

DETEKSI MUTASI GEN KATG *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DENGAN METODE PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*) - HIBRIDISASI *DOT BLOT* MENGGUNAKAN PELACAK OLIGONUKLEOTIDA BERTANDA ³²P

Maria Lina R.¹, Budiman Bela² dan Andi Yasmon²

¹Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Kotak Pos 7002 JKSKL, Jakarta 12070
Telp. 021 7690709, Fax. 021 7691607
E-mail : patir@yahoo.co.id

²Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran
Universitas Indonesia, Jakarta

Diterima 09 Februari 2009; disetujui 03 Juni 2009

ABSTRAK

DETEKSI MUTASI GEN KATG *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DENGAN METODE PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*) - HIBRIDISASI *DOT BLOT* MENGGUNAKAN PELACAK OLIGONUKLEOTIDA BERTANDA ³²P. Penanganan dan pengendalian penyakit tuberkulosis (TB), penyakit yang disebabkan kuman *M. tuberculosis*, menjadi semakin sulit dengan meningkatnya kasus resistensi kuman penyebab terhadap obat anti tuberkulosis (oat) seperti isoniazid. Resistensi dapat terjadi karena penggunaan obat yang tidak tepat dan tidak teratur, sehingga menimbulkan mutasi pada gen yang mengkode/menyandi target oat seperti gen katG (katalase peroxidase G) untuk isoniazid. Teknik biologi molekuler seperti PCR dilanjutkan dengan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak oligonukleotida berlabel radioisotop merupakan teknik deteksi cepat adanya mutasi pada gen tersebut. Percobaan ini bertujuan menerapkan teknik PCR-hibridisasi *dot blot* dengan pelacak oligonukleotida bertanda radioisotop (³²P) untuk mendeteksi adanya mutasi gen katG pada kodon 315 yang menyebabkan *M. tuberculosis* resisten terhadap isoniazid. Dalam penelitian ini digunakan 89 contoh sputum dan kuman standar *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metode BOOM untuk contoh sputum dan metode fenol kloroform untuk kuman standar. Primer oligonukleotida yang dipakai untuk proses PCR adalah Pt8 & Pt9 untuk mendeteksi *Mycobacterium* penyebab tuberkulosis dan RTB 59 & RTB36 untuk mendeteksi keberadaan gen katG, yang masing-masing dirancang dari daerah pada sekuens sisipan IS6110 dan gen katG *M. tuberculosis*. Hasil PCR dideteksi dengan teknik elektroforesis gel agarosa. Metode hibridisasi *dot blot* dengan pelacak oligonukleotida 315 mu bertanda radioisotop ³²P, dilaksanakan untuk mengetahui adanya mutasi gen katG dari hasil PCR dengan primer RTB59 & RTB36. Proses PCR dengan primer Pt8 dan Pt9 menunjukkan hasil positif untuk semua contoh sputum yang menyatakan sputum mengandung *Mycobacterium* penyebab tuberkulosis. Hasil proses hibridisasi *dot blot* dengan pelacak oligonukleotida 315 mu bertanda ³²P, memperlihatkan, 11 strain dari 89 strain *M. tuberculosis* pada contoh sputum, mengalami mutasi pada kodon 315 dari gen katG. Berdasarkan hasil tersebut, dapat dinyatakan bahwa teknik PCR-hibridisasi *dot blot* dengan pelacak oligonukleotida bertanda ³²P adalah metode yang cepat, spesifik, dan sensitif untuk mendeteksi adanya mutasi gen katG *M. tuberculosis* yang berkaitan dengan resistensinya terhadap isoniazid.

Kata kunci : *M. tuberculosis*, gen katG, PCR, hibridisasi *dot blot*, ³²P

ABSTRACT

DETECTION OF KATG GEN MUTATION ON *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY MEANS OF PCR-DOT BLOT HYBRIDIZATION WITH ³²P LABELED OLIGONUCLEOTIDE PROBE METHODS. Handling and controlling of tuberculosis, a disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), is now complicated since there are many MTBs that are resistant against anti-tuberculosis drugs such as isoniazid. The drug resistance could occur due to the inadequate and unregular drug utilization that cause gene mutation of the drug target such as katG gene for isoniazid. The molecular biology techniques such as the PCR-dot blot hybridization with radioisotope (³²P) labeled oligonucleotide probe, has been reported as a technique that is more sensitive and rapid for detection of gene mutations related with drug resistances. Hence, the aim of this study was to apply the PCR-dot blot hybridization technique using ³²P labeled oligonucleotide probe for detection of single mutation at codon 315 of katG gene of MTBs that rise the isoniazid resistance. In this study, we used 89 sputum specimens and a standard MTB (MTB H₃₇RV) as a control. DNA extractions were performed by the BOOM method and the phenol chloroform for sputum samples and standard MTB, respectively. Primers used for PCR technique were Pt8 and Pt9 and RTB 59 and RTB36 for detecting tuberculosis causing *Mycobacterium* and the existence of katG gene, respectively. Both of the primers are specific for IS6110 region and katG gene, respectively. PCR products were detected by an agarose gel electrophoresis technique. Dot blot hybridization with ³²P-oligonucleotide probe 315mu was performed to detect mutation at codon 315 of tested samples. Results of the PCR using primer Pt8 and Pt9 showed that all sputum specimens had positive results. Mutation detection by PCR-dot blot hybridization with ³²P-oligonucleotide probe 315mu, revealed that 11 of 89 tested samples had a mutation at their codon 315 of katG gene. Based upon these results, it is concluded that PCR-dot blot hybridization with ³²P-oligonucleotide probe is a technique that is rapid and highly specific and sensitive for detection of mutation at codon 315 of katG gene related with the resistant MTB against isoniazid.

Key words : *M. tuberculosis*, katG gene, PCR, dot blot hybridization, ³²P

PENDAHULUAN

Sampai saat ini tuberkulosis (TB), penyakit disebabkan bakteri /kuman *M. tuberculosis*, masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia terutama di negara berkembang termasuk Indonesia yang menduduki peringkat ketiga tertinggi di dunia setelah India dan Cina (1). Penanganan dan pengendalian penyakit ini menjadi semakin sulit dengan meningkatnya kasus resistensi kuman TB terhadap obat anti tuberkulosis (oat) seperti rifampisin, isoniazid/INH. Resistensi kuman TB terhadap berbagai oat minimal terhadap isoniazid dan rifampisin dikenal dengan MDR (*Multi Drug Resistance*). Estimasi secara global jumlah kasus MDR di dunia tahun 2006 adalah 4,8% dari semua kasus TB sedangkan untuk Indonesia berjumlah 2,2% (1). Data

resistensi rifampisin & INH tahun 2005 dari RSP Dr Rotinsulu, Bandung adalah 28,2% (2) sedangkan kasus MDR di kabupaten Mimika, provinsi Papua sebesar 2% (2, 3). Penelitian ALAMSJAH (4), menemukan prevalensi resistensi INH di propinsi DKI, Sumatera Barat, dan Sulawesi Selatan berkisar antara 11,9 - 15,6%.

Resistensi dapat terjadi karena penggunaan obat yang tidak tepat dan tidak teratur, sehingga menimbulkan mutasi pada gen yang menyandi target oat seperti isoniazid (INH). Beberapa penelitian menyatakan tidak seperti resistensi terhadap rifampisin, resistensi INH melibatkan mutasi pada beberapa gen *M. tuberculosis* seperti kat G, inhA, kasA, aphC (5, 6, 7). Mutasi terbanyak ditemukan pada gen katG pada kodon 315 yaitu antara 61 - 90% (8, 9,10). Pada kodon 315 mutasi yang paling sering muncul adalah AGC (Serine) menjadi ACC (Threonine) (5, 11, 12). Gen katG menyandi enzim katalase peroksidase yang mengaktifkan INH sebagai *prodrug* sehingga mutasi pada gen tersebut menyebabkan enzim menjadi tidak aktif (4, 9, 13).

Deteksi cepat *M. tuberculosis* resisten oat dengan teknik biologi molekuler seperti PCR dilanjutkan dengan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak DNA bertanda radioisotop dan non radioisotop (14, 15), dapat mendeteksi adanya mutasi pada gen katG. Hal ini sangat penting untuk pengendalian kuman resisten secara efisien. Beberapa penelitian membuktikan penggunaan pelacak DNA bertanda radioisotop pada proses hibridisasi ternyata lebih sensitif dan prosedur yang digunakan lebih sederhana dibandingkan dengan pelacak DNA non isotop.

Percobaan ini dilakukan untuk mendeteksi mutasi gen katG, kodon Ser 315Thr *M. tuberculosis* yang berkaitan dengan resistensinya terhadap isoniazid menggunakan teknik PCR dan hibridisasi dot blot dengan pelacak oligonukleotida bertanda radioisotop (³²P), pada contoh sputum.

TATA KERJA

Persiapan contoh

Contoh yang digunakan dalam percobaan ini adalah 89 spesimen sputum dengan 86 contoh BTA (Basil Tahan Asam) positif dan 3 contoh BTA negatif, diperoleh

dari Perkumpulan Pemberantasan Tuberkulosis Indonesia (PPTI), Kebayoran Lama, Jakarta Selatan. Sputum dihomogenisasi dan didekontaminasi dengan larutan N-asetil sistein dan NaOH dengan tujuan untuk memekatkan bakteri *M. tuberculosis* (MTB) yang terkandung dalam sputum dan untuk menghilangkan kontaminasi mikroorganisme selain Mycobacteria. Sebagai kontrol positif digunakan MTB H₃₇Rv yang disiapkan dari kultur dalam Lowenstein Jensen.

Ekstraksi DNA dan proses PCR

Ekstraksi DNA contoh sputum dilakukan dengan menggunakan metode BOOM (16) Larutan yang terdiri dari Tris-HCl, GuSCN (guanidin tiosianat) sebagai *chaotropic agent*, EDTA, dan triton-x-100, digunakan untuk melisis sel. Suspensi diatom (*Diatomaceous earth*, Sigma D-5384) dipakai untuk mengikat DNA, sedangkan untuk presipitasi DNA dilakukan dengan menggunakan aseton dan etanol 70% dingin. DNA selanjutnya dielusi dengan bufer TE (Tris-EDTA) 1x. Larutan DNA yang diperoleh digunakan sebagai DNA cetakan pada proses PCR. Ekstraksi DNA MTB H₃₇Rv dilaksanakan dengan metode fenol-kloroform (17) yaitu dengan melarutkan kultur bakteri larutan 0,9 % NaCl kemudian disentrifugasi Pelet bakteri yang diperoleh, dilisis dengan larutan TE 1 x, *Sodium Dodecyl Sulfate/SDS*) dan proteinase-K. DNA diekstraksi dengan larutan fenol-kloroform-isoamil alkohol. Presipitasi DNA dilakukan dengan menggunakan etanol.

Proses PCR untuk mengamplifikasi DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan menggunakan 2 pasang primer oligonukleotida. Pasangan pertama adalah primer Pt8 (5'-GTG CGG ATG GTC GCA GAG AT-3') & Pt9 (5'-CTC GAT GCC CTC ACG GTT CA-3') yang didisain dari bagian sekuens sisipan (IS6110), untuk mendeteksi adanya MTB kompleks (MTB yang menyebabkan tuberkulosis) dalam contoh. Pasangan kedua untuk mendeteksi gen katG MTB yaitu primer RTB59 (5'-TGG CCG CGG TCG ACA TT-3') dan RTB 36 (5'-TCG GGG TCG TTG ACC TCC CA-3'). Proses PCR dilakukan dengan mencampur DNA cetakan dengan campuran pereaksi PCR yang terdiri dari, larutan bufer (Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄) 1x, 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM untuk tiap primer oligonukleotida, dan *Taq polymerase* 1,5 U/50 µl. Amplifikasi DNA

menggunakan pasangan primer pertama dan ke dua dilakukan masing-masing dengan 40 dan 35 siklus. Tiap siklus meliputi 3 tahap. Tahap pertama adalah denaturasi yaitu pada suhu 94 °C selama 1,5 menit untuk pasangan primer pertama dan suhu 94°C, 1 menit untuk pasangan ke dua. Tahap kedua adalah *annealing*, untuk primer Pt8 & Pt9 dan RTB59 & RTB36 dilakukan masing-masing pada suhu 65°C, 2 menit, dan 64°C, 1 menit. Tahap *extension* merupakan tahap ketiga, untuk pasangan primer pertama dilaksanakan pada suhu 72°C, 3 menit sedangkan untuk pasangan kedua pada suhu 72°C selama 2 menit. Hasil amplifikasi DNA dideteksi dengan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1,5%, diwarnai dengan larutan etidium bromida (C₂₁H₂₀N₃Br), dan divisualisasi dengan *UV transilluminator* kemudian difoto dengan kamera Polaroid. Besarnya fragmen DNA ditentukan dengan menggunakan penanda berat molekul (*marker*) HaeIIIØX174.

Proses blotting, pelabelan pelacak oligonukleotida, hibridisasi *dot blot* dan autoradiografi

Untuk mengetahui adanya mutasi gen katG, dilakukan proses hibridisasi *dot blot*. dari hasil PCR dengan pelacak oligonukleotida 315 mu (GAT ACC ACC GGC ATC GAG G) yang ditandai radioisotop ³²P, untuk mendeteksi mutasi pada kodon 315 katG dari serine (AGC) menjadi threonine (ACC) DNA hasil PCR dengan menggunakan primer RTB59 & RTB36 didenaturasi dengan pemanasan. Blotting dilaksanakan dengan menspotkan DNA hasil PCR yang telah didenaturasi, pada membran Hybond-N+ dengan menggunakan *dot blotter*, difiksasi pada suhu 80°C selama 1 - 2 jam. Penandaan pelacak oligonukleotida dengan radioisotop ³²P dilakukan dengan mencampur gamma ATP bertanda ³²P, T4 polynukleotida kinase, dan bufer kinase yang kemudian diinkubasi dan diinaktivasi masing-masing pada 37°C, 30 menit, dan 72°C, 10 menit. DNA pada membran dimasukkan dalam larutan prehibridisasi yang terdiri dari 5x larutan SSPE, 5x larutan Denhardt, dan 0,5 % SDS pada suhu 10°C di bawah T_m (*melting temperature*) dari pelacak oligonukleotida, selama 1 jam. Hibridisasi dilakukan dalam larutan yang sama yang ditambah dengan pelacak oligonukleotida yang telah ditandai, pada suhu sama dengan proses prehibridisasi, selama 1 - 2 jam. Membran

selanjutnya dicuci dalam larutan pencuci (2xSSPE, 0,1 % SDS), pada suhu kamar dan 1 x SSPE, 0,1% SDS sekitar suhu T_m. Hasil hibridisasi kemudian divisualisasi dengan memaparkan membran pada hiperfilm / film sinar X pada kaset dalam ruang gelap selama 1 - 2 jam atau satu malam. Film diproses dalam larutan *developer* dan *fixer* kemudian dikeringkan.

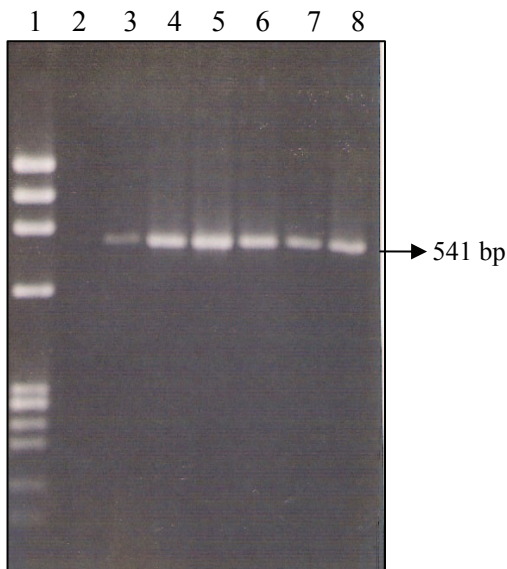
HASIL DAN PEMBAHASAN

IS6110 adalah daerah target amplifikasi dengan menggunakan primer Pt8 dan Pt9. yang mempunyai sensitivitas cukup tinggi untuk mendeteksi MTB *complex* dengan fragmen/pita DNA berukuran 541 bp (*base pair*) sebagai hasil amplifikasinya (Gambar 1). Tebal tipisnya pita DNA pada gel agarosa menunjukkan banyak sedikitnya DNA yang teramplifikasi. Makin banyak DNA, makin tebal pita DNA. Hasil PCR positif pada 89 contoh sputum termasuk 3 contoh (No. 14, 15, 16) dengan BTA negatif, (Tabel 1), menunjukkan bahwa metode PCR lebih sensitif dari metode konvensional secara mikroskopik. Hasil penelitian terdahulu menyatakan, batas deteksi DNA MTB H₃₇Rv dengan primer Pt8 & Pt9 dan YNP5 & YNP6, dirancang dari gen *pab* yang menyandi antigen b protein 38 kDa MTB, masing-masing adalah 10 fg (setara dengan 2 sel bakteri) dan 5pg (setara dengan 1000 sel bakteri) (17).

Gen *katG* adalah daerah target amplifikasi dengan menggunakan primer RTB36 & RTB59 dengan fragmen DNA berukuran 804 bp sebagai hasil amplifikasinya (Gambar 2).

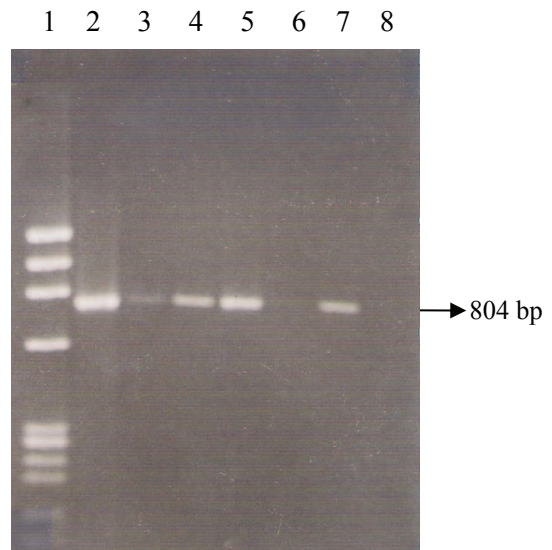
Contoh No.1 & No.2 memperlihatkan hasil PCR positif dengan primer Pt8 & Pt9, sedangkan dengan primer RTB36 & RTB 59, negatif. (Tabel 1). Hal yang memungkinkan adalah sedikitnya/tidak adanya fragmen DNA target yang teramplifikasi pada gen *katG* karena adanya inhibitor pada spesimen tersebut atau adanya perubahan susunan nukleotida pada gen *katG* karena mutasi, sehingga suhu *annealing* untuk proses PCR pada penelitian ini kurang sesuai untuk ke dua spesimen tersebut. Kemungkinan lain PCR dengan primer Pt8 & Pt9 (IS6110 PCR) lebih sensitif dari pada primer RTB59 & RTB36 (PCR untuk *katG*). Mutasi gen *katG* yang berkaitan

dengan resistensi terhadap INH dari hasil PCR-sequensing terlihat pada 29 di antara 38 isolat MTB dan 2 dari 29 isolat tersebut mengalami *complete katG deletion*, dinyatakan dengan tidak adanya produk PCR untuk *katG* (9). Hasil penelitian YIU LEUNG *et al.* (18) memperlihatkan dari 187 spesimen *sputum* dan *bronchialveolar lavage* dengan BTA dan kultur positif MTB, hanya 161 sampel positif *katG* PCR dan dari analisis sensitivitas menunjukkan IS6110 10 kali lebih sensitif dari pada *katG* PCR dengan batas deteksi MTB dengan IS6110 dan *katG*PCR masing-masing adalah 1,5 dan 15 c.f.u.



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk PCR dengan primer Pt8 & Pt9

Lajur 1 : Marker HaeIIIØX174
Lajur 2 : Kontrol negatif
Lajur 3 s/d 7 : MTB sputum
Lajur 8 : Kontrol positif (MTB H₃₇Rv)



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk PCR dengan primer RTB36 & RTB 59

Lajur 1 : Marker HaeIII ØX174
Lajur 2 : Kontrol positif (MTB H₃₇Rv)
Lajur 3 s/d 7 : MTB sputum
Lajur 8 : Kontrol negatif

Keterangan :

Gambar 1 : Lajur 3 s/d 8 : terdapat pita DNA berukuran 541 bp menunjukkan adanya *Mycobacterium* penyebab tuberkulosis
Gambar 2 : Lajur 2 s/d 7 : terdapat pita DNA berukuran 804 bp menunjukkan adanya gen *katG*. Lajur 3 dan 6: pita DNA tampak tipis

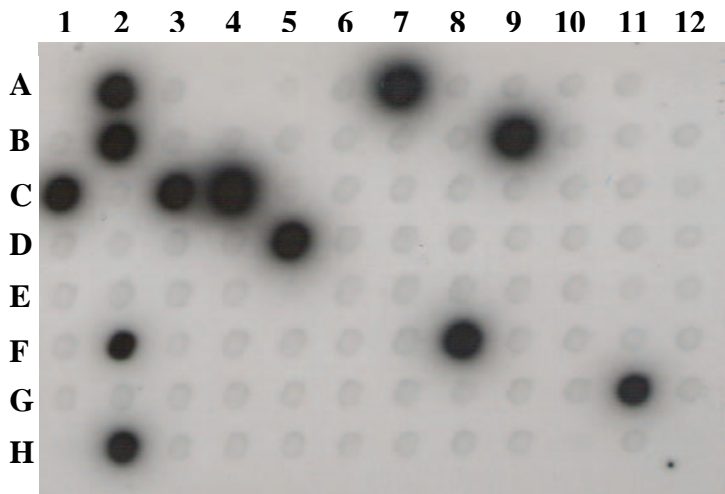
Tabel 1. Hasil BTA, PCR dengan Primer Pt 8 & Pt 9, Primer RTB 36 & 59, dan Hibridisasi *Dot Blot* dengan Probe KatG 315 mu Bertanda ³²P dari Contoh Sputum

No. Contoh Sputum	BTA	Primer Pt8 & Pt9	Primer RTB 36 & 59	Hibridisasi Dot Blot
1.	+ 1	+	-	-
2.	+ 1	+	-	-
3.	+ 1	+	+	+
4.	+ 1	+	+	+
5.	+ 1	+	+	+
6.	+ 1	+	+	+
7.	+ 1	+	+	+
8.	+ 2	+	+	+
9.	+ 2	+	+	+
10.	+ 2	+	+	+
11.	+ 3	+	+	+
12.	+ 3	+	+	+
13.	+ 3	+	+	+
14.	-	+	+	-
15.	-	+	+ tipis	-
16.	-	+	+ tipis	-
17 s/d 53	+ 1	+	+	-
54 s/d 74	+ 2	+	+	-
75 s/d 89	+ 3	+	+	-

Keterangan : Hasil BTA = Pemeriksaan secara mikroskopis kuman basil tahan asam
 + 1 = terdapat 10-99 sel kuman dalam 100 lapangan pandang
 + 2 = terdapat 1 - 10 sel kuman dalam 1 lapangan pandang
 + 3 = terdapat > 10 sel kuman dalam 1 lapangan pandang

Hasil PCR - hibridisasi *dot blot* dari 89 contoh sputum dalam penelitian ini, menunjukkan hasil positif yang dinyatakan dengan adanya *dot* hitam pada film (Gambar 3). Mutasi pada kodon 315 (ser315thr) yaitu AGC (ser) → ACC (thr) terdapat pada 11 (12,36%) dari 89 contoh sputum. Penelitian Bostanabad *et al.* (12), menyatakan dari 163 spesimen sputum dari pasien dengan tuberkulosis paru aktif, 42 isolat adalah

resisten INH secara konvensional dengan metode proposional dan berdasarkan metode PCR-sequencing, tipe mutasi terbanyak pada isolat MTB resisten INH adalah kodon gen katG ser315thr, yaitu 85,7%. Hasil penelitian lainnya dengan metode yang sama, juga memperlihatkan, mutasi terbanyak pada gen katG ser 315thr yaitu 36 - 75% (5, 9, 19, 20, 21). Deteksi mutasi pada isolat MTB dengan teknik PCR-reverse dot blot bertanda biotin menunjukkan juga tipe mutasi tertinggi gen katG adalah ser315thr yaitu 56,6% (22).



Gambar 3. Hasil hibridisasi dot blot produk PCR dengan oligonukleotida (katG315 mu) bertanda ³²P dari 89 contoh sputum.

- A2 : Kontrol positif
- H11 : MTB H₃₇Rv (Kontrol negatif mutasi)
- H10 : Kontrol negatif (tanpa DNA)
- Dot hitam lain : MTB dari sputum
- Keterangan : Huruf dan angka menunjukkan ditematkannya produk PCR dari contoh.

Strain MTB pada 78 contoh menunjukkan hasil negatif PCR-hibridisasi dot blot yaitu tidak adanya dot hitam pada film (Gambar 3) yang menunjukkan tidak terjadinya mutasi katGser315thr pada strain tersebut. Tidak terjadinya mutasi kemungkinan disebabkan strain-strain masih sensitif isoniazid. Berdasarkan hasil PCR-sequencing,

semua strain MTB sensitif INH dengan alat BACTEC MGIT 960, menunjukkan sekuens *wild type* (20). Kemungkinan lain tidak terjadinya mutasi pada percobaan ini, strain mengalami tipe mutasi lain pada kodon katG315 atau kodon lain pada gen katG atau mutasi terjadi pada gen lain yang menjadi target isoniazid. Pada isolat MTB resisten isoniazid, didapatkan juga tipe mutasi lain pada kodon katG315 seperti AGC(ser) →AGG/AGA (arg) = 0,9 - 2,4% (12, 20, 22) , AGC (ser) →AAC(Asn)= 1,9 - 5,7% (9, (12, 20, 22), AGC (ser) →GGC(gly) = 1,1 - 2,4% (12, 20), dan AGC→ ATC (Ile) = 1,1- 2,4% (12 , 20). Mutasi kodon lain pada gen katG seperti kodon 279, 309, 314, 316, 397, dan 529 terdapat pada MTB resisten isoniazid (9, 12, 19, 21). Pada MTB resisten isoniazid juga didapatkan adanya mutasi selain gen katG yaitu gen *inhA*, *kasA*, dan *ahpc* (5, 9, 20, 21, 22). Menurut ZHANG *et al.* yang dikutip oleh GUO *et al.* (5), dan VAN SOOLINGEN *et al.* yang dikutip BAKONYTE *et al.* (23), mutasi pada katG ser315thr MTB, berkaitan dengan tingkat resistensi INH yang tinggi.

Deteksi MTB resisten oat seperti isoniazid secara molekuler yaitu dengan mendeteksi adanya mutasi pada gen yang menjadi target oat telah mulai dikembangkan seperti teknik PCR-RFLP, PCR-SSCP, PCR-Sequencing, PCR-reverse/ dot blot hybridization, line blot hybridization, real time PCR (13, 14, 18, 22, 23, 24, 25, 26). Menurut VICTOR *et al.* yang dikutip oleh CHO *et al.* (26), hanya metode deteksi menggunakan pelacak bertanda radioisotop dan *enchance chemiluminesce* yang cukup sensitif untuk mendeteksi mutasi pada MDR MTB. Hasil penelitian Thon *et al.* (27) menyatakan sensitivitas pelacak DNA bertanda radioisotop untuk deteksi hepatitis B virus, 10 kali lebih tinggi dari pada pelacak bertanda biotin.

Hasil penelitian PCR-hibridisasi dot blot dapat digunakan secara efisien untuk survei prevalensi MDR-TB dan epidemiologik yang sangat penting untuk pengendalian tuberkulosis di Indonesia khususnya MDR-TB.

KESIMPULAN

1. Metode PCR-hibridisasi dot blot dengan pelacak bertanda ³²P merupakan metode cepat, sensitif, spesifik untuk mendeteksi mutasi gen katG pada kodon ser315thr

MTB yang berkaitan dengan resistensinya terhadap isoniazid, langsung dari spesimen sputum.

2. Metode tersebut merupakan metode deteksi yang efisien untuk survei prevalensi MDR-MTB.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. IAEA (International Atomic Energy Agency) atas bantuan dana melalui program TC (Technical Cooperation).
2. Sdr. Rika Heryani dan Almaida atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing WHO Report, Available at http://www.stoptb.org/events/world_tb_day/2008/assets/documents/WHO_2008_global_TB_report_pdf, (2008).
2. ANDRA, Update on tuberculosis and respiratory disorders 2007, Kupas tuntas tuberculosis, Simposia 6 12, Available at: <http://www.majalah.farmacia.com/rubric/one-news.asp?IDNews=530> (2007).
3. KELLY, P.M., ARDIAN, M., WARAMORI, G., ANSTEY, N.M., SYAHRIAL, H., TJITRA, E., BASTIAN, I., MAGUIRE, G.P., and LUMB, R., A communitybased TB drug Susceptibility study in Mimika District, Papua Province, Indonesia, *Tuberc. Lung Dis.*, **10** (2), 167-171 (2006).
4. ALAMSJAH, B., Epidemiologi Genetik Serta Faktor Risiko *Mycobacterium tuberculosis* yang Resisten INH dan atau Rifampisin, Disertasi Program Doktor Ilmu Kesehatan Masyarakat, Program Pascasarjana, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia (2003).
5. GUO, H., SEET, Q., DENKIN, S., PARSONS, L., and ZHANG, Y., Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA, *J. Med. Microbiol.*, **55**, 1527-1531 (2006).
6. KIEPIELA, P., BISHOP, K.S., SMITH, A.N., ROUX, L., and YORK, D.F., Genomic mutations in the *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes are useful for the prediction of

isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa, *Tuberc. and Lung Dis.*, **80**, 47-56 (2000).

7. LEE, A.S.G., LIM, I.H.K., TANG, L.L.H., TELENTI, A., and VONG, S.Y., Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **43**, 2087-2089 (1999).
8. ABE, C., KOBAYASHI, I., MITARAI, S., WADA, M., KAWABE, Y., TAKASHIMA, T., SUZUKI, K., HWEI SNG, L., WANG, S., HTAY, H.H., and OGATA, H., Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan, *J. Clin. Microbiol.*, **46** (7), 2263-2268 (2008).
9. RAMASWAMY, S.V., REICH, R., DOU, S.J., JASPERSE, L., PAN, X., WANGER, A., QUITUGUA, T., and GRAVISS, E.A., Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **47** (4), 1241-1250 (2003).
10. VAN RIE, A., WARREN, R., MSHANGA, I., JORDAAN, A.M., VAN DER SPUY, G.D., RICHARDSON, M., SIMPSON, J., GIE, R.P., ENARSON, D.A., BEYERS, N., VAN HELDEN, P.D., and VICTOR, T.C., Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community, *J. Clin. Microbiol.*, **39** (2), 636-641 (2001).
11. AHMAD, S., FARES, E., ARAJ, G.F., CHUGH, T.D., and MUSTAFA, A.S., Prevalence of S315T mutation within the *katG* gene in isoniazid-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Dubai and Beirut, *Tuberc. and Lung Dis.*, **6** (10), 920-926 (2002).
12. BOSTANABAD, S.Z., TITOV, L.P., BAHRMAND, A., NOJOURI, S.A., Detection of mutation in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from tuberculosis patients in Belarus, Brief Communication, *Indian Journal of Medical Microbiology*, **26** (2), 143-147 (2008).
13. MOKROUSOV, I., NARVSKAYA, OTTEN, T., LIMESCHENKO, E., STEKLOVA, L., and VYSHNEVSKIY, B., High prevalence of *katG* ser315thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **46** (5), 1417-1424 (2002).
14. VICTOR, T.C., JORDAAN, A.M., VAN RIE, A., VAN DER SPUY, G.D., RICHARDSON, M., VAN HELDEN, P.D., and WARREN, R., Detection of

-
- mutations in drug resistance genes of *Mycobacterium tuberculosis* by dot-blot hybridization, *Tuberc. and Lung Dis.*, **79**, 343-348 (1999).
15. LINA, M.R., Deteksi resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap rifampisin berdasarkan mutasi gen rpo β (RNA polymerase sub unit β) dengan metode PCR (Polymerase Chain Reaction), *Jurnal Respiriologi Indonesia*, **27** (3), 161-166. (2007).
 16. KOLK, A.H.J., KOX, L.F.F., VAN LEEUWEN, J., KUIJPER, S., Polymerase Chain Reaction for the *M. tuberculosis* Complex, Laboratory of Tropical Hygiene, Department of Biomedical Research Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherland, 1-35 (1995).
 17. LINA, M.R., Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan Reaksi Berantai Polimerasa/Polymerase Chain Reaction (PCR) (tesis), Program Pascasarjana, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia (1998).
 18. YIU LEUNG, E.T., KAM, K.M., CHIU, A., HO, P.L., SETO, W.H., YUEN, K.Y., and YAM, W.C., Detection of katG ser315thr substitution in respiratory specimens from patients with isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using PCR-RFLP, *J. Med. Microbiol.*, **52**, 999-1003 (2003).
 19. OZTURK, C.E., SANIC, A., KAYA, D., and CEYHAN, I., Molecular analysis of isoniazid, rifampin and streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Duzce, Turkey, *Jpn., J. Infect. Dis.*, **58**, 309-312 (2005).
 20. ZHANG, M., YUE, J., YANG, Y.P. ZHANG, H. M., LEI, J.Q., JIN, R.L., ZHANG, X.L., and WANG, H.H., Detection of mutations associated with isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China, *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5477-5482 (2005).
 21. N'GUESSAN, G., FLORENCE, B., NICOLAS, V., N'GUETTA, A., EULOGE, E., IREMIEN, N., JACQUEMIN, K., MIREILLE, D., WLADIMIR, S., and VINCENT, Molecular characteristic of isoniazid and rifampicin resistance strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from new tuberculosis cases in Lagunes region (Cote D'Ivoire), *Scientific Research and Essay*, **3** (7), 312-315 (2008).
 22. WU, X.Q., LU, Y., ZHANG, J.X., LIANG, J.Q., LI, H.M., ZHANG, G.Y., LU, C.H., and DING, B.C., Detection of the mutation in katG315 and inhA-15 of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Chinese patients, *Chin. Med. J.*, 230-233 (2006).

23. BAKONYTE, D., BARANAUSKAITE, A., CICENAITE, J., SOSNOVSKAJA, A., and STAKENAS, P., Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Lithuania, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **47** (6), 2009-2011 (2003).
24. DE VIEDMA, D.G., Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : a review discussing molecular approaches, *Clin. Microbial. Infect.*, **9**, 349-359 (2003).
25. MARIN, M., DE VIEDMA, D.G., SERRANO, M.J.R., and BOUZA, E., Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutation in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **48** (11), 4293-4300 (2004), (Abstrak).
26. CHO, S.N. and BRENNAN, O.J., Tuberculosis : Diagnostic, (Review), *Tuberculosis* **87**, 514-517 (2007).
27. IAEA-TECDOC-1528, Organization of a Radioisotopes Based Molecular Biology Laboratory, Vienna, Austria, IAEA (2006).