

MUTASI GEN *Kat G* PADA ISOLAT KLINIS R2 FENOTIPE MULTI DRUG RESISTEN *Mycobacterium Tuberculosis*

Elfira Rosa Pane

Dosen Program Studi Tadris Biologi Fakultas Tarbiyah IAIN Raden Fatah Palembang

Abstract : Tuberculosis (TB) is an infected disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, and treatment with anti-tuberculosis drugs (OAT) could cure the disease. Inappropriate medication could cause TB drug resistance. Multi-drug Resistant TB (MDR-TB) describes strains of tuberculosis that are resistant to at least the two main first-line TB drugs - isoniazid (INH) and rifampicin (RIF), (World Health Organization). The aim of our research is to find the genotype information about the cause of resistance INH in clinical isolate R2. The methods used in our research is Polymerase Chain Reaction (PCR) multiplex specific alleles *katG* and electrophoresis gel agarose all isolates produced two multiplex PCR 0,43kb and 0,29kb bands. Sequencing produce electroforegram 0,43kb fragment gene *katG* compared to the same fragment *M. tuberculosis* wild type. Homology analysis showed isolate R2 have mutation in nucleotide 869, C to T.

Data analysis obtained here showed that C869T mutation in isolate R2 located in codon 290, GCT change in to GTT, and the consequence is amino acid alanin replaced by valin. Pymol program showed amino acid residue 290 located in loop region N terminal and approximately from the active site. The effect of this mutation and the relation in resistance INH has not yet known. The implication of our results is to give the new information about mutation position in *katG* gene *M. tuberculosis* which is resistance INH because of mutation C869T (alanin290valin) in isolate R2 have not been published before.

Key words: gene mutation, PCR, *Mycobacterium tuberculosis*, isoniazid

PENDAHULUAN

Multidrug resisten (MDR) TB adalah suatu kondisi dimana bakteri TB resisten setidaknya terhadap dua obat yaitu rifampisin (RIF) dan isoniazid (INH). MDR-TB merupakan penyakit yang terus berkembang dan beberapa penelitian menunjukkan adanya hubungan antara epidemic HIV/AIDS dengan meningkatnya laju TB. Karena itu, bila perhatian berkurang maka akan ada kemungkinan kasus TB akan meningkat lagi. Penelitian terhadap faktor penyebab MDR-TB sangat penting agar dapat diketahui cara pencegahan dan pengobatan yang terbaik.

Penelitian yang telah dilakukan terhadap MDR-TB menunjukkan bahwa resistensi RIF terjadi karena adanya mutasi pada gen *rpoB*, dan resistensi terhadap INH disebabkan oleh mutasi pada beberapa gen yaitu *katG*, *inhA*, *kasA* dan *ahpC*. Namun, mutasi yang paling sering terjadi adalah pada gen *katG*. *katG* berfungsi sebagai enzim katalase peroksidase yang mendegradasi H_2O_2 dan peroksida organik, satu-satunya enzim yang memiliki aktivitas katalase dalam *M. tuberculosis*. *KatG* mengaktifkan prodrug INH menjadi spesies yang reaktif untuk menghambat pembentukan dinding sel. Pada penelitian sebelumnya didapatkan *M. tuberculosis* yang resisten terhadap INH dan RIF, diketahui bahwa ada mutasi pada gen *rpoB* tetapi tidak terjadi mutasi di kodon yang biasanya terjadi mutasi pada gen *katG*315.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis gen *katG* dan menentukan apakah terdapat mutasi pada kodon selain 315 yang memberi kontribusi dalam sifat resistensi *M. tuberculosis* terhadap INH

METODOLOGI PENELITIAN

Alat yang digunakan: Gelas kimia 100mL, 250mL, pipet tetes, gelas ukur, seperangkat alat elektroforesis DNA, lampu UV, Mikropipet 10 μ L, Hot plate, tabung eppendorf, labu ukur, tabung PCR, Erlenmeyer 250mL, mesin PCR.

Bahan yang digunakan: Basa tris, NaOH, HCL, Na₂EDTA, Air distilasi, Agaros, Etidium Bromida (EtBr), *loading buffer* (sukrosa 50% EDTA), Aquabidest steril, Tip pipet 10µL, 100µL, 1000µL, 2×2 cm parafilm, sarung tangan, reagen PCR (buffer PCR 10x, MgCl₂, primer KF, primer KR, primer K315, dNTP, Taq DNA Polimerase).

Isolat yang digunakan didapat dari grup penelitian kami yang telah mengumpulkan specimen klinis berupa dahak atau cairan paru-paru penderita TB yang datang ke laboratorium BPLK, Departemen Kesehatan Bandung dan Rumah Sakit Paru-Paru Rotinsulu, Bandung.

Uji genotipe

Pengujian dilakukan untuk mengetahui posisi mutasi pada gen *katG* dari isolat yang resisten terhadap isoniazid dan rifampin. Uji ini dilakukan dengan menggunakan metode PCR multiplek, yaitu primer luar forward dan reverse yang akan menempel pada DNA templat dan primer dalam pada alel spesifik *wild-type*. Pasangan primer luar akan mengamplifikasi pita *invariable*. Primer dalam akan berhenti pada ujung 3' daerah kodon target dan mengamplifikasi fragmen alel spesifik *wild type* tersebut. Perubahan basa yang terhubung pada ujung 3' primer dalam yang spesifik menyebabkan kesalahan berpasangan antara DNA templat dan primer sehingga akan mencegah polimerase memperpanjang primer dan tidak ada fragmen yang teramplifikasi (Mokrousov *et al.*2003, Mokrousov *et al.*2002).

PCR multiplek gen *katG*315.

Primer dalam terbalik *katG*315 berada pada posisi ujung 3' berpasangan dengan basa kedua (G) dari kodon 315 alel *wild-type* (AGC). Tidak adanya mutasi pada posisi *katG*315, menghasilkan amplifikasi fragmen 292 pb dengan primer luar KF dan primer dalam terbalik KR. Jika terjadi mutasi, maka hasil yang diperoleh adalah kesalahan berpasangan pada ujung 3' primer dalam tanpa ada produk PCR yang spesifik. Dua primer luar KF dan KR mengapit seluruh daerah *katG*315 dan mengamplifikasi fragmen 435 pb. Kualitas PCR dikontrol oleh fragmen 435 pb yang dihasilkan dari amplifikasi primer KF dan KR. Sekuen primer yang digunakan adalah:

- primer luar KF 5'-gCA gAT gAT ggg gCT gAT CTA Cg-3'
- primer luar KR 5'-AAC ggg TCC ggg ATg gTg-3'
- primer dalam terbalik *katG*315 5'-ATA CgA CCT CgA TgC CgC-3'

Reaksi PCR dilakukan dengan mesin PCR Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2700 pada kondisi:

- Denaturasi awal 96 °C selama 3 menit.
- Lima siklus 95 °C 1 menit, 62 °C 1 menit, dan 72°C 30 detik
- Lima siklus 95 °C 1 menit, 60 °C 40 detik, dan 72°C 30 detik
- Dua puluh dua siklus 94 °C 1 menit, 58 °C 40 detik, dan 72°C 30 detik
- Elongasi akhir 72 °C selama 3 menit.

Sebanyak 5µL fragmen hasil amplifikasi dielektroforesis pada agarose gel standar 1,5%, menggunakan marker pUC dan divisualisasi di bawah lampu UV.

Amplifikasi gen *katG* sepanjang 435pb tanpa menggunakan primer dalam, dengan kondisi PCR yang sama dengan PCR multiplek. Hasil amplifikasi digunakan untuk penentuan urutan nukleotida (sekuensing).

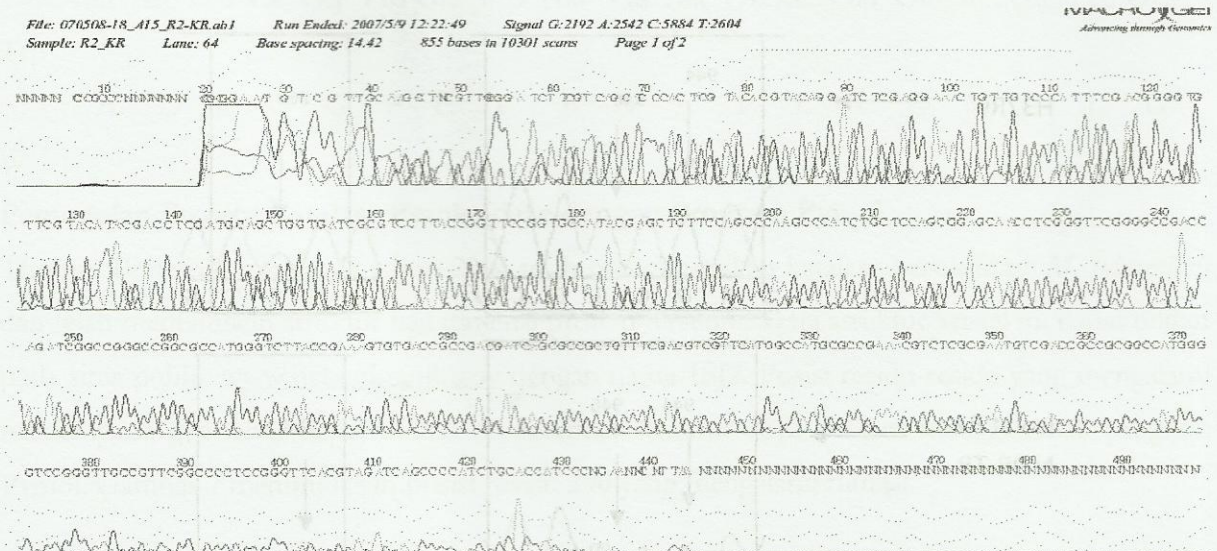
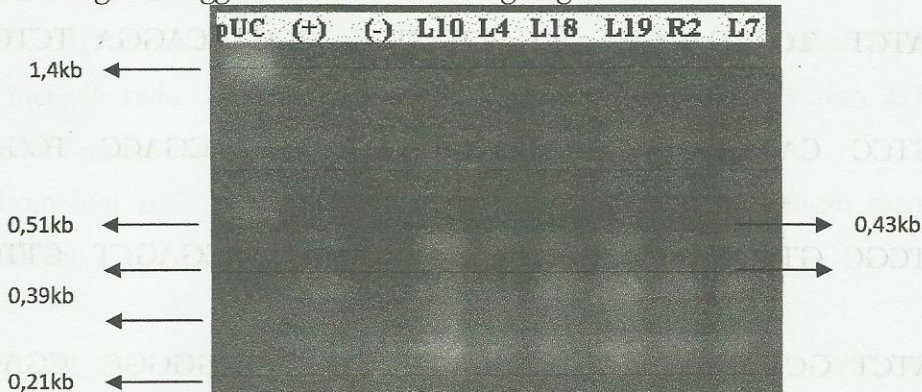
Analisa in silico

Analisa in silico urutan nukleotida menggunakan program DNA*star. Untuk mengetahui posisi-posisi residu yang mengalami mutasi pada struktur tiga dimensi protein katalase peroksidase menggunakan program Pymol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

PCR Multiplek

Beberapa isolat MDR-TB di amplifikasi dengan metode PCR multiplek untuk melihat adanya mutasi pada nukleotida 944 kodon 315, AGC menjadi ACC. Mutasi tersebut menyebabkan



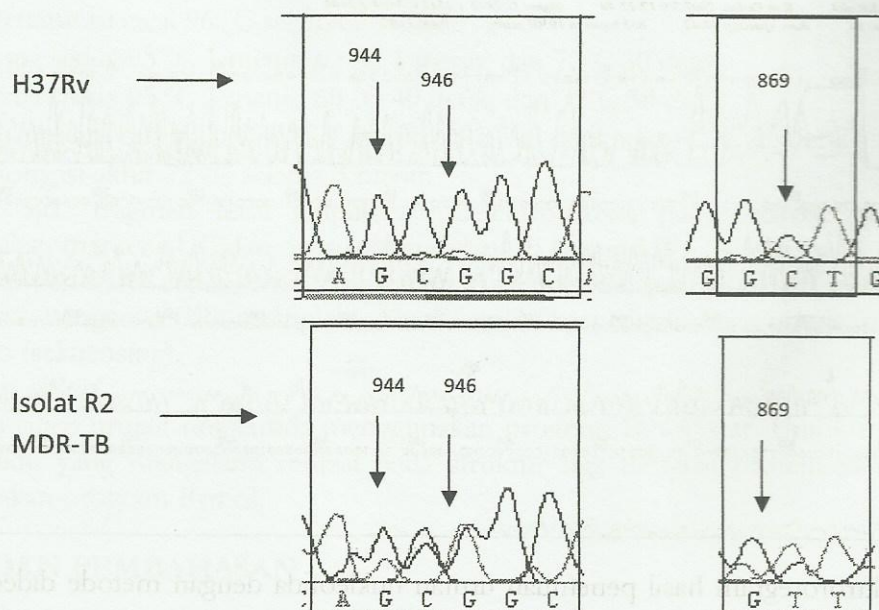
Urutan nukleotida hasil sekuensing isolat R2:

```

NNNNNCCCGC CCNNNNNNNC CGCGGAAATG ATACGGTATG CAAGCATNCG
50
TTGCGGATCT TCGTCAGCTC CCACTCGTAC ACGTACAGGA TCTCGAGGAA
100
ACTGTTGTCC CATTTCGACG GGGTGTTCGT ACATACGACC TCGATGCAGC
150
TGGTGATCGC GTCCTTACCG GTTCCGGTGC CATACGAGCT CTTCCAGCCC
200
AAGCCCATCT GCTCCAGCGG AGCAACCTCG GGTTCGGGGC CGACCAGATC
250
GGCCGGGCGG GCGCCATGGG TCTTACCGAA AGTGTGACCG CCGACGATCA
300
GCGCCGCTGT TTCGACGTCG TTCATGGCCA TGCGCCGAAA CGTCTCGCGA
350
ATGTCGACCG CCGCGGCCAT GGGGTCCGGG TTGCCGTTTCG GCCCCTCCGG
400
GTTACGTTAG ATCAGCCCCA TCTGCACCAT CCCNGAA
437

```

Analisa homologi isolat R2



Gambar.3. Analisa homologi isolat R2 termutasi pada nukleotida 869, C menjadi T, basa kedua kodon 290 GCT menjadi GTT. Isolat R2 tidak mengalami mutasi pada nukleotida 944, kodon 315 (garis oranye) dan nukleotida 946, kodon 316 (garis hijau). Dibandingkan dengan H37Rv.

Analisa homologi isolat R2 dibandingkan dengan galur alami H37Rv. Hasil penjajaran ketiga gen *katG* *M. tuberculosis* tersebut menunjukkan bahwa isolat R2 mengalami mutasi pada nukleotida 869, basa sitosin berubah menjadi timin. Setelah dianalisa, ternyata nukleotida 869 berada pada kodon 290, GCT menjadi GTT, dan perubahan basa tersebut mengakibatkan asam amino alanin berubah menjadi valin. Mutasi yang pernah dilaporkan adalah pada kodon 291, asam amino alanin menjadi prolin (Fang *et al* , 1998).

Analisa homologi asam amino isolat R2 MDR-TB dibandingkan dengan asam amino galur normal H37Rv:

H37RV:

```

281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299
300
841 gcc gat ctg gtc ggc ccc gaa ccc gag gct gct ccg ctg gag cag atg ggc ttg ggc tgg
Ala Asp Leu Val Gly Pro Glu Pro Glu Ala Ala Pro Leu Glu Gln Met Gly Leu GLy
Trp
A D L V G P E P E A A P L E Q M G L G
W

```

Isolat R2:

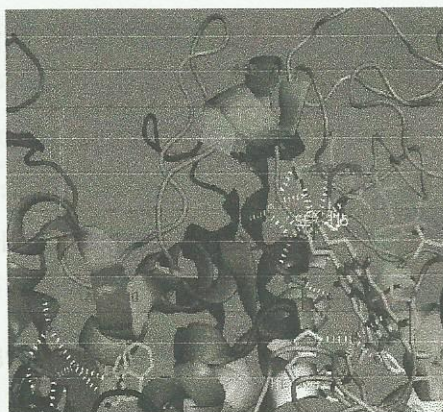
```

281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298
299 300
841 gcc gat ctg gtc ggc ccc gaa ccc gag gtt gct ccg ctg gag cag atg ggc ttg ggc tgg
Ala Asp Leu Val Gly Pro Glu Pro Glu Val Ala Pro Leu Glu Gln Met Gly Leu GLy
Trp
A D L V G P E P E V A P L E Q M G L G
W

```

Pemodelan Protein Katalase Peroksidase dengan Program Pymol

Thomas Bertrand, *et al*, pada tahun 2004 telah mengkristalkan katalase peroksidase *M. tuberculosis* dan telah menentukan struktur tiga dimensi protein tersebut. Data struktur kristal ini dapat dilihat pada situs publik www.ncbi.nlm.nih.gov dengan nama 1SJ2. Posisi residu-residu yang mengalami mutasi pada gen *katG* dapat dilihat berdasarkan struktur 1SJ2 dengan menggunakan program Pymol. Gambar 7 menunjukkan posisi residu 290 yang mengalami mutasi.



Gambar 4. Posisi residu alanin 290 yang mengalami mutasi menjadi valin (gambar B) ditunjukkan dengan label merah, alanin 290 berada dalam daerah loop (warna hijau). Residu 278 hingga 312 pada enzim katalase peroksidase *M. tuberculosis* berada dalam daerah loop, konformasi ini sama dalam dua struktur katalase peroksidase lainnya yaitu pada *Haloarcula marismortui* dan *Burkholderia pseudomallei*. Dalam katalase peroksidase *Burkholderia pseudomallei*, daerah loop ini diperkirakan menjadi sisi pengikatan substrat tempat INH berinteraksi dengan enzim (Carpena *et al*, 2003). Tetapi Bertrand *et al* dan Pieratelli *et al* menyatakan bahwa dalam katalase peroksidase *M. tuberculosis*, daerah loop tersebut bukan merupakan sisi pengikatan INH yang terpenting. Mutasi pada residu asam amino 290 berada relatif jauh dari sisi aktifnya dan pengaruhnya terhadap sifat resistensi INH belum diketahui.

KESIMPULAN DAN SARAN

Isolat R2 MDR-TB, yang secara PCR multiplex termutasi pada gen *rpoB* tetapi tidak mengalami mutasi pada gen *katG* kodon 315 hasil penelitian ini, ternyata menunjukkan bahwa isolat gen *katG*, berdasarkan penentuan urutan nukleotida, tidak termutasi pada posisi kodon 315. Isolat R2 mempunyai jenis mutasi alanin290valin. Simulasi struktur dengan menggunakan program Pymol menunjukkan bahwa residu 290 berada pada daerah loop ujung N yang relatif jauh dari sisi aktifnya. Mutasi pada daerah loop belum diketahui pengaruhnya dalam sifat resisten INH. Penelitian lanjutan diperlukan untuk mengkonfirmasi apakah mutasi tersebut merupakan satu-satunya penyebab sifat resistensi terhadap INH.

DAFTAR PUSTAKA

- Bertrand, T., Eady, A.J.N., Jones, N.J., Jesmin, Nagy,M.J., Gregoire,J.N., Raven, L.E., Brown, A.K., (2004), Crystal Structure of Mycobacterium tuberculosis Catalase-Peroxidase, *J. Biol. Chem.*, Vol **279**, Issue 37, 38991-38999.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A. (2004). Jwetz, Melnick, Adelberg's: medical Microbiology. **23rd eds**. Intl ed. The McGraw-Hill companies. United states. 319-329.
- Cockerill, F. R., III, Uhl, J. R., Temesgen, Z., Zhang, Y., Stockman, L., Roberts, G. D., Williams, D. L., and Kline, B. C. (1995) *J. Infect. Dis.* **171**, 240-245
- Fang, Z., Doig, C., Rayner, A., Kenna, T., Watt, B., Forbes,K.J. (1999). Molecular evidence for heterogeneity of the multiple drug resistant Mycobacterium tuberculosis population un Scotland (1990 to 1997). *J Clin Microbiol.* **37**:998-1003.

- Gillespies, S.H. (2002). Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:267-274.
- Heym, B., Alzari, P. M., Honore, N., and Cole, S. T. (1995) *Mol. Microbiol.* **15**, 235-245
<http://www.who.int/tb/en/>
<http://www.google.co.id/sequencing/>
- Jakopitsch, C., Kolarich, D., Petutschnig, G., Furtmuller, P. G., and Obinger, C. (2003) *FEBS Lett.* **552**, 135-140
- Krueger-Thiemer, E. (1956). *Chemie des Isoniazids*. Jahreshericht Borstel 1954/55, pp. 192- 424. Berlin-Springer.
- Magliozzo, R. S., and Marcinkeviciene, J. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 8867-8870
- Moukrousov, L., Otten, T., Filipenko, M., Vyazovaya, A., Chrapov, E., Limeschenko, E., Steklova, L., Vyshnevskiy, B., Narvskaya, O. (2003). Detection of isoniazid resistance *Mycobacterium tuberculosis* strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting *katG* codon 315 variation. *J Clin Microbiol.* **40**:2509-2512.
- Musser, J. M., Kapur, V., Williams, D. L., Kreiswirth, B. N., van Soolingen, D., and van Embden, J. D. (1996) *J. Infect. Dis.* **173**, 196-202
- Parish, T., Smith, Debbie, A., Kendall, S., Casali, N., Bancroft, G.J., Stoker, N.G. (2003). Deletion of two component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* **71**: 1134-1140
- Pierattelli, R., Banci, L., Eady, N. A. J., Bodiguel, J., Jones, J. N., Moody, P. C. E., Raven, E. L., Jamart-Gregoire, B., and Brown, K. A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 39000-39009
- Pym, A.S., Saint-Joanis, B., Cole, S.T. (2002). Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun.* **70**:4955-4960.
- Rie, A.V., Warren, R., Mshanga, L., Jordaan, A.M., Spuy, G.D., Richardson, M., Simpson, J., Gie, R.P., Enarson, D.A., Beyers, N., Helden, P.D., Victor, T.C., (2001). Analysis for a limited number of genes codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high incidence community. *J. Clin Microbiol.* **39**:636-641.
- Rouse, D. A., Li, Z., Bai, G. H., and Morris, S. L. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2472-2477
- Rouse, D. A., and Morris, S. L. (1995) *Infect. Immun.* **63**, 1427-1433
- Rozwarski, D.A., Grant, G.A., Barton, D.H.R., Jacobs, W.R. & Sacchettini, J.C. (1998). Modification of the NaDH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **279**, 98-102.
- Shoeb, H.A., Bowman, B.U., Ottolenghi, A.C. & Merola, A.J. (1985). Peroxidase-mediated oxidation of isoniazid. *Antimicrob Agents Chemother* **27**, 399-403.
- Soto, C.Y., Menendez, M.C., Perez, E., Samper, S., Gomez, A.B., Garcia, M.J., Martin, C. (2004). IS6110 mediates increased transcription of the *phoP* virulence gene in a multidrug resistance clinical isolate responsible for tuberculosis outbreaks. *J. Clin microbial* **42**:212-219.

- Telenti, A. (2004). In: <http://thorax.bmjjournals.com/cgi/content/full/53/9/793>
- Wei,C-J., Lei, B., Musser, J.M., Tu,S.C. (2003). Isoniazid activation defects in recombinant Mycobacterium tuberculosis catalase peroxidase (katG) mutants evident in InhA inhibitor production. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**:670-675
- Wengenack, N. L., Uhl, J. R., St Amand, A. L., Tomlinson, A. J., Benson, L. M., Naylor, S., Kline, B. C., Cockerill, F. R., III, and Rusnak, F. (1997) *J. Infect. Dis.* **176**, 722-727
- Werngren, J., Hoffner, S.E. (2003). Drug-susceptible Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype does not develop mutation conferred resistance to rifampin at an elevated rate. *J. Clin Microbiol.* **41**:1520:1524
- Winder, F. (1960). Catalase and peroxidase in mycobacteria. A possible relationship to the mode of action of isoniazid. *Am Rev Respir Dis* **81**, 68-78.
- Yue, J., Shi, W., Xie,J., Li,Y., Zeng,E., Wang,H. (2003). Mutation in the rpoB gene of multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from China. *J. Clin Microbiol.* **41**:2209-2212.
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., and Cole, S. (1992) *Nature* **358**, 591-593