

KESEHATAN

LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING



PENGEMBANGAN TEST CEPAT UNTUK DIAGNOSIS MULTI
DRUG RESISTEN OF TUBERCULOSIS (MDR-TB) BERBASIS
MIKROSKOPIS LANGSUNG DAN UJI NITRAT REDUKTASE

dr. Rahmatini, M.Kes
dr. Andani Eka Putra, MSc

Dibiayai oleh
Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat.
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi.
Dengan nomor kontrak : 004/SP2H/PP/DP2M/III/2010, tanggal 1 Maret 2011

PERPUSTAKAAN
Fakultas Kedokteran Univ. Andalas
TANGGAL
Tanggal : 22-5-2019
No. B.I. : 410 / perpus - 2019

UNIVERSITAS ANDALAS
November, 2011

HALAMAN PENGESAHAN

1. a. Judul Penelitian **PENGEMBANGAN TEST CEPAT UNTUK
DIAGNOSIS MULTI DRUG RESISTEN OF
TUBERCULOSIS (MDR-TB) BERBASIS
MIKROSKOPIS LANGSUNG DAN UJI NITRAT
REDUKTASE**

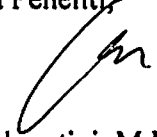
2. Ketua Penelitian
 - a. Nama lengkap & gelar : dr. Rahmatini, MSc
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. NIP : 196702071997022001
 - d. Jabatan Struktural : IIIc
 - e. Jabatan Fungsional : Lektor
 - f. Fakultas/Jurusan : Kedokteran/ Farmakologi
 - g. Pusat penelitian : Lembaga Penelitian Universitas Andalas
 - h. Alamat : Kampus Unand Limau Manis
 - i. Telpon/Fax : (0751) 39725
 - j. Alamat rumah :
 - k. Telpon/fax/e-mail :


3. Jangka waktu penelitian : 2 (dua) tahun

4. Pembiayaan
 - a. Jumlah biaya yang diajukan ke Dikti Rp. 98.642.000,-
 - b. Jumlah biaya tahun ke 2 yang disetujui Rp. 48.000.000,-

Padang, 21 November 2011

Ketua Peneliti,


Dr. Rahmatini, M. Kes
NIP. 196702071997022001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Unand

Prof. Dr. Eryati Darwin, PA
NIP. 195619261987101001
Wakil Dekan
Nomor : 10365/UN16.2/TU/2011
Tanggal : 18 November 2011

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Andalas

Dr. Syafrimen Yasin, MS, MSc
NIP. 196204161986101001

ABSTRAK

PENGEMBANGAN TEST CEPAT UNTUK DIAGNOSIS MULTI DRUG RESISTEN OF TUBERCULOSIS (MDR-TB) BERBASIS MIKROSKOPIS LANGSUNG DAN UJI NITRAT REDUKTASE

Rahmatini*, Andani Eka Putra**, Yenni Muchtar***

**Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang,

**Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang

*** Peserta Program PPDS penyakit Paru FK.Unand/RSUP DR. M. Djamil Padang

Multi Drug Resistance (MDR), yaitu adanya resistensi, minimal terhadap Isoniazid (INH) dan Rifampisin (RIF). Perkembangan MDR-TB menyebabkan munculnya masalah baru dalam penanganan tuberkulosis. Diperkirakan MDR-TB berperan dalam 50 – 70% kematian akibat infeksi *M. tuberculosis*, terutama pada negara-negara sedang berkembang

Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi diagnostik metoda mikrodilusi Nitrat Reduktase dan mikroplate MODS (hasil pengembangan tahun 1) menggunakan metoda proporsional Lowenstein Jensen sebagai standar baku emas.

Penelitian dilakukan terhadap 312 sampel dari berbagai rumah sakit di Sumatera Barat dengan kriteria BTA positif. Uji resistensi dilakukan terhadap INH dan Rifampisin menggunakan ketiga metoda, yaitu metoda mikrodilusi Nitrat Reduktase, mikroplate MODS dan metoda proporsional Lowenstein Jensen.

Hasil penelitian memperlihatkan 34 kasus (10.82%) resistensi terhadap INH, 25 kasus (8.01%) resistensi terhadap Rifampisin dan 24 kasus (7.69%) resisten terhadap INH dan Rifampisin (MDR-TB) berdasarkan pemeriksaan LJ. Sensitivitas, spesifisitas dan nilai kappa metoda mikrodilusi Nitrat reduktase lebih baik terhadap INH, masing-masing 94%, 99% dan 0.901. Hasil ini sama dengan yang ditemukan pada teknik mikroplate MODS, yaitu 88%, 99% dan 0.835. Potensi diagnostik mikrodilusi nitrat reduktase lebih baik dibanding mikroplat MODS.

Kata kunci : MDR-TB, uji resistensi, nitrat reduktase, MODS, kultur proporsional

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Multi Drug Resistance (MDR), yaitu adanya resistensi, minimal terhadap Isoniazid (INH) dan Rifampisin (RIF). Perkembangan MDR-TB menyebabkan munculnya masalah baru dalam penanganan tuberkulosis. Diperkirakan MDR-TB berperan dalam 50 – 70% kematian akibat infeksi *M. tuberculosis*, terutama pada negara-negara sedang berkembang. Pengobatan MDR-TB membutuhkan waktu 2 tahun dengan obat yang 100 kali lebih mahal dibandingkan pengobatan dengan obat standard (*first-line*). Laporan WHO tahun 2008 memperlihatkan bahwa kasus MDR-TB berkisar antara 0 – 22.3% dan pada pasien yang telah mendapat pengobatan, MDR-TB meningkat hingga; Trecevska et al., 2004) 50%, dimana kejadiannya berkisar antara 0 – 85% (WHO, 2008; Weyer et al., 2004).

Metoda standar untuk diagnosis MDR-TB adalah metoda proporsional dengan medium padat Lowenstein Jensen, Ogawa dan Middlebrook 7H10. Pemeriksaan ini membutuhkan waktu yang lama antara 6 – 8 minggu. Salah satu metoda penanganan MDR-TB adalah mengembangkan teknik uji resistensi yang cepat, sehingga pilihan obat pada pasien dapat dilakukan sesegera mungkin. Sejumlah metoda diagnosis cepat adanya MDR-TB telah dicoba dikembangkan di dunia, seperti *Microscopic observation drug susceptibility* (MODS), uji nitrat reduktase, dan azaurin, *microplate Alamar Blue assay* (MABA), *Tetrazolium microplate assay* (TEMA) (Caviedes et al., 2000; Moore et al., 2006; Grandjean et al., 2008).

Pada penelitian ini dicoba mengembangkan metoda diagnosis cepat MDR-TB berbasis mikroskopis yang merupakan modifikasi dari teknik MODS serta modifikasi uji nitrat reduktase yang dibandingkan dengan metoda proporsional medium Lowenstein Jensen dan Middlebrook 7H10. Dasar dari penelitian ini adalah metoda MODS dan nitrat reduktase yang selama ini dikembangkan masih sulit dilakukan di daerah berkembang dan membutuhkan biaya yang cukup besar.

BAB II. STUDI PUSTAKA

2.1. Resistensi terhadap OAT

Pengobatan tuberkulosis menggunakan kombinasi berbagai macam obat, yang terdiri dari INH, Rifampisin, Ethambutol, Streptomisin dan Pirazinamid. Pada tahap awal, digunakan kombinasi 4 – 5 macam obat yang diharapkan dalam membunuh bakteri dengan baik dan mengurangi risiko mutasi. Pada 4 bulan terakhir, umumnya digunakan INH dan Rifampisin yang bertujuan untuk membunuh bakteri yang tersisa (WHO, 2008).

Resistensi *Mycobacterium tuberculosis* pada dasarnya tidak berbeda dengan bakteri lainnya dalam hal resistensi obat. Resistensi *M. tuberculosis* dapat terjadi pada seluruh OAT, kuman ini menjadi resisten paling cepat setelah 2 minggu pengobatan, biasanya 1-4 bulan setelah mulai pengobatan (Telenti et al., 1998)

Analisis genetik dan molekular terhadap MDR-TB memperlihatkan bahwa mutasi terjadi pada sejumlah gen *M. tuberculosis*. Dalam hal ini terdapat dua konsep utama yang terjadi pada gen, yaitu tidak terbentuknya protein target atau overproduksi protein target. Beberapa gen dan protein yang terlibat dalam resistensi OAT adalah sebagai berikut.

Tabel 1. Gen dan protein yang terlibat dalam MDR-TB

| OAT | Gen | Protein | Persentase |
|-----------------|------------------|-----------------------------|------------|
| Rifampicin | <i>rpoB</i> | B-subunit of RNA polymerase | >95 |
| Isoniazid | <i>katG</i> | Catalase-peroxidase | 60-70 |
| | <i>oxyR-ahpC</i> | Alky hydro-reductase | -20 |
| INH-Ethionamide | <i>inhA</i> | Enoyl-ACP reductase | <10 |
| Streptomycin | <i>rpsL</i> | Ribosomal protein S12 | 60 |
| | <i>rrs</i> | 16s rRNA | <10 |
| Fluoroquinolone | <i>gyrA</i> | DNA gyrase | >90 |
| Pyrazinamide | <i>pncA</i> | Amidase | 70-100 |
| Ethambutol | <i>embCAB</i> | EmbCAB | 69 |

Sumber : Rattan et al (1998)

Isoniazid (INH)

Isonicotinic acid hydrazide, 4-pyridinecarboxylic acid hydrazide atau Isoniazid (INH) merupakan golongan OAT yang masih berbentuk prodrug, tersusun dari gugusan hidrazid yang diikatkan pada cincin pyridine. Mekanisme kerja adalah obat ini memasuki sel secara difusi pasif dan diaktivasi oleh katalase – peroksidase yang dikode oleh *katG* untuk menghasilkan radikal bebas. Radikal ini akan menyerang berbagai target di dalam sel. Mutasi pada *katG* akan mengganggu pembentukan enzim katalase-peroksidase (Bardou et al., 1998).

Wengenack dkk (2001) melaporkan bahwa oksidasi INH oleh katalase – peroksidase akan menyebabkan pembentukan radikal acyl, acyl peroxy dan piridil. Radikal ini bersifat pleotrofik. Gugus acyl piridil berikatan dengan NAD^+ yang menyebabkan aktivasi *inhA* terganggu, keadaan ini selanjutnya mengakibatkan gangguan biosintesis asam mikolat (Wangenack et al., 2001).

Resistensi terhadap INH umumnya berkaitan dengan mutasi pada beberapa gen dan regio, antara lain *katG* yang mengkode enzim katalase – peroksidase, *inhA* di region regulator yang mengkode NADH-dependent enoyl acyl carrier protein (ACP) reduktase, *kasA* yang mengkode β -ketoacyl ACP synthase, *ndh* yang mengkode enzim NADH dehydrogenase, *ahpC* yang mengkode enzim alkylhydroperoxide reductase dan *oxyR*. *ahpC* dan *oxyR* terletak pada region intergenik (Lee et al., 2001; Srevaatsan et al., 1997; Basso et al., 1998; Miesel et al., 1998)

Gen *kasA* dan *inhA* mengkode enzim yang berperan dalam biosintesis asam mikolat. Gen *ahpC* mengalami overekspresi sebagai kompensasi pada saat terjadi mutasi *katG*. Mutasi pada *katG* dapat berupa insersi, parsial atau komplet delesi, terminasi dan substitusi, Mutasi ini menyebabkan gangguan pada enzim katalase – peroksidase, baik total, parsial atau minimal. Ramaswamy dkk (2003) melaporkan bahwa substitusi pada kodon 315 umumnya tidak berpengaruh banyak terhadap kerja enzim, sebaliknya delesi atau substitusi dengan stop kodon dapat menyebabkan

hilangnya fungsi enzim. (Sherman et al., 1996; Marrakchi et al., 2000; Ramaswamy et al., 2003).

Rifampisin (RM)

Resistensi terhadap RMP umumnya berkaitan dengan gen *rpoB* pada 81 bp (core region) pada hampir 95% strain *M. tuberculosis*. Analisis sekuensing yang dilakukan oleh Hilleman dkk (2005) memperlihatkan beberapa titik mutasi pada *rpoB*, yaitu S531L, S531T, S531P, His526Asn, His526Leu, His526Arg, His526Tyr, His526Asp, His526Cys, Asp516Val, Asp516Tyr, Ser522Gln, Ser522Leu, Asn518Ile, Gln513Pro dan delesi pada kodon 514 – 517. Sekitar 70.9% ditemukan pada S531L (Bartfai et al., 2001; Hilleman et al., 2005)

RMP bekerja menghambat aktivitas enzim RNA polimerase sehingga mengganggu aktivitas transkripsi. Penelitian Levin dan Hatfull memperlihatkan bahwa RMP menghambat perpanjangan untaian RNA pada transkripsi, bukan pada tahap inisiasi transkripsi. Secara spesifik diketahui bahwa RMP akan berikatan dengan sub unit β RNA polimerase. Mutasi pada gen *rpoB* akan menyebabkan perubahan konformasi pada tempat ikatan antara RMP dan sub unit β , sehingga ikatan tidak terjadi.

Etambutol (EMB)

Etambutol merupakan OAT dengan spektrum luas dengan target operon *embCAB*. Pada operon *embCAB* terdapat 3 gen homolog yang memproduksi arabinosil transferase, yaitu *embA*, *embB* dan *embC*. *M. tuberculosis*, *M. leprae* dan *M. smegmatis* mempunyai ketiga gen ini, sebaliknya *M. avium* hanya mempunyai *embA* dan *embB*. Gen *emb* berperan dalam mengkode enzim arabinosil transferase yang diperlukan untuk tranfer arabinosil pada gugus D-arabinose. (Alcaide et al., 1997; Goude et al., 2008).

Gen *emb* berperan dalam mengkode enzim arabinosil transferase yang diperlukan untuk tranfer arabinosil pada gugus D-arabinose dari arabinogalaktan. Gugus ini diperlukan untuk tempat ikatan asam mikolat untuk membentuk kompleks mikolil arabinogalaktan peptidoglikan pada dinding sel. Gangguan pembentukan gugus arabinogalaktan akibat tidak adanya arabinosil akan menyebabkan gangguan pembentukan dinding sel dan penumpukan asam mikolat (Goode et al., 2008; Rattan et al., 1998).

Streptomisin (SM)

SM dikenal sebagai obat yang efektif terhadap Tuberkulosis sejak tahun 1944. Obat ini berperan melalui ikatan pada sub unit-ribosom 30S sehingga mekanisme kerja obat ini melalui penghambatan pembentukan polipeptida pada saat translasi. Resistensi berkaitan dengan adanya mutasi pada 2 gen yang mengatur sintesis protein Ribosom, yaitu 12S dan 16S rRNA, yaitu *rpsL* dan *rrs*. Gen *rpsL* terletak pada 306bp sedangkan gen *rrs* terletak pada loop 530 (238bp) dan 912 region (240 bp). Streptomisin akan menghambat aminoasil-tRNA yang diperlukan untuk proses translasi. Victor dkk (2001) menemukan transisi C menjadi T pada kodon 491 (C491T) gen *rrs*. (Tracevska et al., 2004; Victor et al., 2001).

Pyrazinamid

Obat ini telah dikenal sejak tahun 1952 sebagai salah satu OAT yang cukup poten. Struktur yang mirip dengan nikotinamid. Obat ini sangat spesifik terhadap *M. tuberculosis* dengan MIC antara 8 – 60 ug/ml. Seperti INH, Pyrazinamid dalam bentuk prodrug yang diaktivasi oleh Pzase menjadi *Pyrizinoic acid*, dalam hal ini protein tersebut digolongkan sebagai amidase (pirazinamidase untuk pirazinamid dan nikotinamidase untuk nikotinamid). Protein ini diduga berperan dalam sintesis gugus nukleotida piridin (Rattan et al., 1998).

Resistensi terhadap obat ini berkaitan dengan mutasi pada gen yang mengkode protein ini. Scorpio dan Zang (1996) berhasil mengisolasi gen yang

berkaitan amidase ini yaitu *pncA*. Poin mutasi gen *pncA* antara lain substitusi Cys138Ser, Gln141Pro dan Asp63His serta delesi nukleotida G pada posisi 162 dan 288. Perubahan ini mengakibatkan hilangnya aktifitas enzim Pzase (Scorpio et al., 1997; Srevaatsan et al., 1997).

2.2. Diagnosis MDR-TB

2.2.1. Kultur

Kultur konvensional

Teknik mikrobiologi masih merupakan standar baku emas untuk menilai resistensi *M. tuberculosis* terhadap berbagai obat-obatan yang ada. Waktu yang dibutuhkan untuk metoda ini cukup lama, yaitu 2-8 minggu untuk kultur dan 3-4 minggu untuk uji resistensi dengan menggunakan medium padat, seperti Lowenstein Jensen, Middlebrook 7H10, Kudoh dan Ogawa. Coban dkk (2005) mencoba menggunakan agar darah sebagai media untuk uji resistensi *M. tuberculosis*, hasil penelitian menunjukkan sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan nilai prediksi negatif masing-masing adalah 71.4, 100, 93.1, and 100% untuk INH dan 100% untuk rifampisin. Penggunaan agar darah terlihat mempersingkat waktu tumbuh menjadi 1-2 minggu (Drancourt et al., 2003; Coban et al., 2005).

Teknik mikrobiologi konvensional ini masih dianggap lama, sehingga mulai dikembangkan metoda yang cepat, akurat dan lebih murah.

Bactec

Teknik ini terdiri dari 2 system, yaitu Bactec 460 yang bersifat radiometrik dan Bactec MGIT 960 dengan pendekatan non radiometrik. Berkaitan dengan kondisi tersebut, teknik Bactec MGIT 960 system yang dikembangkan oleh Becton Dickinson lebih banyak digunakan karena tidak membutuhkan pengelolaan khusus untuk sampah radioaktif. MGIT 960 banyak dikembangkan untuk diagnosis MDR-TB. Teknik ini didasarkan pada perbandingan pertumbuhan kuman pada tabung tanpa obat (Growth Control; GC) dan tabung dengan obat. Konsentrasi obat yang

digunakan adalah INH 0.1 dan 0.4 ug/ml, RMP 1 ug/ml, EMB 5 dan 7.5 ug/ml dan STR 1 dan 4 ug/ml.

Penelitian multisenter yang dilakukan oleh Kontos dkk (2004) yang membandingkan antara MGIT 960 dengan kultur konvensional memperlihatkan kesesuaian kedua metoda terhadap INH adalah 98.9%, RMP 99.4%, EMB 98.8% dan STR 98.9%. Hasil ini menunjukkan bahwa metoda ini mempunyai hasil yang identik dengan yang ditemukan pada metoda kultur konvensional dengan waktu pemeriksaan yang lebih pendek. Tortoli dkk (2002) menyatakan waktu yang dibutuhkan untuk metoda ini rata-rata 7.2 hari (range 5 – 13 hari) (Tortoli et al., 2002; Kontos et al., 2004).

MB/BacT

Metoda ini menggunakan medium cair dan dikembangkan oleh Bio Mereux. Salah satu keunggulan teknik ini adalah dapat digunakan untuk uji resistensi terhadap Pyrazinamid yang sulit dilakukan dengan metoda konvensional dengan menggunakan tabung khusus. Bemer dkk (2004) melaporkan bahwa tingkat kesesuaian hasil dengan kultur konvensional mencapai 98.3%, dengan sensitivitas berkisar antara 98.3% - 100% terhadap OAT. Namun demikian, penelitian ini memperlihatkan waktu yang dibutuhkan untuk uji resistensi sedikit lebih lama dibanding Bactec 460, yaitu 7.8 hari berbanding 6.7 hari (Bemer et al., 2004).

2.2.2. Mikroskopis

Microscopic observation drug susceptibility (MODS)

MODS didasarkan pada penilaian pertumbuhan *M. tuberculosis* secara mikroskopis dengan mengamati adanya pembentukan cord saat diamati dengan mikroskop inverted (pada Non Tuberkulous Mycobacteria biasanya cord lebih sedikit, sebaliknya *M. Chelonae* dapat diamati kurang dari 5 hari).

Penelitian Grandjean dkk (2008) dengan menggunakan teknik MODS ini memperlihatkan bahwa sentrifugasi dan dekontaminasi akan menurunkan jumlah

bakteri yang tumbuh, namun sentrifugasi dan dekontaminasi dengan NaOH akan menurunkan kontaminasi dan meningkatkan sensitivitas terhadap penilaian adanya MDR-TB (Grandjean et al., 2008).

Permasalahan utama dalam metoda ini adalah kebutuhan peralatan yang mahal seperti mikroskop inverted atau penggunaan zat pewarna yang sulit didapat seperti Auramin- Rhodamin.

2.2.3. Biokimia

Pendekatan Biokimia sering digunakan dalam diagnosis MDR-TB, model ini didasarkan pada reaksi kalorimetrik yang terjadi yang ditandai dengan perubahan warna setelah ditambahkan indikator tertentu.

Tetrazolium microplate assay (TEMA)

Pada dasarnya teknik ini menilai perubahan kalorimetrik yang disebabkan oleh reaksi redoks garam tetrazolium. Terdapat dua bentuk dari teknik ini, tergantung pada jenis Tetrazolium yang digunakan, yaitu XTT menggunakan [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] dan MTT yang menggunakan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide]. Metoda ini menggunakan mikroplat 96 sumuran yang diisi dengan suspensi bakteri yang telah ditumbuhkan dalam medium 7H9 Midlebrook. Kedalam tiap sumuran diberikan INH dengan konsentrasi 0.125 – 32 ug/ml, RMP 0.062 – 16 ug/ml, STR 0.125 – 32 ug/ml dan ETB 0.5 – 128 ug/ml. Setelah diinkubasi selama 5 hari ditambahkan Tetrazolium bromide, dan diamati perubahan warna dari kuning menjadi ungu (Martin et al., 2007; Caviedes et al., 2002).

Microplate Alamar Blue assay (MABA)

Metoda ini didasarkan pada perubahan kalorimetrik yang disebabkan oleh alamar Blue. Pada prinsipnya teknik ini sangat mirip dengan TEMA, namun lebih mahal (Fransblau et al., 1998)

3.2. Cara Kerja

3.2.1. Tahun pertama

Penelitian tahun pertama dilakukan terhadap semua spesimen yang telah menunjukkan adanya resistensi terhadap *M. tuberculosis*. Tujuan penelitian tahun pertama ini adalah mendapatkan perlakuan terbaik pada teknik mikroskopis dan nitrat reduktase dalam menilai MDR-TB secara cepat dan murah.

Pengaruh kultur awal terhadap hasil pemeriksaan mikroskopis dan nitrat reduktase

Tahapan ini menyangkut preparasi awal spesimen yang diperiksa, dalam hal ini sputum atau bahan lainnya. Spesimen dibagi atas 2 bagian, satu bagian dikultur dan bagian lain dilakukan berbagai perlakuan sehingga didapatkan dalam bentuk pellet. Komponen yang dikultur, ditumbuhkan hingga 4 minggu, hasil dipreparasi, dekontaminasi, sentrifugasi dan lain sebagainya, sehingga didapatkan dalam bentuk pellet. Kedua bentuk pellet dianalisis dengan secara mikroskopis dan uji nitrat reduktase terhadap adanya MDR-TB.

Pengaruh jenis medium terhadap hasil pemeriksaan mikroskopis dan nitrat reduktase

Jenis medium yang dibandingkan adalah medium padat atau cair terhadap spesimen yang tidak mengalami perlakuan sebelumnya (tanpa prosedur kultur). Spesimen diproses tanpa kultur awal dan langsung ditumbuhkan pada medium yang mengandung medium padat (Lowenstein Jensen) dan cair (Middlebrook 7H9). Dilakukan berbagai fase pengambilan koloni pada medium cair (mid log dan log phase) dan setelah ada pertumbuhan pada medium padat. Hasil yang didapat langsung diujikan dengan metoda mikroskopis dan nitrat reduktase.

Diambil sebagian isolat segar dan diresuspensi dengan PBS dan divortex hingga kekeruhan Mc.Farland I. Bahan dibagi dua, sebagian diencerkan lagi dengan PBS dengan perbandingan 1 : 10.

Preparasi Obat anti tuberkulosis

Konsentrasi obat anti tuberkulosis ditetapkan sesuai dengan standar NCCLS, dimana MIC masing-masing obat adalah INH 0.2 ug/ml, Rifampisin 40 ug/ml, Streptomisin 4 ug/ml dan Ethambutol 2 ug/ml. Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam medium LJ dan 7H9-N pada saat pembuatan bahan (NCCS,2000) .

Preparasi medium untuk nitrat reduktase (7H9-N)

Medium kultur 7H9-N (untuk nitrat) dipersiapkan yang terdiri dari Middlebrook 7H9 yang diperkaya dengan 0.1% casitone, 0.5% gliserol, 10% asam oleat – albumin – glukosa - katalase, PANTA dan NaNO₃ 1000 ug/ml (Drancourt et al., 2003; Coban et al., 2005).

0.5 ml sampel yang tidak diencerkan diinokulasikan ke dalam 4.6 ml medium 7H9-N yang mengandung OAT dan 0.5 ml sampel yang diencerkan dimasukkan ke dalam medium 7H9-N tanpa obat (dianggap kontrol). Tabung diinkubasi pada suhu 37°C (Drancourt et al., 2003; Coban et al., 2005).

Kultur dan uji resistensi pada medium LJ

0.5 ml sampel yang tidak diencerkan dimasukkan ke dalam medium LJ yang mengandung OAT dan tidak mengandung OAT. Diinkubasikan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 – 4 minggu (Drancourt et al., 2003; Coban et al., 2005).

Uji Nitrat Reduktase

Uji Nitrat reduktase dilakukan sesuai metoda yang dikembangkan oleh Affolabi dkk (2008). Reagen nitrat reduktase dibuat dengan mencampurkan 1 bagian 50% (v/v) HCl, 2 bagian 0.2% (wt/vol) sulfanilamid dan 2 bagian (wt/vol) n-1-naphthilendiamine dihidroclorida (Affolabi et al., 2008).

Pada hari ke-5, ditambahkan 0.2 ml reagen Nitrat Reduktase (NR) pada tabung yang berisi medium 7H9-N tanpa obat dan diamati perubahan warna yang terjadi (pink – merah tua/violet (+4)), jika terjadi perubahan warna (sekitar +2), dilanjutkan penambahan reagen NR pada tabung lain. Jika tidak, inkubasi dilanjutkan. Periode pengamatan selanjutnya pada hari ke-7, 10,14 dan 18. Pengamatan hari ke-5 didasarkan pada asumsi bahwa pada hari ke-5 OAT telah bekerja dengan baik secara in vitro atau paling tidak telah mempunyai kekuatan pembeda (discrimination power) (Affolabi et al., 2008).

Pemeriksaan mikroskopis

100 ul suspensi pellet dalam PBS dimasukkan ke dalam plat kultur 24 sumuran yang telah terisi slide kultur. Sebaran dilakukan pada sumuran yang berisi obat dan tidak berisi obat, masing-masing duplo. Obat yang digunakan meliputi INH, RMP, EMB dan STR, konsentrasi disesuaikan dengan konsentrasi standart CLSI. Setelah 7 hari dilakukan analisis hasil, supernatan dibuang. Slide kultur diwarnai dan diamati adanya *M. tuberculosis*. Jika jumlah bakteri yang terlihat lebih banyak pada sumuran dengan obat dibanding sumuran tanpa obat, maka dianggap resisten.

Penilaian resistensi

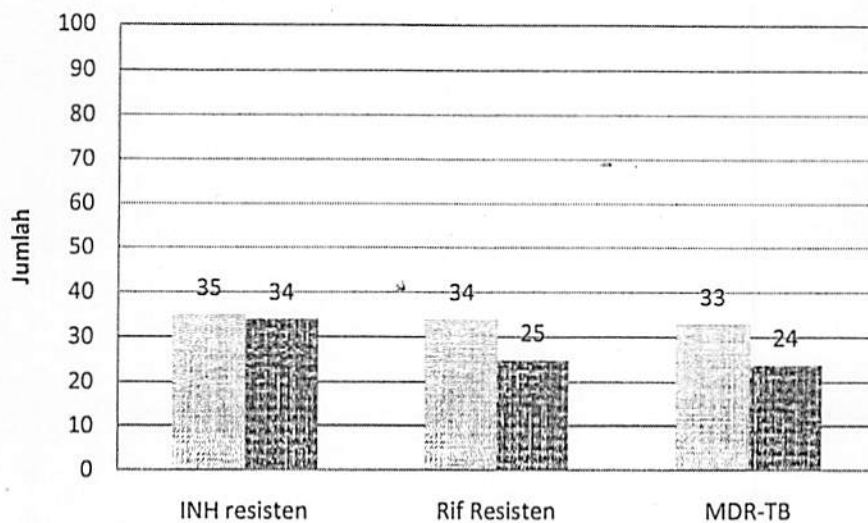
Resistensi pada medium 7H9-N ditandai dengan perubahan warna setelah penambahan reagen Nitrat reduktase pada tabung berisi obat yang sama atau lebih dari yang ditemukan pada tabung kontrol (tabung yang tidak berisi OAT).

Resistensi pada medium LJ dilakukan dengan metoda proporsional dengan menghitung proporsi resistensi. Proporsi resistensi obat lebih 1% dianggap resisten.

$$\text{Proporsi resistensi} = \frac{\text{Jumlah koloni pada media dengan obat}}{\text{Jumlah koloni pada media tanpa obat}} \times 100\%$$

4.1.2. Potensi Diagnostik mikrodilusi Nitrat reduktase

Teknik mikrodilusi Nitrat Reduktase merupakan metoda modifikasi yang dikembangkan dari penelitian tahun pertama. Hasil analisis MODS menemukan 35 kasus (11.2%) INH resisten, 34 kasus (10.8%) rifampisin resisten dan 33 kasus (10.5%) MDR-TB. Nilai ini sedikit berbeda dengan yang ditemukan dari metoda standart. Secara statistik perbedaan yang bermakna ditemukan pada kelompok Rifampisin ($p = 0.020$) dan MDR-TB ($p = 0.022$).



Gambar 2. Perbandingan hasil uji resistensi terhadap INH dan Rifampisin antara metoda Mikrodilusi Nitrat reduktase dengan proporsional LJ

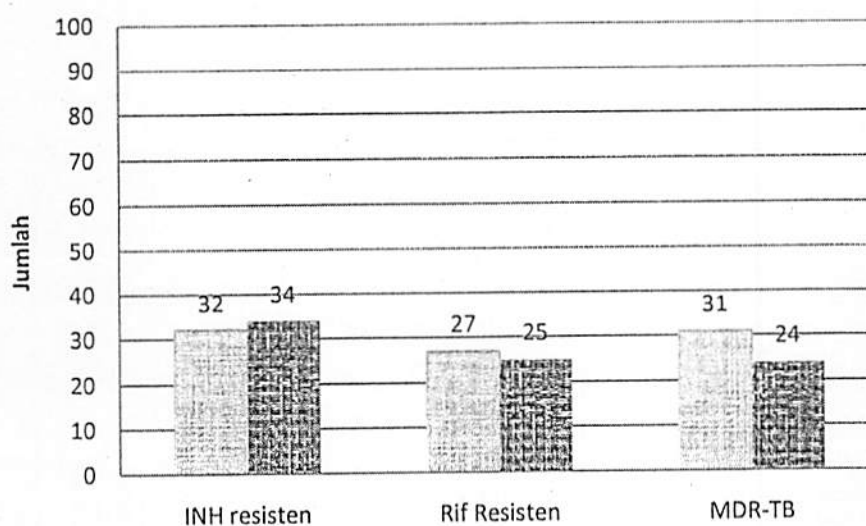
Hasil uji diagnostik memperlihatkan nilai kesesuaian (κ) tertinggi ditemukan pada kelompok INH, yaitu 90.1%, disusul oleh Rifampisin dan MDR-TB, masing-masing 78.5% dan 61.5%. Sensitivitas dan spesivfisitas metoda NR tertinggi ditemukan pada pemeriksaan resistensi INH, masing-masing 94% dan 99%, sedangkan terendah ditemukan pada MDR-TB, yaitu 83% dan 95%.

Tabel 2. Nilai diagnostik Nitrat reduktase dibandingkan dengan Lowenstein Jensen untuk identifikasi resistensi terhadap INH dan Rifampisin

| Katagori | Nilai Diagnostik | | | |
|------------|------------------|------------------|-------|-------|
| | Sensitivitas (%) | Spesifisitas (%) | p | kappa |
| INH | 94 | 99 | 0.000 | 0.901 |
| Rifampisin | 88 | 96 | 0.000 | 0.785 |
| MDR-TB | 83 | 95 | 0.000 | 0.615 |

4.1.2. Potensi Diagnostik mikroplat MODS

Pada penelitian ini ditemukan perbedaan hasil uji resistensi antara MODS dengan LJ terlihat saat analisis MDR-Tb, dimana hasil MODS menunjukkan 31 kasus (9.93%) sedangkan LJ menunjukkan 24 kasus (7.69%) ($p = 0.002$). Namun demikian, tidak ditemukan perbedaan yang bermakna terhadap uji INH dan rifampisin resisten, masing-masing 32 vs 34 kasus ($p = 0.715$) dan 27 vs 25 kasus ($p = 0.625$).



Gambar 3. Perbandingan hasil uji resistensi terhadap INH dan Rifampisin antara metoda Mikroplat MODS dengan proporsional LJ

Hasil uji diagnostik MODS memperlihatkan spesifisitas yang tinggi, yaitu 96 – 99%, sebaliknya sensitivitas relatif rendah, yaitu 79 – 88%. Nilai tertinggi ditemukan pada pemeriksaan INH. Tingkat kesesuaian hasil tertinggi ditemukan pada INH, yaitu 83.5%, disusul oleh Rifampisin dan MDR-TB, masing-masing 76.8% dan 55.2%.

Tabel 3. Nilai diagnostik mikropelat MODS dibandingkan dengan Lowenstein Jensen untuk identifikasi resistensi terhadap INH dan Rifampisin

| Katagori | Nilai Diagnostik | | | |
|------------|------------------|--------------|-------|-------|
| | Sensitivitas | Spesifisitas | p | kappa |
| INH | 88 | 99 | 0.000 | 0.835 |
| Rifampisin | 80 | 98 | 0.000 | 0.768 |
| MDR-TB | 79 | 96 | 0.001 | 0.552 |

4.2. Pembahasan

MDR-TB merupakan salah satu masalah utama dalam penanganan TB di dunia. Strain *M. tuberculosis* dengan resisten terhadap banyak obat akan ditularkan pada individu lain secara langsung melalui droplet infection. Data WHO tahun 2005 memperlihatkan MDR-TB berkisar antara 0 – 20%, sedangkan di Indonesia sekitar 8 – 10%, namun tahun 2009, kasus MDR-TB di Indonesia diperkirakan mencapai 20% dari seluruh populasi yang terinfeksi *M. tuberculosis*.

Metoda standar untuk diagnosis MDR-TB adalah metoda proporsional dengan medium padat Lowenstein Jensen, Ogawa dan Middlebrook 7H10. Pemeriksaan ini membutuhkan waktu yang lama antara 6 – 8 minggu. Berkaitan dengan itu perlu dikembangkan metoda diagnosis yang cepat dan akurat. Pada penelitian ini dicoba dianalisis potensi test cepat untuk MDR-TB, yaitu *Microscopic observation drug susceptibility* (MODS) dan uji nitrat reduktase, dan dilakukan sejumlah pengembangan sehingga dapat memberikan hasil yang optimal. Salah satu masalah utama kedua metoda ini adalah tidak dapat langsung dari sputum.

Penelitian dilakukan terhadap 312 sampel sputum yang tumbuh pada medium Lowenstein Jensen. Sampel berasal dari rumah sakit di kabupaten dan kota di Sumatera Barat, antara lain RS. M. Djamil Padang, BP4 Lubuk Alung, RS. Sei. Dareh, RS. Payakumbuh, RS. Solok, RS. Padang Panjang, RS. Muaro Labuh, RS. Simp Empat – Pasaman, RS. Lb. Sikaping, RS. Achmad Muchtar Bukitinggi dan lain sebagainya. Uji resistensi dengan metoda proporsional memperlihatkan 34 kasus (10.82%) resistensi terhadap INH, 25 kasus (8.01%) resistensi terhadap Rifampisin dan 24 kasus (7.69%) resisten terhadap INH dan Rifampisin (MDR-TB). Hasil ini tidak berbeda jauh dengan yang dilaporkan oleh Departemen Kesehatan, dimana kasus MDR-TB di Indonesia berkisar antara 6 – 10% (Depkes, 2009).

Analisis potensi diagnostik Nitrat reduktase dan MODS berdasarkan hasil LJ sebagai standar baku emas disajikan dalam tabel 4.

Tabel 4. Perbandingan nilai diagnostik NR dan MODS terhadap LJ sebagai standar baku emas uji resistensi INH dan Rifampisin

| Katagori | Nitrat Reduktase | | | MODS | | |
|--------------|------------------|-------|--------|-------|-------|--------|
| | INH | Rif | MDR-TB | INH | Rif | MDR-TB |
| Sensitivitas | 94 | 88 | 83 | 88 | 80 | 79 |
| Spesifisitas | 99 | 96 | 95 | 99 | 98 | 96 |
| Kappa | 0.901 | 0.785 | 0.615 | 0.835 | 0.768 | 0.552 |

Data ini memperlihatkan sensitivitas dan spesifisitas kedua metode lebih baik terhadap INH dan kurang baik terhadap MDR-TB. Kondisi yang sama juga ditunjukkan oleh nilai kesesuaian (kappa) yang lebih tinggi pada INH dan rendah pada MDR-TB. Secara keseluruhan terlihat bahwa metoda mikrodilusi NR lebih baik dibanding MODS dalam identifikasi resistensi terhadap *M. tuberculosis*.

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan hal-hal berikut, yaitu

1. Dari 312 sampel teliti ditemukan 34 kasus (10.82%) resistensi terhadap INH, 25 kasus (8.01%) resistensi terhadap Rifampisin dan 24 kasus (7.69%) resisten terhadap INH dan Rifampisin (MDR-TB).
2. Sensitivitas, spesifisitas dan nilai kappa metoda mikrodilusi Nitrat reduktase lebih baik terhadap INH, masing-masing 94%, 99% dan 0.901. Hasil ini sama dengan yang ditemukan pada teknik mikroplate MODS, yaitu 88%, 99% dan 0.835.
3. Secara keseluruhan potensi diagnostik mikrodilusi nitrat reduktase lebih baik dibanding mikroplat MODS.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menganalisis potensi diagnostik MODS dan NR menggunakan kultur – proporsional sebagai standar baku emas terhadap sampel langsung

DAFTAR PUSTAKA

- Affolabi, D., Sanoussi, ND., Odoun, M., Martin, A., Koukpedji, L., Polomino, J.C., Kestens, L., Anagonou, S and Portaels, F., 2008. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Cotonou (Benin) using two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *J. Med. Microbiol.* 57: 1024–1027
- Alcaide, F., Pfyffer, G.E and Telenti, A., 1997. Role of *embB* in Natural and Acquired Resistance to Ethambutol in *Mycobacteria*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2270 – 2273.
- Angeby, K.A.K., Klintz, L and Hoffner, S.E., 2002. Rapid and Inexpensive Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a Nitrate Reductase Assay. *J. Clin. Microbiol.* 40 : 553 – 555
- Bardou, F., Raynaud, C., Ramos, C., Lane'elle, M.A and Lane'elle, G. 1998. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. 1998. *Microbiology* .144:2539–2544
- Bartfai, Z., A'. Somosko'vi, Ko'dmo'n, C.N., Szabo', N., Puska's, E., Kosztola'nyi, L., Farago', R., Mester, J., Parsons, L.M, and Salfinger, M., 2001. Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. *J. Clin. Microbiol.* 39:3736–3739
- Basso, L. A., R. Zheng, J. M. Musser, W. R. Jacobs, Jr., and J. S. Blanchard. 1998. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid resistant clinical isolates. *J. Infect. Dis.* 178:769–775.
- Bemer, P., Bodmer, T., Munzinger, J., Perrin, M., Vincent, V and Drugeon, H., 2004. Multicenter Evaluation of the MB/BACT System for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 42 : 1030 – 1034.
- Caviedes, L., Lee, T.S., Gilman, R.H., Sheen, P., Spellman, E., Lee, E.H., Berg, D.E., Montenegro-James, S., 2000. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. *J. Clin. Microbiol.* 38:1203–1208.
- Caviedes, L., Delgado, J and Gilman, R.H., 2002. Tetrazolium Microplate Assay as a Rapid and Inexpensive Colorimetric Method for Determination of Antibiotic Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* . *J. Clin. Microbiol.* 40: 1873–1874.
- Coban, A.Y., Bilgin, J., Uzun, M., Fisgin, N.T., Akgunes, A., Cihan, C.C., Birinci, A and Durupinar, B., 2005. Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid and Rifampin on Blood Agar. *J. Clin. Microbiol.* 43 : 1930 – 1931.
- Drancourt, M., P. Carrieri, M.-J. Ge'vaudan, and D. Raoult. 2003. Blood agar and *Mycobacterium tuberculosis*: the end of a dogma. *J. Clin. Microbiol.* 41:1710–1711.
- Franzblau, S. G., Witzig, R.S., McLaughlin, J.C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degnan, M.T., Cook, M.B., Quenzer, V.K., Ferguson, R.M and Gilman, R.H., 1998. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.* 36:362–366
- Goude, R., Amin, A.G., Chaterjee, D and parish, T., 2008. The Critical Role of *embC* in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 190 : 4335 – 4341.

- Golyshevskaya, V. I., A. A. Korneev, L. N. Chernousova, L. G. Selina, T. A. Kazarova, T. D. Grishina, S. G. Safonova, V. A. Puzanov, G. M. Nikolaeva, and N. I. Fadeeva. 1996. New microbiological techniques in diagnosis of tuberculosis. *Probl. Tuberk.* 6:22–25
- Grandjean, L., Martin, L., Gilman, R.H., Valencia, T., Herrera, B., Quino, W., Ramos, E., Rivero, M., Montoya, R., Escombe, A.R., Coleman, D., Mitchison, D and Evans, C.A., 2008. Tuberculosis Diagnosis and Multidrug Resistance Testing by Direct Sputum Culture in Selective Broth without Decontamination or Centrifugation. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2339 – 2344.
- Hilleman, D., Weizenegger, M., Kubica, T., Eichler, E and Niemann, S., 2005. Use of the Genotype MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3699 – 3703.
- Kontos, F., Maniati, M., Costopoulos, C., Gitti, Z., Nicolaou, S., Petinaki, E., Anagnostou, S., Tselenti, I and Maniatis, A.N., 2004. Evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs: a multicenter study. *Microbiol. Method.* 56 :291 – 294.
- Lee, A. S. G., A. S. M. Teo, and S. Y. Wong. 2001.-Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2157–2159
- Marrakchi, H., G. Laneelle, and A. Quemard. 2000. InhA, a target of the antituberculosis drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, Fas-II. *Microbiology* 146:289–296.
- Martin, A., Poortael, F and Polomino, J.C., 2007. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J. antimicrob.chem.* 59 : 175 – 183.
- Miesel, L., T. Weisbrod, J. A. Marcinkeviciene, R. Bittman, P. Doshi, J. C. Sacchetti, and W. R. Jacobs, Jr. 1998. NADH dehydrogenase defects confer resistance to isoniazid and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 180:2459–2467
- Moore, D. A., C. A. Evans, R. H. Gilman, L. Caviedes, J. Coronel, A. Vivar, E. Sanchez, Y. Pinedo, J. C. Saravia, C. Salazar, R. Oberhelman, M. G. Hollm-Delgado, D. LaChira, A. R. Escombe, and J. S. Friedland. 2006. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N. Engl. J. Med.* 355:1539–1550.
- Ramaswamy, S.V., Reich, R., Dou, S.J., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A., Quitugua, T and Graviss, E.A., 2003. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1241 – 1250.
- Rattan, A., Kalia, A and Ahmad, N., 1998. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 195 – 209.
- Sherman, D. R., K. Mdluli, M. J. Hickey, T. M. Arain, S. L. Morris, C. E. Barry III, and C. K. Stover. 1996. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 272:1641–1643
- Scorpio A and Zhang Y., 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* 2: 662-667.

- Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y., 1997. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* . 41: 540-542.
- Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreisworth BN, Musser JM., 1997. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother* . 41: 36-40.
- Sreevatsan, S., X. Pan, Y. Zhang, V. Deretic, and J. M. Musser. 1997. Analysis of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob. Agents Chemother*. 41: 600–606.
- Telenti, A., 1998. Genetic of Drug Resistant Tuberculosis. *Thorax*. 53 : 793-797.
- Tortoli, E., Benedetti, M., Fontanelli, A., Simonetti, M.T., 2002. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460 TB method and the agar plate method of proportion. *J. Clin. Microbiol.* 40, 607–610
- Victor, T.C., van Rie, A., Jordaan, A.M., Richardson, M., van der Spuy, G., Beyers, N., van Helden, P and Warren, R., 2001. Sequence Polymorphism in the *rrs* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Is Deeply Rooted within an Evolutionary Clade and Is Not Associated with Streptomycin Resistance. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 4184 – 4186.
- Wengenack, N. L., and F. Rusnak. 2001. Evidence for isoniazid-dependent free radical generation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* KatG and the isoniazid-resistant mutant KatG(S315T). *Biochemistry* 40:8990–8996
- WHO., 2008. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis Emergency update 2008. WHO/HTM/TB/2008.
- Weyer, K., Lancaster, J., Brand, J., van der Walt, M and Levin, J., 2004. Survey of tuberculosis drug resistance in South Africa 2001–2002. Final report. MRC, Pretoria, South Africa. <http://www.sahealthinfo.org/tb/natsurvey.pdf>.