

14

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

PAMERAN

1 SEP 2004



SELESAI

LAPORAN PENELITIAN
DOSEN MUDA TAHUN ANGGARAN 2002

**PEMBAKUAN DAERAH RESISTEN RIFAMPIN (GEN RPOB)
PADA PENDERITA KUSTA TIPE MULTIBALISER (MB)
DI SURABAYA DENGAN TEKNIK PCR**

Oleh:

Drh. E. BIMO AKSONO H., M.Kes.
Dr. INDROPO AGUSNI, dr., Sp.KK.

3/8 04
LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia
DIP Nomor : 003/XXIII/1/--/2002 Tanggal 1 Januari 2002
Kontrak Nomor : 023/LIT/BPPK-SDM/IV/2002
Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 73

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

September, 2002

DAFTAR ISI

	halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
SUMMARY	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
I. PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Perumusan Masalah	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
Etiologi dan Jalur Penularan Penyakit Kusta	4
Jenis Pembagian Kusta	5
Diagnosis Dan Gejala Klinik Penyakit Kusta	6
Tindakan Penanganan Penyakit Kusta	7
Dasar Molekuler Gen <i>rpoB</i>	7
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	8
Tujuan Penelitian	8
Manfaat Penelitian	8
IV. METODE PENELITIAN	9
Tempat dan Waktu Penelitian	9
Subjek dan Koleksi Sampel	9
Pembuatan Suspensi dan Isolasi Kuman <i>M. leprae</i>	9
Deteksi Gen <i>rpoB</i> Dari Kuman <i>M. leprae</i> Dengan Teknik PCR.....	10
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	12
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	16
DAFTAR PUSTAKA	17

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN
DOSEN MUDA**

1. a. Judul Penelitian	:	
		PEMBAKUAN DAERAH RESISTEN RIFAMPIN (Gen rpoB) PADA PENDERITA KUSTA TIPE MULTIBASILER (MB) DI SURABAYA DENGAN TEKNIK PCR
b. Macam Penelitian	:	
2. Kepala Proyek Penelitian		
a. Nama Lengkap dan Gelar	:	Drh E. Bimo Aksono H, M.Kes
b. Jenis Kelamin	:	Laki-Laki
c. Pangkat/Golongan dan NIP	:	Penata/IIIc/132014464
d. Jabatan Sekarang	:	Lektor
e. Fakultas/Puslit/Jurusan	:	FKH-Universitas Airlangga
f. Universitas	:	Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu Yang Diteliti	:	Mikrobiologi dan Biologi Molekuler
3. Jumlah Tim Peneliti	:	3 Orang
4. Lokasi Penelitian	:	Tropical Disease Centre Unair
5. Kerjasama Dengan Instansi Lain		
a. Nama Instansi	:	-
b. A l a m a t	:	-
6. Jangka Waktu Penelitian	:	6 Bulan
7. Biaya Yang Diperlukan	:	Rp. 6.000.000,- (Enam Juta Rupiah)

SELESAI

Surabaya, 15 September 2002

Mengetahui,
Ketua Tropical Disease Centre
Universitas Airlangga

Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, M.Sc
NIP. 130 359 278

Ketua Peneliti,

Drh. E. Bimo Aksono H, M.Kes
NIP. 132 014 464

Menyetujui :
Ketua Lembaga Penelitian Unair

Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S
NIP. 130 701 125

RINGKASAN

PEMBAKUAN DAERAH RESISTEN RIFAMPIN (GEN *rpoB*) PADA PENDERITA KUSTA TIPE MULTIBASILER (MB) DI SURABAYA DENGAN TEKNIK PCR (E. Bimo Aksono H; Indropo Agusni; Mustofa Helmy Effendi, 2002, 16 halaman)

Rifampin merupakan salah satu pengobatan kemoterapi *multidrug* yang banyak digunakan baik bagi penderita kusta maupun tuberkulosis di seluruh dunia, sedangkan penderita kusta tipe multibasiler merupakan salah satu bentuk kusta yang sangat infeksius. Meskipun demikian pemakaian rifampin ternyata memberikan hasil yang kurang memuaskan pada beberapa penderita kusta tipe multibasiler. Hal ini disebabkan kemungkinan adanya strain *Mycobacterium leprae* yang resisten terhadap rifampin.

Penelitian ini untuk menjawab permasalahan (1). Apakah daerah resisten rifampin (gen *rpoB*) pada *Mycobacterium leprae* dapat di isolasi dari penderita kusta tipe multibasiler di Surabaya; 2). Apakah primer TR1 dan TR2 yang digunakan untuk mendeteksi gen *rpoB* pada *M. tuberculosis* dapat juga digunakan untuk mendeteksi gen *rpoB* pada *M.leprae*

Tujuan penelitian ini untuk membakukan daerah resisten rifampin (gen *rpoB*) dari *Mycobacterium leprae* pada penderita kusta tipe multibasiler di Surabaya-Jawa Timur.

Penelitian ini menggunakan 5 sampel penderita penyakit kusta yang telah positif *M. leprae* di Surabaya-Jawa Timur yang dikoleksi oleh Tropical Disease Centre Universitas Airlangga Surabaya. Semua sample dilakukan pemeriksaan terhadap daerah resisten rifampin (gen *rpoB*) dari *Mycobacterium leprae* dengan teknik PCR menggunakan *nested PCR* (primer TR1 dan TR2 dari *M. tuberculosis*) yang dirancang untuk sekali jalan selama 45 siklus, DNA hasil PCR tersebut diidentifikasi daerah resisten rifampin (gen *rpoB*) dengan panjang 420 pasangan basa nukleotida dengan mempergunakan metode elektroforesis pada gel agarose terbuat dari 5% Polyacrylamide- 0,25% agarose composite gel.



Hasil elektroforesis dapat dilihat dengan pewarnaan menggunakan perak nitrat (metode Indrayana), dimana prinsip metode ini terdiri dari tahap *drying*, *fixation*, *staining*, *developing* dan terakhir *stop reaction*. sebagai pembanding digunakan kontrol positif dan marka marka $\phi X 174/Hae$ digest atau MW Marka 4.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari 5 sampel penderita kusta terdapat 5 penderita yang menunjukkan positif terhadap daerah resisten rifampin (gen *rpoB*) dari *Mycobacterium leprae* dengan teknik PCR.

*(L.P. Tropical Disease Centre, Universitas Airlangga :
No. Kontrak : 690/JO3.2/PG/2002, 30 Mei 2002)*

SUMMARY

THE DETECTION of RIFAMPIN RESISTANCE REGION (*rpoB* GENE) in MULTIBACILLARY (MB) TYPE of LEPROSY PATIENTS in SURABAYA by PCR TECHNIQUE

E. Bimo Aksono; Indropo Agusni; Mustofa Helmy Effendi

*Department of Leprosy
Tropical Disease Centre, Airlangga University Surabaya*

Rifampin is a key component in the chemotherapeutic regimens used to combat both leprosy and tuberculosis. Owing to exquisite rifampin susceptibility of *Mycobacterium leprae*, this drug is the backbone of the multidrug therapy currently recommended by WHO for the treatment of leprosy. It is conceivable, however, that rifampin resistance could compromise control programs, and owing to the very slow growth rate of *M. leprae*, there is a real need for rapid and efficient means of determining whether strains are rifampin susceptible or resistant.

The aim of this study was to gain information about the detection of rifampin resistance region (*rpoB* gene) of *M. leprae* in multibacillary (MB) type of leprosy patients in Surabaya by PCR technique.

M. leprae was detected by nested PCR. In brief, PCR was run with the sense primer TR1 and anti the sense primer TR2 for 45 cycles. Amplified DNA was fragmented by 2% agarose electrophoresis and the 420 base pairs product was visualized by silver staining methods (Indrayana Methods).

The result show that the *rpoB* gene was detected on the basis of TR1 and TR2 (Primers from *M.tuberculosis*) a round 420 base pairs nucleotides using the nested PCR methods. It show that 5 isolate of 5 patients of leprosy in Surabaya-Jawa Timur are positive detected.

*(L.P. Tropical Disease Centre, Universitas Airlangga :
No. Kontrak : 690/JO3.2/PG/2002, 30 Mei 2002)*

KATA PENGANTAR

Pertama-tama kami panjatkan puji syukur ke Hadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena atas perkenannya maka laporan penelitian dosen muda tahun 2002 kami tentang **“PEMBAKUAN DAERAH RESISTEN RIFAMPIN (GEN *rpøB*) PADA PENDERITA KUSTA TIPE MULTIBASILER (MB) DI SURABAYA DENGAN TEKNIK PCR”** dapat kami selesaikan.

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Ditjen Dikti Departemen Pendidikan Nasional, Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Ketua Tropical Disease Centre Universitas Airlangga, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan dan perkenannya sehingga penelitian kami dapat berlangsung dengan lancar. Demikian juga ucapan terima kasih, kami sampaikan kepada Dr. I Made Mertaniasih, M.S.,dr; dr.Linda P, M.S dan Dr. Indrayana N.S., DSF.,DFM yang telah banyak memberikan saran, pengetahuan dan reagen penelitian serta anggota kelompok studi lepra TDC- Univesitas Airlangga yang banyak membantu menyediakan waktu dan tenaga untuk kelancaran penelitian kami.

Kami menyadari bahwa laporan penelitian ini masih banyak kekurangannya, kritik dan saran sangat kami harapkan demi peningkatan kualitas dari laporan penelitian kami. Selain itu besar harapan kami, laporan ini dapat memberikan tambahan pengetahuan dan informasi bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Surabaya, 15 September 2002

Penulis

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1. Primer Sense Dan Antisense Untuk Deteksi Daerah Resisten Rifampin (Gen <i>rpoB</i>) Pada Kuman <i>M. leprae</i>	11
Tabel 2. Hasil Deteksi Daerah Resisten Rifampin (Gen <i>rpoB</i>) Dari <i>M. leprae</i> Pada Penderita Lepra Tipe Multibasiler Di Surabaya-Jawa Timur.....	14

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 1. Produk PCR Sekitar 420 Pasangan Basa Nukleotida Terlihat Sebagai Band Pada Hasil Elektroforesis Dengan Agarose Gel 2%.....	13

I. PENDAHULUAN

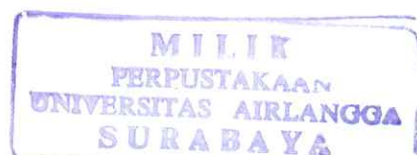
Latar Belakang

Penyakit kusta (*Leprosy, Morbus Hansen*) masih merupakan masalah kesehatan di Indonesia maupun dunia, karena sering menimbulkan kecacatan dan masalah psiko-sosial (pengemis, gelandangan) sehingga merupakan ancaman terhadap kualitas sumber daya manusia untuk pembangunan (Agusni, 1996).

Meskipun program pemberantasan penyakit kusta telah digalakkan bagi penderita kusta tipe *multibasiler* sebagai sumber penularan yang sangat potensial, namun masih saja timbul kasus-kasus kusta baru dengan sumber penularan yang tidak jelas (Agusni, 1996). Selama ini yang dianggap sebagai sumber penularan selalu manusia, karena penyakit ini hanya ditemukan pada manusia saja dan tidak pernah terjadi pada hewan kecuali pada mencit percobaan, armadillo dan kera mangabey dan sifat kumannya tidak sama dengan kuman *M. leprae* pada manusia (Amezcuca *et al*, 1984; dan Baskin *et al*, 1985).

Demikian juga beberapa daerah di Indonesia, meskipun program pemberantasan kusta telah dilakukan dengan pengobatan kombinasi kusta seperti yang dianjurkan oleh WHO (*World Health Organization*) yaitu salah satunya pengobatan dengan pemberian rifampin akan tetapi angka penyembuhan pada beberapa penderita kusta termasuk tipe *multibasiler (MB)* menunjukkan hasil yang kurang memuaskan, ini diduga adanya strain kuman *Mycobacterium leprae* yang resisten terhadap rifampin (Honore dan Cole, 1993).

Penelitian molekuler kasus resistensi kuman *Mycobacterium leprae* terhadap rifampin telah dipelajari dengan menggunakan model pada bakteri *E. Coli*, dimana hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa target obat rifampin tersebut terletak



pada *sub-unit beta* pada *DNA dependent RNA Polymerase* yang selanjutnya diketahui sebagai gen *rpoB* dari kuman *Mycobacterium leprae* (Ovchinnikov *et al*, 1983).

Kapur *et al* (1994) melaporkan bahwa DNA dari daerah gen *rpoB* telah dapat diidentifikasi sejumlah 306 pasangan basa dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, apabila dilanjutkan dengan teknik sekuensing terlihat bahwa terdapat beberapa urutan nukleotida yang mengalami mutasi yang kemudian dikaitkan dengan kejadian resisten dari strain kuman *Mycobacterium leprae*.

Walaupun terdapat kasus resistensi penderita kusta terhadap rifampin tapi penelitian molekuler tentang kasus resistensi kuman *Mycobacterium leprae* terhadap rifampin belum banyak dilakukan. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk mengembangkan teknik *PCR* dalam mendeteksi kasus resistensi pada penderita kusta khususnya tipe *multibasiler (MB)* terhadap rifampin.

Perumusan Masalah

Rifampin merupakan salah satu pengobatan kemoterapi kombinasi kusta yang banyak digunakan bagi penderita kusta maupun tuberkulosis di seluruh dunia (Williams *et al*, 1994), sedangkan penderita kusta tipe *multibasiler* merupakan salah satu bentuk kusta yang sangat infeksius dan menular.

Walaupun demikian pemakaian rifampin ternyata sering memberikan hasil yang kurang memuaskan pada penderita *multibasiler* oleh karena itu saat ini pengobatan dengan rifampin mulai banyak ditinggalkan. Hal ini disebabkan kemungkinan adanya strain kuman *Mycobacterium leprae* yang resisten terhadap rifampin (Honore dan Cole, 1993).

Berkaitan dengan itu sebenarnya beberapa peneliti telah berhasil mengidentifikasi dengan teknik *PCR*, suatu daerah DNA pada kuman *Mycobacterium*

leprae sejumlah 306 pasangan basa yang kemudian disebut dengan gen *rpoB*, gen ini sering dikaitkan dengan penyebab kasus resistensi suatu strain *Mycobacterium leprae* terhadap rifampin (Telenti *et al*, 1993 dan Levin *et al*, 1993).

Walaupun terdapat kasus resistensi penderita kusta khususnya tipe *multibasiler (MB)* di Surabaya terhadap rifampin tapi penelitian molekuler tentang kasus resistensi *Mycobacterium leprae* terhadap rifampin belum banyak dilaporkan.

Oleh karena *M. tuberculosis* dan *M. leprae* merupakan satu genus yaitu *Mycobacterium* maka diperkirakan daerah resisten rifampin (gen *rpoB*) diantara keduanya memiliki daerah yang konservatif sehingga dapat digunakan untuk merancang primer yang akan digunakan untuk mendeteksi daerah tersebut.

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Apakah daerah resisten rifampin (gen *rpoB*) pada *Mycobacterium leprae* dapat di isolasi dari penderita kusta tipe *multibasiler* di Surabaya ?;
- Apakah primer TR1 dan TR2 yang digunakan untuk mendeteksi gen *rpoB* pada *M. tuberculosis* dapat juga digunakan untuk mendeteksi gen *rpoB* pada *M. leprae*?

II. TINJAUAN PUSTAKA

Etiologi dan Jalur Penularan Penyakit Kusta (Lepra, Morbus Hansen)

Mycobacterium leprae merupakan basil penyebab kusta, dimana kuman ini termasuk ordo *Actinomycetales*, famili *Mycobacteriaceae* dan genus *Mycobacterium*. Kuman ini bersifat gram positif, pleomorfik, berbentuk batang lurus dan melengkung, dengan pewarnaan Ziehl-Nielsen termasuk golongan basil tahan asam (BTA) dalam sediaan kuman biasanya ditemukan dalam bentuk formasi tunggal, (*Soliter*), berkelompok (*Clumps*) atau membentuk bulatan (*Globi*) (Cochrane, 1964; Agusni, 1996).

Mycobacterium leprae merupakan salah satu jenis kuman *Mycobacteria* yang sangat sulit ditumbuhkan dalam perbenihan buatan, hidupnya *obligat intraseluler* (hanya bisa hidup di dalam sel) dan dapat bertahan terhadap aksi fagositosis oleh karena kemampuan dinding sel yang sangat kuat terhadap peran lisosim. Struktur dari sel kuman ini memiliki kesamaan dengan struktur *Mycobacterium* yang lain sehingga seringkali didapatkan reaksi silang antara kuman-kuman *Mycobacterium*.

Oleh karena itu sejak kuman kusta ditemukan pertama kali, kemajuan dalam bidang penyakit ini terutama perkembangan molekuler relatif lambat. Untuk mempelajari kuman *Mycobacterium leprae* para peneliti sering menggunakan cara *in vivo* yaitu perbenihan melalui hewan hidup, namun masih sangat terbatas pada telapak kaki mencit, hewan armadillo dan serta sejenis kera mangabey yang hidup di Afrika (Amezcuca *et al*, 1984; dan Baskin *et al*, 1985; Agusni, 1996).

Perjalanan klinik penyakit kusta merupakan suatu proses yang lambat dan berlangsung bertahun-tahun sehingga seringkali penderita tidak menyadari adanya proses penyakit di dalam tubuhnya. Di daerah endemik kusta, walaupun sebagian

besar masyarakat pernah terinfeksi kuman *M. leprae* tetapi hanya sekitar 15% yang mungkin akan berlanjut menjadi penderita kusta (Agusni, 1996).

Pada saat ini yang dianggap sebagai tempat utama keluarnya kuman *Mycobacterium leprae* disamping mukosa hidung juga kulit nodular yang terbuka, karena pada tempat ini seringkali ditemukan basil kusta dalam jumlah banyak (Yawalkar, 1994). Oleh karena itu jalur penularannya yang paling mungkin secara *droplet infection* melalui mukosa hidung serta melalui luka pada kulit yang terkontaminasi basil kusta (Agusni, 1996). Faktor penularan kusta terutama dikaitkan hubungan dengan penderita yang berlangsung lama dan terus menerus disamping itu penyakit kusta lebih banyak didapatkan pada masyarakat dengan gizi yang kurang baik serta lingkungan dan higiene yang buruk (Jopling, 1984).

Jenis Pembagian Penyakit Kusta

Dalam pembagian penyakit kusta dikenal pembagian yang paling sederhana (menurut Madrid) hingga pembagian untuk tujuan riset kusta (menurut Ridley dan Jopling) serta tujuan untuk pengobatan kombinasi kusta (WHO).

Menurut Madrid, merupakan pembagian kusta yang paling sederhana didasarkan atas kriteria klinik, bakteriologik dan histopatologik yaitu dibagi menjadi *tipe intermediate*, *tipe tuberkuloid*, *tipe lepromatosa* serta *tipe borderline*. Menurut Ridley dan Jopling, juga didasarkan pada kriteria klinik, bakteriologik dan histopatologik. Penyakit kusta dipandang sebagai suatu penyakit yang dapat menimbulkan kekebalan dari yang rendah sampai kekebalan yang tinggi terhadap basil kusta, dibagi menjadi *tipe LL (Polar Lepromatous)*, *tipe BL (Borderline Lepromatous)*, *tipe BB (Mid-Borderline)*, *tipe BT (Boderline Tuberculoid)* serta *tipe TT (polar Tuberculoid)* (Ridley, 1988). Menurut WHO, pembagian kusta semata-mata

digunakan untuk menerapkan metode pengobatan kombinasi (*Multi Drug Therapy -MDT*) oleh tenaga lapangan, oleh karena itu dikenal pertama tipe *Pausi-Basiler (PB)* mirip dengan tipe *Tubekuloid* pada pembagian Madrid atau tipe *TT* dan *BT* pada pembagian menurut Ridley dan Jopling dengan BTA negatif; yang kedua tipe *Multi-Basiler (MB)* mirip dengan tipe *lepromatosa Borderline* pada pembagian menurut Madrid serta tipe *BB*, *BL*, dan *LL* pada pembagian menurut Ridley dan Jopling (WHO, 1988).

Diagnosis Dan Gejala Klinik Penyakit Kusta

Dalam program pemberantasan kusta, WHO menganjurkan diagnosis penyakit kusta sebaiknya didasarkan pada gejala klinik yang khas seperti adanya lesi kulit yang khas, gangguan sensasi kulit; penebalan syaraf tepi predileksi serta ditemukannya BTA (basil tahan asam) positif dari sediaan sayatan kulit (WHO, 1988), disamping itu untuk diagnosis kusta subklinik (individu dengan tes serologik kusta positif tanpa menunjukkan gejala klinik) diperlukan uji serologik kusta untuk mengetahui antibody spesifik seperti uji *FLA-ABS (Fluorescent Labelled Antibodi Absorption)*; uji *ELISA* untuk deteksi antibody terhadap PGL-1, uji *MACT (Monoclonal Antibody Competition Test)* serta uji *MLPA (Mycobacterium Leprae Particle Agglutination)*.

Penyakit kusta dapat menyerang semua organ tubuh dan menyebabkan bermacam-macam keluhan dan gejala klinik. Gejala klinik bervariasi mulai dari keluhan adanya kelainan pada kulit (kulit mati rasa/*macula anaesthetica*, penebalan kulit/*papula*, penonjolan kulit/*nodula* maupun tukak pada kulit/*ulcera*), kelainan pada syaraf (rasa semutan) disertai peradangan (*neuritis*), nyeri syaraf atau kelumpuhan otot (WHO, 1988).

Tindakan Penanganan Penyakit Kusta

Dalam perjalanan klinik penyakit kusta, seringkali menimbulkan faktor-faktor penyulit seperti kasus resistensi, reaksi kusta, neuritis, timbulnya tukak. Oleh karena itu tindakan penanganan terhadap penyakit kusta diperlukan penanganan yang khusus dan terpadu seperti pengobatan kombinasi kemoterapi dan pengobatan suportif seperti vitamin B1, bahkan bagi penderita kusta yang terlanjur menjadi cacat akibat terlambat berobat diperlukan rehabilitasi medik dan rehabilitasi sosial (WHO, 1988).

Prognosis dari penyakit kusta, umumnya tidak menyebabkan kematian, akan tetapi apabila berlangsung berlarut-larut bisa menimbulkan daya tahan tubuh sehingga dikhawatirkan masuknya infeksi sekunder yang menyertainya.

Dasar Molekuler Gen *rpoB*

Penelitian molekuler kasus resistensi kuman *Mycobacterium leprae* terhadap rifampin telah dipelajari dengan menggunakan model pada bakteri *E. Coli*, dimana hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa target obat rifampin tersebut terletak pada *sub-unit beta* pada *DNA dependent RNA Polymerase* yang selanjutnya diketahui sebagai gen *rpoB* dari kuman *Mycobacterium leprae* (Ovchinnikov *et al*, 1983).

Kapur *et al* (1994) melaporkan bahwa DNA dari daerah gen *rpoB* telah dapat diidentifikasi sejumlah 306 pasangan basa dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, apabila dilanjutkan dengan teknik sekuensing terlihat bahwa terdapat beberapa urutan nukleotida yang mengalami mutasi yang kemudian dikaitkan dengan kejadian resisten dari strain kuman *Mycobacterium leprae*.

IV. METODE PENELITIAN

Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di *Common Training Laboratory-Tropical Disease Centre (TDC)* Universitas Airlangga Kampus C Unair Jl Mulyorejo Surabaya. Waktu penelitian berlangsung dari bulan April sampai dengan Desember 2002.

Subjek Dan Koleksi Sampel

5 sampel penderita kusta tipe *multibasiler* yang sudah dinyatakan positif terhadap *M. leprae* yang telah di koleksi oleh kelompok studi lepra pada Tropical Disease Centre Universitas Airlangga kampus C Unair Jl. Mulyorejo Surabaya. Pernalas swab yang digunakan berasal dari Medical Wire dan Equipment Co. untuk keperluan mengoleksi sampel dari penderita kusta.

Pembuatan Suspensi dan Isolasi Kuman *M. leprae*

Sampel hasil swab dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang berisi 1 ml *nuclease free water* dan di inkubasi selama 10 menit lalu di vortex, kemudian di sentrifus dengan kecepatan 1.200 rpm selama 2 menit. Supernatan yang diperoleh dari hasil pemusingan kemudian dibuang dan pellet yang ada dicuci dengan 200 µl chelex 100 proteinase-K 10 mg dalam 1 M Tris HCl pH 8-8,5 kemudian di vortex dan hasilnya dimasukkan ke dalam sonikator.

Inkubasi dalam sonikator berlangsung pada suhu 50° C selama 20 menit dan selanjutnya di vortex kembali beberapa detik, dan di boiling 100° C selama 8 menit. Pada tahap akhir isolasi dilakukan sentrifuse kembali dengan kecepatan 12.000 rpm

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian untuk mengetahui daerah resisten rifampin pada penderita kusta di Surabaya-Jawa Timur ini digunakan *nested PCR* dengan demikian produknya lebih spesifik, sedangkan penderita yang digunakan adalah penderita yang sudah dinyatakan positif terhadap *M. leprae* dengan perangkat primer tertentu. Oleh karena itu dalam kontrol positif digunakan sampel yang sudah positif *M. leprae* sebagai kontrol terhadap semua prosedur yang dijalankan. Adapun pasangan primer yang digunakan dalam PCR adalah TR1 dan TR2, primer ini merupakan hasil rancangan dari daerah konservatif *M. tuberculosis*. PCR dijalankan hanya untuk satu kali jalan dengan 45 siklus. Oleh karena primer yang digunakan merupakan hasil suatu rancangan baru sehingga perlu adanya optimasi suhu pada PCR dan diharapkan dari PCR ini diperoleh 420 pasangan basa nukleotida setelah melalui tahap elektroforesis, sebagai petanda digunakan marka $\phi X 174/Hae$ digest atau MW Marka 4 (Gambar 1.)

Primer TR1 dan TR2 sebenarnya merupakan rancangan primer yang akan digunakan untuk mendeteksi *M. tuberculosis*, tetapi dengan asumsi bahwa antara *M. leprae* dan *M. tuberculosis* merupakan genus yang sama yaitu genus *Mycobacterium* maka primer tersebut diharapkan cukup sensitif.



Secara konvensional, uji kepekaan rifampin menggunakan *mouse footpads* untuk pertumbuhan kuman sehingga membutuhkan waktu yang cukup lama. Sebagai contoh pada *M.tuberculosis* membutuhkan 2-4 minggu sedangkan pada *M. leprae* membutuhkan waktu bertahun-tahun, oleh karena itu upaya pengembangan metode atau teknik yang cepat, efektif, efisien, dan akurat sangat diperlukan (Steiner, *et al*, 1986 dan Stottmeir, 1976).

Tabel 2. Hasil Deteksi Daerah Resisten Rifampin (Gen *rpoB*) Dari *M. Leprae* Pada Penderita Lepra Tipe Multibasiler di Surabaya-Jawa Timur

No.	Jenis Kelamin	Hasil PCR (Gen <i>rpoB</i>)
1.	Laki	+
2.	Laki	+
3.	Laki	+
4.	Perempuan	+
5.	Perempuan	+
T o t a l Positip		5

Pemeriksaan terhadap DNA suatu kuman memiliki potensi untuk memberikan informasi yang cepat tentang resistensi rifampin, sebab hasilnya ternyata dilaporkan cukup sensitif dan spesifik dibandingkan cara konvensional (Honore dan Cole, 1993). Pengembangan pemeriksaan DNA untuk kepentingan diagnosis kasus resistensi rifampin tersebut membutuhkan dasar pengetahuan molekuler dari kuman *Mycobacterium*. Pemetaan gen yang mengkode sub unit- β dari *DNA-dependent RNA polymerase* (gen *rpoB*) telah berhasil diidentifikasi dengan menggunakan teknologi

pada *M.leprae* dan *M. tuberculosis* memiliki beberapa mutasi yang dianggap berkaitan dengan penyebab kasus resistensi terhadap rifampin (Jin dan Gross, 1988).

Dari hasil penelitian memperlihatkan bahwa ada 5 isolat *M. leprae* dari 5 penderita kusta memiliki band yang positif terhadap *gen rpoB* yang berperan menimbulkan kasus resistensi (Gambar 1 dan Tabel.2) dengan panjang nukleotida kurang lebih 420 pasangan basa dan hasil ini sesuai dengan yang diharapkan. Ini berarti hasil rancangan primer tersebut (TR1 dan TR2) dapat digunakan untuk mendeteksi *gen rpoB* pada kuman *M.leprae*.

Kapur *et al* (1994) melaporkan bahwa DNA dari daerah *gen rpoB* telah dapat diidentifikasi sejumlah 306 pasangan basa dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, apabila dilanjutkan dengan teknik sekuensing terlihat bahwa terdapat beberapa urutan nukleotida yang mengalami mutasi yang kemudian dikaitkan dengan kejadian resisten dari strain kuman *Mycobacterium leprae*

DAFTAR PUSTAKA

- Agusni, I.** 1996. Perubahan pola imuno-patologik sebagai indikator untuk penanganan kusta stadium subklinik. Disertasi-Program Pascasarjana Universitas Airlangga. hal. 7-32.
- Amezcuca, M.E. et al.** 1984. Wild Mexican armadillo with leprosy like infection. J. Int. Leprosy. Vol. 52. p. 254-255
- Baskin, G.B. et al.** 1985. Experiment leprosy in mangabey monkey. J. Int. Leprosy. Vol. 52. p. 269-277.
- Cochrane, R.G.** 1964. Leprosy in theory and practice. Kohn Wright & Sons Ltd Bristol.
- Honore, N and S.T. Cole.** 1993. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. Mar Vol. 37. No.3. p. 414-418.
- Jopling, W.H.** 1984. Handbook of leprosy. 3rd. Ed. William Heinemann Medical Book.
- Jin, D.J and C.A. Gross.** 1988. Mapping and sequencing of mutation in the Escherchia coli rpoB gene that leas to rifampicin resistance. J. Mol Biol. 202. p. 45-58.
- Kapur, V; L.L. Li; S. Iordanescu; M.R. Hamrick; A. Wanger; B.N. Kreiswirth and J.M. Musser.** 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (gen rpoB) encoding the RNA polymerase B subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. J. Clin. Microbiol. Vol.32. p. 1095-1098.
- Levin, M.E and G.F. Hatful.** 1993. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. Mol. Microbiol. Vol.8. p.277-285.
- Ovchinnikov, Y.A; G.S. Monastyrskaya; S.O. Guriev; N.F. Kalinina; E.D. Sverdlov; A.I. Bass; I.F. Kiver; E.P. Moiseyeva; V.N. Igumnov; S.Z. Mindlin; V.G. Nikiforov and R.B. Khesin.** 1983. RNA polymerase rifampicin resistance mutations in *Escherichia coli* : Sequence changes and dominance. Mole. Gen. Genet. Vol.190. p. 344-348.
- Ridley, D.S.** 1988. Pathogenesis of leprosy and related diseases. 1st. Ed. Butterworth & Co. London.



Telenti, A; P. Imboden; F. Marchesi; D. Lowrie; S.T. Cole; M.J. Colston; L. Matter; K. Schoolfer and T. Bodmer. 1993. Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. Vol. 341. p. 647-650.

Steiner, P; M. Rao; M. Mitchell and M. Steiner. 1986. Primary drug-resistant strains of *M. tuberculosis* to rifampin. Am. Rev. Respir. Dis. 134. p. 446-448.

Stottmeir, K.D. 1976. Emergence of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Massachusetts. J. Infect. Dis. 133. p. 88-90.

Williams, D.L; T.P. Gillis and F. Portaels. 1990. Geographically distinct isolates of *Mycobacterium leprae* exhibit no genotypic diversity by restriction fragment-length polymorphism analysis. Mol. Microbiol. 4. p. 1653-1659.

Williams, D.L; C. Waguespack; K. Eisenach; J.T. Crawford; F. Portaels; M. Salfinger; C.M. Nola; C. Abe; V.S. Stich-Groh; dan T.P. Gillis. Characterization of Rifampin Resistance in Pathogenic *Mycobacteria*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol.38. No.10. P.2380-2386.

World Health Organization. 1988. A guide to leprosy control. 2nd Ed. WHO. Publ. Geneva.

Yawalkar, S.J. 1994. Leprosy for medical practitioners and paramedical workers. 6th. Ed. CIBA-GEIGY Ltd, Basle, Switzerland.

PAMERAN

1 SEP 2004