF. Pertambahan jumlah koloni yang berhubungan dengan lamanya waktu inkubasi yang belum memiliki standar (antara 4-6 minggu), dapat menyebabkan perbedaan hasil antara fenotipe dengan genotipe isolat tersebut. Kemungkinan lainnya adalah tidak seluruh mutasi *rpoB* dapat menimbulkan resistensi terhadap RIF. Analisis penentuan urutan nukleotida isolat P4 dilakukan dengan dua arah, yaitu menggunakan primer maju dan balik dan keduanya menunjukkan hasil yang sama. Penelitian lainnya berhasil mendeteksi *rpoB535* pada isolat MDR-TB yang juga *rpoB516*.

SIMPULAN

Sebanyak empatpuluh dua MDR-TB yang berasal dari Laboratorium Tb RSUD, Jayapura, digunakan pada studi ini. Sebagian besar isolat MDR-TB tersebut resisten terhadap obat antituberkulosis lainnya, dan frekuensi mutasi *rpoB526* dan *rpoB531* hampir sama tetapi mutasi *katG315* hanya terdapat pada 16 isolat. Studi ini berhasil mendeteksi mutasi selain kodon *rpoB526* atau *rpoB531*

yang belum pernah dipublikasikan, di antaranya adalah mutasi C1307T (Asp516Gly), T1374A dan A1376C (Ser539Thr), serta C1413T (Pro552Ser). Adanya perubahan nukleotida C1363A (Pro535His) pada *M. tuberculosis* yang sensitif enam obat antituberkulosis menunjukkan tidak seluruh mutasi *rpoB* menimbulkan sifat resisten. Isolat yang mengalami mutasi *rpoB531* memiliki tingkat resistensi terhadap rifampin relatif lebih tinggi dibandingkan mutasi kodon lainnya, sedangkan mutasi *katG315* dan *rpoB526* memiliki tingkat resistensi masing-masing terhadap isoniazid dan rifampin relatif lebih rendah. Atas dasar fenomena ini, dapat diusulkan bahwa mekanisme terbentuknya galur MDR-TB diawali dengan mutasi *rpoB* yang diikuti dengan mutasi *katG*. Studi ini memperlihatkan bahwa mekanisme resistensi terhadap suatu OAT yang hanya mempengaruhi satu gen, misalnya rifampin yang mempengaruhi *rpoB*, akan lebih mudah dikontrol daripada OAT yang mempengaruhi beberapa gen, misalnya isoniazid yang mempengaruhi gen-gen lainnya selain *katG*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada direktorat riset dan pengabdian masyarakat (DRPM), Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan bantuan dana penelitian. Juga kepada laboratorium biokimia, Institut Teknologi Bandung (ITB) atas fasilitas laboratorium biokimia sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik. Terakhir, kami mengucapkan terima kasih kepada MacroGen Inc., Korea Selatan atas bantuan sekuensing Mtb.

DAFTAR PUSTAKA

- Corbett, E.L., Watt, C.J., Walker, N., Maher, D., Williams, B.G., Raviglione, M.C dan Dye, C. *Arch Intern Med.* **2003.** 163:1009-1021
- Glynn, J.R., Whiteley, J., Bifani, P.J., Kremer, K. dan Van Solingen, D. *Emerg Infect Dis.* 2002. 8:843-850
- Hirano, K., Abe, C. dan Takahashi M. *J Clin Microbiol.* **1999.** 37: 2663-2666
- Höfling, C.C., Pavan, E.M., Giampaglia, C.M.S., Ferrazoli, L., Aily, D.C.G., de Albuquerque, D.M. dan Ramos, M.C. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2005.** 9(1): 87–93
- Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A. dan Darst, S.A. *Science.* **2000.** 289: 619-625
- Maksum IP, Farhani A, Rachman SD, and Ngili Y. *Int J ChemTech Res.* **2013.** 5(2): 441-450.
- Mikhailovich, V., Lapa, S., Gryadunov, D., Sobolev, A., Strizhkov, B., Chernyh, N., Skotnikova, O., Irtuganova, O., Moroz, A., Lituinov, V., Vladimirovskii, M., Perelman, M., Chernousova, L., Erokhin, V., Zasedatelev, A. dan Mirzabekov, A. *J Clin Microbiol.* **2001.** 39: 2531-2540
- Mokrousov, I., Otten, T., Filipenko, M., Vyazovaya, A., Chrapov, E., Limeschenko, E., Steklova, L., Vyshnevskiy, B. dan Narvskaya, O. *J Clin Microbiol.* **2002.** 40: 2509-2512
- Pierattelli, R., Banci, L., Eady, N.A.J., Bodiguel, J., Jones, J.N., Moody, P.C.E., Raven, E.L., Jamart-Gregoire, B. dan Brown, K.A. *J Biol Chem.* **2004.** 279: 39000-39009
- Putman, M., van Veen, H.W. dan Konings, W.N. *Proc Natl Acad Sci.* **1996.** 93: 10668-10672
- Ramaswamy, S.V., Dou, S.-J., Rendon, A., Yang, Z., Cave, M.D. dan Graviss, E.A. *J Med Microbiol.* **2004.** 53: 107-113
- Rie, A.V., Warren, R., Mshanga, I., Jordaan, A.M., Spuy, G.D., Richardson, M., Simpson, J., Gie, R.P., Enarson, D.A., Beyers, N., Helden, P.D. dan Victor, T.C. *J Clin Microbiol.* **2001.** 39: 636-641
- Siallagan J, Maryuni A, Jukwati, and Ngili Y. *Der Pharma Chemica.* **2015.** 7(9): 334-339.
- Tanjung R.H.R and Ngili, Y. *Int J PharmTech Res.* **2016.** 9(5): 334-341.
- Tanjung RHR and Ngili Y. *Der Pharma Chemica.* **2016.** 8(6): 165-173.
- Ubyaan R, Maryuni AE, Sroyer A, Palit Eiy, Jukwati, Suaka IY, and Ngili Y. *Int J PharmTech Res.* **2012.** 4(4): 1803-1811.
- Wei, C.-J., Lei, B., Musser, J.M. dan Tu, S.C. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003.** 47: 670-675
- Yue, J., Shi, W., Xie, J., Li, Y., Zeng, E. dan Wang, H. *J Clin Microbiol.* **2003.** 41: 2209-2212
- Zanden, Van der, A.G.M., Te-Koppele Vije, E.M., Banu, N.V., Van Soolingen, D. dan Schouls, L.M. *J Clin Microbiol.* **2003.** 41: 1101-1108