

INDONESIAN JOURNAL OF
**CLINICAL PATHOLOGY AND
 MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

Nilai Rujukan <i>Soluble Transferrin Receptor (sTfR)</i> {(Soluble Transferrin Receptor Refence Value (sTfR))} Anggraini Iriani, Endah Purnamasari, Riadi Wirawan	211-214
Analisis <i>Absolute Neutrophil Count</i> di Pasien Kanker Payudara dengan Kemoterapi (<i>Analysis of Absolute Neutrophil Count in Breast Cancer Patients with Chemotherapy</i>) Arifa Moidady, Tenri Esa, Uleng Bahrun	215-219
<i>Packed Red Cell</i> dengan Delta Hb dan Jumlah Eritrosit Anemia Penyakit Kronis (<i>Packed Red Cells with Delta Hb and Erythrocytes in Anemia of Chronic Disease</i>) Novita Indayanie, Banundari Rachmawati	220-223
Indeks Aterogenik Plasma di Infark Miokard Akut dan Penyakit Diabetes Melitus (<i>Atherogenic Index of Plasma in Acute Myocardial Infarction and Diabetes Mellitus</i>) Zulfikar Indra, Suci Aprianti, Darmawaty E.R.	224-226
Ret-He dalam Diagnosis sebagai Tolok Ukur dalam Mendeteksi Kekurangan Zat Besi di Ibu Hamil (<i>Ret-He in Diagnostic Parameter to Detecting Iron Deficiency in Pregnant Women</i>) Imee Surbakti, Adi Koesoema Aman, Makmur Sitepu	227-230
Perbedaan Bermakna Kadar <i>Serum Amiloid A</i> antara Stenosis Koroner dibandingkan Bukan Stenosis Koroner (<i>Significantly Higher Level of Serum Amyloid A Among Coronary Stenosis Compared to Nonstenosis</i>) I Nyoman G Sudana, Setyawati, Usi Sukorini	231-236
<i>Hybridization-Based Nucleic Acid Amplification Test</i> terhadap <i>Cartridge-Based Nucleic Acid Amplification Test</i> terkait <i>Multidrug-Resistant Tuberculosis</i> (<i>Hybridization-Based Nucleic Acid Amplification Test Towards Cartridge-Based Nucleic Acid Amplification Test in Multidrug-Resistant Tuberculosis</i>) Ivana Agnes Sulianto, Ida Parwati, Nina Tristina, Agnes Rengga I	237-243
Protein Rekombinan 38 Kda <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> dalam <i>Interleukin-2</i> dan <i>Interleukin-4</i> Serta Limfosit T Cd3 ⁺ (<i>The Mycobacterium Tuberculosis 38 Kda Recombinant Protein in Interleukin-2 and Interleukin-4 as well as Cd3⁺ T Lymphocytes</i>) Maimun Z Arthamin, Nunuk S Muktiati, Triwahju Astuti, Tri Yudani M Raras, Didit T Setyo Budi, Francisca S. Tanoerahardjo	244-249
Angka Banding Albumin Kreatinin Air Kemih dan HbA1c Serta Estimasi Laju Filtrasi Glomerulus pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 (<i>Urinary Albumin to Creatinine Ratio with HbA1c and Estimated Glomerulo Filtration Rate in Type 2 Diabetes Mellitus Patients</i>) Amiroh Kurniati, Tahono	250-256

Zat Besi di Pendonor Teratur dan yang Tidak Teratur (<i>Iron in Regular and Nonregular Donors</i>) Ina Diyana Kartika, Lince Wijoyo, Syahraswati, Rachmawati Muhiddin, Darwati Muhadi, Mansyur Arif.....	257–260
Deteksi Antibodi Multipel Hepatitis C dalam Darah Donor (<i>Multiple Antibody Detection of hepatitis C in Donor Blood</i>) Ranti Permatasari, Aryati, Budi Arifah.....	261–265
<i>Oxidized-Low Density Lipoprotein dan Derajat Stenosis Penyakit Jantung Koroner</i> (<i>Oxidized-Low Density Lipoprotein And Stenosis Level In Coronary Artery Disease</i>) Sutamti, Purwanto Ap, Mi. Tjahjati.....	266–272
Protein 24 HIV dan Limfosit T-CD4 ⁺ di Infeksi HIV Tahap (<i>HIV P24 Protein and CD4⁺T-Lymphocyte in Stage I HIV Infection</i>) I Made Sila Darmana, Endang Retnowati, Erwin Astha Triyono	273–279
Fibrinogen dan <i>Transcranial Doppler</i> di Strok Iskemik Akut (<i>Fibrinogen and Transcranial Doppler in Acute Ischemic Stroke</i>) Hafizah Soraya Dalimunthe, Adi Koesoema Aman, Yuneldi Anwar.....	280–284
Kesahihan Diagnostik Hemoglobin Retikulosit untuk Deteksi Defisiensi Zat Besi di Kehamilan (<i>Diagnostic Validity of Reticulocyte Hemoglobin for Iron Deficiency Detection in Pregnancy</i>) Tri Ratnaningsih, Budi Mulyono, Sutaryo, Iwan Dwiprahasto.....	285–292
Rerata Volume Trombosit dan Agregasi Trombosit di Diabetes Melitus Tipe 2 (<i>Mean Platelet Volume and Platelet Aggregation in Diabetes Mellitus Type 2</i>) Malayana Rahmita Nasution, Adi Koesoema Aman, Dharma Lindarto.....	293–297
Kaitan IgE Spesifik Metode Immunoblot terhadap ELISA pada Rinitis Alergi (<i>Association Between Specific Ige Immunoblot Method with ELISA on Allergic Rhinitis</i>) Aryati, Dwi Retno Pawarti, Izzuki Muhashonah, Janti Tri Habsari.....	298–303
TELAAH PUSTAKA	
Diagnosis Tiroid (<i>Diagnosis of Thyroid</i>) Liong Boy Kurniawan, Mansyur Arif.....	304–308
LAPORAN KASUS	
Talasemia Beta Hemoglobin E (<i>Hemoglobin E Beta Thalassemia</i>) Viviyanti Zainuddin, agus Alim Abdullah, Mansyur Arif	309–312
MANAGEMEN LABORATORIUM	
Mutu Layanan Menurut Pelanggan Laboratorium Klinik (<i>Service Quality Regarding to the Clinical Laboratory Customer</i>) Mohammad Rizki, Osman Sianipar	313–318
INFORMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU.....	319–320

Ucapan terima kasih kepada penyunting Vol. 21 No. 3 Juli 2015

Sidarti Soehita, Jusak Nugraha, J.B. Soeparyatmo, Maimun Z. Arthamin,
Kusworini Handono, Rahayuningsih Dharma, July Kumalawati, Tahono, Rismawati Yaswir, Mansyur Arif

HYBRIDIZATION-BASED NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TEST TERHADAP CARTRIDGE-BASED NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TEST TERKAIT MULTIDRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS

(Hybridization-Based Nucleic Acid Amplification Test towards Catridge-Based Nucleic Acid Amplification Test in Multidrug-Resistant Tuberculosis)

Ivana Agnes Sulianto¹, Ida Parwati², Nina Tristina², Agnes Rengga I²

ABSTRACT

Indonesia has high burden of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Cartridge-based nucleic acid amplification test (CB-NAAT), which is recommended as a diagnostic method of MDR-TB by World Health Organization, is faster in achieving the result. This method determines MDR-TB only from the rifampisin resistance, by detecting mutations that occur on the 81 bp hot-spot region of the *rpoB* gene. The isoniazid resistance is not included in the determination of MDR-TB by this method. Hybridization-based NAAT (HB-NAAT) detects MDR-TB not only from the rifampisin resistance (codon 526 and 531 *rpoB* gene), but also from the isoniazid resistance (codon 315 *katG* gene). The aim of this study was to know the validity of the HB-NAAT in detecting MDR-TB using sputum with CB-NAAT as the gold standard in a diagnostic study. All of 51 sputums were collected during June 2013 from patients suspected pulmonary MDR-TB at Dr. Hasan Sadikin General Hospital. The result of CB-NAAT were 16 MDR-TB, 12 TB non MDR, and 23 non TB. HB-NAAT examination results were 3 MDR-TB, 25 TB non MDR (3 RMR, 6 IMR, 16 susceptible) and 23 non TB. The sensitivity of HB-NAAT was 18.75% and specificity 100%. Low sensitivity values may due to the high mutation variations in the samples. So it could not be detected only by codons 526 and 531 for rifampisin resistance. For the detection of isoniazid resistance, HB-NAAT have optimal primer at low concentrations and it also need more than *katG* genes to detect isoniazid resistance. Based on this study, it can be concluded, that HB-NAAT has low sensitivity but high specificity in the detecting MDR-TB.

Key words: *Catridge-based NAAT, hybridization-based NAAT, multidrug-resistant tuberculosis*

ABSTRAK

Indonesia merupakan negara dengan angka kejadian infeksi *Multidrug-Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) yang tinggi. *Catridge-Based Nucleic Acid Amplification Test* (CB-NAAT) disarankan oleh *World Health Organization* sebagai alat untuk mendiagnosis MDR-TB yang memberikan hasil cepat. Pemeriksaan ini mendiagnosis MDR-TB hanya melalui deteksi resistensi terhadap rifampisin pada 81 bp *hot-spot region* gen *rpoB* dan tidak mendeteksi resistensi isoniazid. *Hybridization-based NAAT* (HB-NAAT) mendeteksi MDR-TB melalui resistensi rifampisin (kodon 526 dan 531 gen *rpoB*) dan juga dapat mendeteksi resistensi isoniazid (kodon 315 gen *katG*). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kesahihan metode HB-NAAT dengan baku emas CB-NAAT dalam mendeteksi MDR-TB dalam bentuk analisis uji diagnostik. Dalam penelitian ini terkumpul 51 dahak selama Juni 2013 dari pasien terduga MDR-TB di Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin. Pemeriksaan CB-NAAT memberikan hasil 16 MDR-TB, 12 TB nonMDR dan 23 bukanTB. Pemeriksaan HB-NAAT memberikan hasil 3 MDR-TB, 25 TB nonMDR (3 RMR, 6 IMR, 16 rentan) dan 23 bukan TB. Pada penelitian ini didapatkan hasil kepekaan 18,75% dan kekhasan 100%. Nilai kepekaan yang rendah disebabkan keragaman mutasi gen *rpoB* tinggi pada sampel, sehingga tidak dapat dideteksi hanya melalui dua kodon. Sedangkan untuk deteksi resistensi isoniazid, pemeriksaan HB-NAAT optimal pada konsentrasi primer rendah dan diperlukan lebih banyak gen yang dideteksi selain *katG*. Berdasarkan kajian ini dapat disimpulkan, bahwa HB-NAAT memiliki kepekaan rendah dan kekhasan tinggi dalam mendeteksi MDR-TB.

Kata kunci: *Catridge-based NAAT, hybridization-based NAAT, multidrug-resistant tuberculosis*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara dengan angka kejadian infeksi *Multidrug-Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) tinggi. Hal ini menyebabkan peningkatan angka kesakitan dan kematian karena TB.¹ *Multidrug-resistant*

tuberculosis adalah jenis yang resisten terhadap paling sedikit dua obat kuat untuk TB, yaitu rifampisin (RIF) dan isoniazid (INH).² Diagnosis MDR-TB ditetapkan melalui pemeriksaan biakan dan uji kepekaan obat yang memerlukan waktu kurang lebih 14 minggu.³

¹ Bagian Patologi Klinik Rumah Sakit Immanuel, Bandung. E-mail: ivana.asulianto@gmail.com

² Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung

Penetapan diagnosis yang lama ini akan menyebabkan pasien MDR-TB mendapat pengobatan yang tidak cukup, berkebahayaan mengalami efek samping, padahal obat yang digunakan tidak tepat guna. Pasien juga berpeluang menyebarkan MDR-TB ke lingkungan sekitarnya.²

Pemeriksaan MDR-TB berbasis Molekuler dapat digunakan untuk mengatasi masalah tersebut di atas karena dapat memberikan hasil yang tepat serta lebih cepat daripada cara konvensional.¹ *World Health Organization* menyarankan penggunaan *cartridge-based* NAAT yang dapat mendeteksi *M.tuberculosis* dan resistensi RIF dengan mendeteksi mutasi yang terjadi sepanjang 81 bp *hot spot region* gen *rpoB*.^{4,5} Pemeriksaan ini menggunakan resistensi terhadap RIF sebagai petanda pengganti MDR-TB dan tidak mendeteksi INH. Hal ini menyebabkan kurang lebih sebanyak 10% pasien yang menderita monoresisten RIF tidak mendapatkan INH dalam pengobatannya dan pasien dengan monoresisten INH tidak terdiagnosis.⁶

Hybridization-based NAAT dapat mendeteksi: *M.tuberculosis*, resistensi RIF (kodon 526 dan 531 gen *rpoB*), yaitu kodon yang paling sering mengalami mutasi di 81 bp *hot spot region* gen *rpoB* dan resistensi INH (kodon 315 gen *katG*), sehingga diharapkan memiliki kesahihan yang baik terhadap *cartridge-based* NAAT. *Hybridization-based* NAAT belum banyak diteliti, tetapi bila diimplementasikan dapat meningkatkan kemungkinan mendiagnosis MDR-TB.

Berdasarkan latar belakang penelitian di atas dan kegiatan serupa belum ada, maka peneliti tertarik untuk mengkajinya. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kesahihan metode HB-NAAT terhadap CB-NAAT dalam mendeteksi MDR-TB dengan menggunakan bahan pemeriksaan dahak.

METODE

Penelitian dilakukan di Divisi Mikrobiologi Klinik, Laboratorium Biologi Molekuler, Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/ Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung. Penelitian dilakukan sejak bulan Januari 2012 sampai dengan bulan Desember 2013. Bentuk penelitian ini adalah uji diagnostik dengan rancangan penelitian potong lintang. Subjek penelitian diambil secara berurutan.

Subjek pada penelitian ini adalah pasien yang didiagnosis sebagai terduga mengidap MDR-TB paru yang berobat di Poliklinik MDR-TB Bagian/Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin dan Klinik Teratai Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin. Subjek telah diberikan penjelasan dan memberikan persetujuan

tindakan. Bahan penelitian adalah dahak yang berasal dari subjek penelitian dan sebagian berasal dari bahan yang disimpan di Laboratorium Patologi Klinik.

Patokan kesertaan penelitian ini adalah: pasien yang memenuhi salah satu persyaratan klinis terduga MDR-TB (pasien TB yang gagal mendapat pengobatan golongan 2/kasus kronis), pengidap yang tidak mengalami perubahan pada pengobatan golongan 2, mempunyai riwayat pengobatan TB di sarana pelayanan kesehatan NonDOTS, gagal pengobatan golongan 1, tidak mengalami perubahan setelah pemberian pengobatan sisipan, kambuhan, berobat setelah lalai, ber riwayat bergaul erat dengan pasien MDR-TB, terjangkit *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) dan bergejala TB-HIV. Subjek dengan bahan pemeriksaan bermutu tidak baik dan tidak dapat diambil ulang dan yang bersangkutan tidak dapat mengeluarkan dahak walaupun telah diberikan obat pengencernya tidak disertakan.

Subjek diminta untuk berdahak (pagi atau sewaktu). Dahak diperoleh dengan cara berdahak dalam, kemudian ditampung di dalam wadah steril yang sudah ditandai dengan identitas pasien. Mutu dahak dinilai, yaitu apakah bahan tersebut purulen dan tidak tampak seperti ludah. Kemudian dahak dipisahkan ke dalam dua tabung. Dahak dalam tabung pertama langsung diperiksa pada CB-NAAT, sedangkan yang di tabung lainnya disimpan pada suhu -80°C selama maksimal enam bulan. Setelah seluruh sampel terkumpul, bahan tersebut menjalani proses dekontaminasi dan penyarian menjadi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). Hasil menyarian disimpan pada suhu -20°C selama maksimal enam bulan. Pemeriksaan HB-NAAT dilakukan apabila jumlah sampel telah memenuhi ukuran untuk penelitian.

Analisis statistik yang digunakan adalah uji diagnosis untuk pemeriksaan HB-NAAT dengan mengukur kesahihan pemeriksaan tersebut dibandingkan dengan baku emas CB-NAAT menggunakan tabel 2×2 . Data diolah dengan memakai program SPSS versi 17.0.

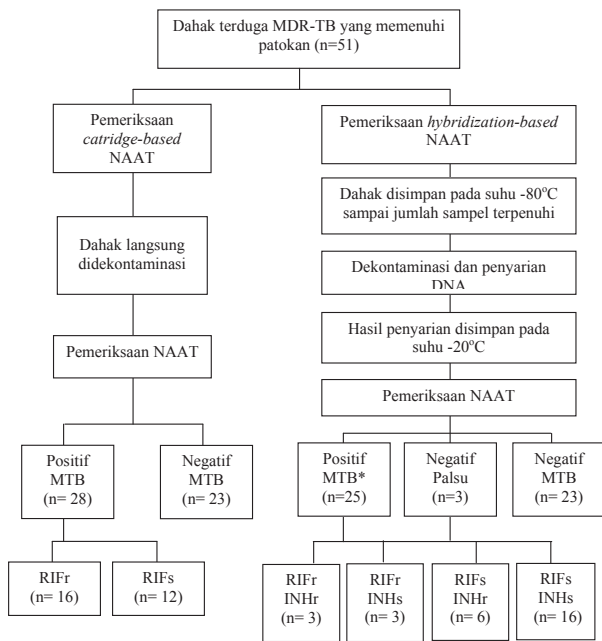
HASIL DAN PEMBAHASAN

Bahan penelitian terkumpul sebanyak 51 buah berupa dahak (Gambar 1) yang terdiri atas 33 (65%) laki-laki dan 18 (35%) perempuan dengan median berusia 38 tahun (usia termuda 20 tahun dan tertua 74 tahun). Persentase subjek berdasarkan patokan dugaan MDR-TB adalah pasien: pengidap TB-HIV (31%), pasien TB gagal pengobatan golongan 2 (20%), yang tidak mengalami perubahan pengobatan golongan 2 (5%), gagal pengobatan golongan 1 (5%), tidak mengalami

perubahan setelah diberi pengobatan sisipan (5%), kambuh (5%), kembali berobat setelah lalai (5%) menjalani pengobatan.

Subjek dengan patokan terduga MDR-TB berupa riwayat bergaul erat dengan pasien MDR-TB dan riwayat pengobatan TB di sarana pelayanan kesehatan NonDOTS tidak ditemukan.

Metode CB-NAAT mendeteksi *M.tuberculosis* pada 28 sampel penelitian, sedangkan pemeriksaan *hybridization-based* NAAT mendeteksi *M.tuberculosis* pada 25 sampel dari keseluruhan 51 sampel penelitian.



Gambar 1. Bagan hasil penelitian

Keterangan: MDR-TB = multidrug-resistant tuberculosis; NAAT = nucleic acid amplification test; MTB = *M.tuberculosis*; RIFr = rifampisin resisten; RIFs = rifampisin peka; RMR = rifampisin monoresisten; IMR = isoniazid monoresisten; INHs = isoniazid peka; * = empat sampel dilakukan pemeriksaan sekuensing

Ditemukan tiga sampel yang memberikan hasil negatif palsu dalam mendeteksi *M.tuberculosis*.

Hasil memeriksa metode CB-NAAT dan HB-NAAT dalam mendeteksi resistensi terhadap RIF dan INH dapat dilihat di Tabel 1 dan 2. Pemeriksaan resistensi secara genotip dengan menggunakan HB-NAAT dilakukan pada semua bahan pemeriksaan dengan hasil positif pada pemeriksaan *M.tuberculosis* menggunakan metode CB-NAAT, yaitu sebanyak 28 sampel. Sepuluh dari 28 sampel menghasilkan *melting temperature* (Tm) yang sesuai dengan pembandingan *wild type rpoB* (rerata 63,58°C) sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel tersebut masih peka terhadap RIF. Dua sampel menghasilkan Tm sesuai dengan pembandingan positif *rpoB* 531 mutan (rerata 66,22°C) dan empat sampel memberikan hasil Tm sesuai pembandingan positif *rpoB* 526 mutan (rerata 60,67°C). Dengan demikian terdapat enam sampel yang disimpulkan resisten terhadap RIF. Sisa 11 sampel lainnya menggambarkan Tm yang tidak berkesimpulan (58,45°C sampai dengan 62,76°C, rerata Tm 61,6°C), sehingga dinyatakan sebagai negatif dalam uji kesahihan. Metode HB-NAAT mendeteksi sembilan sampel positif mutasi pada *kat G315*, yang terdiri atas delapan sampel AGC>ACC (rerata Tm 67,28°C) dan satu sampel AGC>AAC (Tm 66,43°C), tetapi terdapat sepuluh sampel yang tidak terdeteksi.

Hasil uji kesahihan pemeriksaan metode HB-NAAT dalam mendeteksi MDR-TB adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil pemeriksaan *M.tuberculosis* metode CB-NAAT dan *Hybridization-based* NAAT

Hasil Pemeriksaan <i>M.tuberculosis</i>	CB-NAAT (%)	HB-NAAT (%)
Positif	28 (54,9)	25 (49,1)
Negatif	23 (45,1)	26 (50,9)
Jumlah keseluruhan	51 (100)	51 (100)

Tabel 2. Hasil pemeriksaan resistensi metode CB-NAAT dan *Hybridization-based* NAAT

Hasil pemeriksaan resistensi	CB-NAAT (n)	<i>Hybridization-based</i> NAAT			
		RIF (n)	Rerata Tm (oC)	INH (n)	Rerata Tm (oC)
Positif	16	6	66,22a 60,67b	9	67,28* 66,43#
Negatif	12	10	63,58	9	73,56
Tidak berkesimpulan	0	11	61,6	0	-
Tidak terdeteksi	0	1	-	10	-
Jumlah keseluruhan	28	28		28	

Keterangan: a mutasi gen *rpoB* kodon 531
b mutasi gen *rpoB* kodon 526
*mutasi gen *katG* kodon 315 (AGC>ACC)
#mutasi gen *katG* kodon 315 (AGC>AAC)

kepekaan 18,75%, kekhasan 100%, nilai duga positif 100%, nilai duga negatif 48% dan ketepatan 53,6%.

Sepanjang penelusuran kepustakaan, penelitian ini merupakan yang pertama menilai kesahihan HB-NAAT terhadap CB-NAAT. *Hybridization-based* NAAT merupakan cara baru dalam mendeteksi *M.tuberculosis* dan MDR-TB. Cara ini dipilih karena HB-NAAT memiliki kelebihan, yaitu dapat mendeteksi resistensi terhadap INH secara langsung melalui deteksi mutasi gen *katG*. Prosedur pemeriksaan HB-NAAT di setiap laboratorium harus melalui tahap optimasi. Pada penelitian ini dilakukan optimasi untuk menentukan kadar primer dan *probe*, tingkat $MgCl_2$ dan suhu *annealing* yang sesuai bagi tiap primer.

Dekontaminasi dan penyarian seluruh bahan pemeriksaan memerlukan waktu kurang lebih satu minggu. Optimasi untuk deteksi *M.tuberculosis* memerlukan waktu selama kurang lebih satu bulan. Optimasi diawali dengan menentukan kepekatan primer yang terbaik untuk mendeteksi *M.tuberculosis* kemudian diperiksa dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang konvensional untuk memperkirakan rentang suhu kejadian *annealing*. Kondisi terbaik akhirnya ditemukan di kepekatan primer $0,5 \mu M$ dengan suhu *annealing* $60^\circ C$. Optimasi deteksi gen *rpoB* memerlukan waktu kurang lebih dua minggu, dengan kondisi terbaik kepekatan primer $0,5 \mu M$, *probe* $0,2 \mu M$, $MgCl_2$ 4 mM dan suhu *annealing* $55^\circ C$. Optimasi deteksi gen *katG* memerlukan waktu kurang lebih dua bulan, dengan kondisi terbaik kepekatan *forward primer* $0,2 \mu M$, *reverse primer* $0,5 \mu M$, *probe* $0,2 \mu M$, $MgCl_2$ 3 mM dan suhu *annealing* setinggi $55^\circ C$.

Penelitian ini menemukan jumlah pasien terduga MDR-TB laki-laki (65%) lebih banyak daripada perempuan (35%). Data WHO yang didapat di 36 negara di enam wilayah (Afrika, Amerika, Eropa, Mediterania, Asia Tenggara dan Pasifik Barat) juga menemukan MDR-TB lebih sering terjadi pada laki-laki daripada perempuan. Sebagian besar subjek penelitian ini berada pada usia produktif. *World Health Organization* menyatakan bahwa pasien MDR-TB terbanyak adalah rentang usia 25 tahun sampai dengan 44 tahun;⁷ pada penelitian ini terdapat 60,8% subjek berada pada rentang usia tersebut.

Pada penelitian ini tidak ditemukan subjek yang berusia kurang dari 20 tahun karena patokan terduga MDR-TB yang ditemukan pada penelitian ini adalah pasien: yang gagal pengobatan, kambuh, pasien lalai dan mengidap TB-HIV. Patokan tersebut umumnya ditemukan di pasien TB dewasa atau usia lebih lanjut yang sudah pernah berobat TB sebelumnya. Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) pada anak umumnya merupakan resistensi obat primer

yang ditularkan dari pasien MDR-TB dewasa. Zignol dkk⁸ menganalisis data TB anak dari 35 negara dan menyatakan bahwa pada TB anak jarang terjadi resistensi obat selama pengobatan. Keberadaan MDR-TB pada anak merupakan penunjuk yang peka akan adanya penularan galur resisten. Pada penelitian ini tidak ditemukan subjek yang ber riwayat bergaul erat dengan pasien MDR-TB.

Sebagian besar (31%) subjek pada penelitian ini didiagnosis terduga MDR-TB karena terdapat kecurigaan TB-HIV. Namun, dari kelompok ini tidak ada yang terdiagnosis MDR-TB. Penelusuran data melalui rekam medis pasien menunjukkan sebagian besar subjek di golongan ini tidak memiliki riwayat TB dan pengobatan terkait sebelumnya. Pasien TB-HIV dimasukkan ke dalam patokan terduga MDR-TB karena bila seorang pasien HIV terinfeksi MDR-TB maka ia memiliki bahaya angka kematian yang tinggi. Penelitian di kota New York menemukan bahwa 62% pasien HIV yang terinfeksi MDR-TB meninggal selama pengobatan, sedangkan kematian pasien HIV nonMDR adalah 26%. Apakah infeksi HIV merupakan faktor bahaya MDR-TB masih dipertanyakan. Namun, beberapa penelitian menemukan infeksi HIV berhubungan dengan resistensi RIF, malabsorpsi Obat Anti-tuberkulosis (OAT) dan tidak menutup kemungkinan terjadinya resistensi INH, terutama pada pasien HIV dengan riwayat TB sebelumnya dan yang tidak patuh minum obat.

Patokan terduga MDR-TB terbanyak kedua adalah gagal pengobatan golongan 2 dengan hasil positif MDR-TB ditemukan sebanyak 70%. Patokan pasien yang mendapatkan OAT golongan 2 adalah mereka yang: kambuh, gagal dan mendapatkan pengobatan setelah putus berobat.³

Kelalaian manusia ataupun ketidakpatuhan dalam meminum obat berperan besar dalam kejadian MDR-TB.⁶ Karena hal tersebut menyebabkan galur *M.tuberculosis* yang peka obat akan mati dan galur yang resisten akan bertahan dan bertambah banyak jumlahnya. Bila kemudian pasien mendapatkan obat yang berbeda, maka galur resisten terhadap obat tersebut akan terseleksi dan pengidap akan memiliki *mycobacterium* yang resisten terhadap dua obat atau lebih. Semua subjek penelitian pada patokan terduga ini memiliki dua sampai tiga kali riwayat pengobatan TB sebelumnya. Hal ini menjelaskan banyaknya permintaan pemeriksaan MDR-TB dan tingginya positivitas hasil pemeriksaan pada kelompok ini.

Hasil pemeriksaan menunjukkan ada tiga sampel yang memberi hasil negatif palsu (lihat Tabel 1). Ketiga sampel ini memiliki salinan DNA sedikit, dua yang menunjukkan hasil rendah *Cycle Threshold* (C_T) >22 dan satu yang menunjukkan hasil sangat

rendah sebesar C_T 29 dengan metode CB-NAAT. Namun, tampak bahwa jumlah salinan DNA yang sedikit tersebut bukanlah merupakan penyebab hasil negatif palsu. Karena terdapat empat sampel yang memiliki hasil sangat rendah dan di $C_T > 27$ dengan metode CB-NAAT masih dapat dideteksi positif menggunakan *hybridization-based* NAAT. Kemudian para peneliti menelusur lebih lanjut dengan mencoba menggunakan beberapa kepekatan pembandingan positif dan menemukan bahwa metode HB-NAAT dapat mendeteksi salinan DNA 1 fg/mL.

Beberapa kemungkinan penyebab hasil negatif palsu terjadi antara lain karena terdapat perbedaan asas untuk deteksi metode CB-NAAT dengan yang *hybridization-based* NAAT. Metode HB-NAAT mendeteksi *M.tuberculosis* dengan menggunakan *insertion sequence* 6110 (IS6110) sebagai target deteksi padahal jumlah salinan IS6110 untuk tiap galur *M.tuberculosis* sangat beragam. Beberapa penelitian menunjukkan keberadaan galur *M.tuberculosis* yang memiliki jumlah salinan IS6110 rendah, seperti di Tunisia terdapat 75% yang hanya memiliki 6-10 alih kutipan IS6110 dan di India terdapat 41% hanya memiliki kurang dari dua saja IS6110. *Mycobacterium tuberculosis* dengan salinan IS6110 rendah lebih banyak ditemukan di daerah Asia daripada di Eropa. Jumlah salinan IS6110 rendah dapat menyebabkan hasil negatif palsu pada pemeriksaan genotip yang mendeteksi *M.tuberculosis* berdasarkan IS6110.⁹ Metode CB-NAAT tidak mempublikasikan target deteksi yang digunakannya. Lawn dkk⁵ dalam sebuah ulasan mengenai CB-NAAT menyatakan bahwa pemeriksaan ini menggunakan target deteksi *M.tuberculosis* dan terletak dekat dengan gen *rpoB* tanpa menyebutkan secara khusus target deteksi yang digunakan. Tiga sampel yang memberikan hasil negatif palsu pada penemuan IS6110 dapat terdeteksi pada pemeriksaan *rpoB* metode *hybridization-based* NAAT.

Penyebab lain yang dapat menimbulkan hasil negatif palsu adalah sebaran bakteri yang tidak merata di bahan pemeriksaan. Bahan pemeriksaan untuk metode CB-NAAT dan HB-NAAT didapat dari satu tabung pemeriksaan yang sama dan telah dilakukan homogenisasi. Namun, kemungkinan ada sebaran jumlah bakteri yang tidak merata masih tetap terdapat karena *M.tuberculosis* memiliki kecenderungan untuk berkelompok membentuk *serpentine cord*. Pembentukan ini terbentuk karena trihalose-6,6-dimikolat (TDM) yang terdapat dalam dinding sel *M.tuberculosis*.¹⁰ Hal inilah yang menjadi penyulit dalam membagi bahan pemeriksaan.

Hasil memeriksa menunjukkan bahwa dari 28 sampel yang diperiksa resistensi terhadap RIF menggunakan metode *hybridization-based* NAAT; didapatkan 11 sampel tidak berkesimpulan karena

memiliki nilai *melting temperature* (T_m) yang berbeda dengan T_m pembandingan. Nilai T_m *hybridization probe* adalah suhu pada saat 50% *probe* telah terpisah dari DNA *template* dan dapat diperkirakan dari *melting curve*. Nilai T_m digunakan untuk mendeteksi perubahan target sekuens DNA. Tiap dsDNA memiliki ciri stabilitas pada suhu tertentu, bergantung: panjang DNA, kandungan G=C, urutan nukleotida dan ikatan *Watson-Crick*. Ketidaksesuaian yang ada akan mengubah stabilitas suhu. Perubahan ini tampak pada perubahan T_m saat menganalisis *melting curve*.

Ketidaksesuaian yang diapit oleh pasangan G=C lebih stabil daripada yang diapit oleh pasangan A=T. Posisi tersebut juga mempengaruhi kestabilan. Ketidaksesuaian yang terletak di tengah *probe* lebih stabil daripada yang terletak di tepinya. Semakin stabil *double stranded* DNA (dsDNA) tertentu, maka akan menghasilkan nilai T_m yang lebih tinggi.

Berbagai penelitian dengan menggunakan metode HB-NAAT memiliki ragam suhu *within run* 0,1°C dan *between run* 0,5°C. Perbedaan T_m pada untai dsDNA tanpa ketidaksesuaian dan dsDNA dengan ketidaksesuaian di satu nukleotida beragam sebesar 0,5°C sampai 5°C. Perubahan suhu T_m lebih dari 1°C dari nilai T_m yang diharapkan menunjukkan ada mutasi baru. Sebelas sampel yang memiliki nilai T_m berbeda dengan T_m pembandingan menunjukkan kemungkinan ada mutasi lain, baik di kodon 526 (CAG>GAC) dan 531 (TCG>TTG) maupun di luar kodon tersebut. Untuk membuktikan adanya mutasi, maka pemeriksaan baku emas yang dapat digunakan adalah sekuensing hasil NAAT tersebut. Apakah perpindahan, tersebut menyebabkan resistensi ataupun tidak, harus dibuktikan dengan pemeriksaan kultur dan uji kepekaan. Hasil tidak berkesimpulan ini dianalisis sebagai resistensi negatif untuk kepentingan perhitungan statistik dan berperan dalam menyebabkan nilai kepekaan metode HB-NAAT yang rendah.

Para peneliti menelusur lebih lanjut dengan melakukan sekuensing beberapa sampel dan menemukan gen *rpoB* pada sampel sudah banyak mengalami mutasi. Satu sampel yang didiagnosis resisten RIF oleh CB-NAAT dan HB-NAAT memiliki lima mutasi substitusi dan satu insersi di daerah *hot spot region* gen ini. Satu sampel yang didiagnosis resisten RIF oleh CB-NAAT, tetapi peka RIF oleh HB-NAAT ternyata mengalami satu substitusi dan satu insersi. Namun, bukan di kodon 526 dan 531. Satu sampel yang didiagnosis peka RIF oleh CB-NAAT maupun HB-NAAT ternyata mengalami insersi di kodon 522. Sampel lainnya yang terdeteksi resisten RIF oleh CB-NAAT, tetapi tidak berkesimpulan di HB-NAAT ternyata mengalami satu insersi, satu delesi dan enam substitusi, sehingga menjelaskan nilai T_m

yang tidak berkesimpulan. Dari empat sampel yang disekuensing terdapat ragam mutasi sangat besar.

Telitian dari berbagai negara menunjukkan terdapat lebih dari 80 ragam mutasi yang berbeda, termasuk substitusi, delesi dan insersi di *hot spot region* dari gen *rpoB*. Pemeriksaan resistensi berlandas molekuler umumnya hanya mendeteksi mutasi yang paling sering ditemukan. Mutasi yang terjadi di DNA tertentu dapat menyebabkan perubahan protein yang dihasilkan sehingga dapat menyebabkan resistensi ataupun tidak (*silent mutation*). Metode HB-NAAT dapat mendeteksi mutasi di target kodon, baik itu mutasi yang menyebabkan resistensi ataupun *silent mutation*. Alonso dkk¹¹ menemukan *silent mutation* di kodon 514 gen *rpoB* dapat menyebabkan hasil positif palsu di berbagai pemeriksaan resistensi yang berlandaskan genotip.

HB-NAAT terbaik dalam mendeteksi gen *katG* pada kepekatan akhir *forward primer* 0,2 μM dan *reverse primer* 0,5 μM . Kepekatan *forward primer* yang rendah menyebabkan kepekaan pemeriksaan turun dalam mendeteksi keberadaan gen *katG*. Hampir semua sampel dengan C_T rendah dan yang sangat rendah (>22) pada pemeriksaan CB-NAAT tidak terdeteksi oleh HB-NAAT, sehingga nilai kepekaan metode ini menjadi rendah.

Hasil menggabungkan data pemeriksaan gen *rpoB* dan *katG* dengan menggunakan HB-NAAT didapatkan tiga rifampisin monoresisten (RMR) dan enam isoniazid monoresisten (IMR). Rifampisin monoresisten cenderung lebih jarang terjadi dibandingkan dengan IMR. Penelitian yang dilakukan oleh *British Medical Research Council* menemukan bahwa IMR terjadi di 5% pasien, sedangkan RMR terjadi di 0,02% pasien. Mutasi spontan terhadap RIF terjadi di satu (1) dari 10^8 salinan *mycobacterium*, sedangkan untuk mutasi spontan INH adalah 1 dari 10^6 *mycobacterium*, sehingga kemungkinan resistensi INH yang terjadi lebih besar daripada resistensi RIF. Kebahayaan RMR meningkat di pasien pengidap HIV positif, malabsorpsi, riwayat pengobatan TB sebelumnya dan riwayat ketidakpatuhan meminum obat. Ketiga subjek yang terdeteksi RMR oleh HB-NAAT berasal dari: Poliklinik MDR-TB dan bukan dari Poliklinik Teratai. Pasien bersangkutan memiliki riwayat pengobatan TB sebelumnya lebih dari sama dengan dua kali dan seorang memiliki riwayat ketidakpatuhan meminum obat. Ketiga subjek tersebut didiagnosis sebagai MDR-TB berdasarkan pemeriksaan CB-NAAT.

Ditemukannya RMR pada penelitian ini dapat disebabkan oleh tidak terdeteksinya resistensi terhadap INH oleh pemeriksaan *hybridization-based* NAAT. Walaupun antara 60–70% resistensi INH disebabkan karena ada mutasi gen *katG*, hal ini juga dapat terjadi di gen *inhA* ($<10\%$) dan *oxyR-ahpC* (20%).⁶

Kedua gen tersebut tidak diperiksa pada penelitian ini. Kodon 315 di gen *katG* adalah kodon yang paling sering mengalami mutasi dengan kekerapan beragam, yaitu antara 50% sampai dengan 95%.¹² *Hybridization-based* NAAT mendeteksi resistensi INH dengan cara mendeteksi mutasi di kodon 315 gen *katG*, sehingga dapat terjadi hasil negatif palsu karena ada mutasi di kodon dan gen lainnya. Hasil negatif palsu pemeriksaan resistensi INH pada penelitian ini dapat menyebabkan pasien MDR-TB tampak sebagai pasien RMR. Untuk memastikan diagnosisnya, lebih baik dilakukan pemeriksaan kultur dan uji kepekaan.

Hasil IMR ditemukan pada enam subjek, lima diantaranya terdiagnosis MDR-TB oleh *catridge-based* NAAT. Pemeriksaan resistensi RIF oleh metode HB-NAAT di dua dari lima subjek ini memberikan hasil tidak berkesimpulan dan ditetapkan sebagai negatif. Tiga dari lima subjek ini memberikan hasil sesuai dengan kontrol negatif *wild type* pada pemeriksaan *hybridization-based* NAAT. Hasil negatif palsu di kelima subjek ini dapat disebabkan oleh keterbatasan pemeriksaan HB-NAAT yang mendeteksi resistensi RIF hanya di kodon 526 dan 531 gen *rpoB*. Satu subjek dengan IMR terdiagnosis nonMDR oleh CB-NAAT. Hal ini menarik perhatian, karena CB-NAAT mendiagnosis MDR melalui keberadaan resistensi terhadap RIF. Resistensi RIF digunakan sebagai petanda pengganti dalam mendeteksi MDR-TB karena $\pm 90\%$ galur yang resisten RIF juga mengalami hal sama terhadap INH. Pemeriksaan CB-NAAT tidak dapat mendeteksi IMR karena prinsip pemeriksaan tersebut. Namun, untuk membuktikan apakah subjek ini benar terinfeksi galur *M.tuberculosis* IMR atau tidak harus dibuktikan dengan pemeriksaan kultur dan uji kepekaan.

Keterbatasan penelitian ini adalah pendeteksian terhadap keseluruhan 81 bp *hot spot region* gen *rpoB* untuk resistensi RIF dengan lain yang berperan dalam resistensi INH oleh HB-NAAT tidak dilakukan, sehingga dapat menyebabkan hasil negatif palsu. Pemeriksaan HB-NAAT terbaik dalam mendeteksi gen *katG* dengan kepekatan primer yang tidak serasi, sehingga menyebabkan pemeriksaan ini tidak dapat mendeteksi sampel yang bernilai C_T rendah.

SIMPULAN DAN SARAN

Metode HB-NAAT memiliki kesahihan berupa kekhasan tinggi, tetapi berkepekaan rendah dalam MDR-TB terhadap CB-NAAT. Pada penelitian ini juga dapat disimpulkan tambahan, yaitu bahwa metode HB-NAAT memiliki kesahihan berupa kekhasan tinggi (100%) dan juga kepekaan tinggi (89,3%) dalam mendeteksi *M.tuberculosis* terhadap CB-NAAT.

Pemeriksaan HB-NAAT dapat digunakan sebagai sarana penetapan diagnosis MDR-TB di laboratorium rujukan, terutama untuk kasus yang memerlukan diagnosis resistensi INH dengan cepat. Hasil positif untuk memastikan keberadaan MDR-TB, hasil negatif perlu dikonfirmasi dengan metode kultur dan uji kepekaan. Metode HB-NAAT dapat mendeteksi resistensi terhadap rifampisin dan isoniazid, tetapi memiliki kepekaan rendah. Dengan demikian pemeriksaan genotip yang baik digunakan untuk mendiagnosis MDR-TB saat ini adalah CB-NAAT. Karena pemeriksaan tersebut dapat mendeteksi keseluruhan mutasi di 81 *bphot spot region* gen *rpoB*, walaupun tidak dapat menjumpai resistensi terhadap INH.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Global tuberculosis report 2012. Geneva, Switzerland, WHO Press, 2012; 3–28.
2. Nathanson E, Nunn P, Uplekar M, Floyd K, Jaramillo E, Lonnroth K, *et al.* MDR tuberculosis--critical steps for prevention and control. *N Engl J Med.* 2010; 363(11) :1050–8.
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia Direktorat Jenderal pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Pedoman nasional pengendalian tuberkulosis. Jakarta, Departemen Kesehatan, 2011; 38–42.
4. WHO. Policy Statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. Geneva, Switzerland, WHO Press, 2011; 10–12.
5. Lawn SD, Nicol MP. Xpert(R) MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol.* 2011; 6(9): 1067–82.
6. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009; 13(11): 1320–30.
7. WHO. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: report no.4. Geneva, Switzerland: The WHO/IUATLD Global Project On Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance, 2008; 35–77.
8. Zignol M, Sismanidis C, Falzon D, Glaziou P, Dara M, Floyd K. Multidrug-resistant tuberculosis in children: evidence from global surveillance. *Eur Respir J.* 2012; 42(3): 701–7.
9. Sankar S, Kuppanan S, Balakrishnan B, Nandagopal B. Analysis of sequence diversity among IS6110 sequence of *Mycobacterium tuberculosis*: possible implications for PCR based detection. *Bioinformatics.* 2011; 6(7): 283–5.
10. Julian E, Roldan M, Sanchez-Chardi A, Astola O, Agusti G, Luquin M. Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. *J Bacteriol.* 2010; 192(7): 1751–60.
11. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menendez A, Bouza E, *et al.* Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(7): 2688–90.
12. Rahim Z, Nakajima C, Raqib R, Zaman K, Endtz HR, van der Zanden AG, *et al.* Molecular mechanism of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from Bangladesh. *Tuberculosis (Edinb).* 2012; 92(6): 529–34.