

ISOLASI DNA METAGENOMIK DARI SPUTUM PASIEN TUBERKULOSIS DAN AMPLIFIKASI DENGAN PRIMER PROMOTER *inhA*

Ni Made Yustikarini¹, Sagung Chandra Yowani^{1,2}, I Nengah Wirajana^{1,2}

¹ Program Studi Kimia Terapan, Program Pasca Sarjana Universitas Udayana Bali Indonesia

² Kelompok Studi MDR & XDR TB FMIPA Universitas Udayana Bali Indonesia

*cwowani@yahoo.com

ABSTRAK: Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh DNA metagenomik dari sputum pasien tuberkulosis dan mengamplifikasi dengan menggunakan primer promoter *inhA*. Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap, yaitu: isolasi DNA metagenomik dari sputum pasien tuberkulosis, amplifikasi menggunakan sepasang primer promoter *inhA* dari *M. tuberculosis* dengan metode PCR, dan elektroforesis gel agarosa terhadap hasil amplifikasi. Elektroforegram hasil amplifikasi menunjukkan bahwa isolasi DNA metagenomik dari sputum pasien tuberkulosis telah berhasil dilakukan dengan metode modifikasi maupun dengan kit. Ukuran pita fragmen DNA sekitar 284 bp dari hasil amplifikasi (amplikon) yang diperoleh dari DNA metagenomik sputum P.48B, P.46B, dan P.47B MDR- TB merupakan ukuran yang sesuai dengan bagaian dari daerah promoter *inhA* *M. tuberculosis*. Ukuran amplikon ini sama dengan ukuran amplikon yang sebelumnya telah diperoleh dari amplifikasi terhadap DNA *M. tuberculosis* oleh peneliti sebelumnya dengan menggunakan primer yang sama.

Kata kunci : DNA metagenomik, sputum, *Mycobacterim tuberculosis*, primer promoter *inhA*

ABSTRACT: The aims of this research were to obtain metagenomic DNA from sputum of tuberculosis patients and to amplify it by using *inhA* promoter primer. This research was conducted in three steps covering the DNA metagenomic isolation from sputum of tuberculosis patients, amplification of *inhA* promoter region of *M. tuberculosis* by using specific primer pair by PCR (Polymerase Chain Reaction) method, and electrophoresis of amplified products using agarose gel. The electrophoregram of amplified products showed that the metagenomic DNA isolation from sputum of tuberculosis patients was successfully carried out both by the modified method and by a kit. The size of DNA fragment bands about 284 bp of amplified products (amplicons) which obtained from the metagenomic DNAs of P.48B, P.46B, P.47B sputum was suitable size with a part of *inhA* promoter region of *M. tuberculosis*. The size of these amplicons was the same size with the amplicons from *M. tuberculosis* DNA reported by other researchers.

Keywords : Metagenomic DNA, sputum, *Mycobacterium tuberculosis*, *inhA* promoter

1. PENDAHULUAN

Mikroorganisme yang tidak dapat diperkirakan masih ada sekitar 99%.
dikulturkan dengan teknik standar Metagenomik muncul sebagai metode baru

yang dapat mempelajari genom kolektif dari anggota komunitas mikroba yang tidak dapat terkulturkan dengan teknik standar. Metode metagenomik diawali dengan isolasi DNA total dari semua mikroorganisme dalam sampel tanpa dikulturkan terlebih dahulu [1,2].

Metagenomik, suatu metode yang dapat digunakan untuk proses sekuensing tanpa melalui kultur dan analisis semua asam nukleat yang didapatkan dari sampel, merupakan metode yang potensial untuk mendeteksi mikroorganisme baik yang telah diketahui maupun yang baru. Beberapa tahun terakhir metagenomik telah terbukti sangat berguna dalam penelusuran spesies baru, bencana dan penyakit yang kompleks. Oleh karena itu metagenomik berpotensi untuk merevolusi deteksi patogen dalam laboratorium kesehatan publik. Deteksi secara simultan semua mikroorganisme dalam sampel klinik dapat dilakukan dengan metode ini [3].

Sejumlah penelitian metagenomik dari bakteri yang tidak bisa dikulturkan pada mikrobiom manusia telah berkembang pesat dan hal ini banyak dipelajari di area mikrobiologi yang sangat potensial untuk dikerjakan di praktek klinik [4]. Diagnosis adanya infeksi bakteri dengan pendekatan metagenomik pernah dilakukan oleh Nakamura *et al.* (2008) pada pasien yang mengalami penyakit diare. Pada penelitian tersebut digunakan pendekatan metagenomik untuk mendeteksi DNA bakteri patogen dari feses pasien selama terkena diare dan setelah sembuh. Hasil sekuensing DNA menunjukkan kesamaan terbaik dengan *Campylobacter jejuni* yang hanya terdeteksi pada sampel yang berasal dari pasien selama masa sakit [5].

Tuberkulosis (TBC), penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan sampai saat ini masih menjadi masalah serius di seluruh dunia, karena merupakan penyebab kematian tertinggi. Diagnosis tuberkulosis khususnya tuberkulosis paru, dapat ditegakkan dengan

pemeriksaan klinik, pemeriksaan laboratorium, dan pemeriksaan radiologik [6].

Pada umumnya metode yang digunakan adalah metode konvensional seperti pemeriksaan mikroskopik basil tahan asam (BTA) dan pemeriksaan kultur. Pemeriksaan mikroskopik cukup cepat dan ekonomis akan tetapi sensitivitas dan spesifitasnya masih kurang sedangkan pemeriksaan kultur memerlukan waktu yang cukup lama, sekitar 3- 12 minggu [7].

Identifikasi cepat pada mikobakteria merupakan hal yang sangat penting karena hal ini akan sangat membantu pada penanganan awal dan tepat untuk pasien. Bagaimanapun, identifikasi mikobakteri dengan menggunakan metode konvensional memerlukan waktu yang cukup lama dan tidak selalu meyakinkan [8,9]. Oleh karenanya, untuk mengatasi keterbatasan tersebut, diperlukan metode deteksi *M. tuberculosis* yang cepat, sensitif dan spesifik.

Isolasi DNA metagenomik secara langsung dari sampel, sebagai tahapan awal dalam deteksi *M. tuberculosis* dari sputum pasien tuberkulosis belum pernah dilaporkan. Metode yang digunakan dalam isolasi DNA metagenomik ini merupakan tahapan penting yang menentukan kualitas DNA total yang diperoleh. Kualitas DNA total ini berkaitan dengan keberhasilan proses selanjutnya, yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk menganalisis sekuen yang khas dari *M. tuberculosis*.

Berdasarkan pemaparan di atas, pada penelitian ini dilakukan deteksi *M. tuberculosis* dari DNA metagenomik sputum pasien tuberkulosis. DNA metagenomik yang diperoleh dari sputum pasien penderita tuberkulosis diamplifikasi dengan primer promoter *inhA* dalam metode PCR, sehingga diharapkan deteksi penyakit ini dapat dilakukan lebih cepat dan sederhana.

2. PERCOBAAN

2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan penelitian yang digunakan adalah sampel sputum dengan kode P48B, P46B,

P47B dan P44B yang diambil dari pasien MDR-TB pada poliklinik paru rawat jalan RSUP Sanglah. Bahan kimia yang digunakan dalam tahap isolasi DNA adalah larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*), suspensi diatom, larutan TE (Tris-EDTA), larutan pelisis untuk isolasi DNA dari isolat MTB (guanidin tiosianat, Tris-HCl, EDTA, dan Triton-X), larutan pelisis untuk isolasi DNA metagenomik (Tris HCl 100 mM pH 8; EDTA 100 mM pH 8; NaCl 1,5 M; dan natrium fosfat 100 mM pH 8; dan SDS 2%), proteinase K, etanol 70%, aseton serta, NaOH, kloroform, isoamil alkohol, isopropanol. Sedangkan untuk deteksi produk PCR dengan elektroforesis, bahan yang digunakan adalah agarosa (Promega), TBE (Tris-Borat-EDTA) dan TAE (Tris-Asetat-EDTA), serta EtBr (Ethidium Bromida).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang biasa digunakan dalam laboratorium analisis, satu set pipet mikro 0,1-10 μ L, tabung mikro (Eppendorf) 1,5 mL, vorteks, *shaker rotator* tipe H-SR 200, *Biological Safety Cabinet Class II, Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge*, lemari pendingin, *waterbath*, *Thermalcycler* (Sensoquest), kertas parafilm, satu set alat elektroforesis, serta GelDoc (BioRad).

2.2 Metode

2.2.1 Isolasi DNA metagenomik dengan metode modifikasi

Isolasi DNA metagenomik dari sputum menggunakan metode modifikasi dari Zhou *et al.* (1996) dan Patel *et al.* (1997). Pada penelitian ini dilakukan modifikasi metode dari Zhou *et al.* (1996) yang merupakan metode isolasi DNA metagenomik dari tanah. Untuk mengaplikasikan metode tersebut pada sampel sputum, maka metode tersebut dipadukan dengan metode Patel *et al.* (1997) yang digunakan untuk mengisolasi DNA *M. Tuberculosis* [10,11]. Sampel sputum ditambahkan dengan volume yang sama 1 M NaOH, kemudian disuspensi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya

disentrifugasi pada 3000 x g selama 20 menit, dan supernatan dibuang.

Pelet sputum yang diperoleh disimpan pada -20°C selama 1 jam, kemudian diinkubasi pada 80°C selama 45 menit dan didinginkan ke dalam es selama 15 menit. Suspensi di atas ditambah 0,5 mL buffer lisis dan dihomogenkan dengan vorteks selama 1 menit dan diinkubasi pada 60° C selama 2 jam (setiap interval 15 menit dihomogenkan dengan vorteks).

Setelah suspensi tercampur merata, ditambahkan 10 μ L proteinase K (10 mg/mL). Selanjutnya suspensi di atas diinkubasi pada 37°C dengan guncangan selama 45 menit. Setelah itu suspensi disentrifugasi pada kecepatan 5000 x g selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro baru steril.

Supernatan tersebut ditambahkan campuran kloroform : isoamil alkohol (perbandingan volume = 24 : 1), kemudian disentrifugasi pada 10.000 x g selama 15 menit. Lapisan atas diambil, dipindahkan ke dalam tabung steril baru dan dicampur dengan isopropanol sebanyak 1 kali volume. Campuran ini diinkubasi pada suhu -20°C selama 2 jam. Selanjutnya campuran tersebut disentrifugasi pada 10.000 x g selama 15 menit.

Pelet yang diperoleh ditambah 100-200 μ L etanol 70 %, dan disimpan pada -20° C selama 15 menit, lalu disentrifugasi kembali pada 10.000 x g selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan pada suhu kamar, selanjutnya dilarutkan dalam 200 μ L buffer TE pH 8 (Tris Cl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8).

2.2.2 Isolasi DNA metagenomik dengan kit

Isolasi DNA metagenomik dari sputum pasien *M. tuberculosis* dilakukan dengan Kit (*PowerSoil DNA Isolation Kit* dari *MO BIO Laboratories, Inc.*). Sebanyak 900 μ L sputum (hasil preparasi di atas) ditambahkan pada tabung *Power Bead* kemudian divorteks. Selanjutnya 60 μ L larutan C1 ditambahkan pada campuran di atas dan digetarkan dengan vorteks pada kecepatan maksimum selama 10

menit. Campuran ini disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 1 menit pada suhu ruang. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke *collection tube* berukuran 2 ml, kemudian ditambahkan larutan C2 sebanyak 250 μ L, digetarkan dengan vorteks selama 5 detik lalu diinkubasi pada suhu 4°C selama 5 menit, setelah itu disentrifugasi pada suhu ruang pada kecepatan 10.000 x g selama 1 menit.

Supernatan hasil sentrifugasi di atas diambil sebanyak 600 μ L, kemudian ditaruh dalam *collection tube* berukuran 2 ml dan ditambahkan larutan C3 sebanyak 200 μ L. Campuran ini digetarkan dengan vorteks, diinkubasi pada suhu 4°C selama 5 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 1 menit.. Sebanyak 750 μ L supernatan dipindahkan dalam *collection tube* berukuran 2ml lalu ditambahkan 1200 μ L larutan C4 dan digetarkan dengan vorteks selama 5 detik.

Campuran ini diambil sebanyak 675 μ L dan dimasukkan ke *Spin Filter* dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 1 menit pada suhu ruang. Supernatan yang tersisa dimasukkan ke *Spin Filter* dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 1 menit pada suhu ruang. Larutan hasil saringan dalam *collection tube* dibuang. *Spin Filter* (yang sudah mengikat DNA) ditambahkan 500 μ L larutan C5 dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 1 menit, lalu larutan hasil saringan dibuang. *Spin filter* disentrifugasi lagi pada kecepatan 10.000 x g selama 1 menit. Sebanyak 100 μ L larutan C6 ditambahkan ke pusat filter dalam *Spin Filter* yang sudah diletakkan dalam tabung mikro 1,5 mL baru, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 1 menit. Hasil sentrifugasi merupakan larutan DNA hasil elusi dari *Spin Filter* dan disimpan pada suhu -20°C atau langsung digunakan untuk tahapan berikutnya.

2.2.3 Amplifikasi Daerah Promoter *inhA* dengan PCR

Hasil Isolasi DNA metagenomik sputum dan DNA isolat *M. tuberculosis* diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan alat *thermocycler (Sensoquest)*. Sepasang primer yang digunakan untuk amplifikasi adalah primer yang dipilih berdasarkan analisis pustaka [12]. Berikut adalah urutan nukleotida yang digunakan 5'CTGGTTAGCGGAA-TCATCAC-3' untuk primer *forward* dan 5'-CGACCGTCATCCAGTTGTA-3') untuk primer *reverse*.

Proses PCR diawali dengan predenaturasi awal pada 95°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 45 siklus amplifikasi (denaturasi selama 1 menit pada 94°C, *annealing* pada suhu yang dioptimasi sebelumnya, dan polimerisasi selama 1 menit pada 72°C) dan polimerisasi akhir pada 72°C selama 5 menit.

2.2.4 Deteksi DNA dengan elektroforesis

Produk PCR dideteksi dengan metode elektroforesis agarosa 1,3 % . Gel agarosa (Promega) dilarutkan dalam TBE 1X (Invitrogen) dan mengandung etidium bromida (0,5 μ g/ml). Produk PCR divisualisasi pada GelDoc (BioRad).

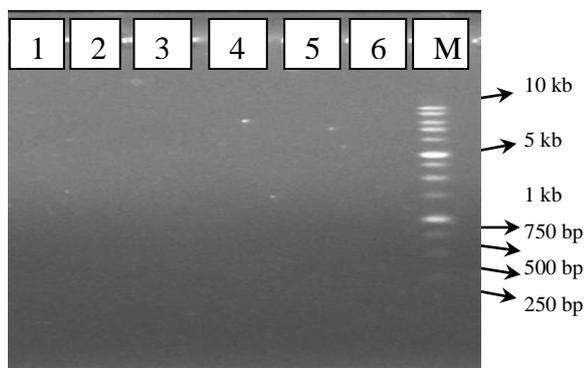
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA Metagenomik dengan metode modifikasi menghasilkan DNA yang tidak dapat terdeteksi pada elektroforesis agarosa (Gambar 1).

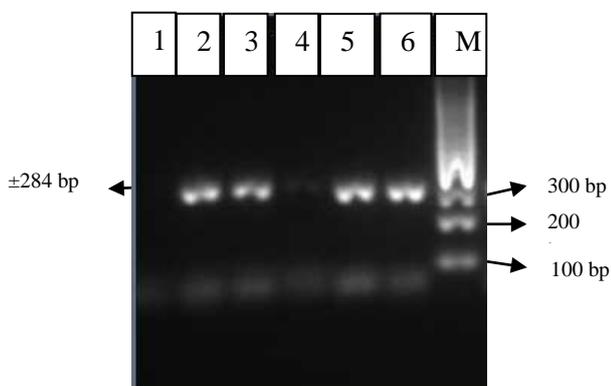
Konsentrasi DNA hasil isolasi yang sangat rendah dapat menyebabkan tidak dapat terdeteksinya pita-pita DNA dengan elektroforesis. Walaupun demikian, untuk membuktikan bahwa DNA metagenomik dari sputum telah dapat diisolasi, maka dilakukan amplifikasi menggunakan metode PCR.

Untuk mengetahui kualitas DNA dan deteksi *M. tuberculosis* yang diisolasi, maka selanjutnya dilakukan PCR Hasil amplifikasi produk PCR tersebut kemudian dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa dan ditunjukkan pada Gambar 2. Dari deteksi produk PCR didapatkan bahwa ukuran DNA

yang dihasilkan sesuai dengan sekuen target yaitu sekitar 284 bp.



Gambar 1. Elektroforegram DNA metagenomik sebelum amplifikasi dengan PCR. M : marker 250 bp DNA ladder, 1:DNA metagenomik P48B, 2: DNA metagenomik P46B, 3: DNA metagenomik P47B, 4 : DNA metagenomik P44B, 5 : DNA metagenomik P48B Kit, 6 : DNA metagenomik P46B Kit.

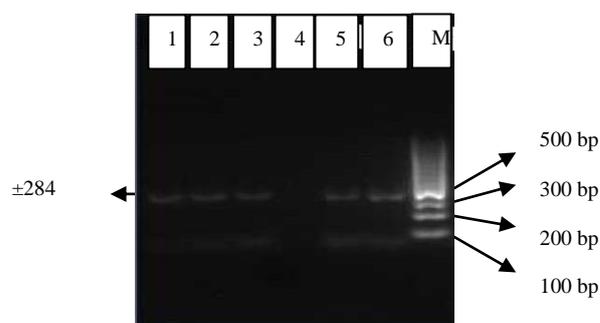


Gambar 2. Elektroforegram produk PCR pertama dari DNA metagenomik. M : Marker 100 bp DNA ladder, 1: DNA metagenomik P48B ,2:DNA metagenomik P46B, 3:DNA metagenomik P47B, 4 :DNA metagenomik P44B, 5: DNA metagenomik P48B Kit, 6 : DNA metagenomik P46B Kit.

Pada elektroforegram Gambar 3 menunjukkan bahwa pita fragmen DNA berukuran sekitar 284 bp dapat terdeteksi, yang diduga sebagai fragmen promoter *inhA* dari DNA metagenomik sputum pasien TB.

Hasil ini menunjukkan bahwa proses amplifikasi dengan teknik PCR telah berhasil dilakukan. Namun amplifikasi PCR terhadap DNA metagenomik sputum P48B dan P44B menunjukkan pita fragmen DNA berukuran sekitar 284 bp yang sangat tipis.

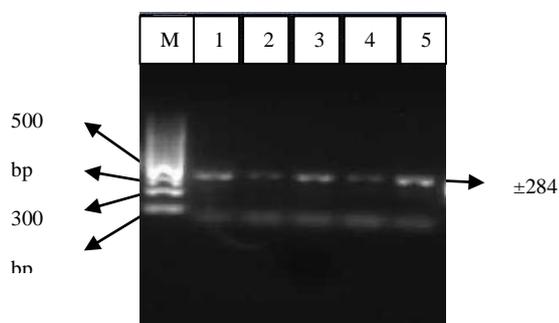
Selanjutnya dilakukan amplifikasi ulang dengan kondisi PCR yang sama, dan produk PCR dielektroforesis gel agarosa yang hasilnya ditunjukkan pada Gambar 3. Pada Gambar 3, pita fragmen DNA yang berukuran sekitar 284 bp untuk amplikon dari DNA metagenomik P44B tidak teramati. Sedangkan untuk kelima amplikon dari DNA metagenomik sputum yang lain dapat teramati pita fragmen DNA berukuran sekitar 284 bp.



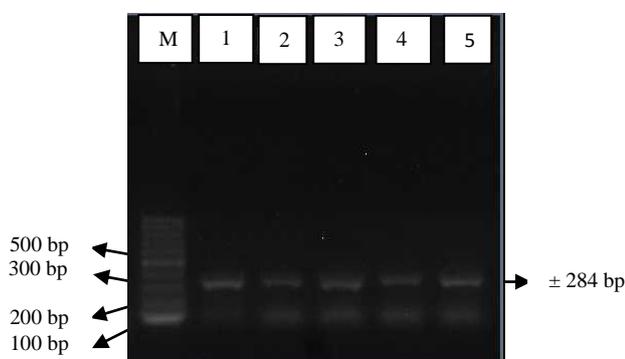
Gambar 3. Elektroforegram produk PCR kedua dari DNA metagenomik. M : Marker 100 bp DNA ladder, 1: DNA metagenomik P48B, 2 ; DNA metagenomik P46B , 3: DNA metagenomik P47B , 4 :DNA metagenomik P44B, 5 : DNA metagenomik P48B Kit, 6 : DNA metagenomik P46B Kit

Amplifikasi selanjutnya hanya dilakukan pada lima sampel DNA metagenomik, yaitu P48B, P46B, P47B, P48B Kit, dan P46B Kit (Gambar 4 dan 5).. Hal tersebut dilakukan karena amplikon dari DNA metagenomik sputum P44B tidak terdeteksi pita fragmen DNA berukuran sekitar 284 bp. Pengulangan proses amplifikasi ini dilakukan sebanyak 2 kali dengan suhu *annealing* yang sama, yaitu 56° C dengan tujuan mengetahui tingkat presisi produk yang dihasilkan. Jika kondisi PCR yang digunakan sudah optimal dan proses PCR berlangsung baik, maka

memungkinkan untuk memvisualisasikan pita fragmen sesuai dengan ukuran yang diharapkan [12].



Gambar 4. Elektroforegram amplifikasi lima sampel DNA metagenomik pengulangan pertama. M:Marker 100 bp DNA ladder, 1: DNA metagenomik P48B ,2 : DNA metagenomik P46B , 3:DNA metagenomik P47B , 4: DNA metagenomik P48B Kit, 5: DNA metagenomik P46B Kit.



Gambar 5. Elektroforegram amplifikasi lima sampel DNA metagenomik pengulangan kedua. M: Marker 100 bp DNA ladder, 1 : DNA metagenomik P48B ,2: DNA metagenomik P46B , 3 : DNA metagenomik P47B , 4 : DNA metagenomik P48B Kit, 5: DNA metagenomik P46B Kit.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa: *M. tuberculosis* dapat dideteksi secara langsung

dari sputum pasien tuberkulosis dengan metode isolasi metagenomik. Amplifikasi dengan menggunakan primer promoter *inhA* menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi cukup baik digunakan sebagai *template* proses PCR

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Kepala Laboratorium Mikrobiologi RS Sanglah yang telah menyediakan sputum MDR-TB, Kepala Laboratorium dan seluruh staf Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Udayana yang telah banyak membantu dalam berlangsungnya penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sabree, Z.L., Rondon, M.R., and Handelsman, J. 2009. Metagenomics. *Elsevier* 622-632.
- [2] Kim W. 2012, Application of Metagenomic Techniques: Understanding the Unrevealed Human Microbiota and Explaining the ini Clinical Infectious Disease. *Journal of Bacteriology and Virology* 42(4): 263-275.
- [3] Miller, R.R., Montoya, V., Gardy, J.L., Patrick, D.M, Tang P 2013. Metagenomics for pathogen detection in public health. *Genome Medicine* 5:81
- [4] Weinstock G.M, 2012. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* 489 : 250-256
- [5] Nakamura, S., Maeda, N., Miron, I.M., Yoh, M., Izutsu, K., Kataoka, C., Honda, T., Yasunaga, T., Nakaya, T., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Horii, T., and Iida, T. 2008. *Metagenomic Diagnosis of Bacterial Infections. Emerging Infectious Diseases* (www.cdc.gov/eid). 14(11) : 1784-1786.
- [6] Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ, Jin RL, 2005. *Detection of mutations associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis*

- isolates from China. J. Clin. Microbiol.* 43: 5477-82.
- [7] Heifets LB, Barnes PF. 1994 *Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis, pathogenesis, protection, and control.* Washington DC: American Society for Microbiology. p. 85-110.
- [8] Kent, P.T and Kubica, G.P 1985. *A Guide for The Level III Laboratory. Centres for Disease and Control*, Atlanta, Ga.
- [9] Kirschner, P., Springer, B., Vogel, U., et al., 1993. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination, report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 2882-2889
- [10] Zhou, J., Bruns, M. A., & Tiedje, J. M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 316–322.
- [11] Patel, S., Yates, M., and Saunders, N.A., 1997. PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Partial rRNA Gene Sequencing: a Rational Approach to Identifying Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 35:2375-2380.
- [12] Chen, X., F. Kong., Q. Wang., C. Li., J. Zhang, dan G. L. Gilbert. 2011. Rapid Detection of Isoniazid, Rifampin, and Ofloxacin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Using High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 49: 3450-3457.
- [13] McPherson, M.J. and Moller, S.G., 2006. *PCR 2nd ed.* UK: Taylor and Francis Group.