

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)

YATNITA 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 imunoterapi *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 aksesori NP_215181.1 dan gen *M. tuberculosis* *rpoB* dengan nomor aksesori 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: Hp :081281210054

Email: nitatafshiilaa@yahoo.com

PENDAHULUAN

TUBERKULOSIS (TB) merupakan salah satu penyakit serius di dunia. Menurut WHO (2005), diperkirakan lebih dari 3 juta orang meninggal setiap tahun akibat penyakit infeksi ini. Salah satu faktor yang menyebabkan sulitnya penanganan TB adalah belum efektifnya pemberian kemoterapi terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) penyebab TB^(1,2).

Efektifitas pengobatan sering terkendala dengan munculnya resistensi bakteri *M. tuberculosis* terhadap agen kemoterapi yang diberikan. Dari beberapa penelitian ditemukan kalau resistensi bakteri ini dapat terjadi pada lebih dari satu jenis agen kemoterapi disebut juga dengan *multi-drug resistance* (MDR). Karena kombinasi INH dan RIF merupakan kemoterapi utama dalam penanganan awal infeksi *M. tuberculosis*, maka khusus untuk TB, MDR didefinisikan sebagai resistensi bakteri *M. tuberculosis* terhadap minimal rifampicin (RIF) dan isoniazin (INH)^(2,3).

Menurut Somoskovi *et al*, 2001 dalam Johnson *et al*, 2005, kemungkinan terjadinya resistensi tunggal bakteri terhadap RIF jarang dibandingkan dengan INH. Berdasarkan hal tersebut maka WHO menetapkan resisten RIF sebagai penanda terjadinya MDR. Mekanisme resistensi *M. tuberculosis* terhadap RIF sudah banyak dipelajari dan ditemukan bahwa lebih dari 95% resistensi RIF terjadi karena adanya mutasi titik pada daerah 81-bp-hot-spot (kodon 507-533) gen *rpoB* *M. tuberculosis*^(4,5).

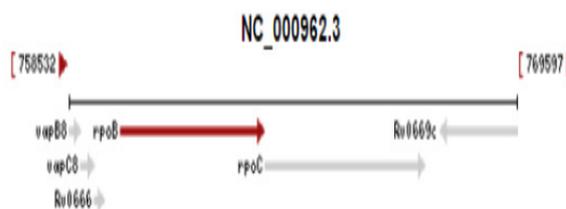
Informasi mengenai gen *rpoB* *M. tuberculosis* ditelusuri melalui situs www.ncbi.nlm.gov menu *gene* menggunakan *reference sequence* (refseq) dengan Accession number NC_000962.3. RefSeq ini merupakan sekuen *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv yaitu strain referensi untuk Tuberkulosis yang sudah diketahui sifatnya dengan baik. Gen ini berada pada genom bakteri dengan posisi 759807..763325 bp, sehingga berukuran sekitar 3518 bp. Gen *rpoB* merupakan DNA-directed RNA polymerase subunit beta, merupakan protein coding, yang berada pada lokus Rv0667 dan ORF MTCI376.08c. Gen ini dimiliki oleh sebagian besar bakteri, namun referensi yang digunakan pada makalah ini merupakan bakteri dengan struktur taksonomi Bacteria; Actinobacteria; Corynebacteriales; Mycobacteriaceae; Mycobacterium; Mycobacterium tuberculosis complex. Pada gambar 1. dapat dilihat posisi gen pada genom *M. tuberculosis*.

Berdasarkan data yang diperoleh dari <http://www.uniprot.org>, diketahui bahwa gen *rpoB* menyandi protein DNA-directed RNA polymerase subunit beta

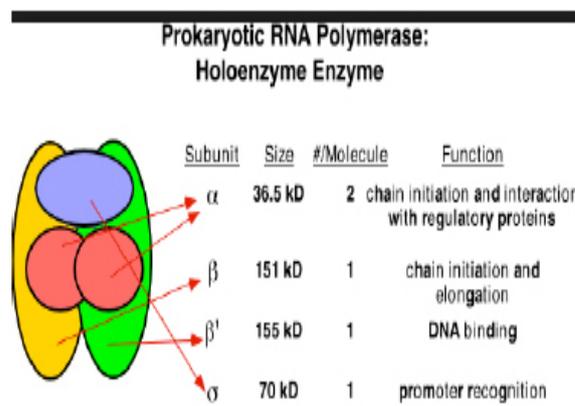
(RNAP subunit beta). Protein ini dikenal juga dengan nama RNA polimerase subunit beta atau Transkriptase subunit beta. Protein RNAP subunit beta berfungsi untuk *catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates*. Aktifitas katalitik yang dilakukan oleh protein ini adalah berupa Nucleoside triphosphate + RNA(n) = diphosphate + RNA(n+1).

Umumnya protein di dalam sel berada pada dinding sel, sitosol, DNA-directed RNA polymerase complex dan membran plasma. Menurut Kunin (1996), gen *rpoB* sangat conserve dan memiliki peran dasar dalam fisiologi bakteri. Gen itu menyandi RNA polimerase (β -subunit) dan bersama gen lain (*rpoA*, *rpoC* dan *rpoD*), menghasilkan protein yang terlibat dalam transkripsi gen.

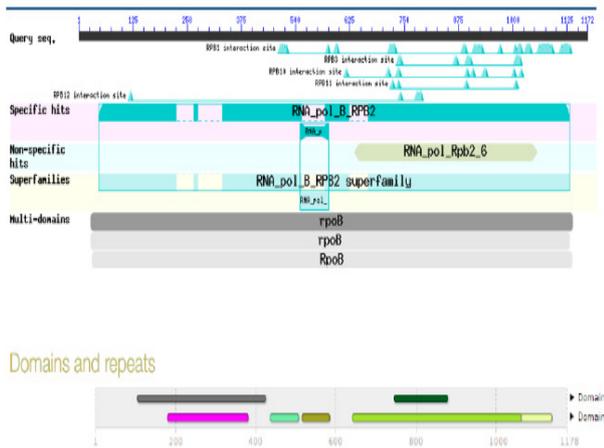
Gambar 2 memperlihatkan suatu studi pada protein DNA-dependent RNA polymerase *Escherichia coli* yang diketahui bahwa protein ini merupakan kompleks oligomer yang terdiri dari 4 subunit yang berbeda (α , β , β' dan σ). Setiap subunit protein ini dirakit membentuk dua struktur protein utama yaitu ($\alpha 2\beta\beta'$) dan holoenzim $\alpha 2\beta\beta'$ ditambah subunit σ . Core enzyme dapat membentuk RNA polimerisasi, tapi membutuhkan subunit σ untuk menginisiasi *site-specific transcription* pada sisi promotor. Gen pengkode subunit α , β , β' dan σ adalah *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* dan *rpoD*.



Gambar 1. Genom, transkripsi dan poliprotein gen *rpoB*.



Gambar 2. Struktur protein DNA-dependent RNA polymerase *Escherichia coli*⁽⁶⁾.



Gambar 3. Putative conserved domains protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis*. A; berdasarkan analisis program BLASP. B; Data dari <http://www.ebi.ac.uk/interpro>.

Hasil BLASP pada <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> menggunakan *reference sequence* (refseq) dengan *Accession number* NP_215181.1 diperoleh data bahwa RNAP subunit beta disusun oleh 1172 asam amino dan memiliki 6-7 domain (Gambar 3).

- RNA polymerase, beta subunit, protrusion
- RNA polymerase Rpb2, domain 2
- RNA polymerase Rpb2, domain 3.
- DNA-directed RNA polymerase, beta subunit, external 1 domain.
- DNA-directed RNA polymerase, subunit 2, domain 6
- RNA polymerase Rpb2, OB-fold
- RNA polymerase Rpb2, domain 7

Berdasarkan analisis protein menggunakan program BLAST-protein pada <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, juga dapat dilihat bahwa protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis* memiliki Ortolog (kemiripan protein yang dianalisis dengan protein lain dari spesies yang berbeda) dengan DNA-directed RNA polymerase subunit beta *Mycobacterium bovis* (AF2122/97)

dengan identities sebesar 100% (Gambar 4).

Mycobacterium bovis adalah agen penyebab tuberkulosis pada sapi (dikenal sebagai sapi TB). Namun, *M. bovis* juga dapat menyebabkan tuberkulosis pada manusia dan mamalia lainnya. *M. bovis* biasanya ditularkan kepada manusia dengan mengkonsumsi daging beku, susu sapi terinfeksi, atau menyebar melalui aerosol. Infeksi *M. bovis* sudah jarang ditemukan di negara maju, karena sudah memperhatikan masalah higienitas dengan baik.

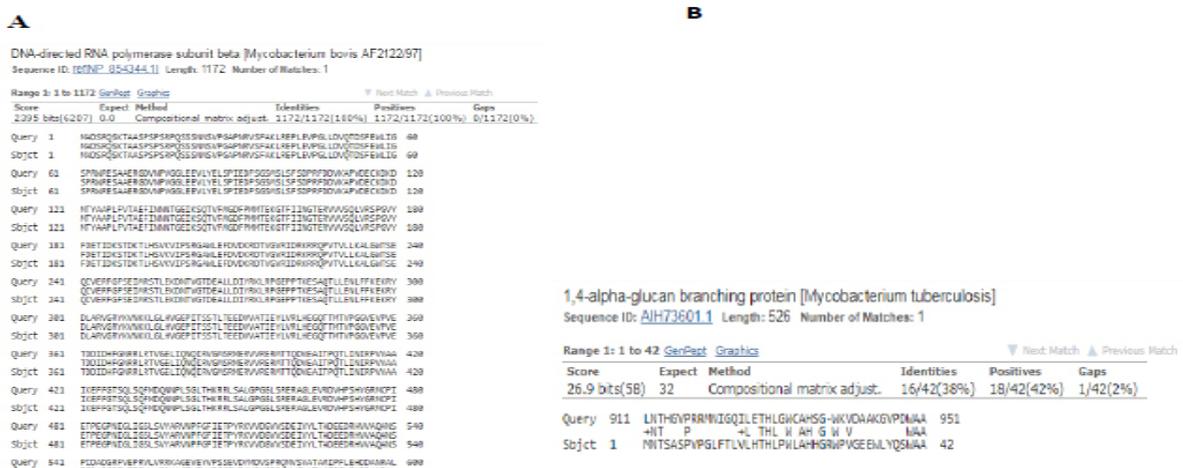
Namun kasus infeksi karena bakteri ini masih banyak ditemukan di negara berkembang. Berdasarkan analisis Paralog (kemiripan protein yang dianalisis dengan protein lain di spesies yang sama) hampir tidak ditemukan adanya kesamaan sekuen protein rpoB dengan protein lain pada *M. tuberculosis*. Kesamaan paling dekat adalah dengan protein 1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB (hanya 38%). Belum diketahui alasan mengapa sulit di temukan paralog protein ini dengan yang lain.

Seperti yang disampaikan sebelumnya, 95% resistensi RIF terjadi karena adanya mutasi titik pada daerah 81-bp-hot-spot (kodon 507-533) gen rpoB *M. tuberculosis* (Musser *et al*, 1995). Sebagian besar penelitian menunjukkan bahwa mutasi paling banyak terjadi pada kodon 531 (Gambar 5).

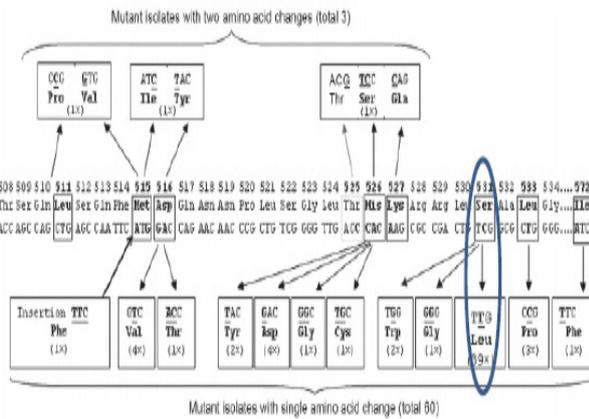
Oleh karena itu, pada makalah ini dipilih mutasi pada kodon 531 (TCG->TTG), yang mengubah serin menjadi leusin (S531L). Analisis bioinformatik ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh mutasi pada kodon 531(S531L) terhadap perubahan sifat protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan-bahan yang digunakan adalah *Reference sequence* protein RNAP subunit beta *M.*



Gambar 4. A. Orthologi protein protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis* dengan *M. bovis*. B. Paralogi protein RNAP subunit beta M tuberculosis dengan protein 1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB.



Gambar 5. Hasil penelitian yang menunjukkan epidemiologi genetik mutasi pada gen rpoB *M. tuberculosis* penyebab resistensi rifampisin.

tuberculosis dengan accession number NP_215181.1 dan gen rpoB *M. tuberculosis* dengan accession number NC_000962.3 digunakan untuk mendapatkan informasi awal.

- Metode.** 1. Analisis struktur dan fungsi dari gen/protein protein RNAP subunit beta *M tuberculosis* menggunakan database bioinformatika dari situs www.ncbi.nlm.gov menu gene dan PubMed, www.uniprot.org.
2. Mutasi pada daerah 81-bp-hot-spot (kodon 507-533) gen rpoB *M. tuberculosis* diperoleh dari literatur.
3. Analisis komposisi, profil dan topologi protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis wild type* dan mutan menggunakan situs/program www.expasy.org, TMHMM, NetNGlyc dan http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/ menu PSIPRED v3.3.
4. Primer di disain untuk mengamplifikasi gen rpoB *M. tuberculosis wild* menggunakan software primer designer version 2.0 (Scientific and Education Software, 1990). Analisis situs restriksi pada gen rpoB *M tuberculosis* dilakukan dengan menggunakan software BioEdit.
5. Analisis struktur sekunder melalui situs http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/ menu PSIPRED dan 3D protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis* serta analisis komparatif dengan yang sudah di mutasi menggunakan situs www.pdb.org menu Swiss Model dan software PYMOL.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Sekuen DNA. Analisa mutasi pada suatu gen dapat dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya dengan menggunakan metode RFLP. Analisis *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) adalah salah satu teknik yang dikembangkan yang secara luas digunakan untuk mendeteksi variasi pada tingkat sekuen DNA. Deteksi RFLP dilakukan atas

dasar adanya kemungkinan untuk membandingkan profil pita-pita yang dihasilkan setelah dilakukan pemotongan dengan enzim restriksi terhadap DNA target.



Gambar 6. Analisis situs enzim restriksi daerah sekitar kodon 531 gen rpoB *M. tuberculosis wild type* dan mutan.

Tabel 1. Pasangan primer yang digunakan untuk mengamplifikasi daerah 81-bp-hot-spot gen rpoB *M. tuberculosis wild type* dan mutan.

	Sekuen	TM
Forward	5'-TACGGTCGGCGAGCTGATCC-3'	78
Reverse	5'-TACGGCGITTCGATGAACC-3'	72

Analisis situs restriksi yang ada pada sekuen nukleotida NC_000962.3 normal dan mutan dilakukan dengan menggunakan program BioEdit 0.7. hasil analisis menunjukkan tidak terdapat perbedaan pola enzim restriksi yang mengenali sekuen NG_027730.1 di daerah 81-bp-hot-spot (khususnya sekitar kodon 531) *M. tuberculosis* normal maupun mutan (Gambar 6). Berdasarkan hasil analisis situs restriksi ini, maka teknik RFLP tidak dapat digunakan untuk menganalisis apakah terdapat mutasi pada gen rpoB *M. tuberculosis*.

Cara lain yang dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi adalah teknik *sequensing*. Disain primer dilakukan untuk menghasilkan primer yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen daerah daerah 81-bp-hot-spot *M. tuberculosis*, termasuk posisi kodon 351 tempat terjadinya mutasi. Pada Tabel 1 dapat dilihat primer yang digunakan untuk mengamplifikasi daerah target.

Analisis Sekuen Protein. Perubahan asam amino pada protein protein RNAP subunit beta di daerah 81-bp-hot-spot *M. tuberculosis* kodon 531 (Ser→Leu), menimbulkan perbedaan sifat yang cukup besar antara kedua asam amino ini. Asam amino Ser bersifat

Tabel 2. Karakteristik fisiko-kimia protein RNAP subunit beta *wild type* dan mutan.

Parameter	protein RNAP Normal		protein RNAP mutan	
Berat Molekul	129236.1 (1172 asam amino) Theoretical pI: 4.93		129262.2 (1172 asam amino) Theoretical pI: 4.93	
Komposisi amino	Asam	Ala (A) 83 7.1%	Ala (A) 83 7.1%	Ala (A) 83 7.1%
		Arg (R) 83 7.1%	Arg (R) 83 7.1%	Arg (R) 83 7.1%
		Asn (N) 39 3.3%	Asn (N) 39 3.3%	Asn (N) 39 3.3%
		Asp (D) 84 7.2%	Asp (D) 84 7.2%	Asp (D) 84 7.2%
		Cys (C) 9 0.8%	Cys (C) 9 0.8%	Cys (C) 9 0.8%
		Gln (Q) 34 2.9%	Gln (Q) 34 2.9%	Gln (Q) 34 2.9%
		Glu (E) 104 8.9%	Glu (E) 104 8.9%	Glu (E) 104 8.9%
		Gly (G) 96 8.2%	Gly (G) 96 8.2%	Gly (G) 96 8.2%
		His (H) 22 1.9%	His (H) 22 1.9%	His (H) 22 1.9%
		Ile (I) 65 5.5%	Ile (I) 65 5.5%	Ile (I) 65 5.5%
		Leu (L) 96 8.2%	Leu (L) 97 8.3%	Leu (L) 97 8.3%
		Lys (K) 49 4.2%	Lys (K) 49 4.2%	Lys (K) 49 4.2%
		Met (M) 31 2.6%	Met (M) 31 2.6%	Met (M) 31 2.6%
		Phe (F) 34 2.9%	Phe (F) 34 2.9%	Phe (F) 34 2.9%
		Pro (P) 65 5.5%	Pro (P) 65 5.5%	Pro (P) 65 5.5%
		Ser (S) 71 6.1%	Ser (S) 70 6.0%	Ser (S) 70 6.0%
		Thr (T) 63 5.4%	Thr (T) 63 5.4%	Thr (T) 63 5.4%
		Trp (W) 9 0.8%	Trp (W) 9 0.8%	Trp (W) 9 0.8%
		Tyr (Y) 24 2.0%	Tyr (Y) 24 2.0%	Tyr (Y) 24 2.0%
		Val (V) 111 9.5%	Val (V) 111 9.5%	Val (V) 111 9.5%
	Pyl (O) 0 0.0%	Pyl (O) 0 0.0%	Pyl (O) 0 0.0%	
	Sec (U) 0 0.0%	Sec (U) 0 0.0%	Sec (U) 0 0.0%	
Komposisi atom	Formula: C ₅₆₆₁ H ₉₂₅₄ N ₁₅₉₅ O ₁₇₀₉ S ₄₀		Formula: C ₅₆₆₄ H ₉₂₅₆ N ₁₅₉₆ O ₁₇₁₀ S ₄₀	
Index aliphatic	88.12		88.46	
Grand average of hydropathicity (GRAV7)	-0.326		-0.322	

polar, hidrofilik, sedangkan asam amino Leu bersifat hidrofobik, non polar alifatik. Berdasarkan nilai scoring matrik, substitusi ini memiliki nilai sekitar -2. Dimana menurut BLOSUM (BLOCK SUBstitution Matrix) jika residu *substitution score* memiliki nilai -1 berarti bahwa residu asam amino yang dibandingkan *mismatch* (tidak cocok)⁽⁷⁾. Semakin negatif score yang diperoleh maka berarti semakin berbeda sifat dari asam amino yang dibandingkan.

Adanya perbedaan sifat dari asam amino penyusun protein mutan dibandingkan dengan protein *wild type* tersebut kemungkinan berpengaruh terhadap fungsi dari protein RNAP *M. tuberculosis*.

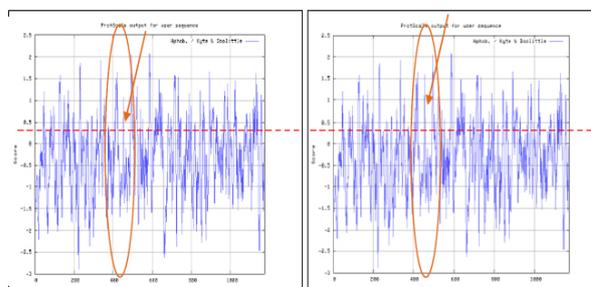
Mutasi pada protein RNAP subunit beta kodon 531 (Ser→Leu) memberikan perubahan pada beberapa parameter yang diamati dengan program ProtParam dari web www.expasy.org. Perbedaan karakteristik protein tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Untuk melihat perbedaan topologi protein *aromatase* yang *wild type* dan protein RNAP subunit beta mutasi pada kodon 531 (Ser→Leu), dilakukan analisis menggunakan program yang ada pada web www.expasy.org. Sifat hidrofobik protein dianalisis menggunakan skala Hphob. / Kyte& Doolittle. Pada Gambar 7, dapat dilihat protein cenderung bersifat hidrofilik, namun bagian tertentu juga bersifat hidrofobik. Terlihat adanya perbedaan sifat hidrofobik pada RNAP subunit beta yang *wild type* dibandingkan yang tipe mutan, khususnya pada daerah sekitar yang mengalami mutasi. Perubahan yang terlihat

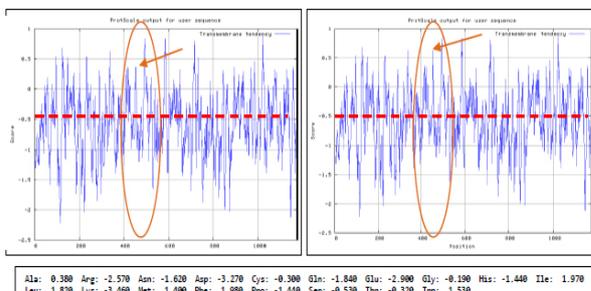
adalah sifat protein pada daerah yang bermutasi lebih hidrofobik dibandingkan dengan yang *wild type*.

Prediksi posisi protein RNAP subunit beta pada transmembran di analisis menggunakan skala asam amino *Transmembrane tendency*. Pada gambar 8, dapat dilihat bahwa RNAP subunit beta sebagian besar cenderung lebih bersifat bukan protein transmembran, namun ada bagian yang dapat bersifat transmembran. Kondisi ini sejalan dengan hasil analisis hidrofobik protein sebelumnya.

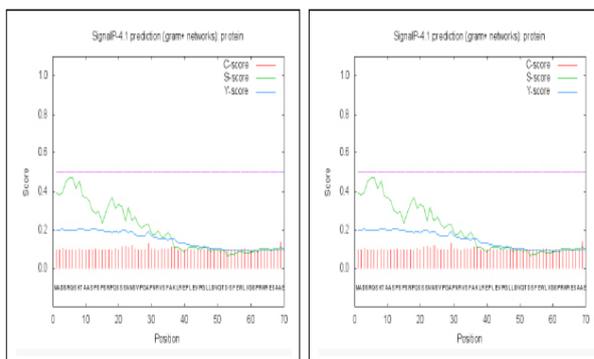
Hasil analisis sifat transmembran protein ini sejalan dengan data yang diperoleh dari <http://www.uniprot.org/> yang menyatakan bahwa selain ditemukan dalam sitoplasma, protein RNAP subunit beta juga berada dalam membran plasma, mutasi yang terjadi menyebabkan nilai/score untuk sifat transmembran



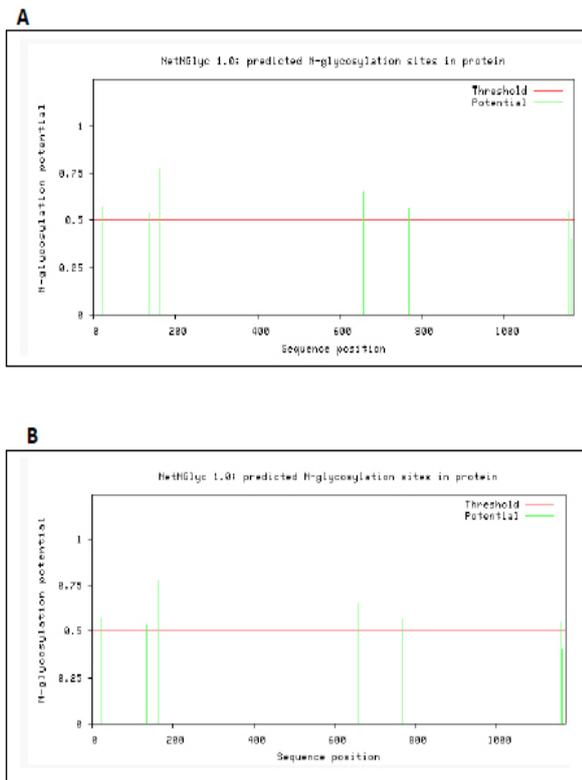
Gambar 7. Topologi RNAP subunit beta berdasarkan sifat hidrofobik menggunakan skala Hphob./Kyte&Doolittle.



Gambar 8. Topologi protein RNAP subunit beta berdasarkan analisis posisi pada transmembran menggunakan skala asam amino *Transmembrane tendency*.



Gambar 9. Signal P dari protein RNAP subunit beta. A: Motif signal P pada protein wild type; B: Motif signal P pada protein mutan.



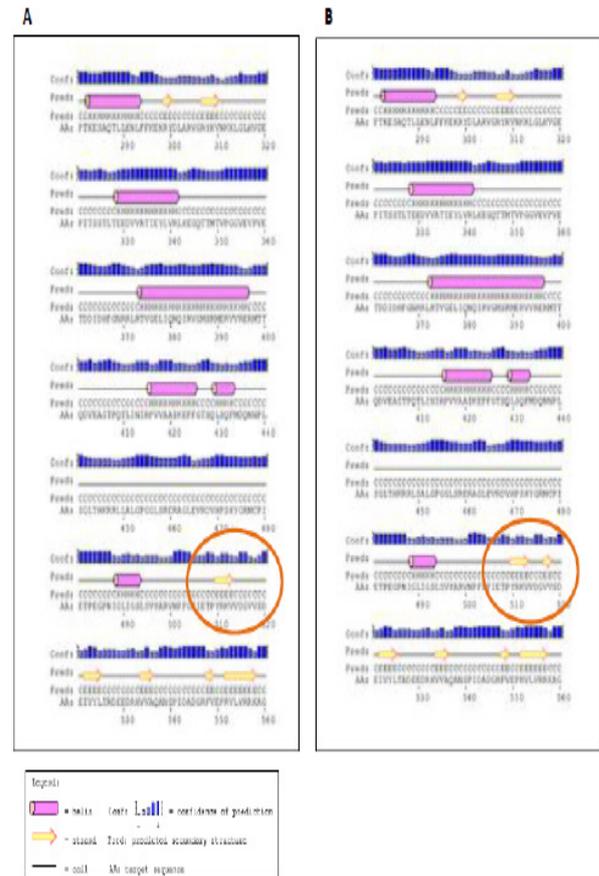
Gambar 10. Motif glikosilasi protein RNAP subunit beta.
A: Motif glikosilasi pada protein RNAP subunit beta *wild type*;
B: Motif glikosilasi pada protein RNAP subunit beta yang dimutasi.

lebih tinggi dibandingkan dengan yang *wild type*.

Walaupun protein RNAP subunit beta memiliki situs protein transmembran, namun hasil analisis menggunakan program SignalP pada web <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> tidak ditemukan adanya motif signal peptida pada protein ini. Signal peptida adalah sinyal N-terminal yang mengarahkan protein melintasi membran plasma. Setiap kelompok organisme memiliki mekanisme sekresi dan signal peptida yang berbeda. Bakteri memiliki mekanisme lebih sederhana jika dibandingkan eukariot. Menurut Roosmalen (2004), signal peptida berupa bagian protein yang bersifat hidrofobik pada daerah C atau N terminal protein⁽⁸⁾ (Gambar 9).

Motif glikosilasi dianalisis menggunakan *software* NetNGlyc. Hasil analisis menunjukkan kalau protein RNAP subunit beta memiliki beberapa motif glikosilasi. Mutasi yang dilakukan tidak merubah situs glikosilasi pada protein (Gambar 10).

Glikosilasi adalah modifikasi yang mempengaruhi proses pelipatan protein, lokalisasi dan kelarutan protein, antigenisitas, aktivitas biologis, serta interaksi protein dengan sel. Walaupun modifikasi protein (khususnya pasca transkripsi) lebih banyak ditemukan pada protein eukariot namun menurut Nothhaft and Szymanski (2013), modifikasi protein



Gambar 11. Sebagian struktur sekunder protein RNAP subunit beta (bagian yang mengalami perubahan).
A: Struktur sekunder protein RNAP subunit beta *wild type*;
B: Struktur sekunder protein RNAP subunit beta mutasi.

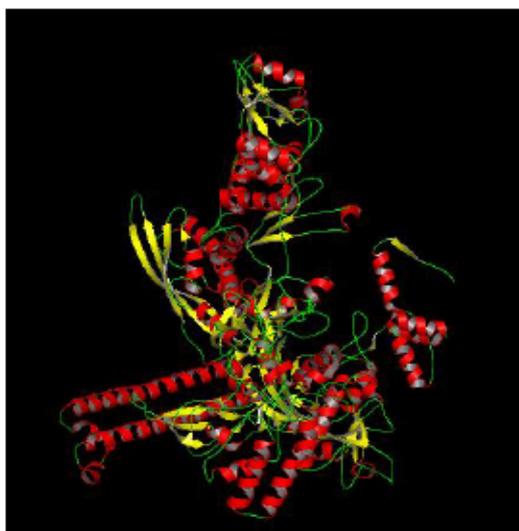
juga ditemukan pada beberapa protein bakteri. Dengan tidak berubahnya motif glikosilasi dari protein yang dimutasi, diharapkan juga tidak akan mengubah struktur dan fungsi penting pada protein⁽⁹⁾.

Struktur sekunder protein berkaitan dengan lipatan dari rantai polipeptida, sehingga menghasilkan bentuk *alpha helix*, berupa berupa pilinan rantai asam-asam amino berbentuk seperti spiral. Bentuk *beta sheet* berupa berupa lembaran-lembaran lebar yang tersusun dari sejumlah rantai asam amino yang saling terikat melalui ikatan hidrogen atau ikatan tiol. Bentuk ketiga berupa struktur koil. Struktur sekunder protein RNAP subunit beta dikonstruksi menggunakan program PSIPRED dari web <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>. Struktur sekunder protein di konstruksi berdasarkan pada sekuen asam aminonya dengan akurasi tinggi. Mutasi pada kodon 531 merubah struktur sekunder protein RNAP subunit beta, dari bentuk koil ke bentuk *strain/beta sheet* (Gambar 11).

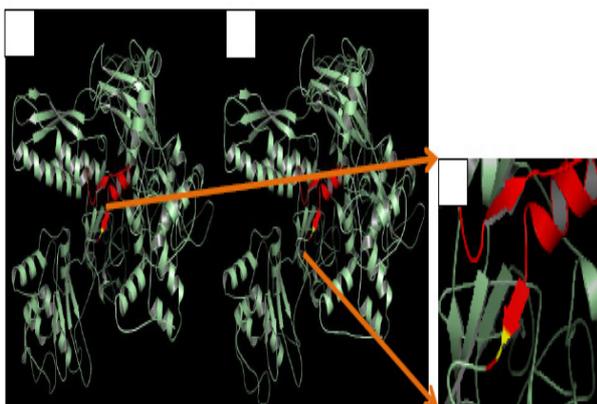
Analisa Struktur Protein. Modeling protein dilakukan untuk memodelkan struktur 3 dimensi dari data sekuen yang dimiliki. Proses modeling dilakukan

menggunakan *template* sekuen protein yang akan diteliti (homolog dengan yang akan diteliti), yang sebelumnya struktur telah dikristalkan dan disimpan dalam Protein Data Bank (PDB). Melalui web www.rcsb.org/pdb/ diketahui protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis* memiliki model kristal dengan kode 4KBM. Namun model kristal ini hanya untuk protein pada posisi asam amino 53-439 (*Structure of the Mtb CarD/RNAP Beta subunit B1-B2 domains complex*), sehingga tidak dapat digunakan pada analisis ini. Hasil penelusuran literatur diketahui bahwa struktur protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis* mirip dengan protein yang sama pada *E. coli*^(10,11). Oleh karena itu pada analisis ini digunakan struktur kristal *Crystal structure of Escherichia coli RNA polymerase* dengan kode 4ZH4 (Gambar 12).

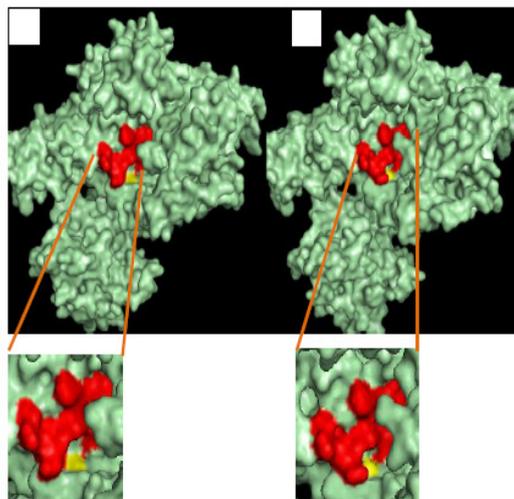
Proses modeling RNAP subunit beta *M. tuberculosis* dilakukan melalui server Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org>). Proses modeling didasarkan pada metode MODELER. Hasil homology



Gambar 12. Model 3D protein *crystal structure Escherichia coli RNA polymerasi (4ZH4)*.



Gambar 13. Perubahan struktur protein akibat mutasi yang terjadi yang ditandai dengan daerah kuning bermutasi (kodon 531, Ser-Leu).



Gambar 14. Modeling protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis* pada posisi *surface*.

A: Protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis* *wild type*;
B: Protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis* mutan.

modeling divisualisasikan pada Pymol. Struktur 3D protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis* dapat dilihat pada Gambar 13, dapat dilihat ada perubahan struktur protein akibat mutasi yang terjadi yang ditandai dengan daerah kuning bermutasi (kodon 531, Ser→Leu).

Keterangan : Merah : daerah 81-bp-hot-spot *M. tuberculosis*. Kuning daerah yang bermutasi.

Dengan menggunakan program Pymol dilakukan analisis protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis* pada posisi *surface* protein. Hasil analisis menunjukkan bahwa posisi protein yang *wild type* lebih berada di daerah *surface* dibandingkan dengan yang mutan (gambar 14). Hal ini sejalan dengan hasil analisis hidrofobik dan karakterisasi asam amino yang dilakukan sebelumnya, bahwa asam amino Leu bersifat hidrofobik sedangkan Ser bersifat hidrofilik, sehingga cenderung untuk berada di permukaan protein^(12,13).

SIMPULAN

Berdasarkan analisis mutasi pada protein RNAP subunit beta *M. tuberculosis*, kodon 531 (Ser→Leu), diketahui bahwa mutasi menyebabkan perubahan pada beberapa sifat dan struktur protein. Kemungkinan perubahan ini yang mempengaruhi sifat resistensi bakteri terhadap antibiotik rifampisin. Namun untuk analisis lebih lanjut perlu dilakukan analisis dengan teknik docking.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Bapak Hidayat Trimarsanto dari Bioinformatika Lembaga Biologi Molekuler Eijkman,

Jakarta yang telah banyak membantu dan mengajarkan penulis tentang bioinformatika.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bauman, Robert W. Microbiology. San Francisco: Person Education Inc; 2004.
2. Gillespie, Stephen H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 2002. 46(2): 267-74.
3. WHO. Anti-TB drug resistance in the world: WHO/ IUATLD global project on Anti-Tuberculosis drug resistance surveillance, 1999-2002, Third Report. 2005.
4. Musser James M. Antimicrobial agent resistance in *Mycobacteria* : Molecular gengetic insights. Clinical microbiol reviews. 1995. 8: 496-514.
5. Johnson Rabia, E M Streichher, G E Louw, *et al*. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Curr Ussues Mol Biol.2005. 8:97-112.
6. Kunin Masai H, Arai K. Mechanism of primer RNA synthesis and D loop/R loop-Dependent DNA replication in *E.coli*. Journal Biochemical Elsevier. 1996. 78(11-12): 1109-17.
7. Alexander P, and J W Fordon. Having a BLAST with bioinformatics. Journal Genome Biology. 2001.
8. Van Rosmaleen M, *et al*. Type I signal peptidases of gram positive bacteria. Journal Biochim Biophys Acta. 2004.
9. Nothafth and Szymanski E M. Bacterial protein N. glycosilation: new perspective and applications. Journal Biology Chemistry. 2013. 288(10): 6912 - 20.
10. Campbell E. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. Cell. 2001. 104(6):901-12
11. Deepa P, K L Therese and H N Madhavan. Detection and characterization of mutations in rifampicin resistance *Mycobacterium tuberculosis* clinic isolates by DNA sequencing. Indian Journal of Tuberculosis. 2005. 52:132-6.
12. Mokrousov I, T Otten, B Vyshnevskiy and O Narvskaya. Allele-specific rpoB PCR assays for detection of rifampin-resistance *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003. 47: 2231-5.
13. Smith Issar. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determination of virulence. Clinical Microbiology reviews. 2003. 16(3):463-96.
14. Madania A, Habous M, Zarzour A, Ghauri I, Hebbo B. Characterization of mutations causing rifampicin and ionozid resistance oh *Mycobacterium tuberculosis* in Syiria. Polish journal of Microbiology. 2012.