

**DETEKSI *Mycobacterium tuberculosis* DAN RESISTENSINYA TERHADAP RIFAMPISIN DENGAN METODE NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION/PCR DAN SEKWENSING.**

Maria Lina R.

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi - BATAN

**ABSTRAK**

**DETEKSI *Mycobacterium tuberculosis* DAN RESISTENSINYA TERHADAP RIFAMPISIN DENGAN METODE NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION/ PCR DAN SEKWENSING.** DNA *rpoβ* (RNA polymerase sub unit  $\beta$ ) *M. tuberculosis* dapat diamplifikasi secara spesifik dengan metode *nested PCR*. *Nested PCR* yang dilanjutkan dengan sekwensing dapat secara langsung diaplikasikan untuk mendeteksi *M. tuberculosis* dan menentukan resistensinya terhadap rifampisin dalam sampel sputum. Dalam penelitian ini digunakan 20 isolat klinis dan 30 sampel sputum yang diamplifikasi dengan primer yang dirancang dari bagian gen *rpoβ* *M. tuberculosis*. Metode fenol-kloroform dan metode Boom masing-masing digunakan untuk ekstraksi DNA isolat klinis dan sampel sputum. Sekwensing hanya dilakukan untuk hasil PCR dari sampel sputum. Dari 20 isolat klinis, 15 isolat positif terdeteksi sebagai *M. tuberculosis* dengan *nested PCR*, 4 isolat tergolong MOTT (*Mycobacteria Other Than Tuberculosis*) dan 1 isolat *non-mycobacteria*. Hasil *nested PCR* pada 30 sampel sputum dengan 25 sampel BTA (Basil Tahan Asam) positif dan 5 sampel BTA negatif, menunjukkan hasil positif pada 21 sampel. Besarnya produk *first-round* dan *second-round PCR* masing-masing adalah 205 bp dan 157 bp. Berdasarkan hasil sekwensing dari produk amplifikasi yang positif pada sampel sputum, diperoleh *M. tuberculosis* dari 8 sampel tidak mengalami mutasi pada bagian gen *rpoβ*.

**ABSTRACT**

**NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION / PCR AND SEQUENCING METHODS FOR DETECTION OF *Mycobacterium tuberculosis* AND ITS RESISTANCE TO RIFAMPICIN .** The *rpoβ* (RNA polymerase sub unit  $\beta$ ) DNA of *M. tuberculosis* can be specifically amplified by using a nested PCR. The nested-PCR linked to DNA sequencing was applied directly to detect *M. tuberculosis* and determine the rifampicin resistance either in clinical isolates or sputa. Samples used in this research were 20 clinical isolates and 30 sputa which were amplified with the region of *rpoβ* DNA of *M. tuberculosis*. DNA of clinical isolates and sputum samples were extracted by means of fenol-kloroform and Boom's methods, respectively. Sequencing method was just applied for sputum samples. Of 20 clinical isolates, 15 isolates were positive of results as *M. tuberculosis* with nested-PCR., 4 isolates were MOTT and 1 isolate was non-mycobacteria. The nested-PCR could detect 21 sputum samples of 30 samples consist of 25 samples with positif AFB (Acid fast bacilli) and 5 samples with negative AFB. First-round and second-round PCR products were 205 bp and 157 bp, respectively. Results of the sequencing method from positive amplified sputum, revealed that mutation of *rpoβ* gen region did not occur in *M. tuberculosis* of 8 sputums samples

**PENDAHULUAN**

Tuberkulosis (TBC), penyakit infeksi disebabkan *M. tuberculosis* sampai saat ini masih menjadi masalah serius di seluruh dunia, karena merupakan penyebab kematian tertinggi. Setiap tahun diperkirakan 8 juta infeksi baru terjadi dan 2,5 sampai dengan 3 juta menimbulkan kematian. (1). Dari seluruh kasus TBC di dunia, 38% terdapat di Asia Tenggara dan lebih dari 95% kasus tersebut terdapat di negara berkembang seperti India, Indonesia, Bangladesh, Thailand, dan Myanmar (2). Dalam *Annual report on global TB control 2003*, WHO

menyatakan ada 22 negara dikategorikan sebagai *high-burden countries* terhadap TBC. Indonesia termasuk peringkat ketiga tertinggi jumlah kasus TBC di dunia setelah India dan China (3). Berdasarkan hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001 (4), TBC menduduki peringkat ke tiga sebagai penyebab kematian (9,4% dari total kematian), setelah penyakit kardiovaskular dan sistem pernafasan. WHO memperkirakan 583.000 kasus baru tuberkulosis terjadi di Indonesia setiap tahun dan 140.000 mengakibatkan kematian (5). Estimasi prevalensi TBC di Indonesia berdasarkan pemeriksaan mikroskopik BTA positif sebesar 148,5 per



100.000 orang (6). Program pemberantasan tuberkulosis menjadi lebih rumit akibat munculnya kuman penyebabnya yang resisten terhadap obat (obat anti tuberkulosis) disebabkan penggunaan obat yang tidak tepat baik dosis maupun lamanya.

Diagnosis tuberkulosis khususnya tuberkulosis paru, dapat ditegakkan dengan pemeriksaan klinik (anamnesis terhadap keluhan penderita dan hasil pemeriksaan fisik), pemeriksaan laboratorium, dan pemeriksaan radiologik. Ketiga hasil pemeriksaan tersebut disatukan untuk diagnosis tuberkulosis. Salah satu pemeriksaan laboratorium adalah mendeteksi kuman *M. tuberculosis* sebagai penyebabnya. Pada umumnya metode yang digunakan adalah metode konvensional seperti pemeriksaan mikroskopik basil tahan asam (BTA) dan pemeriksaan kultur. Pemeriksaan mikroskopik cukup cepat dan ekonomis akan tetapi sensitivitas dan spesifitasnya masih kurang sedangkan pemeriksaan kultur memerlukan waktu yang cukup lama sekitar 3 - 12 minggu (7, 8). Oleh karenanya, untuk mengatasi keterbatasan tersebut, diperlukan metode deteksi *M. tuberculosis* yang cepat, sensitif dan spesifik seperti metode PCR. Amplifikasi DNA *M. tuberculosis* dengan target sekwens yang berbeda telah banyak diteliti menggunakan pasangan primer dari bagian gen yang *conserved* seperti gen yang menyandi protein 38 kDa, 65 kDa, mtp40 (9, 10, 11) ataupun dari sekwens sisipan /*insertion sequence* seperti IS6110 (11,12).

Pengembangan metode PCR untuk deteksi *M. tuberculosis* telah mulai dikembangkan dengan tujuan untuk meningkatkan sensitivitas yaitu dengan *nested PCR*. Metode tersebut menggunakan 2 pasang primer dari bagian yang *conserved* dari genom bakteri tersebut (7, 13, 14). *Nested PCR* yang dikaitkan dengan metode lain seperti *nested PCR-SSCP* (15) *nested PCR reverse hybridization* (16) dan *nested PCR-sekwensing* (15). Metode tersebut dapat mendeteksi tidak hanya keberadaan *M. tuberculosis* dalam spesimen klinis akan tetapi juga dapat menentukan resistensinya terhadap obat, berdasarkan adanya mutasi gen penyandi sasaran obat pada *M. tuberculosis* seperti gen *rpoB* untuk rifampisin.

Dalam penelitian ini digunakan metode *nested PCR* dan *nested PCR*-sekwensing untuk mendeteksi *M. tuberculosis* dalam isolat klinis dan sampel sputum dan mengetahui adanya mutasi gen *rpoB* yang berkaitan dengan resistensinya terhadap rifampisin.

## BAHAN DAN METODE

### Sampel penelitian.

Dalam penelitian ini digunakan 20 isolat klinis *M. tuberculosis* hasil isolasi pasien dan 30 spesimen klinik berupa sputum. Isolasi klinis didapat dari Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia dan telah diuji secara konvensional dengan metode kultur. Sampel sputum diperoleh dari PPTI (Perkumpulan Pemberantasan Tuberkulosis Indonesia), Kebayoran Baru, Jakarta Selatan dengan hasil mikroskopik BTA positif (25 sampel) dan negatif (5 sampel). Data dukung penderita meliputi jenis kelamin dan umur. Penderita terdiri dari 16 orang laki-laki dan 14 perempuan dengan umur masing-masing berkisar 18 - 55 tahun dan 17 - 60 tahun.

### Homogenisasi dan Ekstraksi DNA Sputum

Isolat klinis yang tumbuh dalam media Lowenstein Jensen diekstraksi DNANYA dengan memanen isolat bakteri tersebut dengan cara menambahkan larutan NaCl 0,9%. Ekstraksi DNA dilakukan dengan cara sebelumnya (17), yaitu dengan melisis sel bakteri yang telah dipanen dengan larutan TE (Tris-EDTA) 1 x, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) dan proteinase-K. kemudian ditambahkan larutan fenol-kloroform-isoamil alkohol (24:1) untuk mengekstraksi DNA. Presipitasi DNA dilaksanakan dengan menambahkan etanol dan sentrifugasi dengan kecepatan tinggi. Untuk proses PCR, pellet DNA yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan larutan buffer TE 1x.

Proses homogenisasi dan dekontaminasi dilakukan untuk spesimen klinis (sputum) dengan tujuan untuk memekatkan sampel sehingga memperbanyak jumlah bakteri khususnya *M. tuberculosis* yang terkandung dalam sampel sputum dan untuk mengeliminasi mikroba lain selain mycobacteria. Sputum dihomogenisasi dan di-dekontaminasi dengan larutan asetil-L-sistein, NaOH dan Na-sitrat, kemudian disentrifugasi. Metode untuk ekstraksi DNA sputum adalah metode Boom (18). Sel dilisis dengan larutan Tris-HCl, guanidin tiosianat sebagai *chaotropic agent*, EDTA, dan triton X-100. Larutan diatom (pengikat DNA), aseton, etanol 70% serta sentrifugasi dengan kecepatan tinggi digunakan untuk ekstraksi dan presipitasi DNA. Untuk proses PCR, DNA hasil ekstraksi dielusikan dengan buffer TE 1 x.

### Proses PCR dan Elektroforesis

Amplifikasi DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan *nested PCR* dan dilaksanakan di *Departement of Microbiology, Seoul National University College of Medicine, Seoul Korea*. Primer yang digunakan adalah TB1 (5'-ACGTGGAGGC GATCACACCGCAGA CGT-3') dan TB2 (5'-TGCACGTCGCGGACCTCCAGCCCCGCA-3')



sebagai *outer primer* sedangkan sebagai *inner primer* TB3 (5'-TCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTC-3') dan TR8 (5'-TGCACG TCG CGGACC TCCA-3'). Pada proses *nested PCR* digunakan campuran pereaksi yang sudah dikemas dalam tabung PCR ( Accu Power PCR Premix; Bioneer, Daejeon, Korea) yang terdiri dari 50mM Tris-HCl (pH 8,3), 40 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 μM dNTP, 1U *Taq* DNA polymerase dan *gel loading dye*. Konsentrasi akhir *outer primer* dan *inner primer* masing-masing 20 pmol dan 0,5 pmol. DNA target, ditambahkan dalam campuran tersebut (1 tabung untuk 1 reaksi) sehingga volume menjadi 20 μl. Program pada 1<sup>st</sup> round PCR dari *nested PCR* meliputi 1 siklus denaturasi awal, yaitu pada 94°C, 5 menit; 15 siklus dengan tiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C, 30 detik, *annealing* 82°C, 30 detik, *extension*, 82°C, 30 detik. Program ini langsung dilanjutkan dengan 2<sup>nd</sup> round PCR dengan 30 siklus dari denaturasi pada 94°C, 30 detik; *annealing*, 72°C, 30 detik, *extension* 72°C, 30 detik, dan tahap akhir adalah *extended extension* pada 72°C, 5 menit.

Hasil *nested PCR* dideteksi dengan teknik elektroforesis gel agarosa (1,5%). Visualisasi DNA dilakukan dengan *UV transilluminator* setelah gel diwarnai dalam larutan etidium bromida.

#### Sekwensing Produk PCR.

Sekwensing dilakukan hanya untuk 20 sampel sputum serta *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv hasil *nested PCR*. Persiapan untuk sekwensing dilakukan dengan memotong masing-masing DNA sampel pada gel agarosa, kemudian dipurifikasi dengan *QIAEX II Agarose Gel Extraction*. Sekwensing dengan menggunakan *inner primer* TR8. dan dilaksanakan oleh *Department of DNA Sequencing, Macrogen Company*, Seoul, Korea.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

*Nested PCR* dalam penelitian ini telah mengamplifikasi DNA rpoβ *M. tuberculosis*. Produk amplifikasi pada *first-round PCR* menggunakan primer TB1 dan TB2 menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 205 bp, sedangkan fragmen ukuran 157 bp merupakan produk PCR dengan primer TB3 dan TR8 pada *second-round PCR* (Gambar 1 dan 2). Hasil positif dari *nested PCR* yaitu terdapatnya fragmen DNA 205 bp atau 157 bp menunjukkan adanya *M. tuberculosis*.

Hasil *nested PCR* isolat klinis dan sampel sputum beserta hasil BTanya dapat dilihat pada Tabel 1. Dari 20 isolat klinis, 5 isolat menunjukkan hasil negatif yaitu tidak terlihat fragmen DNA baik fragmen 205 bp maupun 157 bp pada gel agarosa. Isolat tersebut adalah R10 (Gambar 1, lajur 10) ) dan Z4, Z9, Z10, Z11 (Gambar 2, lajur 4, 8, 9, 10).

Dari hasil tersebut diperkirakan ke lima isolat adalah *mycobacteria* bukan *M. tuberculosis* (MOTT = *Mycobacteria Other Than Tuberculosis*) atau bukan *mycobacteria (non-mycobacteria)*. DNA rpoβ MOTT atau *non-mycobacteria* tidak teramplifikasi pada *first round nested PCR* dengan primer yang sama menggunakan suhu *annealing* yang tinggi (15). Fragmen DNA rpoβ berukuran 342 bp dapat diamplifikasi dengan menggunakan primer MF & MR dari 44 strain acuan (*reference strain*) *mycobacteria* akan tetapi tidak ada amplifikasi pada DNA *non-mycobacteria* (19). Oleh karenanya, untuk mengetahui apakah ke lima isolat tersebut di atas tergolong dalam *mycobacteria* atau *non-mycobacteria*, dilakukan juga amplifikasi dengan primer MF & MR. Isolat 10R ternyata *non-mycobacteria* karena tidak ada fragmen DNA 342 bp sebagai hasil amplifikasi, sedangkan 4 isolat lainnya (Z4, Z9, Z10, Z11) mempunyai fragmen tersebut, menunjukkan isolat2 tersebut tergolong dalam genus *mycobacteria*. Dari hasil restriksinya dengan enzim restriksi HindII terlihat 4 isolat adalah MOTT karena fragmen 342 bp tidak terestriksi (data tidak diperlihatkan). Restriksi produk PCR dengan primer MF-MR dengan enzim HindII, dapat membedakan antara *M. tuberculosis* kompleks dan MOTT yaitu 2 fragmen (232 bp, 110 bp) merupakan hasil restriksi *M. tuberculosis* kompleks, sedangkan untuk MOTT tidak direstriksi (342 bp) (20). Hasil deteksi 5 isolat tersebut secara konvensional dengan kultur menunjukkan hasil positif. Hal ini membuktikan *nested PCR* lebih spesifik dibanding dengan kultur. Dari hasil penelitian KIM dkk (15), menunjukkan amplifikasi dengan *first round-nested PCR* menggunakan primer TB1 dan TB2 pada 48 isolat klinik hasil identifikasi dengan tes biokimia dan sekwensing 16S rDNA parsial, memberikan hasil positif hanya pada 20 isolat klinis sedangkan 28 isolat yang lain hasilnya negatif. Semua isolat sesuai dengan hasil identifikasi dengan tes biokimia dan sekwensing yaitu 20 isolat adalah *M. tuberculosis* dan 28 isolat adalah MOTT. Amplifikasi juga tidak terjadi pada 19 strain acuan *mycobacteria* dan 9 strain *non-mycobacteria*. Produk PCR 322 bp pada *nested PCR* dengan primer yang mengamplifikasi daerah gen yang menyandi protein 38-kDa (protein antigen b) *M. tuberculosis*, hanya dapat mendeteksi *M. tuberculosis* kompleks dan tidak pada 10 strain acuan MOTT (21).

Pada Tabel 1 terlihat hasil *second round - PCR* dari 30 sampel sputum, 21 sampel menunjukkan hasil positif mengandung *M. tuberculosis* yaitu terdapatnya fragmen 157 bp dan sebaliknya 9 sampel negatif (Gambar 3). Dari hasil pemeriksaan secara mikroskopik pada 9 sampel tersebut, 8 sampel menunjukkan hasil



BTA +1 dan +2. Kemungkinan besar 8 sampel tersebut bukan terinfeksi *M. tuberculosis* akan tetapi terinfeksi MOTT. Identifikasi *mycobacteria* secara mikroskopik langsung dari sputum tidak dapat mengidentifikasi species *mycobacteria* yang menunjukkan metode pemeriksaan tersebut kurang spesifik (8, 22). Tabel 1 juga memperlihatkan hasil positif *nested PCR* pada 4 sampel dari 5 sampel sputum dengan BTA negatif. Penelitian CHENG dkk (23) menunjukkan hasil pemeriksaan mikroskopik dari 144 spesimen *pulmonary* dan *extrapulmonary* dari pasien dengan diagnosis secara klinik terinfeksi *M. tuberculosis*, hanya 25 % positif pada pemeriksaan BTA nya sedangkan 80% hasil positif diperoleh dengan metode PCR. Pendapat umum menyatakan pasien dengan BTA negatif tidak berperan secara nyata menyebarkan infeksi akan tetapi dari hasil penelitian BEHR dkk yang dikutip oleh GARCIA-QUINTANILLA dkk (24), diperoleh 27% kasus TB di San Francisco, California ditransmisi dari kasus dengan BTA negatif.

Hasil *nested PCR* yang dilanjutkan dengan sekvensing fragmen 157 bp dari gen *rpoβ* dalam penelitian ini dilakukan hanya pada 20 strain *M. tuberculosis* dari sample sputum dan *M. tuberculosis H<sub>37</sub>Rv* sebagai strain standar. Dari 20 strain *M. tuberculosis* tersebut, hanya 8 sampel dan *M. tuberculosis H<sub>37</sub>Rv* yang dapat diinterpretasikan hasil sekvensingnya sedangkan strain *M. tuberculosis* yang lain tidak dapat diinterpretasikan. Kemungkinan yang menyebabkan tidak diperolehnya DNA yang murni saat dipurifikasi pada 12 strain dari sampel sputum tersebut dikarenakan terdapatnya DNA *multiband* hasil PCR pada gel agarosa. Berdasarkan hasil sekvensing, pada strain standar dan 8 strain *M. tuberculosis* dari sampel sputum ternyata tidak terjadi mutasi. Jadi strain 2 tersebut masih sensitif terhadap rifampisin. Dasar dari strain *M. tuberculosis* resisten terhadap rifampisin adalah adanya mutasi pada gen *rpoβ*. Beberapa peneliti menyatakan lebih dari 95% strain *M. tuberculosis* resisten rifampisin disebabkan adanya mutasi pada bagian DNA 81 bp dari gen *rpoβ* yang menyandi *RNA polymerase sub unit β* (25, 26, 1).

Pada umumnya deteksi *M. tuberculosis* dengan *nested PCR* digunakan untuk meningkatkan sensitivitas dengan menggunakan beberapa macam primer yang dirancang dari bagian gen atau sekvens sisipan (IS) *M. tuberculosis* yang *conserved*. Beberapa primer digunakan untuk *nested PCR* seperti bagian gen yang menyandi antigen protein 65 kDa (7), antigen protein b 38 kDa (21), MPB64 (*major secreted protein specific to M. tuberculosis complex*) (14) dan IS6110 (27).

Metode *nested PCR-sequencing* dalam penelitian ini dapat diaplikasikan langsung untuk mendeteksi selain adanya *M. tuberculosis* dalam spesimen klinis seperti sputum juga dapat mengetahui resistensinya terhadap rifampisin.

## KESIMPULAN

- *Nested PCR* dapat mendeteksi *M. tuberculosis* dalam 15 isolat di antara 20 isolat klinis sedangkan 5 isolat lainnya yang negatif dengan *nested-PCR* ternyata 4 isolat tergolong MOTT dan 1 isolat *non-mycobacteria*.
- *M. tuberculosis* pada 21 sampel sputum dari 30 sampel yang terdiri 25 sampel BTA + dan 5 sampel BTA -, dapat terdeteksi dengan *nested PCR*.
- Hasil *nested PCR-sequencing* menunjukkan *M. tuberculosis* dalam 8 sampel sputum tidak mengalami mutasi pada gen *rpoβ*nya yang menyatakan bakteri tersebut tidak resisten terhadap rifampisin.
- *Nested PCR* dengan menggunakan primer yang dirancang dari bagian gen *rpoβ* *M. tuberculosis* merupakan metode yang cepat, sensitif dan spesifik untuk mendeteksi *M. tuberculosis* baik isolat klinis maupun langsung specimen klinis seperti sputum.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada :

- IAEA (*International Atomic Energy Agency*) atas bantuan dana melalui program TC (*Technical Cooperation*)
- Prof. Yoon-Hoh Kook, MD. Ph.D., *Department of Microbiology, Seoul National University College of Medicine*, Seoul, Korea, atas ijin dan fasilitas laboratorium untuk pelaksanaan penelitian ini.
- Sdr. Rika Heryani dan Almaida atas bantuannya dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

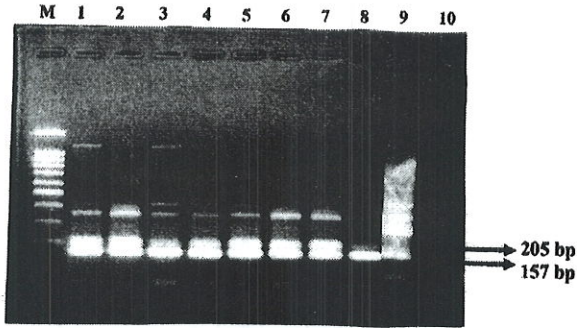
1. ZHANG, M., YUE, J., YANG, Y.P., ZHANG, H.M., LEI, J.Q., JIN, R.L., ZHANG, X.L., and WANG, H.H. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J. Clin. Microbiol.* **43** 11 (2005) 5477 - 5482.
2. ALAMSYAH, B. Epidemiologi genetic serta factor resiko *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten inh dan atau rifampisin. Disertasi Program Doktor Ilmu Kesehatan Masyarakat, Program Pascasarjana, Fakultas Kesehatan



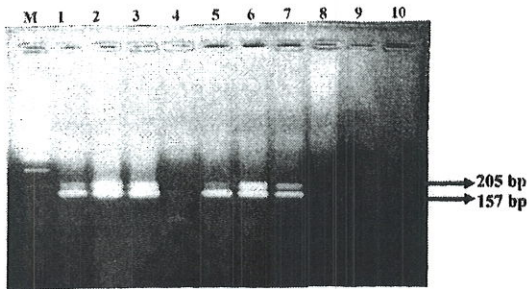
- Masyarakat, Universitas Indonesia, Jakarta 2003.
3. WHO, Global, Tuberculosis Control, WHO Report, Surveillance, Planning, Financing, Geneva 2004.
  4. BADAN PENELITIAN dan PENGEMBANGAN KESEHATAN. Survei Kesehatan Rumah Tangga, 2001. Badan Litbang Depkes, Jakarta 2002.
  5. DIREKTORAT JENDRAL PEMBERANTASAN PENYAKIT MENULAR dan PENYEHATAN LINGKUNGAN PEMUKIMAN, DEPARTEMEN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA. Pedoman pemberantasan tuberkulosis paru, Jakarta 2000.
  6. TIM SURKESNAS BADAN PENELITIAN dan PENGEMBANGAN DEPKES RI.. Survei prevalensi tuberkulosis Indonesia tahun 2004, Jakarta 2005.
  7. PIERRE, C., LECOSSIER, D., BOUSSOUGANT, Y., BOCART, D., JOLY, V., YENI, P., and HANCE, A.J. Use of reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. J. Clin. Microbiol. 29 4 (1991) 712 - 717.
  8. HEIFETS, L.B., and BARNES, P.F. Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In: Bloom, B.R. (ed.). Tuberculosis, pathogenesis, protection, and control. American Society for Microbiology, Washington DC. (1994) p. (85 - 110).
  9. SJOBRING, U., MECKLENBURG, M., ANDERSEN, A.B., and MIORNER, H. Polymerase chain for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 28 10 (1990) 2200- 2204.
  10. PAO, C.C, BENEDICT, T.S., YOU, J.B., MAA, J.S., FISS, E.H., CHANG, C. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 1877 - 1880.
  11. BAROUNI, A.S., SARIDAKIS, H.O., VIDOTTO, M.C. Detection of *Mycobacterium* in clinical samples by multiprimer polymerase chain reaction. Braz. J. Microbiol. 35 1-2 (2004)
  12. KOX, L.F.F., RHIENTHONG, D., MEDO MIRANDA, A., UDOMSANTISUK, N., ELLIS, K. van LEEUWEN, J., van HEUSDEN, S., KUIJPER, S., and KOLK, A.H.J. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 32 3 (1994) 672 - 678.
  13. MIYASAKI, Y., KOGA, H., KOHNO, S., and KAKU, M. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 31 8 (1993) 2228 - 2232.
  14. MARTINS, L.C., PASCHOAL, I.A., NOWAKONSKI, A.V., SILVA, S.A.B., COSTA, F.F., and WARD, L.S. Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 33 3 (2000)
  15. 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 7 (2001) 2610 - 2617.
  16. PALUCH-OLEK, J. Application of nested PCR and reverse hybridization for diagnosis of central nervous system tuberculosis. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 14<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease, Prague/Czech Republic, May 1 -4 2004. Abstract
  17. MARIA LINA R., PRATIWI SUDARMONO, dan FERA IBRAHIM. Sensitivitas metode PCR (*Polymeerase Chain Reaction*) dalam mendeteksi isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis*. J. Kedokteran Trisakti 21 1 (2002) 7 - 14.
  18. KOLK, A.H.J., KOX, L.F.F., van LEEUWEN, J., and KUIJPER, S. Polymerase chain reaction for the *M. tuberculosis* complex. Laboratory of Tropical Hygiene, Department of Biomedical Research Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherland, 1995.
  19. KIM, B.J., LEE, S.H., LYU, M.A., KIM, S.J., BAI, G.H., KIM, S.J., CHAE, G.T., KIM, E.C., CHA, C.Y., and KOOK, Y.H. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*), J. Clin. Microbiol. 37 6 (1999) 1714 - 1720.
  20. KIM, B.J., LEE, K.H., PARK, B.N., KIM, S.J., BAI, G.H., KIM, J.K., and KOOK, Y.H. Differentiation of Mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of RNA polymerase gene (*rpoB*). J. Clin. Microbiol. 39 6 (2001) 2102 - 2109.

- MIYASAKI, Y., KOGA, H., KOHNO, S., and KAKU, M. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **31** 8 (1993) 2228 - 2232.
22. MAGDALENA, J., VACHEE, A., SUPPLY, P., and LOCHT, C. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* **36** 4 (1998) 937 - 943.
23. CHENG, V.C.C., YAM, W.C., HUNG, I.F.N., WOO, P.C.Y., LAU, S.K.P., TANG, B.S.F. and YUEN, K.Y. Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Pathol.* **57** (2004) 281 - 285.
24. GARCIA-QUINTANILLA, A., GARCIA, L., TUDO, G., NAVARRO, M., GONZALEZ, J., and JIMENEZ de ANTA, M.T. Single-tube balanced heminested PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative samples. *J. Clin. Microbiol.* **38** 3 (2000) 1166 - 1169
25. TELENTI, A., IMBODEN, P., MARCHESI, F., LOWRIE, D., COLE, S., COLSTON, M.J., MATTER, L., SCHOPFER, K., and BODMER, T. Detection of rifampicin - resistance mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet* **341** (1993) 647 - 650.
26. YUEN, L.K.W., LESLIE, D. and COLOE, P.J. Bacteriological and molecular analysis of rifampin - resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *J. Clin. Microbiol.* **37** 12 (1999) 3844 - 3850.
27. WHELEN, A.C., FELMLEE, T.A., HUNT, J.M., WILLIAMS, D.L., ROBERTS, G.D., STOCKMAN, L., and PERSING, D.H. Direct genotyping detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance in clinical specimens by using single-tube heminested PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33** 3 (1995) 556 - 561.





Gambar 1. Hasil amplifikasi bagian gen *rpoB* isolat klinis *M. tuberculosis* dengan *nested PCR* dalam gel agarosa 1,5%.  
Lajur M : *Marker* DNA 100 bp ladder; Lajur 1 - 10 : Isolat klinis R1 - R10.



Gambar 2. Hasil amplifikasi bagian gen *rpoB* isolat klinis *M. tuberculosis* dengan *nested PCR* dalam gel agarosa 1,5%.

Lajur M : *Marker* DNA 100 bp ladder; Lajur 1 - 5 : Isolat klinis Z1 - Z5 ;  
Lajur 6 : Isolat klinis Z7 ; Lajur 7 - 10 : Isolat klinis Z8 - Z11



Gambar 3. Hasil amplifikasi bagian gen *rpoB* *M. tuberculosis* dari sputum dengan *nested PCR* dalam gel agarosa 1,5%.

Lajur M : *Marker* DNA 100 bp ladder; Lajur 1 : Sampel Sputum (S61) ;  
Lajur 2 : Sampel sputum (S81) ; Lajur 3 : Sampel sputum (S97) ;  
Lajur 4 : Sampel sputum (S99) ; Lajur 5 : Sampel sputum (S101) ;  
Lajur 6 : Sample sputum (S102) ; Lajur 7 : Sampel sputum (S90) ;  
Lajur 8 : Sampel sputum (S91) ; Lajur 9 : Sampel sputum (S94) ;  
Lajur10: Sampel sputum (S100) ; Lajur 11 : *M. tuberculosis* H37 Rv (kontrol positif)

Tabel 1. Hasil *nested PCR* isolat klinis dan sputum BTA positif.

No.	Kode sampel	Hasil BTA	Hasil nested PCR (157bp)
1.	R1		
2.	R2		+
3.	R3		+
4.	R4		+
5.	R5		+
6.	R6		+
7.	R7		+
8.	R8		+
9.	R9		+
10.	R10		-
11.	Z1		+
12.	Z2		+
13.	Z3		+
14.	Z4		-
15.	Z5		+
16.	Z7		+
17.	Z8		+
18.	Z9		-
19.	Z10		-
20.	Z11		-
21.	S51	+1	+
22.	S52	+2	+
23.	S53	+2	+
24.	S54	+1	-
25.	S55	+1	+
26.	S56	+1	-
27.	S60	+1	-
28.	S61	+3	+
29.	S62	+3	+
30.	S63	+1	+
31.	S64	+1	+
32.	S65	+2	-
33.	S68	+1	-
34.	S70	+1	+
35.	S72	+1	+
36.	S76	+1	+
37.	S78	+1	+
38.	S79	+1	-
39.	S80	+2	+
40.	S81	+2	-
41.	S90	-	+(tipis)
42.	S91	-	+
43.	S92	-	-
44.	S94	-	+(tipis)
45.	S95	+1	+
46.	S97	+1	+
47.	S99	+2	-
48.	S100	-	+(tipis)
49.	S101	+3	+
50.	S102	+2	+

\*) Keterangan : + Pita DNA terlihat jelas; + tipis : Pita DNA terlihat tipis

Sampel no. 1-20 : Isolat klinis

Sampel no. 21 - 40, no. 45- 47 dan 49 - 50 : Sputum BTA positif