

## DETEKSI MUTASI GEN *pncA* SEBAGAI PENYEBAB RESISTENSI *M. TUBERCULOSIS* TERHADAP PIRAZINAMID DENGAN TEKNIK PCR-SSCP DAN AUTORADIOGRAFI

Mukh Syaifudin, Sofiati Purnami dan Devita Tetriana

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, BATAN Jakarta, E-mail : dtetriana@batan.go.id

### ABSTRAK

DETEKSI MUTASI GEN *pncA* SEBAGAI PENYEBAB RESISTENSI *Mycobacterium tuberculosis* TERHADAP PIRAZINAMID DENGAN TEKNIK PCR-SSCP DAN AUTORADIOGRAFI. Resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat semakin memperberat upaya pengendalian penyakit tuberkulosis (TB) di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah menguji resistensi *M. tuberculosis* terhadap pirazinamid (PZA) dengan menganalisis mutasi tiga segmen gen *pncA*, yang mengkode enzim PZase sebagai target PZA, menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan *single strand conformation polymorphism* (SSCP) radioaktif. Perubahan mobilitas *deoxyribonucleic acid* (DNA) dari gen *pncA* yang dilabel dengan alfa <sup>32</sup>P-dCTP pada gel akrilamid ditelusuri dengan autoradiografi. Dengan menggunakan primer P1-P2 gen *pncA*, dari 117 sampel yang diuji, 60 diantaranya menunjukkan PCR positif dan 2 (3,33%) diantaranya diduga resisten PZA karena memiliki mutasi gen. Dengan primer yang lain (*pncA1*) diketahui bahwa dari 80 sampel yang dianalisis, 36 diantaranya PCR positif dan tidak ada sampel yang mengandung mutasi, sedangkan dengan primer *pncA2* telah dilakukan SSCP terhadap 20 sampel dan tidak ada yang menunjukkan resistensi. Kesimpulan yang dapat diambil adalah bahwa mutasi gen *pncA* dapat digunakan sebagai petunjuk resistensi *M. tuberculosis* terhadap PZA. Teknik deteksi molekuler ini sangat membantu pengobatan yang lebih efektif dan cepat serta dapat mendukung hasil diagnosa sehingga memperkecil risiko kematian penderita dan penularannya.

Kata Kunci: *M. tuberculosis*, pirazinamid, resistensi, mutasi, *pncA*, alfa <sup>32</sup>P dCTP, PCR, SSCP

### ABSTRACT

DETECTION OF *pncA* GENE MUTATION AS THE CAUSE OF RESISTANCE OF *M. tuberculosis* TO PYRAZINAMIDE WITH PCR-SSCP AND AUTORADIOGRAPHY TECHNIQUES. The resistance of *M. tuberculosis* to drugs has caused the controlling tuberculosis (TB) disease became heavier in Indonesia. Aim of this research was to determine the resistance of *M. tuberculosis* to PZA by analyzing mutation of three segments of *pncA* gene, encoding PZase enzyme as a target of PZA, with *polymerase chain reaction* (PCR) and radioactive *single strand conformation polymorphism* (SSCP) techniques. The alteration of mobility shift of *deoxyribonucleic acid* (DNA) labeled with alpha <sup>32</sup>P-dCTP on acrylamide gel was searched for by autoradiography. By using P1-P2 primers of *pncA* gene, from 117 samples tested, 60 of them were positive PCR and 2 (3.33%) among them were suspected resistant to PZA due to gene mutation. With other primer (*pncA1*) it was known that from 80 samples analyzed, 36 of them were positive PCR and no sample contained mutation, whereas with *pncA2* primer conducted in 20 samples, there was no resistant sample. The conclusion that can be drawn was that *pncA* gene mutation could be used as a surrogate of the resistance of *M. tuberculosis* to PZA. This molecular technique is very helpful in more effective and quick treatment and could supported diagnose outcomes so that minimize the risk of mortality of victims and its contagious.

Keywords: *M. tuberculosis*, pyrazinamide, resistance, *pncA*, mutation, alfa <sup>32</sup>P dCTP, PCR, SSCP

### LATAR BELAKANG

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit yang sangat kuno dan merupakan permasalahan kesehatan di dunia serta penyebab kematian utama di negara-negara berkembang. Menurut catatan WHO tahun 1998 bahwa Indonesia menempati urutan ketiga setelah India dan Cina dan merupakan penyakit yang “merakyat” sehingga perlu pengendalian antara lain dengan pemberian obat anti tuberkulosis (OAT). Usaha lain melawan penyakit ini adalah dengan sanatorium, kolaps paru, kemoterapi yang dimulai tahun 40-an<sup>[1]</sup>. Di

awal tahun 1990 TB kembali merebak di Indonesia dan merupakan penyebab kematian nomor dua setelah penyakit jantung dan pembuluh darah. Akan tetapi TB menduduki peringkat pertama penyebab kematian karena penyakit menular. Jumlah penderitanya kurang lebih 500.000 orang/tahun dengan kematian sekitar 175.000 orang/tahun atau satu orang setiap empat menit, khususnya di daerah kumuh<sup>[1,2]</sup>. Jika tidak ditangani dengan baik maka dalam tahun berikutnya akan terdapat 5,8 juta orang yang terkena infeksi dengan asumsi 1 orang dapat menularkan ke 10 orang lain.

Pyrazinamide (PZA) adalah obat lini pertama, suatu analog nikotinamida, yang digunakan untuk pengobatan TB jangka pendek dan dikombinasi dengan isoniazid dan rifampisin [3,4]. PZA adalah pro-obat yang akan terkonversi menjadi bentuk aktifnya yakni asam pirazinoat (POA) bakterisidal oleh pirazinamidase (PZase) yang diproduksi oleh *M. tuberculosis*. Karena fungsinya secara eksklusif di lingkungan asam (pH 5,0-5,5) dimana infeksi terjadi maka PZA dapat membunuh bakteri *M. tuberculosis* yang semi-dormant dan mungkin berada di dalam sel intraselular. PZA mampu mematikan basil semidormant yang bertahan di lingkungan pH-asam di dalam makrofag<sup>[3,5,6]</sup> dengan target suatu enzim yang terlibat dalam sintesis asam lemak. Sukseptibilitas (kerentanan) PZA biasanya ditentukan oleh pengamatan perkembangan *M. tuberculosis* di dalam medium mengandung PZA<sup>[7]</sup>. Akan tetapi, metode kultur konvensional memerlukan waktu hingga 3 bulan dan hasilnya berbeda antar laboratorium<sup>[8]</sup>. Sebagai alternatif, sukseptibilitas PZA ditentukan dengan mendeteksi aktivitas pyrazinamidase (PZase) dalam kultur *M. tuberculosis*<sup>[9-11]</sup> karena aktivitas PZase hilang dalam isolat yang resisten PZA<sup>[12]</sup>. Identifikasi gen *pncA* dari *M. tuberculosis*<sup>[13]</sup> yang mengkode PZase telah memberikan petunjuk dalam studi mekanisme resistensi PZA. Namun beberapa isolat yang resisten terhadap PZA tetap menunjukkan aktivitas PZase, sehingga diduga ada mekanisme resistensi yang lain<sup>[12]</sup>.

Penyakit TB merupakan penyakit yang sangat mudah menular, oleh karena itu akan lebih banyak orang berisiko tertular. Kendala paling utama yang memperberat usaha pemberantasan TB adalah resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat. Fenomena ini diyakini karena munculnya mutasi pada gen-gen yang mengkode protein yang menunjang aktivitas bakteri dan menjadi sasaran obat atau menon-aktifkan obat TB. Oleh karena itu perlu dilakukan usaha-usaha untuk menggunakan teknik yang akurat guna mendeteksi keberadaan bakteri yang resisten. Teknik konvensional seperti pengkulturan dapat digunakan untuk tujuan tersebut, namun perlu waktu lama dan tingkat akurasi rendah serta kurang spesifik sehingga perlu penerapan teknik yang cepat seperti biologi molekuler. Teknik biologi molekuler PCR dan SSCP yang mampu mengeksploitasi perubahan materi genetik penyebab resistensi obat dapat digunakan untuk diagnosa TB<sup>[13]</sup>.

Metode SSCP merupakan metode sederhana yang mudah diadaptasi pada teknik deteksi urutan basa dengan sekuensing. SSCP mengidentifikasi variasi mutasi dengan membedakan perubahan struktur sekunder produk

PCR untai tunggal dalam merespon perubahan deret nukleotida. Kelebihannya adalah bahwa teknik ini dapat diotomatisasi dengan akurasi dan sensitivitas yang tinggi. SSCP yang pertama kali diperkenalkan tahun 1986 terbukti bermanfaat untuk mendeteksi mutasi (SNP, *single nucleotide polymorphism*) baik untuk mendeteksi mutasi yang belum diketahui maupun untuk menskrining mutasi yang telah diketahui. Variasi deret dalam produk PCR seperti mutasi titik akan menghasilkan konformasi yang berbeda dan akibatnya merubah mobilitas elektroforetiknya. Dengan membandingkan mobilitas untai antar sampel maka variasi genomik dapat diidentifikasi<sup>[14]</sup>. Dalam makalah ini disajikan hasil uji resistensi bakteri *M. tuberculosis* dalam sputum yang diperoleh dari pasien terduga TB dan beberapa diantaranya menunjukkan resistensi terhadap PZA.

## BAHAN DAN TATA KERJA

### Sampel klinis

Sebanyak 117 sampel sputum diperoleh dari pasien diduga TB rawat jalan di Pusat Perkumpulan Pemberantasan Tuberkulosis Indonesia (PPTI) beralamat di Jl. Baladewa Jakarta Pusat. Dalam penelitian ini nomor sampel tidak berurutan dan mencapai nomor 150. Seluruh pasien diduga menderita TB berdasarkan hasil diagnosis basil tahan asam (BTA) positif dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen. Dari hasil diagnosis BTA diketahui bahwa sampel dikategorikan sebagai positif dua (++) dan positif tiga (+++). Sampel dari Puskesmas tidak diuji BTA karena keterbatasan sarana dan keahlian personil setempat.

### Ekstraksi DNA mikobakterium dari sampel sputum.

Isolasi DNA dari spesimen klinis dilakukan dengan prosedur seperti telah ditinjau sebelumnya<sup>[15]</sup>. Lima ratus mikroliter sputum dicampur dengan volume sama larutan *N*-acetyl L-cysteine NaOH-Na-sitrat dalam tabung mikrosentrifus steril, dikocok dengan *horizontal gyrotary shaker* selama 20 menit pada 420 rpm, kemudian disentrifus selama 10 menit pada 12.000 rpm. Setelah dicuci dengan akuades steril dua kali, pelet ditambahkan 100 µl larutan TE, 900 µl larutan pelisis dan 20 µl Diatom kemudian dikocok kembali dengan *shaker* selama 10 menit pada 100 rpm dan disentrifus selama 2 menit pada 12.000 rpm. Setelah dicuci 2 kali dengan buffer pencuci dan etanol 70% dingin dan satu kali dengan aseton, pelet dikeringkan pada 56°C. Ke dalam pelet, ditambahkan 50 µl larutan TE kemudian diinkubasi pada 56°C selama 10 menit. Setelah disentrifus, supernatannya digunakan untuk *template* PCR.

Seluruh prosedur inokulasi dan ekstraksi DNA dilakukan dalam *biological safety cabinet class II*.

### Primer untuk amplifikasi gen *pncA*

Gen *pncA* diamplifikasi dari masing-masing isolat *M. tuberculosis* menggunakan primer yang dibagi ke dalam P1-P2, *pncA1* dan *pncA2*. Primer oligonukleotida tersebut sama seperti ditinjau sebelumnya [13,15,16]. Primer-primer untuk P1-P2 tersebut meng-*annealing* dari 105 pasang basa (pb) *upstream* dari kodon *start* dan 110-91 pb *down-stream* dari kodon stop gen *pncA*. Ukuran produk PCR yang diharapkan adalah 558 pb. Sedangkan primer *pncA1* dan *pncA2* meng-*annealing* panjang total 730 pb yang meliputi *pncA1* mengamplifikasi 380 pb, mengandung daerah promotor *putative*, mulai dari 80 pb *upstream* kodon *start* dan berakhir pada kodon 90. Sedangkan *pncA2* mengamplifikasi 350 pb, mulai dari kodon *start* 84-70 dan *downstream* kodon *stop*.

### Amplifikasi DNA *M. tuberculosis* dengan primer P1-P2.

Sepasang primer oligonukleotida yang mengamplifikasi fragmen DNA dari gen *pncA* berukuran 342 bp dan spesifik untuk uji resistensi *M. tuberculosis* terhadap PZA yakni P1: 5'-GTC GGT CAT GTT CGC GAT CG-3'; dan P2: 5'-TCG GCC AGG TAG TCG CTG AT-3' [16] (Proligo, Singapura). Amplifikasi dilakukan dengan menambahkan 1-2 µl *template* DNA ke dalam campuran mengandung 1 U *Taq DNA polymerase*, 250 µM masing-masing deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, dan 1 mikrocurie [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP] (Perkin Elmer). Kontrol positif adalah DNA dari strain standard *M. tuberculosis* (H37Rv) yang diperoleh dari sumbangan WC Yam, *Department of Microbiology, Queen Mary Hospital, Faculty of Medicine, The University of Hong Kong* [17] dan kontrol negatif adalah akuabidest steril. Siklus amplifikasi dilakukan pada *automated thermal cycler* (Promega). Profil siklus meliputi denaturasi awal 95°C selama 5 menit diikuti 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 55°C selama 30 detik, dan ekstensi primer pada 72°C selama 45 detik, dilanjutkan dengan 1 siklus terdiri dari ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit. Pencampuran dan proses PCR dilakukan dengan peralatan proteksi yang memadai.

### Amplifikasi DNA *M. tuberculosis* dengan primer *pncA1* dan *pncA2* radioaktif.

Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan sama seperti di atas tetapi dengan menggunakan

primer oligonukleotidanya sbb : *pncA1-f* (5'-TCG GTC ATG TTC GCG ATC G-3') dan *pncA1-r* (5'-GAT TGC CGA CGT GTC CAG AC-3'), sedangkan *pncA2-f* (5'-GTC TGG ACA CGT CGG CAA TC-3') dan *pncA2-r* (5'-GCT TTG CGG CGA GCG CCT CCA-3') seperti ditinjau sebelumnya [13]. PCR dilakukan dalam tabung premix seperti di atas tetapi suhu *annealing*-nya adalah 63°C.

### Analisis mutasi gen dengan metode SSCP dan autoradiografi.

Dalam penelitian ini telah digunakan metode SSCP seperti dilakukan oleh Kim dkk [18] dan Syaifudin dkk [19,20] untuk melokalisir mutasi. Enam mikroliter produk PCR berlabel <sup>32</sup>P radioaktif dicampur dengan 2 µl SSCP *loading dye* dan 4 µl formamide 95% (Biorad) yang mengandung *denaturant urea* (Biorad). Sampel didenaturasi pada 95°C selama 4-5 menit, kemudian diletakkan diatas es selanjutnya di-load pada gel 0.5X *Mutation Detection Enhancement* (MDE) (BMA, Rockland, ME, USA). Elektroforesis dilakukan dengan sistem proteksi radiasi pada 50-51 V suhu kamar selama 5-7 jam. Setelah elektroforesis, gel MDE diambil dari plat kaca dengan menempelkan kertas penyaring Whatman, kemudian ditutup dengan plastik saran wrap dan selanjutnya gel diletakkan dalam kaset khusus (*cassette for autoradiography*, Fuji), diatasnya diletakkan film sinar-X (Kodak) kemudian disimpan pada suhu -80°C selama 24 jam - 2 hari. Film dicetak dengan menggunakan larutan developer dan fixer di dalam ruang gelap.

## HASIL PENELITIAN

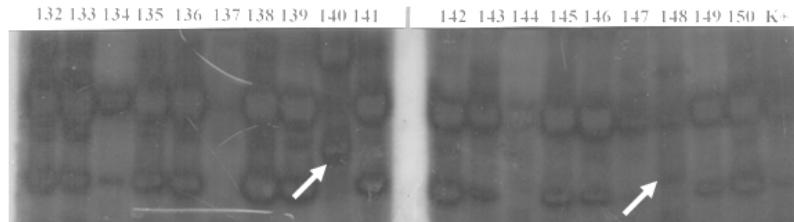
### Amplifikasi DNA *M. Tuberculosis* dengan PCR

Dalam penelitian ini resistensi pirazinamid dideteksi dengan menganalisis bagian gen *pncA* yang mengkode PZase dengan teknik PCR dan SSCP radioaktif dan non radioaktif. Untuk SSCP radioaktif, perubahan mobilitas DNA dari gen *pncA* yang dilabel dengan alfa <sup>32</sup>P-dCTP pada gel akrilamid ditelusuri dengan autoradiografi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan menggunakan primer P1-P2 dari gen *pncA*, dari 117 sampel yang diuji, 60 diantaranya menunjukkan hasil PCR positif (diperoleh segmen DNA yang diinginkan) (Gambar 1). Berdasarkan mobilitas pita DNA pada gel akrilamid, 2 (1,71%) sampel diantaranya berubah sehingga diduga memiliki mutasi gen *pncA* sebagai penyebab resistensi terhadap PZA. Dengan menggunakan primer *pncI* untuk gen yang sama diketahui bahwa dari 80 sampel yang dianalisis, 36 diantaranya PCR positif dan tidak ada sampel mengandung mutasi. Dengan menggunakan primer

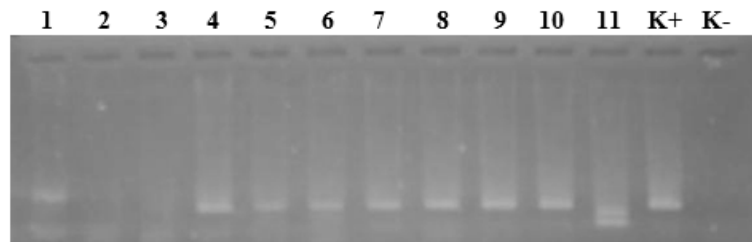
*pnC2*, telah dilakukan uji dengan PCR-SSCP terhadap 20 sampel dan diketahui tidak ada satu pun sampel yang menunjukkan resistensi terhadap PZA.

Dalam penelitian ini amplifikasi DNA dengan PCR juga dilakukan tanpa pelabelan isotopik (non radioaktif) dan hasilnya seperti ditunjukkan pada Gambar 2. Tampak bahwa untuk sampel nomor 2 dan 3 segment DNA yang diamplifikasi tidak terbentuk. Hasil-hasil analisis

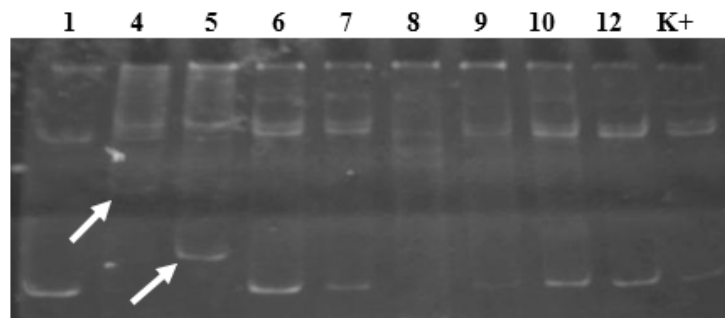
SSCP menggunakan DNA non isotopik disajikan dalam Gambar 3 dan diketahui bahwa sampel nomor 140 dan 148 menunjukkan perubahan mobilitas pita DNA berlabel isotop P-32 dibandingkan dengan pita DNA kontrol. Persentase resistensi sampel yang diuji dengan kedua metode tersebut sedikit berbeda (Tabel 1). Hal ini berarti bahwa sensitivitas deteksi dari metode radioaktif sedikit lebih tinggi daripada non radioaktif.



Gambar 1. Hasil analisis radioaktif resistensi *M. tuberculosis* terhadap PZA menggunakan primer P1P2. Tampak pita DNA sampel nomor 140 dan 148 diduga resisten karena berbeda dengan sampel lain dan kontrol.



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA *M. tuberculosis* dengan menggunakan PCR untuk gen *pnCA* primer PIP2. Sampel no. 11 memiliki pita non spesifik.



Gambar 3. Hasil analisis non radioaktif resistensi *M. tuberculosis* terhadap PZA menggunakan primer PIP2. Tampak mobilitas pita DNA sampel pada kolom ke 2 dan 3 diduga resisten karena berbeda dengan sampel lain dan kontrol (tanda panah).

Tabel 1. Persentase resistensi *M. tuberculosis* terhadap PZA berbasis PCR-SSCP untuk primer PIP2.

Metode SSCP	Jumlah sampel dianalisis	Jumlah sampel PCR/SSCP positif	Jumlah sampel Resistensi (%) *)
Non radioaktif	133	60	2 (3,33)
Radioaktif	117	60	2 (3,33)

\*) Persentase dari jumlah sampel yang menunjukkan PCR positif.

## PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini frekuensi mutasi gen *pncA* yang mengkode pyrazinamidase telah dilakukan pada isolat klinis DNA dari pasien terduga TB menggunakan teknik molekuler berbasis nuklir dan non nuklir. Sampel yang digunakan telah menjalani pemeriksaan BTA dan diketahui tidak ada hubungan antara hasil uji BTA dengan uji PCR, karena sebagai contoh untuk sampel dengan BTA +++ (positif tiga), hasil PCR menunjukkan pita DNA-nya terlihat tipis pada gel agarose atau bahkan negatif. Dalam penelitian ini digunakan dua teknik yaitu autoradiografi untuk DNA yang dilabel dengan P-32 dan teknik pewarnaan EtBr yang masing-masing memiliki keunggulan tersendiri. Terlihat tidak ada perbedaan persentase sampel yang resisten dari kedua teknik yang digunakan. Teknik autoradiografi diketahui lebih rumit karena berbagai faktor yang mempengaruhi seperti konsentrasi DNA, jumlah isotop yang digunakan untuk melabel, waktu pemajanan dalam kaset film, dan sistem proteksi radiasi yang memadai.

Tanpa memperhatikan jenis teknik yang digunakan untuk deteksi maka hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian lain. Dalam penelitian ini ditemukan 3,33% isolat resisten terhadap PZA, sedangkan penelitian Pujarwoto T<sup>[21]</sup> dan Sugiharto<sup>[22]</sup> menemukan 0,0% isolat resisten PZA. Aditama TY dkk.<sup>[23]</sup> dalam penelitiannya di RSUP Persahabatan (*WHO Collaboratory Centre for Tuberculosis*) pada tahun 1992 melaporkan resistensi *M. tuberculosis* terhadap pirazinamid adalah sangat rendah yaitu 0,04%. Hasil-hasil tersebut sangat jauh berbeda dengan penelitian oleh Harun S.<sup>[24]</sup> yang melaporkan bahwa dari 249 sampel positif mikroskopis BTA yang diuji, 187 diantaranya tumbuh pada biakan media Lowestein-Jessen (LJ) serta dapat dilakukan uji resistensi, dan diketahui bahwa 50,80% (95/187) sampel resisten terhadap Pirazinamida. Frekuensi atau persentase resistensi terhadap obat tertentu berbeda antara hasil penelitian satu dengan penelitian lain. Hal ini disebabkan oleh perbedaan sampel sputum yang bergantung pada letak geografis dimana sampel diperoleh, bahkan untuk suatu tempat tertentu di negara yang sama. Sebagai contoh frekuensi mutasi penyebab resistensi dapat mencapai hingga 50% pada isolat dari suatu daerah tetapi hanya sekitar 2% di daerah lain. Perbedaan persentase resistensi tersebut secara sederhana juga dapat disebabkan oleh perbedaan teknik deteksi dan faktor-faktor lain. Untuk deteksi resistensi dengan teknik biologi molekuler, perbedaan dapat disebabkan oleh gen atau primer oligonukleotida yang digunakan. Angka resistensi yang tinggi ini mungkin disebabkan oleh isolat yang diuji berasal

dari penderita yang pernah mendapat pengobatan (resistensi sekunder)<sup>[25]</sup>.

Metode analisis PCR-SSCP telah digunakan oleh banyak peneliti untuk uji resistensi obat. Sreevatsan dkk.<sup>[16]</sup> menggunakan gen *pncA* untuk menganalisis mutasi yang berhubungan dengan resistensi PZA dari kompleks *M. tuberculosis* yang resisten dan rentan (*susceptible*) terhadap PZA dari beberapa lokasi di dunia dengan menggunakan IS6110 *profiling*. Data yang diperoleh merupakan bukti bahwa sebagian besar resistensi *M. tuberculosis* disebabkan karena terjadinya mutasi sederhana yang terjadi dalam kromosom yang dikode oleh gen tersebut, sebagian lainnya melalui akuisisi gen resistensi oleh kejadian transfer horizontal. Di Jepang, Korea dan China, *pncA* ini juga merupakan gen sasaran untuk uji mutasinya untuk mengetahui resistensi *M. Tuberculosis* terhadap PZA<sup>[26-28]</sup>. Dengan menggunakan teknik *Denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE), Mc Cammon dkk.<sup>[29]</sup> juga menelusuri mutasi *pncA* yang berhubungan dengan resistensi *M. tuberculosis* terhadap PZA di daerah perbatasan Amerika Serikat dan Meksiko. Namun penelitian tersebut dilakukan terhadap sampel yang telah diketahui resistensinya secara konvensional dan atau dilakukan uji ulang dengan metode molekuler. Penelitian Miyagi dkk.<sup>[26]</sup> di Jepang menemukan bahwa dari 26 isolat yang resisten, 20 diantaranya memiliki mutasi gen *pncA* yang sebagian besar adalah perubahan deret asam amino primer. Studi ini juga menunjukkan bahwa mutasi *pncA* menyebabkan hilangnya aktivitas Pzase dan perlu dilakukan analisis lebih lanjut pada isolat yang resisten tanpa mutasi *pncA*. Penelitian Hou dkk.<sup>[28]</sup> di Beijing dan Taiyuan China yang dimaksudkan untuk mengetahui dasar-dasar molekuler dan karakterisasi mutasi gen *pncA*, menunjukkan tidak ada mutasi pada 243 isolat yang rentan (*susceptible*) dan diantara 35 isolat yang resisten, 32 (91,4%) diantaranya memiliki substitusi, insersi dan delesi nukleotida. IS6110 *subtyping* menunjukkan bahwa masing-masing strain adalah unik yang menunjukkan independensi epidemiologi isolat.

PZA adalah salah satu obat paling penting untuk mengobati infeksi *M. tuberculosis*. Akan tetapi bertambahnya jumlah strain bakteri yang resisten terhadap PZA membutuhkan obat penggantinya. Terlebih lagi sebagian besar strain yang menunjukkan resistensi terhadap PZA juga resisten terhadap isoniazid dan rifampin. Sehingga sangat penting untuk mengidentifikasi strain yang resisten terhadap obat secara cepat dan akurat untuk pengobatan TB yang efektif<sup>[13]</sup>. Pengobatan dengan PZA ini membuat waktu pengobatan menjadi lebih pendek (dari 12-18 bulan menjadi 6

bulan). Mekanisme kerja PZA adalah bahwa pirazinamidase berdifusi ke dalam *M. tuberculosis* dalam bentuk pasif dan karena sistem effluks yang tidak efisien maka akan berakumulasi dalam jumlah besar di dalam sitoplasma bakteri. Kerentanan (*susceptibility*) biasanya ditentukan dengan mengamati pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* dalam medium yang mengandung PZA untuk menentukan *minimum inhibitory concentration* (MIC). Cara lain adalah mendeteksi aktivitas PZase dalam kultur bakteri *M. tuberculosis*<sup>[11,12]</sup>. Pada isolat *M. tuberculosis* yang resisten biasanya aktivitas pirazinamidase hilang. Setelah kloning dan sekeusung gen yang mengkode pirazinamidase (*pncA*) diketahui bahwa 72-97% isolat klinis yang resisten ternyata memiliki mutasi dalam gen struktural atau dalam daerah promotor gen *pncA* ini. Akan tetapi mekanisme resistensi lain (yakni *uptake* pirazinamidase, regulasi *pncA*, atau efflux POA) terindikasi pada isolat yang menunjukkan resistensi tingkat tinggi tanpa mutasi gen *pncA*.

Mutasi genetik tunggal mungkin menyebabkan terjadinya resistensi tanpa perubahan patogenitas atau viabilitas dari suatu strain bakteri tertentu. Perkembangan resistensi terhadap obat-obat antituberkulos seperti PZA, merupakan contoh klasik dari perubahan tipe ini. Secara teoritis dimungkinkan untuk mengatasi resistensi dengan mengobati pasien menggunakan kombinasi antibiotik dalam dosis yang cukup untuk mengeradikasi infeksi sehingga mencegah penyebaran bakteri resisten ke orang lain. Namun, karena adanya kedaruratan yang meluas dari *multidrug resistant M. tuberculosis* maka tidak mudah untuk mengatasi resistensi dengan formula kombinasi yang baru. Kejadian mutasi mungkin juga mengubah mekanisme resistensi menjadi lebih efektif atau memberikan spektrum aktivitas yang lebih luas<sup>[13]</sup>.

Telah diketahui bahwa resistensi bakteri memperberat usaha pengendalian TB. Selain mutasi gen, mekanisme resistensi pada bakteri dapat disebabkan oleh penghambatan aktivitas obat secara enzimatik, perubahan protein yang merupakan target obat, perubahan jalur metabolik, effluks obat, perubahan pada *porin channel*, dan perubahan permeabilitas membran<sup>[30]</sup>. Resistensi multi-obat antituberkulos di seluruh dunia saat ini berada pada tingkat tertinggi. Menurut Badan Kesehatan Dunia (WHO), sekitar 500.000 kasus baru resistensi multi-obat tuberkulos terjadi setiap tahun di dunia. Di sisi lain, pendanaan global untuk mengatasi penyebaran penyakit itu masih terbatas. Hal ini berarti resistensi multi-obat anti-TB tersebut telah mencapai 5% dari 9 juta kasus baru penyakit TB di dunia. Hal ini berdasarkan survei pada 90.000 pasien TB di 81 negara. Survei ini juga

menemukan kasus resistensi obat TB secara ekstensif meskipun masih dalam skala terbatas. Tingkat resistensi multi-obat tertinggi ditemukan di Baku, ibu kota Azerbaijan yang mencapai 22,3 persen<sup>[31]</sup>.

## KESIMPULAN

Dalam penelitian ini diketahui bahwa dengan menggunakan primer P1-P2 dari gen *pncA*, dari 117 sampel yang diuji, 60 diantaranya menunjukkan PCR positif dan 2 diantaranya diduga memiliki mutasi. Dengan primer yang lain (*pncA1*) diketahui bahwa dari 80 sampel yang dianalisis, 36 diantaranya PCR positif dan tidak ada sampel mengandung mutasi, sedangkan dengan primer *pncA2* telah dilakukan SSCP terhadap 20 sampel dan tidak ada yang menunjukkan resisten terhadap PZA. Mutasi gen *pncA* dapat digunakan sebagai petunjuk resistensi *M. tuberculosis* terhadap pirazinamid. Teknik deteksi molekuler resistensi *M. tuberculosis* terhadap PZA ini sangat membantu pengobatan yang lebih efektif dan cepat serta dapat mendukung hasil diagnosa sehingga memperkecil risiko kematian penderita dan penularannya.

## DAFTAR PUSTAKA

1. ADITAMA, TY., Tuberkulosis kini, masa datang dan penanggulangannya, Seminar Nasional "Quality assurance programme for molecular-based diagnosis of Hepatitis C and tuberculosis", Jakarta 19 Juni 2003.
2. BASRI, C., Program nasional pemberantasan tuberkulosis, Seminar Nasional "Quality assurance programme for molecular-based diagnosis of Hepatitis C and tuberculosis", Jakarta 19 Juni 2003.
3. MITCHISON, D.A., The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy, *Tubercule*, 66, 219-225, 1985.
4. SNIDER, D.E., GRACZYK, J., BEK, E., and ROGOWSKI, J. 1984. Supervised six-months treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis using isoniazid, rifampin, and pyrazinamide with and without streptomycin, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 130, 1091-1094, 1984.
5. HEIFETS, L. and LINDHOLM-LEVY, P., Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semi-dormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 145, 1223-1225, 1992.
6. INDERLIED, C. B. and PFYFFER, G.B., Susceptibility test methods: mycobacteria, p. 1149-1177. In P. R. Muray, E. J. Baron, J. H.

- Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C, 2003.
7. SALFINGER, M. and HEIFETS, L.B. Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pHs by the radiometric method, *Antimicrob. Agents Chemother.* 7, 1002-1004, 1988.
  8. HEWLETT, D., JR., HORN, D.L. and ALFALLA, C. Drug-resistant tuberculosis: inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing, *JAMA*, 12, 916-917, 1995.
  9. MCCLATCHY, J.K., TSANG, A.Y. and CERNICH, M.S. Use of pyrazinamidase activity on *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility, *Antimicrob. Agents Chemother.* 4, 556-557, 1981.
  10. MILLER, M.A., THIBERT, L., DESJARDINS, F., SIDDIQI, S.H. and A. DASCAL, A., Growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by polyoxyethylene stearate present in the BACTEC pyrazinamide susceptibility test, *J. Clin. Microbiol.*, 34, 84-86, 1996.
  11. TRIVEDI, S.S., and DESAI, S.G., Pyrazinamidase activity of *Mycobacterium tuberculosis*—a test of sensitivity to pyrazinamide, *Tubercle*, 3, 221-224, 1987.
  12. ZHANG, Y., and MITCHISON, D., The curious characteristics of pyrazinamide: a review, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 1, 6-21, 2003.
  13. SCORPIO, A., and Y. ZHANG, M.Y., Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to antituberculous drug pyrazinamide in tubercule bacillus, *Nature Medicine*, 2, 662-667, 1996.
  14. BONNER, M.R. and BALLARD, L.W., Considerations in Adding Mutation Detection Services to a Sequencing Core Facility, *J Biomol Tech.*, 10, 177-186, 1999.
  15. BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E., and VAN DER NOORDAA, J., Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *J. Clin. Microbiol.* 28(3), 495-503, 1990.
  16. SREEVATSAN, S., PAN, X., ZHANG, Y., KREISWIRTH, B.N. and MUSSER, J.M., Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(3), 636-640, 1997.
  17. YAM, W.C, TAM, C.M., LEUNG, C. C., TONG, H. L., CHAN, K. H., LEUNG, E.T.Y., WONG, K.C., YEW, W.W., SETO, W.H., YUEN, K. Y., and HO, P.L., Direct detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens by PCR-DNA sequencing, *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (10), 4438-4443, 2004.
  18. 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, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2610-7, 2001.
  19. SYAIFUDIN, M. dkk, Identifikasi *M. tuberculosis* dengan PCR dupleks dan analisis resistensinya dengan SSCP radioaktif, Prosiding Presentasi Ilmiah Keselamatan Radiasi dan Lingkungan XI, Jakarta, 21 Desember 2005.
  20. SYAIFUDIN, M., MARIALINA, R. dkk, Implementasi teknik nuklir untuk analisis resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap rifampisin, Prosiding Pertemuan dan Presentasi Ilmiah Penelitian Dasar Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Nuklir, Yogyakarta, 10 Juli 2006.
  21. PUDJARWOTO, T., Pola resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat anti tuberculosis (OAT) di Jawa Barat, Research Report from JKPKBPPK, 2002.
  22. SUGIHARTO, Kegagalan pengobatan penderita tuberculosis paru dan resistensi *Mycobacterium tuberculosis* dalam uji kepekaan (Skripsi), 1991.
  23. ADITAMA, T.Y. CHAIRIL, A.S. dan HERRY, B.W., Resistensi primer dan sekunder mikobakterium tuberculosis, *Cermin Dunia Kedokteran*, 101, 48-49, 1995.
  24. HARUN, S., Pengembangan laboratorium tuberculosis untuk menentukan Multi Drug Resistance (MDR)TB berdasarkan standar WHO (<http://www.bmf.litbang.depkes.go.id/index.php?option=content&task=view&id=144&Itemid=53>).
  25. SYAIFUDIN, M., ROSILAWATI, M., IRAWAN, H. dan BELA, B., Identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* dan analisis mutasi gen *rpoB* dan *katG* penyebab resistensi ganda dengan teknik molekuler, Jurnal Kedokteran dan Farmasi MEDIKA, 2006.

26. MIYAGI, C., YAMANE, N., YOGESH, B., ANO, H., and TAKASHIMA, T., Genetic and phenotypic characterization of pyrazinamide-resistant mycobacterium tuberculosis complex isolates in Japan, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48(2), 111-116, 2004.
27. LEE, K.W, LEE, J.M. and JUNG, K.S., Characterization of pncA mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea, *J Korean Med Sci.*, 16, 537-43, 2001.
28. HOU, L., OSEI-HYIAMAN, D., ZHANG, Z., WANG, B., YANG, A. and KANO, K., Molecular characterization of pncA gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China, *Epidemiology and Infection*, 124, 227-232, 2000.
29. MCCAMMON, M.T., GILLETTE, J.S., THOMAS, D.P., RAMASWAMY, S.V., ROSAS, I.I., GRAVISS, E.A., VIJG, J. and QUITUGUA, T.N., Detection by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of pncA Mutations Associated with Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from the United States-Mexico Border Region, *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 June; 49(6): 2210–2217.
30. RINTISWATI, N., DWIANINGSIH, E.K., RAHMAN, A., ISWANTO, RIZAL, Y., dan SUMARDI, Resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap beberapa obat anti tuberculosis pilihan utama dan pilihan kedua di Laboratorium Mikrobiologi FK UGM Tahun 2000 – 2004, *Berkala Ilmu Kedokteran*, XXXVII(4), 2005.
31. WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Global tuberculosis control: surveillance,*

*planning, financing*, WHO Report 2005, Geneva (WHO/HTM/TB/2005.349).

---

## TANYA JAWAB

### Pujadi

- Sampel 117 orang apakah sudah diduga PCR positif?
- Kalau dari 117 sampel/pasien didapat 60 yang positif, seolah-olah 50% yang terkena TBC, sebenarnya berapa % rakyat kita yang positif?

### Mukh. Syaifudin

- 117 orang adalah pasien penderita TB dari PPTI Baladewa. PCR dilakukan untuk gen pncA saja.
- 60 yang positif adalah yang positif gen pncA; yang negatif bukan berarti tidak menderita TB tetapi tidak terdeteksi gen pncA.

### Sukirno

- Dari 117 sampel, diantara 60 PCR dan 2 dimiliki mutasi apakah maksudnya? Dan dari 117 sampel lainnya kemana?

### Mukh. Syaifudin

- 117 sampel adalah 117 sputum dari penderita TB di PPTI Baladewa, 60 PCR positif maksudnya 60 sampel positif gen pncA dan 2 orang diduga terjadi mutasi pada gen pncA. Sisanya tidak positif gen pncA.