

PAIR/T. 395/99

UJI PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION/
REAKSI) BERANTAI POLIMERASE PADA
BAKTERI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
DAN MIKOBATERIUM ATIPIK.

Maria Lina R.

UJI PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION / REAKSI BERANTAI
POLIMERASE PADA BAKTERI *Mycobacterium tuberculosis* dan MIKO-
BAKTERIUM ATIPIK *

Maria Lina R.**

ABSTRAK

UJI PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) / REAKSI BERANTAI
POLIMERASE PADA BAKTERI *Mycobacterium tuberculosis* DAN MIKO-
BAKTERIUM ATIPIK. Telah dilakukan uji PCR untuk mendeteksi bakteri.
M. tuberculosis H₃₇Rv, isolat *M. tuberculosis* dari sputum penderita TBC, dan
mikobakterium atipik. Bakteri dibiakkan pada medium Lowenstein-Jensen. Ekstraksi
DNA dilakukan dengan menggunakan metode fenol-kloroform setelah sel dilisiskan
dengan lisosim, proteinase-K, dan SDS. Untuk mengetahui sensitivitas uji PCR, DNA
hasil ekstraksi diencerkan dalam beberapa konsentrasi. Amplifikasi DNA dilakukan
dengan menggunakan primer oligonukleotida YNP5 & YNP6 dan Pt8 & Pt9 yang
masing-masing disintesis dari sekwens DNA yang menyandi antigen b protein 38-kDa dan
sekwens sisipan IS6110. Deteksi hasil amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis gel
agarosa. Gel diwarnai dengan larutan etidium bromida dan divisualisasi dengan ultraviolet
transilluminator. Pengambilan gambar gel agarosa dilakukan dengan menggunakan
kamera polaroid. Hasil penelitian menunjukkan batas deteksi DNA *M. tuberculosis*
H₃₇Rv yang dapat diamplifikasi menggunakan primer YNP5 & YNP6 adalah 5 pg setara
dengan 1000 sel bakteri. Sensitivitas tertinggi uji PCR menggunakan primer Pt8 & Pt9

* Dibawakan dalam Presentasi Ilmiah Hasil Studi Program Doktor dan Magister dalam
Rangka Ulang Tahun Batan ke 40, tanggal 8 - 9 Desember 1998 di Jakarta.

** Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Batan.

pada DNA isolat *M. tuberculosis* yang berasal dari sputum penderita TBC, adalah hasil amplifikasi DNA isolat 9727 yang mempunyai batas deteksi 100 fg. Amplifikasi DNA beberapa mikobakterium atipik menggunakan primer Pt8 & Pt9 cukup spesifik, karena tidak ada amplifikasi DNA bakteri tersebut.

ABSTRACT

PCR ("POLYMERASE CHAIN REACTION") ASSAY ON *Mycobacterium tuberculosis* AND ATYPICAL MYCOBACTERIUM BACTERIA. PCR technique was carried out to detect *M. tuberculosis* H₃₇Rv, isolates of *M. tuberculosis* from TBC patients sputum, and atypical mycobacteria. The bacteria was cultured on Lowenstein-Jensen medium. DNA extraction was done by using phenol- chloroform method after lysing the bacteria cells with lysozyme, proteinase-K, and SDS. Serial dilution of extracted DNA was done to know the sensitivity of PCR. Primers used for DNA amplification were YNP5 & YNP6 and Pt8 & Pt9. The primers were designed from DNA sequence which codes the protein antigen b 38-kDa, and insertion sequence IS6110, respectively. The amplification product was analysed by electrophoresis in agarose gel. Gel was stained with ethidium bromide solution and photographed by polaroid camera under ultraviolet transilluminator. The results showed that the detection limit of amplified DNA of *M. tuberculosis* H₃₇Rv with YNP5 & YNP6 primer was 5 pg which was equivalent to 1000 bacterial cells. The highest sensitivity of PCR using Pt8 & Pt9 primer on DNA of *M. tuberculosis* isolates from TBC patients sputum, was showed on the amplified DNA from *M. tuberculosis* isolate 9727 with detection limit of 100 fg (equivalent to 20 bacterial cells). PCR assay using Pt8 & Pt9 primer on DNA of atypical mycobacteria was specific. It can be revealed that no amplification occurred on DNA of those bacteria.

PENDAHULUAN

Perkembangan biologi molekular dan bioteknologi sangat cepat baik di bidang kedokteran, pertanian, lingkungan hidup, industri farmasi maupun obat-obatan. Biologi molekular di bidang kedokteran, khususnya pengendalian penyakit infeksi meliputi aspek yang sangat luas, yaitu diagnosis, pengobatan, epidemiologi, dan pencegahan.

Diagnosis penyakit infeksi dengan biologi molekular adalah mendeteksi asam nukleat mikroorganisme penyebab. Teknik molekular yang digunakan yaitu pelacak DNA (1), PCR (2, 3), dan LCR (Ligase Chain Reaction) (4). Sekwens DNA spesifik yang berbeda pada tiap organisme merupakan dasar penggunaan pelacak DNA. Sementara itu teknik PCR dan LCR yang dapat memperbanyak jumlah salinan DNA target, dapat mendeteksi mikroorganisme meskipun dalam jumlah sedikit.

Aplikasi molekular dalam bidang pengobatan yaitu telah diidentifikasinya mutasi gen yang menyebabkan mikroorganisme resisten terhadap antibiotika tertentu. Teknik PCR dilanjutkan dengan metode sekwensing atau RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) dapat digunakan sebagai metode untuk mendeteksi mutasi gen kuman (5).

Epidemiologik penyakit infeksi dapat diketahui dari pola transmisi kuman, yaitu menggunakan metode RFLP berdasarkan teknik PCR (PCR-RFLP) dan PFGE (6, 7). Teknik tersebut dapat membedakan pola fragmen DNA strain kuman. Vaksin hepatitis B sebagai hasil rekombinasi DNA virus telah banyak digunakan untuk pencegahan penyakit hepatitis B (8).

Tuberkulosis/TBC adalah suatu penyakit infeksi disebabkan bakteri *M. tuberculosis* dan ditemukan lebih dari 100 tahun yang lalu. (9, 10). Namun, penyakit tersebut masih menjadi masalah kesehatan yang sangat penting terutama di negara berkembang. Jumlah penderita TBC di dunia \pm 20 juta (10) dan pada tahun 1996 diperkirakan 8,8 juta orang terinfeksi meningkat menjadi penderita penyakit dan 3 juta orang akan meninggal (11).

Berdasarkan Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 1980 dan 1986, tuberkulosis paru di Indonesia menduduki peringkat keempat penyebab kematian dan berdasarkan SKRT tahun 1992 menduduki peringkat kedua setelah penyakit kardio-vaskular (12,

BAHAN DAN TATA KERJA

Kultur Bakteri. Strain bakteri yang digunakan adalah *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. tuberculosis* hasil isolasi sputum penderita tuberkulosis yang diperoleh dari rumah sakit Sumber Waras, Jakarta). Sebagai pembanding digunakan mikobakteria atipik yaitu *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. chelonae*, *M. terrae*, *M. scrofulaceum*, dan *M. fortuitum* didapat dari Pusat Penelitian Penyakit Menular, Badan Litbang Kesehatan, Depkes RI. Bakteri ditumbuhkan dalam medium miring Lowenstein-Jensen (25 ml). Inkubasi *M. tuberculosis* H₃₇Rv dan isolat *M. tuberculosis* pada suhu 37°C selama 3 - 4 minggu, sedangkan untuk mikobakteria atipik diinkubasi pada suhu yang sama selama 3 hari.

Ekstraksi DNA Bakteri. Bakteri yang sudah tumbuh dalam medium Lowenstein Jensen dibuat suspensi dengan menambahkan larutan NaCl 0,9% (b/v) ke dalam kultur tersebut. Untuk mematikan sel bakteri, suspensi bakteri dipanaskan 15 menit pada suhu 100°C. Suspensi bakteri tersebut disentrifugasi pada 6000 rpm (revolutions per minute /putaran per menit), selama 30 menit. Pelet dicuci dengan larutan 0,9% NaCl sebanyak 2 kali, dilarutkan dengan 2 ml larutan penyangga TE/Tris-EDTA pH 8,0. Larutan lisosim 10 mg/ml sebanyak 1/10 volume ditambahkan ke dalam larutan bakteri tersebut, 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 100 µg/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 kloroformisoamilalkohol, ditambahkan ke dalam larutan tersebut di atas dengan volume yang sama. Campuran tersebut digoyang supaya homogen selama 10 menit, tidak divorteks, kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm selama 5 menit. Fase air yang mengandung DNA yang berada di atas fase fenol 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 sentrifugasi. Larutan NaCl 5M dan etanol 100% dingin (-20°C) ditambahkan ke dalamnya masing-masing sebanyak 1/25 dan 2,5 volume, diinkubasi semalam pada suhu -20°C, kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada 13.000 rpm dengan suhu -10°C.

Supernatan dibuang dan pelet ditambah dengan etanol 70% tetapi tidak diresuspensikan, disentrifugasi lagi selama 5 menit dengan kecepatan dan suhu sama seperti di atas. Setelah supernatan dibuang, pelet dikeringkan dalam eksikator. Pelet kemudian dilarutkan dalam 1 ml larutan bufer 1 x TE, diinkubasi semalam pada 4°C. Konsentrasi dan kemurnian DNA ditentukan dengan mengukur rapat optiknya (optical density) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260nm dan 280 nm. Untuk mengetahui batas deteksi DNA yang diamplifikasi dan sensitivitas primer oligonukleotida yang digunakan dalam penelitian ini, dilakukan pengenceran DNA. DNA diencerkan dengan larutan bufer TE pada beberapa konsentrasi. DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv yang diamplifikasi menggunakan primer YNP5 & YNP6, diencerkan pada konsentrasi 1ng/μl, 500pg/μl, 100pg/μl, 50pg/μl, 10pg/μl, 1pg/μl, 500fg/μl, 100fg/μl, 50pg/μl, 10fg/μl, dan 1fg/μl. Percobaan selanjutnya menggunakan primer Pt8 & Pt9. Pengenceran DNA isolat *M. tuberculosis* yang berasal dari sputum penderita TBC adalah pada 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 dan kontrol positif, digunakan DNA *M. smegmatis* dan *M. tuberculosis* H₃₇Rv dengan jumlah DNA masing-masing 400 dan 10ng.

Proses PCR. Primer oligonukleotida yang digunakan pada percobaan awal adalah YNP5 (5'-ACCACCGAGCGGTTTCGCCTGA-3') & YNP6 (5'-GATCTGCGG GTC GTCCCAGGT-3'). Primer ini dirancang dari gen *M. tuberculosis* yang menyandi protein 38k-Da. Pada percobaan selanjutnya digunakan primer Pt8 (5'-GTGCGGATGGTTCGC GAGAT-3') dan Pt9 (5'- CTGGATGCCCTCACGGTTCA-3') yang masing-masing terletak pada pasangan basa 105 sampai 124 dan 626 sampai 645 dari sekuens sisipan 6110 (IS 6110). Pada 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 0,2 μM, primer YNP5 & YNP6 masing-masing 20pM sedangkan untuk primer Pt8 & Pt9 masing-masing 0,2 μM, dan 1 Unit Taq. DNA polimerase. Campuran sebanyak 40 μl dimasukkan ke dalam tabung khusus untuk PCR, ditambah dengan 10 μl sampel DNA kemudian dikocok dengan

menggunakan vorteks. Setelah ditambah dengan 50 μ l minyak mineral, campuran dimasukkan dalam alat DNA thermocycler (Perkin-Elmer). Proses PCR dilakukan 40 siklus dengan tahap denaturasi: 1,5 menit, suhu 94°C; “annealing” pada suhu 65°C, 2 menit, dan tahap extension 3 menit pada suhu 72°C.

Deteksi DNA yang Diampifikasi. Produk PCR di analisis dengan elektroforesis gel agarosa. DNA hasil amplifikasi dicampur dengan loading buffer yang terdiri dari 25% (b/v) gliserol, 35% (b/v) sukrosa, dan 0,025% (b/v) bromfenol biru, dengan perbandingan sampel dan “loading buffer” = 4 : 1. Penanda berat molekul yang dipakai dalam penelitian ini adalah Hae III ϕ X174 yang diencerkan dengan air suling dan ditambah dengan loading buffer dengan perbandingan 1 : 3 :1. Proses elektroforesis dilakukan dengan voltase konstan (100V) selama \pm 1 jam dalam larutan penyangga Tris-Borat.EDTA/TBE yang mempunyai komposisi 89 mM Tris, 89 mM asam borat, dan 2 mM EDTA. Gel kemudian 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 = base pair). Pita DNA dalam gel tersebut kemudian diambil gambar/foto menggunakan kamera polaroid MP-4.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi dan nilai rasio absorbansi (λ 260nm/ λ 280 nm) yang menunjukkan tingkat kemurnian DNA hasil ekstraksi DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv, isolat *M. tuberculosis*, dan mikobakteria atipik terlihat dalam Tabel 1. Nilai rasio absorbansi DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv, isolat *M. tuberculosis* berkisar 1,500 - 2,000, sedangkan untuk DNA mikobakteria atipik 1,413 - 1,844. Menurut HILL (23), DNA *M. tuberculosis* hasil ekstraksi yang didapatkan dengan CTAB (cetyltrimethyl-ammonium bromide) mempunyai rasio absorbansi (λ 255nm/ λ 280nm) 1,88 dibanding dengan nilai sebelum proses pengendapan yaitu 1,75.

Nilai absorbansi yang diperoleh dalam penelitian ini bervariasi. Hal ini mungkin disebabkan tercampurnya bahan lain seperti bahan yang terdapat dalam medium pertumbuhan pada saat penyediaan suspensi sel bakteri. Bahan lain yang juga merupakan kontaminan adalah bahan untuk proses ekstraksi DNA. Sampel DNA dinyatakan murni apabila nilai rasio absorbansi (λ 260nm/ λ 280nm) = 1,8 - 1,9 (24, 25). Nilai di bawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi seperti protein, fenol, SDS, dan polisakarida (23, 25).

Batas deteksi (jumlah DNA minimum yang memberikan hasil positif dengan PCR) hasil amplifikasi DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv menggunakan YNP5 & YNP6 adalah 5pg (Gambar 1.) setara dengan 1000 sel bakteri. DNA *M. tuberculosis* 5 fg setara dengan 1 sel bakteri (3). Batas deteksi DNA *M. tuberculosis* dengan nested PCR pada proses PCR pertama menggunakan primer yang sama, adalah 10pg, sedangkan pada proses PCR ke dua dengan primer yang terletak di bagian dalam sekwens DNA produk amplifikasi adalah 10 fg (26).

Hasil uji PCR DNA isolat *M. tuberculosis*, mempunyai sensitivitas berbeda yang dapat ditunjukkan dengan batas DNA yang diamplifikasi dan dideteksi, dapat dilihat Gambar 2 sampai dengan Gambar 7. Dalam penelitian ini, umumnya makin tinggi tingkat kemurnian DNA, sensitivitas PCR makin meningkat. Sensitivitas PCR sangat dipengaruhi metode ekstraksi DNA (17). Namun, apabila dibandingkan amplifikasi DNA isolat 9727 dengan nilai rasio absorbañsi 2,0 dan isolat 302 dengan nilai rasio 1,829, sensitivitas uji PCR pada DNA isolat 9727 lebih tinggi. Batas deteksi DNA isolat 9727 yang dapat diamplifikasi dan dideteksi adalah 100fg (Gambar 4) setara dengan 20 sel bakteri, sedangkan dari hasil amplifikasi isolat 302 mempunyai batas deteksi 1pg setara 200 sel bakteri (Gambar 2). Demikian juga sensitivitas PCR pada DNA isolat 9548 (Gambar 7) dengan tingkat kemurnian paling rendah, sensitivitasnya lebih tinggi dari isolat 033 dan 9947 (Gambar 6, 5) dengan tingkat kemurnian lebih tinggi. Perbedaan sensitivitas tersebut kemungkinan disebabkan banyaknya kopi DNA target dalam genom antara strain *M. tuberculosis*. Beberapa strain bakteri tersebut di Asia hanya mempunyai 1 kopi IS6110 dalam genomnya (27).

Penelitian KOX dkk (2), menunjukkan dari 8 seri pengujian PCR menggunakan primer Pt8 & Pt9, 10fg DNA *M. tuberculosis* masih dapat diamplifikasi dan dideteksi pada 6 uji, sedangkan 2 uji menunjukkan hasil yang lebih sensitif yaitu 1 fg DNA masih dapat dideteksi. Batas deteksi DNA *M. tuberculosis* yang diamplifikasi menggunakan primer yang juga dirancang dari IS6110, menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 317 bp, adalah 250 fg setara 50 sel bakteri (28). Perbedaan sensitivitas uji PCR dari penelitian tersebut dengan penelitian ini kemungkinan disebabkan perbedaan pemilihan fragmen DNA sasaran di samping jumlah kopinya.

Apabila dibandingkan batas deteksi DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv hasil amplifikasi menggunakan primer YNP5 & YNP6 dengan Pt8 & Pt9 pada beberapa isolat *M. tuberculosis* dari sputum penderita TBC, ternyata primer Pt8 & Pt9 lebih sensitif, karena batas deteksinya lebih rendah. Batas deteksi DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv dengan primer YNP5 & YNP6 adalah 5pg sedangkan isolat *M. tuberculosis* 302 dan 9727 batas deteksinya masing-masing 1 pg dan 100fg. Salah satu faktor yang menentukan sensitivitas PCR seperti telah dijelaskan, adalah jumlah kopi sekvens sasaran yang terdapat dalam genom suatu mikroorganisme (29). Sekvens DNA sasaran uji PCR menggunakan primer YNP5 & YNP6 adalah fragmen DNA dalam gen *Pab* yang menyandi antigen b protein 38-kDa. Gen tersebut terdapat hanya 1 kopi dalam genom *M. tuberculosis* (28), sedangkan IS6110 yang merupakan DNA sasaran primer Pt8 & Pt9 ada 16 kopi (30).

Primer Pt8 & Pt9 dalam penelitian ini cukup spesifik untuk *M. tuberculosis* karena tidak ada amplifikasi DNA mikobakteria atipik (*M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. chelonae*, *M. terrae*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*) (Gambar 8). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian KOX dkk (2). Uji PCR menggunakan primer Pt8 & Pt9 pada sampel klinis yang diteliti menunjukkan hasil negatif pada 12 sampel klinis yang mengandung mikobakteria bukan *M. tuberculosis*. KENT dkk (31) menyatakan 24 dari 31 strain mikobakteria nontuberkulosis yang diuji dengan PCR menggunakan primer yang dirancang dari IS6110, menunjukkan hasil positif. Hal tersebut karena adanya suatu sekvens pada mikobakteria nontuberkulosis yang homolog pada IS6110. Sebaliknya,

hasil penelitian HELLYER dkk (32), menyatakan tidak ada sekwens DNA dalam mikobakteria nontuberkulosis yang homolog dengan IS6110. Kemungkinan yang menyebabkan hasil berbeda dari penelitian tersebut adalah daerah elemen IS6110 yang menjadi DNA sasaran berbeda. Kemungkinan lain jumlah DNA sasaran yang digunakan dalam penelitian KENT dkk terlalu banyak, sehingga besar kemungkinan terjadi hasil positif semu yang dihasilkan DNA *M. tuberculosis* sebagai kontaminan dan atau ampikon yang terdapat dalam jumlah kecil. Oleh karenanya, untuk menghindari reaksi silang dengan spesies bukan *M. tuberculosis* kompleks, diperlukan ketelitian mendisain primer berdasarkan sekwens IS6110, di samping persyaratan yang memenuhi untuk menghindari kontaminasi.

KESIMPULAN

1. Uji PCR menggunakan primer Pt8 & Pt9 cukup spesifik untuk mendeteksi bakteri *M. tuberculosis*. Mikobakteria atipik (*M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. chelonae*, *M. terrae*, *M. scrofulaceum*, dan *M. fortuitum*), tidak terdeteksi dengan teknik PCR menggunakan primer Pt8 & Pt9.
2. Sensitivitas uji PCR menggunakan primer YNP5 & YNP6 mempunyai kemampuan mendeteksi 5pg DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv, sedang dengan primer Pt8 & Pt9, mampu mendeteksi 100fg DNA isolat klinik *M. tuberculosis* setara dengan 20 sel bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

1. LEBRUN, L., ESPINASSE, F., POVEDA, J.D., and FREBAULT, V.V.L., Evaluation of non radioactive DNA probe for identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 2476 - 24
2. KOX, L.F.F., RIENTHONG, D., MIRANDA, A.M., 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 (1994) 672 - 678.

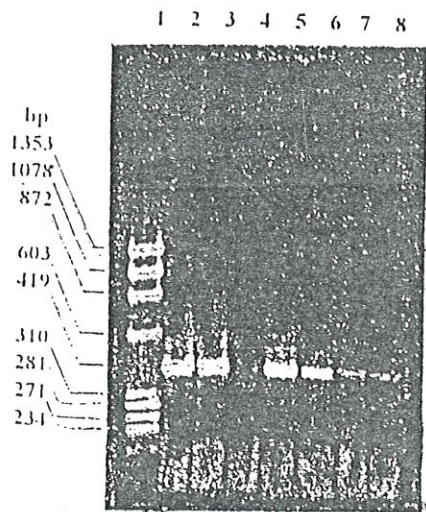
3. KOLK, A.H.J., SCHUITEMA, A.R.J., KUIJPER, S., van LEEUWEN, J., HERMANS, P.W.M., van EMBDEN, J.D.A., and HARSKEERL, R.A., Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a non radioactive detection system. *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 2567 - 2575.
4. LINDBRATHEN, A., GAUSTAD, P., HOVIG, B., and TØnjon, T., Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples from patients in Norway by ligase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 3248 - 3253.
5. MORRIS, S., PAI, G.H., 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.
6. OTAI, I., SAMPER, S., ASENSIO, M.P., VICTORIA, M.A., RUBIO, M.C., GOMEZ-LUS, R., and MARTIN, C., Use of PCR method based in IS6110 polymorphisms for typing *Mycobacterium tuberculosis* strain from BACTEC culture. *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 273 - 277.
7. ZHANG, Y., MAZUREK, G.H., CAVE, M.D., EISENACH, K.D., PANG, Y., MURPHY, D.T., and WALLACE Jr, R.J., DNA polymorphisms in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analysed by pulsed field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 1551 - 1556.
8. ZUCKERMAN, A.J., New hepatitis B vaccines. *Br. Med. J.* 290 (1985) 492 - 496.
9. TJANDRA, T.A., Tuberkulosis dan AIDS. *Medika* (3) (1993) 56 - 58
10. HADIARTO, M., Tuberkulosis dan HIV. *J. Respir. Indo.* 16 (1996) 56 - 60.
11. DOLLIN, P.J., RAVIGLIONE, M.C., and KOCHI, A., Global tuberculosis incidence and mortality during 1990 - 2000. *Bull World Health Org.* 72 (1994) 213 - 220
12. PRIYANTI, Z.S., Pengobatan tuberkulosis. *Kumpulan Naskah Ilmiah Tuberkulosis. SumSel-Jambi : Perhimpunan Dokter Paru Indonesia (PDPI)* (1997).
13. RAMLI, S., Masalah tuberkulosis di Indonesia. *Kumpulan Naskah Ilmiah Tuberkulosis. SumSel-Jambi : Perhimpunan Dokter Paru Indonesia (PDPI)* (1997).
14. STYBLO, K., Overview and epidemiologic assesment of the current global tuberculosis situation with an emphasis on control in developing countries. *Rev. Infect. Dis.* 11 (S2) (1989) 339 - 346.
15. KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., and WINN, W.C., (eds). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 4th edition. JB lippincott Company, Philadelphia (1990).
16. PLORDE, J.J. *Mycobacteria.* In *Medical Microbiology. An introduction to infectious disease.* Sherris, J.C., and Ryan K.J. (eds). Prentice-Hall International

- Inc (UK) limited, London (1994).
17. SJOBRING, J.H., MECKLENBURG, M., ANDERSEN, A.B., and MIORNER, H., Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 2200 - 2204.
 18. HOBBY, G.T., HOLMAN, A.P., ISEMAN, M.D., and JONES, J.M., Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 4 (1973) 97 - 104.
 19. BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., ORNSTON, L.N., JAWETZ, E., MELNICK, J.L., and ADELBERG, E.A., Medical Microbiology. 20th. Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut (1995).
 20. DANIEL, T.M., and DEBANNE, S.M., The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial disease by enzyme-linked immunosorbent assay. Am. Rev. Respir. Dis. 135 (1987) 1137 - 1151.
 21. OKA, G.M.S., OKUZUMI, K., KIMURA, S., and SHIMADA, K., Evaluation of acridinium-ester-labelled DNA probe for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J. Clin. Microbiol. 29 (1991) 2473 - 2476.
 22. BEAVIS, K.G., LICHTY, M.B., JUNGKIND, D.L., and GIGER, O., Evaluation amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. J. Clin. Microbiol. 33 (1995) 2582 - 2586.
 23. HILL, E.B., WAYNE, L.G., and GROSS, W.M., Current practices in mycobacteriology: result of a survey of state public health laboratories. J. Bacteriol. 112 (1972) 1033 - 1039.
 24. 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).
 25. BROWN, T.A., Gene cloning : An introduction. Van Nostrand Reinhold (UK) Co Ltd. Molly Millars Lane, Workingham, Berkshire, England. (1986)
 26. 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 (1993) 2228 - 2232.
 27. YUEN, L.K., ROSS, B.C., JACKSON, K.M., and DWYER, B., Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot-hybridization. J. Clin. Microbiol. 131 (1993) 1615 - 1618
 28. SHAWAR, R.M., EL-ZAATARI, F.A.K., NATARAJ, A., and CLARRIDGE, J.E., Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two-step poly-

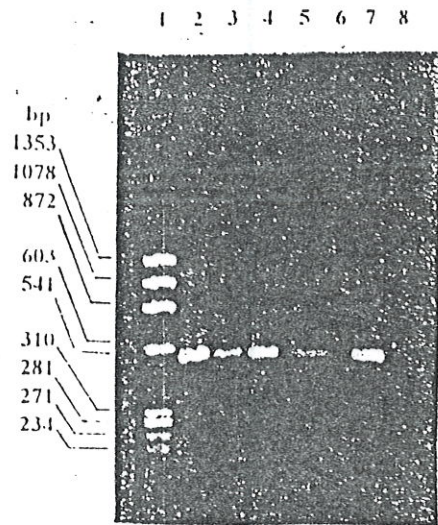
- merase chain reaction and non isotopic hybridization methods. *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 61- 65.
29. THIERRY, D., BRISSON-NOEL, A., FREBAULT, V.V.L., NGUYEN, S., JEAN-LUC, G., and GICQUEL, B., Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 28 (1990) 2668 - 2674.
 30. PHILIPP, W.J., POULET, S., EIGLMEIER, K., PASCOPELLA, L., BALASUBRAMANIAN, V., HEYM, B., BERGH, S., BLOOM, B.R., JACOB Jr., W.R., and COLE, S.T., An integrated map of the genom of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 (1996) 3132 - 3137.
 31. KENT, L., McHUGH, T.D., BILLINGTON, O., DALE, J.W., and GILLESPIE, S.H., Demonstration of homolog between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium spp.* *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 2290-2293
 32. HELLYER, T.J., DesJARDIN, L.E., ASSAF, M.K., BATES, J.H., CAVE, M.D., and EISENACH, K.D., Specificity of IS6110-based amplification assay for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 2843 - 2846.

Tabel 1. Hasil ekstraksi DNA bakteri *M. tuberculosis* strain H₃₇Rv, isolat *M. tuberculosis*, dan mikobakterium atipik.

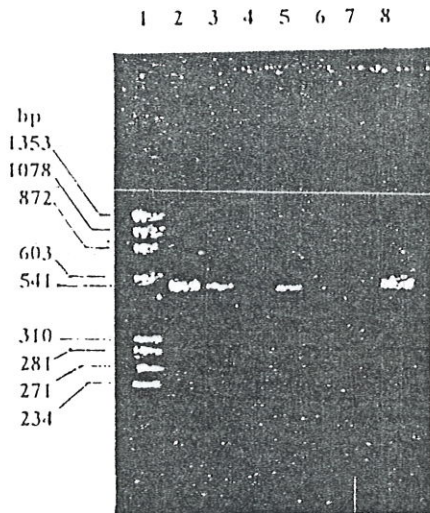
Strain	Konsentrasi DNA (ng/ μ l)	Rasio absorbansi (λ 260 nm/280 nm)
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	1160	1,901
<i>M. tuberculosis</i> isolat 302	310	1,829
<i>M. tuberculosis</i> isolat 295	278	1,827
<i>M. tuberculosis</i> isolat 9727	78	2,000
<i>M. tuberculosis</i> isolat 9947	138	1,761
<i>M. tuberculosis</i> isolat 033	100	1,682
<i>M. tuberculosis</i> isolat 9548	58	1,500
<i>M. smegmatis</i>	1068	1,844
<i>M. phlei</i>	765	1,842
<i>M. chelonae</i>	634	1,627
<i>M. terrae</i>	118	1,511
<i>M. scrofulaceum</i>	88	1,500
<i>M. fortuitum</i>	168	1,413



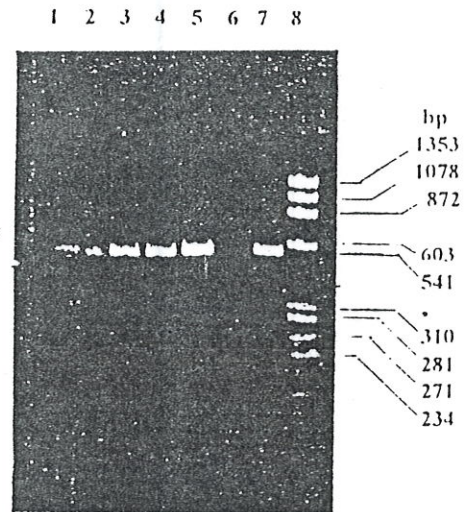
Gambar 1. Hasil PCR DNA *M. tuberculosis* H₃₇Rv menggunakan primer YNP5 & YNP6 dengan elektroforesis gel agarosa
 Lajur : 1. "Marker" ØX174HaeIII
 Lajur: 2. DNA H₃₇Rv 10ng, 3. 5ng, 5. 1ng, 6. 500pg, 7. 5pg, 8. 10pg
 Lajur: 4. DNA *M. smegmatis* 400ng (kontrol -)



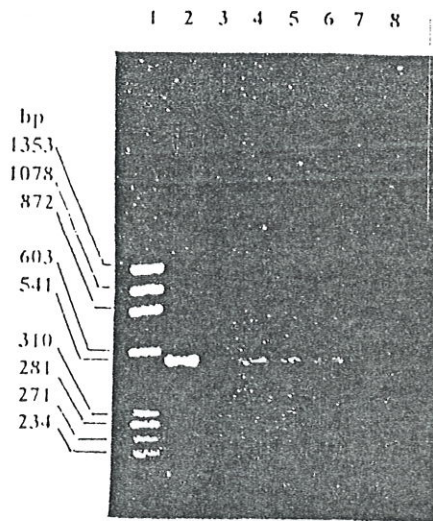
Gambar 2. Hasil PCR DNA isolat *M. tuberculosis* 302 menggunakan primer Pt8 & Pt9 dengan elektroforesis gel agarosa.
 Lajur: 1. "Marker" ØX174HaeIII
 Lajur: 2. DNA isolat 302 100pg, 3. 5pg, 4. 10pg, 5. 1pg, 6. 100fg, 8. 10fg
 Lajur: 7. DNA H₃₇Rv 10ng (kontrol +)



Gambar 3. Hasil PCR DNA isolat *M. tuberculosis* 295 menggunakan primer Pt8 & Pt9 dengan elektroforesis gel agarosa
 Lajur: 1. "Marker" ØX174HaeIII
 Lajur: 2. DNA isolat 295 100pg, 3. 10pg, 5. 5pg, 6. 1pg, 7. 100fg
 Lajur: 4. Kontrol (tanpa DNA)
 Lajur: 8. DNA H₃₇Rv 10ng (kontrol+)

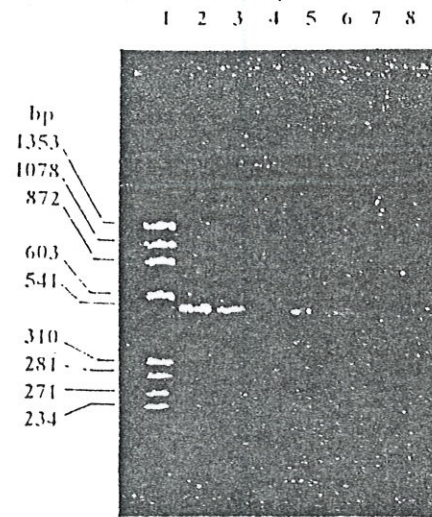


Gambar 4. Hasil PCR DNA isolat *M. tuberculosis* 9727 menggunakan primer Pt8 & Pt9 dengan elektroforesis gel agarosa.
 Lajur: 1. DNA isolat 9727 100fg, 2. 1pg, 3. 5pg, 5. 10pg, 7. 100pg
 Lajur: 4. DNA H₃₇Rv 10ng (kontrol+)
 Lajur: 6. Kontrol (tanpa DNA)
 Lajur: 8. "Marker" ØX174HaeIII



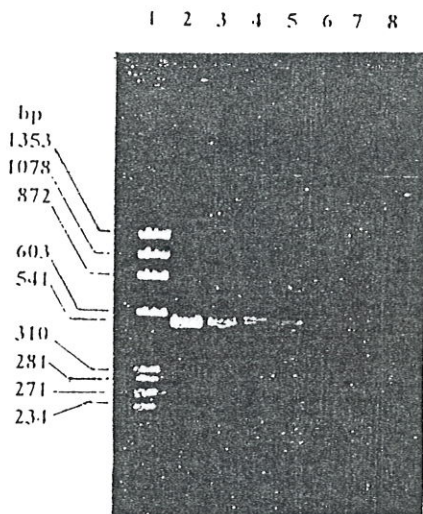
Gambar 5. Hasil PCR DNA isolat *M. tuberculosis* 9947 menggunakan primer Pt8 & Pt9 dengan elektroforesis gel agarosa

Lajur: 1. "Marker" Φ X174HaeIII
 Lajur: 2. DNA *H₃₇Rv* 10ng (kontrol+)
 Lajur: 3. Kontrol (tanpa DNA)
 Lajur: 4. DNA isolat 9947 5ng, 5. 1ng,
 6. 500pg, 7. 100pg, 8. 10pg



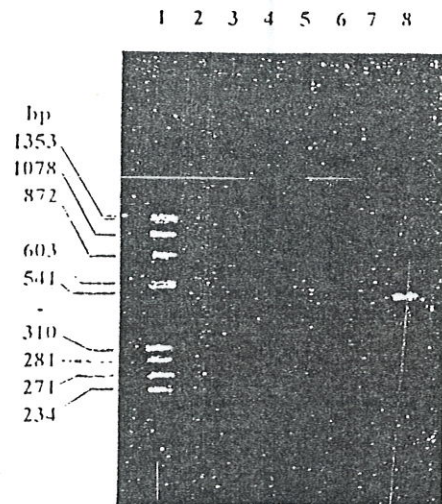
Gambar 6. Hasil PCR DNA isolat *M. tuberculosis* 033 menggunakan primer Pt8 & Pt9 dengan elektroforesis gel agarosa.

Lajur: 1. "Marker" Φ X174HaeIII
 Lajur: 2. DNA *H₃₇Rv* 10ng (kontrol+)
 Lajur: 3. DNA isolat 033 1ng, 5. 500pg,
 6. 100pg, 7. 10pg, 8. 5pg.
 Lajur: 4. Kontrol (tanpa DNA)



Gambar 7. Hasil PCR DNA isolat *M. tuberculosis* 9548 menggunakan primer Pt8 & Pt9 dengan elektroforesis gel agarosa.

Lajur: 1. "Marker" Φ X174HaeIII
 Lajur: 2. DNA *H₃₇Rv* 10ng (kontrol+)
 Lajur: 3. DNA isolat 9548 100pg, 4. 10pg,
 5. 5pg, 6. 1pg, 7. 100fg
 Lajur: 8. Kontrol (tanpa DNA)



Gambar 8. Hasil PCR DNA mikobakterium atipik menggunakan primer Pt8 & Pt9 dengan elektroforesis gel agarosa.

Lajur: 1. "Marker" Φ X174HaeIII
 Lajur: 2. DNA *M. chelonae* 100ng
 Lajur: 3. DNA *M. fortuitum* 100ng
 Lajur: 4. DNA *M. phlei* 100ng
 Lajur: 5. DNA *M. scrofulaceum* 100ng
 Lajur: 6. DNA *M. smegmatis* 100ng
 Lajur: 7. DNA *M. terrae* 100ng
 Lajur: 8. DNA *H₃₇Rv* 10ng (kontrol+)