INDONESIAN JOURNAL OF

Clinical Pathology and Medical Laboratory

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

IJCP & ML (Maj. Pat. Klin. Indonesia & Lab. Med.)	Vol. 15	No. 1	Hal. 1-42	Surabaya November 2008	ISSN 0854-4263
---	---------	-------	-----------	---------------------------	-------------------

Diterbitkan oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Published by Indonesian Association of Clinical Pathologists

Terakreditasi No: 43/DIKTI/Kep/2008, Tanggal 8 Juli 2008

INDONESIAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY AND MEDICAL LABORATORY

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

- Gambaran Fungsi Hati dan Ginjal pada Penderita Malaria
(*Liver and Kidney Functions of Malaria Patients*)
Darmawaty, Fitriani M, Ruland DN Pakasi, Hardjoeno **1-4**
- Anemia dan Defisiensi Besi pada Siswa SLTP Negeri I Curug, Tangerang
(*Anemia and Iron Deficiency Among Female Adolescents from Junior High School (SLTP) Negeri I Curug, Tangerang*)
Fify Henrika, T. Silangit, Riadi Wirawan **5-11**
- Aktivitas SGOT, SGPT di Penderita Luka Bakar Sedang dan Berat
(*SGOT, SGPT Activities an Medium and Severe Burn Injuries Patients*)
Sri Nurul Hidayah, Mutmainnah, H. Ibrahim Abd. Samad **12-15**
- Deteksi Molekuler *Mycobacterium Tuberculosis* di Dahak Cara Polymerase Chain Reaction
(*Molecular Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Sputum with Polymerase Chain Reaction*)
PB. Notopuro, J. Nugraha, H. Notopuro **16-21**
- Pengaruh Pengawet Beku (*Cryopreservation*) terhadap Kadar *Epidermal Growth Factor* (EGF) pada Selaput Amnion
(*The Effect of Cryopreservation to Epidermal Growth Factor (EGF) Level in Amnion Membrane*)
Ety Retno S, Gunawan Effendi, Gatut Suhendro, I. Handojo **22-26**

TELAAH PUSTAKA

- Resistensi Vancomycin terhadap Enterococci
(*The Problem of Vancomycin-Resistant Enterococci*)
Nurhayana Sennang AN **27-33**

LAPORAN KASUS

- Diagnosis Filariasis Berdasar Hapusan Darah Tepi
(*Diagnosis of Filariasis Based on Thick Smear*)
H. I. Malewa, Prihatini **34-37**

MANAJEMEN LABORATORIUM

- Kegunaan Sistem Pengotomatan (Otomasi) Laboratorium/LAS (*Laboratory Automation Systems*)
(*Usefulness LAS (Laboratory Automation Systems)*)
Prihatini **38-42**

INFORMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU

DETEKSI MOLEKULER *Mycobacterium tuberculosis* DI DAHAK CARA POLYMERASE CHAIN REACTION

(Molecular Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Sputum With Polymerase Chain Reaction)

BB. Notopuro,* J. Nugraha,* H. Notopuro**

ABSTRACT

Tuberculosis is a chronic infectious disease which is found in developing and developed country. It is one of community health problems which become priority in national and international health programs. Microbiologic examination is used to establish the diagnosis of tuberculosis beside clinical examination and radiologic examination. Conventional microscopic and culture examination have many limitation ie: such as for example low sensitivity, specificity and need a lot of time. New Molecular technique gives more value in sensitivity, specificity and the time for examination. The aim of this study was to know the diagnostic value of Polymerase Chain Reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. The sputum was collected from twenty eight patients suspected tuberculosis based on the clinical and radiological examination. The study was performed from September 2006 until July 2007. We did the conventional culture technique as a diagnostic gold standard and molecular technique to detect the *Mycobacterium tuberculosis* in the sputum. For molecular technique, we used Polymerase Chain Reaction (PCR) with a set of IS6110 region primer which is specific for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. The sensitivity of PCR with IS6110 region primer is 100% (very high), specificity is 82.4% (high), positive predictive value is 89.7% and negative predictive value is 100%. There was statistically no significant difference between the result of PCR and conventional culture method. Based on the result, the Polymerase Chain Reaction examination with primer IS6110 region primer can be used as the screening tool for tuberculosis infection, while the clinician waits for culture result.

Key words: PCR, culture, IS6110 region primer

PENDAHULUAN

Tuberkulosis adalah penyakit jangkitan (infeksi) menahun (kronik) dapat ditemukan baik di negara berkembang maupun negara maju dan menjadi masalah kesehatan masyarakat yang mendapat prioritas dalam program kesehatan nasional maupun internasional. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan hampir sepertiga penduduk dunia atau sekitar dua milyar orang pernah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*.¹ Angka kematian karena tuberkulosis sebesar 2 juta kasus kematian setiap tahunnya.² Angka kesakitan akibat infeksi *M. tuberculosis* meningkat seiring dengan meningkatnya kejadian pandemi virus *human immunodeficiency* (HIV) di seluruh dunia. Pada saat ini diperkirakan terdapat 6 juta kasus infeksi campuran HIV dan *M. tuberculosis* di seluruh dunia. Hal ini mendorong ditemukannya sarana diagnosis infeksi tuberkulosis yang cepat dan teliti (akurat).¹

Diagnosis awal infeksi *M. tuberculosis* sering didasarkan pada data klinis, tetapi untuk menegakkan diagnosis pasti (definitif) diperlukan pengasingan (isolasi) dan mengenali (identifikasi) *M. tuberculosis* di laboratorium. Prosedur laboratorium untuk

spesimen klinis pada umumnya meliputi proses dekontaminasi, persiapan spesimen, pemeriksaan mikroskopik untuk melihat bakteri tahan asam, isolasi mikroorganisme dengan teknik pembiakan, dan identifikasi kepekaan antibiotika.²

Sejak perkembangan teknik pengecatan tahan asam pada 1882 oleh *Robert Koch*, prinsip diagnosis tuberkulosis secara mikroskopis mengalami perubahan, dan teknik pengecatan ini merupakan metode tercepat untuk deteksi adanya *M. tuberculosis*. Daya lacak teknik ini hanya 5×10^3 kuman per ml dan teknik ini perlu digabung dengan pemeriksaan kultur. Pemeriksaan kultur meskipun lebih sensitif tetapi membutuhkan waktu yang lama, yaitu 4–6 minggu untuk memperoleh hasil positif pada media padat *Lowenstein Jensen*.³ Perkembangan sistem kultur media cair otomatis seperti *Mycobacterial Growth Indicator Tubes* (MGIT Bactec 960) dan *MB BacT Alert system* (Organon Technika) meningkatkan waktu deteksi menjadi 12–18 hari.³ Teknologi molekuler memberi pengembangan metode pemeriksaan yang cepat dan sensitif untuk menemukan (deteksi) dan identifikasi *Mycobacteria*. Teknik molekuler ini digunakan untuk deteksi *Mycobacteria*, deteksi khas (spesifik) *M. tuberculosis*, membedakan *M.*

*Departemen Patologi FK-UNAIR - RSU. Dr. Soetomo, Jl. Prof. Dr. Moestopo 6–8 Surabaya

**Departemen Biokimia FK-UNAIR, Jl. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya

tuberculosis complex dan *Mycobacteria other than tuberculosis* (MOTT), dan deteksi adanya resistensi obat. Sepkowitz (1994).⁴ Metode deteksi molekuler menggunakan tahapan yang dimulai dengan amplifikasi urutan asam nukleat dengan berbagai teknik. Teknik terbaik dan terbanyak digunakan adalah *polymerase chain reaction* (PCR).⁴

Metode molekuler untuk amplifikasi asam nukleat dapat memperpendek waktu pemeriksaan yang digunakan untuk menegakkan diagnosis tuberkulosis. Pemilihan *primer* yang digunakan dalam proses amplifikasi ini dilakukan dengan mempertimbangkan tujuan tersebut. *Primer* yang digunakan dalam proses amplifikasi dapat berupa *primer* yang *species specific* atau pun *genus specific*.⁴

Pemilihan *primer* menentukan kekhasan (spesifisitas) reaksi amplifikasi yang terjadi. *Primer* yang dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis tuberkulosis yaitu *primer* yang mendeteksi urutan nukleotida insersi yang repetitif seperti *primer* yang terdapat pada regio IS6110. *Primer* pada regio IS6110 tersebut merupakan *primer* yang *species specific*.⁴ Secara umum regio IS6110 terdapat dalam jumlah salinan yang banyak (10–20 salinan) pada sebagian besar strain *M. tuberculosis*, dan terdapat dalam jumlah salinan kecil pada strain *M. bovis*. Spesifisitas dan sifat repetitif yang dimilikinya membuat regio IS6110 merupakan sasaran (target) cocok (ideal) untuk amplifikasi.

IS6110 merupakan suatu regio pada kromosom *M. tuberculosis* (termasuk *Complex*) sepanjang 1361-bp, merupakan suatu *conserved region* yang dimiliki oleh semua *species* dari *M. tuberculosis Complex*.⁵ Eisenach dkk.,⁶ pada tahun 1995 menggunakan *primer* pada daerah IS6110 dengan urutan nukleotida no 759 sampai dengan 882 yang terletak antara daerah Pvu II dan daerah Bam HI. Hasil amplifikasi berupa basa nukleotida sepanjang 123-bp (Gambar 1).

Gambar 1. Posisi *primer* PCR untuk deteksi MtbC IS 6110⁶

Sampai saat ini, belum ada sarana diagnostik infeksi *M. tuberculosis* yang "ideal" yaitu yang memiliki kepekaan (sensitivitas), kekhasan (spesifisitas) diagnostik yang sangat tinggi, memiliki

waktu pemeriksaan yang cepat, dapat menemukan (deteksi) adanya kuman dalam jumlah yang sangat sedikit yaitu pada kasus tuberkulosis pausibasiler yang sering memberi hasil negatif palsu pada teknik pengecatan tahan asam dan teknik kultur. Teknik pembenihan (kultur) merupakan metode baku emas untuk deteksi *M. tuberculosis*, namun teknik kultur ini membutuhkan waktu pemeriksaan yang lama (6 sampai 8 minggu) dan memiliki sensitivitas yang tidak terlalu tinggi. Pengembangan teknik molekuler deteksi *M. tuberculosis* diharapkan dapat berguna untuk pengembangan diagnosis infeksi *M. tuberculosis* yang teliti (akurat), cepat serta andal (sensitif dan spesifik). Pengembangan teknik diagnosis yang cepat dan akurat akan sangat membantu penggunaan di laboratorium rujukan dalam usaha penatalaksanaan dan pemberantasan infeksi *M. tuberculosis* di masyarakat.

METODE

Sampel Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan pengumpulan sampel dahak dari 28 orang penderita yang diduga menderita tuberkulosis paru berdasarkan pemeriksaan fisik dan radiologi di poli paru RSUD Dr. Soetomo Surabaya pada bulan September 2006 sampai Juli 2007. Penderita tersebut yang batuk lebih dari 3 minggu dengan dahak purulen, pada pemeriksaan fisik dan foto sinar X dada diduga menderita tuberkulosis paru dan belum pernah mendapatkan pengobatan antituberkulosis. Untuk kelompok kontrol diperiksa dahak dari 15 orang penderita batuk lebih dari 3 minggu dengan dahak purulen dan atau mukoid pada pemeriksaan fisik dan foto sinar X dada didapatkan hasil penyakit paru menahun (kronik) non tuberkulosis paru seperti radang tenggorokan (bronkitis) kronik, *asma bronkiale*, radang paru (pneumonia) yang berobat ke poli paru RSUD dr. Soetomo, penderita belum atau sedang dalam proses pengobatan penyakitnya.

Persiapan Sampel

Pada tiap ml volume dahak (*sputum*), ditambahkan 2 ml NaOH 4%. Tutup tabung rapat lalu dikocok dan dibiarkan 15 menit di suhu kamar. Dilakukan pemusingan (sentrifugasi) 3000 g selama 15 menit. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan 15 ml PBS (*phosphate buffer saline*) steril dan disentrifugasi 3000 g selama 15 menit lagi. Hasil sentrifugasi (*pellet*) sebanyak 100–1000 μ l dilakukan kultur sedimen pada media LJ (*Lowenstein Jensen*) selama 4–6 minggu. Pada sisa hasil sentrifugasi (*pellet*) dilakukan pengasingan (isolasi) DNA dengan DNA extraction kit.

Pemeriksaan PCR

Pada hasil ekstraksi DNA dilakukan proses amplifikasi PCR dengan primer region IS6110 CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3' (20 mers) dan IS6110: 5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3' (20 mers). menggunakan mesin *thermocycler* Biorad®. Proses diawali dengan denaturasi pada suhu 95° C selama 3 menit (*Hot Start*), kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus reaksi amplifikasi (denaturasi pada 95° C selama 0,5 menit, *annealing* pada 55° C selama 0,5 menit, ekstensi pada 72° C selama 1 menit. Hasil amplifikasi digambarkan (visualisasi) dengan elektroforesis gel agarosa 2% dengan pengecatan *ethidium bromide* dengan *submarine electrophoresis apparatus* Atago®. Kemungkinan kontaminasi diamati dengan pembanding kendali (kontrol) negatif yang mengandung semua bahan campuran reaksi PCR tanpa *DNA template* yang selalu disertakan untuk setiap reaksi PCR.

Kultur Standar pada Media LJ

Hasil sentrifugasi (pellet) dipipet ke dalam media LJ. Botol ditutup tetapi tidak terlalu rapat. Bahan pemeriksaan tersebut disebar merata di atas permukaan media dengan cara menggerakkan botol. Botol diletakkan pada rak dengan kemiringan 30° selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 35–37° C. Setelah 24 jam, tutup botol dikencangkan dan diletakkan pada rak tabung dengan posisi tegak dan inkubasi dilanjutkan. Pertumbuhan *M. tuberculosis* diamati setiap minggu. Pengamatan dilakukan sampai 8 minggu.

Uji Identifikasi Niacin

Sebanyak 1cc *aquadest* steril ditambahkan pada subkultur *M. tuberculosis*. Media LJ digores dengan menggunakan sengkelit steril, kemudian dimasukkan pada *autoclave* 121° C selama 30 menit secara horizontal sampai semua cairan menutupi permukaan media. Botol diangkat dari *autoclave* dan diletakkan pada posisi tegak, didiamkan selama 5 menit. Sebanyak 0,5 ml cairan ekstrak dipipet dan masukkan ke dalam tabung reaksi 5 ml. Ditambahkan 0,5 ml larutan Chloramin T 5%, dan 0,5 ml larutan KCN 1%. Dicampur sampai homogen, dan dibiarkan pada suhu kamar selama 5 menit, perubahan warna diamati. Hasil Positif apabila terbentuk warna kuning dan negatif apabila tidak berwarna. Kontrol positif digunakan kultur *M. tuberculosis* H37Rv dan kontrol negatif dengan media LJ yang tidak ditanami. Untuk netralisasi, ditambahkan NaOH 10% dengan volume yang sama, kemudian isi tabung dapat dibuang.

Analisis Statistik

Uji statistik *Mc Nemar* dengan *software SPSS v.12* digunakan untuk menguji hipotesis penelitian,

membuktikan ada atau tidak perbedaan yang bermakna pada hasil ditemukan (deteksi) *M. tuberculosis* antara teknik PC.R dengan teknik kultur metode standar sebagai baku emas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi *M. tuberculosis* dengan teknik kultur metode standar

Pemeriksaan kultur metode standar dilakukan terhadap 28 orang penderita yang diduga menderita tuberkulosis paru dan 15 orang kelompok kontrol nontuberkulosis. Dahak penderita dikumpulkan mulai bulan November 2006 sampai bulan Mei 2007. Pada 28 penderita yang diduga menderita tuberkulosis paru berdasarkan pemeriksaan fisik dan foto dada sinar X, didapatkan hasil kultur yang positif pada 26 penderita dan 2 penderita dengan hasil kultur negatif. Pada 15 penderita kelompok kontrol didapatkan hasil kultur yang negatif pada semua penderita. Diagnosis kelompok kontrol berdasarkan foto paru sinar X beragam (variasi) yaitu 9 penderita dengan bronkitis kronik dan 6 orang dengan pneumonia. Pada setiap preparasi media pembenihan (kultur) dan reagensia dilakukan kultur pada 1 strain kontrol *M. tuberculosis* H 37 rv (ATCC 27294) untuk kontrol mutu (kualitas) alat (media) dan reagensia, menunjukkan hasil yang optimal.

Deteksi *M. tuberculosis* dengan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Pemeriksaan PCR dengan *primer regio* IS6110 dilakukan pada dahak 28 penderita yang diduga menderita tuberkulosis paru dan dahak 15 orang kelompok kontrol non tuberkulosis. Hasil PCR pada 28 penderita yang diduga menderita tuberkulosis paru, semua dari 28 penderita (28/28) dapat ditemukan (deteksi) satu pita DNA spesifik dengan ukuran molekul 123-bp yang disesuaikan dengan standar ukuran molekul marka 100-bp *DNA ladder Promega Catalog# G2101*, pada elektroforesis gel agarosa. Hasil PCR pada 15 penderita kelompok kontrol, sebanyak 14 penderita (14/15) tidak dideteksi pita DNA spesifik dengan ukuran molekul 123-bp yang disesuaikan dengan standar ukuran molekul marka 100-bp *DNA ladder Promega Catalog# G2101* pada elektroforesis dan 1 penderita bronkitis kronik berdasarkan foto dada sinar X (1/15) dapat dideteksi pita DNA khas (spesifik) dengan ukuran molekul 123-bp yang disesuaikan dengan standar ukuran molekul marka 100-bp *DNA ladder Promega Catalog# G210*. Pada setiap reaksi PCR, dilakukan pemeriksaan terhadap strain kontrol *M. tuberculosis* H37 rv sebagai kontrol positif untuk kontrol kualitas pemeriksaan PCR dan kontrol negatif yang mengandung semua bahan campuran reaksi PCR

tanpa *DNA template* yang selalu disertakan untuk setiap reaksi PCR.

Gambar 1. Hasil PCR *M. tuberculosis Complex* pada dahak dengan primer *IS 6110* yang menghasilkan satu pita DNA spesifik dengan ukuran molekul 123-bp. (No: 1,2,3,4,5). L = 100-bp DNA ladder, K(+) = kontrol positif, K(-) = kontrol negatif.

Gambar 2. Hasil PCR *M. tuberculosis Complex* pada dahak dengan primer *IS 6110* yang menghasilkan satu pita DNA spesifik dengan ukuran molekul 123-bp. (No: 2,3,4,6,8,9,10,12,13). Hasil PCR *M. tuberculosis Complex* yang negatif (No: 1,5,7,11). L = 100-bp DNA ladder, K(+) = kontrol positif, K(-) = kontrol negatif.

Gambar 3. Hasil PCR *M. tuberculosis Complex* pada dahak dengan primer *IS 6110* menghasilkan satu pita DNA spesifik dengan ukuran molekul 123-bp. (No: 1,2,5). Hasil PCR *M. tuberculosis Complex* yang negatif (No: 3,4). L = 100-bp DNA ladder, K(+) = kontrol positif, K(-) = kontrol negatif.

Gambar 4. Hasil PCR *M. tuberculosis Complex* pada dahak dengan primer *IS 6110* menghasilkan satu pita DNA spesifik dengan ukuran molekul 123-bp. (No: 1,2,3,4,5). L = 100-bp DNA ladder, K(+) = kontrol positif, K(-) = kontrol negatif.

Hasil Uji Validitas dan Uji Statistik

Uji validitas pada hasil deteksi *M. tuberculosis* pada dahak menggunakan PCR dengan teknik kultur metode standar sebagai baku emas dapat dinilai pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil deteksi *M. tuberculosis* pada dahak menggunakan PCR dengan teknik kultur metode standar sebagai baku emas

Deteksi <i>M. tuberculosis</i>		Kultur metode standar (baku emas)	
		+	-
PCR	+	26	3
	-	0	14

Hasil tabel 1, diperoleh sensitivitas sebesar 100%, spesifisitas 82,4%, nilai ramal positif 89,7%, dan nilai ramal negatif 100%.

Pada hasil uji statistik *Mc Nemar* ternyata tidak terdapat perbedaan bermakna pada hasil deteksi *M. tuberculosis* pada dahak antara teknik PCR dan teknik kultur metode standar ($p = 0,250$), dihitung menggunakan hasil pada tabel 1.

Deteksi *M. tuberculosis* pada Dahak Cara PCR dengan Teknik Kultur Metode Standar sebagai Baku Emas

Diagnosis tuberkulosis yang cepat dan pasti (definitif) pada pemeriksaan klinik rutin sangat sulit ditegakkan, hal ini disebabkan karena untuk melakukan pemeriksaan kultur diperlukan 3 sampai 6 minggu. Pemeriksaan PCR sedikitnya dapat membantu menyingkirkan diagnosis tuberkulosis selama pemeriksaan ini dilakukan dengan prosedur kerja yang terstandarisasi dengan baik untuk menghindari terjadi cecaran di hasil. Hal ini

didukung penelitian yang dilakukan Beige dkk., tahun 1995 yang melaporkan bahwa kepekaan (sensitivitas) PCR adalah 98% jauh lebih tinggi dari sensitivitas pemeriksaan kultur sebesar 75%. Pemeriksaan PCR ini memiliki kesahan (validitas) yang sama dengan sedikitnya 3 prosedur kultur. Pemeriksaan PCR ini juga mengurangi waktu pemeriksaan dari 3 sampai 6 minggu pada teknik kultur menjadi 1 sampai 2 hari saja.⁷ Sepkowitz dkk.,⁴ pada tahun 2003 melaporkan bahwa kepekaan (sensitivitas) pemeriksaan PCR beragam (variasi) dari 50% sampai 100% dan spesifisitasnya sangat tinggi yaitu 95% sampai 100%. Johansen,⁸ pada tahun 2006 melaporkan bahwa sensitivitas teknik PCR bervariasi dari 40% sampai 100% dan spesifisitasnya juga beragam (variasi) dari 70% sampai 100%.

Berdasarkan hasil penelitian ini didapat sensitivitas pemeriksaan PCR adalah 100% (sangat tinggi), spesifisitas 82,4% (tinggi), nilai ramal positif 89,7% dan nilai ramal negatif 100%. Di kelompok penderita yang diduga menderita tuberkulosis paru, terdapat 2 (dua) penderita dengan hasil pemeriksaan PCR positif palsu. Hasil pemeriksaan kultur pada penderita ini negatif karena kemungkinan penderita ini menderita tuberkulosis pausibasiler sehingga pada pemeriksaan kultur yang daya lacaknya "hanya" 25 kuman/ml hasil *sputum* negatif. Pada pemeriksaan lanjutan didapatkan hasil pemeriksaan serologis Mycotec TB XP™ pengesahan ulang (*recombinant*) dari *index diagnostics* yang positif pada kedua penderita tersebut. Mycotec TB XP™ (*recombinant*) menggunakan beberapa antigen rekombinan yaitu antigen 38,16 kDa dan 6 kDa *Early Secreted Antigen Target* (ESAT-6) yang mendeteksi adanya tanggapan (respons) imun humoral terhadap infeksi *M. tuberculosis*. Antigen 38,16 kDa memiliki 7 epitop yang spesifik untuk *M. tuberculosis* di antaranya epitop TB 72 MAB yang penting peran terjadinya tuberkulosis ekstrapulmoner dan tuberkulosis pausibasiler. Antigen ESAT-6 merupakan antigen *M. tuberculosis* yang hanya disekresi (*in vivo* dan *in vitro*) oleh strain *Mycobacterium* yang patogen saja (*M. tuberculosis* Complex, *M. kansasii*, *M. szulgai*, dan *M. marinum*) dan tidak disekresi oleh *M. tuberculosis* var *bovis* BCG maupun *Mycobacterium* lingkungan hidup yang nontuberkulosis yang tidak patogen untuk manusia. Mycotec TB XP pengesahan ulang (*recombinant*) memiliki sensitivitas 71,64% dan spesifisitas 79,17%.⁹ Adanya hasil pemeriksaan serologis Mycotec TB XP (*recombinant*) yang positif ini memperkuat dugaan adanya tuberkulosis pausibasiler. Untuk dapat memastikan diagnosis tuberkulosis pausibasiler, perlu dilakukan pemberian OAT selama minimal 3 bulan, apabila didapatkan perbaikan dalam kondisi klinis dan radiologis maka dapat dipastikan penderita tersebut adalah penderita tuberkulosis pausibasiler.^{8,9} Pada kelompok kontrol

nontuberkulosis, didapatkan hasil PCR positif palsu pada 1 penderita dengan kultur negatif (diagnosis berdasarkan X foto paru adalah bronkitis kronik). Pada pemeriksaan lanjutan dengan uji serologis Mycotec TB XP™ (*recombinant*), didapat hasil uji serologis negatif. Hasil pemeriksaan tersebut menunjukkan bahwa penderita tidak menderita tuberkulosis aktif, tetapi masih terdapat kemungkinan lain yaitu hasil uji serologis yang negatif palsu dan penderita tersebut pernah menderita tuberkulosis yang telah diobati dan masih mengeluarkan kuman yang mati dalam dahaknya.¹⁰

Batas deteksi DNA murni oleh teknik PCR dilaporkan sebesar 1 fg (sama dengan 1/5 organisme), tetapi dalam spesimen klinik seperti dahak (*sputum*), batas deteksi bervariasi dari 10 sampai 1000 mikroorganisme. Kepekaan (sensitivitas) pemeriksaan PCR tergantung pada prosedur ekstraksi DNA, parameter siklus PCR, dan metode yang digunakan untuk mendeteksi dan identifikasi produk DNA yang sudah teramplifikasi. *M. tuberculosis* memiliki lapisan lemak pada dinding sel yang tebal, hal ini membuatnya lebih menyulitkan (resisten) dalam proses ekstraksi DNA. Sensitivitas PCR dapat ditingkatkan dengan menggunakan prosedur ekstraksi DNA yang melibatkan proses digesti protease, ekstraksi kloroform fenol, dan presipitasi dengan etanol dari DNA yang diekstraksi. Suatu metode yang lebih sederhana yaitu penggunaan *lysis buffer* yang mengandung *non-ionic detergent* dapat dilakukan pada pemeriksaan rutin, tetapi metode tersebut kurang sensitif dibandingkan metode terdahulu.^{8,10}

Sensitivitas juga dipengaruhi oleh metode yang digunakan untuk mendeteksi dan identifikasi produk amplifikasi DNA. Sebagian laboratorium penelitian menggunakan prosedur hibridisasi dengan menggunakan identifikasi *probe*. Kepekaan (sensitivitas) reaksi tergantung dari jenis label yang terikat pada suatu *probe*. *Probe* yang berlabel³²P menghasilkan reaksi yang paling sensitif. Namun demikian, masalah limbah akhir menjadikan penggunaan rutin radioisotop pada laboratorium klinik kurang diminati. Penggunaan label enzim seperti alkali fosfatase, digoxigenin atau biotin dan deteksinya dengan teknik kolorimetrik atau *chemiluminescent* mempunyai sensitivitas yang sama dengan metode pengecatan *ethidium bromide*. Sensitivitas PCR juga dapat ditingkatkan dengan menggunakan suatu set *primer* kedua pada hasil produk amplifikasi DNA yang bertujuan untuk mengamplifikasikan segmen internal (*nested PCR*).⁸ Spesifisitas pemeriksaan PCR ditentukan oleh pemilihan *primer* yang digunakan. *Primer* IS6110 merupakan *primer* yang *species specific* yaitu spesifik terhadap *M. tuberculosis* complex. Kelebihan teknik PCR untuk deteksi *M. tuberculosis* pada dahak adalah pada tingginya sensitivitas dan spesifisitasnya. Teknik

ini juga sangat efisien karena dapat memberikan hasil dalam waktu 24–48 jam. Teknik PCR ini juga dapat digunakan untuk deteksi *M. tuberculosis* pada kasus tuberkulosis pausibasiler yang pada pemeriksaan pengecatan tahan asam dan kultur hasilnya negatif, karena teknik PCR dengan kemampuan amplifikasi DNA memiliki daya lacak yang sangat tinggi meskipun pada kultur mikroorganisme masih tumbuh minimal. Prosedur kerja PCR juga aman terhadap masalah penularan karena penggunaan ekstrak DNA yang merupakan partikel dari kuman secara utuh.^{6,8} Pada penelitian ini, hasil deteksi *M. tuberculosis* pada dahak, terbukti tidak terdapat perbedaan bermakna antara teknik PCR dengan teknik kultur metode standar ($p = 0,250$).

Kekurangan teknik PCR adalah karena metode deteksi secara genetik bukan merupakan metode definitif untuk diagnosis infeksi *M. tuberculosis*, hal ini disebabkan karena PCR bukan hanya mendeteksi kuman yang hidup saja, tetapi PCR juga mendeteksi fragmen kuman yang telah mati. Teknik PCR juga memiliki sensitivitas yang sangat tinggi, sehingga dapat memberikan hasil positif palsu. Oleh sebab itu, diperlukan prosedur kerja yang teliti dan tepat untuk mencegah adanya cemaran (kontaminasi) yang memberikan hasil positif palsu.⁸

Berdasarkan kelebihan dan kekurangan teknik PCR tersebut, maka teknik PCR ini sebaiknya digunakan untuk uji penapisan yang dapat membantu klinisi sebelum menegakkan diagnosis, selama menunggu hasil teknik kultur metode standar yang merupakan baku emas diagnosis tuberkulosis. Teknik ini sebaiknya digunakan bersama cara serologis, teknik kultur untuk memastikan diagnosis tuberkulosis.

SIMPULAN DAN SARAN

Teknik deteksi *M. tuberculosis* pada dahak dengan PCR memiliki sensitivitas dan spesifisitas diagnostik yang tinggi yaitu 100% dan 82,4%. Pada uji statistik, ternyata hasil pemeriksaan PCR tidak berbeda bermakna dengan teknik kultur metode standar yang merupakan metode baku emas.

Untuk membedakan adanya *M. tuberculosis* yang hidup pada penderita tuberkulosis paru aktif dan *M. tuberculosis* yang mati pada penderita yang telah sembuh tetapi masih mengeluarkan sisa kuman mati dalam dahaknya diperlukan pemeriksaan PCR yang dapat mendeteksi adanya mRNA *M. tuberculosis*. Hasil PCR positif pada kasus kemungkinan tuberkulosis pausibasiler perlu dilanjutkan dengan pemberian OAT minimal 3 bulan, apabila didapat adanya perbaikan dalam kondisi klinis dan radiologis maka dapat dipastikan penderita tersebut adalah penderita tuberkulosis pausibasiler.

DAFTAR PUSTAKA

1. Caws M, Drobniewski FA. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. In: Molecular Techniques in TB Diagnosis. Annals New York: Academy of Sciences; 2004. p. 138–45.
2. Soini H, Musser J.M. Molecular diagnosis of *Mycobacteria*. Clin chem 2004; 47(5): 809–14.
3. Baron E.E, Peterson L.R, and Finegold S.M. *Mycobacteria*. In (Bailey & Scott's) Diagnostic Microbiology. Mosby Year Book, Inc. St. Louis Baltimore Boston, Chicago, London, Madrid, Philadelphia, Sydney, Toronto; 1994. p. 590–633.
4. Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn T, Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clinical Microbiology Review* 2005; 8(2): 180–99.
5. Thierry D, Noel AB, Vrebault L, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequences, IS6110, and Its application in diagnosis. J. Clin. Microbiol 1990; 28(12): 2668–73.
6. Eisenach KD, Cave MD, Crawford JT. PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In diagnostic molecular microbiology, principles and applications. Mayo Foundation Rochester; 1993. p. 191–6.
7. Beige J, Lokies J, Schaberg T, Finckh U, Fischer M, Mauch H, Lode H, Kohler B, Rolfs K. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. J. Clin. Microbiol 1995; 33(1): 90–5.
8. Johansen IS. Rapid diagnoses of mycobacterial diseases and their implication on clinical management. Dan Med Bull 2006; 53(1): 28–45.
9. Indec Diagnostics. Mycotec TB XP™ recombinant product insert kit: A Rapid Test for the Qualitative Detection of Antibodies against active tuberculosis in human serum or plasma. Indec Diagnostics 2006; p: 3–11.
10. Handojo I. Imunoasai (Uji Serologis) untuk Penyakit Tuberkulosis (USTB). In imunoasai terapan pada beberapa penyakit infeksi. Airlangga University Press; 2004. p. 23–30.