

LAMPIRAN

Lampiran 1

Prosedur Pemeriksaan MTB/RIF dengan PCR dan sekuensing

A. Pengumpulan spesimen

1. Sediakan pot dahak bertutup ulir, baru, bersih, transparan, dan bermulut lebar
2. Tuliskan nomor identitas spesimen dahak
3. Pengumpulan dahak dilakukan di tempat berdahak (sputum booth) atau di ruangan terbuka yang mendapat sinar matahari langsung
4. Kumur dengan air minum sebelum mengeluarkan dahak
5. Tarik napas dalam sebanyak 2-3 kali dan setiap kali hembuskan napas dengan kuat
6. Batukkan dengan keras dari dalam dada dan keluarkan dahak ke dalam pot
7. Bersihkan mulut dengan tisu dan buang tisu pada tempat sampah tertutup yang sudah disediakan
8. Cuci tangan dengan sabun antiseptik lalu bilas dengan air mengalir

B. Alat Bahan dan Cara Kerja

1. Kultur *Mycobacterium tuberculosis*

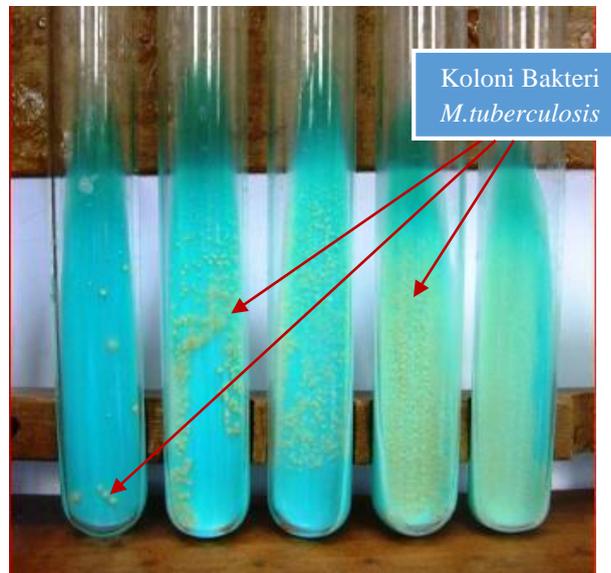
- a. Media LJ disiapkan dengan menimbang 18.65 gram medium dasar LJ dan dilarutkan ke dalam 300 ml aquadest
- b. Ditambahkan 6 ml gliserol dan 10 ml larutan *malachite green* 2%
- c. Kemudian, larutan disterilkan dalam *autoclaved* pada 121°C selama 30 menit dan didinginkan
- d. Tambahkan telur yang telah dihomogenkan 500 ml dan dicampurkan
- e. Kemudian medium dibagikan ke dalam tabung bertutup ulir sebanyak 6-8 ml. Tutup botol.
- f. Sebar secara merata bahan pemeriksaan tersebut diatas permukaan media dengan cara menggerak-gerakkan botol
- g. Letakkan botol-botol pada rak dengan kemiringan 30° selama 24 jam pada incubator dengan suhu 35-37°C
- h. Setelah 24 jam, kencangkan tutup botol dan letakkan botol pada rak tabung dengan posisi tegak dan lanjutkan inkubasi
- i. Amati pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* setiap minggu. Pengamatan dilakukan sampai 8 minggu.

Tabel 1. Pembacaan Hasil Kultur

Pembacaan	Pencatatan
➤ 500 koloni	+4

200 – 500 koloni	+3
100 – 200 koloni	+2
20 – 100 koloni	+1
1-19 koloni	Jumlah koloni
Tidak ada pertumbuhan	Negatif

Sumber : Ariami, P, dkk, 2014



Sumber : Girsang, M, 2016

Gambar. Koloni MTB yang tumbuh pada media LJ

2. Isolasi DNA dari *Mycobacterium tuberculosis*

Isolat klinis yang tumbuh dalam media Lowenstein Jensen diekstraksi DNA nya dengan memanen isolat bakteri tersebut dengan cara menambahkan larutan NaCl 0,9%. Ekstraksi DNA dilakukan dengan cara melisis sel bakteri yang telah dipanen, dengan larutan TE (Tris-EDTA) 1x, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) dan proteinase-K, kemudian ditambahkan larutan fenol-kloroform-isoamil alkohol (24:1). Presipitasi DNA dilakukan dengan menambahkan etanol dan sentrifugasi dengan kecepatan tinggi. Untuk proses PCR, pelet DNA yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan larutan buffer TE satu kali.

3. Proses PCR dan elektroforesis

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan PCR, dengan menggunakan masing-masing primer, karena produk hasil PCR akan digunakan untuk bahan analisa selanjutnya yaitu sekuensing.

- a. Dilakukan amplifikasi hasil ekstraksi DNA terdiri dari: fastard mix PCR 25 ul, primer 1,0 μ M (*Forward Primer dan Reverse Primer*) 1.0 μ l , aquabidest 12 ul, dan 5 ul templet 0,1 ug dihomogenkan.

- b. Untuk kontrol positif (+), DNA template sampel diganti dengan DNA isolat *M. tuberculosis* dan kontrol negatif (-) menggunakan aquabidest steril.
- c. Selanjutnya, pencampuran bahan – bahan tersebut dilakukan pada eppendrof 200 ml dalam box pendingin supaya DNA dan enzim yang digunakan tidak rusak.
- d. Campuran di *spin down* dan selanjutnya di masukkan dalam mesin PCR *thermal cycler* untuk amplifikasi dengan kondisi :

Hotstart : 94°C, 4 menit	1x
Denaturasi : 94°C, 1 menit	} 38x
Annealing : 60°C, 1 menit	
Elongasi : 72°C, 1 menit	
Elongasi post PCR : 72°C, 4 menit	
- e. Hasil amplifikasi kemudian di elektroforesis dalam gel yang terbuat dari agarose 0,8 gr, dilarutkan dalam 40 ml larutan TBE (*Tris Borate EDTA*)1X.
- f. Gel diletakkan dalam bak elektroforesis dan dialiri arus listrik 100 volt selama 40 menit. Selanjutnya hasil elektroforesis dibaca dengan alat visualisasi (Kurniawan, E, dkk, 2015).

4. Sekuensing produk PCR

Sampel yang akan disekuensi dapat berasal dari hasil klon atau hasil PCR. *Cycle sequencing* merupakan proses pelabelan DNA dengan ddNTP yang telah dilabel dengan *dye fluorescens* dengan mesin PCR. Bahan yang dibutuhkan berupa master mix PCR biasa ditambah dengan ddNTP yang berfungsi sebagai terminator sehingga rantai DNA tidak terpolimerisasi pada ujung 3'OH. Purifikasi lanjutan diperlukan jika DNA template yang digunakan merupakan hasil PCR. Purifikasi ini bertujuan untuk membersihkan DNA template dari sisa-sisa pereaksi PCR. Selanjutnya di denaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit kemudian dilakukan run (elektroforesis di dalam sekuenser) yang selanjutnya diolah dalam computer dan disajikan dalam kromatogram (Ridwan, R, 2008).

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

Lampiran 3

Artikel Penelitian

**Identifikasi Mutasi Gen *rpoB Ser531Leu* *Mycobacterium tuberculosis*
Yang Berhubungan Dengan Resistensi Rifampisin**

**The Identification of *rpoB Ser531Leu* *Mycobacterium tuberculosis*
Gene Mutation That Associate with Rifampicin Resistance**

Ella Amalia¹, Maghribah Rahayu Nurdiana², Lusia Hayati³, dan Dwi Handayani⁴

1. Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
2. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
3. Departemen Biologi Medik Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
4. Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya

Alamat Korespondensi: maghribahrahayu@yahoo.co.id

Abstrak

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Kasus resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampisin sudah banyak dilaporkan di dunia termasuk Indonesia. Resistensi terhadap rifampisin pada *M. tuberculosis* sebagian besar disebabkan mutasi gen *rpoB* yang menyandi RNA polimerase subunit β . Mutasi gen *rpoB Ser531Leu* yang berhubungan dengan resistensi terhadap Rifampisin paling sering terjadi. Adanya mutasi pada *rpoB* akan menyebabkan perubahan pada struktur dan aktivitas target obat. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi mutasi gen *rpoB Ser531Leu* *Mycobacterium tuberculosis* pada sampel yang diambil dari penderita tuberkulosis paru di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif terhadap 40 penderita tuberkulosis paru di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Identifikasi mutasi gen *rpoB Ser531Leu* *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan dengan teknik *Multiplex Polymerase Chain Reaction* menggunakan primer *rpoB531*. Dari 40 isolat gen *rpoB* kodon 531 didapatkan 70% (21 dari 30) terjadi mutasi, *wild type* sebanyak 9 isolat (30%) dan isolat yang tidak menghasilkan pita sebanyak 10 isolat. Telah ditemukan mutasi gen *rpoB Ser531Leu* *Mycobacterium tuberculosis* pada penderita tuberkulosis paru di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang.

Kata Kunci: *Mycobacterium tuberculosis*, resistensi, rifampisin, gen *rpoB Ser531Leu*

Abstract

Tuberculosis is a contagious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *M. tuberculosis* rifampicin resistance cases were numerous reported in the world including Indonesia. The most common rifampicin resistance in *M. tuberculosis* caused by *rpoB* gene mutation that code RNA polymerase subunit β . *RpoB Ser531Leu* gene mutation that associate with Rifampicin resistance is the most common. This mutation will cause the structure and drug target activity change. This research aimed to identify *rpoB Ser531Leu* *Mycobacterium tuberculosis* gene mutation of sample that taken from pulmonary tuberculosis patient at RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. This research is a descriptive research to 40 pulmonary tuberculosis patients at RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Identification of *rpoB Ser531Leu* *Mycobacterium tuberculosis* gene mutation was done by using *Multiplex Polymerase Chain Reaction* technique with *rpoB531* primer. Out of 40 codon 531 *rpoB* gene isolates, identified 70% (21 of 30) mutation, *wild type* in 9 isolates (30%) and non-amplification isolates in 10 isolates. *rpoB Ser531Leu* *Mycobacterium tuberculosis* gene mutation of pulmonary tuberculosis patient in RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang was found.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, resistance, rifampicin, *rpoB Ser531Leu* gene

Identifikasi Mutasi Gen *rpoB* Isolat MDR *Mycobacterium tuberculosis* di Bali dengan Metode Nested PCR¹⁾
Identification Of *rpoB* Gene Mutation of MDR *Mycobacterium tuberculosis* Isolate in Bali Using Nested PCR

Sagung Chandra Yowani^{1,2)}, I Nengah Wirajana^{2,3)}

1) Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Udayana; 2) Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana; 3) Kelompok Studi MDR & XDR Tuberculosis FMIPA Universitas Udayana *Correspondence Author: cyowani@yahoo.com

¹⁾ Telah dipresentasikan pada Kongres Ilmiah IAI XX, di Jakarta, 21-23 Februari 2014

ABSTRAK

Tuberkulosis merupakan salah satu penyakit infeksi yang menjadi perhatian untuk ditangani pada program *Millennium Development Goals* (MDGs), terutama oleh meningkatnya kejadian *Multi Drug Resistance (MDR-TB)*. Menurut WHO, resistensi terhadap rifampisin dan isoniazid telah dikategorikan sebagai MDR-TB. Dari beberapa penelitian, ditemukan bahwa hampir 90 % isolat yang resisten rifampisin, juga resisten terhadap isoniazid. Oleh karena itu, resistensi terhadap rifampisin dianggap sebagai marka penentu (*surrogate marker*) kejadian MDR-TB. Resistensi terhadap rifampisin dimediasi oleh adanya mutasi pada suatu region 81 bp (RRDR : *Rifampicin Resistance Determinant Region*) dari gen *rpoB*. Penelitian ini bertujuan utamanya untuk mengeksplorasi mutasi pada gen *rpoB* dari MDR-TB yang terjadi pada penderita Tuberkulosis di Bali. Isolat MDR-TB yang digunakan pada penelitian ini merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi RS Sanglah, Denpasar. Amplifikasi dilakukan dengan metode *Nested Polymerase Chain Reaction* menggunakan sepasang *outer primer* dan sepasang *inner primer*. Hasil penelitian menunjukkan selain mutasi pada daerah RRDR, 5 dari 6 isolat yang dikerjakan memiliki titik mutasi yang sama yaitu pada kodon 418, dengan perubahan asam amino dari asam glutamat menjadi asam aspartat. Oleh karenanya, dapat disimpulkan bahwa terdapat *missense mutation*.

Kata Kunci : *Nested PCR*, MDR-TB, Mutasi gen *rpoB*

ABSTRACT

Tuberculosis is one of the infectious diseases that is important to be treated in *Millennium Development Goals* (MDGs) programme, mainly due to the increasing of *Multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB)* cases. According to WHO, MDR-TB was defined as tuberculosis caused by strains of *Mycobacterium tuberculosis* that are resistant to at least isoniazid and rifampicin. Several studies found that nearly 90% of rifampin-resistant isolates, were also resistant to isoniazid. Therefore, resistance to rifampicin is a surrogate marker of MDR. Resistance to rifampicin is mediated by



Study of the Rifampin Mono-resistance Mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*

Yu Pang,^a Jie Lu,^b Yufeng Wang,^a Yuanxuan Song,^a Shengfen Wang,^a Yanlin Zhao^a

^aNational Center for Tuberculosis Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China; ^bInstitute of Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing, China^a

Rifampin (RIF) susceptibility is a key factor in determining the treatment effectiveness of the standardized treatment regimens. In *Mycobacterium tuberculosis*, both target gene mutation and the efflux pump play major roles in the resistance to antituberculosis drugs. By eliminating RIF-resistant strains with *rpmB* mutation, the choice of RIF-mono-resistant strains may allow us to identify the RIF-specific efflux pump genes. This study explored the RIF mono-resistance mechanism in *M. tuberculosis*. Data from DNA sequencing and MIC measurements revealed that specific mutations, including Ser531Leu and His526Asp in *RpoB*, show high-level drug resistance. Three-dimensional structure modeling provided further evidence that the affinity between RIF and *RpoB* mutants was in accordance with the drug resistance level of the corresponding isolates. Furthermore, transcription-level analysis among the nonmutated isolates indicated that three efflux pumps (Rv0785, Rv2936, and Rv0933) might be involved in exporting RIF from the cell. Compared to 8 µg/ml for wild-type *Escherichia coli*, the MICs for the transgenic *E. coli* strains with either Rv0785 or Rv2936 were 32 and 16 µg/ml, respectively. In conclusion, our study indicated that several *RpoB* mutant types, including Ser531Leu and His526Asp, show high-level RIF resistance attributed to low affinity between *RpoB* mutant proteins and RIF. In addition, this work demonstrates that Rv2936 and Rv0785 may be responsible for low-level resistance to RIF by exporting RIF from cells. The predicted structure of *RpoB* and the newly identified efflux pumps in this study will provide a novel approach to design new drugs and develop novel diagnosis technologies.

Tuberculosis (TB), one of the most widespread and lethal infectious diseases worldwide, caused 8.8 million incident TB cases and 1.45 million deaths in 2010 (1). With the introduction of effective antimycobacterial drugs about half a century ago, the prevalence of TB appeared to be under control (2). However, the emergence of drug-resistant TB, especially multidrug-resistant (MDR) TB, defined as resistance to at least isoniazid and rifampin (RIF), has hampered effective TB treatment and control (3). A large number of recent studies have focused on the mechanisms of drug resistance. Several molecular and genetic mechanisms have been discovered to cause the resistance to most routine anti-TB drugs, including RIF (*rpmB*), isoniazid (*katG* and *inhA*), and streptomycin (*rpsL* and *rps*) (4–6).

RIF is the most important first-line antituberculosis drug and is a key factor in determining the treatment effectiveness of the treatment regimens (7, 8). Because more than 90% of RIF-resistant strains are also resistant to isoniazid, RIF resistance can be used as a valuable surrogate marker for MDR TB (9, 10). The mechanism of action of RIF is to arrest DNA-directed RNA synthesis of *Mycobacterium tuberculosis* by interacting with the β subunit of RNA polymerase (RNAP) (8, 11). Previous research has demonstrated that *rpmB* mutations of 95% of strains with RIF resistance are more likely located in the 81-bp region (codons 507 to 535) called the RIF resistance-determining region (RRDR) (12, 13). Inside the 81-bp RRDR, mutations within codons 516, 526, and 531 are responsible for up to 90% of RIF-resistant strains (14, 15). However, not all mutations within the RRDR display the same loss of RIF susceptibility (16, 17). The amino acid alterations of codon 526 or codon 531 cause high-level resistance to RIF, the MIC of which is greater than 32 µg/ml. In contrast, mutations in codons 511, 516, 518, and 522 cause low-level resistance to RIF (8, 17). Outside the RRDR, RIF-resistant mutation is also seen in the

amino-terminal region of *rpmB*, where the mutation in codon 176 results in high-level resistance to RIF (MIC of 1 to 32 µg/ml) (8).

In addition to mutations in the RRDR of the *rpmB* gene, an efflux pump may be responsible for approximately 3% of clinical RIF-resistant *M. tuberculosis* strains with no mutation in the RRDR (4). Efflux pumps, by which various molecules are exported outside the bacteria cell, are involved in the drug resistance described in several mycobacterial species (18), and the design of new therapeutic strategies may depend on the characterization of efflux pumps (19). Several putative efflux pumps have been reported to play a role in RIF resistance in *M. tuberculosis* based on large-scale transcriptional data (4, 20).

In the past few years, several studies have reported on the relationship between the RIF resistance level and the codon mutation *rpmB* (16, 17), while no explanation has been offered for the drug resistance difference mentioned above. Hence, it is meaningful to gain an insight into RIF resistance mechanisms, which will provide a novel track to design new drugs and develop new diagnosis technologies (4). By eliminating RIF-resistant strains with an *rpmB* mutation, the choice of RIF-mono-resistant strains may allow us to identify the RIF-specific efflux pump genes. The aim of the present

Received 13 May 2012; returned for modification 11 Aug 2012

Accepted 26 November 2012

Published ahead of print 2 December 2012

Address correspondence to Yanlin Zhao, zhaoan@163.com

YF and JL contributed equally to this article.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JACI.01209-12>.

JACI 01209-12

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All rights reserved.

doi:10.1128/JACI.01209-12

Analisis Mutasi pada Kodon 531 pada Gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* Penyebab Resistensi Rifampisin
(Mutation Analysis Codon 531 of *Mycobacterium tuberculosis* *rpoB* Gen Caused Rifampicin Resistance)

YAINITA PARAMA CITA^{1*}, DWI HILDA PUTRI²

¹STIKES Istara Nusantara, Jakarta

²Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Padang

Diterima 17 Mei 2017, Disetujui 31 Juli 2017

Abstrak: Menurut WHO, diperkirakan lebih dari 3 juta orang meninggal setiap tahun akibat penyakit tuberkulosis (TB). Salah satu faktor yang menyebabkan kesulitan penanganan kemoterapi TB ternyata tidak efektif melawan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang menyebabkan TB. Efektivitas pengobatan sering terhambat oleh munculnya resistensi bakteri terhadap agen kemoterapi *M. tuberculosis*. Dari beberapa penelitian ditemukan bahwa resistensi bakteri dapat terjadi pada lebih satu jenis agen kemoterapi yang juga dikenal dengan *multi drug resistance* (MDR). *Mycobacterium tuberculosis* mengembangkan mekanisme resistensi yang berbeda dengan bakteri lain pada umumnya. Dalam prokariota, resistensi pada umumnya disebabkan oleh transfer genetik, baik melalui plasmid, transposon dan lainnya. Rangkaian referensi beta sub unit protein RNAP *M. tuberculosis* dengan nomor akses NP_215181.1 dan gen *M. tuberculosis* *rpoB* dengan nomor akses NC_000962.3 digunakan untuk mendapatkan informasi pendahuluan dari data base www.ncbi.nlm.gov dan www.uniprot.org. Analisis komposisi, profil, lokasi dan struktur protein menggunakan www.expasy.org, TMHMM dan <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>. Desain primer dilakukan dengan program desain primer. Berdasarkan analisis mutasi pada subunit beta protein RNAP *M. tuberculosis*, kodon 531 (Ser → Leu), diketahui bahwa mutasi menyebabkan perubahan pada beberapa sifat dan struktur protein. Kemungkinan perubahan yang mempengaruhi sifat resistensi bakteri terhadap antibiotik rifampisin. Namun, analisis lebih lanjut perlu dilakukan dengan analisis teknik docking.

Kata kunci: kodon 531, protein RNAP subunit Beta, *M. tuberculosis*, resistensi, rifampisin.

Abstract: According to the WHO, it is estimated more than 3 million people die every year as a result of tuberculosis disease. One factor that causes difficulty handling TB chemotherapy is not effective against the bacteria *Mycobacterium tuberculosis* that causes TB. Effectiveness of treatment is often hampered by the emergence of bacterial resistance against *M. Tuberculosis* chemotherapy agents are given. From some research found that bacterial resistance may occur in more one type of chemotherapy agent also known as *multi-drug resistance* (MDR). *M. tuberculosis* develop resistance mechanisms that are different from other bacteria. In prokaryotes, resistance is generally due to the transfer of genetic, either through plasmids, transposons and other. Reference sequence beta sub unit of RNAP protein *M. Tuberculosis* with accession number NP_215181.1 and *M. tuberculosis* *rpoB* gene with accession number NC_000962.3 used to obtain preliminary information from the data base www.ncbi.nlm.gov and www.uniprot.org. Analysis of the composition, profile, location and structure of protein using www.expasy.org, TMHMM and <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>. The primer design is done with Primer Design Program. Based on the analysis of mutation in the beta subunit of RNAP protein *M. Tuberculosis*, codon 531 (Ser → Leu), it is known that mutations cause changes in some properties and structure of proteins. Possible changes affecting the nature of bacterial resistance to antibiotics rifampicin. However, further analysis needs to be done with the analysis of the docking technique.

Keywords: codon 531, protein RNAP subunit Beta, *M. Tuberculosis*, resistance, rifampicin.

*Penulis korespondensi: hip.081281210054

Email: ainanahilka@yahoo.com

Full Length Research Paper

Rapid detection of *rpoB* and *katG* genes from the sputum of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction (PCR)-direct sequencing analysis

Song Yang^{1*}, Min Zhong², Yaoting Zhang¹ and Yiwei Wang²

¹Department of Pulmonary Disease, Dongnan Hospital Affiliated to Xiamen University, Zhangzhou, Fujian Province, China.

²Center of Tuberculosis Gene Diagnosis, Chongqing city, China.

Accepted 13 May, 2020

Rapid diagnosis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) plays a role in guiding standardized treatment regimen. Traditional drug susceptibility (DST) testing takes about six to eight weeks. Therefore, the aim of the present study is to characterize the mutations in *rpoB* and *katG* genes from the sputum specimens of MDR-TB by using polymerase chain reaction (PCR)-direct sequencing analysis and to diagnose the MDR-TB as soon as earlier. The sensitivity and specificity of this molecular DST would be assessed further. *RpoB* and *katG* genes were detected directly from the clinical sputum specimens of inpatients with MDR-TB by PCR-direct sequencing. The sensitivity, specificity of *rpoB* and *katG* gene for 48 specimens was as follows: 95.8, 100% and 93.75, 97.9%, respectively. Our study demonstrated that PCR-direct sequencing analysis was a rapid, sensitive and specific molecular approach for the mutation detection of *rpoB* and *katG* genes that are associated with multidrug-resistance clinical sputum specimens within 48 h of receipt, which is more rapid than drug susceptibility testing after the bacillus culture.

Key words: Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, polymerase chain reaction (PCR)-direct sequencing, genetic mutation, diagnosis, *rpoB*, *katG*.

INTRODUCTION

In 1882, Robert Koch made the landmark discovery that Tuberculosis (TB) is caused by an infectious agent, *Mycobacterium tuberculosis* (Koch, 1882). The World Health Organization (WHO) estimates that approximately one-third of the global community is infected with *M. tuberculosis* (Dye et al., 2002). TB is the second most common cause of death due to an infectious disease, and current trends suggest that TB will still be among the 10 leading causes of global disease burden in the year 2020 (Murray et al., 1998). China is ranked 21st among the WHO list of 22 high-burden countries, based upon

estimated total number of tuberculosis cases. There are estimated half a million cases of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) worldwide (Loddenkemper et al., 2010). Because of the very large financial implications of the treatment and spread of MDR strains due to globalization, MDR-TB has been classified as a global pandemic more deadly than AIDS, with the potential to destabilize society (Ramaswamy et al., 1998).

MDR-TB is defined as resistance to the most effective first-line anti-TB agents, at least isoniazid (INH) and rifampin (RIF). About 2 to 3% of all new TB cases worldwide are due to MDR-TB (Becerra et al., 2000; Dye et al., 1996, 2002; Espinal et al., 2001). The highest rate of MDR-TB among the new cases in the year 2007 has been found in Rus. Federation (13%) and China yield 5.0% rate of MDR-TB (Loddenkemper et al., 2010).

*Corresponding author. E-mail: yangsongq@yahoo.com.cn. Tel: (0596)2975538. Fax: (0596)2975534.



Molecular Characteristics of Rifampin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Vietnam

Nghiêm Ngọc Minh,^a Nguyễn Văn Bắc,^a Nguyễn Thái Sơn,^b Vũ Thị Kim Liên,^c Chu Hoàng Hà,^a Nguyễn Hữu Cường,^a Cung Thị Ngọc Mai,^a and Thanh Hoa Lê^a

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology,^a Hospital 101, Vietnam Military Medical University,^b and National Institute of Hygiene and Epidemiology,^c Hanoi, Vietnam

Molecular characterization of the drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different origins can generate information that is useful for developing molecular methods. These methods are widely applicable for rapid detection of drug resistance. A total of 166 rifampin (RIF)- and/or isoniazid (INH)-resistant strains of *M. tuberculosis* have been isolated from different parts of Vietnam; they were screened for mutations associated with resistance to these drugs by sequence analysis investigating genetic mutations associated with RIF and INH resistance. Seventeen different mutations were identified in 74 RIF-resistant strains, 56 of which (approximately 76%) had mutations in the so-called 81-bp "hot-spot" region of the *rpoB* gene. The most common point mutations were in codons 531 (37.8%), 526 (23%), and 516 (9.46%) of the *rpoB* gene. Mutations were not found in three strains (4.05%). In the case of INH resistance, five different mutations in the *katG* genes of 82 resistant strains were detected, among which the nucleotide substitution at codon 515 (76.85%) is the most common mutation. This study provided the first molecular characterization of INH and RIF resistance of *M. tuberculosis* strains from Vietnam, and detection of the *katG* and *rpoB* mutations of the INH and RIF-resistant strains should be useful for rapid detection of the INH- and RIF-resistant strains by molecular tests.

Mycobacterium tuberculosis is one of the most harmful human pathogens worldwide, causing about 9.4 million incident cases of tuberculosis (TB) and 14 million prevalent cases and the deaths of 1.3 million HIV-negative and an additional 0.58 million HIV-positive people (1). Since the reemergence of TB in the mid-1980s, there have been an increasing number of drug-resistant strains throughout the world, in particular, an upsurge of *M. tuberculosis* strains that are resistant to one or more of the primary anti-TB drugs.

Early diagnosis of the disease and the rapid identification of resistance to primary anti-TB agents are essential for the efficient treatment and control of multidrug-resistant (MDR) strains. It is known that resistance to isoniazid (INH) and rifampin (RIF) is a key factor in determining the effectiveness of the currently recommended standard treatment regimens. The elucidation of the mechanism of action of these drugs, which was accomplished only recently, has led to the development of new rapid diagnostic methods (5, 8, 10, 12, 21). The rapid detection of RIF resistance is of particular importance, since it also represents a valuable surrogate marker for multidrug resistance (resistance to at least INH and RIF), which is a tremendous obstacle to TB therapy (9, 10).

Previous studies have found that about 96% of epidemiologically unrelated RIF-resistant strains have mutations in the "81-bp hot spot" core region of the *rpoB* gene of *M. tuberculosis*, which includes codons 507 to 533, encoding 27 amino acids (5). The most commonly seen mutations that occur from amino acid replacements are at codons 516, 526, and 531 (5, 6, 9, 29), and DNA sequencing of this region could be used as a clinical marker for probe assay of mutation and treatment. For INH resistance, while mutations in several genes of *M. tuberculosis* have been found to be associated with INH resistance, mutations in the *katG* gene, which encodes the catalase-peroxidase enzyme, have been the most commonly observed (26.0 to 93.6%) (7, 16, 19, 24).

Vietnam is one of the high-burden countries for *M. tuberculosis*

infection globally, with a smear-positive tuberculosis prevalence of 89 per 100,000 population. In addition, Vietnam is one of the 22 countries in which 80% of the world's new TB cases occur (31). Primary drug resistance has been monitored since 1978, with decreasing frequency up to 1998. In 2006, a 12.52% increase in the primary resistance rate was observed in comparison with that in 1978 (30.7% versus 18.18%). At the same time, an increased level of primary multidrug resistance was also observed (19.3% versus 2.3%). The Beijing genotype, which was found to be strongly genetically associated with drug and multidrug resistance, comprised at least half of the strains isolated in Vietnam (2, 4, 12). Vietnam has one of the most successful directly observed therapy short-course programs, with a cure rate of approximately 90% (89% in 1995 and 92% in 2007) and a case detection rate estimated at 37% in 1995 and at >50% since then (31). In recent years, the reported rate of resistance to at least one drug, i.e., INH, is 16% to 25.0%, and the MDR-TB rates are at 2% to 4% among the first and 25% to 27% among subsequent treated TB patients, respectively (11, 23). However, so far, only a limited number of studies have been carried out to characterize the genetic changes associated with the drug resistance of *M. tuberculosis* strains obtained from Vietnam.

In this paper, we present an investigation to profile genetic mutations associated with the RIF and INH resistance of *M. tu-*

Received 23 July 2011; Returned for modification 23 August 2011.

Accepted 13 November 2011.

Published ahead of print 14 December 2011.

Address correspondence to Nghiêm Ngọc Minh, ngminh@vict.ac.vn or ngminh@phn.vnm.va.gov.vn.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All rights reserved.

doi:10.1128/JCM.00801-11.11

**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 Ngli

Kelompok riset biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Cenderawasih,
Jalan Kamp Wolker Kampus Baru Waena, Jayapura-Indonesia.
e-mail: joe_ngli@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 (Ser530Thr), 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 disulkan 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

Research Paper

Rapid Detection of *rpoB* Mutations in Rifampin Resistant *M. tuberculosis* from Sputum Samples by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

Jun Li, Jiaojiao Xin, Liyuan Zhang, Longyan Jiang, Hongcui Cao, Lanjuan Li[✉]

State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, 79 Qingchun Rd., Hangzhou, China. 310003.

[✉] Corresponding author: Lanjuan Li. Tel: 86-571-87236425; Fax: 86-571-87236456; E-mail: ljli@zjhu.edu.cn© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>). Reproduction is permitted for personal, non-commercial use, provided that the article is in whole, unmodified, and properly cited.

Received: 2011.10.08; Accepted: 2011.12.29; Published: 2012.01.11

Abstract

Objective: To establish a rapid detection method for identifying *rpoB* mutations associated with rifampin (RIF) resistance in sputum specimens.**Methods:** We detected *rpoB* mutations directly in 90 sputum specimens collected from suspected tuberculosis patients using PCR-based denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and compared these results with those obtained by *rpoB* sequencing and conventional drug susceptibility testing.**Results:** The positive detection rate of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) was 52.2% by Acid-Fast Bacilli staining and 72.2% by conventional mycobacterial culture. In contrast, the positive rate was significantly higher (93.3%) by PCR-based detection of the *rpoB* gene in the same specimens. Furthermore, 75% of the tested specimens presented abnormal patterns compared with the wild-type pattern (standard H37Rv strain) analysed by DGGE. A total of 12 different patterns, representing 12 different *rpoB* mutations, were observed in the 63 abnormal patterns. The match rate of *rpoB* mutations detected by DGGE reached 96.9% when compared to DNA sequencing.**Conclusion:** Our findings indicate that PCR-based DGGE is a rapid and reliable bio-technique for direct detection of *rpoB* mutations associated with RIF resistance in the sputum of suspected tuberculosis patients.**Key words:** Genotyping; *Mycobacterium Tuberculosis*; Resistance; Microbial Drug Resistance.

Introduction

The most serious threat related to tuberculosis control is the recent emergence of drug-resistant tuberculosis strains. This emergence has been induced by widespread use of the standard short-course drug regimen. Especially concerning is the emergence of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), defined as TB that is resistant to at least isoniazid and rifampin (RIF)(1-3). The re-emergence of TB worldwide and the rise in MDR-TB have increased demand for rapid and reliable drug susceptibility testing (DST) to perform drug-resistance surveillance. Improved testing

would also aid in the development of an efficient regimen for appropriate treatment of MDR-TB, the frequency of which has gradually increased in many regions of the world(4, 5). Early detection of MDR-TB isolates is essential for efficient treatment and control of TB. Resistance to RIF is almost exclusively associated with mutations in the *rpoB* gene, which encodes the β -subunit of RNA polymerase in *M. tuberculosis*(6). More than 70 distinct *rpoB* mutations have been characterised from RIF-resistant *M. tuberculosis* isolates worldwide(7-11). Approximately 95% of

Molecular profiling of drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in the state of Santa Catarina, southern Brazil

Rodrigo Ivan Prim¹, Marcos André Schömer¹, Simone Gonçalves Senna²,
Christiane Lourenço Nogueira¹, Anna Carolina Cançado Figueiredo³,
Jaqueline Germano de Oliveira², Darcita Bürger Rovaris¹, Maria Luíza Bazzo^{1*}

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Biologia Molecular, Serologia e Microbactérias, Florianópolis, SC, Brazil

²Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brazil

³Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

Drug resistance is a global threat and one of the main contributing factors to tuberculosis (TB) outbreaks. The goal of this study was to analyse the molecular profile of multidrug-resistant TB (MDR-TB) in the state of Santa Catarina in southern Brazil. Fifty-three MDR Mycobacterium tuberculosis clinical isolates were analysed by spoligotyping and a partial region of the rpoB gene, which is associated with rifampicin resistance (RMP-R), was sequenced. Some isolates were also distinguished by their mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU). S531L was the most prevalent mutation found within rpoB in RMP-R isolates (58.5%), followed by S531W (20.8%). Only two MDR isolates showed no mutations within rpoB. Isolates of the Latin American Mediterranean (LAM) family were the most prevalent (45.3%) found by spoligotyping, followed by Haarlem (9.4%) and T (7.5%) families. SIT106 was found in 26.4% of isolates and all SIT106 isolates typed by MIRU-12 (5 out of 14) belong to MIT251. There was a high correlation between the S531W mutation and the LAM family mainly because all SIT2263 (LAM9) isolates carry this mutation. Among isolates with the S531W mutation in rpoB MIRU demonstrates a cluster formed by four isolates (SIT2263 and MIT163) and very similar profiles were observed between eight of the nine isolates. Better characterization of TB isolates may lead to new ways in which to control and treat TB in this region of Brazil.

Key words: tuberculosis - MDR-TB - rpoB - spoligotyping - MIRU

Among the many infectious diseases, tuberculosis (TB) remains the world's leading cause of death. Despite the advances in TB therapy over the past century, there were an estimated nine million new cases and 1.1 million deaths in 2013 (WHO 2014). Mycobacterial drug resistance is a global threat and one of the main problems associated with this illness, as evidenced by multidrug-resistant TB (MDR-TB). For MDR-TB, multidrug resistance is defined as resistance to isoniazid (INH) and rifampicin (RMP), the two key drugs used to treat TB. Thus, MDR-TB requires second-line drugs for treatment, which are more toxic, expensive and less efficient (Dye & Williams 2000, Espinal 2003).

The acquisition of resistance by *Mycobacterium tuberculosis* occurs spontaneously due to the natural mutation rate of genomic DNA and there are no known plasmids that confer resistance (Risika et al. 2000). The molecular basis of RMP resistance is mainly due to several mutations within the 81-bp hotspot region of the rpoB gene (corresponding to codons 507-533), most fre-

quently at codons 531, 526 and 516. This gene encodes the β -subunit of the *M. tuberculosis* RNA polymerase (RNAP), the target of RMP (Telenti et al. 1993). Mutations in this hotspot region are found in almost 96% of RMP-resistant strains, making rpoB the molecular marker of multidrug resistance and, in fact, the majority of the RMP-resistant isolates are MDR-TB (Soroskovci et al. 2001, Sam et al. 2006, Zhang & Yew 2009).

Genotyping tools are used to elucidate the distribution of TB and its transmission dynamics in the population (Demay et al. 2012). Spoligotyping is a genotyping technique based on the polymorphism of the direct repeat (DR) locus present within *M. tuberculosis*. The DR contains 36-bp well-conserved repeat sequences interspersed with 34-41-bp nonrepetitive spacers. The profile of the presence/absence of the 43 spacers is compared to more than 58,000 strains deposited in the SITVIT-WEB database (pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITD) (Kamerbeek et al. 1997, Demay et al. 2012). Another important genotyping method is based on the copy number of the variable number tandem repeats of mycobacterial interspersed repeat units (MIRU-VNTR) (Supply et al. 2000). In fact, out of the 41 loci that contain MIRUs, the most prevalent VNTRs are the 12, 15 and 24-loci.

Despite the relevance of drug resistance to the treatment and control of TB and MDR-TB, few studies have been published about circulating resistant strains in Brazil. Thus, the aim of this study was to analyse the molecular profile of MDR-TB strains in the state of Santa Catarina (SC), Brazil.

doi: 10.1590/0074-02760150100

Financial support: CNPq (473402/2011-4)

* Corresponding author: m.lbazzo@ufsc.br

Received 15 March 2015

Accepted 8 June 2015



Original Article

Detection of genomic mutations in *katG*, *inhA* and *rpoB* genes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain reaction

Azar Dokht Khosravi^{a,b}, Hamed Goodarzi^{a*}, Seyed Mohammad Alavi^{b,c}

^aDepartment of Microbiology, School of Medicine, Almaz Jundishapur University of Medical Sciences (AJUMS), Ahvaz, Iran

^bInfectious and Tropical Diseases Research Center, AJUMS, Ahvaz, Iran

^cInfectious Disease Ward, Razi Teaching Hospital, AJUMS, Ahvaz, Iran

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2011

Accepted 21 August 2011

Keywords:

Drug resistance

Genes, MDR

Mutation

Polymerase chain reaction

ABSTRACT

Objective: Isoniazid (INH) and rifampin (RIF) are the most effective first line antibiotics against *Mycobacterium tuberculosis*. Mutations in several genes determine resistance of *M. tuberculosis* to INH, with the most common gene target of *katG*, and resistance to RIF is due to mutation in *rpoB* gene. The aim of present study was to assess the mutations in the regions related to RIF and INH resistance.

Methods: We characterized 80 clinical isolates of confirmed *M. tuberculosis* to analyze the most commonly observed INH and RIF mutations. PCR analysis and sequencing were used to detect mutations related to RIF and INH resistance. The multiplex allele-specific-PCR (MAS-PCR) was performed as a comparative assay and for evaluation of this method.

Results: The sequencing of the 250-bp region of *katG* codon 315, revealed point mutations at 5 different codons in 33.7% of the *M. tuberculosis* isolates. The sequencing of the 270-bp central region of the *rpoB* gene revealed point mutations at 7 different codons in 12 (15%) of the *M. tuberculosis* isolates. The results obtained with MAS-PCR are in accordance with PCR-sequencing with high sensitivity and specificity for *katG*315, *inhA*15, and *rpoB* (531, 516, 526).

Conclusion: The results of this study suggested that molecular techniques can be used as a rapid tool for the identification of drug resistance in clinical isolates of *M. tuberculosis*. Both DNA sequencing and MAS-PCR yielded high sensitivity for the detection of RIF and INH mutations and detecting multi-drug resistant tuberculosis cases.

© 2012 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

* Corresponding author at: Department of Microbiology, School of Medicine, Almaz Jundishapur University of Medical Sciences (AJUMS), Ahvaz, 61335, Iran.

E-mail address: goodarzi2000@yahoo.com (Hamed Goodarzi).

STUDI PENGARUH MUTASI GEN *rpoB* PADA KODON 513: ANALISIS PADA ISOLAT PAPUA

Richardo Ubyuan¹⁾, Agnes E. Maryuni,²⁾ dan Alvin Ssoyer³⁾

¹⁾ Program Studi Kimia, FKIP, Universitas Cenderawasih, Jayapura, Papua

²⁾ Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Cenderawasih

³⁾ Jurusan Matematika, FMIPA, Universitas Cenderawasih

Disajikan 29-30 Nop 2012

ABSTRAK

Resistensi terhadap RIF disebabkan oleh mutasi pada gen *rpoB* pengkode RNA polimerase (RNAP) subunit β , terutama pada daerah sepanjang 81 pasang basa (pb) sebagai pemutar sifat resistensi RIF, dengan frekuensi yang paling tinggi pada kodon 528 dan 532. Mutasi ini menyebabkan RIF tidak berfungsi dalam menghambat proses inisiasi transkripsi. Pada salah satu galur isolat klinis *M. tuberculosis* MDR asal Jayapura, Papua yang ada di kelompok penelitian *M. tuberculosis* Laboratorium Biologi, Universitas Cenderawasih, terdapat isolat yang memiliki mutasi pada kodon 513 gen katG penyebab resistensi isoniazid, tetapi tidak memiliki mutasi pada kodon *rpoB*528 dan *rpoB*532. Fenotipe resistensi terhadap RIF yang dimiliki diduga disebabkan oleh adanya mutasi pada posisi selain kodon tersebut. Pada penelitian ini dilakukan penentuan penyebab resistensi RIF tingkat genotipe pada isolat klinis *M. tuberculosis* MDR dan juga dicari penjelasan mengenai hubungan mutasi dengan sifat resistensi tersebut. Tahapan penelitian meliputi PCR multiplex spesifik alel *rpoB* dan elektrofesis, penentuan urutan nukleotida, dan analisis *in silico*. Hasil sekuen yang dianalisis secara *in silico*, yaitu dibandingkan dengan urutan nukleotida galur standar *M. tuberculosis* H37Rv. Selain itu juga, dilakukan pemodelan protein menggunakan program PyMOL versi open source untuk melihat pengaruh mutasi pada interaksi RIF dengan RNAP. Hasil analisis translasi *in silico* menunjukkan bahwa kodon CAA yang mengkode asparat glutamin termutasi menjadi CTA yang mengkode leusin. Hasil pemodelan protein menggunakan aplikasi tersebut menunjukkan bahwa perubahan Glu513Leu merubah jarak antara rantai samping residu tersebut dengan gugus hidroksil RIF dari 2,63 Å menjadi 3,71 Å. Hasil sekuen yang diteliti dan perbandingan di atas menunjukkan adanya mutasi pada posisi lain gen *rpoB* isolat Papua 1, yaitu pada kodon 523. Mutasi ini diduga kuat merupakan penyebab resistensi RIF. Mutasi yang ada telah merubah residu tersebut menjadi Leu yang memiliki rantai samping non-polar dan membuat jarak rantai samping residu tersebut dengan gugus hidroksil RIF menjadi lebih jauh. Hal ini dapat menyebabkan ikatan hidrogen tidak dapat terbentuk, sehingga mengurangi efisiensi pengikatan RIF pada RNAP. Diharapkan pengetahuan tentang mekanisme resistensi ini dapat digunakan sebagai dasar desain obat baru untuk mengatasi masalah MDR-TB.

Kata Kunci: Mtb, mutasi, *rpoB*, rifampin, isolat Papua

1. PENDAHULUAN

Penyakit tuberkulosis (TB) merupakan suatu penyakit infeksi memular pada manusia yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Sampai saat ini, terdapat banyak obat anti-TB (OAT) yang merupakan antibiotik seperti rifampin, isoniazid, pirazinamid, etambutol, streptomisin, senyawa-senyawa golongan fluoroquinolon, dan lain-lain. Akan tetapi, walaupun sudah terdapat banyak OAT, TB tetap merupakan penyakit yang sulit di atasi. Hal ini terutama diakibatkan oleh sifat resistensi yang dimiliki TB terhadap antibiotik. Resistensi TB terbagi menjadi dua macam, yaitu resistensi terhadap satu jenis antibiotik, dan resistensi terhadap lebih dari satu jenis antibiotik. WHO telah mendefinisikan TB yang resisten terhadap paling tidak dua jenis antibiotik sekaligus yaitu rifampin (RIF) dan

isoniazid (INH) sebagai multi-drug-resistant TB (MDR-TB). Tentunya MDR-TB disebabkan oleh galur *M. tuberculosis* yang memiliki sifat tersebut. Munculnya kasus MDR-TB merupakan suatu masalah global yang harus di atasi untuk memberantas penyakit TB.

Resistensi *M. tuberculosis* terhadap antibiotik diakibatkan adanya mutasi pada kromosom bakteri tersebut. Hal ini menyebabkan sensitivitas *M. tuberculosis* terhadap OAT berkurang. Mutasi ini terjadi pada gen yang mengkode target antibiotik atau gen yang berperan dalam interaksi antibiotik dengan targetnya pada *M. tuberculosis*. Resistensi terhadap INH sebagian besar terjadi akibat mutasi pada gen katG pengkode katalase-peroksidase yang berperan dalam mengubah INH menjadi bentuk aktifnya di dalam sel [1-2]. Resistensi terhadap RIF terjadi akibat mutasi pada gen *rpoB*



Molecular analysis of *rpoB* gene mutations in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by multiple allele specific polymerase chain reaction in Puducherry, South India



Ravibalan Thirumurugan^{a,b,1}, Maruthai Kathirvel^{b,1},
Kommoju Vallayyachari^b, Kesavan Surendar^b,
Antony V. Samrot^a, Muthuraj Muthaiah^{b,*}

^a Department of Microbiology, Intermediate Reference Laboratory, State TB Training and Demonstration Centre, Government Hospital for Chest Diseases, Gorimedu, Puducherry 605006, India

^b Department of Biotechnology, Sathyabama University, Jeppiaar Nagar, Rajiv Gandhi Salai, Sholinganallur, Chennai 600119, Tamil Nadu, India

Received 13 February 2015; accepted 16 May 2015

KEYWORDS

Mycobacterium tuberculosis;
Rifampicin;
Multiple allele-specific PCR;
Drug resistance;
rpoB gene

Summary

Background: *rpoB* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) make the bacteria resistant to rifampicin. Thus, these mutations are surrogate markers for multi-drug resistance (MDR). The objective of this study was to evaluate an allele-specific multiplex-polymerase chain reaction (MAS-PCR) assay to detect mutations at codons 516, 526 and 531 of the *rpoB* gene.

Methods: In total, 127 *M. tuberculosis* clinical isolates were subjected to standard drug susceptibility tests. A MAS-PCR assay was then performed to detect mutations in the *rpoB* gene. Three different allele-specific PCR assays were performed (single-step MAS-PCR) and the amplified products were sequenced.

Results: Of the 127 isolates, 89 (54.3%) were multidrug resistant *M. tuberculosis* (MDR-TB), 21 (16.5%) were rifampicin mono-resistant and 37 (29.1%) were drug susceptible. The frequency of mutations at codons 531, 526 and 516 was 54.4%, 18.9% and 5.8%, respectively. A triple mutation was found in 4 (4.4%) isolates. Mutations

* Corresponding author.

E-mail address: strikirtpdy@gmail.com (M. Muthaiah).

¹ These authors contributed equally to this research paper.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.e-jmi.com

ORIGINAL ARTICLE

Resistance profiles and *rpoB* gene mutations of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Taiwan



Yun-Ho Lin^a, Chun-Hsi Tai^a, Chia-Ru Li^a, Chin-Fu Lin^c,
Zhi-Yuan Shi^{a,b,*}

^a Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Taichung Veterans General Hospital, Taichung, Taiwan

^b School of Medicine, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

^c Microbiology Section of the Medical Laboratory, Taichung Veterans General Hospital, Taichung, Taiwan

Received 30 April 2011; accepted 19 June 2012

KEYWORDS

Mycobacterium tuberculosis;
Resistance profiles;
rpoB

Background/Purpose: The rifampicin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* is caused by mutations in the 81-base pair region of the *rpoB* gene encoding the β -subunit of RNA polymerase. Sequences of the *rpoB* gene of 68 isolates were analyzed to identify the mutations and to compare the mutations with their related susceptibilities.

Methods: Susceptibility tests of 68 *M. tuberculosis* isolates, collected in Taiwan during the period from 1999 to 2011, were performed by the modified agar proportion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations. Sequences of the *rpoB* gene and the resistance profiles were analyzed and compared with the data from different geographic regions.

Results: Seven alleles were identified. Among 47 isolates of allele 1 (without mutations of *rpoB*), 46 were rifampicin-susceptible. The other 21 isolates (alleles 2 to 7, with mutations of *rpoB*) were rifampicin-resistant, including 18 isolates that were multidrug-resistant. Five mutated alleles demonstrated a single mutation. The mutations occurred in the codons 531 (68.2%), 513 (9.1%), 533 (9.1%), 516 (4.5%), and 526 (4.5%). The sensitivity and specificity of *rpoB* mutations for predicting the rifampicin-resistance of *M. tuberculosis* were 95.5% and 100%, respectively.

Conclusion: The most prevalent mutations of the *rpoB* gene were missense mutations in the critical codons, encoding Ser-531, Gin-513, Leu-533, Asp-516, and His-526. These mutations had high sensitivity and specificity for predicting the rifampicin-resistance of *M. tuberculosis* isolates. The resistance profiles and the frequencies of mutated codons of the *rpoB* gene varied in different

* Corresponding author. Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Taichung Veterans General Hospital, 160 Section 3, Chung-Kang Road, Taichung 40705, Taiwan.
E-mail address: zyshi@vghtc.gov.tw (Z.-Y. Shi).

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

Identifikasi Mutasi Gen *rpoB* Pada Daerah Hulu RRDR *Mycobacterium Tuberculosis* Multidrug Resistant 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 Unod-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 0361-703837

Email: amalapratiwi12@yahoo.com

ABSTRAK

Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) merupakan tuberkulosis yang disebabkan oleh strain *M.tuberculosis* yang resisten 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 (*Rifampicin Resistance Determining Region*) (125-421) Gen *rpoB*. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan metode *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (*Multiplex PCR*) dengan menggunakan sepasang primer Frl.2 5'CTAAGCTGC GCGAACCACCTGA3' dan RevL.2 5'TGATGAACTCGCGGTGAC 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 tuberkulosis (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 tuberkulosis menjadi kompleks akibat munculnya resistensi terhadap obat anti tuberkulosis (OAT), terutama dengan adanya kejadian *Multi-drug Resisten TB* (MDR-TB). Banyak ditemukan galur *M. tuberculosis* resisten terhadap dua atau lebih OAT (Obat Anti Tuberkulosis) yang dikenal sebagai galur *Multi-Drug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) (Remington, 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 (*Rifampicin Resistance Determining Region*) (Ramaswamy, 1998).

Lampiran 17

KARTU BIMBINGAN

Nama Mahasiswa : Fira Atasya
 NIM : 1713353032
 Judul : Variasi Kodon pada Gen *rpoβ* (*Rna Polymerase Sub Unit β*) yang Bermutasi pada *Mycobacterium tuberculosis* Resisten Rifampisin

Pembimbing Utama : Hj. Maria Tuntun Siregar, S.Pd., M.Biomed

No	Hari, Tanggal	Materi	Keterangan	Paraf
1.	Minggu, 3 Januari 2021	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	Revisi	
2.	Senin, 4 Januari 2021	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	Revisi	
3.	Selasa, 12 Januari 2021	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	Revisi	
4.	Rabu, 13 Januari 2021	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	Revisi	
5.	Kamis, 14 Januari 2021	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	Revisi	
6.	Rabu, 20 Januari 2021	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	Revisi	
7.	Senin, 25 Januari 2021	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	ACC Seminar Proposal	
8.	Rabu, 19 April 2021	Perbaikan Sempro	ACC	
9.	Selasa, 25 Mei 2021	Penulisan Bab 4,5	Revisi	
10.	Rabu, 2 Juni 2021	Penulisan Bab 4,5	Revisi	
11.	Kamis, 10 Juni 2021	Acc semhas	ACC	
12.	Jum'at, 2 Juli 2021	Perbaikan Semhas	Revisi	
13.	Selasa, 13 Juli 2021	Perbaikan Semhas	Revisi	
14.	Rabu, 21 Juli 2021	ACC Cetak	ACC	

Ketua Program Studi TLM
 Program Sarjana Terapan

Sri Ujiani, S.Pd., M.Biomed.
 NIP. 197301031996032001

Lampiran 18

KARTU BIMBINGAN

Nama Mahasiswa : Fira Atasya
 NIM : 1713353032
 Judul : Variasi Kodon pada Gen *rpoβ* (*Rna Polymerase Sub Unit β*) yang Bermutasi pada *Mycobacterium tuberculosis* Resisten Rifampisin

Pembimbing Pendamping : Nurminha, S.Pd., M.Sc.

No	Hari, Tanggal	Materi	Keterangan	Paraf
1.	Rabu, 16 Desember 2020	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	Revisi	
2.	Senin, 11 Januari 2021	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	Revisi	
3.	Rabu, 27 Januari 2021	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	Revisi	
4.	Jum'at, 29 Januari 2021	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	Revisi	
5.	Senin, 1 Februari 2021	Penulisan Bab I, II, III dan Daftar Pustaka	Acc Seminar	
6.	Jum'at, 16 April 2021	Perbaikan Sempro	ACC	
7.	Kamis, 3 Juni 2021	Penulisan Bab 4,5	Revisi	
8.	Selasa, 8 Juni 2021	Penulisan Bab 4,5	Revisi	
9.	Jum'at, 11 Juni 2021	Penulisan Bab 4,5	Revisi	
10.	Senin, 14 Juni 2021	Acc Semhar	Acc	
11.	Rabu, 21 Juli 2021	Perbaikan Semhar	ACC	

Ketua Program Studi TLM
 Program Sarjana Terapan

Sri Ujiani, S.Pd., M.Biomed.
 NIP. 197301031996032001

VARIASI KODON PADA GEN *rpoβ* (Rna Polymerase Sub Unit β) YANG BERMUTASI PADA *Mycobacterium tuberculosis* RESISTEN RIFAMPISIN (Studi Pustaka)

Fira Atasya

Program Studi Teknologi Laboratorium Medis Program Sarjana
Terapan Politeknik Kesehatan Tanjungkarang

Abstrak

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Sekitar 96% isolat *Mycobacterium tuberculosis* resisten terhadap rifampisin. Hampir semua strain resisten rifampisin juga resisten obat lain, khususnya isoniazid. Hal ini adalah alasan mengapa resistensi rifampisin dianggap sebagai *surrogate marker* untuk MDR-TB. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui prevalensi dan adanya mutasi gen *rpoβ* yang merubah asam aminonya dan frekuensi mutasi pada beberapa kodon tertentu. Jenis penelitian yang digunakan adalah kualitatif yang menggunakan artikel dan jurnal ilmiah serta literatur lainnya sebagai objek yang utama. Studi pustaka ini menggunakan 15 artikel yang dipublikasikan secara nasional maupun internasional. Hasil penelitian didapatkan prevalensi tertinggi mutasi gen *rpoβ* pada kodon 531 (37,5%), kodon 526 (25%) dan kodon 533 (4,2%). Dari 15 artikel, 14 menemukan adanya mutasi gen *rpoβ* dan 1 artikel tidak menyebutkan adanya mutasi gen *rpoβ*. Perubahan asam amino terbanyak ditunjukkan pada daerah RRDR yakni pada kodon 531 yang mengubah asam amino serin menjadi leusin, pada kodon 526 yang mengubah asam amino histidin menjadi leusin atau tirosin dan pada kodon 516 yang mengubah asam amino asam aspartat menjadi glysin atau valin. Terdapat 4 artikel yang menampilkan frekuensi mutasi tertinggi mutasi gen *rpoβ* ditunjukkan pada kodon 531 dan 1 artikel menampilkan pada kodon 526.

Kata Kunci : Gen *rpoβ*, Rifampisin, *Mycobacterium tuberculosis*

CODON VARIATIONS IN THE MUTATED *rpoβ* (Rna Polymerase Sub Unit β) GENE in RIFAMPIN-RESISTANT *Mycobacterium tuberculosis* (Literature Review)

Abstract

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. About 96% of *Mycobacterium tuberculosis* isolates are resistant to rifampin. Almost all rifampin-resistant strains are also resistant to other drugs, particularly isoniazid. This is the reason why rifampin resistance is considered a surrogate marker for MDR-TB. The purpose of this study was to determine the prevalence and presence of mutations in the *rpoβ* gene that change its amino acids and the frequency of mutations in certain codons. The type of research used is qualitative which uses articles and scientific journals and other literature as the main object. This literature study uses 15 articles published nationally and internationally. The results showed that the highest prevalence of *rpoβ* gene mutation was at codon 531 (37.5%), codon 526 (25%) and codon 533 (4.2%). Of the 15 articles, 14 found mutations in the *rpo* gene and 1 article did not mention mutations in the *rpo* gene. The most amino acid changes are shown in the RRDR region, namely at codon 531 which converts the amino acid serine to leucine, at codon 526 which converts the amino acid histidine to leucine or tyrosine and at codon 516 which converts the amino acid aspartic acid to glycine or valine. There are 4 articles showing the highest mutation frequency of *rpoβ* gene mutations shown at codon 531 and 1 article showing at codon 526.

Keyword : *rpoβ* gene, Rifampicin, *Mycobacterium tuberculosis*

Koresponden : Fira Atasya, Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Tanjungkarang, Jalan Soekarno-Hatta No. 1 Hajimena Bandar Lampung, *mobile* 083184987506, *email* firaatasya96@gmail.com

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. *World Health Organization* (WHO) melaporkan bahwa pada tahun 2019 sebanyak 1,4 juta orang meninggal karena TB termasuk 208.000 orang yang positif HIV. (WHO, 2020).

Pengobatan TB tidak terlepas dari masalah *multidrug-resistant tuberculosis* (MDR-TB) yaitu suatu keadaan ketika pasien tuberkulosis tidak dapat diobati dengan regimen obat anti tuberkulosis (OAT) lini pertama karena sudah terjadi resistensi terhadap rifampisin dan isoniazid tanpa atau dengan disertai resistensi terhadap OAT lainnya. Pada tahun 2019, di seluruh dunia sekitar 465.000 orang yang terinfeksi TB resisten terhadap obat dan kurang dari 40% yang dapat melakukan pengobatan (WHO, 2020).

WHO memperkirakan ada 23.000 kasus MDR/RR di Indonesia. Pada tahun 2017 kasus TB yang tercatat di program ada sejumlah 442.000 kasus yang mana dari kasus tersebut diperkirakan ada 8.600-15.000 MDR/RR TB, (perkiraan 2,4% dari kasus baru dan 13% dari pasien TB yang diobati sebelumnya), tetapi cakupan yang diobati baru sekitar 27,36% (Kemenkes RI, 2019).

Berdasarkan Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia, secara umum terjadi kenaikan kasus tuberkulosis di Lampung dari tahun 2018-2019 pada jumlah kasus TB laki-laki dari 9.027 menjadi 9.170 dan jumlah kasus TB perempuan dari 6.543 menjadi 6.790. Dapat disimpulkan bahwa kasus TB masih menjadi perhatian khusus dalam pengendalian penyakit (Dinkes Lampung, 2019).

Sekitar 96% isolat *Mycobacterium tuberculosis* resisten terhadap rifampisin. Penyebabnya adalah mutasi pada daerah yang disebut “*hot-spot region*” dari daerah inti 81-bp (*Rifampicin Resistance-Determining Region* atau RRDR) dari rentang kodon

507-533 gen *rpoβ* (Irianti, dkk, 2016). Monoresisten adalah resistensi terhadap 1 obat lini pertama saja (WHO, 2016). Hampir semua strain resisten rifampisin juga resisten obat lain, khususnya isoniazid. Hal ini adalah alasan mengapa resistensi rifampisin dianggap sebagai *surrogate marker* untuk MDR-TB (Irianti, dkk, 2016). Mekanisme rifampisin adalah menghambat sintesis RNA *Mycobacterium tuberculosis* dengan cara mengikat sub unit β RNA polimerase (Silva dan Palomina, 2011). Menurut penelitian Wijaya (2013) amplifikasi fragmen gen *rpoβ* menunjukkan adanya perubahan nukleotida yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino pada gen *rpoβ* isolat P10 dibandingkan dengan gen *rpoβ* *Mycobacterium 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. Menurut penelitian Cita dan Putri (2013) terjadi perubahan asam amino pada protein RNAP sub unit β di daerah 81-bp-hot-spot *M. tuberculosis* pada kodon 531 yakni berubahnya asam amino serin menjadi leusin.

Teknik PCR digunakan untuk mendeteksi resistensi terhadap obat melalui perubahan region DNA penyandi protein berkaitan dengan sasaran kerja obat (Notopuro, PB, dkk, 2010). Hasil amplifikasi PCR selanjutnya disekuensing dan sekuen nukleotida dibandingkan dengan gen *rpoβ* *Mycobacterium tuberculosis* (Pratiwi, MA, dkk, 2015).

Mutasi-mutasi yang terjadi menyebabkan perubahan asam amino

yang dapat menghilangkan aktivitas pengikatan RIF pada RNA polimerase. Hilangnya aktivitas pengikatan ini akan menyebabkan resistensi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Yowani, SC dan Wirajana, IN, 2014).

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui prevalensi dan adanya gen *rpoB* yang bermutasi, mengetahui perubahan asam amino dan mengetahui frekuensi mutasi kodon gen *rpoB*.

Metode

Jenis penelitian yang digunakan adalah kualitatif dengan menelaah artikel, jurnal ilmiah dan buku terkait penelitian dan perkembangan variasi kodon pada gen *rpoB* yang bermutasi pada *Mycobacterium tuberculosis* resisten rifampisin. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Maret sampai Juni 2021. Adapun batasan dari literatur yang digunakan adalah artikel dan jurnal ilmiah yang dipublikasi secara nasional dan internasional dalam 10 tahun terakhir, yaitu antara tahun 2011-2021 yang memuat sumber data yang dibutuhkan secara detail, terutama mengenai variasi kodon pada gen *rpoB*

yang bermutasi pada *Mycobacterium tuberculosis* resisten rifampisin.

Sumber data yang menjadi bahan untuk penelitian yaitu artikel ilmiah yang berjumlah 15. Peneliti melakukan pencarian literatur artikel dan jurnal berbasis *computer* seperti database Taylor & Francis, PubMed dan Google Scholar. Kata kunci yang digunakan dalam pencarian literatur adalah "*rpoB gene, Rifampicin, Mycobacterium tuberculosis*" atau "gen *rpoB*, Rifampisin, *Mycobacterium tuberculosis*" dan ditemukan sebanyak 127 artikel, dan untuk rentang tahun 2011-2021 ditemukan sebanyak 87 artikel dan dari artikel-artikel tersebut ditemukan sebanyak 15 artikel yang sesuai dengan penelitian ini.

Instrumen penelitian adalah alat-alat yang akan digunakan untuk pengumpulan data. Instrumen dalam penelitian kepustakaan ini adalah artikel ilmiah, buku, laporan dan referensi yang di dapat dari internet. Teknik analisa data yang digunakan dalam penelitian ini berupa metode analisis isi (*content analysis*).

Hasil Penelitian

Berdasarkan 15 artikel penelitian ditemukan mutasi pada kodon yang bervariasi dengan perubahan nukleotida yang berbeda-beda. Dari 15 artikel penelitian ditemukan 14 artikel yang menemukan mutasi gen *rpoB* baik pada daerah RRDR maupun non-RRDR yang dipaparkan pada tabel dibawah ini.

Tabel 1. Ringkasan literatur tentang variasi kodon pada gen *rpoB* yang bermutasi pada *Mycobacterium tuberculosis* resisten rifampisin

No.	Kodon mutasi	Perubahan nukleotida dan asam amino	Referensi
1.	526	CAC (His) → CTC (Leu)	Wijaya, M.D., dkk (2013)
	418	GAA (Glu) → GAT (Asp)	
2.	531	Ser → Leu	Amalia, E., dkk (2015)
3.	526	CAC (His) → CTC (Leu)	Yowani, S. C., dkk (2014)
	531	TCG (Ser) → TTG (Leu) GAC	
	516	(Asp) → TAC (Tyr)	
	510	CAG (Gln) → CCG (Pro)	
	418	GAA (Glu) → GAT (Asp)	

4.	531 526 533	TCG (Ser) → TTG (Leu) CAC (His) → GGC (Gly) CAC (His) → GAC (Asp) CAC (His) → GTC (Leu) CAC (His) → CGC (Arg) CTG (Leu) → CCG (Pro)	Pang, Y, <i>et al</i> (2013)
5.	531	TCG (Ser) → TTG (Leu)	Cita, Y.P dan Putri, D.H (2017)
6.	526 531 516 479	CAC (His) → TAC (Tyr) CAC (His) → CGC (Arg) CAC (His) → GAC (Asp) TCG (Ser) → TTG (Leu) GAC (Asp) → GGC (Gly) CCC (Pro) → CCT (Pro)	Yang, S., <i>et al</i> , 2020
7.	516 522 526 530 531 533 490	GAC (Asp) → GTC (Val) TCG (Ser) → TTG (Leu) CAC (His) → CTC (Leu) CAC (His) → TAC (Tyr) CAC (His) → GAC (Asp) CAC (His) → CGC (Arg) CAC (His) → AGC (Ser) CAC (His) → ACC (Thr) CTG (Leu) → ATG (Met) TCG (Ser) → TTG (Leu) TCG (Ser) → TGG (Trp) TCG (Ser) → TTC (Phe) TCG (Ser) → TAG (Gln) CTG (Leu) → CCG (Pro) CAG (Gln) → CAT (His) CAG (Gln) → CGG (Arg)	Minh, N.N., <i>et al</i> (2012)
8.	526 531 513 512 516 552 550 535	His → Arg His → Tyr Ser → Leu Gln → Leu Ser → Trp Asp → Gly Pro → Ser Val → MetPro → His	Ngili, Yohanis (2017)
9.	533 531 526 516 513	CTG (Leu) → TTG (Leu) TCG (Ser) → TTG (Leu) TCG (Ser) → TGG (Trp) CAC (His) → GAC (Asp) CAC (His) → TAC (Tyr) CAC (His) → CTT (Leu) GAC (Asp) → GGA (Gly) GAC (Asp) → TAC (Tyr) CAA (Gln) → GAA (Glu)	Li, J, <i>et al</i> (2012)
10.	531 531 526 516 505/516 512/526 572	TCG (Ser) → TTG (Leu) TCG (Ser) → TGG (Trp) CAC (His) → TAC (Tyr) CAC (His) → GAC (Asp) GAC (Asp) → GTC (Val) TTC → GTC/GAC → GTC AGC → GGC/CAC → AAC ATC → GTC	Prim, R.I., <i>et al</i> (2015)

11.	512 527 517 531 511	AGC (Ser) → ACC (Thr) AAG (Lys) → AAC (Asn) CAG (Gln) → CCG (Leu) TCG (Ser) → TTG (Leu) CTG (Leu) → ATG (Met)	Khosravi, A.D., et al (2012)
12.	513	CAA (Gln) → CTA (Leu)	Ubyaan, R., dkk (2012)
13.	516 526 531 413 435 451 511 513 521	Asp → Val His → Tyr Ser → Leu AAC (Asn) → CAC (His) GAC (Asp) → GAG (Glu) GCA (Ala) → GAC (Asp) CGC (Arg) → TGC (Cys) GTC (Val) → GAC (Asp) GAG (Glu) → GAC (Asp)	Thirumurugan, R., et al (2015)
14.	531 513 533 516 526	TCG (Ser) → TTG (Leu) TCG (Ser) → TGG (Try) CAA (Gln) → AAA (Lys) CTG (Leu) → CCG (Pro) GAC (Asp) → GTC (Val) CAC (His) → TGC (Cys)	Lin, Y., et al (2013)
15.	Tidak ditemukan mutasi	Tidak ada perubahan nukleotida dan asam amino	Pratiwi, dkk (2015)

Pembahasan

Prevalensi dan adanya mutasi pada gen *rpoB* pada *Mycobacterium tuberculosis* resisten RIF. Berdasarkan hasil dari 15 artikel penelitian diperoleh,

1 artikel menyebutkan prevalensi yaitu pada Penelitian Pang Y, *et al* (2013) yang menggunakan strain bakteri hasil isolasi dari surveilans epidemiologi tuberkulosis di Cina mendapatkan bahwa prevalensi tertinggi yaitu pada kodon 531 sebesar 37,5% kemudian diikuti kodon 526 sebesar 25% dan kodon 533 sebesar 4,2%.

Berdasarkan hasil dari 15 artikel penelitian diperoleh 14 artikel penelitian terjadi mutasi gen *rpoB*, adapun 1 artikel penelitian mendeteksi mutasi pada daerah hulu RRDR gen *rpoB* dan tidak menemukan adanya mutasi pada daerah tersebut. Penelitian yang dilakukan oleh Yowani, dkk (2014) bahwa ditemukan adanya mutasi dengan jenis mutasi *missense mutation* yang menyebabkan perubahan asam amino pada beberapa kodon. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh

Wijaya, dkk (2013) didapatkan bahwa ditemukan mutasi pada gen *rpoB* isolat P10 dengan jenis mutasi *missense mutation*. *Missense mutation* adalah perubahan suatu kode genetik umumnya pada posisi 1 dan 2 pada kodon, sehingga menyebabkan asam amino yang terkait pada rantai polipeptida berubah. Perubahan pada asam amino dapat menghasilkan fenotip mutan apabila asam amino yang berubah merupakan asam amino esensial bagi protein tersebut (Warmadewi, D.A., 2017). Hal ini tidak sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Li, *et al* (2012) yang menemukan mutasi pada kodon 533 sebanyak 2 isolat yang mengalami mutasi diam (*silent mutation*). Mutasi diam (*silent mutation*) adalah perubahan suatu pasangan basa dalam gen pada posisi 3 kodon yang menimbulkan perubahan suatu kode genetik tetapi tidak mengakibatkan perubahan atau pergantian asam amino yang dikode (Warmadewi, D.A., 2017). Hal ini juga tidak sejalan dengan penelitian Pratiwi, dkk (2015) dari hasil analisis yang ditunjukkan bahwa isolat

P10 tidak terdapat mutasi nukleotida dan perubahan asam amino pada daerah hulu RRDR.

Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Yang, *et al* (2020), Cita dan Putri (2017), Ngili, Y (2017), Prim, *et al* (2015), Thirumurugan, *et al* (2015), Pang, Y (2013), Lin, *et al* (2013), Khosravi, *et al* (2012), Ubyaan, dkk (2012), Minh, *et al* (2012) juga menyebutkan bahwa terjadi mutasi pada gen *rpoβ* baik didalam RRDR maupun non- RRDR. Daerah yang paling sering mengalami mutasi dan menyebabkan resistensi terhadap rifampisin disebut sebagai RRDR. Dimana mutasi yang terjadi menyebabkan perubahan asam amino dengan rantai berukuran besar yang menghambat kerja molekul rifampisin dalam mengikat polimerase (Koch, A, *et al*, 2014).

Perubahan asam amino gen *rpoβ* yang bermutasi pada *Mycobacterium tuberculosis* resisten RIF. Berdasarkan hasil dari 15 artikel penelitian diperoleh 2 artikel ditemukan mutasi hanya pada kodon 531. Pada 2 artikel lainnya ditemukan mutasi pada daerah non-RRDR di kodon 418. Pada 5 artikel ditemukan mutasi pada daerah non-RRDR dengan kodon yang berbeda-beda, lima artikel ditemukan mutasi pada daerah RRDR dan 1 artikel tidak ditemukan mutasi pada daerah hulu RRDR gen *rpoβ*.

Penelitian yang dilakukan oleh Amalia, dkk (2015) didapatkan mutasi gen *rpoβ* pada kodon 531 yang mengubah asam amino serin menjadi leusin, hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Cita dan Putri (2017) yaitu mutasi yang terjadi pada kodon 531 menunjukkan perubahan asam amino serin menjadi leusin dan menimbulkan perbedaan sifat yang cukup besar antara kedua asam amino ini.

Penelitian yang dilakukan oleh Yowani, dkk (2014) didapatkan perubahan asam amino pada kodon di daerah RRDR yaitu 526, 531, 516, 510 dan satu kodon di luar daerah RRDR yaitu kodon 418 yang merubah asam glutamat menjadi asam aspartat, hal ini

serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Wijaya, dkk (2013) terjadi perubahan asam amino pada daerah RRDR dan non-RRDR, pada daerah non-RRDR terjadi mutasi pada kodon 418 mengubah asam glutamat menjadi asam aspartat (Wijaya, M.D., dkk, 2013). Adanya perbedaan titik-titik mutasi pada *Mycobacterium tuberculosis* sangat dipengaruhi oleh geografis (Lingala, *et al*, 2010).

Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Lin, *et al* (2013), Pang, Y (2013), Khosravi, *et al* (2012), Ubyaan, dkk (2012), Li, *et al* (2012) menyebutkan bahwa terjadi mutasi pada daerah RRDR, yang paling sering pada kodon 531 (Ser→Leu), kodon 526 (His→Leu/Tyr) dan kodon 516 (Asp→Gly/Val). Di dalam bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang terjadi mutasi gen *rpoβ* pada kodon- kodon tersebut maka akan terjadi perubahan nukleotida dan asam amino sehingga akan mengakibatkan terjadinya perubahan konformasi ikatan obat rifampisin yang dapat mempengaruhi afinitasnya dalam mengikat sub unit β RNA polimerase. Hal ini akan menyebabkan proses transkripsi masih dapat berlangsung, sehingga *Mycobacterium tuberculosis* menjadi resisten (Silva dan Palomino, 2011). Dan timbulnya resistensi terhadap obat pada *Mycobacterium tuberculosis* juga disebabkan mutasi *random* pada kromosom bakteri. Proses mutasi tersebut terjadi secara spontan (Amalia, dkk, 2015), yaitu mutasi genetik yang penyebabnya belum diketahui secara pasti (Warmadewi, D.A., 2017).

Penelitian yang dilakukan oleh Ngili, Y (2017) didapatkan mutasi di luar daerah RRDR yang jarang terjadi pada kodon 552 (Pro→Ser), 550 (Val→Met) dan 535 (Pro→His) sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Yang, *et al* (2020), Minh, *et al* (2012), Prim, *et al* (2015), Thirumurugan, *et al* (2015) menunjukkan mutasi non-RRDR pada beberapa kodon yang berbeda. Sementara itu, beberapa penelitian menyebutkan mutasi gen *rpoβ* yang berada di luar RRDR juga dapat menimbulkan sifat resisten (Ngili, 2017).

Frekuensi mutasi kodon gen *rpoβ* pada *Mycobacterium tuberculosis* resisten RIF. Berdasarkan hasil dari 15 artikel penelitian diperoleh, 5 artikel menyebutkan frekuensi mutasi gen *rpoβ* pada beberapa kodon yaitu pada penelitian yang dilakukan oleh Prim, *et al* (2012) yang menggunakan isolat pasien TB koleksi Laboratorium Pusat Negara Bagian Santa Catarina diperoleh frekuensi mutasi gen *rpoβ* pada 531 sebesar 37,8% diikuti kodon 526 sebesar 23% dan kodon 516 sebesar 9,4%. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Minh, *et al* (2012) yang memiliki frekuensi mutasi tertinggi pada kodon 531, 526 dan 516. Mutasi-mutasi yang terjadi dominan terletak pada daerah RRDR, hal tersebut membuktikan bahwa lebih dari 96% resistensi terhadap rifampisin terjadi akibat mutasi yang terjadi pada RRDR gen *rpoβ*, suatu gen yang menyandi perubahan asam amino pada subunit-β dari RNA polimerase (Yowani S.C., 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Thirumurugan (2015) yang menggunakan isolat pasien dari rumah sakit yang berada di Puducherry, India memperoleh mutasi tertinggi pada kodon 531 (54,4%), 526 (18,9%) dan 521(15,6%) dan Lin, *et al* (2013) juga memperoleh frekuensi mutasi tertinggi pada kodon 531 (68,2%) diikuti kodon 533 (9,1%) dan 513 (9,1%). Hal ini tidak sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Li, *et al* (2012) yang menyebutkan frekuensi mutasi tertinggi pada kodon 526 (51,2%) diikuti kodon 531 (10,7%) dan 516 (6,0%).

Uji molekuler yang tersedia saat ini di desain untuk mendeteksi polimorfisme yang telah diketahui paling sering terjadi pada gen *rpoβ* pada isolat *Mycobacterium tuberculosis* yaitu kodon 531, 526 dan 516, kodon-kodon ini merupakan titik mutasi yang berada dalam daerah RRDR (Lingala, *et al*, 2010). Hal ini tentunya menjadikan uji molekuler yang ada tidak dapat diterapkan secara universal dan kondisi ini juga berdampak pada Tes Cepat Molekuler (TCM) yang menjadi kurang efektif dalam mendiagnosa TB. Maka, diperlukan TCM yang lebih spesifik dalam mendeteksi mutasi pada gen *rpoβ* yang menyebabkan resistensi *Mycobacterium tuberculosis*.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil studi pustaka yang dilakukan pada 15 artikel penelitian diperoleh prevalensi tertinggi mutasi gen *rpoβ* ditunjukkan oleh kodon 531 yaitu sebesar 37,5%, kodon 526 sebesar 25% dan kodon 533 sebesar 4,2% dan 14 artikel menunjukkan mutasi gen *rpoβ* dan 1 artikel tidak menemukan mutasi pada daerah hulu RRDR gen *rpoβ*. Mutasi gen *rpoβ* ditunjukkan terbanyak pada daerah RRDR diperoleh 12 artikel terjadi perubahan asam amino yaitu pada kodon 531 yang mengubah asam amino serin menjadi leusin, kodon 526 diperoleh 10 artikel yang mengubah asam amino histidin menjadi leusin atau tirosin dan kodon 516 diperoleh 8 artikel yang mengubah asam amino asam aspartat menjadi glysin atau valin. Diperoleh 4 dari 5 artikel yang menampilkan frekuensi mutasi tertinggi mutasi gen *rpoβ* ditunjukkan pada kodon 531.

Daftar Pustaka

Amalia, E., dkk, 2015. Identifikasi Mutasi Gen *rpoβ Ser531Leu Mycobacterium tuberculosis* Yang Berhubungan Dengan Resistensi Rifampisin. *Biomedical Journal of Indonesia*. 1(1).pp.30-34

Cita, YP, Putri, DH; 2017. Analisis Mutasi pada Kodon 531 pada Gen *rpoβ Mycobacterium tuberculosis* Penyebab Resistensi Rifampisin. *JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA*; 15(2), pp.140-147

Kementrian Kesehatan RI, 2019, Situasi TBC di Indonesia <https://tbindonesia.or.id/informasi/tentang-tbc/situasi-tbc-di-indonesia-2/>, [Accessed Januari 4, 2020]

Khosravi, A.D., *et al*. 2012. *Detection of genomic mutations in katG, inhA and rpoβ genes of Mycobacterium tuberculosis isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain reaction. The*

- Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 16(1), pp. 57-62.
- Koch, A, Mizrahi, V dan Warner, DF., 2014. *The Impact of Drug Resistance on Mycobacterium tuberculosis Physiology: What Can We Learn From Rifampicin?*. *Emerging Microbes & Infections*, 3:1, pp.1-11.
- Lin Ho, Y, et al. 2013. *Resistance profiles and rpoB gene mutations of Mycobacterium tuberculosis isolates in Taiwan*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46, pp. 266-270.
- Li, J, et al. 2012. *Rapid Detection of rpoB Mutations in Rifampin Resistant M. tuberculosis from Sputum Samples by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*. *International Journal of Medical Science*, 9(2), pp. 148-156.
- Lingala, M.A.L., et al, 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), pp.13-18.
- Minh, N.N., et al, 2012. *Molecular Characteristics of Rifampin- and Isoniazid- Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated in Vietnam*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), pp. 598-601
- Ngili, Y., 2017. *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*. *AVOGADRO Jurnal Kimia*, 1(1), pp.15-23.
- Notopuro, PB., Nugraha, J., Notopuro, H., 2010. *Deteksi Molekul Mutasi Gen rpoB Mycobacterium tuberculosis pada dahak dengan Polymerase Chain Reaction dan Single Strand Conformation Polymorphism*. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 16(2), pp.81-87.
- Pang, Y., et al, 2013. *Study of the Rifampin Monoresistance Mechanism in Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 57(2).pp.893-900.
- Pratiwi, M.A., Ratnayani, K., Yowani, S.C., 2015. *Identifikasi Mutasi Gen rpoB pada Daerah Hulu RRDR Mycobacterium tuberculosis Multidrug Resistant Isolat P10*. *Jurnal Farmasi Udayana*, 4(1), pp.90-94.
- Prim, R.I., et al, 2015. *Molecular profiling of drug resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis in the state of Santa Catarina, southern Brazil*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 110(5), pp.618-623.
- Silva, PEAD & Palomino, JC, 2011, *Molecular Basis And Mechanisms of Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis: Classical and New Drugs*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011; 66: 1417-1430.
- Thirumurugan, R., et al, 2015. *Molecular analysis of rpoB gene mutations in rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by multiple allele specific polymerase chain reaction in Puducherry, South India*. *Journal of Infection and Public Health* 8, pp. 619-625.
- Ubyaan, R., Maryuni, A.E., Sroyer, A. 2012. *Studi Pengaruh Mutasi Gen rpoB pada kodon 513 : Analisis pada Isolat Papua*. *Prosiding Insinas*. 0195, pp. 161-167.
- Wijaya, Made D., dkk, 2013. *Identifikasi Mutasi Gen RpoB Pada Isolat Mycobacterium Tuberculosis Multidrug Resistant Dengan Metode Nested Polymerase Chain Reaction*. Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana
- World Health Organization, 2020, *Global TB progress at risk*, <https://www.who.int/news/item/14-10-2020-who-global-tb-progress-at-risk>, [Accessed Januari 3, 2021]
- World Health Organization, 2020, *WHO Global Tuberculosis Report 2020*, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>, [Accessed Januari 3, 2021]

Yang, S., et al. 2020. Rapid detection of *rpoβ* and *katG* genes from the sputum of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction (PCR)-direct sequencing analysis. *International Journal of Microbiology Research and Reviews*. 9(6), pp.001-005.

Yowani, SC. dan Wirajana, IN., 2014. Identifikasi Mutasi Gen *rpoβ* Isolat MDR *Mycobacterium tuberculosis* di Bali dengan Metode Nested PCR, *Jurnal Farmasi Indonesia*, 7(2), pp.121-127.

