

**DETEKSI *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
DENGAN REAKSI BERANTAI POLIMERASA
(PCR).**

**Maria Lina, Pratiwi Sudarmono, Fera Ibrahim, dan
Amin Soebandrio.**

DETEKSI *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv DENGAN REAKSI BERANTAI POLIMERASA (PCR) *

Maria Lina**,Pratiwi Sudarmono***,Fera Ibrahim **, dan Amin Soebandrio***

ABSTRAK

DETEKSI *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv DENGAN REAKSI BERANTAI POLIMERASA (PCR). Sensitivitas PCR mendeteksi bakteri *M. tuberculosis* H₃₇Rv telah dilakukan dengan menggunakan berbagai konsentrasi DNA H₃₇Rv. Ekstraksi DNA sel bakteri *M. tuberculosis* dilakukan dengan metode standar fenol kloroform setelah sel dilisiskan dengan lisosim dan proteinase K. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan primer oligonukleotida Pt8 dan Pt9 yang berasal dari DNA *M. tuberculosis*, yaitu sekwens sisipan 6110 (IS6110) dan primer YNP5 & YNP6 yang disintesis dari sekwens DNA yang menyandi antigen b protein 38 kDa (Pab). Reaksi dilakukan pada DNA dengan konsentrasi 2µg, 1µg, 800ng, 600ng, 400ng, 200ng, 150ng, 100ng, 50ng, 10ng, 5ng, 1ng, 100 pg, 10pg, 5pg, 1pg, 100fg, 10fg dan 1fg untuk primer Pt8 & Pt9, sedangkan untuk primer YNP5 & YNP6 konsentrasi yang digunakan

* Dibawakan pada Kongres Nasional VII Perhimpunan Ahli Mikrobiologi Indonesia, tanggal 8 - 10 Desember 1997 di Bali.

** Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Batan, Jakarta.

*** Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.

adalah 10ng, 5ng, 1ng, 500pg, 100pg, 10pg, 1pg, 500fg, 100fg, dan 10fg. Dengan menggunakan primer Pt8 & Pt9, fragmen sebesar 541 bp masih dapat dideteksi pada DNA 10fg. Jumlah tersebut setara dengan 2 sel bakteri. Fragmen DNA yang diamplifikasi menggunakan primer YNP5 & YNP6 adalah sebesar 419 bp dengan jumlah DNA 5pg, masih dapat dideteksi dan setara dengan 1000 sel bakteri. Penelitian ini merupakan penelitian awal untuk mengetahui sensitivitas uji PCR dalam mendiagnosis tuberkulosis dari spesimen penderita.

ABSTRACT

DETECTION OF *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). Study on detection of *M. tuberculosis* H₃₇Rv bacteria to determine the sensitivity of PCR has been carried out by using many varieties of H₃₇Rv DNA concentrations. After the bacterial cells were lysed with lysozyme and proteinase-K, the DNA extraction was done with phenol-chloroform standard method. The oligonucleotide primers Pt8 & Pt9 from insertion sequence 6110 (IS6110) and YNP5 & YNP6 which synthesized from DNA sequence of the 38 kDa protein antigen b (Pab) of *M. tuberculosis*, were used for DNA amplification process. DNA concentration used in this study, were 2μg, 1μg, 800ng, 600ng, 400ng, 200ng, 150ng, 100ng, 50ng, 10ng, 5ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg, 1fg, and the concentrations of 100pg, 10pg, 5pg, 1pg, 100fg, 10fg for each pair of Pt8 & Pt9

primer and YNP5 & YNP6 primer, respectively. Results showed that the detection limit of amplified DNA using Pt8 & Pt9 primer was 10fg. The DNA was equivalent to two bacterial cells. The DNA of 5pg which was equivalent to 1000 bacterial cells could be amplified by using YNP5 & YNP6 primer. The amplified fragment DNA of 541 bp and 419 bp, were resulted by using Pt8 & Pt9 primer and YNP5 & YNP6 primer, respectively. The preliminary study was carried out to determine the sensitivity of PCR test for diagnosis of tuberculosis from clinical specimen.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (tbc) adalah suatu penyakit disebabkan oleh infeksi bakteri *M. tuberculosis*. Penyakit tuberkulosis merupakan penyebab mortalitas tertinggi di daerah tropis. Jumlah kasus dan rerata kejadian tuberkulosis paru (positif kuman tahan asam) tiap 10.000 penduduk di Indonesia tahun 1995, berturut-turut menunjukkan angka 77381 dan 5,96 (1).

Pada umumnya diagnosis penyakit tuberkulosis dilakukan dengan metode konvensional, yaitu dengan mengidentifikasi langsung bakteri tahan asam dengan pemeriksaan mikroskopik. Metode tersebut dapat dilakukan dengan cepat dan biaya yang diperlukan cukup murah, tetapi sensitivitas dan spesifitas masih rendah. Hal ini disebabkan bakteri tidak dapat diidentifikasi sampai dengan spesies dan jumlah bakteri dalam spesimen klinis khususnya sputum harus dalam jumlah cukup banyak. YEAGER

dalam DE WIT dan EISENACH dkk (2, 3), menyatakan jumlah bakteri yang ada dalam spesimen untuk dapat dideteksi adalah $\geq 10^4 - 10^5$ per ml.

Metode konvensional lain adalah dengan mengkultur kuman dalam media tertentu dan hasil yang diperoleh cukup baik, karena mempunyai spesifisitas dan sensitivitas tinggi. Sensitivitas metode tersebut mendekati 100% (4). Menurut HOBBY (5), kandungan bakteri 10 - 100 dalam tiap sampel klinis, masih dapat dikultur. Namun, cara ini membutuhkan waktu cukup lama, yaitu 3 - 8 minggu (4, 6). Cara diagnosis lain dengan menggunakan tes serologi, akan tetapi sensitivitas dan spesifisitasnya masih kurang memuaskan (7).

Saat ini telah dikembangkan metode alternatif untuk mengatasi keterbatasan cara diagnosis tersebut di atas, antara lain dengan teknik yang didasarkan pada amplifikasi DNA bakteri *M. tuberculosis* menggunakan reaksi berantai polimerasa ("Polymerase Chain Reaction"/PCR). Teknik tersebut dikembangkan dengan menggunakan berbagai elemen genetik yang merupakan sasaran cetakan DNA, misalnya sekwens sisipan 6110 (8, 9), gen yang menyandi protein struktural 65kDa (10) 38 kDa (4). Metode PCR cukup sensitif karena dapat mendeteksi kuman dalam jumlah sedikit yang ada dalam spesimen. Kelebihan lain metode tersebut mempunyai spesifitas cukup tinggi dengan waktu yang relatif singkat.

Dalam penelitian ini telah dilakukan uji sensitivitas PCR dengan menggunakan primer oligonukleotida tertentu untuk mendeteksi bakteri *M. tuberculosis* strain H₃₇Rv.

BAHAN DAN TATA KERJA

Kultur Bakteri. Strain bakteri yang digunakan ialah *M. tuberculosis* H₃₇Rv diperoleh dari rumah sakit Sumber Waras, Jakarta. Bakteri dibiakkan dalam medium miring Lowenstein Jensen (volume 25 ml) pada suhu 37°C selama 3 - 4 minggu. Sebagai kontrol negatif digunakan juga bakteri *Mycobacterium* lain, yaitu *M. smegmatis* yang mempunyai waktu pertumbuhan 3 - 4 hari.

Ekstraksi DNA Bakteri. *M. tuberculosis* yang sudah tumbuh dalam medium Lowenstein Jensen dibuat suspensi dengan menambahkan larutan NaCl 0,9% (b/v). Untuk mematikan sel bakteri, suspensi dipanaskan 15 menit pada suhu 100°C. Suspensi bakteri tersebut disentrifuge pada kecepatan 6000 rpm ("revolutions per minute/putaran per menit), selama 30 menit. Pelet sel bakteri dicuci dengan larutan 0,9% NaCl sebanyak 2 kali, kemudian dilarutkan dalam 2 ml larutan bufer Tris-EDTA /bufer TE) pH 8,0. Larutan lisosim 10mg per ml sebanyak 1/10 volume ditambahkan ke dalam larutan bakteri tersebut dan diinkubasi 90 menit pada suhu 37°C. Proteinase K dan SDS ("Sodium Dodecyl Sulfate") kemudian ditambahkan sehingga konsentrasi akhir proteinase K dan SDS masing-masing menjadi 100µg per ml dan 1% (b/v). Larutan dikocok dan diinkubasi semalam pada suhu 65°C. Larutan fenol yang dijenuhkan dengan larutan Tris-HCl pH 8,0 dan ditambah larutan kloroform isoamilalkohol, ditambahkan ke dalam larutan tersebut dengan volume yang sama. Campuran larutan digoyang supaya homogen selama 10 menit, kemudian disentrifuge pada 4000 rpm selama 5 menit. Fase air yang mengandung DNA dan berada di atas fase fenol yang berwarna kuning,

dipindahkan ke dalam tabung lain, ditambah dengan kloroform dengan volume yang sama. Larutan digoyang seperti di atas, fase air yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge. Larutan NaCl 5M dan etanol 100% dingin (-20°C) ditambahkan masing-masing sebanyak 1/25 dan 2,5 volume, diinkubasi semalam pada suhu -20°C, kemudian disentrifuge selama 15 menit pada 13.000 rpm dengan suhu -10°C. Supernatan dibuang dan pelet ditambah dengan etanol 70% tetapi tidak diresuspensikan, disentrifuge lagi selama 5 menit dengan kecepatan dan suhu sama seperti di atas. Setelah supernatan dibuang, pelet dikeringkan dalam eksikator. Pelet kemudian dilarutkan dalam 1ml larutan bufer 1 x TE, diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Konsentrasi dan kemurnian DNA ditentukan dengan mengukur rapat optiknya ("optical density") menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260nm dan 280 nm. DNA yang diperoleh kemudian diencerkan dengan larutan bufer TE pada beberapa konsentrasi. Pengenceran DNA untuk uji PCR menggunakan primer Pt8 & Pt9 dilakukan dalam 3 tahap. Tahap I menggunakan konsentrasi 200, 100, 80, 60, 40, dan 20ng/µl. Apabila pengenceran pada tahap I, pita DNA masih jelas terdeteksi, dilakukan pengenceran tahap II yang mempunyai konsentrasi lebih rendah. Konsentrasi DNA pada tahap II adalah 15ng/µl, 10ng/µl, 1ng/µl, dan 500pg/µl. Demikian juga jika pita DNA masih terdeteksi pada pengenceran tahap II, dilakukan pengenceran tahap III. Pada tahap III digunakan konsentrasi DNA yang lebih rendah lagi, yaitu 100pg/µl, 10pg/µl, 1pg/µl, 500fg/µl, 100fg/µl, 50fg/µl, 10fg/µl, 1fg/µl, dan 0,1fg/µl. Amplifikasi DNA dengan primer YNP5 & YNP6, dilakukan dengan konsentrasi 1ng/µl, 500pg/µl, 100pg/µl, 50pg/µl,

10pg/μl, 1pg/μl, 500fg/μl, 100fg/μl, 50fg/μl, 10fg/μl, dan 1fg/μl. Sebagai kontrol negatif digunakan DNA *Mycobacterium smegmatis* 1008 dengan konsentrasi 40ng/μl.

Proses Reaksi Berantai Polimerasa. Primer yang digunakan pada proses PCR adalah Pt8 (5'- GTGCGGATGGTCGCAGAGAT- 3') dan Pt9 (5'- CTCGATGCCCTCACG-GTTCA- 3') dari Boehringer Mannheim yang masing-masing terletak pada pasangan basa 105 sampai 124, dan 626 sampai 645 dari sekvens sisipan 6110 (IS 6110) *M. tuberculosis* kompleks. Sebagai pembanding digunakan primer yang disintesis dari sekvens DNA *M. tuberculosis* kompleks yang menyandi antigen b protein Pab 38kDa, yaitu primer YNP5 (5'- ACCACCGAGCGGTTCG(CTGA-3') & YNP6 (5'- GATCTGCGGGTCGTCCCAGGT-3'), yang diperoleh dari R. Nakamura Ph.D., laboratorium BCG, Jepang. Dalam proses ini digunakan campuran komponen, yaitu larutan bufer (10 mM Tris-HCl pH 8,3 + 50 mM KCl), 2,0 mM MgCl₂, 0,01% (b/v), gelatin, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) masing-masing 0,2μM, primer Pt8 & Pt9 masing-masing 0,2μM, sedang untuk primer YNP5 & YNP6 masing-masing 20pmol dan 1 Unit Taq DNA polimerasa. Campuran tersebut sebanyak 40μl dimasukkan ke dalam tabung khusus untuk PCR, ditambah dengan 10μl sampel DNA kemudian kocok dengan menggunakan vorteks. Setelah ditambah dengan 50μl minyak mineral, campuran dimasukkan dalam alat "DNA thermocycler" (Perkin-Elmer). Proses PCR dilakukan sebanyak 40 siklus dengan tahap denaturasi selama 0,5 menit pada suhu 94°C, "annealing" pada suhu 65°C selama 2 menit, dan tahap ekstensi 3 menit pada suhu 72°C.

Deteksi DNA Hasil Amplifikasi. Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa. DNA hasil amplifikasi dicampur dengan "loading buffer" yang terdiri atas 25%

(b/v) gliserol, 35% (b/v) sukrosa, dan 0,025% (b/v) bromofenol biru, dengan perbandingan 4 bagian sampel dan 1 bagian "loading buffer". Penanda berat molekul yang dipakai dalam penelitian ialah ϕ X174 HaeIII yang diencerkan dengan air suling dan ditambah dengan "loading buffer" dengan perbandingan 1 : 3 : 1. Proses elektroforesis dilakukan dengan voltase konstan (100V) selama 1 jam dalam larutan bufer Tris-Borat EDTA/TBE yang mempunyai komposisi 89 mM Tris, 89 mM asam borat, dan 2 mM EDTA. Gel diwarnai dengan larutan etidium bromida (0,5 ug/ml) dan divisualisasi dengan sinar ultra violet melalui "UV transilluminator". Pewarnaan ini menunjukkan pita DNA dengan ukuran tertentu yang dapat diketahui dengan menggunakan penanda berat molekul yang dinyatakan dengan pasangan basa (bp). Pita DNA dalam gel tersebut kemudian diambil gambar dengan menggunakan kamera polaroid MP-4.

HASIL

Konsentrasi DNA yang diperoleh hasil ekstraksi DNA strain bakteri *M. tuberculosis* H₃₇Rv adalah 118 - 1160 ng/ μ l. Rasio absorbansi DNA pada panjang gelombang 260nm dan 280 nm yang menunjukkan kemurnian hasil ekstraksi DNA, berkisar antara 1,51 - 1,91. DNA hasil ekstraksi mikobakterium atipik *M. smegmatis* 1008 sebagai kontrol negatif, mempunyai konsentrasi 600 - 1068 ng/ μ l dengan rasio absorbansi berkisar antara 1,84 - 1,94.

Seri pengenceran dilakukan pada DNA strain *M. tuberculosis* H₃₇Rv dengan rasio absorbansi 1,94, sedangkan untuk DNA strain *M. smegmatis* 1008 dengan nilai absorbansi

1,84. Hasil amplifikasi setelah dideteksi dengan proses elektroforesis, diwarnai dengan larutan etidium bromida, visualisasi melalui “UV transilluminator”, dilakukan pemotretan dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 1, 2, 3, dan 4. Tidak semua hasil amplifikasi diperlihatkan pada gambar tersebut. Gambar 1, 2, 3 memperlihatkan pita fragmen DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv hasil amplifikasi DNA yang diencerkan pada tahap I, II, dan III, menggunakan primer Pt8 & Pt9. Konsentrasi DNA terendah 20ng/μl (= 200ng DNA yang diamplifikasi) ada tahap I, masih jelas terdeteksi (Gambar 1). Deteksi hasil amplifikasi DNA pada pengenceran tahap II, dapat dilihat pada Gambar 2. Pada Gambar 2 terlihat pita DNA hasil amplifikasi DNA 5ng (konsentrasi 500pg/μl) masih jelas terlihat. Amplifikasi DNA hasil pengenceran tahap III, disajikan pada Gambar 3. Batas deteksi DNA yaitu DNA yang masih dapat diamplifikasi dan dideteksi, adalah 10fg (Gambar 3, lajur 8). DNA 1fg tidak terdeteksi yaitu tidak menunjukkan pita pada gel agarosa (tidak diperlihatkan dalam gambar). Jumlah DNA 10fg yang merupakan batas deteksi hasil amplifikasi menggunakan primer Pt8 & Pt9, setara dengan 2 sel bakteri.

Gambar 4 menunjukkan pita DNA hasil amplifikasi menggunakan primer YNP5 & YNP6. Jumlah DNA 5pg (= 500fg/μl) masih memperlihatkan pita DNA (Gambar 4, lajur 7), sedangkan pita DNA dalam gel agarosa hasil amplifikasi 1pg tidak terlihat. Berdasarkan penanda berat molekul (“marker”) ØX174HaeIII, pita DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv yang diamplifikasi menggunakan primer Pt8 & Pt9, mempunyai ukuran 541 bp (Gambar 1, 2, 3), sedangkan ukuran fragmen DNA yang diamplifikasi dengan primer YNP5 & YNP6, ialah 419 bp (Gambar 4).

Gambar 1 lajur 8, Gambar 2 lajur 4, Gambar 3 lajur 5 dan Gambar 4 lajur 4 tidak menunjukkan adanya pita DNA *M. smegmatis* 1008, berarti tidak terjadi amplifikasi DNA dengan menggunakan primer tersebut di atas.

PEMBAHASAN

Konsentrasi DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv yang didapat dalam penelitian ini berkisar antara 118 - 1160 ng/μl dengan rasio absorbansi 1,51 - 1,91. Hasil ekstraksi strain yang sama dengan menggunakan larutan fenol-kloroform tanpa perlakuan lisosim dan proteinase-K, ialah 50 - 300 μg DNA per gram suspensi sel bakteri, dengan rasio absorbansi > 1,75 (2).

Sensitivitas penggunaan PCR untuk mendeteksi bakteri *M. tuberculosis* H₃₇Rv dengan menggunakan primer Pt8 & Pt9 disinsis dari sekwens sisipan (IS6110) merupakan sekwens spesifik pada DNA *M. tuberculosis* kompleks, telah dilakukan. Hasil dari seri pengenceran, ternyata DNA dengan konsentrasi 10 fg atau setara dengan 2 sel bakteri (2, 9, 6), masih dapat dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil dari 8 uji PCR dengan menggunakan primer yang sama, 10 fg DNA *M. tuberculosis* dapat dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa, sedang 1 fg masih dapat dideteksi pada 2 uji PCR (9). Menurut KOLK dkk (6), 1 fg DNA *M. tuberculosis* kompleks yang diamplifikasi dengan menggunakan primer INS1 & INS2 dari sekwens sisipan IS986 bakteri tersebut, menunjukkan pita DNA cukup jelas dalam gel agarosa. IS986 identik dengan IS6110 (11). DNA *M. tuberculosis* dari 50 sel yang diamplifikasi menggunakan primer yang

berasal dari IS6110, dapat dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa. (8). Batas deteksi dengan hibridisasi "southern" menggunakan pelacak DNA yang mempunyai sekwens yang terletak di antara hasil amplifikasi, masing-masing adalah 2 dan 5 sel bakteri (12, 8).

Hasil amplifikasi DNA H₃₇Rv dengan menggunakan primer YNP5 & YNP6 dalam penelitian ini, menunjukkan pita DNA dari 5pg DNA setara dengan 1000 sel bakteri masih terlihat dalam gel agarosa. Penelitian SJOBRING dkk (4) menyatakan DNA *M. tuberculosis* dari < 10 sel bakteri yang diamplifikasi dengan menggunakan primer oligonukleotida dengan sekwens yang sama, masih dapat dideteksi setelah dilisis dengan metode pemanasan dan ultrasonikasi.

DNA *M. tuberculosis* yang diamplifikasi dengan menggunakan primer yang didesain dari gen yang menyandi protein kejut panas 65 kDa, mempunyai ukuran fragmen sebesar 383 dan 165 bp dalam gel agarosa, masing-masing mempunyai batas deteksi 100pg setara dengan 40 sel bakteri (13, 10). Fragmen DNA sebesar 208bp yang merupakan hasil amplifikasi DNA *M. tuberculosis* dengan menggunakan primer dari gen yang menyandi 16S rRNA, mempunyai batas deteksi 100pg (14).

Perbedaan sensitivitas uji PCR dalam penelitian ini dengan penelitian yang dilakukan oleh para peneliti terdahulu, kemungkinan disebabkan oleh banyaknya fragmen DNA target yang terdapat berulang dalam genom bakteri secara alamiah (2, 15). Sekwens sisipan IS6110 terdapat 10 - 16 kopi dalam genom *M. tuberculosis* (16, 17), sedangkan gen yang menyandi antigen protein 38kDa ataupun 65kDa terdapat hanya 1kopi dalam genom bakteri tersebut (8, 18). Metode ekstraksi DNA juga berpengaruh pada sensitivitas PCR (4).

KESIMPULAN

Penggunaan teknik PCR untuk mendeteksi bakteri *M. tuberculosis* H₃₇Rv dengan primer Pt8 & Pt9 dalam penelitian ini cukup sensitif dibanding dengan primer YNP5 & YNP6. Batas deteksi penggunaan primer tersebut masing-masing adalah 10fg DNA setara dengan 2 sel bakteri dan 5pg DNA setara dengan 1000 sel bakteri.

UCAPAN TERIMA KASIH

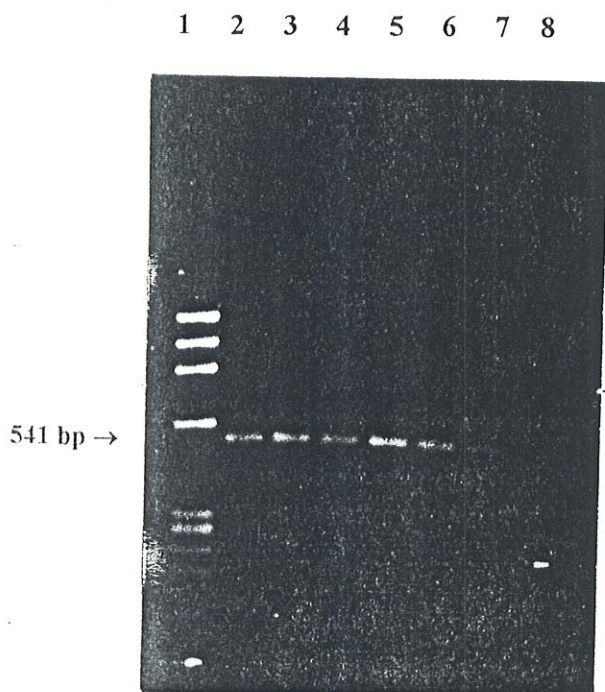
Ucapan terima kasih ditujukan kepada Kepala Laboratorium Mikrobiologi, Rumah Sakit Sumber Waras atas bantuan sampel penelitian yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ditjen PPM PLP Depkes RI. Profil Kesehatan Indonesia. Jakarta : Departemen Kesehatan RI. Pusat Data Kesehatan. 1996 : 246.
2. De Wit D, Steyn L, Shoemaker S, and Sogin M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimen by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. 1990 ; 28 : 2437 - 2441.
3. Eisenach KD, Crawford JT, and Bates JH. Repetitive DNA sequence as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1988; 26 : 2240 - 2245.
4. Sjobring U, Mecklenburg M, Andersen AB, and Mierner H. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1990; 28 : 2200 - 2204.
5. Hobby GT, Holman AP, Iseman MD, and Jones JA. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 1973; 4 : 97 - 104.

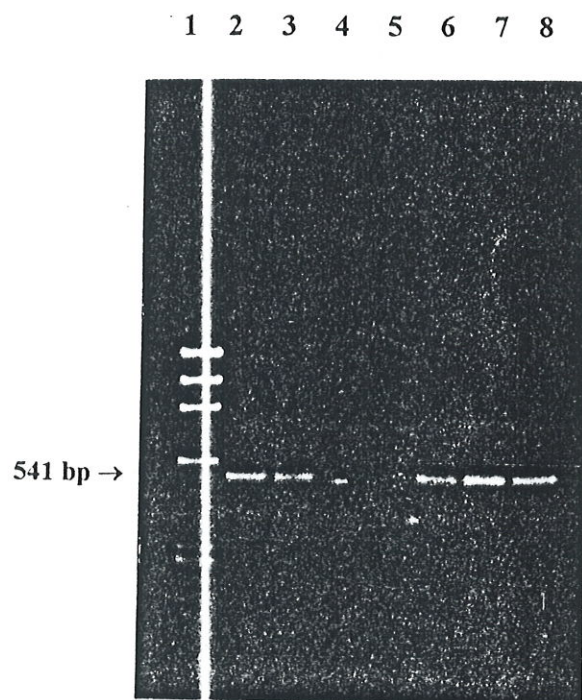
6. Kolk AHJ, Sshuitema ARJ, Kuijper S, van Leeuwen J, Herman PWM, van Embden JDA, and Hartskeerl R.A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a non radioactive detection system. J. Clin. Microbiol. 1992; 30 : 2567 - 2575.
7. Daniel TM, and Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial disease by enzyme-linked immunosorbent assay. Am. Rev. Respir. Dis. 1987; 135 : 1137 - 1151.
8. Shawar RM, El-Zaatari FAK, Nataraj A, and Clarridge JE. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and non isotopic hybridization methods. J. Clin. Microbiol. 1993; 31 : 61- 65.
9. Kox LFF, Rienthong D, Miranda AM, Udomsnatisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, van Heusden S, Kuijper S, and Kolk AHJ. A more realible PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 1994; 32 : 672 - 678.
10. Pao CC, Yen TSB, You JB, Maa CS, Fiss EH, and Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. 1990; 28 : 1877 - 1880.
11. Thierry D, Brisson-Noel A, Frebault VVL, Nguyen S, Jean-Luc G, and Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J. Clin. Microbiol. 199 ; 28 : 2668 - 2674.
12. Nolte FS, Metchock B, McGowan Jr JE, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, Mitchell PS, Plikaytis B, and Shinnick T. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. 1993; 31 : 1777 - 1782.
13. Hance AJ, Grand Champ B, Vincent-Levy-Frebault V, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D, and Gicquel B. Detection and identification of mycobacteria amplification of mycobacterial DNA. Mol. Microbiol. 1989; 3 : 843 - 849.
14. Kox LFF, van Leeuwen J, Kuijper S, Jansen H.M, and Kolk AHJ. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 1995; 33 : 3225 - 3233.
15. Persing DH. In vitro nucleic acid amplification techniques. In Diagnostic Molecular Microbiology. Persing DH, Smith PF, Tenover FC, and White TJ. (eds). Washington DC: American Society for Microbiology, 1993; 51-87.

16. Fumokong NG, Tang TH, Al-Maamary S., Ibrahim VA, Ramayah S, Yates M., Zainuddin ZF, and Dale JW. Insertion sequence typing of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization of a widespread subtype with a single copy of IS6110. *Tubercle and Lung Disease* 1994; 75 : 435 - 440.
17. Philipp WJ, Poulet S, Eiglmeier K, Pascopella L, Balasubramanian V, Heym B, Bergh S, Bloom BR, Jacob Jr WR, and Cole ST. An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, and comparison with *Mycobacterium lepre*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93 : 3132 - 3137.
18. Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, Boucart D, Jol V, Yeni P, and Hance AJ. Use of reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29 : 712 - 717.



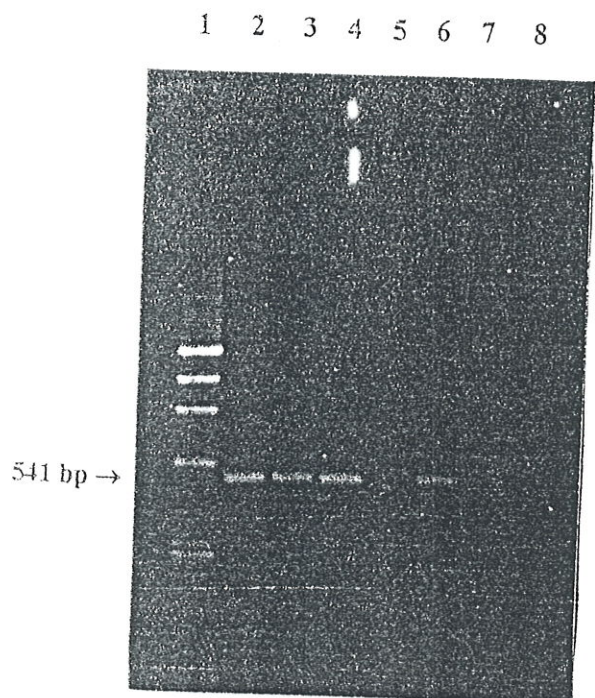
Gambar 1. Hasil PCR DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv menggunakan primer Pt8 & Pt9 dengan elektroforesis gel agarosa.

Lajur : 1. "Marker" ØX174HaeIII,
 2. DNA H₃₇Rv 2µg, 3. 1µg,
 4. 800ng, 5. 600ng, 6. 400ng
 7. 200ng
 8. DNA *M. smegmatis* 1008 400ng
 (kontrol negatif)

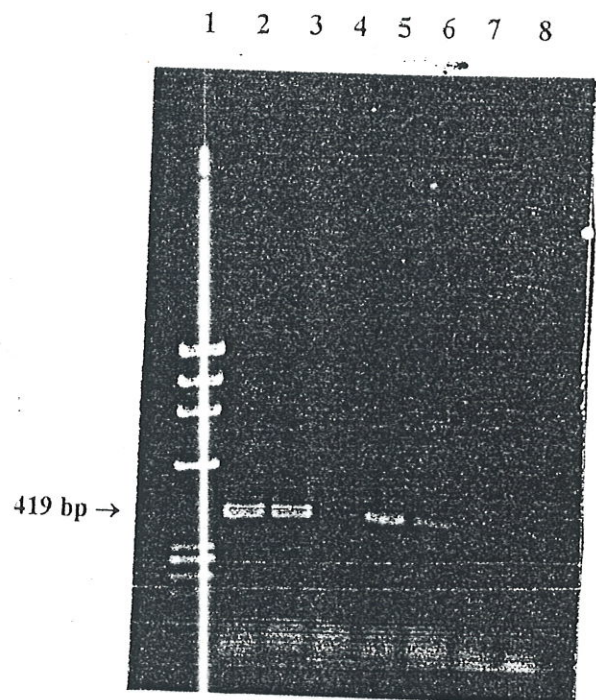


Gambar 2. Hasil PCR DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv menggunakan primer Pt8 & Pt9 dengan elektroforesis gel agarosa.

Lajur : 1. "Marker" ØX174HaeIII
 2. DNA H₃₇Rv 150ng, 3. 100ng,
 6. 50ng, 7. 10ng, 8. 5ng.
 4. DNA *M. smegmatis* 1008
 400ng (kontrol negatif)
 5. Kontrol (tanpa DNA)



Gambar 3. Hasil PCR DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv menggunakan primer Pt8 & Pt9 dengan elektroforesis gel agarosa.
 Lajur : 1. "Marker" ØX174HaeIII
 Lajur : 2. DNA H₃₇Rv 1ng, 3. 10pg, 4. 5pg, 6. 1pg, 7. 100fg, 8. 10fg
 Lajur : 5. DNA *M. smegmatis* 1008 400ng (kontrol negatif)



Gambar 4. Hasil PCR DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv menggunakan primer YNP5 & YNP6 dengan elektroforesis gel agarosa.
 Lajur : 1 "Marker" ØX174HaeIII.
 Lajur : 2. DNA H₃₇Rv 10ng, 3. 5ng, 5 1ng, 6. 500pg, 7. 5pg, 8. 10pg
 Lajur : 4. DNA *M. smegmatis* 1008 400ng (kontrol negatif).