

SURAT KETERANGAN

Nomor: 217/UNUSA/Adm-LPPM/III/2021

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya menerangkan telah selesai melakukan pemeriksaan duplikasi dengan membandingkan artikel-artikel lain menggunakan perangkat lunak **Turnitin** pada tanggal 02 Maret 2021.

Judul : Studi Meta Data Gen RhoB pada Mycobacterium tuberculosis
Sebagai Evaluasi Tingkat Resistensi Terhadap Antibiotik
Rifampicin
Penulis : Gilang Nugraha, Rahayu Anggraini, Maharani Pertiwi K
No. Pemeriksaan : 2021.03.13.112

Dengan Hasil sebagai Berikut:

Tingkat Kesamaan diseluruh artikel (*Similarity Index*) yaitu 23%

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 13 Maret 2021

Ketua LPPM



UNUSA
LPPM

Achmad Syafiuddin, Ph.D

NPP: 20071300

LPPM Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya

Website : lppm.unusa.ac.id

Email : lppm@unusa.ac.id

Hotline : 0838.5706.3867

STUDI META DATA GEN *rpoB*
PADA *Mycobacterium*
tuberculosis SEBAGAI EVALUASI
TINGKAT RESISTENSI
TERHADAP ANTIBIOTIK
RIFAMPICIN

by Gilang Nugraha

Submission date: 02-Mar-2021 02:17PM (UTC+0700)

Submission ID: 1522111890

File name: Isi.pdf (1.63M)

Word count: 2301

Character count: 13809

STUDI META DATA GEN *rpoB* PADA *Mycobacterium tuberculosis* SEBAGAI EVALUASI TINGKAT RESISTENSI TERHADAP ANTIBIOTIK RIFAMPICIN

Gilang Nugraha¹, Rahayu Anggraini¹, Maharani Pertiwi K¹

¹Program Studi D-IV Analis Kesehatan, Fakultas Kesehatan, Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya, Jalan Jemursari No. 51-57 Surabaya 60237, gilang@unusa.ac.id

ABSTRAK

Saat ini, Indonesia menduduki peringkat ke-4 penyakit Tuberkulosis (TB) di dunia. Penanganan TB mengalami kendala dengan munculnya *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap antibiotik Rifampisin (RIF) dan Isoniazid (INH) yang dikenal sebagai *Multidrug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB). Analisis sekuens gen *rpoB* *M. tuberculosis* yang resisten terhadap RIF menunjukkan daerah yang rawan mengalami perubahan susunan basa adalah antara kodon 431, 507, 531 dan 533. Kondisi ini menyebabkan Tes Cepat Molekuler (TCM) menjadi kurang efektif dalam mendiagnosa MDR-TB. Oleh karena itu, penelitian ini melakukan evaluasi data base gen *rpoB* pada *M. tuberculosis* melalui meta-analisis. Permasalahan dalam penelitian ini adalah bagaimana variasi dan diferensiasi urutan nukleotida protein *rpoB* pada strain *M. tuberculosis* yang mengarah pada MDR-TB; Apakah perbedaan basa polimorfik gen *rpoB* *M. tuberculosis* menyebabkan mutasi; dan apakah resistensi *M. tuberculosis* terhadap RIF melibatkan mutasi genetik yang mengarah pada proses evolusi. Penelitian dilakukan menggunakan sekuens data gen *rpoB* pada *genBank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Sebanyak 167 data sekuens diekstrak dari *genBank* dengan memperhatikan kriteria eksklusi dan inklusi. Kriteria inklusi meliputi isolat berasal dari pasien dan resistensi isolat terhadap RIF menggunakan program *MEGA7*, *DnaSP 5.1*, *Arlequin3.5* dan *Network 5*. Hasil analisis menunjukkan mutasi gen *rpoB* bervariasi di antara isolat *M. tuberculosis*. Mutasi pada gen *rpoB* melibatkan NI, NII, RRDR, CII dan CIII. Mutasi yang terjadi termasuk dalam mutasi titik. Pendekatan analisis pohon kekerabatan menunjukkan bahwa mutasi pada daerah RRDR merupakan hasil evolusi dalam kurun waktu 10–15 tahun. Variasi mutasi yang terjadi terdapat pada wilayah geografi yang berbeda.

Kata kunci: Meta-analisis, *Multidrug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB), *Mycobacterium tuberculosis*, Rifampisin, Tuberkulosis

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara dengan jumlah penderita Tuberkulosis (TB) cukup besar, sekitar 5,8% dari total TB dunia dan menduduki peringkat terbanyak ke-4 dunia. Penyebaran TB di Indonesia sangat luas dan mempengaruhi semua kelompok umur (1). Upaya pencegahan, pengendalian dan eliminasi penyebaran TB dilakukan dengan pengembangan Tes Cepat Molekuler (TCM) dan terapi yang memadai (1). Analisis molekuler genotip *M. tuberculosis complex* diketahui dapat membantu mengendalikan penyebaran TB.

Fenomena TB di Indonesia, mengalami kendala dengan adanya *M. tuberculosis* yang resisten terhadap Rifampisin (RIF) dan Isoniazid (INH), obat lini pertama terapi TB, dimana kondisi ini disebut sebagai *Multidrug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB). Hasil studi tentang mekanisme dan epidemiologi dari resistensi antibiotik menunjukkan bahwa *M. Tuberculosis* memiliki adaptasi terhadap lingkungan yang terpapar antibiotik rentan terhadap kasus MDR-TB (2). Mekanisme resistensi pada bakteri meliputi mutasi, penghambatan aktivitas antibiotik secara enzimatik, perubahan protein yang merupakan target antibiotik, perubahan laur metabolik, efluks antibiotik, perubahan pada porin channel dan perubahan permeabilitas membran (3).

RIF merupakan salah satu OAT yang secara luas digunakan dan menjadi komponen kunci pengobatan TB di Indonesia dari tahun 1957 hingga saat ini (1,4). Resistensi terhadap RIF pada *M. tuberculosis* sebagian besar disebabkan perubahan susunan gen *rpoB* yang menyandi RNA polymerase sub unit- β . Adanya perubahan susunan gen tersebut akan menyebabkan perubahan struktur dan aktivitas target obat (5,6). Analisis sekuens nuklotida *M. tuberculosis* yang resisten terhadap RIF menunjukkan daerah yang rawan mengalami perubahan susunan basa adalah antara kodon 431, 507, 531 dan 533, dan umumnya terjadi pada 81 pasang basa di daerah *core* yang disebut *Rifampicin Resistance determining Region* atau RRDR (5,7,8). Kondisi ini dapat berdampak pada Tes Cepat Molekuler (TCM) menjadi kurang efektif dalam mendiagnosa MDR-TB.

Oleh karena itu, penelitian ini melakukan evaluasi data base gen *rpoB* pada *M. tuberculosis* melalui meta-analisis. Metode ini dipilih karena memiliki kelebihan yaitu terfokus pada pendekatan kuantitatif. Permasalahan dalam penelitian ini adalah bagaimana variasi dan diferensiasi urutan nukleotida protein *rpoB* pada strain *M. tuberculosis* yang mengarah pada MDR-TB; Apakah perbedaan basa polimorfik gen *rpoB* *M. tuberculosis* menyebabkan mutasi; dan apakah resistensi *M. tuberculosis* terhadap RIF melibatkan mutasi genetik yang mengarah pada proses evolusi.

Mekanisme Molekuler Resistensi Rifampisin

Upaya mempelajari mekanisme molekuler resistensi RIF telah dilakukan dengan penelitian-penelitian berbasis genomik, dimana telah berhasil menyusun genom lengkap dari *M. tuberculosis* (strain H37Rv dan H37Ra) yang mengandung sekitar 4056 gen yang terdiri dari 91% gen penyandi fungsional (9). *M. tuberculosis* memiliki enzim RNA polymerase yang tersusun oleh lima macam sub-unit, yaitu α , β , β' , ω dan σ . Masing-masing sub unit RNA polymerase tersebut dikode oleh lima macam gen independen, yaitu: *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoZ* dan *rpoD* (10). RIF bekerja dengan cara berikatan dengan sub unit- β dari RNA polymerase (11).

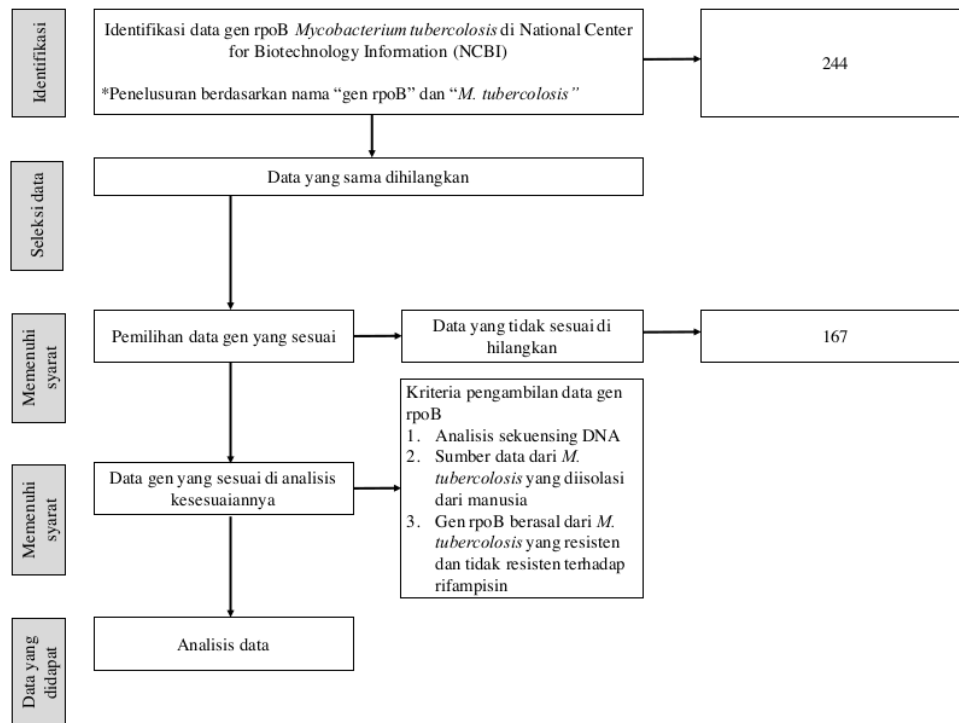
Analisis sekuens nuklotida *M. tuberculosis* yang resisten terhadap RIF menunjukkan daerah yang rawan mengalami perubahan susunan basa adalah antara kodon 507 dan 533, dan meliputi 81 bp (5,7,8). Namun demikian, penelitian lain menunjukkan bahwa mutasi pada daerah tersebut tidak sepenuhnya menimbulkan resistensi *M. tuberculosis* terhadap RIF.

Mutasi yang terjadi pada gen *rpoB* akan merubah struktur sub unit beta sehingga Rifampisin kehilangan *site of action*. Mutasi umumnya terjadi pada 81 pasang basa di daerah *core* yang disebut *Rifampicin Resistance determining Region* (RRDR). Kodon yang paling sering bermutasi dalam gen *rpoB* adalah 531, 526 dan 516. RRDR terdiri dari sekitar dua belas asam amino yang berfungsi untuk berikatan dengan sisi aktif sub unit RNA polymerase lainnya. Pada daerah ini pula, sisi pengikat RIF berada. Mutasi yang berada di daerah RRDR menghasilkan modifikasi sisi aktif dan konsekuensinya adalah inaktivasi RNA polimerase yang menghasilkan resistansi RIF (8).

Selain RRDR, mutasi yang terjadi di luar daerah tersebut ternyata juga berhubungan dengan resistensi RIF (12). Siu dkk (2011) menemukan mutasi di kodon 146 dan 572 yang terletak di luar RRDR menimbulkan resistensi RIF. Upaya pengembangan penelitian selanjutnya diperlukan untuk menentukan sensitivitas deteksi molekuler MDR-TB rifampisin. Informasi perubahan genetik terkait gen *rpoB* diperlukan sebagai upaya penegakan diagnosa MDR-TB.

Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Kesehatan, Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya pada bulan Juli-Desember 2018. Penelitian ini merupakan studi primer atau meta-analisis terhadap kumpulan gen *rpoB* pada *M. tuberculosis* yang terdapat di data base DNA. Desain penelitian merupakan observasional dengan rancangan evaluatif yang bersifat retrospektif dengan tujuan mengevaluasi tingkat resistensi *M. tuberculosis* terhadap RIF. Berikut merupakan urutan jalannya penelitian berdasarkan pada diagram alir (Gambar 1).



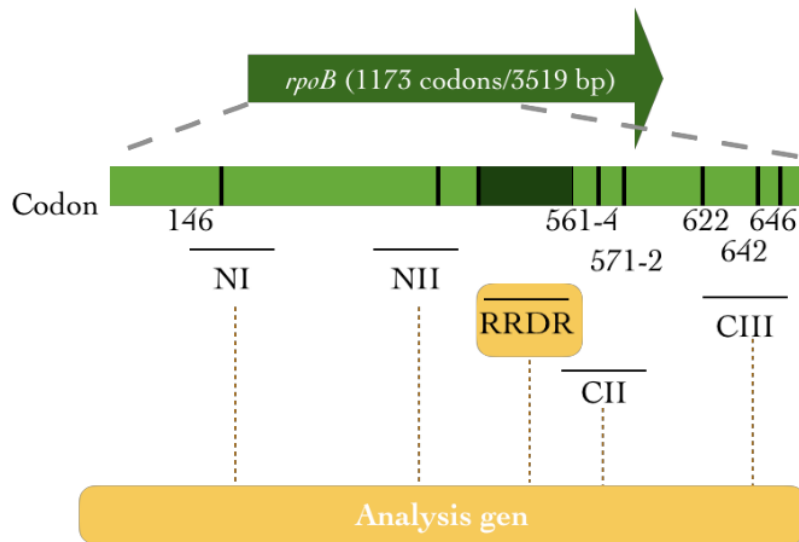
Gambar 1. Bagan air penelitian

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi gen rpoB pada gen bank NCBI menunjukkan bahwa isolat *M. tuberculosis* yang mengalami resistensi terhadap antibiotik RIF berasal dari berbagai wilayah geografis. Analisis data *gene bank* menunjukkan bahwa mutasi rpoB bervariasi dalam isolat *M. tuberculosis* yang berasal dari pasien penderita TB dengan resisten terhadap RIF. Mutasi pada gen rpoB ditemukan pada wilayah geografis yang berbeda, mulai dari benua Eropa, Amerika, Asia dan Australia. Data *base* ini diperlukan untuk mengetahui pengaruh geografi terhadap daerah konservatif mutasi yang terjadi pada *M. tuberculosis*. Data ini nantinya diperlukan sebagai langkah awal untuk merancang metode cepat spesifik wilayah untuk mendeteksi sebagian besar strain yang resisten terhadap RIF di masing–masing wilayah (13).

Analisis gen rpoB berdasarkan kriteria inklusi

Analisis Gen rpoB tersusun atas 1173 kodon atau 3519 bp. Untuk memudahkan analisis, sekuen dibagi atas 5 fragmen, yaitu NI, NII, RRDR, CII dan CIII seperti yang diperlihatkan pada Gambar 2.

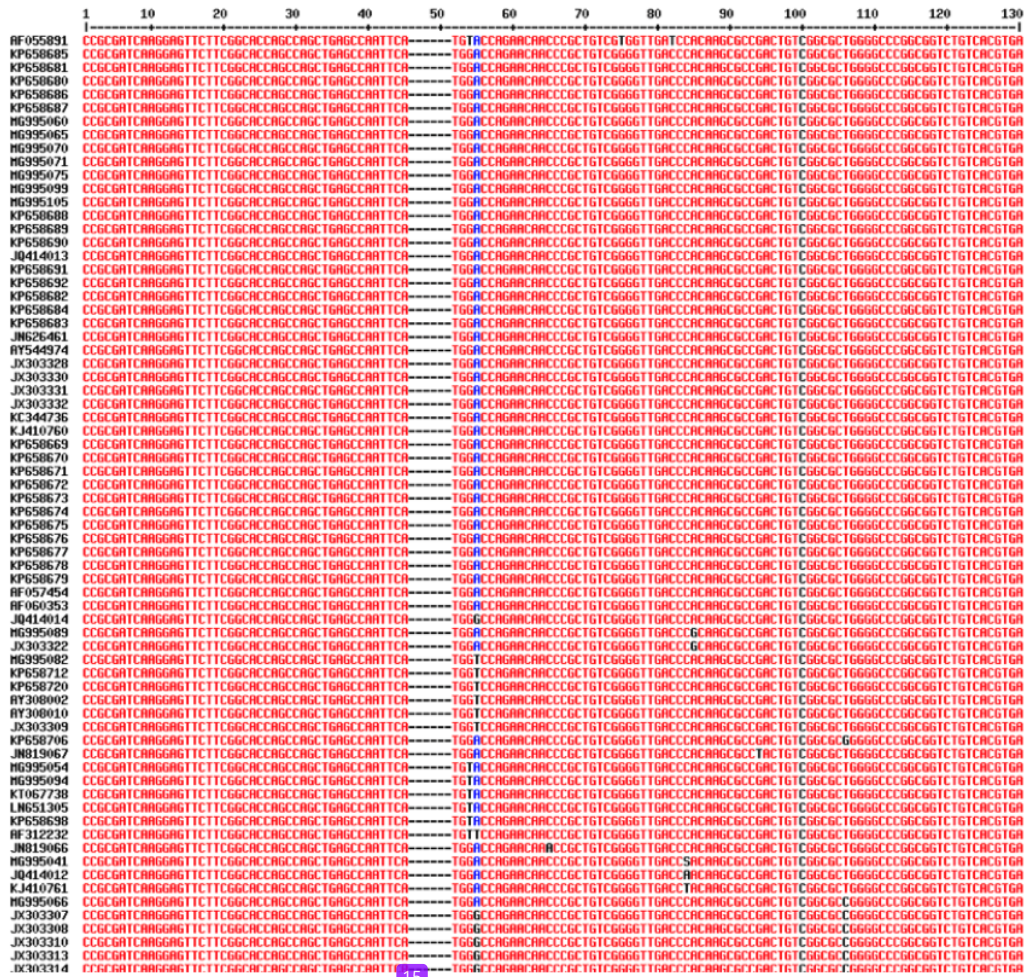


Gambar 2. Gambaran wilayah gen *rpoB* yang mengalami mutasi sehingga menyebabkan resistansi pada RIF. Fragmen NI, NII, RRDR, CII, dan CIII dibuat untuk memudahkan pembuatan primer.

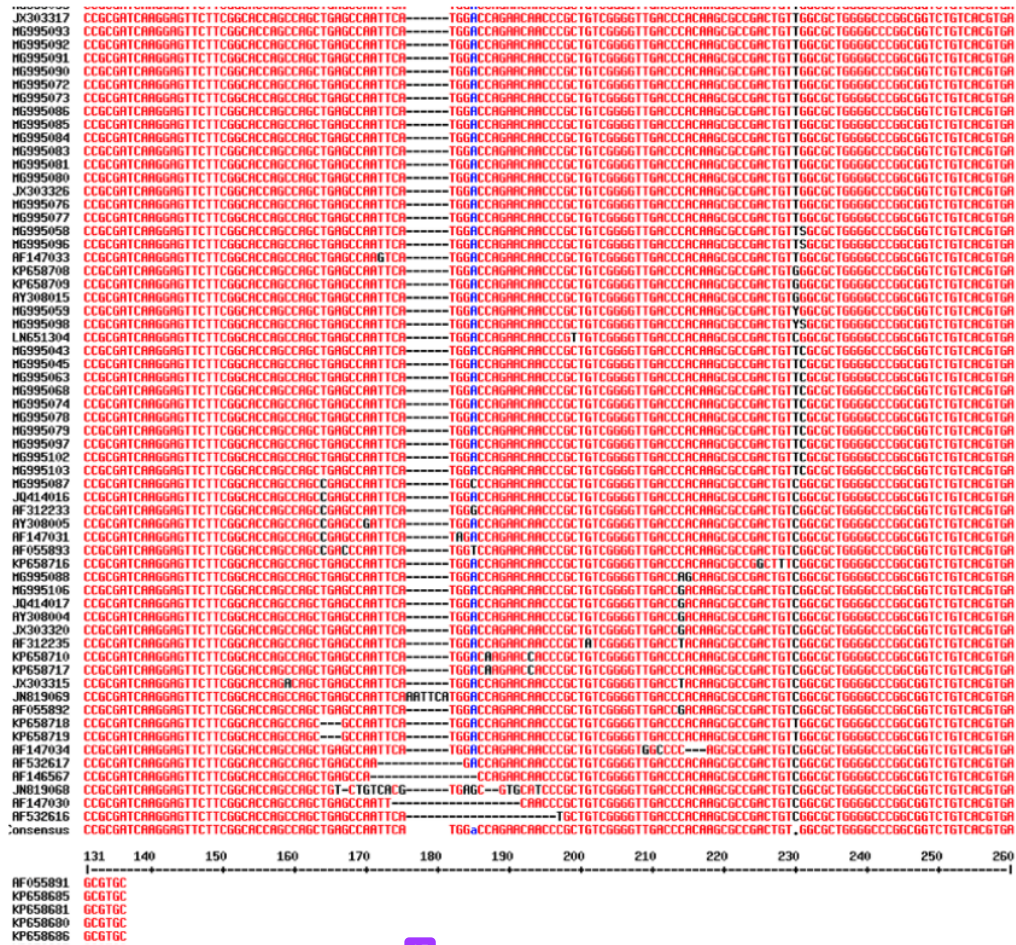
Hasil analisis sekuens data gen *rpoB* menggunakan program MEGA7 menunjukkan adanya perubahan basa nukleotida yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino pada *rpoB* dibandingkan dengan gen *rpoB* *M. tuberculosis* H37Rv sebagai *wild-type*.

Analisis program MEGA7 untuk gen *rpoB*

Hasil analisis menggunakan program MEGA7 menunjukkan adanya perubahan nukleotida yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino pada gen *rpoB* wilayah RRDR.



Gambar 3. Sequence alignment dari Rifampicin Resistance Determining Region atau RRDR di gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis*.



Gambar 3. *Sequence alignment* dari *Rifampicin Resistance Determining Region* atau RRDR di gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* (lanjutan)

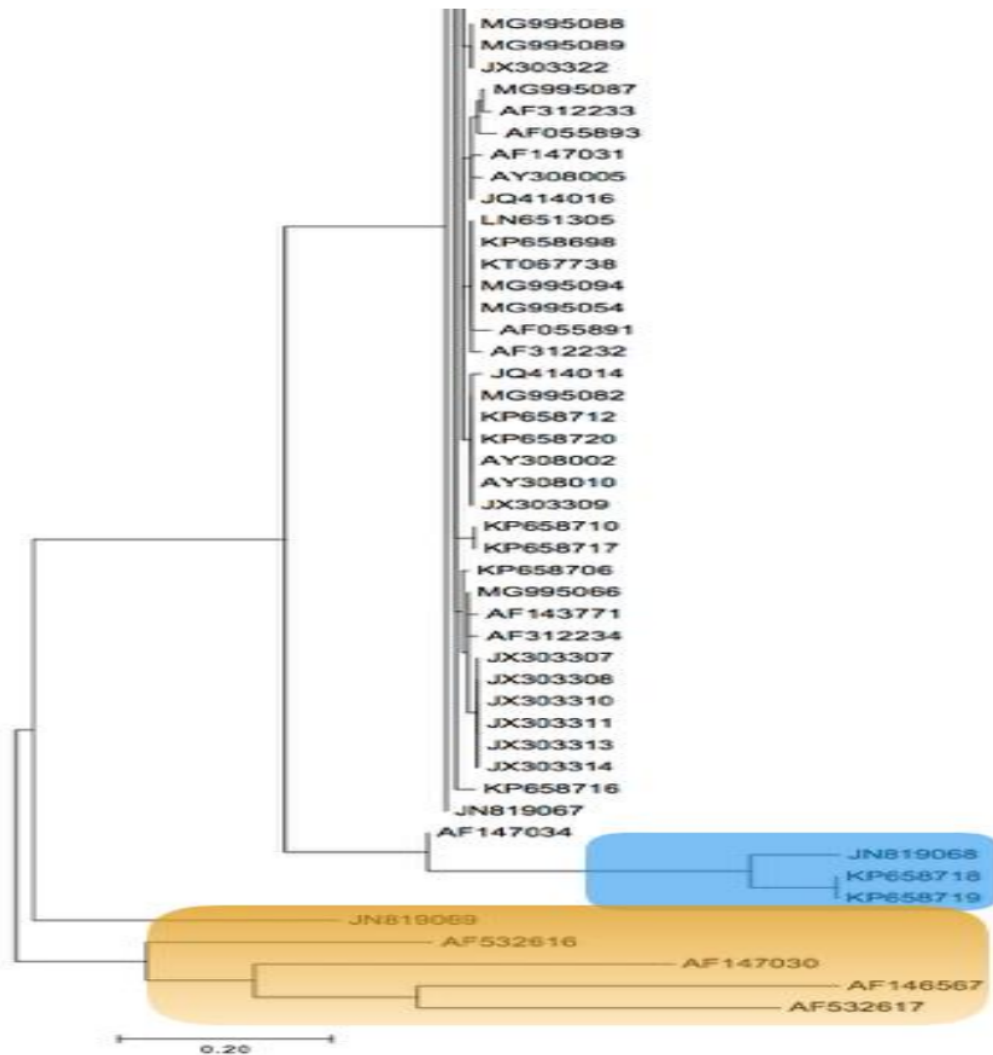
Mutasi berupa penggantian basa nukleotida pada basa nukleotida menyebabkan perubahan hasil ekspresi gen *rpoB* yaitu protein *rpoB*. Mutasi pada kodon 531 (Serin–Leusin) yang terjadi pada daerah kuning menyebabkan perubahan sifat dan struktur asam amino ini. Uji *Gel Shift Mobility Assay* menunjukkan penurunan aktivitas pengikatan *rpoB* sehingga menimbulkan fenotip yang resisten terhadap RIF.

Dalam *sequence alignment analysis*, 206 sekuens isolat *M. tuberculosis* di dibandingkan dengan sekuens dari *M. tuberculosis* H37Rv sebagai kontrol, dan ditelusuri basa nukleotida di daerah RRDR yang mengalami mutasi. Data dalam NCBI menyebutkan bahwa 206 sekuens merupakan isolat *M. tuberculosis* yang resisten terhadap RIF. Tabel 1 menunjukkan nomer kodon dan perubahan nukleotida yang terjadi, serta perubahan asam amino yang ditimbulkannya. Mirip dengan penelitian lain sebelumnya dari berbagai wilayah di dunia Ser531Leu dan His526Cys adalah mutasi titik yang paling banyak terjadi. Mutasi yang terjadi di atas menunjukkan keragaman mutasi titik pada gen RRDR di *rpoB* *M. tuberculosis*.

Tabel 1. Mutasi yang diamati pada gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis*

No Kodon	Perubahan Nuklotida	Perubahan Asam Amino
413	AAC → CAC	Asn → His
435	GAC → GAG	Asp → Glu
451	GCA → GAC	Ala → Asp
490	CAG → CAT	Gln → His
	CAG → CGG	Gln → Arg
511	CGC → TGC	Arg → Cys
513	GTC → GAC	Val → Asp
516	GAC → GTG	Asp → Val
	GAC → GTC	Asp → Val
521	GAG → GAC	Glu → Asp
522	TCG → TTG	Ser → Leu
526	CAC → CTC	His → Leu
	CAC → TAC	His → Tyr
	CAC → GAC	His → Asp
	CAC → CGC	His → Arg
	CAC → AGC	His → Ser
	CAC → ACC	His → thr
530	CTG → ATG	Leu → Met
531	TCG → TTG	Ser → Leu
	TCG → TGG	Ser → Trp
533	CTG → CCG	Leu → Pro

Gambar 4. menunjukkan jarak paling dekat menunjukkan kemiripan atau tingkat kekerabatan paling tinggi. Dari data *base gen bank* diketahui bahwa isolat JN819068, KP658718 dan KP65719 berasal dari dua negara berbeda, yaitu Belanda dan India. Tetapi, kemiripan data sekuens menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut memiliki rata-rata evolusi yang sama dan berada pada tingkat kekerabatan tertinggi. Sedangkan pada isolat JN819069, AF532616, AF147030, AF145657 dan AF532617 menunjukkan level pemisahan yang berarti bahwa isolat tersebut memiliki level kekerabatan terendah dengan isolat lainnya.



Gambar 4. Diagram filogenetik (phylogenetic tree) mutasi pada daerah RRDR gen *rpoB* *M. tuberculosis*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Informasi variasi genetik dan diferensiasi gen *rpoB* dari *M. tuberculosis* terhadap resistensi RIF dari RRDR menyebabkan perubahan genetik meliputi *point mutation*, yaitu pergantian satu basa nukleotida yang mengakibatkan perubahan ekspresi gen. Berdasarkan analisis data primer wilayah RRDR pada gen *rpoB* merupakan hasil dari evolusi atau akibat mengkonsumsi RIF dalam kurun waktu tertentu. Data mutasi yang dihasilkan dari penelitian berguna untuk desain rasional tes molekuler untuk skrining cepat untuk mutasi terkait resistansi RIF sebagai salah satu cara dalam pengendalian MDR-TB.

Saran

Analisis yang dilakukan berdasarkan data primer secara menunjukkan bahwa mutasi pada gen *rpoB* diperoleh dari pasien yang mendapat pengobatan RIF. Tetapi, belum ada studi yang menyebutkan bahwa pasien yang memiliki resistensi terhadap RIF belum pernah mendapatkan pengobatan RIF. Hal ini diperlukan untuk mengetahui kemungkinan *M. tuberculosis* bertransmisi atau menyebar ke individu sehat. Sehingga, individu tersebut berpotensi menjadi penderita MDR-TB.

DAFTAR PUSTAKA

1. Penyakit DJP dan P. Rencana aksi nasional penanggulangan TB melalui penguatan laboratorium TB 2016–2020. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2016.
2. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology Mol Biol Rev.* 2010;74(3):17–33.
3. Campbell EA, Korzhveva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell Press.* 2001;104:901–12.
4. Indyanty WL E, Loekqijana A A, Putri Y T. Pengembangan Laboratory Information System untuk Memperbaiki Waktu Tunggu Layanan Development of Laboratory Information System to Improve Services Turnaround Time. 2014;28(1):53–7.
5. Comas I, Borrell S, Roetzer A, Rose G, Malla B, Galagan J, et al. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *M. tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase. *Nat Genet.* 2012;44(1):106–10.
6. Lahti JL, Tang GW, Capriotti E, Liu T, Altman RB. Bioinformatics and variability in drug response : a protein structural perspective. *J R Soc Interface.* 2012;9:1409–37.
7. YP C, DH P. Analisis mutasi pada kodon 531 pada gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* penyebab resistensi rifampisin. *J Kefarmasian Indonesia.* 2017;15:140–7.
8. A A, MR N, L H, D H. Identifikasi mutase gen *rpoB* Ser531Leu *Mycobacterium tuberculosis* yang berhubungan dengan resistensi rifampisin. *Biomed J Indones.* 2015;1:30–5.
9. Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhu G, et al. Genetic Basis of Virulence Attenuation Revealed by Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One.* 2014;9(6).
10. MM K, MH K, MS A, SK S, MA B, M K. Structure based assessment of *rpoB* gene from multiple-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate. *Int J Adv Res.* 2013;1(7):567–575.
11. Palomino JC, Martin A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics.* 2014;3:317–40.
12. Kit G, Siu H, Zhang Y, Lau TCK, Lau RWT, Ho P, et al. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemoterapy.* 2011;66:730–3.
13. Takawira FT, Mandishora RSD, Dhlamini Z, Munemo E, Stray-Pedersen B. Mutations in *rpoB* and *katG* genes of multidrug resistant *mycobacterium tuberculosis* undetectable using genotyping diagnostic methods. *PanAfrican Med J.* 2017;27:1–16.

STUDI META DATA GEN rpoB PADA Mycobacterium tuberculosis SEBAGAI EVALUASI TINGKAT RESISTENSI TERHADAP ANTIBIOTIK RIFAMPICIN

ORIGINALITY REPORT

23%

SIMILARITY INDEX

23%

INTERNET SOURCES

12%

PUBLICATIONS

11%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	media.neliti.com Internet Source	3%
2	artikel.dikti.go.id Internet Source	2%
3	www.jurnal.unsyiah.ac.id Internet Source	2%
4	ilmuantibiotik.blogspot.com Internet Source	2%
5	jjmicrobiol.com Internet Source	2%
6	Submitted to Associatie K.U.Leuven Student Paper	1%
7	www.medrxiv.org Internet Source	1%
8	Yinjuan Guo, Xingwei Cao, Jinghui Yang, Xiaocui Wu, Yin Liu, Baoshan Wan, Longhua Hu, Hongxiu Wang, Fangyou Yu. "Rifampin-	1%

resistance-associated mutations in the rifampin-resistance-determining region of the rpoB gene of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Shanghai, PR China", Journal of Medical Microbiology, 2021

Publication

9	Submitted to University of Melbourne Student Paper	1 %
10	www.cash4coursework.com Internet Source	1 %
11	repository.usu.ac.id Internet Source	1 %
12	www.medlit.ru Internet Source	1 %
13	pt.scribd.com Internet Source	1 %
14	www.journalijar.com Internet Source	1 %
15	aura.abdn.ac.uk Internet Source	1 %
16	Submitted to University of College Cork Student Paper	1 %
17	edoc.pub Internet Source	1 %
18	jifi.farmasi.univpancasila.ac.id	

Internet Source

1 %

19 idoc.pub
Internet Source

1 %

Exclude quotes On
Exclude bibliography On

Exclude matches < 1%