

PROSES AMPLIFIKASI DAERAH PROMOTER *inhA* PADA ISOLAT P11 *Mycobacterium tuberculosis* MULTIDRUG RESISTANCE DI BALI DENGAN TEKNIK POLYMERASE CHAIN REACTION

Asmara, A. A. R.¹⁾, Yustiantara, P. S.^{1,2)}, Yowani, S.C.^{1,2)}

¹⁾Jurusan Farmasi-Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Universitas Udayana

²⁾Kelompok Studi MDR& XDR-TB-Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Universitas Udayana

Korespondensi: Asmara, A. A. R.

Jurusan Farmasi-Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Universitas Udayana

Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 0361-703837

Email: ria_asmara@yahoo.com

ABSTRAK

Saat ini, *Multidrug resistance Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) menjadi salah satu masalah kesehatan di dunia. Resistensi terhadap isoniazid dapat dipengaruhi oleh mutasi pada daerah promotor *inhA*. Untuk memperoleh titik mutasi di daerah promotor *inhA* maka terlebih dahulu dilakukan amplifikasi fragmen DNA target. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu *annealing* optimum primer yang dapat mengamplifikasi fragmen target daerah promotor *inhA*. Fragmen target diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan sepasang primer yaitu primer *forward* (*mabA-inhA-promoter-FS*) dengan urutan 5'ACATACCTGCTGCGCAAT3' dan primer *reverse* (*mabA-inhA-promoter-R*) dengan urutan 5'CTCCGGTAACCAGGACTGAA3'. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa sepasang primer yang digunakan pada suhu *annealing* 54° telah dapat mengamplifikasi fragmen 0,3 kb daerah promotor *inhA*.

Kata Kunci: MDR-TB, Daerah promotor *inhA*, Suhu *annealing*, PCR

1. LATAR BELAKANG

Tuberkulosis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Pada tahun 2011, tuberkulosis menempati urutan kedua penyebab kematian setelah HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (WHO, 2012). Pada tahun 2011 di Provinsi Bali terdapat 1450 kasus penderita TB paru dan sebanyak 513 kasus (35%) ditemukan di Kota Denpasar (Agung dkk., 2013).

Upaya pengendalian terhadap tuberkulosis semakin sulit dengan munculnya kasus *Multidrug Resistance Tuberculosis* (MDR-TB). WHO (2012) mendefinisikan MDR-TB sebagai penyakit tuberkulosis yang disebabkan oleh *M. tuberculosis* yang resistensetidaknya terhadap isoniazid dan rifampisin yang merupakan obat antituberkulosis lini pertama yang paling efektif. Resistensi terhadap isoniazid dapat

terjadi akibat adanya mutasi pada *inhA*. Studi terhadap *inhA* mengungkapkan bahwa telah ditemukan mutasi pada daerah ORF (*Open Reading Frame*) *inhA* sebanyak 9 dari 41 isolat (22%). Sedangkan sebanyak 27 dari total 41 isolat (66%) menunjukkan mutasi pada daerah promotor *inhA* yaitu pada posisi -15 (Morlock *et. al.*, 2003). Hazbon *et al.* (2003) melaporkan frekuensi terjadinya mutasi pada daerah promotor *inhA* sebesar 8-20% dibandingkan pada ORF (*Open Reading Frame*) yaitu 0-5%. Tingginya persentase mutasi yang terjadi pada daerah promotor *inhA* ini mendorong pentingnya dilakukan penelitian untuk menemukan titik mutasi yang mengakibatkan resistensi terhadap isoniazid. Mutasi pada daerah promotor *inhA* dapat menyebabkan ekspresi berlebihan dari protein *InhA*, peningkatan level target obat dan resistensi INH melalui

mekanisme titrasi dosis (Ramaswamy dan Musser, 1998; Zhang dan Yew, 2009).

Optimasi suhu *annealing* terhadap primer *forward* dan *reverse* ini dilakukan untuk memperoleh satu suhu *annealing* yang optimal sehingga primer dapat menempel dengan tepat pada fragmen daerah target dan selanjutnya memperbanyak fragmen target. Penggunaan suhu *annealing* yang tepat diharapkan akan diperoleh produk PCR yang optimal. Penentuan variasi suhu yang akan digunakan pada proses optimasi suhu *annealing* primer didasarkan pada nilai T_m primer yang diperoleh melalui analisis *in silico* dengan menggunakan program *Clone Manager Suite 6*.

Adanya resistensi terhadap obat lini pertama tuberkulosis mendorong pentingnya deteksi cepat *M. tuberculosis* untuk menentukan terapi yang tepat bagi pasien. Pada penelitian ini dilakukan amplifikasi fragmen target pada daerah promoter *inhA* dengan menggunakan teknik PCR pada isolat MDR-TB di provinsi Bali. Tahap awal penelitian ini yaitu melakukan pemilihan primer yang tepat untuk dapat mengamplifikasi fragmen target daerah promoter *inhA* dan penentuan suhu *annealing* primer sehingga dapat diperoleh produk PCR yang optimal.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat P11 MDR-TB, larutan pelisis L6 (GuSCN, Tris-HCl, EDTA dan Triton-X), suspensi diatom, buffer L2 (GuSCN, Tris-HCl), *aquadest*, etanol 70% dan aseton untuk proses isolasi DNA. Sepasang primer (primer *forward* (*mabA-inhA*-promoter-FS) dengan urutan 5'ACATACCTGCTGCGCAAT3' dan primer *reverse* (*mabA-inhA*-promoter-R) dengan urutan 5'CTCCGGTAACCAGGACTGAA3'), H₂O, PCR mix untuk tahap amplifikasi dengan PCR. Gel agarosa 1,5% (Promega), marker 100 bp DNA ladder, TBE (Tris-Boric Acid-EDTA) (Invitrogen) dan etidium bromide (Promega) untuk deteksi PCR dengan elektroforesis gel agarosa.

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 Pemilihan dan Analisis Primer

Primer yang digunakan dalam proses amplifikasi fragmen target promoter *inhA* dengan metode PCR ditentukan melalui studi pustaka terhadap *database* yang terdapat pada NCBI. Pada penelitian ini digunakan sepasang primer oligonukleotida (*GenBank*: U66801.1) berdasarkan penelitian oleh Chen *et al.* (2011) yaitu primer *forward* (*mabA-inhA*-promoter-FS) 5'ACATACCTGCTGCGCAAT3' dan primer *reverse* (*mabA-inhA*-promoter-R) dengan urutan 5'CTCCGGTAACCAGGACTGAA3'. Analisis primer dilakukan dengan menggunakan program *Clone Manager Suite 6* untuk menentukan primer yang digunakan telah memenuhi kriteria primer dalam program dan dapat digunakan dalam proses amplifikasi dengan PCR.

2.2.2 Isolasi DNA *M. tuberculosis* MDR

Isolasi DNA *M. tuberculosis* dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Boom yang telah dimodifikasi (Boom *et al.*, 1990).

2.2.3 Optimasi terhadap Suhu *Annealing* Primer *Forward* dan *Reverse*

Proses optimasi tahap awal terhadap suhu *annealing* dilakukan pada 6 suhu berbeda yaitu suhu 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C dan 62°C. Optimasi dilakukan terhadap suhu *annealing* primer *forward* dan *reverse*. Pada optimasi tahap pertama dilakukan optimasi terhadap suhu *annealing* yaitu dengan kondisi pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 15 menit; 45 siklus PCR yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, gradien suhu *annealing* selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit; serta ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

Optimasi tahap kedua terhadap suhu *annealing* dilakukan pada 3 suhu berbeda dengan perbedaan antar suhu sebesar 1°C. Suhu yaitu suhu 54, 55 dan 56°C. Kondisi PCR yang digunakan sama dengan kondisi PCR pada optimasi tahap pertama. Templat DNA yang

Proses Amplifikasi Daerah Promoter *inhA* pada Isolat P11 *Mycobacterium tuberculosis* Multidrug Resistance di Bali dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (Asmara, A. A. R., Yustiantara, S., Yowani, S.C.)

digunakan dalam formula PCR merupakan templat tanpa pengenceran.

2.2.4 Deteksi Produk PCR menggunakan Elektroforesis Gel Agarosa 1,5%

Produk akhir PCR dideteksi dengan metode elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5% b/v yang dilarutkan dalam TBE 1x yang mengandung etidium bromida. Sampel hasil PCR sebanyak 3 μ L dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5%. Marker yang digunakan adalah marker 100 bp DNA ladder (Invitrogen) sebanyak 3 μ L. Elektroforesis dilakukan selama 35 menit pada tegangan 65 volt. Visualisasi dan dokumentasi hasil elektroforesis dilakukan dengan menggunakan alat UV Transluminator *Gel Doc XR System* (BioRad®).

3 HASIL

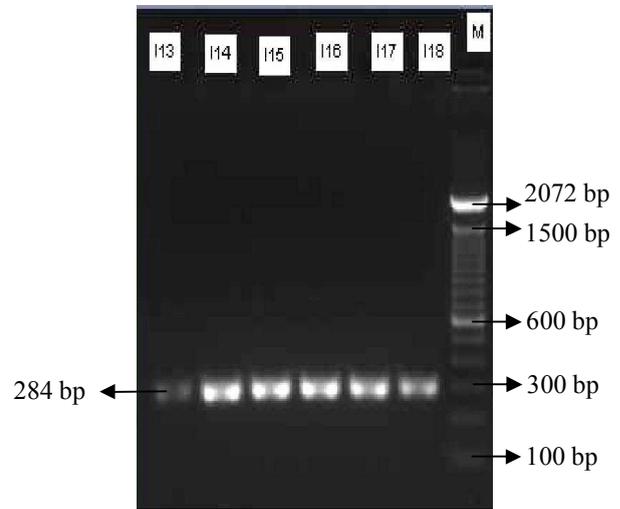
3.1 Pemilihan dan Analisis Primer

Berdasarkan hasil analisis *in silico* dengan program *Clone Manager Suite 6*, primer *forward* dan *reverse* yang digunakan telah memenuhi kriteria primer yang baik dan dapat digunakan dalam tahap amplifikasi untuk mengamplifikasi daerah target yang diharapkan. Primer ini digunakan untuk mengamplifikasi fragmen target daerah promoter *inhA* sebesar 284 bp.

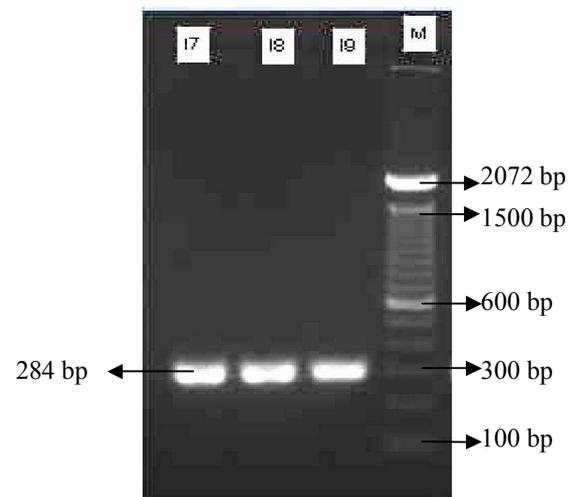
3.2 Optimasi Suhu *Annealing* Primer *Forward* dan *Reverse*

Berdasarkan hasil optimasi tahap awal diperoleh adanya pita pada isolat P11 yang menunjukkan bahwa primer yang digunakan telah berhasil mengamplifikasi sekuen DNA templat yang diinginkan. Hasil optimasi primer tahap pertama ditunjukkan pada Gambar 1.

Pada hasil optimasi primer tahap pertama belum dapat ditentukan suhu *annealing* primer yang optimum. Untuk itu dilakukan optimasi PCR tahap kedua menggunakan tiga suhu berbeda. Hasil optimasi primer tahap kedua ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 1 Elektroforegram produk PCR hasil optimasi tahap pertama primer *forward* dan *reverse*. I₁₃-I₁₈: pita fragmen promoter *inhAM. tuberculosis* isolat P11 pada suhu 52°C (I₁₃), 54°C (I₁₄), 56°C (I₁₅), 58°C (I₁₆), 60°C (I₁₇), 62°C (I₁₈); M: Marker 100 bp DNA ladder.



Gambar 2 Elektroforegram produk PCR hasil optimasi tahap kedua primer *forward* dan *reverse*. M: Marker 100 bp DNA ladder; I₇-I₉: pita fragmen promoter *inhAM. tuberculosis* isolat P11 pada suhu 54°C (I₇), 55°C (I₈), 56°C (I₉).

4 PEMBAHASAN

4.1 Optimasi Suhu *Annealing* Primer *Forward* dan *Reverse*

Proses amplifikasi promoter *inhA* pada isolat P11 MDR-TB dengan teknik PCR dilakukan dengan menggunakan sepasang primer yaitu primer *forward* (*mabA-inhA*-promoter-FS) 5'ACATACCTGCTGCGCAAT3' dan primer *reverse* (*mabA-inhA*-promoter-R) 5'CTCCGGTAACCAGGACTGAA3' (Chen *et al.*, 2011). Tahap *annealing* merupakan salah satu tahap penting dalam PCR (Handoyo dan Ari, 2001). Optimasi terhadap suhu *annealing* primer *forward* dan *reverse* dilakukan untuk menentukan T_a optimal agar primer dapat menempel secara spesifik pada DNA templat dan diperoleh produk PCR yang optimal.

Proses optimasi tahap awal terhadap suhu *annealing* dilakukan pada 6 suhu yang berbeda dengan perbedaan suhu sebesar 2°C. Suhu yang digunakan yaitu 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C dan 62°C. Pemilihan suhu tersebut didasarkan atas nilainya yang mendekati nilai T_a yang disarankan pada program *Clone Manager Suite 6* yaitu suhu 55°C. Berdasarkan hasil optimasi PCR tahap pertama (Gambar 1) diperoleh pita pada isolat P11. Hal ini menunjukkan bahwa primer yang digunakan telah berhasil mengamplifikasi sekuen DNA templat yang diinginkan. Spesifisitas penempelan primer ditunjukkan dari hanya terdapat satu fragmen DNA hasil amplifikasi dengan PCR. Produk PCR (amplikon) yang dihasilkan ditunjukkan oleh adanya pita dengan ukuran fragmen sebesar 284 pb.

Pada Gambar 1 terlihat bahwa pita fragmen promoter *inhA* yang dihasilkan untuk isolat P11 pada suhu *annealing* 54°C, 56°C, 58°C dan 60°C memiliki tebal yang relatif sama, namun pita pada suhu 62°C relatif lebih tipis. Sementara itu, pita fragmen promoter *inhA* yang dihasilkan pada suhu 52°C sangat tipis. Pita yang sangat tipis ini diasumsikan dapat disebabkan oleh perbedaan kualitas isolat dan konsentrasi DNA pada isolat. Tipisnya pita yang dihasilkan dipengaruhi oleh sedikitnya jumlah DNA yang terdapat pada sampel dan penyimpanan yang cukup lama dalam larutan sehingga terjadi

pengurangan jumlah produk (templat DNA) (McPherson dan Simon, 2006). Hasil optimasi PCR tahap pertama belum dapat menunjukkan suhu *annealing* yang optimum untuk digunakan pada tahap amplifikasi. Oleh karena itu, untuk menentukan suhu *annealing* yang optimum dilakukan kembali optimasi terhadap suhu *annealing*.

Pada optimasi tahap kedua ini, suhu yang dipilih yaitu mendekati nilai T_a yang disarankan pada program *Clone Manager Suite 6* yaitu suhu 55°C. Selain itu dipilih juga suhu 54°C dan 56°C karena berdasarkan hasil elektroforegram pada optimasi tahap pertama, visualisasi pita fragmen promoter *inhA* pada suhu 54°C dan 56°C menunjukkan pita yang relatif lebih tebal dibandingkan pada suhu lainnya. Suhu *annealing* yang digunakan pada optimasi tahap kedua ini adalah suhu 54, 55 dan 56°C. Pada Gambar 2 terlihat bahwa pita fragmen promoter *inhA* pada isolat P11 memiliki tebal yang relatif sama pada ketiga suhu. Namun pada suhu *annealing* 54°C menghasilkan pita DNA yang relatif tebal secara konstan dan suhu ini memiliki kedekatan suhu *annealing* dengan hasil analisis *in silico* primer. Oleh karena itu, suhu *annealing* primer yang akan dipilih sebagai suhu optimum saat proses amplifikasi dengan metode PCR adalah suhu 54°C. Hal ini karena dengan suhu yang lebih rendah diharapkan akan mempermudah terjadinya hibridisasi primer pada templat (Borah, 2011).

Hasil deteksi produk PCR dengan elektroforesis gel menunjukkan bahwa amplifikasi fragmen promoter *inhA* telah berhasil dilakukan yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA berukuran 0,3 kb. Hal ini sesuai dengan hasil produk PCR (amplikon) yang diharapkan saat analisis primer yaitu sebesar 284 pb. Visualisasi elektroforegram menunjukkan pita fragmen promoter *inhA* yang cukup tebal sehingga dapat digunakan sebagai templat dalam proses sekuensing. Hasil tersebut menunjukkan bahwa primer *forward* (*mabA-inhA*-promoter-FS) yaitu dengan urutan 5'ACATACCTGCTGCGCAAT3' dan primer *reverse* (*mabA-inhA*-promoter-R) dengan urutan 5'CTCCGGTAACCAGGACTGAA3' ini telah

Proses Amplifikasi Daerah Promoter *inhA* pada Isolat P11 *Mycobacterium tuberculosis* Multidrug Resistance di Bali dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (Asmara, A. A. R., Yustiantara, S., Yowani, S.C.)

mampu mengamplifikasi fragmen 0,3 kb daerah promoter *inhA*.

5 KESIMPULAN

Suhu *annealing* optimum primer yang digunakan adalah 54°C dan amplifikasi fragmen 0,3 kb daerah promoter *inhA* dengan teknik PCR telah berhasil dilakukan dengan menggunakan sepasang primer (primer *forward* (*mabA-inhA*-promoter-FS) dan primer *reverse* (*mabA-inhA*-promoter-R).

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kami ucapkan kepada Kepala Bagian Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah yang telah menyediakan isolat MDR-TB dan seluruh staf Laboratorium Biomolekular Fakultas kedokteran Universitas Udayana yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agung, A.A. G., Sawitri, A. A., dan Wirawan, D.N.(2013). Rendahnya Proporsi Kontak yang Melakukan Deteksi Dini Tuberculosis Paru di Puskesmas I Denpasar Selatan tahun 2012. *Public Health and Preventive Medicine Archive*, 1(1),55- 62
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M.,Jansen, C. L.,van Dillen, P. M. E. W. dan Van Der Noordaa, J. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *JClin Microbiol*, 28(3), 495-503
- Borah, P. 2011. Primer Designing for PCR. *Science Vision*, 11(3), 134-136
- Chen, X., Kong, F., Wang, Q., Li,C., Zhang, J. danGilbert, G. L. (2011). Rapid Detection of Isoniazid, Rifampin, and Ofloxacin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Using High-Resolution Melting Analysis. *JClin Microbiol*, 49(10), 3450-3457
- Handoyo, D. danRudiretna, A. (2001). Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 9(1), 17-29
- McPherson, M. dan Moller, S. (2006). *PCR* 2nd Edition. UK: Taylor & Francis Group
- Morlock, G. P., Metchock,B., Sikes, D., Crawford, J. T. dan Cooksey, R. C. (2003).

ethA, *inhA*, dan, *katG* Loci of Ethionamide-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *J Clin Microbiol*, 47(12), 3799-3805

Ramaswamy, S. dan Musser, J. S. (1998). Molecular Genetic Basic of Antimicrobial Agent Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*: 1998 Update. *Tubercle and Lung Dis*, 79(1), 3-29

WHO. (2012). *Global Tuberculosis Report 2012*. Switzerland: WHO Press. P. 1-6

Zhang Y. dan Yew, W. (2009). Mechanism of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J TubercLung Dis*, 13(11), 1320- 1330