

IMPLEMENTASI TEKNIK NUKLIR UNTUK ANALISIS RESISTENSI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TERHADAP RIFAMPISIN

Mukh Syaifudin

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radias-BATAN

Devita Tetriana Marialina Rosilawati

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radias BATAN

Budiman Bela

Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran-Universitas Indonesia

ABSTRAK

IMPLEMENTASI TEKNIK NUKLIR UNTUK ANALISIS RESISTENSI *Mycobacterium tuberculosis* TERHADAP RIFAMPISIN. Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* merupakan penyebab tingginya kematian akibat tuberkulosis (TB) terutama negara-negara di Asia dimana Indonesia menempati peringkat ketiga dari 22 negara dengan kasus TB tinggi. Permasalahan menjadi lebih serius oleh merebaknya bakteri yang resisten terhadap obat anti-TB. Teknik molekuler dengan menggunakan DNA berlabel radioisotop dapat diandalkan untuk mengetahui mekanisme molekuler penyebab resistensi terhadap rifampisin. Dalam penelitian ini, karakteristik molekuler bagian gen *rpoB* telah dianalisis dengan teknik nested polymerase chain reaction (PCR) untuk melabel deoxyribonucleic acid (DNA) dengan [α - 32 P dCTP] pada 70 sputum basil tahan asam (BTA) positif. Perubahan mobilitas pita produk hot-PCR 157-base pairs (bp) dianalisis dengan teknik single strand conformational polymorphism (SSCP) pada gel poliakrilamid. Hasil deteksi menunjukkan bahwa 60 (85,71%) dari 70 sampel sputum adalah positif PCR. Analisis mutasi dengan SSCP berhasil mengungkapkan bahwa 5 (7,1%) isolat diduga mengandung mutasi pada daerah 81 bp gen *rpoB* pada kodon 526 yakni mutasi titik (CAC→TAC) yang menyebabkan perubahan asam amino histidin (His) menjadi tirosin (Tyr). Untuk kelompok sampel lain sebanyak 104, hanya 11 (10,6%) diantaranya positif yang mungkin disebabkan karena perbedaan kondisi reaksi PCR. Hasil studi ini mengindikasikan bahwa mekanisme molekuler resistensi rifampin isolat *M. tuberculosis* melibatkan perubahan gen *rpoB* dan diagnosa molekuler dengan DNA berlabel radioisotop 32 P sangat berguna untuk mendeteksi resistensi dengan lebih sensitif.

Kata kunci : infeksi, *M. tuberculosis*, rifampisin, *rpoB*, resistensi, PCR, SSCP, 32 P

ABSTRACT

THE IMPLEMENTATION OF NUCLEAR TECHNIQUE FOR RESISTANCE ANALYSIS OF *Mycobacterium tuberculosis* TO RIFAMPISIN. *Mycobacterium tuberculosis* infection is still regarded as a causative agent of high mortality mainly in the Asian countries where Indonesia ranks third on the list of 22 high-burden tuberculosis countries in the world. This problem is become more serious due to the emergence of resistant bacteria to anti-TB drugs. Molecular technique with radioisotope-labeled DNA could be implemented to assess the molecular mechanism of rifampicin resistance in *M. tuberculosis*. In this research, the molecular nature of a part of the *rpoB* gene was analyzed using nested polymerase chain reaction (PCR) technique for labeling deoxyribonucleic acid (DNA) with [α - 32 P dCTP] in 70 sputa of positive acid fast bacilli (AFB) results. The alteration of the mobility movement of 157-base pairs (bp) hot-PCR product was analyzed with single strand conformational polymorphism (SSCP) technique on polyacrylamide gel. Sixty (85.71%) samples of the 70 sputa were PCR positive. The analysis of mutation with SSCP revealed that 5 (7.1%) isolates were suggested to contain mutation in the 81 bp region of the *rpoB* gene at codon 526 i.e. point mutation (CAC→TAC) which resulted in amino acid alteration from histidine (His) to tyrosine (Tyr). For other group of 104 samples, only 11 (10.6%) of them were positive with MF-MR which may be due to the difference in PCR reaction condition. The results from our study clearly indicate that the molecular mechanism of rifampicin resistance in *M. tuberculosis* isolates involves alterations in the *rpoB* gene and molecular diagnosis by using 32 P labeled DNA is useful for detection of resistance with more sensitive.

Keywords : infection, *M. tuberculosis*, rifampicin, *rpoB*, resistance, PCR, SSCP, 32 P

PENDAHULUAN

Mycobacterium tuberculosis telah menginfeksi sejumlah besar penduduk di dunia yakni sekitar 8,8 juta kasus tuberkulosis (TB) baru dengan kematian 3 juta per tahun dan menjadi masalah kesehatan masyarakat paling penting terutama di negara-negara berkembang [1]. Di Indonesia, masalah TB masih menjadi ancaman yang serius karena ditemukan sekitar 557.000 kasus TB setiap tahun dan selama tahun 2002 ditemukan 115 kasus dengan *smear* positif per 100.000 populasi [2,3]. Merebaknya kembali TB disertai bertambahnya jumlah strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap obat TB seperti rifampisin (RIF) telah terjadi sejak tahun 1980 [4]. Hal ini mengancam keberhasilan program pengendalian TB nasional yang mengandalkan terapi tuberkulostatika jangka pendek dan merupakan tulang punggung terapi anti-TB [5,6]. Resistensi disebabkan oleh pengobatan yang tidak tepat, ketidakpatuhan pasien dalam meminum obat, adanya infeksi *human immunodeficiency virus* (HIV) [7] dan secara genetika disebabkan karena mutasi gen atau akuisisi dari gen lain [8].

Rifampisin (RIF) adalah obat antibakteri yang handal dan kombinasi komponen regimen standard yang merupakan obat lini pertama untuk pengobatan TB dengan aktivitas tinggi terhadap *M. tuberculosis*. Analisis pada kurang lebih 500 strain *M. tuberculosis* dari berbagai penjurur dunia menunjukkan bahwa 96% isolat klinis *M. tuberculosis* yang resisten RIF memiliki mutasi di daerah 81-bp gen *rpoB*, suatu *house-keeping gene* yang mengkode sub-unit-beta dari polimerase RNA [8,9] dan mampu memblok masuknya nukleotida pertama yang diperlukan untuk mengaktifkan polimerase karena menghalangi sintesis mRNA. Sebagian besar mutasi *missense* penyebab resistensi RIF ditemukan pada kodon 513, 514, 526, atau 531 dan 533 dari *rpoB* [8] sehingga menjadi *marker* RIF. Diperkirakan 90% isolat resisten RIF juga resisten terhadap isoniazid, sehingga resistensi terhadap RIF menjadi indikator penting untuk resistensi ganda (*multi-drug resistance*, MDR), dengan demikian obat lini kedua atau ketiga sangat diperlukan dengan waktu pengobatan lebih lama dan risiko lebih toksik [10,11].

Pengungkapan mekanisme molekuler penyebab resistensi terhadap obat antimikroba memerlukan pengembangan dan aplikasi dengan beberapa strategi PCR yang didesain untuk mendeteksi mutasi penyebab resistensi secara cepat seperti PCR *nested*, *duplex*, *multiplex* atau *real-time* [12,13]. Ada kalanya dalam PCR diperoleh amplifikasi DNA non spesifik yang mungkin disebabkan oleh sekuens yang sangat beragam dari DNA *rpoB*

diantara bakteri yang kaya akan deret basa G-C yang masih menyelinap di dalam saluran pernafasan pasien yang menyebabkan kesulitan dalam menginterpretasikan hasil. Untuk mendekati kebenaran, telah diperkenalkan metode *heminested PCR* yang didasarkan pada *signature* nukleotida dari *M. tuberculosis* dan diketahui lebih spesifik dalam mengamplifikasi suatu segmen gen.

Teknik deteksi konvensional ternyata memiliki beberapa kelemahan seperti lambat, prosedurnya panjang dan kurang sensitif sehingga dapat memberikan diagnosa yang salah. Sedangkan teknik molekuler hanya membutuhkan 1 atau 2 parasit dalam sampel, kemudian DNA-nya digandakan sampai 1 juta kalinya dengan PCR menggunakan asam nukleat berlabel radioisotop seperti P-32 dan hasilnya dapat diperoleh hanya dalam waktu kurang lebih 1 jam [14,15]. Teknik nuklir dapat digunakan untuk melengkapi teknik konvensional dan pada beberapa aplikasi, teknik nuklir dapat dikatakan spesifik dan menawarkan beberapa kelebihan antara lain lebih sensitif dan lebih murah untuk mengidentifikasi organisme yang resisten, untuk mengetahui kerja suatu obat dan mendeteksi organisme yang sangat *virulent*. Makalah ini menyajikan hasil analisis molekuler yang cepat dan sensitif untuk deteksi resistensi dengan teknik PCR dan SSCP menggunakan DNA yang dilabel dengan radioisotop ³²P pada sampel klinis.

TATA KERJA

Sampel klinis

Sebanyak 70 sampel sputum diperoleh dari pasien rawat jalan (55 wanita dan 15 pria; umur rata-rata 67±15,2 tahun) di Pusat Perkumpulan Pemberantasan Tuberkulosis Indonesia (PPTI) Kebayoran Baru Jakarta (50 sampel) dan Balai Pengobatan Penyakit Paru-pru (BP4) Surakarta Jawa Tengah (20 sampel). Kelompok sampel sputum lain berjumlah 104 buah dari PPTI Jl. Baladewa Jakarta Pusat dan Puskesmas Serpong Tangerang dianalisis pula dalam penelitian ini. Seluruh pasien diduga menderita TB berdasarkan hasil diagnosis basil tahan asam (BTA) positif dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen. Sampel dari Puskesmas tidak duji BTA.

Ekstraksi DNA mikobakterium dari sampel sputum

Isolasi DNA dari spesimen klinis dilakukan dengan prosedur Boom seperti telah ditinjau sebelumnya [16]. Lima ratus mikroliter sputum

dicampur dengan volume sama larutan *N*-acetyl L-cysteine NaOH-Na-sitrat dalam tabung mikrosentrifus steril, dikocok dengan *horizontal gyrotary shaker* selama 20 menit pada 420 rpm, kemudian disentrifus selama 10 menit pada 12.000 rpm. Setelah dicuci dengan akuadest steril dua kali, pelet ditambahkan 100 μ l larutan TE, 900 μ l larutan pelisis dan 20 μ l Diatom kemudian dikocok kembali dengan *shaker* selama 10 menit pada 100 rpm dan disentrifus selama 2 menit pada 12.000 rpm. Setelah dicuci 2 kali dengan buffer pencuci dan etanol 70% dingin dan satu kali dengan aseton, pelet dikeringkan pada 56°C. Ke dalam pelet, ditambahkan 50 μ l larutan TE kemudian diinkubasi pada 56°C selama 10 menit. Setelah disentrifus, supernatannya digunakan untuk *template* PCR. Seluruh prosedur inokulasi dan ekstraksi DNA dilakukan dalam *biological safety cabinet class II*.

Amplifikasi DNA bakteri dengan primer MF-MR

Sepasang primer oligonukleotida yang mengamplifikasi fragmen DNA berukuran 342 bp dan spesifik untuk kompleks *M. tuberculosis* yakni MF: 5'-CGA CCA CTT CGG CAA CCG-3'; dan MR: 5'-TCG ATC GGG CAC ATC CGG-3' (Genotech Corporation Korea). Amplifikasi dilakukan dengan mencampur 3-5 μ l *template* DNA dengan 20 pmol masing-masing primer ke dalam tabung PCR-Premix (AccuPower PCR; Bioneer, Chungbuk, Korea) yang mengandung 1 U *Taq DNA polymerase*, 250 μ M masing-masing deoksinukleosida trifosfat (dNTP), 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, dan *gel loading dye*. Kontrol positif adalah DNA dari strain standard *M. tuberculosis* (H37Rv) dan kontrol negatif adalah akuadest. Siklus amplifikasi dilakukan pada *automated thermal cycler* (Bio Rad). Profil siklus meliputi denaturasi awal 95°C selama 5 menit diikuti 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 60°C selama 30 detik, dan ekstensi primer pada 72°C selama 45 detik dan ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit. Pendeteksian dilakukan dengan elektroforesis pada 1,5% agarose (Sigma) yang dilarutkan dalam 1,0X TAE (Tris-Acetate-EDTA) mengandung etidium bromida (0,5 μ g/ml) dan divisualisasi pada panjang gelombang 260 nm UV transilluminator. Kelompok sampel sputum lain dari PPTI Jl. Baladewa yang berjumlah 104 buah juga dianalisis dengan pencampuran komponen PCR biasa dengan kondisi PCR dan visualisasi sama seperti di atas.

Amplifikasi DNA *M. tuberculosis* dengan PCR nested radioaktif

PCR *nested* dilakukan dengan *outer primers* TB1 (5'-ACG TGG AGG CGA TCA CAC CGC AGA CGT-3') dan TB2 (5'-TGC ACG TCG CGG ACC TCC AGC CCG GCA-3') dan *inner primers* TB3 (5'-TCG CCG CGA TCA AGG AGT TCT TC-3') dan TR8 (TGC ACG TCG CGG ACC TCC-3') seperti ditinjau sebelumnya [15,17,18]. PCR dilakukan dalam tabung premix komersial (AccuPower PCR PreMix; Bioneer) yang mengandung *Taq* polymerase 2U, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), dan MgCl₂ 1,5 mM dan primer TB1 dan TB2 masing-masing 20 pmol dan primer TB3 and TB8 masing-masing 1,25 pmol dan kemudian volume dibuat menjadi 20 μ l. Satu mikroliter (0,1 μ Ci) [α -³²P]dCTP (Amersham International) ditambahkan ke dalam campuran reaksi serta dilakukan PCR dengan kondisi preheating pada 94°C selama 5 menit, diikuti 15 siklus untuk amplifikasi tahap awal (30 detik pada 94°C, 1 menit pada 82°C) diikuti amplifikasi kedua sebanyak 30 siklus (30 detik pada 94°C, 1 menit pada 72°C) dan ekstensi selama 5 menit pada 72°C yang dilakukan pada mesin BioRad Thermal cycler Japan. Pencampuran dan proses PCR dilakukan dengan peralatan proteksi yang memadai.

Analisis mutasi gen *rpoB* dengan SSCP radioaktif

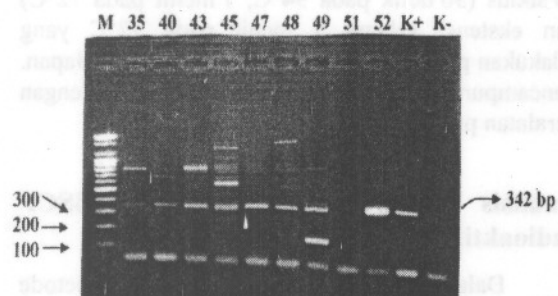
Dalam penelitian ini telah digunakan metode SSCP seperti dilakukan oleh Kim dkk [13] untuk melokalisasi mutasi. Enam mikroliter produk PCR berlabel ³²P radioaktif dicampur dengan 2 μ l SSCP *loading dye* dan 4 μ l formamide 95% (Biorad) yang mengandung *denaturant urea* (Biorad). Sampel didenaturasi pada 95°C selama 4-5 menit, kemudian diletakkan diatas es serta di-load pada gel 0.5X *Mutation Detection Enhancement* (MDE) (BMA, Rockland, ME, USA). Elektroforesis dilakukan dengan sistem proteksi radiasi pada 50-51 V suhu kamar selama 5-7 jam. Gel MDE diambil dengan menempelkan kertas penyaring Whatman, ditutup dengan plastik saran wrap dan selanjutnya dikeringkan dengan vakum-panas (Rapid Dry, Atto, Japan) selama 1 jam. Gel diletakkan dalam kaset, diatasnya diletakkan film sinar-X (Kodak) kemudian disimpan pada suhu -80°C selama 24 jam - 2 hari. Film dicetak dengan *Fuji Medical Processor*.

HASIL PENELITIAN

Amplifikasi DNA *M. tuberculosis* dengan PCR

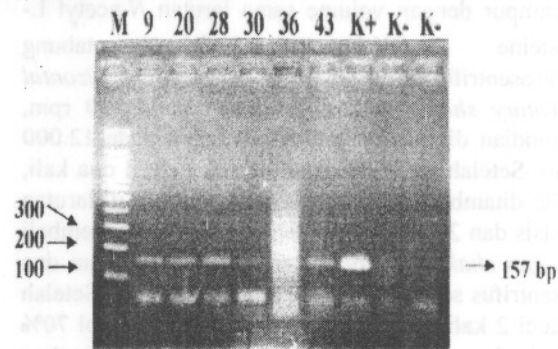
Dari 70 spesimen yang diduga mengandung *M. tuberculosis* dengan hasil uji BTA 100% positif,

60 (85,71%) spesimen diantaranya menunjukkan positif mengandung *M. tuberculosis* berdasarkan hasil PCR dengan primer spesifik MF-MR dari gen *rpoB* (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan keandalan teknik PCR yang dapat diterapkan langsung pada spesimen sputum untuk mendeteksi *M. tuberculosis*. Namun untuk kelompok sampel lain (sebanyak 104 sampel dari PPTI Baladewa, Pasar Senen), hanya 11 (10,6%) diantaranya positif. Hal ini disebabkan karena perbedaan kondisi reaksi yang dilakukan pada kedua kelompok. Untuk kelompok pertama (70 sampel dari PPTI Kebayoran Baru dan BP4), PCR dilakukan dengan menggunakan premix-PCR komersial dengan konsentrasi komponen tertentu yang berbeda dengan reaksi PCR untuk kelompok kedua (104 sampel) yang menggunakan reaksi PCR konvensional (pencampuran biasa). Dalam Gambar 1 terlihat pita-pita yang muncul lebih dari satu untuk setiap sampel sehingga perlu dilakukan teknik amplifikasi DNA menggunakan PCR-nested.



Gambar 1. Hasil amplifikasi dengan PCR konvensional menggunakan primer MF-MR gen *rpoB* yang menunjukkan pita-pita produk DNA berukuran 342 base-pair lebih dari satu untuk setiap sampel

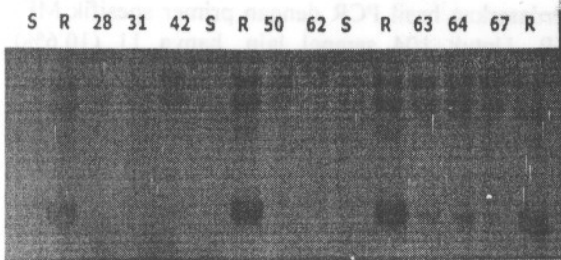
M adalah *marker* bertingkat 100, 200 dan 300 bp. K+ dan K- masing-masing adalah kontrol positif dan kontrol negatif. Pewarnaan dengan EtBr. PCR *nested* menghasilkan produk berukuran 157 bp dimana pita-pita tunggalnya terlihat jauh lebih baik daripada PCR konvensional. Hal ini disebabkan karena produk yang diamplifikasi oleh fase PCR pertama (sepasang primer TB1-TB2) adalah DNA *rpoB* berukuran 205 base pair (bp) yang kemudian mengamplifikasi fragmen 157-bp yang merupakan hasil amplifikasi fase PCR kedua sehingga lebih spesifik (Gambar 2). Oleh karena itu adanya mutasi dalam DNA yang teramplifikasi dari semua spesimen dapat ditentukan dengan mudah menggunakan analisis SSCP. Satu sampel menunjukkan pita yang memoles sepanjang sumur gel yang dapat disebabkan karena kontaminasi.



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA dengan PCR *nested* untuk gen *rpoB* yang menunjukkan pita-pita produk DNA berukuran 157 base-pair (bp) untuk setiap sampel. M adalah *marker* bertingkat 100, 200 dan 300 bp. K+ dan K- masing-masing adalah kontrol positif dan kontrol negatif. Pewarnaan dengan EtBr

Analisis mutasi dengan SSCP radioaktif

Bukti genotipik yang diduga menjadi penyebab resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampin dapat diperoleh dengan mengamati adanya perubahan mobilitas pita untai tunggal DNA menggunakan teknik SSCP dibanding kontrol. Dalam penelitian ini 5 (7,1%) dari 70 sampel yang diuji diduga mengandung mutasi gen *rpoB* penyebab resistensi RIF. Hasil analisis mutasi dengan SSCP radioaktif yang menunjukkan kesamaan mobilitas pita DNA dengan pita DNA kontrol positif ditunjukkan dalam Gambar 3. Dalam penelitian ini digunakan kontrol positif strain *M. tuberculosis* yang resisten (R) terhadap rifampisin yang memiliki mutasi gen *rpoB* pada posisi kodon 526 (CAC→TAC) yang menyebabkan perubahan asam amino histidin (His) menjadi tirosin (Tyr). Sedangkan kontrol rentan (*susceptible*) (S) adalah strain *M. tuberculosis* yang sensitif terhadap obat karena tidak memiliki mutasi pada gen *rpoB*. Dari seluruh sampel yang dianalisis, sampel nomor 28, 42, 63, 64 dan 67 diduga mengandung mikobakteri resisten terhadap rifampisin. Namun hal ini perlu dianalisis lebih lanjut dengan sekuensing untuk memastikan jenis mutasinya. Di samping itu perlu dikemukakan bahwa sampel yang positif tersebut belum tentu tidak memiliki mutasi gen *rpoB* pada kodon lain, karena kontrol positif yang digunakan hanya menunjukkan mutasi pada kodon 526 yang mungkin ukuran produk PCR-nya sama dengan produk ini.



Gambar 3. Hasil analisis mutasi dengan SSCP radioaktif untuk gen *rpoB* yang menunjukkan resistensi terhadap RIF pada sampel nomor 28, 42, 63, 64 dan 67. S adalah sampel standard untuk rentan (*susceptible*) dan R adalah resisten. Waktu elektroforesis 8 jam pada suhu kamar dan pemajanan 40,5 jam

PEMBAHASAN

Resistensi strain *Mycobacterium tuberculosis* sangat mempengaruhi penyebaran tuberkulosis (TB). Penanganan kasus yang kurang baik mungkin menjadi faktor paling penting dalam penyebaran resistensi TB dimana prosedur standard diagnosis dan pengobatan seringkali tidak diikuti dengan baik. Permasalahan logistik, waktu dan tempat yang memadai juga menjadi kendala keberhasilan uji resistensi dalam skala besar dengan mengandalkan metode konvensional di beberapa laboratorium. Implementasi metode yang handal untuk uji resistensi ini dapat membantu survei dan mendeteksi resistensi obat, serta mengidentifikasi pasien resisten obat ganda (*multi-drug resistance* TB) dengan lebih cepat dan sensitif/spesifik^[1]. Oleh karena itulah Pustek Keselamatan dan Metrologi Radiasi tergugah untuk menyumbangkan pemikirannya dalam menangani permasalahan besar ini dengan menawarkan metode berbasis teknik nuklir yang ternyata lebih sensitif yakni menggunakan pelabelan DNA menggunakan isotop radioaktif.

Deteksi resistensi yang cepat terhadap RIF sebagai obat lini pertama adalah sangat dibutuhkan untuk pengendalian secara efisien strain yang resisten terhadap obat ganda^[17,18]. Metode biologi molekuler yang mengeksplorasi perubahan materi genetik penyebab resistensi obat dapat digunakan untuk diagnosa TB. Resistensi ini sangat berhubungan dengan mutasi titik di daerah gen *rpoB*^[15], yakni mutasi yang juga menyebabkan resistensi terhadap RIF pada *Escherichia coli*^[19]. Berbagai macam metode molekuler telah digunakan untuk mendeteksi mutasi yang unik ini seperti PCR-SSCP,

single-tube heminested PCR-SSCP, metode *dideoxy fingerprinting*, *line probe assay*, dan analisis DNA sequence^[13]. Diantara metode tersebut, PCR-SSCP merupakan metode yang paling praktis, tetapi deteksi langsung *M. tuberculosis* resisten RIF dalam sputum dengan PCR-SSCP konvensional memiliki kelemahan dalam sensitivitasnya. Oleh karena itu perlu dikembangkan metode deteksi didasarkan pada teknologi nuklir.

Dalam penelitian ini digunakan isotop ³²P dengan waktu paro 14 hari yang memungkinkan untuk melabel DNA dengan aktivitas spesifik sangat tinggi. Ini berarti bahwa sejumlah kecil produk berlabel akan menghasilkan sejumlah besar disintegrasi radioaktif per menit. Satu keunggulan dari ³²P adalah isotop ini akan menghasilkan berkas penetrasi partikel beta (elektron) yang memunculkan sinyal/pita yang lebih lebar pada lembaran film. Isotop ³²P dapat diganti dengan ³³P yang memiliki waktu paruh dua kali lebih lama sehingga akan menghasilkan gambaran pita yang lebih tajam. Substrat dNTP yang dilabel dengan isotop ini akan memiliki umur lebih lama, tetapi dengan waktu paruh lebih panjang sehingga aktivitas spesifiknya menjadi lebih rendah. Isotop ³²P dapat juga diganti dengan isotop ³⁵S dimana unsur sulfur akan mengganti unsur oksigen dalam gugus pospat menghasilkan tio-pospat. Dengan waktu paro lebih lama (85 hari), maka substrat yang dilabel dengan ³⁵S memiliki waktu paro lebih lama dengan peluruhan energetik lebih kecil yang berarti hasil pita pada filmnya lebih tajam^[20].

Uji PCR dapat memberikan identifikasi yang cepat dengan mengamplifikasi secara selektif daerah di dalam genom bakteri yang spesifik untuk setiap spesies maupun strain^[21]. Uji ini dapat digunakan terutama untuk bakteri yang tumbuh lambat, tidak dapat dikultur dan pada sejumlah kasus dimana pertumbuhan bakteri dihambat dengan obat. Namun kondisi yang sangat penting adalah bahwa *template* DNA hasil ekstraksi dari sputum bebas dari penghambat PCR disamping metode yang harus cepat dan sederhana serta dapat diandalkan. Dalam penelitian ini, dengan menggunakan primer MF-MR untuk setiap sampel diperoleh pita-pita PCR lebih dari 2 atau 3 (Gambar 2), hal ini mungkin disebabkan karena adanya kontaminasi atau primer tidak berikatan secara spesifik pada *template* DNA. Kemungkinan lain disebabkan oleh sekuens yang sangat beragam dari DNA gen *rpoB* diantara bakteri yang mengandung banyak deret basa G-C yang masih menyelip di dalam saluran pernafasan pasien yang menyulitkan interpretasi hasil. Sedangkan dengan menggunakan PCR *nested*, pita-pita yang muncul adalah tunggal.

Dalam penelitian ini persentase sampel yang resisten terhadap RIF diketahui rendah (7,1%). Resistensi primer (resistensi yang belum pernah mendapat OAT kurang dari 1 bulan) terhadap RIF di laboratorium Mikrobiologi RSUP Persahabatan adalah sebesar 1,6%, jadi lebih rendah. Sedangkan resistensi sekunder (penderita pernah mendapat pengobatan lebih dari 1 bulan) adalah 6,02%, yang menunjukkan kemiripan hasil. Sedangkan di BP4 Medan pada 1997-1998, resistensi sekunder terhadap RIF adalah 2,77% [22]. Rendahnya persentase (1-2%) perubahan genetik di daerah gen *rpoB* yang diuji secara *in vitro* resisten terhadap RIF ini juga ditemukan oleh beberapa peneliti lain [23,24]. Persentase resistensi sebesar 5% ditemukan oleh Watterson dkk [25] dan persentase sedikit lebih tinggi (11,3%) ditemukan oleh Alrajhi dkk [26].

Dalam studi ini, digunakan PCR diikuti dengan SSCP yang merupakan metode yang sangat luas untuk deteksi mutasi titik dimana pita abnormal pada gel *non-denaturing* poliakrilamida. Namun untuk memastikan jenis mutasi yang terjadi, diperlukan metode sequencing untuk mengetahui urutan asam nukleotidnya. Kelebihan lain dari SSCP adalah banyak produk PCR dapat diketahui jenis-jenis mutasi secara sekaligus dan merupakan metode yang jauh lebih efisien untuk mengetahui *polymorphism* dalam lokus inti. Meskipun berbagai macam penelitian membuktikan sensitivitas probe radioaktif jauh lebih tinggi, namun memiliki keterbatasan yakni waktu paro isotop yang pendek dan bahaya radiasi yang dimilikinya, sehingga metode *chemiluminescence* lebih banyak digunakan [27,28]. Keberhasilan SSCP juga dipengaruhi oleh suhu saat elektroforesis yang konstan, kondisi pH dimana DNA biasanya didenaturasi dalam larutan dengan pH tinggi (aditif gliserol dapat menurunkan pH dan menggunakan buffer Tris-borat) dan ukuran fragmen (ukuran DNA yang paling baik adalah sekitar 150 pasang basa). Dengan kondisi optimal, 80-90% perubahan basa yang terjadi dapat dideteksi dengan SSCP. Dalam penelitian ini terbukti SSCP radioaktif lebih sensitif dibandingkan SSCP konvensional atau non radioaktif yakni pewarnaan EtBr (data tidak disajikan).

KESIMPULAN

Analisis mutasi dengan SSCP terbukti merupakan teknik yang sederhana dan efektif untuk mendeteksi substitusi basa tunggal (mutasi). SSCP radioaktif lebih sensitif dibandingkan SSCP konvensional (non radioaktif). Dari 70 spesimen yang dianalisis, 60 spesimen diantaranya menunjukkan positif keberadaan *M. tuberculosis*

berdasarkan hasil PCR dengan primer spesifik MF-MR. Untuk 104 sampel lain, hanya 11 (10,6%) diantaranya positif yang disebabkan karena perbedaan kondisi reaksi PCR yang dilakukan. Lima (7,1%) dari 70 sampel sputum BTA positif diduga mengandung mutasi gen *rpoB* berdasarkan hasil analisis SSCP radioaktif yakni memiliki mutasi gen *rpoB* pada kodon 526 (CAC→TAC) yang menyebabkan perubahan asam amino histidin (His) menjadi tirosin (Tyr). Isotop ³²P dapat digunakan untuk melabel DNA dengan aktivitas spesifik tinggi sehingga akan lebih kuat dalam menetrasi film dan diperoleh gambaran pita DNA yang lebih tajam dan lebih mendekati kebenaran.

DAFTAR PUSTAKA

1. WORLD HEALTH ORGANIZATIONS, PPM DOTS in Indonesia; A Strategy for Action, Geneva, Switzerland, 2003.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION REPORT, WHO's Global Tuberculosis Control, Geneva, Switzerland, 2004.
3. MOKROUSOV, I., BHANU, N.V., SUFFYS, P.N., KADIVAL, G.V., YAP, S.F., CHO, S.N., JORDAAN, A.M., NARVSKAYA, O., SINGH, U.B., GOMES, H.M., LEE, H., KULKARNI, S.P., LIM, K.C., KHAN, B.K., SOOLINGEN, D.V., VICTOR, T.C., and SCHOOLS, L.M., Multicenter evaluation of reverse line blot assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates, *Journal of Microbiological Methods*, 57, 323-335, 2004.
4. RATTAN, A., KALIA, A., and AHMAD, N., Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* : molecular perspectives, *Emerging Infectious Diseases* 4, 195-209, 1998.
5. KOCHI, A., VARELDZIS, B., and STYBLO, K., Multi-drug resistant tuberculosis and control, *Res. Microbiol.* 144, 104-110, 1993.
6. SOMOSKOVI, A., PARSONS, L.M. and SALFINGER, M., The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*, *Respiratory Research* 2, 164-0168, 2001.
7. SNYDER, D.E. and ROPER W.L., The new tuberculosis, *New England Journal of Medicine* 326, 703-705, 1992.
8. MUSSER, J., Antimicrobial Agent Resistance in mycobacteria: molecular genetic insights, *Clin Microbiol Rev*, 8:496-514, 1995.

9. VALIM, A., ROSSETTI, M., RIBERIO, M, and ZAHA, A., Mutations in the *rpoB* Gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil, *J. Clin. Microbiology*, 38 (8): 3119-3122, 2000.
10. YUEN, L., LESLIE, D., and COLOE, P., Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia, *J. Clin. Microbiology* 37(12): 3844-3850, 1999.
11. WATTERSON, S., WILSON, S., YATES, M., and DROBNIEWSKI, F.A., Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Clin. Microbiology* 36(7): 1969-1973, 1998.
12. RISKA, P., JACOBS, W., and ALLAND, D., Molecular determinants of drug resistance in Tuberculosis, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4(2 Suppl 1): S4-10, 2000.
13. KIM, B.J., HONG, S.K., LEE, K.H., YUN, Y.J., KIM, E.C., PARK, Y.G., BAI, G.H., and KOOK, Y.H., Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous Mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*), *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3): 1308-1312, 2004.
14. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Combating infection in developing countries, Vienna Austria, 2000.
15. TELENTI, A., IMBODEN, P., MARCHESI, F., LOWRIE, D., COLE, S., COLSTON, M.J., MATTER, L., SCHOPFER, K., and BODMER, T., Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*, *Lancet* 341: 647-650, 1993.
16. GARCIA, L., ALONSO-SANZ, M., REBOLLO, M.J., TERCERO, J.C., and CHAVES, F. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *Journal of Clinical Microbiology* 39 (5): 1813-1818, 2001.
17. KIM, B. J., LEE, K. H., PARK, B. N., KIM, S. J., PARK, E. M., PARK, Y. G., BAI, G. H., KIM, S. J., and KOOK, Y. H., Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputa by nested PCR-linked single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing, *J. Clin. Microbiol.* 39: 2610-2617, 2001.
18. TELENTI, A., IMBODEN, P., MARCHESI, F., SCHMIDHEINI, T., and BODMER, T., Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37:2054-2058, 1993.
19. JIN, D. and GROSS, C.A., Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance, *J. Mol. Biol.*, 202: 45-58, 1988.
20. DAVIS, L.G., KUEHL, W.M., and BATTEY, JF., Basic Methods in Molecular Biology, Edisi kedua, Appleton and Lange, USA, 1994.
21. JENKINS, F.J., Basic methods for the detection of PCR products. *PCR Methods and Applications*, 3:S77-82, 1994.
22. ADITAMA, C.Y., Facts and figures Mycobacterial Laboratory Persahabatan Hospital, WHO Collaborating Center for TB, 2000.
23. BODMER, T., ZURCHER, G., IMBODEN, P. and TELENTI, A., Mutation position and type of substitution in the β -subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35: 345-348, 1995.
24. OHNO, H., KOGA, H., KOHNO, S., TASHIRO, T. and HARA, K., Relationship between rifampin MIC for *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 1053-1056, 1996.
25. WATTERSON, A.S., WILSON, S.M., YATES, M.D., and DROBNIEWSKI, F.A., Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Clin. Microbiol.* 36, 1969-1973, 1998.
26. ALRAJHI, A.A., ABDULWAHAB, S., ALMODOVAR, E., and AL-ABDELY, H.M., Risk factors for drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia, *Saudi Med. J.*, 23, 305-310, 2002.
27. KASYAP, V.K., SITALAKSMI, T., CHATTOPADDHYAY, P. and TRIVEDI, R.

DNA profiling technologies in forensic analysis, *Int. J. Human Genet* 4(3), 11-30, 2004.

28. LOVLIE, R. and EIKEN, H.G., Increased P-32 SSCP sensitivity by combining RE digestion and extended X-ray film exposures, *Biotechniques* 22(4): 598-600, 1997.

TANYA JAWAB

M. Yazid

- Apakah sudah diperhitungkan efek radiasi P-32 terhadap kejadian mutasi DNA?
- Perlu dibuat/dirancang metode untuk membedakan antara mutasi yang asli dan akibat radiasi.

M. Syaifudin

- Efek radiasi P-32 tidak diperhitungkan karena mutasinya akan terjadi dengan memerlukan waktu lama. Disamping itu dalam penelitian ini digunakan kontrol positif yang susceptible (tidak ada mutasi) sebagai pembanding.

- Terima-kasih atas sarannya, tetapi tidak ada manfaatnya dibandingkan dengan urgensi perlunya informasi resistensi yang akan digunakan untuk pertimbangan pengobatan TB secara tepat.

Sucipta

- Jelaskan singkat indikasi adanya resistensi Micobacteri Tuberculosis dengan teknik nuklir.
- Bagaimana keadaannya bila resistensi tersebut tidak hanya oleh Rifampisin, misal terhadap obat yang lain.

M. Syaifudin

- Dalam penelitian ini, resistensi M. tuberculosis ditelusuri melalui perubahan pada DNA yakni mutasi pada gen *rpoB*. Perubahan mobilitas pita DNA berlabel P32 pada sel polioksilamid diduga karena terjadi pada gen lain yang menjadi obat lain seperti isoniazid (gen kat G), atau pirazinamid dan streptomisin.