

PROSEDING

SEMINAR NASIONAL BASIC SCIENCE III

Tema:

*Kontribusi Sains untuk Pengembangan Pendidikan,
Biodiversitas dan Mitigasi Bencana pada Daerah Kepulauan*



Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Pattimura

Ambon 2010

ISBN : 978-602-97522-0-5

PROSEDING

SEMINAR NASIONAL BASIC SCIENCE II

Kontribusi Sains Untuk Pengembangan Pendidikan,
Biodiversitas dan Mitigasi Bencana
Pada Daerah Kepulauan



SCIENTIFIC COMMITTEE:

Prof. H.J. Sohilait, MS
Prof. Dr. Th. Pentury, M.Si
Dr. J.A. Rupilu, SU
Drs. A. Bandjar, M.Sc
Dr.Ir. Robert Hutagalung, M.Si

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PATTIMURA
AMBON, 2010**

2 Juli 2010

ANALISIS MUTASI GEN *rpoB* ISOLAT KLINIS *Mycobacterium tuberculosis* YANG MULTIDRUG-RESISTANTSemuel Unwakoly^{1,3}, Bertha Kusnandar^{2,3}, Rachel Turalely^{1,4}¹Program Studi Pendidikan Kimia FKIP – Unpatti Ambon, ²SMA St. Alloysius Bandung,³Jurusan Kimia – Biokimia Institut Teknologi Bandung,⁴Jurusan Bioteknologi Universitas Gadjah Mada**ABSTRAK**

Mycobacterium tuberculosis (*M. tb*) adalah bakteri penyebab penyakit infeksi menular tuberkulosis (TB). Sampai saat ini penyakit TB masih merupakan pandemi yang menular melalui dahak sputum (penderita). Pengobatan penyakit ini menggunakan kombinasi antibiotik selama minimal 6 bulan, antara lain rifampin, isoniazid, kanamisin, streptomisin, etambutol dan pirazinamid. Tetapi pengobatan yang tidak teratur dan tidak tuntas menyebabkan timbulnya resistensi terhadap obat-obat antibiotik tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan urutan nukleotida fragmen gen *rpoB* *M. tb* melalui PCR multipleks. Tahap penelitian diawali dengan metode amplifikasi DNA *M. tb* dengan teknik PCR diikuti elektroforesis menggunakan gel agarosa, dilanjutkan dengan sekuensing kemudian dilakukan analisis *in silico*. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita fragmen DNA yang masing-masing berukuran sekitar 0,25 kb. Hasil penajajaran isolat L18 dengan galur standar H37Rv memberikan informasi genotip yang sama yaitu adanya mutasi pada posisi 1349. Mutasi isolat L18 tersebut adalah mutasi substitusi yang merupakan penggantian satu basa nukleotida sitosin menjadi timin (C1349T). Rifampin merupakan antibiotik yang menghambat inisiasi transkripsi RNA polimerase subunit β dari *M. tb*. Resistensi bakteri *M. tb* terhadap rifampin disebabkan adanya mutasi pada gen *rpoB* yang merupakan gen pengkode enzim RNA polimerase subunit β .

Kata kunci : rifampin, gen *rpoB*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Multidrug Resistant*.

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit menular yang dapat menyerang semua jenis kelamin dan semua umur adalah tuberkulosis (TB). Penyakit ini merupakan penyakit infeksi menular dengan tingkat kematian yang tinggi dan disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*). Penyebaran penyakit TB terjadi dari orang ke orang melalui dahak (sputum) dan percikan dahak yang dibatukkan (*droplet nuclei*). TB dapat menyerang otak, ginjal, dan paling utama adalah paru-paru, dengan gejala batuk berdahak yang terus menerus selama tiga minggu atau lebih. Batuk tersebut dapat berupa

2 Juli 2010

dahak bercampur darah disertai demam, rasa nyeri di dada, keringat malam, berkurangnya nafsu makan, dan penurunan berat badan (Aditama, 2006).

Bakteri tuberkulosis yang berupa basil tuberkel menyerang organ tubuh, terutama paru-paru. Negara-negara berkembang di Asia dan Afrika belum terbebas dari TB, salah satunya adalah Indonesia yang menempati peringkat ketiga dunia (data WHO, 2007). Tingginya kasus TB di Indonesia diperkirakan akibat dari pengobatan yang tidak tuntas sehingga basil tuberkel menjadi resisten terhadap obat-obatan anti tuberkulosis (OAT) dan juga akibat menurunnya sistem kekebalan tubuh. Bakteri tuberkulosis merupakan bakteri yang pertumbuhan dan pembelahannya lambat (15-20 jam) dibandingkan bakteri lain misalnya *E. coli* (20 menit). Siklus yang panjang tersebut menyebabkan pengobatan penyakit TB membutuhkan waktu minimal 6 bulan dengan mengkonsumsi kombinasi 2 jenis obat lapis pertama, antara lain rifampin (RIF) dan isoniazid (INH). Obat yang dikonsumsi haruslah teratur sampai dinyatakan sembuh. Kesalahan pengobatan dan ketidaktepatan dosis dapat menyebabkan basil tuberkel menjadi resisten terhadap antibiotiknya. Sulitnya memberantas penyakit TB diakibatkan timbulnya sifat kebal atau resisten terhadap antibiotik. Resistensi ini sudah ada tak lama sejak diperkenalkannya OAT. Resistensi TB terbagi menjadi dua jenis, resistensi terhadap satu jenis OAT dan resistensi terhadap lebih dari satu jenis OAT (Hirano dkk., 1999). WHO telah menetapkan istilah MDR-*M. tb*, *multidrug-resistant M. tb*, yaitu resisten terhadap paling tidak dua jenis antibiotik sekaligus yaitu RIF dan INH (Zager dan Mc Nerney, 2008). Karakteristik fenotip berupa resistensi bakteri *M. tb* terhadap OAT terjadi karena adanya mutasi yang merupakan karakteristik genotip, pada gen yang mengkode target antibiotik atau gen yang berperan dalam interaksi antibiotik dengan targetnya. Resistensi terhadap rifampin terjadi karena mutasi pada gen *rpoB* pengkode RNA polimerase (RNAP) subunit β , sehingga RIF tidak dapat menjalankan fungsinya dalam menghambat proses inisiasi transkripsi (Mulligan, 2003; Zenkin dan Severinov, 2004). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya mutasi pada fragmen gen *rpoB* isolat klinis *M. tb* melalui PCR multipleks yang merupakan penyebab resisten RIF.

BAHAN DAN METODE

Pada penelitian ini digunakan beberapa sampel isolat klinis MDR-*M. tb* dari peneliti sebelumnya (Noviana, 2007), yaitu isolat L18. Isolat-isolat berupa spesimen klinis dahak atau cairan paru-

2 Juli 2010

paru penderita TB dari Rumah Sakit Rontisulu, Bandung dan laboratorim BPLK, Departemen Kesehatan. Sebagai galur standar digunakan hasil lisis *M. tuberculosis H37Rv* (ATCC25618). Untuk amplifikasi dengan alat PCR diperlukan *master mix* berupa komponen-komponen stok dengan merk MDBio. Inc., Taipei, Taiwan, yang terdiri atas bufer PCR 10x (KCl 0,5 M, Tris-Cl 0,1 M pH 9 suhu 25°C), MgCl₂ 25 mM, dNTP 10 mM, primer RF 20 pmol/μL, primer RR 20 pmol/μL, *Taq DNA polymerase* 5 U/μL dan ddH₂O steril. Hasil PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5% (b/v) (0,6 g agarosa dalam 40 mL bufer TAE 1X (40 mM tris asetat dan 1 mM EDTA pH 8,0) yang mengandung 2 μL EtBr 10 mg/mL), dan *loading buffer* (sukrosa 50%, EDTA 0,1 M dan bromfenol biru 0,1% pH 8,0). Pada gel elektroforesis digunakan penanda plasmid pUC19/*HinfI* 30 ng/μL, yang terdiri atas lima pita pada gel elektroforesis dengan ukuran 1,419 kb, 0,517 kb, 0,397 kb, 0,214 kb, dan 0.075 kb.

Amplifikasi fragmen DNA gen *rpoB* isolat menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan dengan 20 μL *master mix*, masing-masing 5 μL templat DNA isolat klinis L18 dan R9. Untuk kontrol positif digunakan *master mix* PCR yang sama, dengan templat DNA berupa *M. tb H37Rv* bervolume sama, pada kontrol negatif templat DNA diganti dengan ddH₂O steril bervolume sama pula. Primer yang digunakan masing-masing memiliki 17 pb dengan urutan nukleotida 5'-GTCGCCGCGATCAAGGA-3' untuk primer *forward* (RF) dan urutan nukleotida 5'-TGACCCGCGCGTACACA-3' untuk primer *reverse* (RR). Primer yang digunakan mengamplifikasi fragmen DNA sepanjang 0,25 kb (Mokrousov dkk., 2003) mulai urutan basa 1252 sampai 1501.

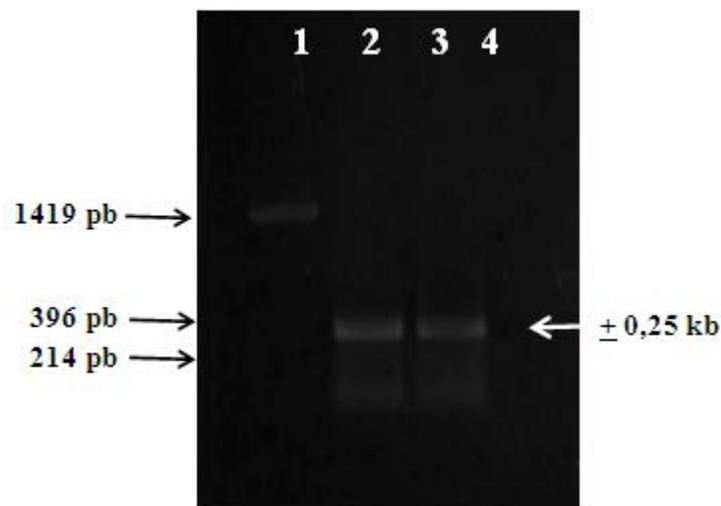
Tahapan proses PCR meliputi tahap denaturasi awal pada 94°C selama 1 menit, lalu 30 siklus PCR dengan masing-masing siklus terdiri atas denaturasi pada 94°C selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) pada 50°C selama 1 menit, perpanjangan rantai pada 72°C selama 1 menit, dan pemantapan pada 72°C selama 4 menit (Noviana, 2007). Setelah PCR, hasilnya dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% (b/v) dan *running buffer* TAE 1X, pada tegangan 80 Volt, arus 400A selama 45 menit. Pada prosesnya digunakan 5 μL penanda pUC19/*HinfI* dan 5 μL hasil PCR yang dicampur dengan 2 μL *loading buffer*. Hasil elektroforesis berupa pita DNA pada gel dilihat dengan bantuan sinar UV dan hasil ini didokumentasikan.

2 Juli 2010

Ukuran fragmen DNA dapat diketahui dengan membandingkan pita hasil PCR terhadap pita penanda. Untuk mengetahui konsentrasi DNA sampel dilakukan dengan membandingkan intensitas pita DNA sampel dengan intensitas pita penanda. Konsentrasi DNA perlu diketahui untuk penentuan urutan nukleotida (sekuensing) dengan konsentrasi 800-1000 ng. Analisis *in silico* urutan nukleotida fragmen DNA gen *rpoB* hasil sekuensing menggunakan program *SeqManTM II* dan *MegAlignTM* DNASTAR untuk mengetahui adanya mutasi pada fragmen DNA antara isolat-isolat klinis dengan urutan nukleotida galur standar *M. tb* H37Rv.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi fragmen DNA gen *rpoB* *M. tb* dapat di lihat dari visualisasi hasil elektroforesis gel agarosa pada gambar 3.1. Pita pada gambar mewakili, penanda pUC19/*Hinf*I, kontrol positif H37Rv, isolat L18, dan kontrol negatif secara berurutan.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis *M.tuberculosis* H37RV dan isolat L18 MDR-TB. Tampak pada gambar lajur 1 adalah penanda (*marker*) DNA puC19/*Hinf*I, lajur 2 *M.tuberculosis* galur alami H37Rv, lajur 3 isolat L18 MDR-TB, dan lajur 4 adalah kontrol negatif. Pada gambar tampak kedua pita sampel berukuran 0,25 kb.

Berdasarkan data tersebut diperkirakan hasil pita DNA H37Rv dan isolat L18 MDR-*M. tb* berukuran 0,25 kb. Ukuran fragmen DNA yang diperoleh sesuai dengan perkiraan panjang fragmen yang menggunakan primer RF dan primer RR pada program *Editseq*, DNASTAR. Hasil

2 Juli 2010

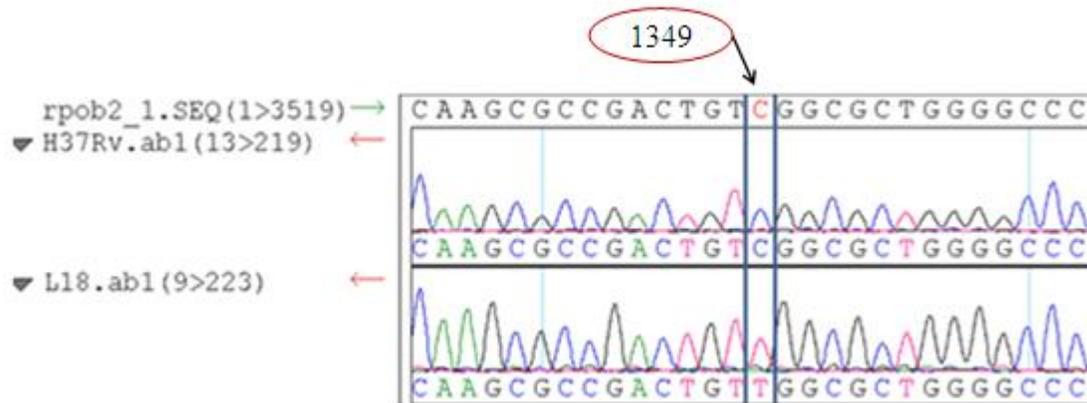
PCR tersebut divalidasi dengan kontrol positif dan kontrol negatif yang digunakan. Kedua kontrol berjalan dengan baik, ditunjukkan dengan tidak adanya pita DNA pada hasil PCR kontrol negatif dan adanya dua pita DNA berukuran 0,25 (sesuai jenis PCR multipleks yang dilakukan) pada hasil PCR kontrol positif.

Intensitas masing-masing fragmen DNA dibandingkan terhadap intensitas penanda DNA pUC19/*Hinf*I memperlihatkan bahwa intensitas semua pita sampel terletak pada posisi di antara intensitas pita dua dan pita tiga penanda. Hasil perbandingan ini digunakan untuk memperkirakan konsentrasi setiap fragmen DNA.

Konformasi adanya mutasi dilakukan dengan mensejajarkan basa-basa nukleotida isolat L18 dengan H37Rv. Hasil penjajaran isolat L18 dengan gen *rpoB* *M. tb* H37Rv menunjukkan bahwa pada posisi 1349 terdapat perbedaan urutan nukleotida, yang ditunjukkan dengan adanya puncak berwarna biru pada H37Rv, sedangkan pada posisi yang sama isolat L18 berwarna merah (Gambar 3.2). Perbedaan urutan nukleotida pada posisi 1349 mengindikasikan terdapat mutasi dari basa sitosin (C) menjadi basa timin (T) yang merupakan mutasi substitusi yaitu penggantian satu basa nukleotida sitosin menjadi timin C(1349)T. Mutasi C(1349)T pada gen *rpoB* yang terjadi di daerah *Rifampin resistance determining region* (RRDR) merupakan mutasi yang umum dengan frekuensi tinggi untuk isolat-isolat *M. tb* yang resisten rifampin.

Mutasi yang terjadi pada gen *rpoB* akan mengubah konformasi dan pelipatan protein pada daerah sekitar residu yang termutasi sehingga dapat mempengaruhi kantung pengikatan RIF, hal ini mengakibatkan afinitas pengikatan RIF terhadap RNAP subunit β menjadi berkurang sehingga RIF tidak dapat menghambat RNAP dan bakteri menjadi resisten terhadap antibiotik tersebut. Oleh karena mutasi tersebut berkaitan dengan sifat resistensi rifampin yang diperoleh, maka diduga kuat bahwa penyebab resistensi isolat L18 adalah mutasi C(1349)T.

2 Juli 2010



Gambar 2. Analisis Elektroforegram H37Rv, dan Isolat L18.
 Pada posisi 1349 puncak untuk H37Rv berwarna biru (C),
 sedang isolat L18 berwarna merah (T).

Di antara sekian banyak gen yang terdapat pada genom *M. tuberculosis* tersebut, mutasi pada beberapa gen bertanggung jawab dalam menyebabkan sifat resistensi bakteri ini terhadap antibiotik. Mutasi penyebab resistensi terjadi pada gen yang mengkode protein target antibiotik atau gen yang mengkode protein yang membantu interaksi antara antibiotik dan targetnya. Mutasi-mutasi yang ditemukan pada isolat *M. tb* yang resisten terhadap obat tertentu memberikan tambahan pengetahuan mengenai penyebab dan mekanisme resistensi yang sangat berguna bagi pengembangan obat baru dalam menangani masalah resistensi TB.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa adanya mutasi substitusi pada isolat *Multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis* (MDR *M. tb*) yaitu isolat L18 pada perubahan basa sitosin (C) menjadi timin (T). Mutasi tersebut berkaitan dengan sifat resistensi rifampin yang di duga kuat merupakan penyebab resistensi obat antibiotik TB.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditama, T.Y. (2006). TBC Pembunuh Dua Juta Jiwa, *Ethical Digest*, **23**, 38-41.
- Hirano, K., Abe, C., dan Takahashi, M. (1999). Mutations in the *rpoB* Gene of Rifampin-Resistant *M. tb* Strains Isolated Mostly in Asian Countries and Their Rapid Detection by Line Probe Assay, *Journal of Clinical Microbiology*, **37** (8), 2663-2666.

2 Juli 2010

- Mokrousov, I., Otten, T., Vyshnevskiy, B., Narvskaya, O. (2003). Allele-Specific *rpoB* PCR Assays for Detection of Rifampin-Resistant *M. tb* in Sputum Smears, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47 (7)**, 2231–2235.
- Noviana, H. (2007). *Hubungan Multidrug-resistant M. tb dengan Gen-gen yang Terkait dan Pengaruh Mutasi Terhadap Tingkat Resistensi Rifampin dan Isoniazid*, Disertasi Program Doktor, Institut Teknologi Bandung.
- Zager, E.M. dan McNerney, R. (2008). Multidrug-Resistant Tuberculosis, *BMC Infectious Diseases*, **8 (10)**, 1-5.
- Zenkin, N. dan Severinov, K. (2004). The role of RNA Polymerase σ Subunit in Promoter-independent Initiation of Transcription, *PNAS*, **101 (13)**, 4396–4400.