

PENGUJIAN ISOLAT KLINIK *Mycobacterium tuberculosis* RESISTEN TERHADAP BEBERAPA ANTIBIOTIKA DENGAN METODE REAKSI BERANTAI POLIMERASE / POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Maria Lina R., Dadang, S., dan F. Suhadi

Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, Batan, Jakarta

ABSTRAK

PENGUJIAN ISOLAT KLINIK *Mycobacterium tuberculosis* RESISTEN TERHADAP BEBERAPA ANTIBIOTIKA DENGAN METODE REAKSI BERANTAI POLIMERASE / POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) Uji PCR menggunakan 2 pasang primer (Pt8 & Pt9 dan Pt3 & Pt6) untuk mendeteksi DNA 9 isolat bakteri *M. tuberculosis* yang resisten terhadap beberapa macam antibiotika seperti isoniazid, streptomisin, isoniazid + streptomisin, dan isoniazid + rifampisin, telah dilakukan Teknik PCR dilakukan untuk mengamplifikasi DNA hasil ekstraksi sel 9 isolat *M. tuberculosis* resisten yang sudah dilisiskan. DNA 8 isolat menunjukkan hasil positif yaitu terdapatnya pita DNA pada gel agarosa setelah diamplifikasi dengan primer Pt8 & Pt9, sedangkan satu isolat resisten memberikan hasil negatif (tidak ada pita DNA). Amplifikasi DNA dengan menggunakan primer Pt3 & Pt6 memberikan hasil positif pada 2 isolat bakteri, sedangkan 7 isolat bakteri resisten yang lain memberikan hasil negatif. DNA strain H₃₇Rv yang diamplifikasi dengan primer Pt8 & Pt9 maupun primer Pt3 & Pt6, juga menunjukkan hasil positif. Ukuran fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer Pt8 & Pt9 dan primer Pt3 & Pt6 masing-masing adalah 541 dan 188 bp.

ABSTRACT

PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) ASSAY ON ANTIBIOTICS RESISTANT CLINICAL ISOLATES OF *Mycobacterium tuberculosis* To detect the DNA of 9 drug-resistant isolates of *M. tuberculosis* such as isoniazid, streptomycin, isoniazid + streptomycin, and isoniazid + rifampisin-resistant isolates, the DNA amplification by using PCR assay was carried out after lysing the bacterial cells. Two primer pairs for amplification used were Pt8 & Pt9 and Pt3 & Pt6. The amplified DNA target of 8 drug-resistant isolates and 1 drug-resistant isolate by means Pt8 & Pt9 primer, gave the positive and negative results, respectively. Presence of amplified DNA target fragments/bands on agarose gel, showed the positive results and vice versa. PCR process by using Pt3 & Pt6 primer revealed the positive results on 2 drug-resistant isolates, whereas there was no amplified DNA bands from the other 7 isolates. DNA amplification by using either Pt8 & Pt9 or Pt3 & Pt6 primers occurred on H₃₇Rv strain DNA. Size of the amplified DNA products with Pt8 & Pt9 and Pt3 & Pt6 primers were 541 bp and 188 bp, respectively.

PENDAHULUAN

Saat ini peningkatan kasus tuberkulosis suatu penyakit infeksi disebabkan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* sejalan dengan peningkatan kasus tuberkulosis yang resisten terhadap antibiotika (obat anti tuberkulosis = oat) khususnya di negara berkembang termasuk Indonesia. Para peneliti memperkirakan ± 50 juta orang terinfeksi strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap paling tidak satu macam oat (NCCR, Mei 1998). Mini-epidemi penyakit tuberkulosis / tbc disebabkan strain yang resisten oat ganda pernah dilaporkan terjadi di Amerika Serikat dan penyembuhan kasus tersebut dengan pengobatan terbaik hanya mencapai 20 - 40 % . (1). Di Medan pernah dilakukan penelitian yang menyatakan 96 % penderita mengandung kuman TB resisten terhadap satu atau lebih dari 4 macam obat yaitu etambutol, rifampisin, isoniazid, dan streptomisin (2). Kegagalan program pengendalian penyakit tbc antara lain disebabkan kegagalan terapi kasus tuberkulosis yang resisten terhadap oat disamping kelemahan dalam diagnostik (3,4). Penderita yang telah menerima pengobatan tetapi gagal merespon obat

tersebut, masih dapat menularkan ke penderita lain ataupun ke orang yang sedang dalam terapi.

Resistensi terhadap antibiotika (oat) seperti INH/ isoniazid, streptomisin, etambutol, rifampisin, dll dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain pengobatan yang tidak adekuat, ketidak patuhan berobat, pemakaian obat tunggal pada penderita tbc. Timbulnya resistensi terhadap oat pada *M. tuberculosis* disebabkan mutasi random pada kromosom bakteri. Proses mutasi tersebut terjadi secara spontan pada strain liar, bahkan terjadinya sebelum kontak dengan obat (3). Sifat resistensi ini juga disebabkan karena adanya mutasi gen yang menyandi protein atau enzim tertentu dalam bakteri tersebut, misalnya terjadinya resistensi terhadap rifampisin karena mutasi gen *rpoβ* yang menyandi RNA polimerase sub unit β (5).

Penggunaan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mendeteksi *M. tuberculosis* telah banyak dikembangkan dan diaplikasikan (6). Sekuens DNA target yang diamplifikasi dapat dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa. Namun penggunaan pelacak DNA spesifik yang dilabel antara lain dengan radioisotop (³²P) untuk menghibridisasi produk amplifikasi tersebut

ternyata lebih sensitif dan spesifik (7,8). Pengujian dengan kultur pada 11 spesimen penderita tbc menunjukkan hasil negatif sedangkan setelah diuji dengan PCR yang dilanjutkan dengan uji hibridisasi menggunakan pelacak yang dilabel dengan ³²P, 9 spesimen dari jumlah tersebut menunjukkan hasil positif (8).

Penelitian telah dilakukan untuk mengetahui apakah metode PCR juga dapat digunakan untuk mendeteksi isolat *M. tuberculosis* yang resisten terhadap antibiotika (obat anti tuberkulosis).

BAHAN DAN TATA KERJA

Strain Bakteri. Dalam penelitian ini digunakan 9 buah strain bakteri *M. tuberculosis* resisten terhadap beberapa antibiotika berasal dari penderita tuberkulosis yang diperoleh dari rumah sakit Persahabatan. Strain yang resisten terhadap isoniazid / INH berjumlah 4 sampel (isolat I a, I b, I c, I d), resisten streptomisin satu sampel (isolat S), resisten isoniazid + streptomisin satu sampel (isolat I + S), dan resisten isoniazid + rifampisin 3 sampel (isolat IR.1, IR.2, IR.3). Metode untuk menentukan resistensi yang digunakan adalah *modified absolute concentration* (konsentrasi absolut yang dimodifikasi). Strain bakteri resisten tersebut kemudian ditumbuhkan dalam medium Lowenstein Jensen, suhu 37°C selama ± 1 bulan.

Persiapan DNA Bakteri. DNA yang dipersiapkan untuk proses PCR dilakukan dengan metode fenol-kloroform sesuai dengan penelitian terdahulu (9). Secara singkat dapat dijelaskan sebagai berikut, DNA diisolasi dari kultur bakteri dalam medium agar miring Lowenstein Jensen. Sel bakteri dari agar miring dibuat suspensi dengan menambahkan larutan NaCl 0,9 %, dipanaskan pada suhu 90°C untuk mematikan sel. Suspensi disentrifugasi, dicuci, dan dibuat pelet. Pelet bakteri diresuspensikan dengan bufer TE (Tris-EDTA/ Ethylene Diamine Tetra Acetic) ditambah dengan lisosim, proteinase-K dan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) untuk melisiskan sel. Larutan fenol-kloroform-isoamilalkohol (24 : 1) kemudian ditambahkan dengan volume sama, disentrifugasi, dan diperoleh fase air yang mengandung DNA. DNA diendapkan dengan menambahkan larutan NaCl 5M dan etanol absolut dingin (-20°C). Pelet DNA didapatkan dengan mensentrifugasi suspensi tersebut dengan kecepatan 13.000 rpm, suhu -10°C.

Penentuan Konsentrasi dan Tingkat Kemurnian DNA. Pelet DNA disuspensikan dengan bufer TE pH 8,0. Suspensi DNA tersebut dibuat pengenceran, kemudian ditentukan konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi, dengan menggunakan spektrofotometer pada λ (panjang gelombang) 260 nm dan 280 nm.

Amplifikasi DNA. DNA *M. tuberculosis* resisten antibiotika diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan 2 macam primer. Primer 1 adalah pasangan primer Pt8 (5' - GTGCGGATGGTCGCAGAGAT-3') dan Pt9 (CTGGATGCCCTCACGGTTCA-3') yang terletak dalam sekvens sisipan (IS6110) genom bakteri *M.*

tuberculosis kompleks, masing-masing pada pasangan basa 105 sampai 124 dan 626 sampai 645 (10). Primer 2 merupakan pasangan primer Pt3 (5'- GAACGGCTGATGACCAAAC-3') dan Pt6 (5'- ACGTAGGCGAACCCTGCCCA-3'), masing-masing terletak pada pasangan basa 664 sampai 683 dan 832 sampai 851 dari IS 986 (7). DNA sampel sebanyak 100 ng (10 μ l) ditambahkan ke dalam campuran reaksi PCR (40 μ l) untuk tiap satu reaksi. Sebagai kontrol positif digunakan DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Campuran reaksi PCR terdiri dari komponen-komponen seperti penelitian terdahulu (9) yaitu bufer reaksi (10mM Tris-HCl + 50mM KCl), 2,0 mM MgCl₂, 0,01 % gelatin, dNTP (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) masing-masing 0,2 μ M, primer Pt8 & Pt9 masing-masing 0,2 μ M, dan 1 Unit Taq polimerase. Penggunaan primer Pt3 & Pt9 masing-masing 0,4 μ M dan Taq polimerase yang ditambahkan adalah 2,5 Unit (7). Amplifikasi dilakukan dalam DNA thermocycler (Perkin-Elmer) dengan tahap denaturasi selama 1,5 menit pada suhu 94°C, tahap *annealing* pada suhu 65°C selama 2 menit dan tahap *extension* 3 menit, suhu 72°C. Banyaknya siklus yang digunakan 40 siklus.

Teknik Elektroforesis Gel Agarosa. Teknik ini digunakan untuk mendeteksi DNA hasil amplifikasi. Produk PCR setelah ditambah dengan *loading buffer* dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa. Hae III ϕ X174 yang diencerkan dan juga ditambah dengan *loading buffer* dimasukkan juga ke dalam sumur tersebut sebagai penanda ukuran molekul DNA (*marker*). Elektroforesis dilakukan selama ± 1 jam dengan voltase 100V dalam larutan bufer TBE (Tris-Borat-EDTA).

Visualisasi DNA. DNA hasil amplifikasi yang telah dielektroforesis divisualisasi dengan mewarnai DNA dalam gel menggunakan larutan etidium bromida. Dengan menggunakan UV transilluminator, pita DNA akan terlihat dan dapat diketahui ukurannya berdasarkan penanda ukuran molekul yang dinyatakan dengan *base pair* (bp).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi DNA isolat *M. tuberculosis* resisten terhadap beberapa antibiotika dapat dilihat pada Tabel 1. Konsentrasi DNA dari 9 strain bakteri tersebut bervariasi yaitu berkisar antara 109,5 - 556,5 ng/ μ l. Hal ini disebabkan tingkat pertumbuhan strain-strain tersebut berbeda, sehingga mempengaruhi jumlah DNA yang diekstraksi. Nilai rasio (λ 260nm / λ 280nm) yang menunjukkan tingkat kemurnian DNA hasil ekstraksi 9 strain bakteri tersebut juga bervariasi antara 1,27 - 1,50. Nilai rasio 1,8 - 1,9 menunjukkan kemurnian DNA hasil ekstraksi (10). Hasil ekstraksi DNA dalam penelitian ini mempunyai nilai rasio di bawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi dengan protein (11). Kontaminasi tersebut kemungkinan dari protein medium pertumbuhan yang tercampur pada saat penyediaan suspensi sel bakteri. Kontaminasi protein dari medium kecil kemungkinannya apabila menggunakan medium cair untuk penyediaan suspensi bakteri. KOLK, dkk (10) menggunakan juga kultur cair *M. tuberculosis* dalam media cair Sauton, Middlebrook 7H11 atau Tween

albumin untuk ekstraksi DNANYa dan memberikan tingkat kemurnian yang baik. Namun, hasil penelitian terdahulu (12) dengan menggunakan medium padat yang sama dengan penelitian ini, menunjukkan tingkat kemurnian DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv sebagai strain standar cukup baik (nilai rasio 260 nm/ 280 nm = 1,9). Perubahan pada sel bakteri yang resisten terhadap antibiotika, mungkin juga dapat mempengaruhi DNA hasil ekstraksinya. Menurut MORRIS (5) *M. tuberculosis* resisten streptomisin mengalami perubahan pada selubung dinding selnya yang menyebabkan permeabilitasnya menurun, kemungkinan akan mempengaruhi ekstraksi pada DNA nya.

Hasil amplifikasi DNA 9 isolat strain *M. tuberculosis* resisten terhadap beberapa antibiotika menggunakan primer Pt8 & Pt9 yang dianalisis dengan teknik elektroforesis gel agarosa, dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2. Dari gambar tersebut dapat dilihat 8 isolat dari 9 isolat resisten antibiotika, menunjukkan hasil positif demikian juga strain H₃₇Rv. Adanya fragmen/pita DNA pada gel agarosa dari 4 isolat resisten isoniazid (Gambar 1 lajur 3, 5, 8, dan Gambar 2, lajur 2), satu isolat resisten streptomisin dan 1 isolat resisten isoniazid + streptomisin masing-masing pada Gambar 2 lajur 3 dan lajur 6, menunjukkan hasil positif. DNA 2 isolat bakteri resisten isoniazid + rifampisin yang di amplifikasi dengan pasangan primer tersebut, juga menunjukkan hasil positif (Gambar 1, lajur 4 dan 7). Jumlah DNA isolat dan strain H₃₇Rv yang di amplifikasi masing-masing adalah 100 ng dan 10 ng. Fragmen DNA tersebut mempunyai ukuran 541 bp. Pada Gambar 2 lajur 5 juga terlihat hasil negatif (tidak adanya pita DNA) dari satu isolat resisten isoniazid + rifampisin (IR3). Hal ini mungkin disebabkan adanya perubahan sekwens DNA pada daerah/ lokasi sasaran primer Pt8 & Pt9 yang terletak pada sekwens sisipan (IS 6110) dari isolat tersebut. Jumlah kopi IS6110 dalam genom isolat resisten tersebut juga sangat mempengaruhi DNA hasil amplifikasi. Beberapa strain bakteri *M. tuberculosis* hanya mempunyai 1 kopi IS6110 bahkan ada strain yang tidak mempunyai kopi tersebut. (13).

Analisis DNA produk PCR yang di simplifikasi menggunakan primer Pt3 & Pt6 diperlihatkan pada Gambar 3 dan 4. Gambar tersebut menunjukkan di antara 9 isolat *M. tuberculosis* yang resisten pada antibiotika, hanya terdapat 2 isolat memberikan hasil positif yaitu isolat resisten isoniazid (I.a) dan isolat resisten isoniazid + rifampisin (IR.1). Fragmen DNA 2 isolat tersebut terdapat pada lajur 3 dan 6 gel agarosa (Gambar 3) DNA strain standar H₃₇Rv hasil amplifikasi sebagai kontrol positif juga memberikan hasil positif. Jumlah DNA isolat dan strain standar masing-masing adalah 100ng dan 10ng. Fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer Pt3 & Pt6 baik untuk isolat maupun strain standar adalah 188bp.

Beberapa peneliti menyatakan resistensi terhadap obat anti tuberkulosis pada *M. tuberculosis* disebabkan perubahan ataupun mutasi pada gen dalam genom bakteri. Perubahan pada gen katG yang menyandi katalase-peroksidase atau gen inhA yang mengkode enzim yang terlibat dalam biosintesis asam nikolat, menyebabkan terjadinya sifat resistensi terhadap isoniazid (14,15). Mutasi gen rpsL yang menyandi protein

ribosomal S 12 dan gen rrs yang menyandi 16rRNA, terdapat pada ± 80 % strain *M. tuberculosis* resisten streptomisin. (16). Strain resisten rifampisin (± 95%) mengalami mutasi pada daerah spesifik dari gen rpoβ yang menyandi RNA polimerase sub unit β (17). Mekanisme utama resistensi obat anti tuberkulosis ganda adalah akumulasi perubahan dalam gen yang menyandi sasaran obat dalam sel (5). Dalam penelitian ini, lokasi sekwens DNA target dengan menggunakan primer Pt8 & Pt9 maupun Pt3 & Pt6 adalah pada sekwens sisipan (IS6110 & IS986) dari genom *M. tuberculosis*. Jadi tidak pada gen yang menyandi sasaran obat dalam genom tersebut. Namun, DNA beberapa isolat tidak dapat di amplifikasi seperti satu isolat resisten isoniazid + rifampisin dengan menggunakan primer Pt8 & Pt9 dan 7 isolat dengan menggunakan primer Pt3 & Pt6. Hal ini mungkin disebabkan adanya mekanisme resistensi lain dalam genom bakteri yang resisten tersebut. Berdasarkan penelitian MORRIS (5), gen rrs dan rpsL pada 27 % isolat resisten streptomisin, tidak mengalami mutasi demikian juga 17 isolat resisten isoniazid dari 42 isolat tidak mengalami perubahan pada gen katG atau inhA.

Apabila dibandingkan uji PCR menggunakan primer Pt8 & Pt9 dan Pt3 & Pt6, ternyata primer Pt8 & Pt9 lebih sensitif. Sekwens DNA sasaran untuk primer Pt8 & Pt9 kemungkinan terdapat lebih banyak dalam genom isolate yang digunakan dalam penelitian ini, daripada sekwens untuk Pt3 & Pt6. Penggunaan primer Pt3 & Pt6 akan lebih sensitif dan spesifik untuk deteksi *M. tuberculosis* apabila digunakan sebagai primer ke 2 untuk mengamplifikasi DNA hasil PCR dengan primer INS1 & INS2 pada *nested PCR* (7)

KESIMPULAN

Deteksi *M. tuberculosis* resisten terhadap beberapa antibiotika (obat anti tuberkulosis) dengan PCR menggunakan primer Pt8 & Pt9, lebih sensitif dibanding dengan primer Pt3 & Pt6. Jadi uji PCR dengan primer Pt8 & Pt9 dapat dipakai untuk mengetahui adanya bakteri resisten tersebut.

Uji PCR dengan menggunakan primer yang didisain dari gen yang menyandi protein / enzim yang menjadi sasaran obat anti tuberkulosis (oat), yang dilanjutkan dengan teknik biologi molekuler yang lain seperti sekwensing dapat mendeteksi resistensi *M. tuberculosis* terhadap oat, sehingga dapat diberikan terapi yang tepat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Almaida, Sdr. Suheni, dan Sdr. Rika Heryani atas bantuan yang diberikan, sehingga penelitian dapat terlaksana dengan baik.

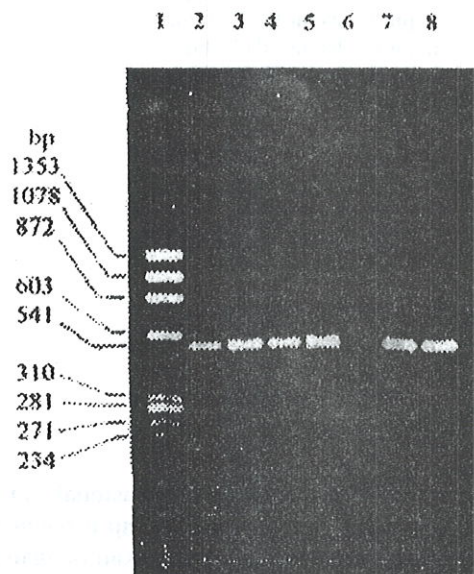
DAFTAR PUSTAKA

1. KOENTJAHJA. Terapi tuberkulosis pada pengidap HIV. Kumpulan Naskah Ilmiah Tuberkulosis

- Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. Pertemuan Ilmiah Nasional Tuberkulosis, SumSel - Jambi (1997).
- AZHAR, T., KELIAT, E.N. Resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat anti tuberkulosis pada penderita tuberkulosis paru yang telah mengalami pengobatan. *Maj. Kedokt. Indon.* **46** (1996) 242 - 247.
 - WINARIANI, K. Pedoman penanganan tuberkulosis paru dengan resistensi multi obat (MDR-TB). Kumpulan Naskah Ilmiah Tuberkulosis Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. Pertemuan Ilmiah Nasional Tuberkulosis, SumSel - Jambi (1997).
 - STYBLO, K. Overview and epidemiologic assesment of the current global tuberculosis situation with an emphasis on control in developing countries. *Rev. Infect. Dis. II (S2)* (1989) 339 - 346.
 - MORRIS, S., HAN BAI, G., SUFFYS, P., PORTILLO-GOMEZ, L., FAIRCHOK, M., and ROUSE, D. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* **177** (1995) 954 - 960.
 - BEAVIS, K.G., LICHTY, M.B., JUNGKIND, D.L., and GIGER, O. Evaluation of amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimen. *J. Clin. Microbiol.* **33** (1995) 2582-2586.
 - KOLK, A.H.J., SCHUITEMA, A.R.J., KUIJPER, S., van LEEUWEN, J., HERMANS, P.W.M., van EMBDEN, J.D.A., and HARTSKEERL, R.A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J. Clin. Microbiol.* **30** 10 (1992) 2567 - 2575.
 - YAP, S.F., CHEN, Y.C., WONG, P.W., and SOO-HOO, T.S. Application of the polymerase chain reaction and molecular probe technology for the diagnosis of tuberculosis. In *Radionuclides in Molecular Technology for Diagnosis of Communicable Disease*. Tharavanyi, S., and Khusmith, S. (eds). IAEA- Tec. Doc., Vienna, Austria (1994) 93-96.
 - LINA, M.R., SUDARMONO, P., IBRAHIM, F., dan SOEBANDRIO, A. Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv dengan reaksi berantai polimerase (PCR). *Maj. Kedokt. Indon.* **7** (1999) 250 - 255.
 - 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 Netherlands (1995) 1-35.
 - SAMBROK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) E.5.
 - LINA, M.R. Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan reaksi berantai polimerase / *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Tesis Magister. Program Pascasarjana Bidang Ilmu Kesehatan, Program Studi Ilmu Biomedik, Kekhususan Mikrobiologi, Universitas Indonesia, Jakarta (1998) 32-46.
 - van SOLINGEN, D., de HAAS, P.E.W., HERMANS, P.W.H., GROENEN, P.M.A., and van EMBDEN, J.D.A. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **3** (1993) 1987 - 1995.
 - ZHANG, Y., HEYM, B., ALLEN, B., YOUNG, D., and COLE, S. The catalase-peroxidase, gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **328** (1992) 591 - 593
 - BANERJEE, A., DUBNAU, E., Quemaid, A., BALASUBRAMANIAN, V., SUN UM, K., WILSON, T., COLLINS, D., de LISTE, G., and JACOBS, Jr. W.R. *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* **263** (1994) 227 - 230
 - KATASUKAWA, C., TAMARU, A., MIYATA, Y., ABE, C., MAKINO, M., and SUZUKI, Y. Characterization of the *rpsL* and *rrs* genes of streptomycin -resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J. Appl. Microbiol.* **83** (1977) 634 - 640.
 - TELENTI, A., IMBODEN, P., MARCHESI, F., LOWRIE, D., COLE, S.T., COLSTON, M.J., MATTER, L., SCHOPFER, K., and BODMER, T. Detection of rifampicin-resistance mutants in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341** (1993) 647 - 650

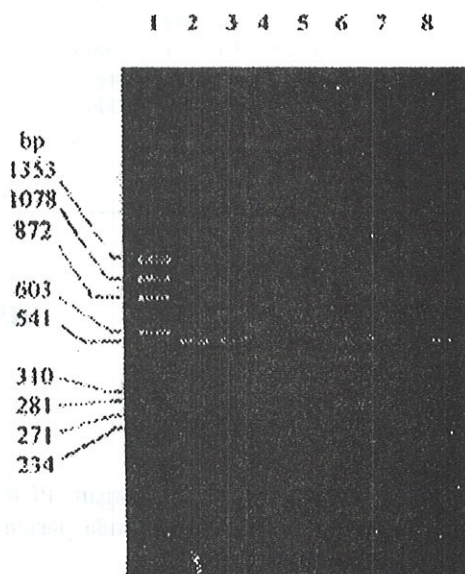
Tabel 1. Konsentrasi dan tingkat kemurnian (rasio absorbansi pada λ 260 nm / λ 280nm) DNA hasil ekstraksi isolat *M. tuberculosis* resisten isoniazid (I), streptomisin (S), isoniazid + streptomisin (I+S), dan isoniazid + rifampisin (IR)

Macam Isolat	Konsentrasi DNA (ng / μ l)	Rasio absorbansi (λ 260 nm/ λ 280nm)
Isolat I.a.	144	1,41
Isolat I.b	400,5	1,43
Isolat I.c	109,5	1,30
Isolat I.d	181,5	1,33
Isolat S	324	1,50
Isolat I + S	121,5	1,40
Isolat IR. 1	145,4	1,30
Isolat IR.2	318	1,42
Isolat IR.3	556,5	1,27



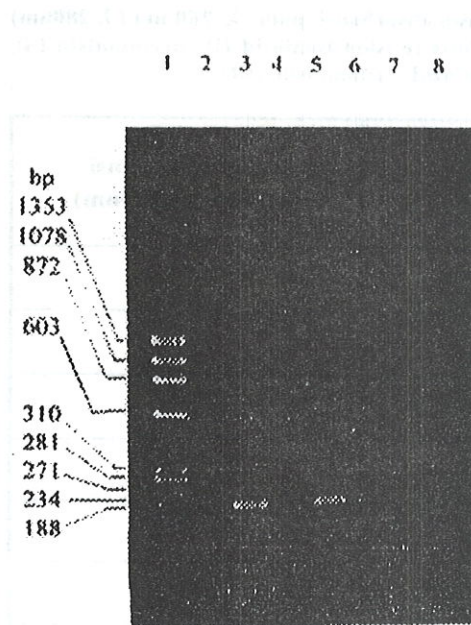
Gambar 1. Analisis DNA produk PCR isolat *M. tuberculosis* resisten, dengan primer Pt8 & Pt9 menggunakan elektroforesis gel agarosa

- Lajur 1 : Marker Φ X174HaeIII
- Lajur 2 : DNA strain H₃₇Rv 10ng (kontrol +)
- Lajur 3 : Isolat I.a (100ng)
- Lajur 4 : Isolat IR. 1 (100ng)
- Lajur 5 : Isolat I.b (100ng)
- Lajur 6 : Kontrol - (Tanpa DNA)
- Lajur 7 : Isolat IR.2 (100ng)
- Lajur 8 : Isolat I.c (100ng)



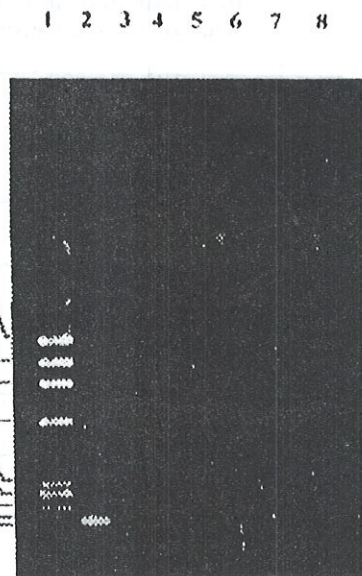
Gambar 2. Analisis DNA produk PCR isolat *M. tuberculosis* resisten, dengan primer Pt8 & Pt9 menggunakan elektroforesis gel agarosa

- Lajur 1 : Marker Φ X174HaeIII
- Lajur 2 : Isolat I.d (100ng)
- Lajur 3 : Isolat S (100ng)
- Lajur 4 : Kontrol - (tanpa DNA)
- Lajur 5 : Isolat IR.3 (100ng)
- Lajur 6 : Isolat I + S (100ng)
- Lajur 8 : DNA strain H₃₇Rv 10ng (kontrol +)



Gambar 3. Analisis DNA produk PCR isolat *M. tuberculosis* resisten, dengan primer P13 & P16 menggunakan elektroforesis gel agarosa

Lajur 1 : Marker Φ X174HaeIII
 Lajur 2 : Isolat I + S (100ng)
 Lajur 3 : Isolat I.a (100ng)
 Lajur 4 : Kontrol - (Tanpa DNA)
 Lajur 5 : DNA strain H₃₇Rv 10ng (kontrol +)
 Lajur 6 : Isolat IR.1 (100ng)
 Lajur 7 : Isolat S (100ng)
 Lajur 8 : Isolat I.b (100ng)



Gambar 4. Analisis DNA produk PCR isolat *M. tuberculosis* resisten, dengan primer P13 & P16 menggunakan elektroforesis gel agarosa

Lajur 1 : Marker Φ X174HaeIII
 Lajur 2 : DNA strain H₃₇Rv 10ng (kontrol +)
 Lajur 3 : Kontrol - (tanpa DNA)
 Lajur 4 : Isolat I.c (100ng)
 Lajur 5 : Isolat IR.2 (100ng)
 Lajur 6 : Isolat I.d (100ng)
 Lajur 8 : Isolat IR.3 (100ng)

DISKUSI

NAZLY HILMY

Berapa lama kecepatan analisis dengan PCR dibandingkan dengan metode konvensional pada pasien yang terkontaminasi kuman TB resisten ?

MARIA LINA

Dengan metode konvensional uji resistensi *M. tuberculosis* : uji pembiakan + uji resistensi : 2 - 4 bulan. Dengan metode PCR : dilanjutkan dengan metode RFLP ataupun sekwenasing : 2 - 3 hari.