

## OPTIMASI SUHU ANNEALING DAN AMPLIFIKASI 0,3 kb GEN *rpoB* DI HULU DARI RRDR PADA ISOLAT P16 *Mycobacterium tuberculosis* MULTIDRUG RESISTANT DI BALI DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION

Putu Lita Astriani<sup>1</sup>, Ketut Ratnayani<sup>2,3</sup>, Sagung Chandra Yowani<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Bali-Indonesia

[Astrianilita@gmail.com](mailto:Astrianilita@gmail.com), [cyowani@yahoo.com](mailto:cyowani@yahoo.com)

<sup>2</sup> Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Bali-Indonesia

[Ratnayaninew@gmail.com](mailto:Ratnayaninew@gmail.com)

<sup>3</sup> Kelompok Studi MDR dan XDR-TB, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Bali-Indonesia

**ABSTRAK:** Mutasi di hulu dari RRDR diindikasikan sebagai adanya *low level resistance* [1]. Untuk mendapatkan titik mutasi di hulu dari RRDR maka perlu dilakukan amplifikasi fragmen DNA target. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui suhu *annealing* optimum untuk mengamplifikasi daerah hulu dari RRDR menggunakan isolat P16 *Multidrug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) yang didapatkan dari RSUP Sanglah. Proses isolasi DNA dilakukan dengan metode Boom termodifikasi. Deteksi produk PCR dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% b/v dan divisualisasi pada alat UV Transiluminator. Hasil dari penelitian ini diketahui bahwa dengan proses PCR menggunakan sepasang primer FrL2 dan RevL2 dengan suhu *annealing* optimum 58<sup>0</sup>C dapat mengamplifikasi daerah hulu dari RRDR berukuran 0,3 kb.

**Kata kunci:** *M. tuberculosis*; hulu RRDR; suhu *annealing*; PCR

**ABSTRACT:** Mutations at the upstream of RRDR indicated as the presence of low level resistance [1]. To find a point mutation at the upstream of RRDR it is necessary to amplify of the target DNA fragment. The aim of this research was to determinate the optimum annealing temperature to amplify the upstream region of the RRDR using isolate from Sanglah Hospital. Isolation DNA processed by Boom modification method. Product PCR detected using agarosa gel 1,5% b/v and was visualisation by UV Transiluminator. The results of this research, by PCR method using the pairs primer FrL2 and RevL2 with optimum annealing temperature 58<sup>0</sup>C, can amplify 0,3 kb the upstream region of RRDR.

**Keywords:** *M. tuberculosis*; upstream RRDR; annealing temperature; PCR

### 1.PENDAHULUAN

*Mycobacterium tuberculosis* merupakan penyebab timbulnya penyakit Tuberkulosis (TB). WHO melaporkan bahwa telah terjadi lebih dari 9 juta kasus baru di tahun 2011 dan 1,4 juta meninggal akibat TB (990.000 di antaranya pasien

yang negatif HIV dan 430.000 menderita TB disertai HIV). Pada tahun 2011 Indonesia menduduki peringkat ke-4 sebagai negara dengan penderita TB terbanyak di dunia dengan jumlah 400.000-500.000, setelah India sejumlah 2-2,5 juta,

Cina sejumlah 900.000-1,1 juta, dan Afrika Selatan sejumlah 400.000-600.000 [2].

Banyak ditemukan galur *M. tuberculosis* resisten terhadap dua atau lebih OAT (Obat Anti Tuberkulosis) yang dikenal sebagai galur *Multi-Drug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) [3]. Strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap rifampisin, 96% diantaranya memiliki mutasi di segmen 81-pb gen *rpoB* [4]. Gen *rpoB* merupakan suatu *house-keeping gene* yang menyandi subunit  $\beta$  dari RNA polimerase dan dapat menghalangi sintesis mRNA karena gen *rpoB* mampu menghalangi hibridisasi nukleotida pertama untuk mengaktifkan RNA polimerase. Daerah ini dikenal sebagai daerah RRDR (*Rifampicin Resistance Determining Region*) dan mutasi biasanya terjadi pada kodon antara 507-533 [5]. Selain di daerah RRDR mutasi juga dapat terjadi pada daerah di luar RRDR [1]. Pada penelitian di India ditemukan pula adanya mutasi di luar RRDR yaitu pada kodon 145, 170, 173, 174, 176, 181, dan 184 [6]. Mutasi diluar RRDR diindikasikan sebagai adanya *low level resistance* [7].

Untuk dapat memberikan terapi yang cepat dan tepat pada pasien TB, metode diagnosis dan deteksi *M. tuberculosis* menjadi amat penting [8]. Salah satu caranya yaitu dengan membuat suatu database yang berisi informasi mengenai titik mutasi yang sering terjadi pada MDR-TB di suatu wilayah [6]. Maka dari itu diperlukan penelitian-penelitian lainnya untuk mencari titik mutasi baru di luar RRDR. Tahap awal dari penelitian tersebut yaitu dengan menemukan primer yang tepat untuk dapat mengamplifikasi daerah diluar RRDR khususnya bagian hulu (125-425 pb) dan suhu annealing optimumnya sehingga didapatkan hasil proses PCR yang optimal .

## 2. PERCOBAAN

### 2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah larutan pelisis L6 (GuSCN, Tris-HCl, EDTA dan Triton-X), suspensi diatom, buffer L2 (GuSCN dan Tris-HCL), serta etanol 70% dingin dan aseton untuk proses isolasi DNA. Sepasang primer FrL2 5' CTA AGC TGC GCG AAC CAC TTGA 3' dan RevL2 5' TGA TGA ACT CGG CGG TGA CGAA 3'. PCR mix (Promega) untuk tahap amplifikasi gen *rpoB*. Dan untuk deteksi produk hasil PCR digunakan agarosa (Promega), TBE (Invitrogen), dan *Ethidium Bromida* (Promega). Peralatan yang digunakan di antaranya mesin PCR (Veriti® *Thermal Cycler*), horizontal elektroforesis (Power Pac Basic™, USA), Gel Doc (Bio-Rad).

### 2.2 Metode

#### 2.2.1 Isolasi DNA dari isolat *M. tuberculosis multi-drug resistant*

Tahap isolasi DNA sampel dilakukan dengan menggunakan metode yang telah dimodifikasi dari metode Boom [9]. Menggunakan larutan pelisis L6 (GuSCN, Tris-HCl, EDTA dan Triton-X), lalu ditambahkan suspensi diatom. Selanjutnya dikocok dengan *shaker* selama 15 menit dengan kecepatan 100 rpm dan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Pelet dicuci sebanyak dua kali dengan larutan buffer L2 (GuSCN dan Tris-HCL), serta satu kali dengan etanol 70% dingin dan aseton yang masing-masing sebanyak 1 mL. Pelet dikeringkan pada suhu 56°C. Akuades steril ditambahkan ke dalam pelet lalu diinkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang diperoleh digunakan

sebagai templat PCR. Semua proses tersebut dilakukan di dalam *Biological safety cabinet class II*.

### 2.2.2 Optimasi suhu annealing dan amplifikasi gen *rpoB* *M. tuberculosis* dengan PCR.

PCR dilakukan dengan menggunakan sepasang primer yang telah didesain khusus pada penelitian ini dengan menggunakan aplikasi *Clone Manager Suite 6*. Sepasang primer ini digunakan untuk mengamplifikasi daerah hulu dari RRDR (kodon 125-425 pb). Tahap PCR terdiri dari siklus predenaturasi pada 95°C selama 15 menit lalu dilanjutkan dengan 45 siklus amplifikasi yang terdiri dari denaturasi selama 1 menit pada 94°C, *annealing* selama 1 menit dan untuk suhunya akan dilakukan optimasi menggunakan enam suhu yang berbeda yaitu 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, dan 62°C. Serta elongasi selama 1 menit pada 72°C. Tahap akhir amplifikasi gen *rpoB* adalah elongasi akhir pada 72°C selama 10 menit.

### 2.2.3 Deteksi produk PCR

Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% b/v. Elektroforesis dilakukan dengan *running buffer* TBE (Tris-Boric Acid-EDTA) 1x pada tegangan 65 volt selama 35 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi pada alat UV Transiluminator (Gel Doc).

## 3. HASIL dan PEMBAHASAN

### 3.1 Isolasi dan Identifikasi Hasil Isolasi

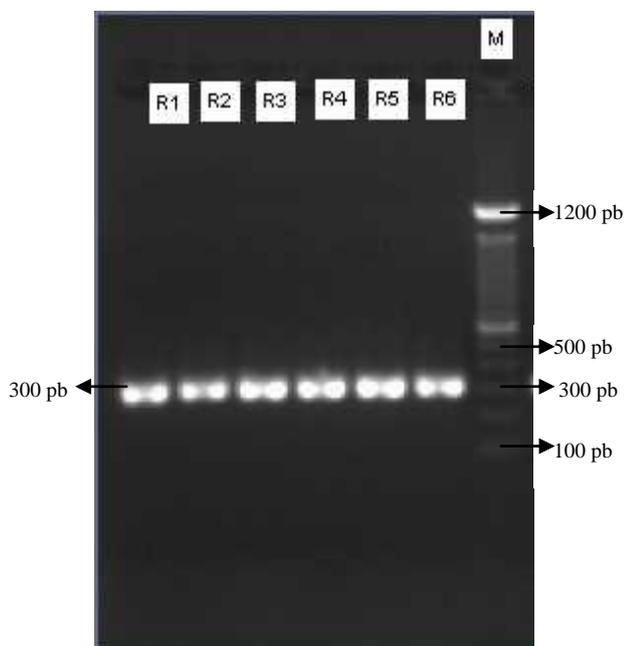
Pada metode Boom ini digunakan larutan L6 yang terdiri dari GuSCN, Tris-HCl, Triton-X 100 dan EDTA sebagai larutan pelisis. Guanidium thiocyanate (GuSCN) diketahui sebagai reagen yang

kuat untuk melisis dinding sel, selain itu GuSCN berpotensi untuk menginaktivasi nuklease yang mampu mendegradasi molekul DNA. Pada saat proses isolasi juga ditambahkan suspensi diatom yang bertujuan untuk mengikat DNA hasil proses pelisisan. Sehingga setelah dilakukan sentrifugasi DNA dalam diatom akan berada pada bagian peletnya [9]. *Washing buffer* L2, etanol 70% dan aseton dingin digunakan untuk mencuci pelet, tujuannya untuk menghilangkan sisa pengotor yang ada pada DNA kromosom [10]. Selain itu etanol 70% dan aseton dingin berfungsi untuk proses presipitasi setelah disentrifugasi pada kecepatan tinggi. Selanjutnya DNA dilusi dengan akuades steril dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, sehingga nantinya DNA berada pada bagian supernatannya dan digunakan sebagai templat dalam proses PCR [11].

### 3.2 Optimasi suhu annealing dan amplifikasi gen *rpoB* *M. tuberculosis* dengan PCR.

Suhu *annealing* ( $T_a$ ) yang optimum merupakan salah satu faktor penting yang menentukan keberhasilan proses PCR [12]. Suhu yang diperlukan untuk primer berhasil menempel pada DNA target tersebut disebut dengan suhu *annealing*. Bila suhu *annealing* yang digunakan tidak tepat, misalnya terlalu rendah dari suhu optimum, maka akan menyebabkan terjadinya *false priming*, dan apabila suhu *annealing* lebih besar dari suhu optimumnya maka primer tidak dapat menempel pada DNA target sehingga proses PCR tidak berhasil [13]. Penentuan suhu optimum primer yang akan digunakan untuk mengamplifikasi daerah hulu dari RRDR pada isolat P16 dilakukan dengan membandingkan enam suhu yaitu 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C dan 62°C.

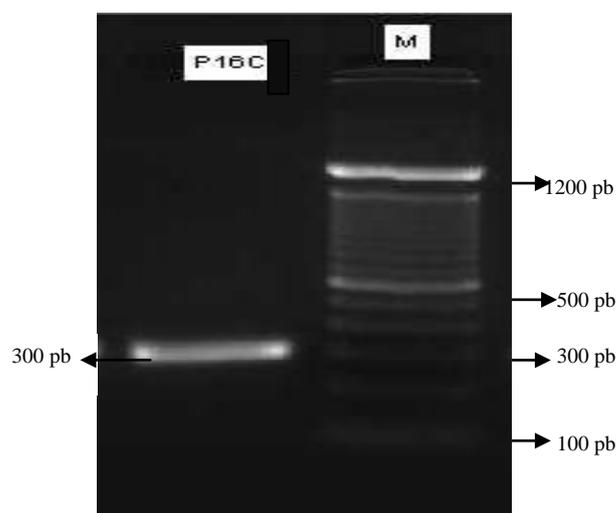
Alasan pemilihan suhu tersebut karena nilainya mendekati Ta yang disarankan dari hasil analisis *in silico* pada *Clone Manager Suite 6 (University of Groningen)*. Hasil optimasi menggunakan enam suhu tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1.1. Elektroforegram produk PCR hasil optimasi primer. M: Marker 100 bp DNA ladder; R1-R6 adalah pita fragmen 0,3 kb isolat P16 pada suhu *annealing* 52°C (R1); 54°C (R2); 56°C (R3); 58°C (R4); 60°C (R5); 62°C (R6).

Berdasarkan hasil optimasi tersebut dapat dilihat bahwa pada enam suhu yang digunakan, dihasilkan pita fragmen DNA yang hampir sama tebalnya. Gambar 1 menunjukkan bahwa primer dapat menempel dengan baik pada templat menggunakan semua suhu *annealing* yang diuji. Sementara itu uji *in silico* pada program *Clone Manager Suite 6 (University of Groningen)*, diketahui suhu *annealing* untuk primer adalah 58°C. Jika produk amplifikasi yang dihasilkan sama baiknya, dalam hal ini tidak terjadi hibridisasi

sekunder dan pita DNA yang cukup tebal, maka Ta yang lebih rendah akan dipilih. Hal ini dikarenakan Ta yang tinggi dapat menghalangi hibridisasi templat sehingga dihasilkan produk PCR yang lebih sedikit [14].



Gambar 2. Elektroforegram produk PCR hasil amplifikasi 0,3 kb.

Berdasarkan hal tersebut maka akan dipilih suhu 58°C sebagai suhu *annealing* optimum, sesuai dengan suhu *annealing* optimum yang ditunjukkan oleh program *Clone Manager Suite 6 (University of Groningen)*. Dengan primer yang telah berhasil didesain dihasilkan amplifikasi fragmen gen *rpoB* sebesar 0,3 kb (Gambar 2). Hal ini sesuai dengan target yang diharapkan untuk mendesain primer yang dapat mengamplifikasi daerah 125-425 pb (sebesar 0,3 kb). Hasil tersebut menunjukkan bahwa primer FrL2 5' CTA AGC TGC GCG AAC CAC TTGA 3' dan RevL2 5' TGA TGA ACT CGG CGG TGA CGAA 3' mampu mengamplifikasi daerah 125-425 pb gen *rpoB M. tuberculosis*.

#### 4. KESIMPULAN

Amplifikasi 0,3 kb gen *rpoB M. tuberculosis* daerah hulu dari RRDR (125-

425 pb) dengan metode PCR dapat dilakukan dengan menggunakan sepasang primer FrL2 dan RevL2. Proses PCR dilakukan dengan denaturasi awal pada suhu 95<sup>0</sup>C selama 15 menit, proses amplifikasi sebanyak 45 siklus, yang tiap siklusnya terdiri dari proses denaturasi 94<sup>0</sup>C selama 1 menit, *annealing* pada suhu optimum 58<sup>0</sup>C selama 1 menit, dan *elongasi* pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 1,5 menit. Serta *elongasi* akhir pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 10 menit.

## 5. UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Kepala Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Sanglah yang telah menyediakan isolat MDR-TB, dan kepada seluruh staf Laboratorium Biomolekuler Fak. Kedokteran Universitas Udayana yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

## 6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Heep, M., B. Brandstätter, U. Rieger, N. Lehn, E. Richter, S. Rüscher-Gerdes dan S. Niemann. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39(1):107
- [2] World Health Organization. *Global Tuberculosis Report, 2012.*
- [3] Retnoningrum, D.S., dan Roga F.K. Mekanisme Tingkat Molekul Resistensi Terhadap Beberapa Obat pada *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Pharmaceutica Indonesia.* 2004, 29(1): 92-95.
- [4] Yong Fan, *et al.* Rapid Detection of *rpoB* Gene Mutations in Rifampin Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Shanghai by Using the Amplification Refractory Mutation System. *Journal of Clinical Microbiology (JCM).* 2002, 41 (3): 993-997.
- [5] Syaifudin, M., Rosilawati, M.L., Irawan, H., dan Bela, B. *Identifikasi Mycobacterium Tuberculosis dan Analisis Mutasi Gen rpoB dan kat-G Penyebab Resistensi Ganda dengan Teknik Molekuler.* Laporan Penelitian. Balitbang BATAN, 2007.
- [6] Lingala, *et al.* Clinical and Geographical Profiles of *rpoB* Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Hyderabad and Koraput in India. *Journal of Microbiology and Antimicrobials.* 2010, 2(2): 13-18.
- [7] Cole, Stewart T., Kathleen Davis E., David N. McMurray, William R. Jacobs. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus.* Press, American Society for Microbiology Press, 2005.
- [8] Lorenzo, David., Shaker A. Mousa. Mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Journal Elsevier Acta Tropica.* 2011, 119 :5-10.
- [9] Boom, R *et al.* Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal Of Clinical Microbiology.* 1989, Vol 28 No.3: 495-503