

(PATTERN OF RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) *Mycobacterium tuberculosis* RESISTAN RIFAMPISIN (RIF) AND ISONIAZID (INH) IN MAKASSAR)

Purwanta¹ dan Asaad Maidin²

¹ Sekolah Tinggi Penyuluhan Pertanian (STPP) Gowa,
Jl. Malino KM 7 Romanglompoa, Gowa, telpon 0411-861127, E-mail ;
najwapur@yahoo.com

² Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin,

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari pola RAPD *M. tuberculosis* (MTB) isolat klinik resisten isoniazid (INH) dan rifampisin (RIF) di Kota Makassar dengan metode *Polymerase Chain Reaction Random Amplified Polymorphic DNA* (PCR-RAPD).

Penelitian dilakukan di laboratorium Bioteknologi Pusat Kegiatan Penelitian (PKP) Universitas Hasanuddin, dengan jumlah sampel masing-masing isolat klinik resisten rifampisin (RIF) 6 sampel, dan isolat klinik resisten isoniazid 7 sampel. Penelitian meliputi ekstraksi DNA dengan *kit komersial Wizard*, amplifikasi DNA dan elektroforesis. Primer yang digunakan 5 primer yaitu OPN-02 (5'ACCAAGGGGCA, 70% G+C), OPN-09 (5'TGCCGGCTTG 3',70% G+C), OPN-20 (5'GGTGCTCCGT 3', 70% G+C), BG-65 (5'CTCGAGCGGC 3',80% G+C), BG-66 (5'CGACGCTGCG 3'. 80% G+C). Diversitas genetik isolat dianalisa dengan metode *Dendro UPGMA: A Dendrogram Construction Utility* dari Valive, S.G. (2009).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 5 primer yang digunakan memberikan hasil amplifikasi yang jelas. Pita DNA yang berhasil di amplifikasi berukuran antara 200 sampai 1500 bp. Variasi genetik dilihat dari perbedaan jumlah fragmen, ukuran fragmen, jumlah pita polimorfik dan persentase (%) polimorfik. Persentase polimorfik tertinggi ditemukan pada kelompok isolat klinik MTB resisten Rif berkisar 80 – 100% atau rata-rata 93,76%, sedangkan pada kelompok isolat klinik MTB resisten INH berkisar 50 – 100% atau rata-rata 90%. Analisis dendrogram dengan metode UPGMA antara isolat RIF dan INH memberikan nilai koefisien kekerabatan 0-40% atau terdapat keragaman populasi 60-100%. Tingginya polimorfisme disebabkan oleh mutasi pada gen pengkode resistensi obat anti TB.

Kata kunci : *M. tuberculosis*, RAPD, Resisten RIF, Resisten INH.

Dalam bidang kedokteran (manusia maupun hewan), uji diagnostik merupakan salah satu metode untuk menangani kasus penyakit. Berbagai uji diagnostik telah dikembangkan, baik yang didasarkan pada teknik kultur agen penyakit, reaksi kimia/biokimia maupun reaksi imunologik. Dengan berkembangnya teknologi dalam bidang

biologi molekuler, maka pengembangan uji diagnostik mulai diarahkan kepada teknologi tersebut menggunakan materi genetik sebagai dasar pengujiannya (1,2). Berdasarkan materi genetik tersebut, uji-uji diagnostik dikembangkan melalui teknik molekuler seperti hibridisasi dengan *probe* asam nukleat, *polymerase chain reaction* (PCR), *restriction*

fragment length polymorphism (RFLP) dan *sekuensing* asam nukleat (3).

Saat ini ada beberapa teknik yang didasarkan pada *polimorfisme gen* secara langsung seperti RFLP, MFLP, DGGE dan RAPD. *Restriction fragment length polymorphisme* (RFLP), menggunakan pelacak *insertion sequences* IS986, IS1081, dan IS6110 telah digunakan secara intensif untuk melakukan diferensiasi galur *M. tuberculosis* (MTB), tetapi metode ini sangat kompleks dan menggunakan pelacak yang berbeda. Oleh karena itu diperlukan suatu metode yang prosedurnya cepat dan mudah. *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) adalah suatu sistem deteksi molekuler yang berbasis PCR. Metode ini menggunakan primer oligonukleotida pendek dengan *low-stringency* PCR untuk mengamplifikasi fragmen DNA tertentu, yang dapat digunakan sebagai marka molekuler. Analisis RAPD menawarkan suatu metode yang cepat, murah, mudah digunakan dan dapat digunakan untuk menentukan heterogenitas genetik, berdasarkan diversitas urutan DNA. Selain itu metode ini juga mempunyai keunggulan bahwa tidak diperlukan informasi genetik dari mikroba yang diteliti, hanya berdasarkan pada penempelan primer dengan spesifitas yang tidak terlalu tinggi pada molekul DNA, sehingga PCR masih dapat berjalan. Hasil yang diperoleh dapat merupakan sidik jari (*fingerprinting*) dan telah berhasil dilakukan pada MTB dan patogen lainnya (4,5).

Penggunaan obat anti tuberkulosis (OAT) yang tidak teratur, terutama karena pengertian penderita yang kurang tentang pengobatan yang teratur dan memadai, dapat menyebabkan terjadinya

resistensi bakteri. Seiring dengan meningkatnya kasus TB, maka angka resistensi terhadap obat anti tuberkulosis juga meningkat, baik resistensi primer maupun sekunder. *Multi drug-resistant tuberkulosis* (MDR-TB) merupakan masalah terbesar pemberantasan TB di dunia. Lebih dari 50 juta orang diperkirakan telah terinfeksi oleh bakteri TB, resisten terhadap OAT khususnya rifampisin dan isoniazid (INH) (6,7). MDR-TB adalah *strain* yang resisten terhadap isoniazid dan rifampisin dengan atau tanpa resistensi terhadap obat lain. MDR-TB merupakan faktor penyulit dalam mengobati penyakit TB dan beresiko kematian tinggi (50-60% dalam 5 tahun). Hasil survei resistensi MTB di 64 negara yang dilaporkan oleh WHO-IUATLD, diperkirakan terdapat 273.00 kasus baru MDR-TB yang terjadi diseluruh dunia pada tahun 2000. Berdasarkan penelitian Nikmawati, A., Windarwati dan Hardjoeno di RS. Dr. Wahidin Sudirohusodo sepertiga dari jumlah penderita terduga TB adalah positif menderita TB dengan persentase *mono-resistant* dan MDR-TB tinggi (8). Selain pengobatan, pada tahap awal untuk mengetahui penderita TB dengan status sensitif atau resisten terhadap obat isoniazid dan rifampisin diperlukan pengujian dengan penanda/marker, menjadi salah satu hal yang penting dalam pengendalian tuberkulosis. Oleh karena itu, perlu adanya suatu metode yang efektif untuk diferensiasi (pembedaan) galur MTB. Ada beberapa metode yang sering digunakan dalam epidemiologi seperti kepekaan antibiotik, biologi molekuler, khususnya pada pengkajian karakter bahan genetik *biotyping* dan *typing bakteriofaga* tetapi pola yang diperoleh ini, kurang dapat

memberikan gambaran mengenai diferensiasi galur (9,5).

Meningkatnya masalah resistensi TB dan MDR-TB khususnya terhadap OAT isoniazid dan rifampisin perlu dicari solusi yang efektif, diantaranya dengan mencari fragmen DNA yang spesifik untuk memperoleh marker, dengan metode yang dapat mendeteksi dengan cepat yaitu RAPD, dimana metode ini belum banyak digunakan khususnya di Indonesia. Sebagai langkah awal untuk memperoleh penanda adalah perlu dilakukan penelitian tentang bagaimana gambaran heterogenitas MTB isolat klinik yang resisten terhadap INH dan rifampisin dengan metode RAPD.

Pada penelitian ini dilakukan analisis RAPD untuk diferensiasi polimorfisme MTB isolat klinik yang resisten terhadap isoniazid dan rifampisin di Kota Makassar. Isolat yang diambil adalah MTB *multiresisten* terhadap OAT yaitu isoniazid dan rifampisin, tanpa resisten terhadap etambutol, pirazinamid dan streptomisin. Isolat – isolat tersebut akan diteliti sifat resistensinya dengan metode RAPD, selanjutnya dianalisis keragaman genetiknya.

METODE

Isolat *M. tuberculosis*

Dalam penelitian ini digunakan 13 *M. Tuberculosis* yang terdiri dari 7 isolat *M. tuberculosis* resisten INH dan 6 isolat *M. tuberculosis* resisten RIF. Ke-13 isolat tersebut sebelumnya telah dipilih dari berbagai isolat yang ada pada Balai Besar Pengobatan Paru Makassar dan dikultur di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Makassar, menggunakan media *Lowenstein Jensen* (LJ), setelah 4-6 minggu kultur yang tumbuh diuji niasin dan nitrat, apabila hasilnya positif dilanjutkan dengan uji sensitifitas. Uji

sensitifitas isolat *M. tuberculosis* menggunakan media Ogawa 1% dan obat anti TB INH dan RIF (10).

Preparasi dan Amplifikasi DNA

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah isolat *M. tuberculosis* resisten INH dan RIF, *Wizard-Genome DNA Purification Kit* (Promega Madison, USA.) dan primer yang digunakan untuk PCR (11).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain bunsen, waterbath, rak dan tabung eppendorf, sentrifus, vortex shaker, freezer, mesin PCR, *PCR tube* (tabung PCR), rak tabung PCR, *electrophoresis*, tip untuk pipet, *refrigerator*, gelas ukur, erlenmeyer, sendok timbangan, neraca analitik, power supply, UV transiluminator, parafilm, kamera digital.

Pemeriksaan PCR – RAPD, dengan urutan sebagai berikut :

1). Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA kromosom diekstraksi dengan *kit komersial Wizard*. Urutan kerja ekstraksi DNA sebagai berikut :

- a) Ambil kultur tunggal dengan usa, tambahkan aquadest steril sampai 1 ml dalam tube mikrosentrifus. Sampel disimpan pada suhu ruangan selama 24 jam
- b) Sampel disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 rpm, supernatan dibuang.
- c) Resuspensi seluruhnya kedalam 480 µl dari 50 mM EDTA.
- d) Tambahkan lytic enzyme kedalam cell pellet sampai total volume 120 µl dan campur dengan menggunakan pipet.
- e) Inkubasi sampel pada suhu 37°C selama 30-60 menit. Sentrifus selama 2 menit pada kecepatan

- 13.000-16.000 rpm, buang lanjut atau apabila pengerjaan supernatan. ditunda.
- f) Tambahkan 600 μ l *Nucleic Lysis Solution*. Dicampur dengan menggunakan pipet.
 - g) Diinkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit, kemudian dinginkan pada suhu ruangan.
 - h) Ditambahkan 3 μ l *RNAse solution*, dicampur dengan bantuan pipet.
 - i) Inkubasi pada suhu 37°C selama 15-60 menit, kemudian dinginkan pada suhu ruangan.
 - j) Tambahkan 200 μ l *protein precipitation solution*, lalu dicampur dengan menggunakan vortex.
 - k) Inkubasikan diatas es selama 5 menit
 - l) Sentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit
 - m) Dipindahkan supernatan ke tube mikrosentrifus 1,5 μ l, lalu ditambahkan 600 μ l isopropanol, dicampur perlahan-lahan dengan menggunakan pipet.
 - n) Disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit.
 - o) Supernatan dibuang, sisanya dikeringkan dengan tissue.
 - p) Ditambahkan 600 μ l etanol 70% dicampur dengan menggunakan pipet.
 - q) Disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit, supernatan dibuang (bisa menggunakan pipet).
 - r) Keringkan dengan *clean absorbent paper* (diangin-anginkan) selama 10-15 menit.
 - s) Ditambahkan 100 μ l DNA rehydration solution. Diinkubasi pada 65°C selama 1 jam, atau disimpan pada suhu 4 °C selama 24 jam.
 - t) Disimpan pada suhu 2 °C - 8 °C untuk menunggu pengerjaan lebih lanjut atau apabila pengerjaan ditunda.
- 2). Primer oligonukleotida
- Sebanyak 5 primer oligonukleotida pendek akan digunakan pada penelitian ini. Urutan kesepuluh primer tersebut diambil dari pustaka yang telah berhasil menggunakannya untuk diferensiasi isolat *M. tuberculosis* . Primer yang dipilih adalah yang mempunyai 5G+C yang tinggi ($\geq 70\%$) mengingat *M. tuberculosis* adalah bakteri dengan % G+C yang tinggi dengan harapan mendapatkan pita yang tidak banyak tetapi dapat membedakan antar galur.
- Primer yang digunakan sebanyak 5, yaitu OPN-02 (5'ACCAAGGGGCA, 70% G+C), OPN-09 (5'TGCCGGCTTG 3',70% G+C), OPN-20 (5'GGTGCTCCGT 3', 70% G+C), BG-65 (5' CTCGAGCGGC 3',80% G+C), BG-66 (5'CGACGCTGCG 3'. 80% G+C) (5).
- 3). Amplifikasi
- Amplifikasi DNA *M. tuberculosis* menggunakan primer dengan komposisi *mix* PCR sebagai berikut : 10X buffer 2,5 μ l, MgCl₂ 3 μ l, dNTP 0,5 μ l, primer 1 μ l, dd H₂O, dan DNA 5 μ l.
- Kondisi amplifikasi terdiri atas tahap denaturasi awal 94°C selama 5 menit; diikuti dengan 45 siklus tahap denaturasi 94°C selama 1 menit, tahap *annealing* (penempelan) 36 °C selama 1 menit, dan tahap ekstensi (pemanjangan) 72 °C selama 1 menit, dan tahap post PCR/pemanjangan akhir 72 °C selama 5 menit.
- Produk hasil RAPD-PCR dianalisis dengan gel agarose 1,5% dengan pewarnaan ethidium bromida. Selanjutnya , gel divisualisasi dan didokumentasi. Pola pita yang diperoleh dari RAPD ditentukan dari foto.

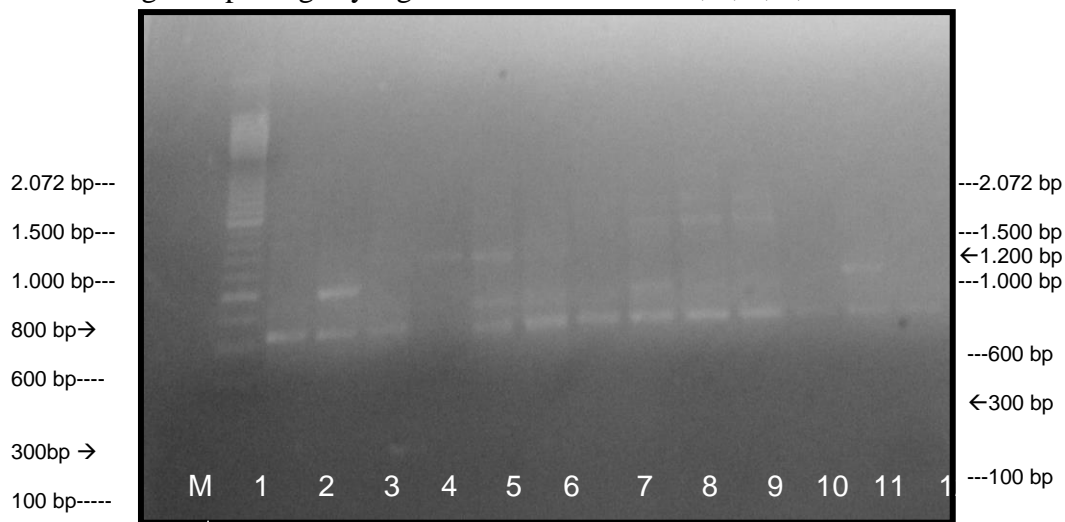
Analisis data

Analisis data berdasarkan hasil matriks data, terdiri atas penomoran 1 dan 0 dibuat dengan dasar ada (1) atau tidak ada (0) pita DNA yang tampak pada replika untuk setiap isolat. Hanya pita yang jelas dan terpisah yang diberi penomoran dan digunakan untuk memperoleh pola RAPD. Ukuran pita dikalkulasi menggunakan program komputer. Ukuran pita yang berbeda lebih kurang 5% pada gel yang berbeda

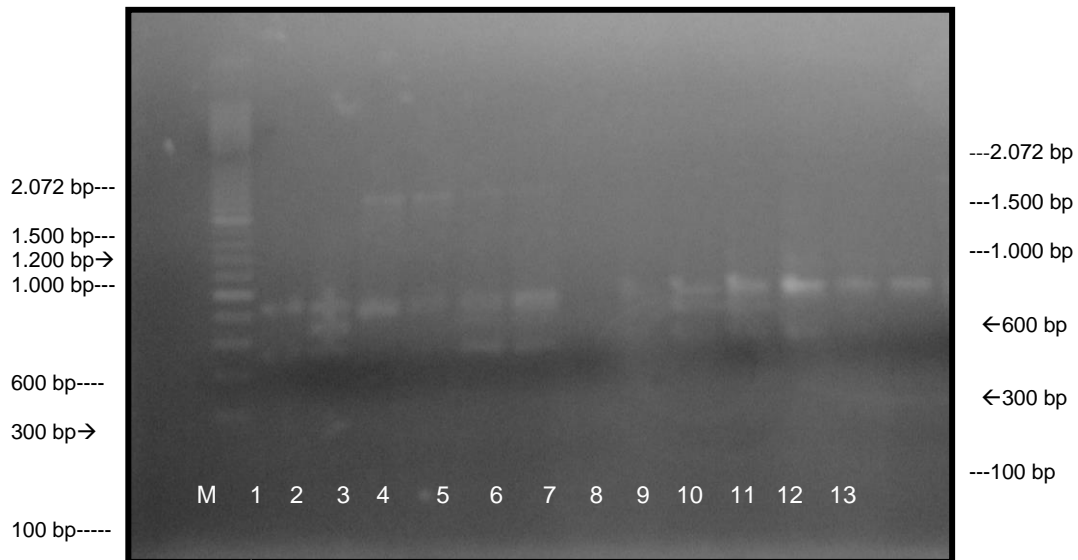
dianggap pita sama. Diversitas genetik isolat dianalisa dengan metode *Dendro UPGMA : A Dendogram Construction Utility* (12).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi terhadap genom DNA isolat klinik MTB resisten RIF dan resisten INH dengan menggunakan 5 primer yaitu BG-65, BG-66, OPN-02, OPN-09 dan OPN-20 dapat dilihat pada Gambar 1, 2, 3, 4, dan 5.



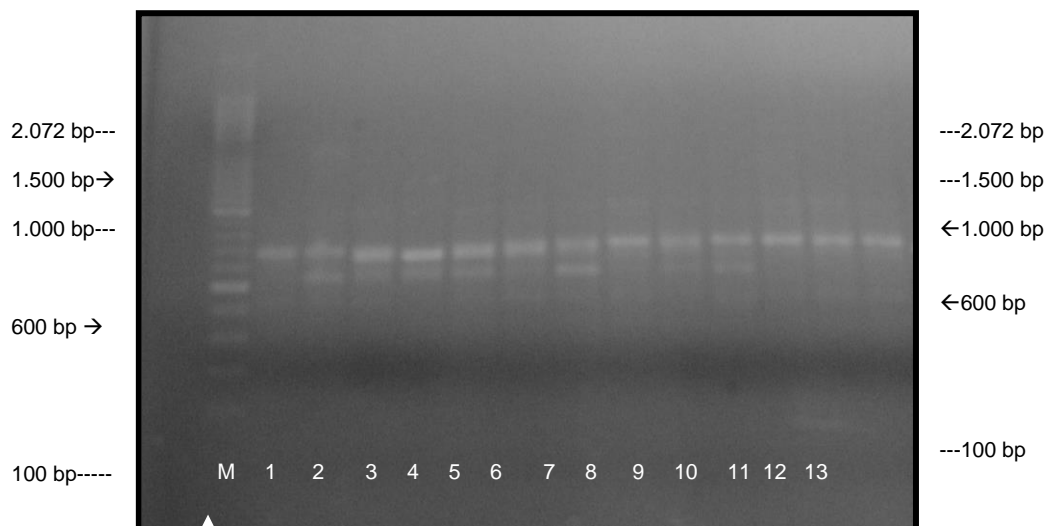
Gambar 1. Hasil analisis PCR-RAPD isolat klinik *M. tuberculosis* yang diamplifikasi dengan primer BG - 65 : M = Marker 100 bp , 1-6 = isolat resisten rifampisin/RIF (ukuran 300-800bp), dan 7-13 = isolat resisten isoniazid /INH (ukuran 300-1200bp) .



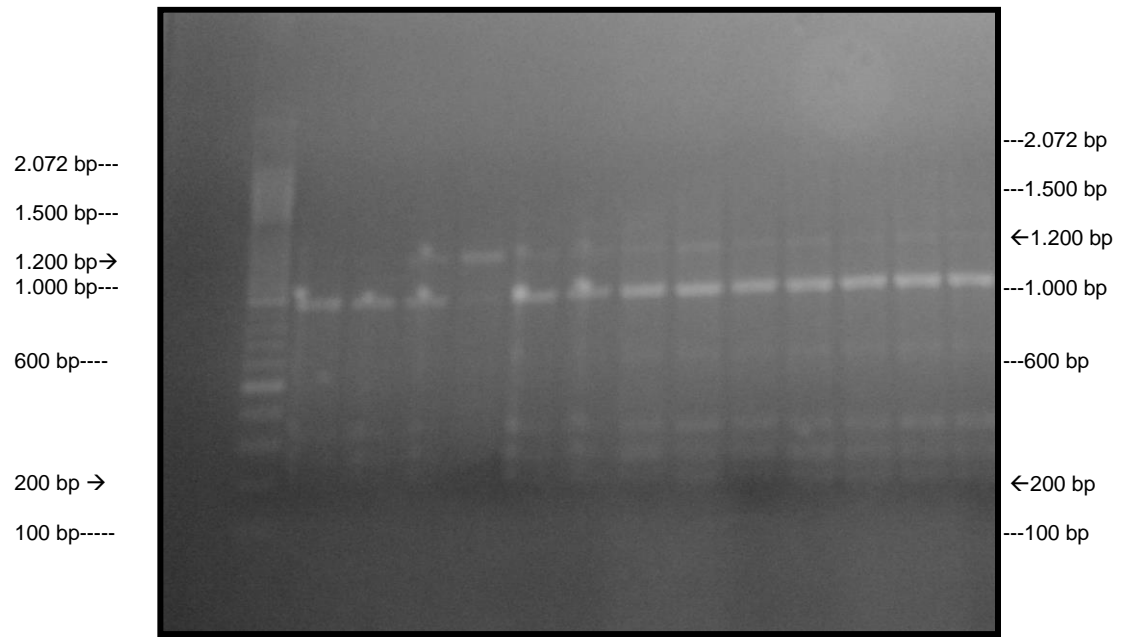
Gambar 2. Hasil analisis PCR-RAPD isolat klinik *M. tuberculosis* yang diamplifikasi dengan primer BG – 66 : M = Marker 100 bp , 1–6 = isolat resisten rifampisin/RIF (ukuran 300-1200bp), dan 7–13 = isolat resisten isoniazid /INH (ukuran 300-600bp) .

Berdasarkan Gambar 1, 2, 3, 4, dan 5, tampak 5 primer yang digunakan mampu menghasilkan pita amplifikasi genom isolat klinik MTB resisten RIF dan resisten INH. Pita yang dihasilkan pada setiap primer yang digunakan selanjutnya dilakukan penilaian (skoring) terhadap

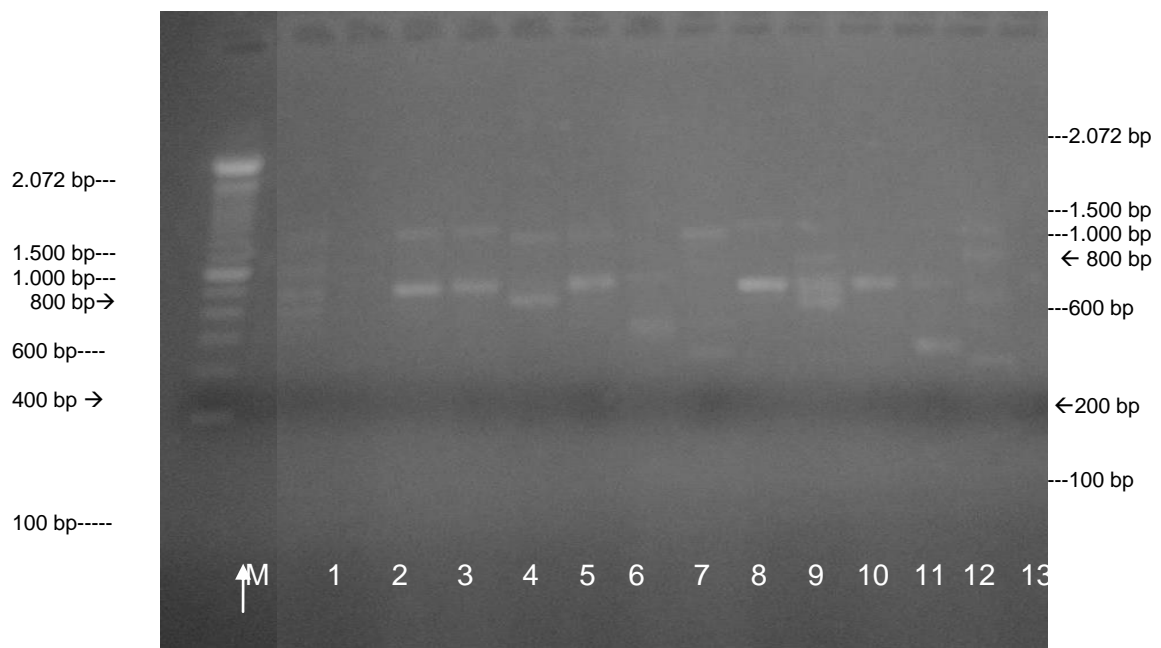
kemunculan fragmen tebal – tipis, dengan ketentuan skor 1 bila ada pita, dan skor 0 bila tidak ada pita. Hasil skoring ditransfer ke data biner untuk mengetahui profil DNA seperti pada Tabel 1.



Gambar 3. Hasil analisis PCR-RAPD isolat klinik *M. tuberculosis* yang diamplifikasi dengan primer *OPN-09* : M = Marker 100 bp , 1–6 = isolat resisten rifampisin/RIF (ukuran 600-1500bp), dan 7–13=isolat resisten isoniazid /INH (ukuran 600-1000bp)



Gambar 4. Hasil analisis PCR-RAPD isolat klinik *M. tuberculosis* yang diamplifikasi dengan primer *OPN-02* : M = Marker 100 bp , 1–6 = isolat resisten rifampisin/RIF (ukuran 200-1200bp), dan 7–13=isolat resisten isoniazid /INH (ukuran 200-1200bp)



Gambar 5. Hasil analisis PCR-RAPD isolat klinik *M. tuberculosis* yang diamplifikasi dengan primer *OPN-20* : M = Marker 100 bp , 1–6 = isolat resisten rifampisin/RIF (ukuran 400-1200bp), dan 7–13=isolat resisten isoniazid /INH (ukuran 200-1200bp)

Berdasarkan Tabel 1, tampak profil DNA yang bervariasi pada masing-masing kelompok isolat. Variasi tersebut dapat dilihat dari perbedaan jumlah fragmen, ukuran fragmen, jumlah pita polimorfik dan persentase (%) polimorfik isolat klinik MTB resisten rifampisin (RIF) dan isolat klinik MTB resisten isoniazid (INH). Persentase polimorfik tertinggi ditemukan pada kelompok isolat

klinik MTB resisten RIF berkisar 80 – 100% atau rata-rata 93,76%, sedangkan pada kelompok isolat klinik MTB resisten INH berkisar 50 – 100% atau rata-rata 90%. Dengan demikian isolat klinik MTB resisten RIF memiliki variasi yang lebih tinggi dibandingkan klinik MTB resisten INH. Perbedaan variasi antar kedua kelompok isolat adalah 3,76%.

Tabel 1. Variasi genetik/polimorfisme isolat klinik *M. tuberculosis* resisten isoniazid (INH) dan resisten rifampisin (RIF).

Fragmen	Primer BG 65		Primer BG 66		Primer OPN 2		Primer OPN 9		Primer OPN 20	
	RIF	INH	RIF	INH	RIF	INH	RIF	INH	RIF	INH
Jumlah	4	5	3	3	9	6	5	3	4	7
Ukuran	300-800	300-1200	300-1200	300-600	200-1200	200-1200	600-1500	600-1000	400-800	200-800
Polimorfik	4	5	3	3	8	3	4	3	4	7
% Polimorfik	100	100	100	100	88.8	50	80	100	100	100

Keterangan :

RIF : Isolat MTB resisten rifampisin

INH : isolat MTB resisten isoniazid

Hasil analisis kekerabatan atau jarak genetik antar sampel dalam kelompok isolat klinik resisten RIF dan INH disajikan dalam Tabel 2 dan 3.

Tabel 2. Jarak genetik antar sampel (1 – 6) dalam kelompok isolat klinik *M. tuberculosis* resisten rifampisin (RIF) berdasarkan penanda RAPD.

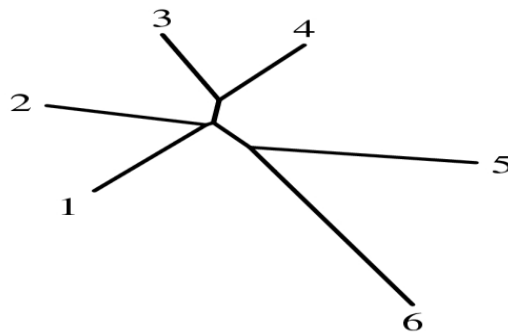
Sampel	1	2	3	4	5	6
1	0	0.400	0.374	0.447	0.548	0.632
2		0	0.374	0.490	0.583	0.693
3			0	0.316	0.529	0.648
4				0	0.548	0.632
5					0	0.707
6						0

Tabel 3. Jarak genetik antar sampel (1 – 7) dalam kelompok isolat klinik *M. tuberculosis* resisten isoniazid (INH) berdasarkan penanda RAPD.

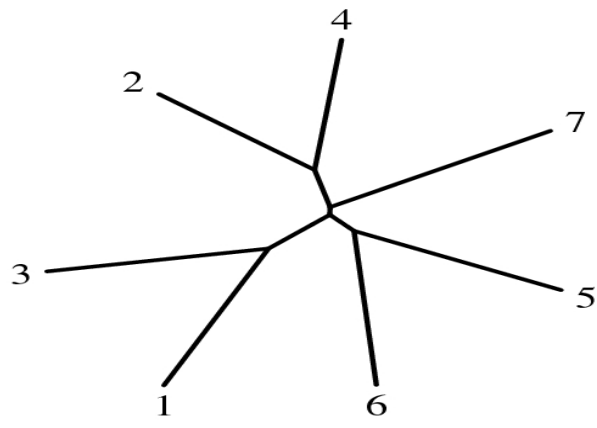
Sampel	1	2	3	4	5	6	7
1	0	0.424	0.400	0.548	0.469	0.424	0.469

2	0	0.510	0.346	0.447	0.447	0.400
3		0	0.469	0.548	0.583	0.548
4			0	0.400	0.529	0.490
5				0	0.400	0.490
6					0	0.447
7						0

Hasil analisis 0 – 30% atau keragaman populasi 70 – pengelompokan/dendogram antar 100%. Pada koefisien kekerabatan populasi dan antar sampel isolat klinik 0,2408 atau 24,08% atau keragaman *M. tuberculosis* resisten isoniazid (INH) subpopulasi 75,92% terbentuk 3 dan resisten rifampisin (RIF) dengan subpopulasi, yaitu subpopulasi I metode *Dendro UPGMA : A Dendogram Construction Utility* (12)., terlihat seperti subpopulasi II beranggotakan 2 sampel dendogram pada Gambar 6, dan 7. nomor 3 dan 4 ; subpopulasi III beranggotakan sampel 5 dan 6. Gambar 6, hasil analisis UPGMA terhadap 6 sampel dalam kelompok isolat klinik MTB resisten RIF menghasilkan dendogram dengan koefisien kekerabatan



Gambar 6. Dendogram sampel (1- 6) dalam kelompok isolat klinik *M. tuberculosis* resisten rifampisin (RIF) hasil amplifikasi menggunakan 5 primer, terbentuk 3 pengelompokan yaitu kelompok I=1 dan 2, II=3 dan 4, III=5 dan 6 .



Gambar 7. Dendrogram sampel (1 - 7) dalam kelompok isolat klinik *M. tuberculosis* resisten isoniazid (INH) hasil amplifikasi menggunakan 5 primer, terbentuk 4 pengelompokan yaitu kelompok I=1 dan 3, II=2 dan 4, III=5 dan 6 dan IV=7.

Gambar 7, merupakan hasil analisis UPGMA terhadap 7 sampel dalam kelompok isolat klinik MTB resisten INH menghasilkan dendrogram dengan koefisien kekerabatan 0 – 30% atau keragaman populasi 70 – 100%. Pada koefisien kekerabatan 0,2401 atau 24,01% atau keragaman subpopulasi 75,99% terbentuk 4 subpopulasi, yaitu subpopulasi I beranggotakan 2 sampel nomor 1 dan 3; subpopulasi II beranggotakan 2 sampel nomor 2 dan 4; subpopulasi III beranggotakan 2 sampel nomor 5 dan 6; dan subpopulasi IV beranggotakan 1 sampel nomor 7. Berdasarkan Gambar 7, 8, 9, 10, dan 11 telah berhasil diamplifikasi terhadap genom isolat klinik resisten RIF dan INH dengan menggunakan lima primer, yaitu BG-65, BG-66, OPN-02, OPN-09 dan OPN-20. Selanjutnya dilakukan penilaian (skoring) terhadap kemunculan fragmen tebal-tipis. Hasil skoring ditranfer ke data

biner untuk mengetahui profil DNA seperti pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1, tampak profil DNA yang bervariasi pada masing-masing kelompok isolat. Persentase polimorfik tertinggi ditemukan pada kelompok isolat klinik MTB resisten Rif berkisar 80 – 100% atau rata-rata 93,76%, sedangkan pada kelompok isolat klinik MTB resisten INH berkisar 50 – 100% atau rata-rata 90%. Dengan demikian isolat klinik MTB resisten RIF memiliki variasi yang lebih tinggi dibandingkan klinik MTB resisten INH. Perbedaan variasi antar kedua kelompok isolat adalah 3,76%. Tingkat polimorfisme penelitian ini termasuk tinggi, hal ini disebabkan primer yang dipakai adalah primer komersil dan telah terbukti untuk penelitian polimorfisme MTB (5). Fragmen DNA dikatakan polimorfik apabila variasi genetiknya lebih besar

atau sama dengan 1% ($\geq 1\%$). Tingkat keragaman individu dalam populasi maupun antara populasi menggambarkan status keberadaan spesies tersebut di alam. Populasi yang memiliki polimorfisme tinggi memiliki peluang hidup yang lebih baik. Hal ini disebabkan setiap gen memiliki respon yang berbeda-beda terhadap kondisi lingkungan, sehingga dengan dimilikinya berbagai macam gen dari individu-individu di dalam populasi, maka berbagai perubahan lingkungan yang ada dapat direspons lebih baik (13).

Tingginya polimorfisme isolat klinik MTB resisten RIF dan INH dapat disebabkan oleh mutasi pada gen-gen yang mengkode resistensi obat anti TB. Resistensi terhadap RIF disebabkan oleh mutasi pada fragmen *gen rpoB* pengkode RNA polimerase subunit β , terutama pada daerah sepanjang 81 pasang basa (pb) penentu sifat resistensi RIF (kodon 507-533), dengan frekuensi yang paling tinggi pada kodon 526 dan 531. Mutasi ini menyebabkan RIF tidak berfungsi dalam menghambat proses inisiasi transkripsi (14,15).

Demikian juga dengan INH, yang merupakan *prodrug* yang harus diaktifkan oleh adanya enzim *katalase peroksidase* yang dikode oleh *gen katG* *M. tuberculosis* dan *gen inhA* yang menyandi enzim *EnvM*, serta *gen oxyR-ahpC*, mutasi pada ketiga gen ini mengakibatkan resistensi INH. Posisi yang paling sering termutasi pada *gen katG* adalah posisi nukleotida 944, G menjadi C. Mutasi ini berada pada kodon 315, AGC menjadi ACC, yang mengubah Ser menjadi Thr dan telah dibuktikan penyebab resistensi terhadap INH (16,14,17).

Mutasi yang menyebabkan resistensi MTB dapat terjadi karena faktor pengobatan tidak adekuat, misalkan : pemakaian obat tunggal dalam pengobatan TB, penggunaan rejimen pengobatan yang tidak tepat sebagai contoh memberikan hanya RIF dan INH di daerah dengan tingkat resistensi tinggi terhadap kedua jenis obat tersebut, penyediaan obat yang tidak reguler (kadang-kadang pengiriman obat ke suatu daerah terhenti selama berbulan-bulan), pemberian obat yang tidak teratur, sebagai contoh setelah 2 bulan diminum 2 atau 3 minggu lalu berhenti setelah 2 bulan pasien datang lagi ke dokter lain dan mendapat OAT lagi untuk 2 atau 3 bulan kemudian berhenti lagi dan demikian seterusnya (7).

Berdasarkan hasil analisis kekerabatan atau jarak genetik antar kelompok isolat klinik MTB resisten RIF dan INH sebagaimana tersaji pada Tabel 3 adalah 0.0669. Koefisien kekerabatan berdasarkan analisis UPGMA adalah 0 - 40%. Rendahnya jarak genetik kedua kelompok isolat klinik MTB resisten RIF dan INH mungkin disebabkan oleh mekanisme resistensi keduanya yang disebabkan oleh mutasi.

Hasil analisis UPGMA terhadap 6 sampel dalam kelompok isolat klinik MTB resisten RIF pada Gambar 12 menghasilkan dendrogram dengan koefisien kekerabatan 0 - 30% atau keragaman populasi 70 - 100%. Pada koefisien kekerabatan 0,2408 atau 24,08% atau keragaman populasi 75,92% terbentuk 3 subpopulasi, yaitu subpopulasi I beranggotakan 2 sampel nomor 1 dan 2 ; subpopulasi II beranggotakan 2 sampel nomor 3 dan 4 ; subpopulasi III beranggotakan sampel 5 dan 6.

Gambar 7 merupakan hasil analisis UPGMA terhadap 7 sampel dalam kelompok isolat klinik MTB resisten INH menghasilkan dendrogram dengan koefisien kekerabatan 0 – 30% atau keragaman populasi 70 – 100%. Pada koefisien kekerabatan 0,2401 atau 24,01% atau keragaman populasi 75,99% terbentuk 4 subpopulasi, yaitu subpopulasi I beranggotakan 2 sampel nomor 1 dan 3; subpopulasi II beranggotakan 2 sampel nomor 2 dan 4; subpopulasi III beranggotakan 2 sampel nomor 5 dan 6; dan subpopulasi IV beranggotakan 1 sampel nomor 7.

Terbentuknya subpopulasi pada kelompok isolat resisten RIF dan INH, mungkin disebabkan perbedaan mutasi gen. Resistensi INH umumnya disebabkan mutasi pada *gen katG*, *gen inhA*, *gen kasaA*, *ndh* dan *gen oxyR-ahpC*. Sedangkan resistensi RIF disebabkan mutasi pada *gen rpoB*. Disamping itu resistensi MTB dapat disebabkan mekanisme lainnya seperti pompa *efluks* antibiotik.

Berdasarkan analisis kekerabatan/jarak genetik baik antara kelompok isolat klinik MTB resisten INH dan RIF, maupun antar sampel dalam kelompok isolat klinik MTB resisten RIF dan INH,

memberikan hasil analisis sebagaimana disajikan Tabel 2 dan 3 yang relatif kecil $\leq 0,707$. Hal tersebut dimungkinkan karena Balai Besar Pengobatan Paru sebagai rujukan penderita TB hanya terdapat satu di Kota Makassar, sehingga pasien dan MTB dari berbagai wilayah di Kota Makassar saling berinteraksi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian diketahui terdapat keragaman genetik isolat klinik MTB resisten RIF dan INH di Makassar, MTB resisten Rif berkisar 80 – 100% atau rata-rata 93,76%, sedangkan pada kelompok isolat klinik MTB resisten INH berkisar 50 – 100% atau rata-rata 90%. Analisis kekerabatan atau jarak genetik antar sampel dalam kelompok isolat klinik MTB resisten RIF dan INH relatif dekat yaitu $\leq 0,707$.

Masih diperlukan penelitian lanjutan dengan jumlah sampel yang lebih banyak dan lokasi yang berbeda, sehingga dapat ditemukan *pita/fragmen* DNA yang spesifik dari masing-masing isolat, untuk menentukan secara epidemiologi penyebaran MDR-TB di Kota Makassar dan perlu pengulangan beberapa kali untuk melihat tingkat keberulangan (*reproducibility*) hasil RAPD.

DAFTAR PUSTAKA

Naim, R, 1996. **Teknik Pengembangan Uji Diagnostik melalui Teknik Molekuler**. Cermin Dunia Kedokteran No. 110, p. 32-34.

Depkes, 2006. **Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis**. Edisi 2 Cetakan I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Mahardika, I.G.N. K. 2003. **Polymerase Chain Reaction**. Jurnal Veteriner Fakultas kedokteran Hewan,

Universitas Udayana Denpasar Vo. 4(1).

Suryanto, D. 2003. **Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui beberapa Teknik Genetik Molekuler**. USU Digital Library.

Singh, J.P.N., Verma, R., Chaudhuri, P. 2006. **Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *M. tuberculosis* strains in India**. Journal of Veterinary Science Vo. 7, No. 2. 181-187.

- Poeloengan, M, I. Komala and S.M. Noor, 2007. **Bahaya dan Penanganan Tuberculosis. Lokakarya Nasional Zoonosis** . Balai Penelitian Veteriner Bogor.
- Viska, O. 2007. **Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR-TB)**. Jurnal Tuberkulosis Indonesia, Volume 5, 19-23.
- Nikmawati, A., Windarwati, Hardjoeno, 2006. **Resistensi *M. tuberculosis* terhadap Obat Anti Tuberculosis**. Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory, Vol.12 No.2 ; 58-61.
- Jou, R., Chen, H.Y., Chiang , C.Y., Yu, M.C., Su, I.J. 2005. **Genetic Diversity of Multidrug-Resistant *M. Tuberculosis* Isolates and Identification of 11 Novel *rpoB* Alleles in Taiwan**. Journal Clinical Microbiology, Volume 43, No.3, p.1390-1394.
- Post, F.A., P.A.Willcox, B. Mathema, L.M. Steyn, K. Shean, S.V. Ramaswamy, E.A. Graviss, E. Shashkina, B.N. Kreiswirth, and G. Kaplan , 2004. **Genetic Polymorphism in *M. tuberculosis* Isolates from Patients with Chronic Multidrug-Resistant Tuberculosis**. Journal of Infectious Disease, Vol.190, p. 99-106.
- Promega, 2005. **Technical Manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit**. Promega Corporation, Woods Hollow Road, Madison, USA.
- Valive, S.G., 2009. **Dendro UPGMA : A Dendogram Construction Utility**. Biochemistry and Biotechnology Departement Universitet Rovira Virgili Tarragon, Spain. Online in www.expasy.ch/tools/ diakses tanggal 10 November 2009.
- Kimbal, J.W. 2000. **Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)**. <http://user.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RFLPs.html>. online diakses 2 Juni 2009.
- Maidin, M.A. 2005. **Harapan dan Tantangan Aplikasi Reaksi Rantai Polimerase (PCR) Multipleks dalam Pemberantasan TB Paru di Indonesia** (Suatu Pendekatan Biologi Molekuler). Jurnal Supplement Vo. 26 No.3 , p. 19-28.
- Syahrani, P. 2007. **Mutasi Gln menjadi Leu pada Kodon 513 Gen *rpoB M.tuberculosis* L1 Resisten Rifampin**. Master Theses . Central Library Institute Technology Bandung.
- Retnoningrum, D.S, Kembaren , R. F. 2004. **Mekanisme Resistensi Tingkat molekul terhadap Beberapa Obat pada Mycobacterium tuberculosis**. Jurnal Acta Pharmaceutica Indonesia, Vol.29 No.3 , hal. 92-85.
- Pane, E.R. 2007. **Beberapa Mutasi Gen katG Isolat Klinis *M. tuberculosis* Resisten Isoniazid**. Undergraduate Theses . Central Library Institute Technology Bandung.

