

INDONESIAN JOURNAL OF
**Clinical Pathology and
Medical Laboratory**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

IJCP & ML (Maj. Pat. Klin. Indonesia & Lab. Med.)	Vol. 16	No. 2	Hal. 55-104	Surabaya Maret 2010	ISSN 0854-4263
---	---------	-------	-------------	------------------------	-------------------

Diterbitkan oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Published by Indonesian Association of Clinical Pathologists

Terakreditasi No: 43/DIKTI/Kep/2008, Tanggal 8 Juli 2008

INDONESIAN JOURNAL OF
**CLINICAL PATHOLOGY AND
MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

**SUSUNAN PENGELOLA MAJALAH INDONESIAN JOURNAL OF
CLINICAL PATHOLOGY AND MEDICAL LABORATORY**

Pelindung (Patron)

Ketua Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Penasehat (Advisor)

Prof. Hardjoeno, dr., Sp.PK(K)
Prof. Siti Budina Kresna, dr, Sp.PK(K)
Dr. R. Darmawan Setijanto, drg, M.Kes

Penelaah Ahli/Mitra Bestari (Editorial Board)

Prof. Dr. Indro Handoko, dr, Sp.PK(K)
Prof. Dr. J B Soeparyatmo, dr, Sp.PK(K)
Prof. Riadi Wirawan, dr, Sp.PK(K)
Prof. Dr. A A G Sudewa, dr, Sp.PK(K)
Prof. Tiki Pang, PhD
Prof. Marzuki Suryaatmadja, dr, Sp.PK(K)
Prof. Dr. Rustadi Sosrosumihardjo, dr, DMM, MS, Sp.PK(K)
Prof. Dr. Adi Prijana, dr, Sp.PK
Prof. Rahayuningsih Dharma, dr, Sp.PK(K), DSc

Penyunting Pelaksana (Managing Editors)

Prof. Dr. Prihatini, dr, Sp.PK(K), Prof. Adi Koesoema Aman, dr, Sp.PK(K), Yuli Kumalawati, dr, DMM, Sp.PK(K),
Lia Gardenia Partakusuma, dr, Sp.PK(K), MM; Dr. Ida Parwati, dr, Sp.PK(K), PhD; Dr. FM Yudayana, dr, Sp.PK(K),
Prof. Dr. Krisnowati, drg, Sp.Pros, Tahono, dr, Sp.PK(K), Nurhayana Sennang Andi Nanggung, dr, M.Kes, DMM, Sp.PK,
Osman Sianipar, dr, DMM, MS, Sp.PK(K), Dr. Sidarti Soehita, FHS, dr, MS, Sp.PK(K), Purwanto AP, dr, SpPK,
Dr. Jusak Nugraha, dr, MS, Sp.PK(K); Endang Retnowati, dr, MS, Sp.PK(K), Dr. Aryati, dr, MS, Sp.PK(K),
Puspa Wardhani, dr, Sp.PK, Bastiana, dr, Maimun Zulhaidah Arthamin, dr, M.Kes, Sp.PK,
Sulistyo M. Agustini, dr, Sp.PK(K), Dr. Noormartany, dr, Sp.PK(K), MSI

Pelaksana Tata Usaha

Ratna Ariantini, dr, Sp.PK, Leonita Aniwati, dr, Sp.PK(K), Yetti Hernaningsih, dr, Sp.PK :
Tab. Siklus Bank Jatim Cabang RSU Dr. Soetomo Surabaya; No AC: 0323551651,
Tabungan Mandiri KCP SBY PDAM; No. AC: 142-00-0743897-0
Email:majalah.ijcp@yahoo.com (PDSPATKLIN Cabang Surabaya),
Bendahara PDSPATKLIN Pusat, RS PERSAHABATAN, Jl. Persahabatan Raya no 1, Jakarta Timur 13230,
Tlp. 62-021-4891708, Fax. 62-021-47869943
Email: pds_patklin@yahoo.com

Alamat Redaksi (Editorial Address)

Departemen/Laboratorium Patologi Klinik RSU Dr. Soetomo Gedung Diagnostik Terpadu Lantai 4 RSUD Dr. Soetomo
Jl. Prof. Dr. Moestopo 6-8 Surabaya Tlp/Fax. (031) 5042113, Fax (031) 5042113, Email: majalah.ijcp@yahoo.com

INDONESIAN JOURNAL OF
**CLINICAL PATHOLOGY AND
 MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

Kadar Albumin Serum Penderita Strok Iskemik dan Strok Hemoragik (<i>Serum Albumin Level in Ischemic and Hemorrhagic Stroke Patients</i>)	55-57
Fasni Halil, Hj. Darmawaty ER, Ruland DN Pakasi	55-57
Pola Ketahanan (Resisten) dan Kepekaan (Sensitivitas) Kuman terhadap Antimikroba (<i>Microbial resistance and Sensitivity Pattern to Antimicrobial Drug</i>)	58-61
Y F Tallulembang, Nurhayana Sennang, Benny Rusli	58-61
Ragam Berbagai Perbenihan Bakteri Terkait Kerentanannya terhadap Aneka Jenis Antibiotika (<i>Various Bacterial Cultures Related to Their Susceptibility Against Several Types of Antibiotics</i>)	62-64
Carolina M Viany S, Aryati	62-64
Analisis Eosinofil Darah Terkait Radang Sel Ginjal Akut/Nefritis Interstisial Akut (NIA) (<i>Analysis of Eosinophil on Acute Interstitial Nephritis</i>)	65-67
Yedid Lebang, Sulina Yanti Wibawa, Mansyur Arif	65-67
Kinetika Faktor Von Willebrand Demam Berdarah Dengue Orang Dewasa (<i>Von Willebrand Kinetic Factor in Adult Dengue Haemorrhagic Fever Patients</i>)	68-72
Riat El Khair, Usi Sukorini	68-72
Immature to Total Neutrophil (I/T) Ratio sebagai Penunjang Diagnosis Sepsis Neonatorum (<i>Immature to Total Neutrophil (I/T) Ratio as Septic Neonatorum Diagnostic</i>)	73-77
Bastiana, Aryati, Yulia Iriani	73-77
Kadar Kolesterol HDL Terukur Menggunakan Reagen Cholestest N HDL dan HDL-C Plus Generasi Ketiga (<i>HDL Cholesterol Concentration Measured Using Cholestest N HDL and HDL-C Plus 3rd Generation Reagents</i>)	78-80
Ichwan Meinardi, Mansyur Arif	78-80
Deteksi Molekul Mutasi Gen <i>RpoB Mycobacterium Tuberculosis</i> pada Dahak Dengan Polymerase Chain Reaction dan Single Strand Conformation Polymorphism (<i>MoLecul Detection of rpoB Gene Mutation in Mycobacterium Tuberculosis with Polymerase Chain Reaction and Singgle Strand Conformation Polymorphism</i>)	81-87
P B Notopuro, J Nugraha, H Notopuro	81-87

TELAAH PUSTAKA

Diagnosis Molekul dan Aplikasi dalam Pengobatan Hepatitis B & C (<i>The Diagnosis Molecular and Aplication in Treatment of B & C Hepatitis</i>)	88-92
Aryati	88-92

LAPORAN KASUS

Konfirmasi Flu Babi A/H1N1 Menggunakan PCR (<i>Swine Influenza A/H1N1 Confirmed by PCR</i>)	93-96
A.A. Wiradewi Lestari, I.A. Putri Wirawati, Tjok Gde Oka	93-96

MENGENAL PRODUK BARU

SD Dengue Duo® (NS1, IgG, IgM) Rapid Test dalam Menunjang Diagnosis Infeksi Virus Dengue (<i>SD Dengue Duo (NS1, IgG, IgM) Rapid Test for the Diagnosis of Dengue Virus Infection</i>)	97-101
Diah Puspita Rini, Aryati	97-101

MANAJEMEN LABORATORIUM

Pengelolaan Laboratorium Unit Gawat Darurat (<i>The Management of An Emergency Laboratory</i>)	102-104
J.Nugraha	102-104

INFORMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU

DETEKSI MOLEKUL MUTASI GEN *rpoB* *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* PADA DAHAK DENGAN POLYMERASE CHAIN REACTION DAN SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM

*(Molecular Detection of *rpoB* Gene Mutation in *Mycobacterium Tuberculosis* With Polymerase Chain Reaction And Single Strand Conformation Polymorphism)*

P B Notopuro*, **J Nugraha***, **H Notopuro****

ABSTRACT

Tuberculosis is a chronic infectious disease which is found in the developing as well as the developed country. This disease is one of the community health problems which become the priority programs in the national as well as international health. In the last two decades, they can be found in the emergency tuberculosis problems that is related with the Multi Drug Resistance (MDR) Strain. The detection of rifampicin resistance in *M. tuberculosis* infection can help clinical laboratory to find the MDR strain. Related to this problem the proportional culture method is still the gold standard for rifampicin resistance detection for *M. tuberculosis* infection. But this method needs 4–6 weeks to obtain the result, while its sensitivity is not very high. The development of the molecular detection for *M. tuberculosis* rifampicin resistance in a direct clinical specimen such as sputum, cerebrospinal fluid, etc. will give an improvement in the diagnosis, because it has an accurate, fast, sensitive and a specific result. Isolates from twenty six of *M. tuberculosis* derived from the sputum of tuberculosis patients that have failed the tuberculosis treatment, were examined with the proportional culture method. In this study PCR-SSCP were used for the molecular detection of rifampicin resistance using direct sputum samples. The proportional culture method was used as a gold standard for the rifampicin resistance detection. A set of primers was directed to conserve the region of *rpoB* gene of *M. tuberculosis*. This RNA polymerase gene was encoded, which is bound on rifampicin. A 157-bp fragment was amplified by PCR and analyzed by SSCP technique. The sensitivity of PCR-SSCP is 80% (high), its specificity is 95.2% (very high), the positive predictive value is 80% and the negative predictive value is 95.2%. Statistically there were no significant difference between the result of PCR-SSCP and the proportional culture method. Based on the study result, the molecular detection technique for rifampicin resistance on *M. tuberculosis* infection can be used as the screening device /means for Multi Drug Resistance Tuberculosis (MDR-TB), while the clinician waits the culture result.

Key words: MDR-TB, PCR-SSCP, Culture

PENDAHULUAN

Tuberkulosis adalah penyakit jangkitan menahun (infeksi kronis) yang dapat ditemukan baik di negara berkembang maupun negara maju. Penyakit tersebut menjadi masalah kesehatan masyarakat yang mendapat keutamaan (prioritas) dalam program kesehatan nasional maupun internasional. Angka kejadian kesakitan akibat penjangkitan (infeksi) *M. tuberculosis* bertambah seiring dengan meningkatnya kejadian pandemi virus *human immunodeficiency* (HIV) di seluruh dunia. Pada tahun 1991 telah dilaporkan kejadian ketahanan (resistensi) terhadap sedikitnya (minimal) satu macam obat. Beberapa tahun kemudian muncul masalah darurat tuberkulosis sehubungan adanya ketahanan terhadap beberapa macam *Multi isoniazid* (INH) dan rifampicin dengan atau tanpa tahan terhadap obat antituberkulosis lainnya. Mertaniasih² di Surabaya melaporkan isolat *M. tuberculosis* yang tahan terhadap

rifampicin Drug Resistant (MDR) Strain adalah galur (*strain*) *M. tuberculosis* yang tahan sebesar 14%.

Berdasarkan masalah tersebut, maka pada tahun 1993 WHO menyatakan bahwa tuberkulosis merupakan masalah kedaruratan kesehatan mendunia (global) dan mencanangkan siasat (strategi) penanggulangan tuberkulosis secara tersebut.^{1,2} Uji kepekaan *M. tuberculosis* terhadap obat antituberkulosis dapat dilakukan dengan teknik perbenihan (kultur). Teknik ini memerlukan waktu lama, yaitu 4–6 minggu. Serta memerlukan pembakuan (standardisasi) inokulum dan kemungkinan (potensi), stabilitas, serta kepekatan (konsentrasi) obat, keadaan perbenihan (kondisi kultur) dan patokan (kriteria) penentuan ketahanan atau kepekaan (sensitif).

Teknik molekul merupakan metode memeriksa yang jauh lebih cepat, peka dan khas (spesifik) untuk deteksi resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat antituberkulosis (*strain* MDR-TB).³ Teknik

* Alamat Korespondensi : Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Lantai 4 Gedung Pusat Diagnostik Terpadu, JL. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo 6-8 Surabaya, Email : paulusbudiono@yahoo.com

** Departemen Biokimia FK Unair, Jl. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya

Polymerase Chain Reaction (PCR) bentukan banyak utas tunggal penyesuaian (konformasi)/ *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) untuk deteksi resistensi terhadap obat dilakukan melalui perubahan di regio DNA penyandi protein berkaitan dengan sasaran kerja obat. PCR adalah teknik amplifikasi segmen DNA secara laboratorik (*in vitro*) dengan primer khas terhadap sasaran DNA sebagai model/ contoh pembentuk (*template*) secara bersamaan/ serentak (simultan). Sehingga salinan sasaran DNA meningkat secara berpangkat (eksponensial) yaitu salinan 2^n DNA.⁴ Wilayah DNA penyandi protein di sasaran kerja obat yang teramplifikasi dianalisis lebih lanjut dengan teknik SSCP untuk mengetahui adanya perubahan di urutan DNanya.⁵ Analisis SSCP merupakan uji saring mengenali perubahan (deteksi mutasi) dengan asas analisis perubahan pola migrasi pita DNA di gel elektroforesis, karena penyulihan (substitusi) nukleotida mengakibatkan perubahan penyesuaian DNA rantai tunggal. Dalam keadaan tidak diawa-alamkan (nondenaturasi), DNA utas tunggal/*single strand* (ssDNA) memiliki susunan penyesuaian (struktur konformasi) terlipat yang ditentukan oleh persitindakan (interaksi) dalam molekul (intramolekul) dan urutan basa di dalamnya. Pada saat dilakukan elektroforesis di gel yang tidak diawa-alamkan, ssDNA akan memiliki pergerakan khas yang bergantung pada persitindakan dalam molekul (interaksi intramolekul) dan urutan basanya. Perubahan urutan basa dalam ssDNA, disebabkan perubahan atau bentukan banyak (*polymorphism*) dapat dibedakan berdasarkan selisih pergerakan yang menghasilkan pola pita yang terpaut (berbeda) bila dibandingkan dengan pembanding yang wajar (kontrol normal).⁶

Rifampicin merupakan kemoterapi utama di aturan (regimen) OAT di samping INH. Rifampicin bekerja dengan cara terikat di protein dari satuan kecil (subunit) β *RNA polymerase*, yaitu penghambat (inhibitor) di kegiatan (aktivitas) enzim *RNA polymerase*. Ikatan yang terbentuk antara rifampicin dan *RNA polymerase* membentuk rangkaian (kompleks) yang mantap (stabil), sehingga mikroorganisme tidak dapat membuat mRNA (hambatan pengolahan rekaman/proses transkripsi) dan akan mati.^{2,5}

Strain MDR M. tuberculosis adalah isolat *M. tuberculosis* yang tahan sedikit (resisten minimal) terhadap INH dan rifampicin. Bila timbul galur yang tahan terhadap INH dan rifampicin, sasaran angka kesembuhan akan gagal dicapai, pengobatan akan menjadi lebih lama, dan sifat racun (toksisitas) obat akan meningkat. Mekanisme ketahanan ini terjadi karena perubahan (mutasi) gen kromosom yang menyandi protein sasaran kerja obat.^{5,7} Pada saat ini telah ditemukan 12 macam gen yang berperan di mekanisme ketahanan *M. tuberculosis* terhadap obat.

Mekanisme ketahanan obat yang paling sederhana ditemukan terhadap rifampicin. Sekitar 95% isolat *M. tuberculosis* yang tahan terhadap rifampicin mempunyai perubahan di wilayah 81 pasang basa (*Codon 507-533*) dari gen *rpoB* yang menyandi satuan kecil (subunit) β *RNA polymerase*. Hampir 90% isolat *M. tuberculosis* yang tahan terhadap rifampicin juga sekaligus memiliki ketahanan terhadap INH, temuan ini merupakan penunjuk (indikator) galur MDR yang kuat. Mekanisme ketahanan terhadap INH jauh lebih rumit, karena dapat disebabkan oleh 4 gen yang sedikit dan penting, yaitu gen *katG*, gen *inhA/mabA*, gen *ahpC* serta gen *oxyR*.^{8,9}

METODE

Subjek Penelitian

Pada penelitian ini dikumpulkan sampel dahak dari 26 orang pasien/penderita tuberkulosis di poli paru RSU Dr. Soetomo Surabaya pada bulan September 2006 sampai Juni 2007. Penderita tuberkulosis paru tersebut adalah mereka yang putus pengobatan (pasien putus pengobatan lebih dari 2 bulan berurutan). Di samping pasien yang gagal diobati (hasil kultur: positif 2–5 kali perbenihan atau dari tiga kali perbenihan satu hasilnya positif pada akhir masa pengobatan) berdasarkan patokan WHO 1997.¹¹

Persiapan Sampel

Pada tiap ml volume dahak (*sputum*), ditambahkan 2 ml 4% NaOH. Tabung ditutup rapat lalu dikocok dan dibiarkan 15 menit pada suhu kamar. Kemudian dipusingkan (sentrifugasi) sebanyak 3000 g selama 15 menit. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan 15 mL PBS darap fosfat (*phosphate buffer saline*) sucihama (steril) dan sentrifugasi sebanyak 3000 g selama 15 menit lagi. Hasil memusingkan (sentrifugasi)/pel (*pellet*) sebanyak 100–1000 μ L dibenih-endapkan (- kultur sedimen) di media LJ (*Lowenstein Jensen*) selama 4–6 minggu. Kemudian dilanjutkan uji kepekaan obat antituberkulosis dengan teknik perbenihan (kultur) sebanding bakuan (proporsional standar) di benihan kecil (subkultur) isolat berumur 1–2 minggu. Di sisa hasil sentrifugasi/pel (*pellet*) di-isolasi DNA dengan perangkat DNA extraction kit.

Pemeriksaan PCR-SSCP

Hasil ekstraksi DNA dilakukan pengolahan (proses) amplifikasi PCR dengan primer RIF-R1 : 5'-CCA-CCC-Agg-ACg-Tgg-Agg-CgA-TCA-CAC-3' (27 mers) dan RIF-R2 : 5'-CgT-TTC-gAT-gAA-CCC-gAA-Cgg-gTT-gAC-3' (27 mers) menggunakan mesin pemutar panas (*thermocycler*) Biorad ®. Pengolahan

diawali dengan denaturasi pada suhu 95° C selama 3 menit (*Hot Start*). Kemudian dilanjutkan dengan 40 daur (siklus) reaksi amplifikasi (denaturasi) pada 95° C selama 0,5 menit, dipijarkan (*annealing*) pada 55° C selama 0,5 menit, diluaskan (ekstensi) pada 72° C selama 1 menit. Hasil -amplifikasi diperlihatkan (-visualisasikan) dengan elektroforesis gel agarosa 2% dengan pengecatan bromide etidium (*ethidium bromide*) dengan *submarine electrophoresis apparatus* Atago®. Kemungkinan kontaminasi diamati dengan pembanding kontrol negatif yang mengandung semua bahan campuran reaksi PCR tanpa *DNA template* yang selalu disertakan untuk setiap reaksi PCR.

Analisis SSCP dilakukan dengan mencampur 5 µL hasil PCR dengan 5 µL *denaturing solution* yang mengandung 10 mM EDTA 0,1% *sodium dodecyl sulphate* (SDS). Hasil denaturasi sebanyak 5 µL dicampur dengan 5 µL *formamide dye* (95% *formamide*, 0,05% *bromophenol blue*, 20 mM EDTA). Suspensi dipanaskan 100° C selama 5 menit, langsung dicelupkan dalam es 0° C selama 10 menit. Suspensi dimuatkan pada *gel non-denaturing* 8% *acrylamide-bisacrylamide*, kemudian dilakukan elektroforesis vertikal. Elektroforesis secara vertikal dilakukan dalam *buffer 1× TBE* (*Tris Buffer EDTA*) pada suhu kamar dengan arus listrik 50 Volt selama 4–5 jam. Pita DNA dari gel divisualisasikan dengan pewarnaan perak nitrat. Pola migrasi pita DNA dari *strain* resisten atau sensitif dibandingkan dengan kontrol *strain M. tuberculosis* H37rv yang sensitif terhadap rifampicin.

Pemeriksaan Kultur Metode Standar Proporsional

Isolat *M. tuberculosis* dari subkultur di media Lowenstein Jensen yang berumur 1–2 minggu, dibuat suspensi dalam media cair Middlebrook 7 H 9 dengan kekeruhan sesuai standar Mc Farland 1.0. Kemudian dilakukan penipisan (dilusi) sampai 10³–10⁴ CFU/mL. Suspensi *M. tuberculosis* dilakukan kultur konvensional di media agar Middlebrook 7 H 10 yang mengandung rifampicin dengan konsentrasi kritis 1,0 mg/mL dan media tanpa obat. Kultur selama 3 minggu, hambatan pertumbuhan diamati setiap minggu. *Strain* dinyatakan resisten positif setelah minggu ketiga dan dinyatakan resisten negatif (sensitif) setelah minggu keenam. Setiap satu perangkat media baru, dilakukan uji kontrol kualitas media dan reagensia dengan *strain* kontrol *M. tuberculosis* H37rv (ATCC 27294) sensitif rifampicin.

Analisis Statistik

Uji statistik Mc Nemar dengan *software SPSS v.12* digunakan untuk menguji hipotesis penelitian, membuktikan ada atau tidak perbedaan yang bermakna. Hasil deteksi resistensi *M. tuberculosis*

terhadap rifampicin antara teknik PCR-SSCP dengan teknik kultur metode standar proporsional sebagai baku emas.

HASIL

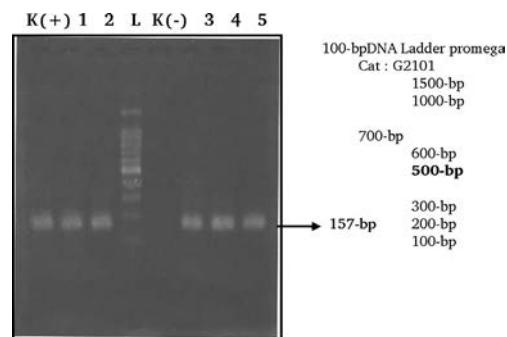
Deteksi Resistensi *M. tuberculosis* terhadap Rifampicin dengan Teknik Kultur Metode Standar Proporsional

Hasil uji resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin dengan teknik kultur metode standar proporsional sebagai teknik baku emas adalah sebanyak 26 isolat *M. tuberculosis* dari dahak. Penderita tuberkulosis diisolasi mulai bulan September 2006 sampai Mei 2007 di Surabaya, 21 (21/26) isolat *M. tuberculosis* diidentifikasi sensitif rifampicin, 5 (5/26) resisten terhadap rifampicin. Setiap persiapan kultur media dan reagensia dilakukan uji di isolat secara lipat dua(duplo). Juga 1 *strain* kontrol *M. tuberculosis* H37rv (ATCC 27294) yang sensitif rifampicin untuk kontrol kualitas media dan reagensia dengan hasil yang optimal.

Deteksi Resistensi *M. tuberculosis* terhadap Rifampicin dengan Teknik PCR - SSCP

Hasil Pemeriksaan PCR

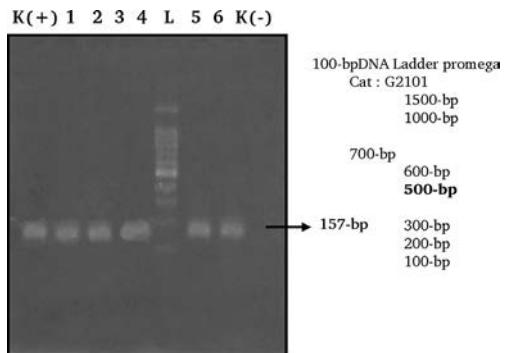
Pemeriksaan PCR dengan *primer RIF-R1* dan *RIF-R2* dilakukan di 26 sampel dahak penderita tuberkulosis yang diisolasi mulai bulan September 2006 sampai bulan Mei 2007 di Surabaya.



Gambar 1. Hasil PCR pada dahak dengan *primer RIF-R1* dan *RIF-R2* menghasilkan satu pita DNA spesifik dengan ukuran molekul 157-bp.(No: 1,2,3,4,5), L = 100-bp DNA Ladder, K(+) = kontrol positif, K(-) = kontrol negatif.

26 Penderita (26/26) dapat dideteksi di satu pita DNA spesifik ukuran molekul 157-bp yang disesuaikan ukuran standar molekul marka 100-bp DNA Ladder Promega Catalog# G2101, di elektroforesis gel agarosa. Pada setiap reaksi PCR, dilakukan pemeriksaan terhadap strain kontrol *M. tuberculosis* H37 rv sebagai kontrol positif. Kontrol

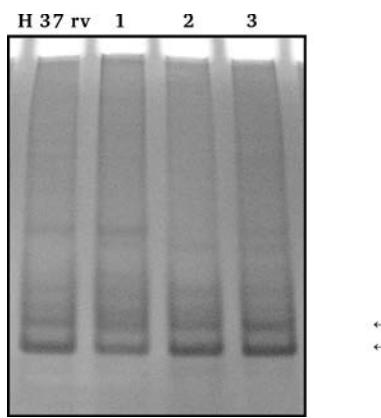
kualitas pemeriksaan PCR dan kontrol negatif yang mengandung semua bahan campuran reaksi PCR tanpa *DNA template* yang selalu disertakan untuk setiap reaksi PCR (Gambar 1 dan 2).



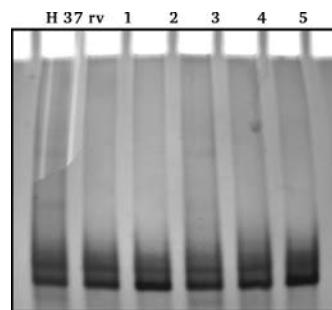
Gambar 2. Hasil PCR pada dahak dengan *primer RIF-R1* dan *RIF-R2* menghasilkan satu pita DNA spesifik dengan ukuran molekul 157-bp.(No: 1, 2, 3, 4, 5, 6), L = 100-bp DNA Ladder, K(+) = kontrol positif, K(-) = kontrol negatif.

Hasil Analisis SSCP

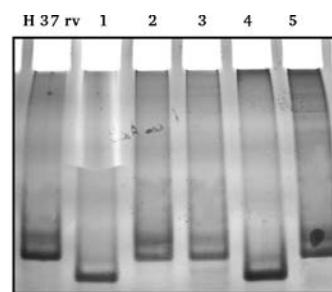
Analisis SSCP dilakukan pada hasil PCR dengan *primer RIF-R1* dan *RIF-R2* dari 26 dahak penderita tuberkulosis dengan hasil kultur positif . Hasil sebagai berikut: sebanyak 21 (21/26) strain *M. tuberculosis* diidentifikasi DNA mutan negatif dinyatakan adanya pola migrasi DNA yang sama dengan kontrol strain sensitif *M. tuberculosis* H 37 rv. (Gambar 3 dan 4). Sebanyak 5 (5/26) strain *M. tuberculosis* diidentifikasi DNA mutan positif, dinyatakan adanya pola migrasi DNA berbeda dengan kontrol strain sensitif *M. tuberculosis* H 37 rv. (Gambar 5 dan 6).



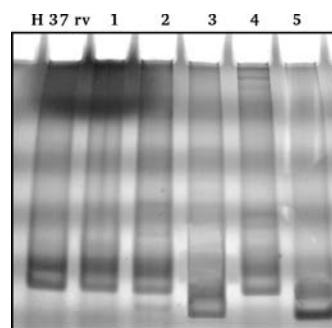
Gambar 3. Hasil analisis SSCP dengan pewarnaan perak nitrat yang menunjukkan adanya pola migrasi DNA strain *M. tuberculosis* yang sensitif terhadap rifampicin. Sampel ekstrak DNA no. 1, 2 dan 3 menunjukkan pola migrasi DNA yang sama dengan kontrol *M. tuberculosis* H 37 rv yang sensitif rifampicin.



Gambar 4. Hasil analisis SSCP dengan pewarnaan perak nitrat yang menunjukkan adanya pola migrasi DNA strain *M. tuberculosis* yang sensitif terhadap rifampicin. Sampel ekstrak DNA no. 1, 2, 3, 4 dan 5 menunjukkan pola migrasi DNA yang sama dengan kontrol *M. tuberculosis* H 37 rv yang sensitif rifampicin.



Gambar 5. Hasil analisis SSCP dengan pewarnaan perak nitrat yang menunjukkan adanya pola migrasi DNA strain *M. tuberculosis* yang sensitif terhadap rifampicin (Sampel ekstrak DNA no. 2, 3, 5 menunjukkan pola migrasi DNA yang sama dengan kontrol *M. tuberculosis* H 37 rv yang sensitif rifampicin) dan pola migrasi DNA strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap rifampicin (Sampel ekstrak DNA no. 1 dan 4 menunjukkan pola migrasi DNA yang berbeda dengan kontrol *M. tuberculosis* H 37 rv).



Gambar 6. Hasil analisis SSCP dengan pewarnaan perak nitrat yang menunjukkan adanya pola migrasi DNA strain *M. tuberculosis* yang sensitif terhadap rifampicin (Sampel ekstrak DNA no. 1, 2, 4 menunjukkan pola migrasi DNA yang sama dengan kontrol *M. tuberculosis* H 37 rv yang sensitif rifampicin) dan pola migrasi DNA strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap rifampicin (Sampel ekstrak DNA no 3 dan 5 menunjukkan pola migrasi DNA yang berbeda dengan kontrol *M. tuberculosis* H 37 rv).

Hasil Uji Validitas dan Uji Statistik

Uji validitas pada hasil deteksi mutasi gen *rpoB* *M. tuberculosis* pada dahak menggunakan PCR SSCP dengan teknik kultur metode standar proporsional sebagai baku emas pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil deteksi mutasi gen *rpoB* *M. tuberculosis* pada dahak menggunakan PCR-SSCP dengan teknik kultur metode standar proporsional sebagai baku emas

Deteksi Resistensi rifampicin		Kultur metode standar proporsional (baku emas)	
		Resisten +	Resisten -
PCR – SSCP	Mutan +	4	1
	Mutan –	1	20

Pada hasil uji statistik Mc Nemar ternyata tidak terdapat perbedaan bermakna. Hasil deteksi resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin di dahak antara teknik PCR-SSCP dan teknik kutur metode standar proporsional ($p = 1$), dihitung menggunakan hasil pada tabel 1.

PEMBAHASAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa isolat *M. tuberculosis* resisten terhadap rifampicin adalah 19,23% berdasarkan teknik kultur standar proporsional yang merupakan baku emas deteksi resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin. Mertaniasih pada tahun 2001 di Surabaya melaporkan isolat *M. tuberculosis* yang resisten terhadap rifampicin di Surabaya sebesar 14%.² Cooksey dkk. pada tahun 1996 melaporkan hasil survei di New York yaitu ditemukannya 22% strain resisten rifampicin dari 46 isolat *M. tuberculosis*.¹⁰ Variasi prevalensi resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin pada daerah geografis berhubungan dengan ketaatan penderita minum obat, dan penggunaan rifampicin pada penyakit infeksi nontuberkulosis, dan kebijakan penggunaan antituberkulosis setempat. Selain itu variasi tersebut dapat disebabkan karena masih adanya kesulitan dalam standarisasi uji resistensi obat *M. tuberculosis*. Faktor yang berpengaruh pada interpretasi hasil uji resistensi metode kultur seperti standardisasi inokulum yang mengandung *M. tuberculosis*, potensi, stabilitas obat, konsentrasi obat, kondisi kultur dan kriteria menentukan resisten atau sensitif.¹¹ Hasil pemeriksaan PCR pada 26 isolat *M. tuberculosis*, dapat diidentifikasi semua fragmen DNA sepanjang 157-bp dari gen *rpo B*. Regio dengan ukuran fragmen 157-bp dari gen *rpo B* hampir selalu ditemukan pada strain *M. tuberculosis*, karena merupakan regio yang *highly conserved*.^{2,5} Penggunaan regio yang *highly conserved* sebagai marka deteksi

pada reaksi amplifikasi DNA dengan teknik PCR akan meningkatkan sensitivitas deteksinya. Regio target ini memiliki urutan DNA yang spesifik untuk genus *Mycobacteria* dan spesifik untuk penyandi domain protein tempat ikatan rifampicin.^{8,16} Penggantian asam amino sering ditemukan dan disandi oleh gen *rpoB* adalah di regio Leu₅₁₁ sampai dengan Leu₅₃₃, terutama penggantian pada asam amino His₅₂₆ dan Ser₅₃₁. Regio DNA 157-bp merupakan *conserved region* dari gen *rpoB* dan merupakan regio spesifik pada *cluster I* penyandi domain protein tempat ikatan rifampicin, yaitu penyandi ALa₅₀₀ sampai VaL₅₁₀.^{2,5}

Deteksi mutasi hasil analisis PCR-SSCP sebesar 19,23% (5 dari 26 sampel dahak penderita tuberkulosis), menunjukkan pola migrasi di gel elektroforesis berbeda dengan kontrol strain *M. tuberculosis* H37 rv yang sensitif rifampicin. Pada uji validitas teknik PCR-SSCP, dengan teknik kultur metode standar proporsional sebagai baku emas, didapatkan sensitivitas sebesar 80% dan spesifisitas 95,2%. Kemampuan teknik PCR-SSCP untuk mendeteksi strain resisten positif dari isolat uji yang benar resisten positif menurut kultur metode standar proporsional adalah 80%. Kemampuan untuk mendeteksi strain resisten negatif adalah 95,2% dari isolat uji yang benar sensitif rifampicin menurut kultur metode standar proporsional. Pada penelitian ini, nilai ramal positif pemeriksaan PCR-SSCP sebesar 80%, yaitu 4 strain dengan hasil positif benar dan 1 strain dengan hasil positif palsu. Sedangkan nilai ramal negatif pemeriksaan PCR-SSCP sebesar 95,2%, yaitu 20 strain dengan hasil negatif benar dan 1 strain dengan hasil negatif palsu.

Mertaniasih pada tahun 2001 melaporkan sensitivitas teknik PCR-SSCP dalam menentukan adanya resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin sebesar 84,61%, spesifisitas sebesar 98,70%. Hasil deteksi resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin menggunakan teknik PCR-SSCP pada regio 157-bp gen *rpoB* tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna dengan teknik kultur metode standar proporsional.²

Sensitivitas amplifikasi DNA dapat ditingkatkan dengan melakukan optimasi reaksi PCR, dan memilih primer RIF-R1 dan RIF-R2 untuk *conserved region* yaitu regio 157-bp. Spesifisitas PCR ditingkatkan dengan dipilihnya primer RIF-R1 dan RIF-R2 untuk regio yang spesifik penyandi protein tempat ikatan rifampicin.

Penggunaan PCR-SSCP spesimen klinik secara langsung dilaporkan Scarpellini dkk. tahun 1997 yaitu, isolat diperoleh dari cairan serebrospinal penderita tuberkulosis sistem saraf pusat di daerah Itali, mulai tahun 1992 sampai 1997. Hasil analisis didapat PCR-SSCP di regio gen *rpoB* *M. tuberculosis* yaitu 100% dari 9 isolat sensitif rifampicin menunjukkan pola SSCP yang identik dengan pola

strain kontrol. Semua dari 18 isolat strain yang resisten rifampicin menunjukkan pola migrasi yang jelas berbeda dengan strain kontrol *M. tuberculosis* H 37 rv *wild type* yang sensitif terhadap rifampicin.¹²

Pada penelitian ini didapatkan hasil positif palsu pada analisis PCR-SSCP yang kemungkinan disebabkan adanya *silent mutation* atau adanya *missense mutation* yang bukan merupakan penentu fenotipe resistensi terhadap rifampicin. Hasil pemeriksaan PCR-SSCP positif sedangkan hasil pada teknik kultur yang negatif dapat juga dikaitkan dengan masih adanya kelemahan dalam standardisasi teknik kultur sebagai teknik baku emas.

Pada penelitian ini, hasil deteksi resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin, terbukti Hasil negatif palsu teknik PCR-SSCP mungkin disebabkan mutasi di luar regio 157-bp gen *rpoB* atau perubahan di satu atau lebih gen yang produk proteinnya berperan pada permeabilitas antibiotika atau metabolismenya, mengakibatkan fenotipe resisten rifampicin.^{13,14} tidak terdapat perbedaan bermakna antara teknik PCR-SSCP dengan teknik kultur metode standar proporsional ($p = 1$). Berdasarkan hasil ini dapat dinyatakan bahwa deteksi mutasi pada regio gen *rpoB* dengan teknik PCR-SSCP dapat digunakan untuk penentu resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin.

Kelebihan teknik PCR-SSCP untuk deteksi mutasi di regio gen *rpoB* sebagai penentu resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin pada tingginya sensitivitas dan spesifikasi, efisien karena pemeriksaan dilakukan dalam waktu 48–72 jam. Teknik ini juga dapat digunakan pada spesimen klinik langsung ataupun kultur yang masih tumbuh minimal (1–2 minggu) karena kemampuan amplifikasi DNA yang tinggi dengan PCR. Keuntungan lain dari penentuan adanya resistensi terhadap rifampicin yaitu karena kebanyakan (90%) isolat *M. tuberculosis* yang resisten terhadap rifampicin juga resisten terhadap isoniazid dan obat antituberkulosis lainnya.^{5,15}

Teknik PCR-SSCP sangat sensitif sehingga kemungkinan memberikan hasil positif palsu, karena itu harus diperhatikan penggunaan prosedur yang tepat dan teliti. Kekurangan teknik PCR-SSCP disebabkan karena adanya keterbatasan identifikasi untuk mekanisme resistensi yang lebih kompleks bila lebih dari satu regio gen yang berkaitan dengan proses resistensi akan memerlukan prosedur multiamplifikasi. Teknik PCR-SSCP juga tidak dapat membedakan antara *missense mutation* dan *silent mutation* yang dapat memberikan hasil positif palsu. Oleh karena kekurangan teknik PCR-SSCP tersebut di atas, maka teknik ini sebaiknya digunakan untuk uji penapisan yang membantu sebelum diagnosis ditegakkan, dan menunggu hasil pemeriksaan dengan teknik kultur metode standar proporsional. Teknik ini

sebaiknya digunakan secara paralel dengan teknik kultur untuk menegakkan adanya resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin.^{17,18}

SIMPULAN

Teknik deteksi resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin pada dahak penderita tuberkulosis paru menggunakan PCR-SSCP pada regio gen *rpoB* memiliki sensitivitas dan spesifikasi diagnostik yang tinggi yaitu 80% dan 95,2%. Di uji statistik, hasil pemeriksaan PCR-SSCP dahak penderita tuberkulosis paru di regio gen *rpoB* menunjukkan hasil tidak berbeda bermakna dengan teknik kultur metode standar proporsional yang merupakan metode baku emas. Deteksi resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampicin pada sediaan klinik secara langsung (contoh: dahak) memberikan hasil yang jauh lebih cepat (48–72 jam), karena tidak memerlukan subkultur pada media selama 1–2 minggu.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sepkowitz K.A, Raffalli J, Riley L, Kiehn T, Armstrong D. Tuberculosis in The AIDS Era. Clinical Microbiology Review 1995; 8 (2): 180–199.
2. Mertaniaish N.M. Mutasi Gen *rpoB* pada Strain Mycobacterium tuberculosis Resisten Rifampicin Isolat Penderita Tuberkulosis Paru di Surabaya. (Disertasi), Surabaya: Universitas Airlangga. 2001
3. Baron E.E, Peterson L.R, and Finegold S.M. Mycobacteria. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. St. Louis Baltimore Boston, Chicago, London, Madrid, Philadelphia, Sydney, Toronto, Mosby Year Book, Inc. 1994; pp. 590–633.
4. Koolman J, Roehm K.H. Molecular Genetics and Genetics Engineering. In *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme, 2005; pp 262–263.
5. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, and Bodmer T. Direct Automated Detection of Rifampicin-Resistant Mycobacterium tuberculosis by Polymerase Chain Reaction and Single Strand Conformation Polymorphism Analysis. Antimicrob Agents and Chemoter, 1993; 37 (10): 2054–2058
6. Saker PJ. Mutation Screening Using PCR-SSCP, Silver Staining and Isotopic Protocols. In: *Methods in Molecular Medicine and Clinical Application of PCR*. Totowa, NJ, Humana Press Inc, 2001; pp 39–49.
7. Crofton SJ, ChauLet P, Maher D. GuideLines for Management of Drug Resistant TubercuLosis. WHO/TB/96.210 (Rev 1), 1997; pp. 5–44.
8. Kim BJ, Kim SY, Park BH, Lyu MA, Park IK, Bai GH, Kim SJ, Cha CY, Kook YH. Mutations in the *rpoB* Gene of Mycobacterium tuberculosis that Interfere with PCR-Single Strand Conformation Polymorphism Analysis for Rifampicin Susceptibility Testing. J. CLin. Microbiol, 1997; 35 (2): 492–494
9. Caws.M, Drobnewski F.A. Molecular Techniques in The Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis and The Detection of Drug Resistance. In : *Molecular Techniques in TB Diagnosis*. Annals New York Academy of Sciences, 2004; pp. 138–145.
10. Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT . Evaluation of a Line Probe Assay Kit for Characterization of *rpo B* Mutations in Rifampicin Resistant Mycobacterium tuberculosis

- Isolates from New York City. *J. Clin. Microbiol.*, 1997; 35 (5): 1281–1283
11. Pablos MA, Laszlo A, Bustreo F, Binkin N, Cohn D, Weezenbeek CSB, Kim SJ, Chaulet P, Nunn P, Raviglione MC. Antituberculosis Drug Resistance in the World. The WHO/IUATLD Global Project on Antituberculosis Drug Resistance Surveillance. WHO. Geneva, 1997; pp: 13–50.
 12. Scarpellini P, Braglia S, Brambilla AM, Dalessandro M, Chicero P, Gori A, Lazzarus A. Detection of Rifampicin Resistance by Single Strand Conformation Polymorphism Analysis of Cerebrospinal Fluid of Patients with Tuberculosis of Central Nervous System. *J. Clin. Microbiol.*, 1997; 35 (11): 2802–2806.
 13. Kapur V, Lingling L, Iordanescu S, Hamrick MR. Characterization by Automated DNA Sequencing of Mutations in the Gene (*rpoB*) Encoding the RNA Polymerase β subunit in Rifampicin Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strain from New York City and Texas. *J. Clin. Microbiol.*, 1994; 32 (4): 1095–1098.
 14. Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hora K. Relationship between Rifampicin MICs for and *rpoB* Mutations of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996; 40 (4): 1053–1056.
 15. Scheinehaim C. The Molecular Mechanism by which *Mycobacterium tuberculosis* Gains Resistance to Antibiotic and The Impact The Development of Resistant Strains Have on Tuberculosis Control Efforts. In: Multi Drug Resistance. American Lung Association, 2005; pp1–7.
 16. Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM. The *rpoB* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Anti Microb Agents and Chemoter*, 1994; 38 (4): 805–811.
 17. Telenti A, Honore N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B, Takiff HE, and Cole ST. Genotypic Assesment of Isoniazid and Rifampicin Resistant in *Mycobacterium tuberculosis*: A Blind Study at Reference Laboratory Level. *J. Clin. Microbiol.*, 1997; 35 (3): 719–723.
 18. Gillespie SH. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrobial Agents and Chemoter*, 2002; 46 (2): 267–274.