

KONSTRUKSI PRIMER UNTUK MENDETEKSI MUTASI GEN *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* DENGAN METODE AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM (ARMS)-PCR

Arif Sardi

Biologi, UIN Ar-Raniry, Banda Aceh, Indonesia

arif_sardi@yahoo.co.id

Abstract: Quickly recognize drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is very important for the efficiency of the treatment and control of the disease. More than 95% of RIF resistance occurs due to point mutations in the 81-bp region of the *rpoB* gene *M. tuberculosis*. Generally, the mutation occurs at codon 531, 526 and 516. One of method to detect the mutation is using ARMS-PCR. In order to apply the ARMS-PCR technique to detection of mutations needed a special and specific primer. Primer design process using computer software “Primer Designer” and the specificity was confirmed with “Bioedit”. Accuracy and ability of all these primers to detecting mutation in *rpoB* gene *M. tuberculosis* tested using ARMS-PCR method. PCR amplification results were then analyzed using the techniques of electrophoresis on agarose 1.5%. Electrophoresis results showed two bands produced from the amplification with the template H37RV (wild type). Both bands are expected to be in a position 238 bp and 484 bp, in the other hand the result amplification with the template from mutant strains produce one band with sized 484 bp. From these data it is known that ARMS-PCR reactions are performed can be used to detect mutations in the *rpoB* gene of *M. Tuberculosis*.

Abstrak: Mengetahui secara cepat resistansi obat pada *Mycobacterium tuberculosis* adalah hal yang sangat penting untuk efisiensi pengobatan dan pengontrolan penyakit tersebut. Lebih dari 95% resistan RIF terjadi karena adanya mutasi titik pada daerah sepanjang 81-bp dari gen *rpoB* *M. tuberculosis*. Umumnya mutasi terjadi pada kodon 531, 526 dan 516. Salah satu cara yang dapat mendeteksi mutasi tersebut adalah dengan menggunakan metode ARMS-PCR. Untuk bisa menerapkan teknik ARMS-PCR dalam mendeteksi mutasi yang terjadi dibutuhkan suatu primer yang khusus dan spesifik. Proses konstruksi primer dilakukan dengan menggunakan *software* komputer ”Primer Designer” dan spesifisitasnya dikonfirmasi dengan “Bioedit”. Ketepatan dan kemampuan ketiga primer tersebut dalam mendeteksi mutasi gen *rpoB* *M. tuberculosis* diuji menggunakan metode ARMS-PCR. Hasil amplifikasi PCR selanjutnya dianalisis menggunakan teknik elektroforesis pada agarosa 1,5%. Dari hasil elektroforesis dilihat adanya dua pita yang terbentuk dari hasil amplifikasi menggunakan template H37RV (*wild type*). Kedua pita tersebut diperkirakan berada pada posisi 238 bp dan 484 bp, sedangkan pada hasil amplifikasi

menggunakan template strain mutan menghasilkan satu pita sepanjang 484 bp. Dari data tersebut diketahui bahwa reaksi ARMS-PCR yang dilakukan bisa digunakan untuk mendeteksi mutasi gen rpoB *M. tuberculosis*.

Key Word: mutasi, *M. tuberculosis*, ARMS-PCR.

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit infeksi tertua yang dikenal dalam dunia kedokteran, namun sampai sekarang masih menjadi pembunuh paling besar diantara penyakit infeksi. Menurut World Health Organization^[1], lebih dari satu juta orang meninggal setiap tahunnya akibat infeksi ini. WHO memperkirakan antara tahun 2002–2020 sekitar 1 milyar manusia akan terinfeksi. Dengan kata lain pertambahan jumlah infeksi lebih dari 56 juta tiap tahunnya. Biasanya 5-10% diantara infeksi berkembang menjadi penyakit dan 40% diantara yang berkembang menjadi penyakit berakhir dengan kematian^[2].

Di Indonesia, penyakit tuberkulosis merupakan masalah utama kesehatan masyarakat. Hasil Survei Kesehatan Nasional (SURKESNAS)^[3] yang dilakukan tahun 2010 menunjukkan bahwa penyakit ini merupakan penyebab kematian nomor tiga setelah penyakit jantung dan saluran pernafasan pada semua kelompok usia dan nomor satu dari golongan penyakit infeksi. Ada beberapa faktor yang menyebabkan sulitnya penanganan TB, salah satunya adalah belum efektifnya pemberian kemoterapi terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) penyebab TB^[4].

Pendekatan kemoterapi untuk TB agak berbeda dengan infeksi bakteri yang lain. *M. tuberculosis* merupakan mikroorganisme yang memiliki waktu regenerasi yang panjang dan memiliki kemampuan menjadi dorman dalam tubuh hospesnya, sehingga menyulitkan agen kemoterapi mencapai targetnya. Kemoterapi anti tuberkulosis yang umumnya digunakan adalah : Isoniazid (INH), Ethambutol (EMB), Pyrazinamide (PZA) dan Rifampicin (RIF). Keempat jenis kemoterapi anti tuberkulosis ini sering juga disebut sebagai “*First line drugs*”^[5,6].

Pemberian kemoterapi anti tuberkulosis ibarat pisau bermata

dua, disatu sisi mereka membunuh patogenik *M. tuberculosis*, namun disisi lain bisa memunculkan *M. tuberculosis* yang resistan terhadap obat-obatan tersebut. Penyebab utama dari resistansi adalah penggunaan obat yang tidak memadai, yang mencakup ketidakpatuhan minum obat, penggunaan obat bermutu rendah, diagnosa yang kurang akurat dan pengawasan penggunaan obat yang tidak optimal^[1]. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa resistan bakteri ini tidak saja terjadi pada salah satu jenis agen kemoterapi tapi bisa lebih. Kondisi ini dikenal juga dengan istilah *Multi-Drugs Resistance* (MDR). Karena kombinasi INH dan RIF merupakan kemoterapi utama dalam penanganan awal infeksi *M. tuberculosis*, maka khusus untuk TB, MDR didefinisikan sebagai resistan *M. tuberculosis* terhadap minimal Rifampicin (RIF) dan Isoniazid (INH)^[1,5,7].

Kemungkinan terjadinya resistan tunggal bakteri terhadap RIF jarang dibandingkan dengan INH. Hal tersebut dapat diketahui dari data penelitian Johnson *et al*^[7] yaitu sekitar 95% resistan RIF selalu diiringi resistan agen kemoterapi lain. Dengan demikian jika *M. tuberculosis* sudah diketahui resistan terhadap RIF maka sangat besar kemungkinannya juga sudah resistan terhadap INH, artinya bakteri ini sudah mengalami MDR. Berdasarkan hal tersebut maka WHO menetapkan resistan RIF sebagai penanda terjadinya MDR.

Mekanisme resistansi *M. tuberculosis* terhadap RIF sudah banyak dipelajari, dan ditemukan bahwa lebih dari 95% resistan RIF terjadi karena adanya mutasi titik pada daerah sepanjang 81-bp (*Rifampicin resistance region*) dari gen *rpoB* yaitu antara kodon 507-533. Umumnya mutasi terjadi karena perubahan asam amino Ser menjadi Leu pada kodon 531 (lebih kurang 25-47 %), kemudian diikuti oleh mutasi His menjadi Tyr pada kodon 526 dan Asp menjadi Val pada kodon 516^[7,8,9].

Untuk mengetahui apakah *M. tuberculosis* sudah resistan atau belum maka perlu dilakukan uji resistansi bakteri. Secara konvensional uji resistansi dilakukan dengan teknik kultur bakteri pada medium yang mengandung agen kemoterapi. Tetapi metode ini memiliki kelemahan diantaranya membutuhkan waktu yang lama (sekitar 3-4 bulan) dan faktor *human error* yang cukup tinggi. Karena rentang waktu yang diperlukan untuk mendapatkan

hasil cukup lama, terjadinya resistansi pada bakteri sulit diketahui dengan cepat. Dampak dari tidak terdeteksinya bakteri yang resistan ini adalah selain berpengaruh pada faktor kesembuhan pasien juga akan menyebabkan terjadinya penularan secara luas kuman-kuman TB yang resistan ke orang lain. Hal ini menyebabkan penanganan masalah TB semakin kompleks dan membutuhkan biaya yang sangat besar^[5].

Seperti umumnya sebagian besar negara berkembang, di Indonesia dengan alasan efisiensi, uji resistansi konvensional kuman *M. tuberculosis* tidak terlalu umum dilakukan. Padahal sebagai negara dengan kasus TB nomor tiga terbesar di dunia, dimana WHO memperkirakan lebih kurang 680 ribu kasus TB pada tahun 2013 dengan angka kematian 25 orang per 100 ribu jumlah penduduk setiap tahunnya, penanganan TB idealnya dilakukan lebih serius lagi.

Dengan diketahuinya mekanisme resistansi *M. tuberculosis* terhadap RIF terjadi karena adanya mutasi titik pada daerah sepanjang 81-bp, maka saat ini banyak dikembangkan metode deteksi resistansi berbasis molekuler yang lebih cepat, tepat dan akurat. Salah satu diantaranya adalah metode *amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR*. Metode ini cukup ideal dikembangkan di Indonesia, karena berbeda dengan metode-metode deteksi mutasi secara molekuler lain (seperti teknik hibridisasi dan sekuensing) yang membutuhkan peralatan canggih, biaya mahal, serta keahlian khusus, metode ARMS-PCR lebih sederhana. Karena metode ini hanya menerapkan prinsip PCR dengan beberapa primer sekaligus (*multiplex PCR*), yang umumnya telah tersedia di hampir setiap daerah di Indonesia. Walaupun relatif sederhana, teknik ARMS-PCR tetap memiliki sensitivitas yang tinggi dalam mendeteksi mutasi^[7,8,10].

Untuk bisa menerapkan teknik ARMS-PCR dalam mendeteksi mutasi pada gen *rpoB* dari *M. tuberculosis* diperlukan suatu primer yang khusus dan spesifik. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkonstruksi primer yang mampu mengenali terjadinya mutasi pada gen *rpoB Mycobacterium tuberculosis* khususnya kodon 531. Hasil penelitian ini diharapkan dapat berguna dalam pengembangan sistem deteksi resistansi *M. tuberculosis* yang

cepat, akurat dan murah, sehingga dapat membantu mengatasi masalah TB di Indonesia.

Metode penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, dimana peneliti mendeskripsikan hasil konstruksi primer dan konfirmasi kemampuan primer mengamplifikasi daerah yang diinginkan. Isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah DNA dari *M. tuberculosis* strain H37RV dan strain mutan (yang sudah resistan RIF pada kodon 531). Semua isolat diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Isolat-isolat ini diperlukan untuk menguji apakah primer yang dikonstruksi dapat bekerja mengamplifikasi fragmen DNA yang diinginkan. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara kualitatif, data yang dianalisis adalah hasil konstruksi primer dan kemampuan primer mengamplifikasi daerah yang diinginkan.

Konstruksi Primer

Primer yang akan digunakan untuk mendeteksi mutasi gen rpoB *M. tuberculosis* dengan metode ARMS-PCR dikonstruksi dengan menggunakan piranti lunak komputer “*primer designer*”. Akan dihasilkan tiga buah konstruksi primer yaitu primer A196F, A196R dan A196C. Primer A196F dan A196C merupakan primer *forward* sedangkan primer A196R merupakan primer *reverse*. Primer A196F dan A196R digunakan untuk mengamplifikasi DNA yang mencakup daerah 81-bp (selanjutnya disebut primer eksternal). Primer A196C dan A196R dipakai untuk mengamplifikasi daerah yang meliputi kodon 531 (disebut primer internal). Sekuen gen rpoB *M. tuberculosis* yang akan digunakan untuk konstruksi primer ini diperoleh dari gen bank NCBI^[11].

Konfirmasi hasil konstruksi primer

Ketepatan dan kemampuan konstruksi primer yang dibuat selanjutnya dikonfirmasi dalam 2 tahapan: pertama secara *in silico* (komputerisasi) dan selanjutnya baru diujikan langsung pada sampel. Konfirmasi awal dilakukan menggunakan *software*

komputer “Bioedit” untuk melihat adanya kemungkinan *mispriming* primer dengan daerah-daerah lain pada genom *M. tuberculosis* selain daerah yang akan diamplifikasi. Jika tidak ditemukan kemungkinan adanya *mispriming* maka selanjutnya hasil konstruksi primer siap untuk disintesis menjadi oligonukleotida primer (proses sintesis/membuat oligonukleotida primer dilakukan oleh laboratorium komersial).

Proses konfirmasi/pengujian kerja primer yang dikonstruksi pada sampel dilakukan dalam 3 tahapan yaitu: isolasi DNA, amplifikasi dengan PCR dan elektroforesis pada gel agarosa

Isolasi DNA

Proses isolasi DNA diawali dengan mengambil 2-3 ose koloni *M. tuberculosis* strain H37RV dari medium LJ (Lowenstein Jensen). Koloni tersebut dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang berisi 200 μ L air destilasi. Campuran ini kemudian dimasukkan kedalam *waterbath* pada suhu 100°C selama 30 menit untuk memisahkan DNA dan menginaktifkan bakteri. Tabung tersebut kemudian disentrifus dengan menggunakan mikrosentrifus pada 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang berisi DNA diambil dan disimpan pada suhu -20°C dan siap digunakan pada reaksi PCR. Untuk koloni *M. Tuberculosis* strain mutan juga dilakukan dengan cara yang sama.

Amplifikasi dengan PCR

DNA yang diperoleh dari hasil isolasi, selanjutnya diamplifikasi dengan menggunakan primer yang dikonstruksi. Pada tahap awal reaksi PCR dilakukan sesuai dengan SOP's yang dibuat Victor, TC *et al* ^[12] (tidak dipublikasikan). Pada tabung PCR dimasukkan primer yang dikonstruksi sebanyak 1 μ L, H₂O 36,85 μ L, dNTP's 4 μ L, taq polymerase 2 μ L, 10X Buffer 5,0 μ L, MgCl₂ 1,0 μ L, dan kemudian ditambahkan 2,5 μ L DNA yang diisolasi. Untuk tahap selanjutnya reaksi akan disesuaikan dengan kondisi optimum primer yang dirancang. Pada penelitian ini, reaksi PCR berlangsung sebanyak 35 siklus. Siklus PCR dimulai dengan melakukan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 4 menit. Tahap selanjutnya dilakukan denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit,

annealing disesuaikan dengan T_m (*Melting temperatur*) primer yang dikonstruksi, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Untuk tahap 2-4 diulang sebanyak 35 siklus. Pada akhir siklus dilakukan inkubasi tambahan pada suhu 72°C selama 10 menit untuk menyempurnakan proses polimerisasi.

Elektroforesis gel agarosa

Untuk mengetahui hasil dari amplifikasi, dilakukan elektroforesis pada gel agarosa 1,5%. Gel agarosa dibuat dengan cara melarutkan agarosa sebanyak 1,5 gram kedalam 100 ml TAE 1X. Larutan dipanaskan sampai homogen dan selanjutnya didinginkan pada suhu ruangan. Larutan agarosa dituangkan ke dalam cetakan yang sebelumnya sudah dibatasi dan telah diletakkan sisir dan ditunggu sampai agarosa mengeras. Setelah agarosa mengeras, pembatasnya dibuka dan sisir diangkat. Selanjutnya agar dan cetakannya dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah berisi larutan TAE 1X hingga gel terendam. DNA yang akan diamati ditambahkan dengan *loading dye* dengan komposisi 5:1 (DNA : *Loading dye*). Bahan tersebut dicampur dengan cara pipet *up-down* agar tercampur dengan baik. Setelah bahan tercampur, diambil dan kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis. Lalu *chamber* ditutup dan diberi tegangan 110 Volt selama 30 menit. Setelah itu gel direndam dalam larutan etidium bromida ($0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) selama 10 menit, dibilas dengan akuades dan diamati dibawah sinar UV. Sebagai penanda ukuran DNA digunakan GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Selanjutnya gel hasil elektroforesis diletakkan di atas UV transluminator dan difoto^[13].

Hasil dan pembahasan

Konstruksi Primer

Salah satu hal yang sangat penting dalam reaksi PCR ialah pemilihan primer atau pemula DNA yang tepat. Primer bertanggung jawab untuk mengenali dan menandai segmen DNA *template* yang akan diamplifikasi. Pada penelitian ini dihasilkan tiga buah konstruksi primer yaitu primer *forward* A196F, primer *reverse* A196R dan primer *forward* A196C. Proses konstruksi

primer diawali dengan mengkonstruksi primer internal A196C. Hal ini dikarenakan primer A196C merupakan primer yang nantinya secara spesifik akan mengenali mutasi pada gen rpoB *M. tuberculosis* khususnya kodon 531. Hasil konstruksi primer internal A196C dapat dilihat pada Tabel 1 berikut :

Tabel 1. Hasil konstruksi awal primer A196C

Sequence: 5'-GACCCACAAGCGCCGACTGTC-3'			
Kriteria	Pengaturan kriteria	Hasil	Ket
% GC	Min 50, Max 60	66	NO
Tm C	Min 55, Max 80	80	YES
No Hairpins	Energy cutoff 0.0 kcal	-	YES
No 3' Dimers	Reject >= 3 matches pada ujung 3'	3	NO
No Dimers	Reject >= 7 batasan homol basa	4	YES
No Runs	Reject >= 3 basa runs	3	NO
No 3'GC runs	Reject >= 3 G atau C pada ujung 3'	1	YES

Konstruksi primer dilakukan menggunakan *software* komputer “*primer designer*“. Penggunaan *software* komputer dalam mengkonstruksi primer lebih efektif dibandingkan pemilihan secara manual dan acak. Beberapa faktor yang mendukung reaksi PCR lebih mudah disesuaikan bila suatu primer dikonstruksi menggunakan program komputer. *Melting temperatur* dan kemungkinan homolog primer dengan DNA target lebih mudah diketahui bila menggunakan komputer.

Dari Tabel 1 bisa dilihat bahwa primer A196C memiliki kandungan basa GC yang tidak ideal yaitu 66 % dan Tm (*Melting Temperature*) yang terlalu tinggi 80°C (walaupun masih dalam batas toleransi). *Run* dari primer tersebut kurang bagus karena terjadinya pengulangan basa C sebanyak 3 kali yaitu pada basa ke 3 sampai basa ke 5. Selain itu juga terdapat kemungkinan terjadinya *self-dimer* pada ujung 3' primer dengan komplementnya. Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam mengkonstruksi primer adalah panjang primer, kandungan basa GC dan Tm dari primer tersebut^[14]. Panjang oligonukleotida yang digunakan sebagai primer umumnya 18-28 nukleotida dan mempunyai kandungan G+C sebesar 50-60%^[15]. Pada kisaran ini primer bisa bekerja secara spesifik dan lebih mudah mengenali DNA cetakan yang akan diamplifikasi. Ukuran

primer yang terlalu pendek akan mengurangi kespesifikan primer, sebaliknya primer yang terlalu panjang juga menyebabkan reaksi PCR tidak berjalan efektif^[14].

Untuk mengurangi kriteria yang tidak sesuai pada konstruksi primer pertama (Tabel 1), maka dilakukan konstruksi ulang primer A196C. Hasil konstruksi primer A196C yang telah diperbaiki dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil konstruksi primer A196C

Sequence: 5'-GACCTACAAGCGCTGACTGTC-3'			
Kriteria	Pengaturan kriteria	Hasil	Ket
% GC	Min 50, Max 60	57	YES
Tm C	Min 55, Max 80	70	YES
No Hairpins	Energy cutoff 0.0 kcal	-	YES
No 3' Dimers	Reject >= 3 matches pada ujung 3'	3	NO
No Dimers	Reject >= 7 batasan homol basa	6	YES
No Runs	Reject >= 3 basa runs	2	YES
No 3'GC runs	Reject >= 3 G atau C pada ujung 3'	1	YES

Konstruksi ulang dilakukan dengan cara penggantian/perubahan dua nukleotida dibagian tengah primer internal A196C. Tujuan penggantian dua nukleotida tersebut adalah agar kandungan GC dari primer A196C berada dalam kondisi ideal. Kandungan GC dan Tm perlu distabilkan (dalam kondisi ideal) hal tersebut akan mempengaruhi temperatur *annealing* dari primer^[16]. Primer yang memiliki kandungan GC dan Tm yang tepat akan mudah menempel pada urutan nukleotida yang sesuai dengan urutan primer itu sendiri dan menempel pada posisi ujung 5' dari untai DNA target yang telah terurai pada proses sebelumnya.

Penggantian dua basa pada primer diharapkan tidak akan mempengaruhi spesifisitas penempelan primer. Primer yang memiliki panjang 20 nukleotida, homologi antara urutan nukleotida dengan urutan DNA target minimal 66,7%^[17]. Dengan melakukan penggantian dua basa pada primer A196C, primer tersebut masih memiliki homologi dengan DNA cetakan sekitar 90,5 %.

Hasil rekonstruksi primer juga dapat menghasilkan *run* (jalannya reaksi) primer lebih baik karena tidak terdapat lagi pengulangan suatu basa sebanyak tiga kali. Dalam mengkonstruksi primer sebaiknya hindari konstruksi primer yang mempunyai

nukleotida C atau G secara berurutan tiga atau lebih karena bisa menyebabkan *hairpins* dan *run* dari primer menjadi tidak bagus^[18]. *Hairpins* bisa terbentuk karena interaksi intramolekuler pada primer yang mengakibatkan melipatnya ujung 3' dari primer. Munculnya struktur sekunder yang diakibatkan oleh reaksi intramolekuler atau intermolekuler bisa menyebabkan produk PCR menjadi tidak bagus (sedikit). Reaksi tersebut mampu mempengaruhi penempelan primer pada DNA cetakan dan jalannya proses amplifikasi^[19]. Walaupun masih terdapat kemungkinan terjadinya *self-dimer* pada ujung 3' primer, tetapi kemungkinan terjadinya primer-dimer sangat kecil.

Dengan berpedoman pada primer internal A196C, maka tahap selanjutnya adalah konstruksi primer eksternal A196F dan A196R. Proses konstruksi primer A196F dan A196R lebih bersifat fleksibel jika dibandingkan konstruksi primer internal A196C. Hal ini didasarkan atas fungsi primer A196F dan A196R yang akan mengamplifikasi gen yang meliputi daerah 81-bp, sehingga memiliki banyak kemungkinan untuk konstruksi primer dan posisi dari primer tersebut. Faktor yang perlu diperhatikan dalam mengkonstruksi primer A196F dan A196C adalah T_m primer A196C karena nantinya ketiga primer tersebut akan digunakan dalam reaksi *multiplex*. Temperatur *annealing* antara primer yang digunakan pada reaksi *multiplex* PCR harus berkisar antara 1°C. Tingginya perbedaan suhu antar primer bisa menyebabkan tidak berlangsungnya proses amplifikasi^[16]. Hasil konstruksi primer A196F dan A196R dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil konstruksi primer A196F dan A196R.

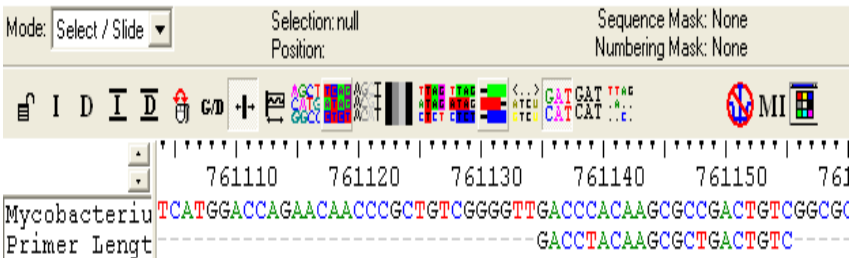
	Sequence: 5'-CGACGACATCGACCACTTC-3'			
	Kriteria	Pengaturan kriteria	Hasil	Ket
Primer A196F	% GC	Min 50, Max 60	57	YES
	Tm C	Min 55, Max 80	69	YES
	No Hairpins	Energy cutoff 0.0 kcal	-	YES
	No 3' Dimers	Reject >= 3 matches pada ujung 3'	2	YES
	No Dimers	Reject >= 7 batasan homol basa	4	YES
	No Runs	Reject >= 3 basa runs	2	YES
	No 3'GC runs	Reject >= 3 G atau C pada ujung 3'	1	YES

Primer A196R	Sequence: 5'-CGATCTCGTCGCTAACCAC-3' (Complementary strand)			
	Kriteria	Criteria Setting	Hasil	Ket
% GC	Min 50, Max 60	57	YES	
Tm C	Min 55, Max 80	69	YES	
No Hairpins	Energy cutoff 0.0 kcal	-	YES	
No 3' Dimers	Reject >= 3 matches pada ujung 3'	2	YES	
No Dimers	Reject >= 7 batasan homol basa	4	YES	
No Runs	Reject >= 3 basa runs	2	YES	
No 3'GC runs	Reject >= 3 G atau C pada ujung 3'	1	YES	

Konfirmasi Hasil Konstruksi Primer Secara *In Silico*

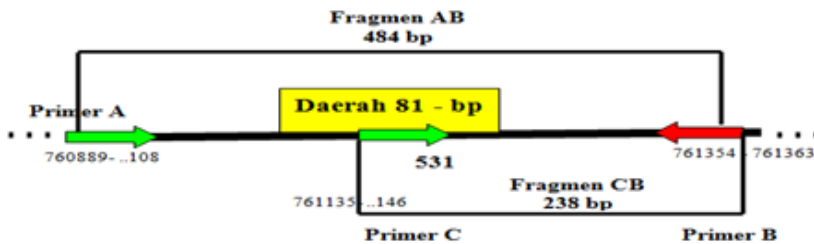
Spesifisitas konstruksi primer yang dibuat selanjutnya dikonfirmasi dengan *software* komputer “Bioedit“. Hal ini dilakukan untuk menghindari kemungkinan *mispriming* primer dengan daerah lain pada genom *M. tuberculosis* selain daerah yang akan diamplifikasi. Hasil konstruksi primer dialignment dengan DNA genom *M. tuberculosis* untuk mengetahui kemungkinan primer tersebut bekerja pada daerah lain selain daerah yang akan diamplifikasi. Kesalahan dan kurang tepatnya penggunaan primer dapat mengakibatkan kesalahan segmen yang akan diamplifikasi. Primer menempel pada bagian lain dari DNA dan bukan pada bagian yang dikehendaki. Akibatnya amplifikasi akan dilakukan pada daerah yang ditemplei primer walaupun daerah tersebut bukan daerah yang dikehendaki untuk amplifikasi.

Tahap konfirmasi perlu dilakukan khususnya primer internal A196C karena dalam mengkonstruksi primer A196C dilakukan perubahan dua basa dari yang seharusnya. Hasil *alignment* primer internal A196C dengan DNA genom *M. tuberculosis* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil *alignment* primer internal A196C

Dari Gambar 1 bisa dilihat bahwa posisi penempelan primer A196C berada pada sekuens 761135-761146 dari DNA genom *M. tuberculosis*. Penempelan primer pada posisi tersebut sesuai dengan yang diprediksi sebelumnya bahwa primer internal A196C akan mengenali daerah yang mengalami mutasi titik (kodon 531). Spesifisitas dari primer dalam mengenali daerah yang akan diamplifikasi tetap tinggi walaupun telah dilakukan perubahan dua basa pada primer tersebut. Secara teoritis *annealing* primer A196C akan dimulai dari posisi 761135 serta tidak ditemukan adanya kemungkinan *mispriming*. Besarnya pita DNA yang akan terlihat pada agarosa tergantung pada posisi primer yang digunakan. Pada penelitian ini posisi penempelan primer dan besarnya pita/fragmen DNA yang terbentuk secara relatif dapat dilihat pada Gambar 2.




Gambar 2. Posisi penempelan primer :

- Genom *M. tuberculosis*
- Forward primer / sense;
- Reverse primer / antisense

Konfirmasi Menggunakan PCR

Tahap awal pengujian primer dengan PCR dilakukan secara terpisah sesuai dengan kondisi masing-masing pasangan primer. Beberapa faktor yang harus diperhatikan untuk mendapatkan hasil yang optimum dalam reaksi PCR adalah jumlah/konsentrasi *mix* yang digunakan. Masing-masing komponen tersebut memiliki peranan yang sangat penting dalam suatu reaksi PCR. Komposisi enzim, *template*, dNTP, MgCl₂, *buffer* dan primer yang tepat sangat menentukan berhasil/tidaknya suatu reaksi PCR. Komposisi *mix* yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi *mix* PCR* yang digunakan

Mix	Final konsentrasi	Siklus
Buffer 10 X	1 X	Denaturasi awal 95 ° C ; 4'
dNtp 10 mM	0,2 mM	
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	
Taq polymerase	0,3 µL (50 µL)	
Primer A196F	1 µM	
Primer A196R	1 µM	Polimerisasi akhir 72 ° C 1'
Primer A196C	1 µM	
H ₂ O	23,2 µL (50 µL)	
Template	2,5 µL (50 µL)	

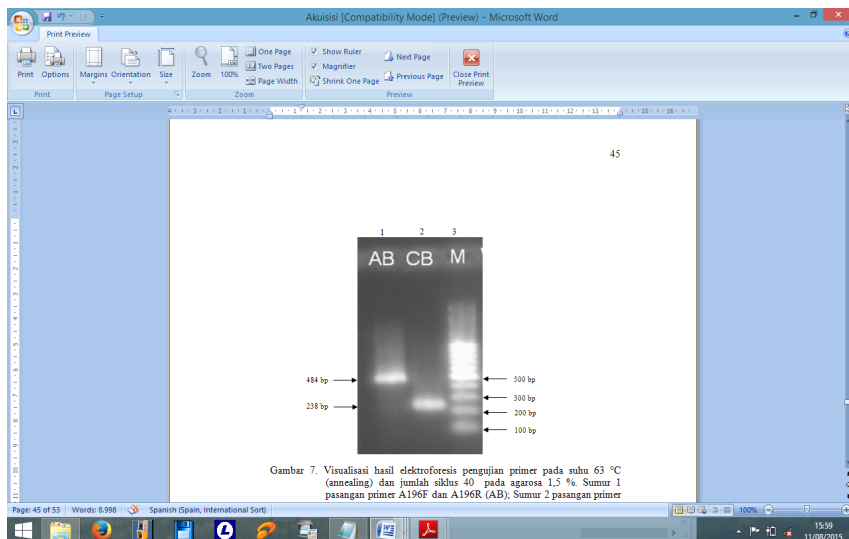
Ket : * Berdasarkan standard protokol Fermentas®

Konsentrasi dNTP yang ideal dalam suatu *mix* PCR antara 0,1-0,2 mM karena pada konsentrasi ini dNTP menghasilkan keseimbangan yang optimal. Pada penelitian ini digunakan dNTP dengan konsentrasi 0,2 mM karena pada konsentrasi 0,1 mM tidak mampu dihasilkan produk PCR yang diinginkan. Untuk MgCl₂ digunakan 1,5 mM. Hal ini digunakan berdasarkan konsentrasi minimum yang dianjurkan standar protokol pada Fermentas®. Mengoptimalkan konsentrasi magnesium adalah penting karena konsentrasi magnesium dapat mempengaruhi proses annealing primer, temperatur disosiasi untuk DNA *template* dan produk PCR yang dihasilkan^[15]. Konsentrasi enzim taq DNA polymerase yang direkomendasikan adalah antara 1,25 -2 unit untuk 50 µL^[20]. Kebutuhan enzim tergantung pada DNA target atau primer. Konsentrasi enzim yang terlalu tinggi akan mengakibatkan terjadinya *smears* pada hasil PCR dan bila terlalu rendah hasil yang didapatkan tidak cukup. Penggunaan Taq DNA polymerase dari *supplier* yang berbeda akan menyebabkan perbedaan komposisi *mix* yang digunakan karena berbedanya formulasi, kondisi asasi dan definisi unit. Pada penelitian ini penggunaan enzim, MgCl₂, dNTP, buffer dan komponen PCR lainnya disesuaikan dengan standar protokol pada Fermentas®.

Reaksi PCR terdiri dari tiga tahapan. Diawali dengan mendenaturasi material genetik yaitu mengubah molekul DNA dari *double stranded* (untai ganda) menjadi *single stranded* (untai tunggal). Selanjutnya primer bekerja dengan cara menempel (*annealing*) pada bagian yang sesuai dengan molekul *single strand*.

Pada tahap ketiga terjadi proses elongasi dengan bantuan enzim DNA polymerase.

Hasil amplifikasi PCR dianalisis menggunakan teknik elektroforesis pada agarosa. Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran molekul tersebut. Sehingga elektroforesis dapat digunakan untuk separasi makromolekul. Elektroforesis pada makro molekul (seperti protein dan asam nukleat) memerlukan matriks penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang digunakan^[16]. Lokasi dari DNA yang terdapat pada gel bisa diamati dengan pewarnaan menggunakan ethidium bromida, sehingga nantinya bisa dilihat sewaktu gel diletakkan diatas UV transluminator. Visualisasi hasil elektroforesis produk PCR menggunakan pasangan primer A196F dan A196R serta pasangan primer A196C dan A196R dapat dilihat pada Gambar 3.

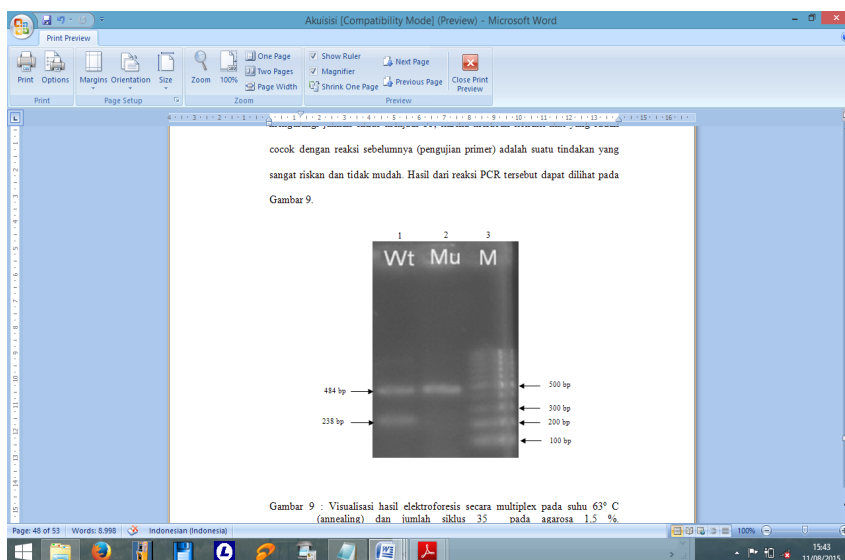


Gambar 3. Visualisasi hasil elektroforesis pengujian primer

Berdasarkan perbandingan posisi *marker* maka pita DNA hasil amplifikasi yang terlihat pada Gambar 3 diyakini sebagai fragmen yang terbentuk oleh masing-masing primer. Dari visualisasi hasil elektroforesis dapat dilihat adanya pita pada posisi antara 400 dan

500 bp pada sumur 1 sedangkan pada sumur 2 terdapat pita pada posisi diantara *marker* 200 dan 300 bp. Hal tersebut sesuai dengan yang diprediksi sebelumnya bahwa reaksi PCR yang menggunakan primer A196F (*forward* A) dan A196R (*reverse* B) (AB) akan mengamplifikasi fragmen DNA sepanjang 484 bp. Sedangkan primer A196C (*forward* C) dan A196R (*reverse* B) (CB) mampu membentuk fragmen DNA berukuran 238 bp. Dari kedua data tersebut bisa disimpulkan bahwa primer yang dikonstruksi bisa melakukan proses amplifikasi secara optimal.

Selanjutnya dilakukan pengujian dengan metode ARMS-PCR. Prinsip dari metode ARMS-PCR yang digunakan dalam mendeteksi mutasi merupakan reaksi *multiplex* PCR. Dimana tiga atau lebih primer digunakan untuk mengamplifikasi suatu daerah pada DNA secara bersamaan. Satu dari tiga primer tersebut adalah primer yang spesifik untuk mengenali strain mutan. Terjadinya mutasi titik pada suatu kodon tertentu dapat diketahui dengan mengkonstruksi primer yang spesifik mengenali kodon yang mengalami mutasi. Hal ini bisa dilakukan dengan memposisikan ujung 3' dari primer ini tepat berada pada sekuen yang mengalami mutasi titik^[14]. Visualisasi pengujian secara *multiplex* PCR dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Visualisasi hasil elektroforesis dengan metode ARMS-PCR

Dari hasil elektroforesis terlihat adanya 2 pita DNA yang terbentuk dari amplifikasi menggunakan *template* H37RV (*wild type*). Kedua pita tersebut diperkirakan berada pada posisi 238 bp dan 484 bp (Sumur 1), sedangkan pada hasil amplifikasi menggunakan *template* strain mutan menghasilkan satu pita pada posisi 484. Hal ini (Sumur 2) menunjukkan bahwa pada kondisi tersebut hanya primer A196F dan A196R yang mampu mengamplifikasi DNA target, sedangkan amplifikasi primer A196C dan A196R tidak bisa dilanjutkan karena telah terjadi perubahan (mutasi) dari sekuen DNA *M. tuberculosis*. Primer tidak bisa mengamplifikasi DNA target yang diinginkan karena perubahan suatu nukleotida dari *template*^[14]. Akibat dari berbedanya target PCR menyebabkan taq DNA polymerase tidak mampu melanjutkan proses amplifikasi pada daerah yang diinginkan.

Berdasarkan data tersebut bisa diketahui bahwa reaksi ARMS-PCR yang dilakukan bisa digunakan untuk mendeteksi mutasi pada gen *rpoB* *M. tuberculosis* khususnya kodon 531, tetapi metode ini masih memiliki keterbatasan diantaranya: reaksi ini tidak mungkin bisa mendeteksi 100% mutasi dari gen *rpoB*, dimana lebih dari 40 tipe mutasi yang mencakup 20 kodon^[9]. Walaupun demikian spesifitas dan sensitifitasnya yang tinggi dalam mendeteksi mutasi dapat dijadikan sebagai salah satu faktor mengapa metode ini bisa digunakan. Selain itu jika dibandingkan dengan metode deteksi mutasi lainnya, reaksi ARMS-PCR memiliki beberapa keuntungan diantaranya lebih murah dan mudah diaplikasikan. Proses/waktu pelaksanaannya lebih singkat, mulai dari persiapan reagen, peralatan termasuk penambahan DNA genom (*template*), ARMS-PCR amplifikasi dan elektroforesis pada agarosa bisa diselesaikan dalam satu hari. Pengaplikasiannya yang cepat dan metode yang mudah untuk mendeteksi resisten RIF pada *M. tuberculosis* merupakan nilai yang sangat penting untuk efisiensi pengobatan dan pengontrolan TB.

Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan telah berhasil dikonstruksi tiga buah primer yaitu primer *forward* A196F, primer *reverse* A196R dan primer *forward* A196C. Ketiga primer yang dikonstruksi

mampu mengenali mutasi gen rpoB *Mycobacterium tuberculosis* pada kodon 531 dengan metode ARMS-PCR.

Daftar Kepustakaan

- [1.] WHO. 2015. Global Health Observatory (GHO) data <http://www.who.int/gho/data> Diakses 3 agustus 2015
- [2.] Rumah Sakit Prof. Sulianti Saroso (www.infeksi.com). 2007. Pusat Informasi Penyakit Khususnya HIV AIDS. Jakarta. Diakses 4 Maret 2008.
- [3.] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Strategi Nasional Pengendalian TB di Indonesia 2010-2014*. Jakarta
- [4.] WHO. 2005. *Guidelines for Surveillance of Drug Resistant in Tuberculosis*. Geneva
- [5.] Gillespie, SH. 2002. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical and molecular perspective. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (Vol.46. No.2, 2002)
- [6.] Crofton, J.N., Horne and Miller. 2002. *Clinical Tuberculosis*. McMillan education. London.
- [7.] Johnson, R. et al. 2005. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cuur Issue molecular Biology*. (vol.8, 2005)
- [8.] Deepa, P., K. L. Therese and H. N. Madhavan. 2005. Detection and Characterization of mutations in rifampicin resistance *Mycobacterium tuberculosis* clinic isolates by DNA sequencing. *Indian Journal of Tuberculosis*. (vol.52, 2005).
- [9.] Musser, J. M. 1995. Antimicrobial Agent resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. *Clinical microbial reviews*. Hal 496 – 514
- [10.] Victor, TC et al. 1999. Detection of mutation in drug resistance genes of *Mycobacterium tuberculosis* by a dot-blot hybridization strategy. *Tuberculosis and Lung Disease*. (vol.79, 2009) Hal 343-348
- [11.] National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. rpoB gene [*Mycobacterium tuberculosis*]; 2008. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Diakses 4 maret 2008
- [12.] Victor, TC et al. *Standard Operation Procedure*. (Tidak dipublikasikan)
- [13.] Sambrook, J and Russel. 2001. *Molecular cloning, A laboratory Manual 3rd edition*. Cold Sprig Harbour Laboratory Press. New York

- [14.] Dieffenbach CW, Dveksler GS, editors. 2003. *PCR primer: a laboratory manual. 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- [15.] Yuwono, T. 2006. *Teori dan aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Andi. Yogyakarta
- [16.] Fatchiyah, dkk. 2008. *Analisa Biologi Molekuler*. Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Malang
- [17.] Hanegariu, O. et.al. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *Bio Techniques*. (vol.23, 1997)
- [18.] Rybicki, et.al. 2001. *PCR Primer Design and Reaction Optimisation*. University of Cape town. Cape town
- [19.] Yuryev, A. 2008. *PCR Primer Design*. Tontowa J. Humana Press.
- [20.] Fermentas. 2008. *Standard Protocol for PCR*. Fermentas Lincoln centre Drive. California.