

Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dan resistensinya terhadap rifampisin dengan metode *nested polymerase chain reaction* (PCR) dan *sequencing*

Maria Lina Rosilawati*

ABSTRAK

LATAR BELAKANG

DNA *rpoβ* (*RNA polymerase sub unit β*) *Mycobacterium tuberculosis* dapat diamplifikasi secara spesifik dengan metode *nested polymerase chain reaction* (PCR). *Nested* PCR yang dilanjutkan dengan *sequencing* dapat secara langsung diaplikasikan untuk mendeteksi *M. tuberculosis* dan menentukan mutasi pada gen *rpoβ* yang berkaitan dengan resistensinya terhadap rifampisin, pada isolat klinis maupun sampel sputum.

METODE

Dalam penelitian ini digunakan 20 isolat klinis dan 30 sampel sputum yang diamplifikasi dengan primer yang dirancang dari bagian gen *rpoβ* *M. tuberculosis*. Metode fenol-kloroform dan metode Boom masing-masing digunakan untuk ekstraksi DNA isolat klinis dan sampel sputum. *Sequencing* hanya dilakukan untuk hasil PCR dari sampel sputum.

HASIL

Dari 20 isolat klinis, 15 isolat positif terdeteksi sebagai *M. tuberculosis* dengan *nested* PCR, 4 isolat tergolong *Mycobacteria other than tuberculosis* (MOTT) dan 1 isolat *non-Mycobacteria*. Hasil *nested* PCR pada 30 sampel sputum dengan 25 sampel basil tahan asam (BTA) positif dan 5 sampel BTA negatif, menunjukkan hasil positif pada 21 sampel. Besarnya produk *first-round* dan *second-round* PCR masing-masing adalah 205 bp dan 157 bp.

KESIMPULAN

Nested PCR dengan *sequencing* lebih sensitif dan spesifik dalam mendeteksi *M. tuberculosis* dan resistensinya terhadap rifampisin.

Kata kunci : *Mycobacterium tuberculosis*, DNA *rpoβ*, *nested* PCR, *sequencing*

*Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), Jakarta

Korespondensi

Dra. Maria Lina Rosilawati,
M.Biomed
Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN)
Jl. Cinere Pasar Jumat
PO BOX 7002 - JKSKL
Jakarta 12070
Email:
marialinarosilawati@yahoo.com

Universa Medicina 2007; 26: 1-10.

Detection and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* on rifampicin using nested polymerase chain reaction and sequencing method

Maria Lina Rosilawati*

ABSTRACT

*Center for the Application of Isotopes and Radiances Technology, Jakarta

Correspondence

Dra. Maria Lina Rosilawati,
M.Biomed

*Center for the Application of Isotopes and Radiances Technology, Jakarta
Jl. Cinere Pasar Jumat
PO BOX 7002 - JKS KL
Jakarta 12070

Email:
marialinarosilawati@yahoo.com

Universa Medicina 2007; 26: 1-10.

BACKGROUND

*The rpoβ (RNA polymerase sub unit β) DNA of *Mycobacterium tuberculosis* can be specifically amplified by using a nested PCR. The nested PCR linked to DNA sequencing was applied directly to detect *M. tuberculosis* and determine the rpoβ gene mutation related with the rifampicin resistance either in clinical isolates or sputa.*

METHODS

*Samples used in this research were 20 clinical isolates and 30 sputa which were amplified with the region of rpoβ DNA of *M. tuberculosis*. DNA of clinical isolates and sputum samples were extracted by means of fenol-kloroform and Boom's methods, respectively. Sequencing method was only applied for sputum samples.*

RESULTS

*Of 20 clinical isolates, 15 isolates were positive for *M. tuberculosis* with nested PCR, 4 isolates were *Mycobacteria* other than *tuberculosis* (MOTT) and 1 isolate was non-*Mycobacteria*. The nested PCR could detect 21 sputum samples of 30 samples consisted of 25 samples with positive acid fast bacilli (AFB) and 5 samples with negative AFB. First-round and second-round PCR products were 205 bp and 157 bp, respectively.*

CONCLUSION

*Nested PCR in the sequencing was more sensitive and specific to detect *M. tuberculosis* and its resistance to rifampicin.*

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis, rpoβ DNA, nested PCR, sequencing*

PENDAHULUAN

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

Annual report on global TB control 2003, WHO menyatakan ada 22 negara dikategorikan sebagai *high-burden countries* terhadap TBC. Indonesia termasuk peringkat ketiga tertinggi jumlah kasus TBC di dunia setelah India dan China.⁽³⁾

Berdasarkan hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001,⁽⁴⁾ TBC menduduki peringkat ketiga sebagai penyebab kematian (9,4% dari total kematian), setelah penyakit kardiovaskular dan sistem pernafasan. WHO memperkirakan 583.000 kasus baru tuberkulosis terjadi di Indonesia setiap tahun

dan 140.000 mengakibatkan kematian.⁽⁵⁾ Estimasi prevalensi TBC di Indonesia berdasarkan pemeriksaan mikroskopik BTA positif sebesar 148,5 per 100.000 orang.⁽⁶⁾ Program pemberantasan tuberkulosis menjadi lebih rumit akibat munculnya kuman penyebabnya yang resisten terhadap obat anti tuberkulosis (OAT) disebabkan penggunaan obat yang tidak tepat baik dosis maupun lamanya.

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

Pengembangan metode PCR untuk deteksi *M. tuberculosis* telah mulai dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan sensitivitas yaitu dengan *nested* PCR. Metode tersebut menggunakan dua pasang primer dari bagian yang *conserved* dari genom bakteri tersebut.^(12,13)

Nested PCR dapat dikaitkan dengan metode lain seperti *nested* PCR-SSCP⁽¹⁴⁾ *nested* PCR *reverse hybridization*⁽¹⁵⁾ dan *nested* PCR *sequencing*.⁽¹⁶⁾ Metode tersebut dapat mendeteksi tidak hanya keberadaan *M. tuberculosis* dalam spesimen klinis akan tetapi juga dapat menentukan resistensinya terhadap OAT, berdasarkan adanya mutasi gen penyandi sasaran OAT pada *M. tuberculosis* seperti gen *rpoβ* untuk rifampisin.

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

BAHAN DAN CARA

Sampel penelitian

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

Homogenisasi dan ekstraksi DNA sputum

Isolat klinis yang tumbuh dalam media Lowenstein Jensen diekstraksi DNANYa dengan memanen isolat bakteri tersebut dengan cara menambahkan larutan NaCl 0,9%. Ekstraksi DNA dilakukan dengan cara seperti telah dilaporkan sebelumnya,⁽¹⁷⁾ yaitu dengan melisis

sel bakteri yang telah dipanen, dengan larutan TE (Tris-EDTA) 1 x, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) dan proteinase-K, kemudian ditambahkan larutan fenol-kloroform-isoamil alkohol (24:1). Presipitasi DNA dilaksanakan dengan menambahkan etanol dan sentrifugasi dengan kecepatan tinggi. Untuk proses PCR, pelet DNA yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan larutan buffer TE satu kali.

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

Proses PCR dan elektroforesis

Amplifikasi DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan *nested* PCR dan dilaksanakan di *Departement of Microbiology, Seoul National University College of Medicine, Seoul Korea*. Primer yang digunakan adalah TB1 (5'-ACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGT-3') dan TB2 (5'-TGCACGTCGCGGACCTCCAGCCCGGCA-3') sebagai *outer primer* sedangkan sebagai *inner primer* TB3 (5'-TCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTC-3') dan TR8 (5'-TGCACG TCG CGGACC TCCA-3'). Pada proses *nested* PCR digunakan campuran pereaksi yang sudah dikemas dalam tabung PCR (*Accu Power PCR Premix; Bioneer, Daejon,*

Korea) yang terdiri dari 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 40 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 250 μM dNTP, 1U *Taq* DNA polymerase dan *gel loading dye*. Konsentrasi akhir *outer primer* dan *inner primer* masing-masing 20 pmol dan 0,5 pmol. DNA target, ditambahkan dalam campuran tersebut (1 tabung untuk 1 reaksi) sehingga volume menjadi 20 μl. Program pada *1st round* PCR dari *nested* PCR meliputi 1 siklus denaturasi awal, yaitu pada 94°C, 5 menit; 15 siklus dengan tiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C, 30 detik, *annealing* 82°C, 30 detik, *extension*, 82°C, 30 detik. Program ini langsung dilanjutkan dengan *2nd round* PCR dengan 30 siklus dari denaturasi pada 94°C, 30 detik; *annealing*, 72°C, 30 detik, *extension* 72°C, 30 detik, dan tahap akhir adalah *extended extension* pada 72°C, 5 menit. Hasil *nested* PCR dideteksi dengan teknik elektroforesis gel agarosa (1,5%). Visualisasi DNA dilakukan dengan *UV transilluminator* setelah gel diwarnai dalam larutan etidium bromida.

Sequencing produk PCR

Sequencing dilakukan hanya untuk 20 sampel sputum serta *M. tuberculosis* H₃₇Rv hasil *nested* PCR. Persiapan untuk *sequencing* dilakukan dengan memotong masing-masing DNA sampel pada gel agarosa, yang dipurifikasi dengan *QIAEX II Agarose Gel Extraction*. Hasil purifikasi kemudian *sequencing* dengan menggunakan *inner primer* TR8. dan dilaksanakan oleh *Department of DNA Sequencing, Macrogen Company, Seoul, Korea*.

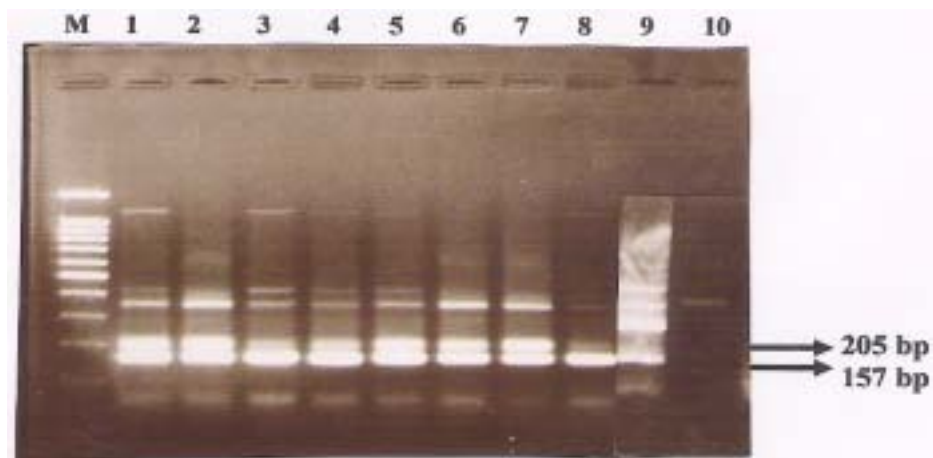
HASIL

Nested PCR dalam penelitian ini telah mengamplifikasi DNA *rpoβ* *M. tuberculosis*. Produk amplifikasi pada *first-round* PCR menggunakan primer TB1 dan TB2 menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 205 bp, sedangkan fragmen ukuran 157 bp

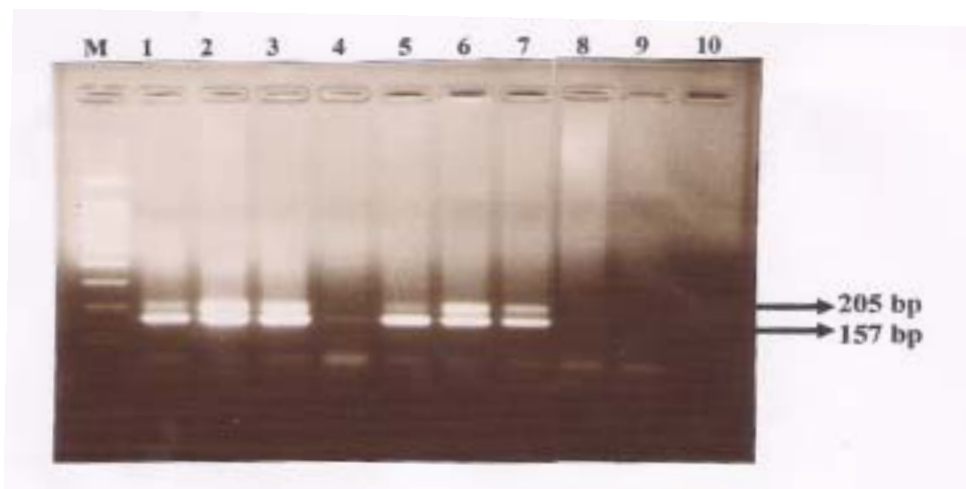
merupakan produk PCR dengan primer TB3 dan TR8 pada *second-round* PCR (Gambar 1 dan 2). Hasil positif dari *nested* PCR yaitu terdapatnya fragmen DNA 205 bp atau 157 bp menunjukkan adanya *M. tuberculosis*.

Hasil *nested* PCR isolat klinis dan sampel sputum beserta hasil BTA-nya dapat dilihat pada

Tabel 1. Dari 20 isolat klinis, 5 isolat menunjukkan hasil negatif yaitu tidak terlihat fragmen DNA baik fragmen 205 bp maupun 157 bp pada gel agarosa. Isolat tersebut adalah R10 (Gambar 1, lajur 10) dan Z4, Z9, Z10, Z11 (Gambar 2, lajur 4, 8, 9, 10). Jadi isolat tersebut bukan *M. tuberculosis*.



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



Gambar 2. Hasil amplifikasi bagian gen *rpoβ* isolat klinis *M. tuberculosis* dengan *nested* PCR dalam gel agarosa 1,5%. Lajur M: *Marker DNA 100 bp ladder*; Lajur 1-5 : Isolat klinis Z1-Z5; Lajur 6: Isolat klinis Z7; Lajur 7- 10: Isolat klinis Z8-Z11

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

Kode sampel	Hasil BTA	Hasil <i>nested PCR</i> (157bp)
R1		
R2		+
R3		+
R4		+
R5		+
R6		+
R7		+
R8		+
R9		+
R10		-
Z1		+
Z2		+
Z3		+
Z4		-
Z5		+
Z7		+
Z8		+
Z9		-
Z10		-
Z11		-
S51	+1	+
S52	+2	+
S53	+2	+
S54	+1	-
S55	+1	+
S56	+1	-
S60	+1	-
S61	+3	+
S62	+3	+
S63	+1	+
S64	+1	+
S65	+2	-
S68	+1	-
S70	+1	+
S72	+1	+
S76	+1	+
S78	+1	+
S79	+1	-
S80	+2	+
S81	+2	-
S90	-	+(tipis)
S91	-	+
S92	-	-
S94	-	+(tipis)
S95	+1	+
S97	+1	+
S99	+2	-
S100	-	+(tipis)
S101	+3	+
S102	+2	+

*) Keterangan : + Pita DNA terlihat jelas; + tipis : Pita DNA terlihat tipis; Sampel no. 1-20 : Isolat klinik; Sampel no. 21 – 40, no. 45- 47 dan 49 – 50 : Sputum BTA positif; Sampel no. 41 – 44 dan 48 : Sputum BTA negatif

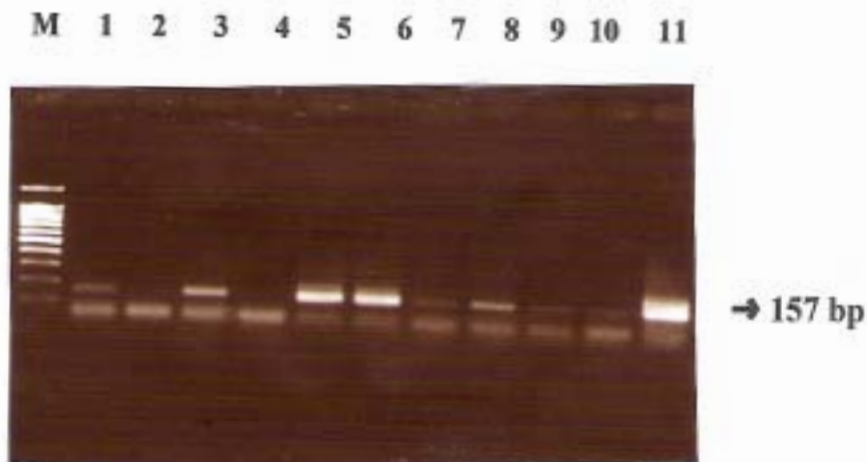
Pada Tabel 1 terlihat hasil *second round PCR* dari 30 sampel sputum, 21 sampel menunjukkan hasil positif mengandung *M. tuberculosis* yaitu terdapatnya fragmen 157 bp dan sebaliknya 9 sampel negatif (Gambar 3). Dari hasil pemeriksaan secara mikroskopik pada 9 sampel tersebut, 8 sampel menunjukkan hasil BTA +1 sampai dengan +2. Tabel 1 juga memperlihatkan hasil positif *nested PCR* pada 4 sampel dari 5 sampel sputum dengan BTA negatif.

Hasil *nested PCR* yang dilanjutkan dengan *sequencing* fragmen 157 bp dari gen *rpoβ* dalam penelitian ini dilakukan hanya pada 20 *strain M. tuberculosis* dari sampel sputum dan *M. tuberculosis H₃₇Rv* sebagai *strain* standar. Dari 20 *strain M. tuberculosis* tersebut, hanya 8 sampel dan *M. tuberculosis H₃₇Rv* yang dapat diinterpretasikan hasil *sequencing* sedangkan *strain M. tuberculosis* yang lain tidak dapat diinterpretasikan.

Berdasarkan hasil *sequencing*, *strain* standar dan 8 *strain M. tuberculosis* dari sampel sputum ternyata tidak terjadi mutasi. *Strain*2 tersebut kemungkinan besar masih sensitif terhadap rifampisin.

PEMBAHASAN

Nested PCR isolat klinis menunjukkan hasil negatif pada 5 isolat dan diperkirakan kelima isolat adalah *Mycobacteria* bukan *M. tuberculosis (Mycobacteria other than tuberculosis / MOTT)* atau bukan *Mycobacteria (non-Mycobacteria)*. DNA *rpoβ* MOTT atau *non-Mycobacteria* tidak teramplifikasi pada *first round nested PCR* dengan primer yang sama pada suhu *annealing* yang tinggi.⁽¹⁵⁾ Fragmen DNA *rpoβ* berukuran 342 bp dapat diamplifikasi dengan menggunakan primer MF & MR dari 44 *strain* acuan (*reference strain*) *Mycobacteria*, akan tetapi tidak ada amplifikasi pada DNA *non-Mycobacteria*.⁽¹⁹⁾



Gambar 3. Hasil amplifikasi bagian gen *rpoβ* *M. tuberculosis* dari sputum dengan *nested PCR* dalam gel agarosa 1,5%. Lajur M: *Marker DNA 100 bp ladder* ; Lajur 1: Sampel sputum (S61); Lajur 2: Sampel sputum (S81); Lajur 3: Sampel sputum (S97) ; Lajur 4: Sampel sputum (S99); Lajur 5: Sampel sputum (S101); Lajur 6: Sample sputum (S102); Lajur 7: Sampel sputum (S90); Lajur 8: Sampel sputum (S91); Lajur 9: Sampel sputum (S94); Lajur10: Sampel sputum (S100); Lajur 11: *M. tuberculosis* H37 Rv (kontrol positif)

Oleh karenanya, untuk mengetahui apakah kelima isolat tersebut di atas tergolong dalam *Mycobacteria* atau *non-Mycobacteria*, dilakukan juga amplifikasi dengan primer MF & MR. Isolat 10R ternyata *non-Mycobacteria* karena tidak ada fragmen DNA 342 bp sebagai hasil amplifikasi, sedangkan 4 isolat lainnya (Z4, Z9, Z10, Z11) mempunyai fragmen tersebut, menunjukkan isolat tersebut tergolong dalam genus *Mycobacteria*. Untuk konfirmasi 4 isolat tersebut adalah *Mycobacteria*, hasil amplifikasinya direstriksi dengan enzim HindII. Fragmen DNA 342 bp tidak terestriksi (data tidak diperlihatkan) yang menunjukkan 4 isolat tersebut adalah MOTT. Restriksi produk PCR dengan primer MF-MR dengan enzim HindII, dapat membedakan antara *M. tuberculosis* kompleks dan MOTT yaitu 2 fragmen (232 bp, 110 bp) merupakan hasil restriksi *M. tuberculosis* kompleks, sedangkan untuk MOTT tidak direstriksi (342 bp).⁽²⁰⁾ Dari hasil penelitian Kim *et al*,⁽¹⁵⁾ menunjukkan amplifikasi dengan

first round-nested PCR menggunakan primer TB1 dan TB2 pada 48 isolat klinis memberikan hasil positif hanya pada 20 isolat sedangkan 28 isolat yang lain hasilnya negatif. Hasil ini sesuai dengan hasil identifikasi dengan tes biokimia dan *sequencing* yaitu 20 isolat adalah *M. tuberculosis* dan 28 isolat adalah MOTT. Amplifikasi juga tidak terjadi pada 19 *strain* acuan *Mycobacteria* dan 9 *strain non-Mycobacteria*. Produk PCR 322 bp pada *nested PCR* dengan primer yang mengamplifikasi daerah gen yang menyandi protein 38-kDa (protein antigen b) *M. tuberculosis*, hanya dapat mendeteksi *M. tuberculosis* kompleks dan tidak pada 10 *strain* acuan MOTT.⁽¹³⁾ Hasil deteksi 5 isolat klinis dalam penelitian ini secara konvensional dengan kultur memberikan hasil positif, sedangkan dengan *nested PCR* negatif. Hal ini menunjukkan *nested PCR* lebih spesifik dibanding dengan kultur.

Pada sampel sputum dengan BTA + tetapi hasil *nested PCR*-nya negatif kemungkinan ini

bukan terinfeksi *M. tuberculosis* akan tetapi infeksi oleh MOTT. Identifikasi *Mycobacteria* secara mikroskopik langsung dari sputum kurang sensitif dan apabila hasilnya positif, pemeriksaan tersebut tidak dapat mengidentifikasi species *Mycobacteria* yang menunjukkan metode tersebut juga kurang spesifik.^(7,8,21) Hal ini juga terlihat pada hasil *nested* PCR yang positif pada sampel sputum tetapi hasil BTA negatif. Penelitian Cheng *et al*⁽²²⁾ menunjukkan hasil pemeriksaan mikroskopik dari 144 spesimen *pulmonary* dan *extrapulmonary* dari pasien dengan diagnosis klinis infeksi *M. tuberculosis*, hanya 25% positif pada pemeriksaan BTA-nya sedangkan 80% hasil positif diperoleh dengan metode PCR. Pendapat umum menyatakan pasien dengan BTA negatif tidak berperan secara nyata menyebarkan infeksi akan tetapi dari hasil penelitian Behr *et al* yang dikutip oleh Garcia-Quintanilla *et al*,⁽²³⁾ diperoleh 27% kasus TB di San Francisco, California ditransmisi dari kasus dengan BTA negatif.

Hasil *sequencing* produk *nested* PCR yaitu untuk mengetahui adanya mutasi pada gen *rpoβ* dari 20 *strain M. tuberculosis* dari sampel sputum hanya 8 *strain* yang dapat diinterpretasikan. Kemungkinan yang menyebabkan tidak diperolehnya DNA yang murni untuk proses *sequencing* saat dipurifikasi pada 12 *strain* dari sampel sputum tersebut, disebabkan terdapatnya DNA hasil PCR yang *multiband* pada gel agarosa. Mutasi tidak terjadi pada 8 *strain*, kemungkinan besar *strain* tersebut masih sensitif terhadap rifampisin atau mutasi terjadi di luar daerah 81 bp gen *rpoβ*. Menurut Heep *et al* yang dikutip oleh Sajduda *et al*.⁽²⁴⁾ Mutasi yang berkaitan dengan resistensi terhadap rifampisin dapat terjadi di luar daerah 81 bp gen *rpoβ*, meskipun hal ini jarang sekali terjadi. Dasar dari resistensi *strain M. tuberculosis* terhadap rifampisin adalah adanya mutasi pada gen *rpoβ*. Beberapa peneliti menyatakan lebih dari 95% *strain M. tuberculosis* resisten rifampisin

disebabkan adanya mutasi pada bagian DNA 81 bp dari gen *rpoβ* yang menyandi RNA *polymerase sub unit β*.^(1,25,26)

Pada umumnya deteksi *M. tuberculosis* dengan *nested* PCR digunakan untuk meningkatkan sensitivitas dengan menggunakan beberapa macam primer yang dirancang dari bagian gen atau sekuens sisipan (IS) *M. tuberculosis* yang *conserved*. Beberapa primer digunakan untuk *nested* PCR seperti bagian gen yang menyandi antigen protein 65 kDa,⁽⁷⁾ antigen protein b 38 kDa,⁽¹³⁾ MPB64 (*major secreted protein specific to M. tuberculosis complex*)⁽¹⁴⁾ dan IS6110.⁽²⁷⁾

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

KESIMPULAN

Nested PCR lebih spesifik dari kultur dalam mendeteksi *M. tuberculosis*. *Nested* PCR lebih sensitif dan spesifik dibanding dengan pemeriksaan mikroskopik untuk mendeteksi *M. tuberculosis*. *Nested* PCR dengan menggunakan primer yang dirancang dari bagian gen *rpoβ M. tuberculosis* merupakan metode yang cepat, sensitif dan spesifik untuk mendeteksi *M. tuberculosis* dan resistensinya terhadap rifampisin pada isolat klinis maupun langsung spesimen klinis seperti sputum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada *International Atomic Energy Agency* (IAEA) atas bantuan dana melalui program *Technical Cooperation* (TC), kepada Prof. Yoon-Hoh Kook, MD. Ph.D., *Department of Microbiology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*, atas ijin dan fasilitas laboratorium

untuk pelaksanaan penelitian ini, dan kepada Sdr. Rika Heryani dan Almaida atas bantuannya dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ, Jin RL, et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5477-82.
2. Alamsyah B. Epidemiologi genetic serta faktor resiko *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten inh dan atau rifampisin [disertasi]. Jakarta: Program Doktor Ilmu Kesehatan Masyarakat, Program Pascasarjana, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia; 2003.
3. World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO Report: Surveillance, Planning, Financing. Geneva: World Health Organization; 2004.
4. Departemen Kesehatan RI. Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT). Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2001.
5. Direktorat Jendral Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman Departemen Kesehatan RI. Pedoman Pemberantasan Tuberkulosis Paru. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2000.
6. Tim Surkesnas Badan Litbang Departemen Kesehatan RI. Survei Prevalensi Tuberkulosis Indonesia tahun 2004. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2005.
7. Heifets LB, Barnes PF. Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis, pathogenesis, protection, and control. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994. p. 85-110.
8. Sjobring U, Mecklenburg M, Andersen AB, Miorner H. Polymerase chain for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2200-4.
9. Fukushima M, Kakinuma K, Hayashi H, Nagai H, Ito K, Kawaguchi R. Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2605-15.
10. Barouni AS, Saridakis HO, Vidotto MC. Detection of *Mycobacterium* in clinical samples by multiprimer polymerase chain reaction. *Braz J Microbiol* 2004; 35: 1-2.
11. Kox LFF, Rhienthong D, Medo Miranda A, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 672-8.
12. Wang JY, Lee LN, Chou CS, Huang CY, Wang SK, Lai HC, et al. Performance assessment of a nested PCR assay (the RAPID BAP-MTB) and the BD ProbeTec ET system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4599-603.
13. Martins LC, Paschoal IA, Nowakonski AV, Silva SAB, Costa FF, Ward LS. Nested PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33: 1-7.
14. Kim BJ, Lee KH, Park BN, Kim SJ, Park EM, Park YG, et al. Detection of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputa by nested PCR linked single strand conformation polymorphism and DNA sequencing. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2610-7.
15. Paluch-Oles J. Application of nested and reverse hybridization for diagnosis of central nervous system tuberculosis (abstract). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease; 2004 May 1-4; Prague/Czech Republic.
16. Lorino G, Lilli D, Rivanera D, Guarino P, Angeletti S, Gherardi G, et al. Polymerase chain reaction, with sequencing, as a diagnostic tool in culture negative bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 92-6.
17. Rosilawati ML, Sudarmono P, Ibrahim F. Sensitivitas metode PCR (Polymerase Chain Reaction) dalam mendeteksi isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis*. *J Kedokteran Trisakti* 2002; 21: 7-14.
18. Kolk AHJ, Kox LFF, van Leeuwen J, Kuijper S. Polymerase chain reaction for the *M. tuberculosis* complex. Amsterdam, The Netherland: Laboratory of Tropical Hygiene, Department of Biomedical Research Royal Tropical Institute; 1995. p. 1-35.
19. Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Kim SJ, et al. Identification of *Mycobacterium* species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1714-20.
20. Kim BJ, Lee KH, Park BN, Kim SJ, Bai GH, Kim JK, et al. Differentiation of *Mycobacterium* species by PCR restriction analysis of DNA (342 base pairs)

- of RNA polymerase gene (*rpoβ*). *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2102-9.
21. Magdalena J, Vachee A, Supply P, Locht C. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 937-43.
 22. Cheng VCC, Yam WC, Hung IFN, Woo PCY, Lau SKP, Tang BSF, et al. Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 281-5.
 23. Garcia-Quintanilla A, Garcia L, Tundo G, Navarro M, Gonzalez J, Jimenez de Anta MT. Single tube balanced heminested PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1166-9.
 24. Sajduda A, Brzostek A, Poplawska M, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Niemann S, et al. Molecular characterization of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2425-31.
 25. Aragon LM, Navarro F, Heiser V, Garrigo M, Espanol M, Coll P. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 825-31.
 26. Yuen LKW, Leslie D, Coloe PJ. Bacteriological and molecular analysis of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3844-50.
 27. Whelen AC, Felmlee TA, Hunt JM, Williams DL, Roberts CD, Stockman L, et al. Direct genotyping detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampicin resistance in clinical specimens by using single-tube heminested PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 556-61.