

Optimasi Suhu *Annealing* Tiga Regio Berbeda Isolat *Multidrug Resistance Mycobacterium Tuberculosis* dengan Metode *Multiplex Polymerase Chain Reaction*

(ANNEALING TEMPERATURE OPTIMIZATION ON THREE DIFFERENT REGIONS
OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MULTIDRUG RESISTANCE ISOLATE
USING MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION)

Indra Juana Adikara¹, I Nengah Wirajana^{2,3},
Sagung Chandra Yowani^{1,3}

¹Jurusan Farmasi, ²Jurusan Kimia, ³Kelompok Studi *Multidrug Resistance Tuberculosis & Extensively Drug-Resistance Tuberculosis*, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Kampus Unud Bukit Jimbaran, Kuta Selatan, Badung, Bali-Indonesia, 80361, adikaraindra@gmail.com

ABSTRAK

Multiplex PCR merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi dua atau lebih sekuen target secara simultan. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi PCR pada daerah promoter *inhA*, gen *inhA*, dan gen *katG* menggunakan isolat *Multidrug Resistance Tuberculosis* (MDR-TB). Proses isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *High Pure PCR Template Preparation Kit*. Proses amplifikasi dilakukan dengan *Multiplex* PCR yang menggunakan tiga pasang primer yaitu *mabA-inhA*-promoter-FS dan *mabA-inhA*-promoter-R, *inhA* (F) dan *inhA* (R) dan KG24F dan KG60R. Proses amplifikasi dimulai dengan proses denaturasi awal pada suhu 95°C selama 15 menit, diikuti dengan 45 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, *annealing* pada suhu 56°C, 57°C dan 58°C selama satu menit 20 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama dua menit. Proses amplifikasi diakhiri dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Deteksi produk PCR dilakukan dengan elektroforesis dan divisualisasi pada Ultra Violet Transiluminator. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada suhu *annealing* 56°C, pita yang dihasilkan tebal, jelas dan sesuai dengan ukuran yang diinginkan dibandingkan pada suhu 57°C dan 58°C. Simpulan yang diperoleh yaitu suhu *annealing* 56°C merupakan suhu *annealing* optimum daerah promoter *inhA*, gen *inhA*, dan gen *katG* dari isolat *Multidrug Resistance Mycobacterium tuberculosis* dengan metode *Multiplex* PCR.

Kata-kata kunci: *Multi-Drug Resistance Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB); *Multiplex Polymerase Chain Reaction*

ABSTRACT

Multiplex PCR is a method used to amplify more than one target sequences simultaneously. The aim of this research was to optimize PCR on the region of *inhA* promoter, *inhA* gene and *katG* gene using *Multidrug Resistance Tuberculosis* (MDR-TB) Isolate. Isolation of DNA was done by using *High Pure PCR Template Preparation Kit*. Amplification process was done by *Multiplex* PCR using three pairs primers i.e. *mabA-inhA*-promoter-FS and *mabA-inhA*-promoter-R, *inhA* (F) and *inhA* (R) and KG24F and KG60R. Amplification process started by pre-denaturation at 95°C for 15 minutes, followed by 45 cycles consisting of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at 56°C, 57°C and 58°C for 1 minute and 20 seconds and extension at 72°C for 2 minutes. Then it is finished by post-extension at 72°C for 10 minutes. PCR product was detected by electrophoresis and visualized under UV Transiluminator. Annealing temperature of 56°C resulted in a thicker, clearer and according to the desired size as compared to that of with 57°C and 58°C. Conclusion that obtained was annealing temperature 56°C was optimum annealing temperature on *inhA* promoter, *inhA* gene and *katG* gene region of *Mycobacterium tuberculosis* *Multidrug Resistance* isolate using *Multiplex* Polymerase Chain Reaction.

Keywords: multi-drug resistance mycobacterium tuberculosis (MDR-TB); multiplex polymerase

PENDAHULUAN

Multi-Drug Resistance Mycobacterium tuberculosis (MDR-TB) adalah bentuk tuberkulosis (TB) yang resisten terhadap dua atau lebih obat antituberkulosis (OAT) lini pertama, seperti rifampisin (RIF) dan isoniazid (INH) (Halilu *et al.*, 2014).

Isoniazid merupakan salah satu obat utama untuk tuberkulosis (Silva dan Palomino, 2011). Isoniazid bekerja dengan cara menghambat biosintesis asam mikolat yang merupakan komponen utama dan spesifik dari dinding sel mikobakteri (Bardou *et al.*, 1998). Resistensi yang terjadi pada INH disebabkan oleh adanya mutasi gen pada *Mycobacterium tuberculosis*. Terdapat Beberapa gen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya resistensi terhadap INH yaitu, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, dan *ndh* (Kaufmann dan Hahn, 2003). Berdasarkan laporan penelitian yang telah dilakukan, penyebab utama terjadinya resistensi terhadap INH karena terjadi mutasi pada *katG* dan *inhA* (Silva dan Palomino, 2011). Sekitar 50% resistensi terhadap INH disebabkan oleh mutasi pada *katG* dan antara 20 sampai 34% mutasi pada *inhA* (Kaufmann dan Hahn, 2003).

Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi dua atau lebih sekuen target secara simultan (Markoulatos *et al.*, 2002). Kelebihan *Multiplex* PCR adalah lebih murah dan hemat waktu pengerjaan karena dapat mengamplifikasi dua atau lebih sekuen target secara simultan dengan satu kali reaksi PCR sehingga dapat menghemat alat dan reagen yang digunakan (Edwards dan Gibbs, 1994). Metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi penyakit pasien yang berbeda dalam sampel yang sama (Rodriguez dan Ramirez, 2012).

Spesifisitas, efisiensi, dan sensitivitas amplifikasi dengan *Multiplex* PCR dipengaruhi oleh beberapa faktor. Salah satu faktor yang memengaruhi adalah suhu *annealing* (Yang *et al.*, 2013). Suhu *annealing* adalah suhu yang diperlukan untuk primer berhasil menempel pada DNA target. Suhu *annealing* yang terlalu rendah dari suhu optimum, maka akan menyebabkan terjadinya *false priming*, dan jika suhu *annealing* lebih tinggi dari suhu optimumnya, maka primer tidak dapat menempel pada DNA target sehingga proses PCR tidak berhasil (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Dalam perkembangan keilmuan mengenai mutasi yang terjadi pada MDR-TB, telah

banyak dilakukan penelitian pada gen resistensi INH dengan metode PCR di Indonesia. Namun, penelitian menggunakan metode *multiplex* PCR masih belum banyak dilakukan di Indonesia. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk optimasi suhu *annealing* dan amplifikasi fragmen promotor *inhA*, gen *inhA*, dan gen *katG* dengan metode *Multiplex* PCR. Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu dalam pengembangan teknik biomolekular dan membantu dalam mendeteksi MDR-TB.

METODE PENELITIAN

Sampel dalam penelitian ini adalah isolat 151 *M. tuberculosis* MDR yang diperoleh dari Instalasi Mikrobiologi Klinik, Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) Sanglah Denpasar. Sampel yang diperoleh diisolasi, kemudian ditentukan suhu *annealing* optimum. Setelah suhu *annealing* optimum diperoleh, dilakukan amplifikasi dengan metode *multiplex* PCR dan hasil produk PCR dideteksi menggunakan elektroforesis.

Isolasi DNA

Sampel isolat 151 *M. tuberculosis* MDR hasil subkultur dilarutkan dalam larutan *phosphate-buffered saline* (PBS). Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *high pure PCR template preparation kit* (Roche, 2012). Sampel bakteri sebanyak 200 iL diputar pada *Centrifuge* dengan kecepatan 3000xg selama lima menit. Pelet diresuspensi dengan penambahan 200 iL larutan PBS. Selanjutnya dilisiskan dengan menggunakan 5 iL lyzosome (10 mg/mL dalam 10 mM Tris HCl pH 8). Kemudian sampel diinkubasi dalam suhu 37°C selama 15 menit. Sampel ditambahkan 200 iL *binding buffer* dan 40 iL Proteinase K. Kemudian dihomogenkan dan diinkubasi dalam suhu 70°C selama 10 menit. Sampel ditambahkan 100 iL isopropanol kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vorteks*. Campuran tersebut dituangkan pada tabung mikro yang telah dipasang *filter* dan diputar pada *Centrifuge* selama satu menit dengan kecepatan 8000 x g. Supernatan yang diperoleh dibuang. *Filter* dipindahkan ke tabung mikro baru dan ditambahkan dengan 500 iL *inhibitor removal buffer* kemudian diputar pada *Centrifuge* selama satu menit dengan kecepatan 8000xg. Supernatan yang diperoleh dibuang dan *filter* dipindahkan ke tabung mikro baru.

Ditambahkan 500 μ L *washing buffer* dan diputar pada *Centrifuge* selama satu menit dengan kecepatan 8000xg. Supernatan dibuang dan *filter* dipindahkan ke tabung mikro baru. Ditambahkan 500 μ L *washing buffer*. Diputar pada *Centrifuge* selama satu menit dengan kecepatan 8000xg. Kemudian supernatan dibuang dan *filter* dipindahkan pada tabung mikro ukuran 1,5 mL. Diputar pada *Centrifuge* selama 10 detik dengan kecepatan 13000xg. Supernatan dibuang dan *filter* dipindahkan ke dalam tabung baru. Ditambahkan 50 μ L *ellution buffer* (70°C) dan diputar pada *Centrifuge* selama satu menit dengan kecepatan 8000xg. DNA pada supernatan yang diperoleh digunakan sebagai templat DNA dalam proses PCR.

Optimasi suhu *annealing* dan amplifikasi fragmen promotor *inhA*, gen *inhA*, dan gen *katG* *M. tuberculosis* dengan Multiplex PCR

Multiplex PCR dilakukan dengan menggunakan tiga pasang primer yaitu daerah promotor *inhA* (7-290 pb) dengan sepasang primer yaitu *mabA-inhA*-promoter-FS dengan urutan 5'-ACA TAC CTG CTG CGC AAT-3' dan *mabA-inhA*-promoter-R dengan urutan 5'- CTC CGG TAA CCA GGA CTG AA-3' (Chen *et al.*, 2011), daerah gen *inhA* (31-490 pb) dengan sepasang primer, yaitu primer *inhA* (F) dengan urutan 5'-CTG GTT AGC GGA ATC ATC AC-3' dan primer *inhA* (R) dengan urutan 5'-CGA CCG TCA TCC AGT TGT A-3', daerah gen *katG* (2437-3160 pb) dengan sepasang primer yaitu KG24F dengan urutan 5'-GAA GTA CGG CAA GAA GCT CTC-3' dan KG60R dengan urutan 5'-CGA TCT ATG AGC GGA TCA CG-3' (Suryadi *et al.*, 2014). Kondisi PCR yang diaplikasikan adalah denaturasi awal pada suhu 95°C selama 15 menit, amplifikasi sebanyak 45 siklus (denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, *annealing* selama satu menit 20 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama dua menit) serta ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Suhu *annealing* yang akan digunakan ditentukan dengan optimasi. Optimasi pertama menggunakan suhu 56°C dan 58°C dan apabila suhu tersebut belum dapat menentukan suhu *annealing* optimum dilakukan optimasi kedua dengan suhu 57°C.

Deteksi Produk PCR

Produk PCR dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa 1,3% b/v. Elektroforesis dilakukan dengan *running buffer* TBE (Tris-Boric Acid-

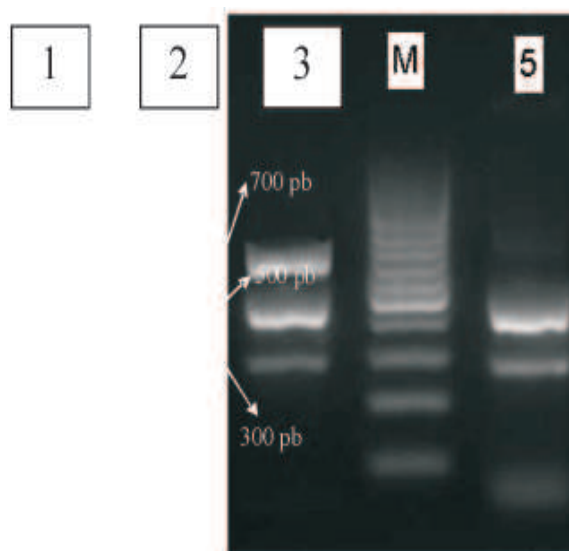
EDTA) 0,5x pada tegangan 50 v selama 60 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi menggunakan alat ultraviolet (UV) *Transiluminator* (Gel Doc).

HASIL DAN PEMBAHASAN

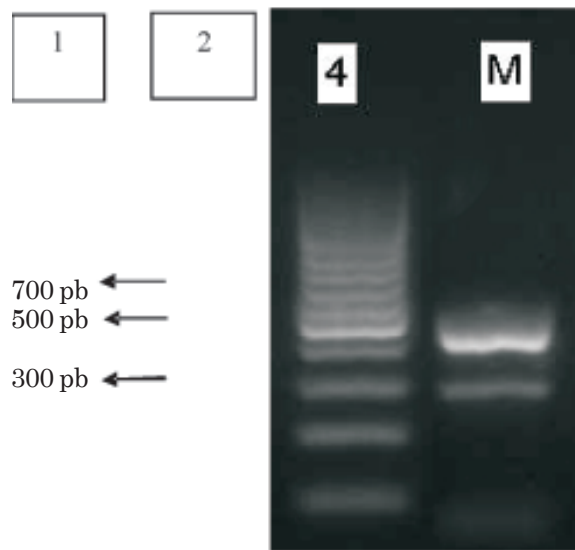
Hasil amplifikasi PCR menggunakan suhu *annealing* 56°C dan 58°C dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa yang disajikan pada Gambar 1.

Suhu *annealing* adalah suhu yang diperlukan untuk primer berhasil menempel pada DNA target (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Suhu *annealing* (T_a) yang optimum merupakan salah satu faktor penting yang menentukan keberhasilan proses PCR (Henegariu, 1997). Suhu *annealing* yang terlalu rendah dari suhu optimum, maka akan menyebabkan terjadinya *false priming*, dan jika suhu *annealing* lebih tinggi dari suhu optimumnya, maka primer tidak dapat menempel pada DNA target sehingga proses PCR tidak berhasil (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Suhu *annealing* yang dipilih untuk *multiplex* PCR harus dapat mengoptimalkan kerja ketiga primer yang digunakan. Optimasi pertama menggunakan suhu 56°C dan 58°C. Kedua suhu ini dipilih karena berdasarkan penelitian sebelumnya, kedua suhu tersebut dapat mengamplifikasi daerah promotor *inhA*



Gambar 1. Elektroforegram hasil PCR pada suhu 56°C dan 58°C; 1. Suhu *annealing* 56°C 2. Marker 100 pb, 3. Suhu *annealing* 58°C.



Gambar 2. Elektroforegram hasil PCR pada suhu 57°C; 1. Marker 100 pb, 2. Isolat 151 MDR-TB.

dan *katG* (Asmara *et al.*, 2014; Deniariasih *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil optimasi pertama, hasil tersebut belum mampu menentukan suhu *annealing* optimum ketiga regio berbeda dari isolat yang digunakan. Oleh karena itu, dilakukan optimasi kedua dengan suhu 57°C. Suhu ini dipilih karena berada di antara 56°C dan 58°C yang diperkirakan dapat memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan suhu 56°C dan 58°C.

Hasil amplifikasi PCR menggunakan suhu *annealing* 57°C dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa yang disajikan pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil kedua optimasi tersebut dapat dilihat bahwa pada suhu *annealing* 56°C menghasilkan pita fragmen DNA yang tebal, jelas dan sesuai dengan ukuran yang diinginkan dibandingkan dengan suhu *annealing* 57°C dan 58°C. Hasil ini menunjukkan bahwa pada suhu *annealing* 56°C, ketiga primer yang digunakan dapat menempel dengan baik pada *template*. Selain itu, suhu *annealing* yang tinggi dapat menghambat hibridisasi primer dengan *template* sehingga dihasilkan produk PCR yang lebih sedikit (Borah, 2011).

Pada Gambar 1 tersaji bahwa metode *multiplex* PCR telah berhasil mengamplifikasi tiga fragmen DNA sekaligus pada isolat MDR-

TB. Hal ini ditunjukkan dengan ukuran pita yang dihasilkan sesuai dengan ukuran yang diinginkan sehingga dapat diaplikasikan untuk proses sekuensing. Keberhasilan metode *multiplex* PCR ini mengamplifikasi tiga fragmen DNA menghasilkan metode yang lebih efisien dalam hal biaya dan waktu pengerjaan karena dapat mengamplifikasi lebih dari satu sekuen target secara simultan dengan satu kali reaksi PCR, sehingga dapat menghemat alat dan reagen yang digunakan (Edwards dan Gibbs, 1994).

Keberhasilan metode tersebut juga menghasilkan metode yang mampu mendeteksi tuberkulosis dengan cepat dan sensitif sehingga terapi yang diberikan cepat dan sesuai dengan kebutuhan pasien dan mampu mencegah berkembangnya resistensi obat antituberkulosis. Metode *multiplex* PCR juga telah diuji mampu membedakan spesies mikobakteri penyebab tuberkulosis (Gopinath dan Singh, 2009).

SIMPULAN

Simpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah suhu *annealing* 56°C merupakan suhu *annealing* optimum daerah promotor *inhA*, gen *inhA*, dan gen *katG* dari isolat *Multidrug Resistance Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) dengan metode *Multiplex* PCR.

SARAN

Perlu dilakukan analisis lebih lanjut terhadap produk PCR (amplikon) dengan teknik sekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida amplikon dan mutasi yang terjadi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Instalasi Mikrobiologi Klinik Rumah, Sakit Umum Pusat (RSUP) Sanglah Denpasar dan Laboratorium Biomolekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, yang telah membantu penelitian ini. Ucapan terimakasih juga dihaturkan kepada semua pihak yang telah membantu sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Asmara AAR, Yustiantara PS, Yowani SC. 2014. Proses Amplifikasi Daerah Promoter *inhA* pada Isolat P11 *Mycobacterium tuberculosis Multidrug Resistance* di Bali dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Farmasi Udayana* 3(1): 35-39.
- Borah P. 2011. Primer Designing for PCR. *Science Vision* 11(3): 134-136.
- Bardou F, Raynaud C, Ramos C, Laneelle MA, Laneelle G. 1998. Mechanism of Isoniazid Uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 144: 2539-2544.
- Chen X, Kong F, Wang Q, Li C, Zhang J, Gilbert GL. 2011. Rapid Detection of Isoniazid, Rifampin, and Ofloxacin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Using High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 49(10): 3450-3457.
- Deniariasih NW, Ratnayani K, Yowani SC. 2013. Optimasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Fragmen 724 pb Gen *katG Multidrug Resistance Tuberculosis* untuk Meningkatkan Produk Amplifikasi. *Jurnal Farmasi Udayana* 2(3): 110-115.
- Edwards MC, Gibbs RA. 1994. Multiplex PCR: Advantages, Development, and Applications. *Cold Spring Harbor Laboratory* 3: 65-75.
- Gopinath K, Singh S. 2009. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection and Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complexes and Other Mycobacterial Species Directly from Clinical Specimens. *Journal of Applied Microbiology* 107: 425-435.
- Halilu TB, Bala Z, Florence S, Yerima. 2014. Multi-drug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) Survey in North East Nigeria. *Journal of Pharmaceutical and Cosmetic Sciences* 2(1): 1-5.
- Handoyo D, Rudiretna A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Unitas* 9(1): 17-29.
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vancee GH, Vogt PH. 1997. Multiplex PCR: Critical-by-Step Protocol. *Bio Techniques* 23: 504-511.
- Kaufmann SHE, Hahn H. 2003. *Mycobacteria and TB*. Swiss: Karger. Hlm. 90.
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. 2002. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16: 47-51.
- Roche. 2012. *High Pure PCR Template Preparation Kit*. Version 20. Mannheim: Roche Applied Science. Hlm. 12-14.
- Rodriguez PH, Ramirez AG. 2012. *Polymerase Chain Reaction*. Croatia: Dalam: Tech Europe. Hlm. 159.
- Silva PEAD, Palomino JC. 2011. Molecular Basis and Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Classical and New Drugs. *Antimicrobial Chemotherapy* 66: 1417-1430.
- Suryadi TP, Ratnayani K, Yowani SC. 2014. Desain Primer untuk Amplifikasi Gen *katG Multidrug Resistance Tuberculosis* (MDR-TB) dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Jurnal Kimia* 8(1): 77-82.
- Yang L, Wang C, Wang L, Xu C, Chen K. 2013. An Efficient Multiplex PCR Assay for Early Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in Transgenic Plant Material. *Turk J Agric For* 37: 157-162.