

Kemunculan Gen *Mycobacterium tuberculosis* dari Sampel Darah Pasien Pengobatan Tuberkulosis Fase Konversi Menggunakan PCR yang Tidak Terdeteksi dengan Evaluasi Pewarnaan Bakteri di Puskesmas Janti

Rehmadanta Sitepu, Fira Dwijayanti, Chresiani D. Yoedistira

Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ma Chung, Malang, Indonesia

Abstrak

Fase konversi pada pengobatan tuberkulosis merupakan fase dilakukannya pemeriksaan terhadap pasien tuberkulosis untuk memastikan apakah pasien melanjutkan pengobatan ke tahap lanjutan atau mengulangi pengobatannya. Sayangnya, evaluasi yang dilakukan di puskesmas masih menggunakan metode pewarnaan mikroskopis dengan tingkat spesifisitas yang rendah meski masih merupakan metode standar. Banyaknya hasil bias dari penggunaan metode tersebut dapat memunculkan masalah baru terkait resistensi yang dikenal dengan *multidrug resistant-tuberculosis* (MDR-TB). Pendekatan identifikasi secara molekuler dikenal lebih spesifik dan akurat dalam mengidentifikasi mikroorganisme. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan spesifisitas dan sensitivitas antara metode molekuler dengan metode pewarnaan. Penelitian ini menggunakan 17 sampel darah pasien tuberkulosis fase konversi disertai satu kontrol positif dan kontrol negatif yang diambil dalam rentang waktu Oktober–November 2020. Sekuens primer yang digunakan pada penelitian ini adalah 16s rRNA bakteri dengan primer *forward* yang mempunyai urutan basa ACT GAG ATA CGG CCC AGA CT dan *reverse* TCA CGA ACA ACG CGA CAA AC. Penelitian diawali dengan melakukan optimasi pada variasi jumlah siklus, *melting temperature* (Tm), dan konsentrasi DNA templat, yang kemudian dilanjutkan dengan identifikasi bakteri pada sampel darah pasien. Pada hasil PCR, dihasilkan satu pita dengan ukuran 279 pb dengan kondisi optimum amplifikasi pada siklus 35, Tm 60°C, dan konsentrasi DNA templat 5 µmol. Hasil penelitian menunjukkan adanya 2 sampel yang positif dari 17 sampel yang diidentifikasi menggunakan PCR, sedangkan berdasarkan data objektif pada identifikasi secara mikroskopis tidak ada satupun sampel yang positif. Dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan antara hasil yang diperoleh dari identifikasi secara pewarnaan mikroskopis dan metode PCR.

Kata kunci: 16s rRNA, darah, *Mycobacterium tuberculosis*

The Emerge of *Mycobacterium tuberculosis* Gene from Blood Sample of Tuberculosis Conversion Phase Treatment Patient Using PCR which Staining Evaluation has Not Detected in Janti Public Health Center

Abstract

The conversion phase in tuberculosis treatment examines patients to ensure the possibility of further advancement. Despite its low specificity, microscopic evaluation is a standard method at public health centers. Moreover, the biased results from this method form a new problem related to multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Molecular approaches are known for their high specificity and accuracy in microbial identification. Therefore, this study aimed to compare the specificity and sensitivity of molecular and microscopic methods. The sample used was 17 blood of tuberculosis patients in the conversion phase accompanied by one positive and negative control collected from October to November 2020. The DNA sequence was 16s RNA with forwarding ACT GAG ATA CGG CCC AGA CT and reverse primer TCA CGA ACA ACG CGA CAA AC. Furthermore, the research was conducted by optimizing variations in the number of cycles, temperature melting (Tm), and template DNA concentration. The results showed 279 bp length of PCR product, under the optimum conditions under 35 cycles, Tm of 60°C, and template DNA concentration of 5 µmol. The PCR result identified that 2 of 17 samples contain positive *Mycobacterium tuberculosis*. Meanwhile, none was positive on microscopic evaluation. Therefore, there are different results between microscopic and molecular methods.

Keywords: 16s rRNA, blood, *Mycobacterium tuberculosis*

Korespondensi: apt. Rehmadanta Sitepu, M.Si., Program Studi Farmasi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ma Chung, Dau, Jawa Timur 65151, Indonesia, *email:* rehmadanta.sitepu@machung.ac.id

Naskah diterima: 7 Februari 2021, Diterima untuk diterbitkan: 18 Februari 2022, Diterbitkan: 30 Maret 2022

Pendahuluan

Indonesia masuk dalam 30 negara dengan tingkat beban tuberkulosis (TB) yang tinggi di dunia. Laporan *World Health Organization* (WHO) tahun 2018 mencatat bahwa 2,8% dari kasus baru yang muncul merupakan *multidrug-resistant TB* (MDR-TB) atau *rifampicin-resistant TB* (RR-TB). Sebanyak 13% kasus yang sudah ditangani dengan pengobatan mengalami perubahan menjadi MDR-TB.¹ Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan (Permenkes) No. 67 Tahun 2016 tentang pengobatan TB orang dewasa, pemantauan pasien TB dilaksanakan dengan pemeriksaan ulang dahak secara mikroskopis. Tahapan pemeriksaan ini dilakukan ketika pasien yang telah melakukan pengobatan pada fase awal (fase intensif) menuju ke fase lanjutan. Fase ini dikenal dengan istilah fase konversi.² Namun pada penderita TB fase konversi, sulit untuk mengevaluasi secara spesifik akan adanya *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) pada sampel dahak akibat adanya kendala dari penderita TB dalam mengeluarkan dahak yang memenuhi persyaratan. Oleh karena itu, proses pemantauan hasil pengobatan lebih diarahkan pada tingkat kelengkapan pengobatan atau *success rate*.³

Fase konversi menjadi titik kritis dalam proses pemantauan penggunaan obat oleh pasien. Teknik molekular dalam identifikasi agen penginfeksi merupakan perubahan besar yang sangat signifikan terjadi dalam beberapa tahun silam. Teknik ini sangat mumpuni karena dapat memberikan hasil dengan sensitivitas yang tinggi dan cepat. Selain itu, teknik ini juga dapat mengidentifikasi terjadinya MDR-TB ataupun mutasi yang dapat memperparah penyakit.^{4,5} Namun demikian, perkembangan ini tidak disertai pembenahan peralatan diagnosis di fasilitas pelayanan kesehatan. Identifikasi keberadaan bakteri *M. tuberculosis* yang dilakukan di fasilitas kesehatan di Indonesia

sebagian besar masih menggunakan metode pewarnaan mikroskopis. Metode ini memiliki spesifisitas dan akurasi yang rendah karena membutuhkan jumlah bakteri yang banyak agar dapat dilakukan identifikasi. Kesenjangan teknologi ini mengakibatkan risiko terjadinya resistensi masih sangat tinggi.⁶ Kementerian Kesehatan Republik Indonesia menyatakan bahwa sekitar 24.000 masyarakat Indonesia mengalami resistensi dan 93.000 orang meninggal akibat TB pada tahun 2018. Hal ini menunjukkan masih adanya kelemahan dalam sistem pengendalian TB, terutama dalam metode karakterisasi yang digunakan.

Penelitian ini membandingkan hasil yang diperoleh berdasarkan metode PCR dengan metode pemeriksaan pewarnaan mikroskopis. Dalam penelitian ini, digunakan pengembangan metode identifikasi secara molekular yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yaitu gen *16S ribosomal ribonucleic acid* (16S rRNA).⁷

Metode

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu tabung plebotomi Vacutainer®, mikrosentrifugasi Sigma Zentr Germany, mikropipet Eppendorf® (1000 µL, 500 µL, 100 µL, 20 µL, 10 µL), tip mikropipet (biru, kuning dan putih), cetakan agarosa, tabung Eppendorf®, gelas ukur Iwaki® 100 mL, *beker glass* Iwaki® 1000 mL, *vortex* Ika®, neraca analitik Ohaus®, *stopwatch*, *thermocycler* PCR Biometar T-Advanced, inkubator Ecocell, elektroforesis Biorad, spektrofotometer *UV-Visible* Jasco V-630 yang ditandem dengan *One Drop System* SAF 851, *UV-Transilluminator* Cleaver®, dan *freezer* Gea®. Bahan-bahan yang digunakan adalah kit isolasi Geneaid Biotech Ltd., Air PCR Merck®, etanol Merck®, sepasang primer *forward* 5' ACT GAG ATA GCG CCC AGA CT 3' dan *reverse* 5' TCA CGAACAACG CGA CAAAC 3', *master mix* PCR *GoTaq*® Green, agarose dari Merck®,

Tris acetate EDTA (TAE) dari Promega, dan *Diamond™ Nucleic Acid Dye*.

Pendekatan molekuler yang dilakukan pada penelitian dapat dibagi menjadi enam tahap utama, yaitu: desain primer dengan menggunakan gen 16s *M. tuberculosis*, isolasi DNA bakteri dan penentuan kuantitas dan kualitasnya, optimasi konsentrasi DNA templat, optimasi suhu penempelan, optimasi siklus *thermocycler*, dan identifikasi bakteri pada sampel klinis pasien fase konversi berupa darah.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah darah pasien TB fase konversi, yakni pasien yang telah mendapatkan pengobatan awal selama 2 bulan lalu diobservasi kembali untuk masuk ke pengobatan fase lanjutan, yang diambil dalam rentang waktu Oktober–November 2020. Jumlah seluruh sampel yang diambil pada rentang waktu tersebut adalah 17 sampel, satu sampel kontrol positif, yaitu pasien yang telah mengalami resistensi pengobatan TB, dan satu sampel kontrol negatif, yaitu pasien yang tidak memiliki penyakit TB. Subjek penelitian ini terdiri atas 8 pasien perempuan dan 9 pasien laki-laki. Sampel yang digunakan sebagai kontrol positif diambil dari pasien yang baru terdiagnosis TB dan belum melalui pengobatan fase awal, sedangkan sampel kontrol negatif diambil dari pasien yang sehat dan tidak terdiagnosis TB maupun penyakit lain. Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah: pasien TB yang telah melakukan pengobatan fase awal selama 2 bulan dan pasien TB yang belum melakukan pengobatan pada fase lanjutan. Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah: pasien TB yang sedang melakukan pengobatan pada fase awal dan pasien TB yang telah memasuki pengobatan fase lanjutan.

Perancangan primer 16s rRNA

Perancangan primer dilakukan dengan mengakses *database* nukleotida 16s rRNA *M. tuberculosis* melalui *National Center for*

Biotechnology Information (NCBI) pada laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, dengan urutan referensi dengan kode NR_102810.2. Selanjutnya, primer dipilih menggunakan *Primer-BLAST* dengan memperhatikan: 1) Panjang pasangan primer antara 18–23 basa; 2) Komposisi G dan C antara 50–60%; dan 3) Titik leleh (*melting temperature/Tm*) dalam kisaran 55–60°C dengan perbedaan antara kedua primer tidak lebih dari 5°C.

Isolasi DNA

Sebanyak 2,0–2,5 mL sampel darah setiap pasien diambil dan dipindahkan ke dalam tabung plebotomi tutup ungu yang mengandung EDTA untuk memudahkan proses pemisahan darah dengan serumnya. Lalu masing-masing sampel diinaktivasi dengan menambahkan 100 µL etanol 90% dan diupkan dalam suhu ruangan. Setelah diinaktivasi, sampel disimpan pada suhu –20°C hingga sampel digunakan dalam proses analisis.⁸ Proses ekstraksi DNA dilakukan sesuai prosedur yang diberikan dari *kit* isolasi DNA Geneaid Biotech Ltd., yakni isolasi dilakukan berdasarkan tahapan lisis sel, pemerangkapan DNA di kolom yang disediakan, pencucian, dan elusi untuk memperoleh DNA.

Pengukuran konsentrasi DNA dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis *One Drop Model* dilakukan untuk mengetahui jumlah DNA dan kemurnian DNA pada semua sampel. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Konsentrasi DNA dihitung berdasarkan persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh dari referensi peralatan tersebut. Kemurnian DNA diperoleh dengan membandingkan absorbansi sampel pada panjang gelombang 260 nm dan absorbansi sampel pada panjang gelombang 280 nm. DNA dikatakan murni apabila diperoleh nilai perbandingan antara 1,8 sampai dengan 2,0.⁹

Optimasi kondisi PCR

Penelitian ini menggunakan tiga kondisi optimasi

untuk mendapatkan hasil yang baik, yaitu: 1) Optimasi konsentrasi DNA. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi pada konsentrasi DNA 10 μmol , 5 μmol , 2.5 μmol ; 2) Optimasi siklus PCR. Optimasi variasi jumlah siklus pada penelitian ini dilakukan pada 40, 35 dan 30 siklus secara terpisah menggunakan masing-masing primer; dan 3) Optimasi Tm. Optimasi Tm dilakukan mulai suhu 58°C, 60°C, dan 62°C. Proses optimasi dilakukan secara bersamaan, dengan variasi konsentrasi secara bersamaan dijalankan dengan optimasi variasi suhu. Variasi konsentrasi dan suhu akan dioperasikan pada *thermocycler* dengan satu siklus tertentu, dilanjutkan dengan siklus berikutnya. Hasil dari semua proses tersebut selanjutnya dilakukan karakterisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 2%.

Karakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa. Sejumlah 2 gr agarosa dilarutkan dalam 100 mL *Buffer* TBE 0,5 $\times$ untuk mendapatkan larutan agarosa 2%. Campuran agarosa dan *Buffer* TBE 0,5 $\times$ dipanaskan hingga larut. Kemudian larutan agarosa dituang ke dalam cetakan dan ditunggu hingga beku. Gel yang telah beku dimasukkan ke dalam wadah elektroforesis dan direndam dalam larutan *Buffer* TBE 0,5 $\times$. Pada lubang pertama, tambahkan 3 μL DNA *leader* dimasukkan sumur yang berdekatan dengan kontrol positif dan sampel pada

lubang lain. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi menggunakan *diamond kit* dan dilakukan pembacaan dengan alat *UV-transilluminator*.

Deteksi bakteri *M. tuberculosis* pada pasien fase konversi

Deteksi bakteri dilakukan pada seluruh sampel yang ada dengan menggunakan hasil perancangan primer 16s RNA. Primer akan mengamplifikasi 16s RNA yang spesifik pada bakteri dengan kondisi optimasi konsentrasi sampel DNA, siklus, dan Tm yang telah dilakukan.

Hasil

Jumlah pasien yang menjadi subjek dalam penelitian ini adalah 17 pasien fase konversi pengobatan TB. Proses pengambilan sampel telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Kepanjen dengan No.104/S. Ket/KEPK/STIKesKPJ/X/2020. Data demografi pasien tercantum pada Tabel 1.

Kriteria yang harus dipenuhi dalam pemilihan desain primer di antaranya adalah panjang primer dengan panjang berkisar antara 18 sampai dengan 25 basa. Jumlah "G" dan "C" sebaiknya sama dengan jumlah "G" dan "C" DNA target atau persentase G

Tabel 1 Data Demografi Pasien

Karakteristik Pasien	Jumlah Pasien	Persentase (%)
Jenis Kelamin		
Laki-laki	9	52,94
Perempuan	8	47,06
Usia		
19–29 tahun	3	17,65
30–39 tahun	5	29,41
40–49 tahun	7	41,18
50–59 tahun	2	11,76
>60 tahun	0	0,00
Klasifikasi		
Tuberkulosis paru	15	88,24
Tuberkulosis ekstra paru	2	11,76

dan C sekitar 50%. Persyaratan nilai dari *product length* adalah berkisar 200 pb. *Self complementary* (SC) yang dipersyaratkan adalah $\leq 4,00$ (Handoyo dkk., 2001). Dari pasangan primer yang disediakan oleh *Primer-BLAST*, Pasangan primer yang memenuhi kriteria tersebut memiliki urutan basa *forward* 5' ACT GAG ATA GCG CCC AGA CT 3' dan *reverse* 5' TCA CGA ACA ACG CGA CAA AC 3'. Tabel 2 merupakan hasil pencarian primer menggunakan *Primer-BLAST* NCBI. Primer yang digunakan adalah primer dengan nomor urut 1, dan primer tersebut masuk dalam kriteria.

Hasil isolasi dievaluasi kemurnian dan konsentrasinya dengan melakukan pengukuran absorbansi. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Teknik pengukuran konsentrasi dan kemurnian dilakukan berdasarkan absorbansi pada pengukuran spektrofotometer. Hal ini didasarkan pada Hukum *Lambert Beer* yaitu

jumlah cahaya yang diserap pada panjang gelombang 260 nm sebanding dengan asam nukleat dalam larutan.¹⁰ Tabel 3 merupakan hasil pengukuran sampel kontrol positif.

Berdasarkan hasil pengukuran absorbansi DNA dapat dilakukan perhitungan konsentrasi DNA menggunakan persamaan kurva kalibrasi $y=0,0017x-0,0032$ sesuai dengan acuan dari *Jasco Spectrophotometer UV-Vis One Drop Model*. Panjang gelombang yang digunakan untuk perhitungan konsentrasi adalah pada 260 nm. Pada panjang gelombang tersebut DNA terabsorpsi sangat kuat. Berdasarkan data absorbansi sampel dan kontrol, dapat dilakukan perhitungan kemurnian DNA dengan membandingkan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Rasio perbandingan absorbansi tersebut merupakan indikator yang paling baik untuk analisis menggunakan PCR. Rasio antara 1,8 dan 2,0 mengindikasikan DNA murni,⁹ seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2 Hasil Pencarian Primer Menggunakan Database NCBI

No.	Pasangan Primer	Ukuran (pb)	GC (%)	SC
1	<i>Forward</i> : ACTGAGATAGCGCCAGACT	279	55,00	4,00
	<i>Reverse</i> : TCACGAACAACGCGACAAAC		50,00	4,00
2	<i>Forward</i> : GTTTGTGCGGTTGTTCTGTA	650	50,00	4,00
	<i>Reverse</i> : TAGCATGTGTGAAGCCCTGG		55,00	4,00
3	<i>Forward</i> : GGCGTGCTTAACACATGCAA	296	50,00	6,00
	<i>Reverse</i> : AGTCTGGGCCGTATCTCAGT		55,00	4,00
4	<i>Forward</i> : ACGCGAAGAACCTTACCTGG	216	55,00	4,00
	<i>Reverse</i> : CCACCTTCCTCCGAGTTGAC		60,00	5,00
5	<i>Forward</i> : AGCTCGTAGGTGGTTTGTGCG	415	55,00	4,00
	<i>Reverse</i> : CCAGGTAAGGTTCTTCGCGT		55,00	4,00
6	<i>Forward</i> : GTCAACTCGGAGGAAGGTGG	80	60,00	5,00
	<i>Reverse</i> : CGGCCATTGTAGCATGTGTGT		55,00	4,00
7	<i>Forward</i> : CGGATTGACGGTAGGTGGAG	343	60,00	3,00
	<i>Reverse</i> : GTTTACGGCGTGGACTACCA		55,00	5,00

Tabel 3 Hasil Pengukuran Absorbansi DNA pada Kontrol Positif

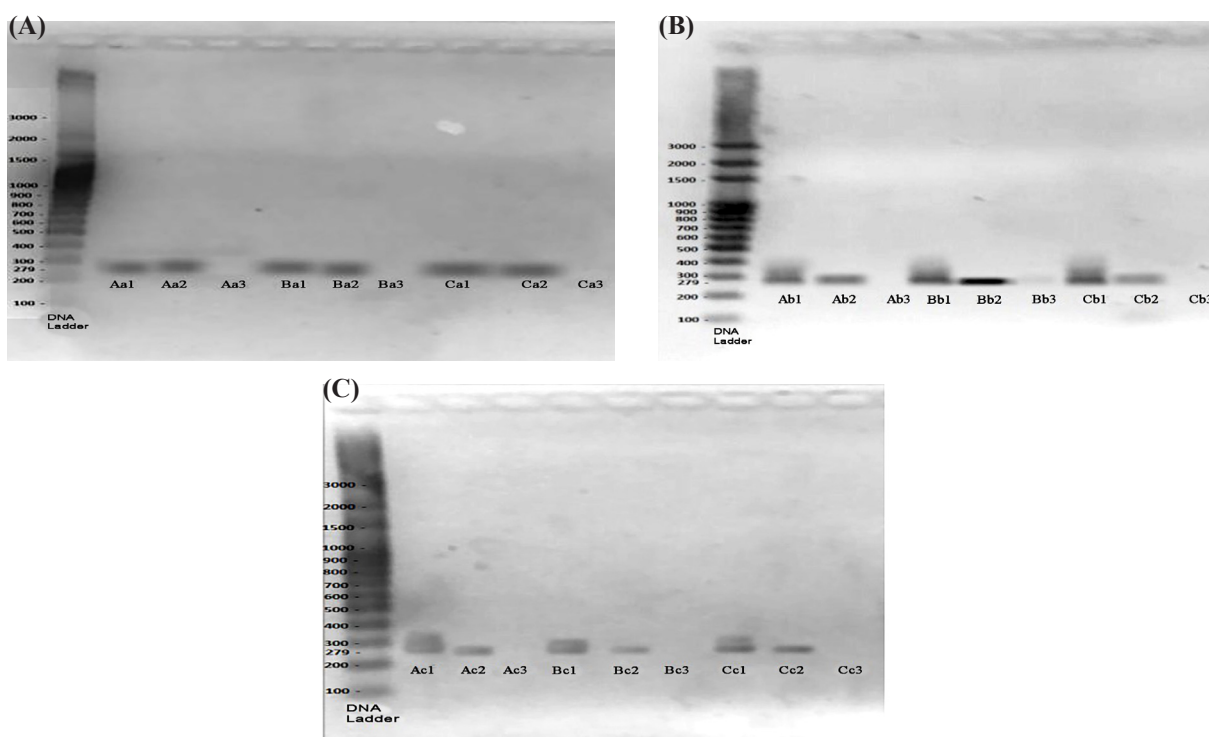
Sampel	Absorbansi pada 260 nm (A260)	Absorbansi pada 280 nm (A280)	Kemurnian DNA (A260/A280)	Konsentrasi DNA (x) ng/ μ L
Kontrol positif	1,431 $\pm$ 0,230	0,953 $\pm$ 0,098	1,496 $\pm$ 0,121	843,142 $\pm$ 135,557

Berdasarkan hasil perhitungan kemurnian DNA, diperoleh bahwa kontrol positif pada replikasi 3 memiliki kemurnian yang tinggi. Kontrol positif pada replikasi ini yang selanjutnya akan dipreparasi dengan variasi siklus (30, 35, 40), T_m (58°C, 60°C, 62°C), serta konsentrasi DNA (10 μmol , 5 μmol , 2,5 μmol). Setelah kontrol positif dengan variasi siklus, T_m , serta konsentrasi DNA disiapkan, sampel tersebut dipreparasi dengan komposisi sebagai berikut: DNA templat sebanyak 1 μL , primer *forward* dan *reverse* sejumlah 1 μL , dan air PCR sebanyak 13 μL .

Kontrol positif yang telah diamplifikasi menggunakan PCR kemudian dielektroforesis.

Hasil elektroforesis pada siklus 30, 35 dan 40 dengan variasi konsentrasi DNA dan T_m terdapat pada Gambar 1.

Berdasarkan hasil optimasi, terlihat kondisi optimal dengan munculnya pita yang identik dengan DNA *Ladder* pada siklus 35, T_m 60°C dan konsentrasi DNA 5 μmol . Pita tersebut muncul pada 279 bp sesuai dengan fragmen yang diharapkan pada T_m 60°C. Amplifikasi spesifik akan menghasilkan fragmen pada pasang basa yang diharapkan dan ini disebut dengan kondisi optimal (Phang, 2017). Kondisi optimal ini dijadikan acuan pada identifikasi *M. tuberculosis* di sampel darah pasien TB fase konversi.



Gambar 1 Hasil Elektroforesis Optimasi Siklus (A) 30, (B) 35, dan (C) 40

Keterangan Gambar 1(A): Aa1: Konsentrasi DNA (μmol) 10, T_m 58°C; Aa2: Konsentrasi DNA (μmol) 10, T_m 60°C; Aa3: Konsentrasi DNA (μmol) 10, T_m 62°C; Ba1: Konsentrasi DNA (μmol) 5, T_m 58°C; Ba2: Konsentrasi DNA (μmol) 5, T_m 60°C; Ba3: Konsentrasi DNA (μmol) 5, T_m 62°C; Ca1: Konsentrasi DNA (μmol) 2,5, T_m 58°C; Ca2: Konsentrasi DNA (μmol) 2,5, T_m 60°C; Ca3: Konsentrasi DNA (μmol) 2,5, T_m 62°C

Keterangan Gambar 1(B): Ab1: Konsentrasi DNA (μmol) 10, T_m 58°C; Ab2: Konsentrasi DNA (μmol) 10, T_m 60°C; Ab3: Konsentrasi DNA (μmol) 10, T_m 62°C; Bb1: Konsentrasi DNA (μmol) 5, T_m 58°C; Bb2: Konsentrasi DNA (μmol) 5, T_m 60°C; Bb3: Konsentrasi DNA (μmol) 5, T_m 62°C; Cb1: Konsentrasi DNA (μmol) 2,5, T_m 58°C; Cb2: Konsentrasi DNA (μmol) 2,5, T_m 60°C; Cb3: Konsentrasi DNA (μmol) 2,5, T_m 62°C

Keterangan Gambar 1(C): Ac1: Konsentrasi DNA (μmol) 10, T_m 58°C; Ac2: Konsentrasi DNA (μmol) 10, T_m 60°C; Ac3: Konsentrasi DNA (μmol) 10, T_m 62°C; Bc1: Konsentrasi DNA (μmol) 5, T_m 58°C; Bc2: Konsentrasi DNA (μmol) 5, T_m 60°C; Bc3: Konsentrasi DNA (μmol) 5, T_m 62°C; Cc1: Konsentrasi DNA (μmol) 2,5, T_m 58°C; Cc2: Konsentrasi DNA (μmol) 2,5, T_m 60°C; Cc3: Konsentrasi DNA (μmol) 2,5, T_m 62°C

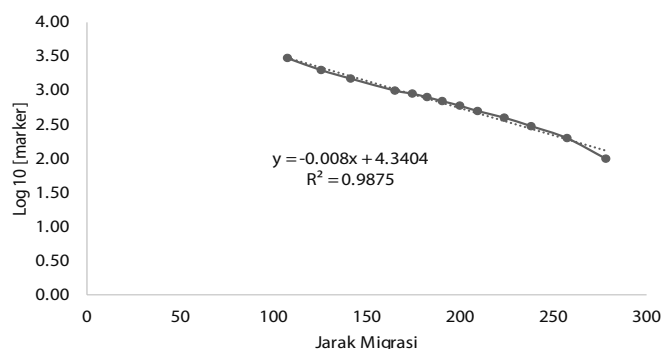
Berdasarkan evaluasi yang diperoleh dari hasil regresi linier berdasarkan *plot* logaritma ukuran *marker* (y) dan panjang jarak migrasi (x), didapatkan persamaan regresi linier $y = -0,008x + 4,3404$ dengan $R^2 = 0,9875$. Pita sampel berada pada ukuran 275,423 pb. Hasil ini dapat dilihat pada Gambar 2.

Deteksi *M. tuberculosis* ditemukan pada 17 sampel darah pasien TB fase konversi disertai dengan satu kontrol positif dan satu kontrol negatif. Proses identifikasi diawali dengan ekstraksi DNA. Hasil ekstraksi DNA yang didapat kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis One Drop Model*.

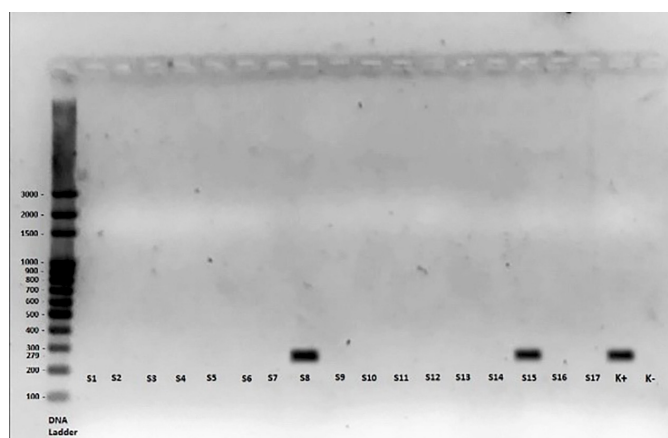
Data absorbansi sampel dan kontrol replikasi 1, 2, dan 3 digunakan pada perhitungan kemurnian DNA. Hasil ekstraksi

DNA pada sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif kemudian dipreparasi dengan menambahkan *master mix*, *forward primer*, *reverse primer*, dan air PCR. Hasil preparasi sampel lalu diamplifikasi pada PCR dan dilakukan elektroforesis. Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan *Diamond Kit* dan dilakukan pembacaan pada sinar UV. Hasil identifikasi *M. tuberculosis* pada sampel darah menggunakan metode PCR menunjukkan hasil yang sama pada semua replikasi. Pada Gambar 3, ditunjukkan munculnya pita pada 279 bp di nomor sampel 8, nomor sampel 15, serta pada kontrol positif.

Berdasarkan hasil elektroforesis sampel, kontrol positif dan kontrol negatif yang dibaca pada sinar UV terlihat adanya perpindahan DNA dari kutub negatif ke kutub positif.



Gambar 2 Perhitungan Regresi Linier Jarak Migrasi *Marker* dan Sampel



Gambar 3 Hasil Elektroforesis Sampel, Kontrol Positif, dan Kontrol Negatif

Keterangan: S1=Sampel 1, S2=Sampel 2, S3=Sampel 3, S4=Sampel 4, S5=Sampel 5, S6=Sampel 6, S7=Sampel 7, S8=Sampel 8, S9=Sampel 9, S10=Sampel 10, S11=Sampel 11, S12=Sampel 12, S13=Sampel 13, S14=Sampel 14, S15=Sampel 15, S16=Sampel 16, S17=Sampel 17, K+=Kontrol positif, K-=Kontrol negatif

Terlihat bahwa sampel nomor 8 dan nomor 15 mengalami perubahan ketebalan pita pada 279 pb. Pada 15 sampel lain dengan nomor sampel 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, dan 17 tidak terlihat ketebalan pita pada ukuran manapun. Pada sampel nomor 8 dan nomor 15, terlihat pita pada 279 pb, sehingga disimpulkan bahwa pada sampel tersebut menunjukkan hasil yang positif mengandung *M. tuberculosis*.

Pembahasan

Rancangan primer pada penelitian ini berhasil diperoleh dengan mendapatkan primer *forward* dan *reverse* dari gen 16s RNA. Pemilihan gen ini dikarenakan urutan basa nukleotida yang lestari (*conserved*) sehingga sangat identik dan spesifik untuk masing-masing spesies. Gen ini adalah gen yang paling umum digunakan dalam identifikasi dan penentuan pohon filogenetik.^{11,12} Ukuran produk hasil PCR yang dihasilkan adalah 279 pb secara teoritis dan hampir mendekati secara regresi linier, yaitu 275,423 pb. Perancangan primer dilakukan untuk membatasi amplifikasi pada urutan gen target yang spesifik. Primer yang dirancang telah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan sebagai primer yang baik seperti panjang basa sekitar 18–28 basa, konten G dan C berkisar 50–60%, dan titik leleh berkisar 50–60°C dengan perbedaan antara kedua primer tidak lebih dari 5°C.¹³ Pengujian spesifisitas dilakukan dengan mendaftarkan kembali primer yang terpilih pada *Primer-BLAST* NCBI tanpa mendaftarkan nomor registrasi gen target. Hasilnya menunjukkan primer tersebut spesifik karena menghasilkan pembacaan pada NR_102810.2 yang merupakan 16s RNA *M. tuberculosis*.

Isolasi DNA dari sampel darah juga membutuhkan evaluasi kualitas sehingga menghasilkan hasil amplifikasi yang baik. Secara umum, tingkat kemurnian DNA paling memengaruhi hasil amplifikasi menggunakan

PCR. Hasil yang bias dapat diperoleh bila PCR dilakukan dengan menggunakan tingkat kemurnian DNA yang rendah. Penentuan kemurnian dilakukan dengan melihat rasio absorbansi pada λ 260 nm dan 280 nm. Nilai yang memenuhi kriteria bila rasio diperoleh antara 1,8 hingga 2,0.^{14,15} Hasil yang diperoleh, seperti pada Tabel 2, masih menunjukkan tingkat kemurnian yang belum baik. Perlu dilakukan optimasi pada tingkat kemurnian isolasi DNA, seperti dalam proses lisis sel, pengikatan, dan pencucian dengan buffer. Konsentrasi DNA diperoleh dengan melihat nilai absorbansi pada λ 260 nm. Nilai ini dipakai untuk mendapatkan konsentrasi dengan menggunakan persamaan $y=0,0017x-0,0032$. Rentang konsentrasi yang diperoleh adalah antara 691–952 ng/ μ L. Umumnya rentang konsentrasi yang diperoleh dengan menggunakan *Nanodrop* adalah sekitar 46–216 ng/ μ L pada analisis DNA pada daging dan dapat digunakan untuk amplifikasi dengan PCR.¹⁶ Hasil yang diperoleh sudah lebih dari cukup untuk selanjutnya dilakukan amplifikasi dengan PCR.

T_m pada penelitian ini dihitung berdasarkan rumus $[2(A+T)+4(C+G)]$. Berdasarkan rumus tersebut, diperoleh T_m primer *forward* sebesar 62°C dan T_m primer *reverse* sebesar 60°C. Optimasi suhu dilakukan pada suhu 58°C, 60°C, dan 62°C.

Optimasi variasi jumlah siklus biasanya dilakukan pada 40, 35, dan 30 siklus secara terpisah dengan menggunakan masing-masing primer. Pemilihan nilai siklus ini dikarenakan umumnya rentang siklus untuk mengoperasikan metode PCR mulai dari rentang 30 hingga 40. Hasil optimasi pada variasi jumlah siklus terbaik untuk masing-masing primer adalah pada 30 siklus, selanjutnya hasil ini dipilih sebagai jumlah siklus untuk reaksi PCR yang akan dilakukan untuk evaluasi pada tahap selanjutnya.

Variasi konsentrasi primer 2,5 μ mol, 5 μ mol dan 10 μ mol didapatkan dari referensi

yang mendapatkan gambar pita/*band* yang jelas dan sesuai target. Optimasi konsentrasi DNA sangat krusial karena dibutuhkan jumlah DNA yang sesuai untuk mendapatkan hasil PCR yang maksimal. Begitu juga dengan nilai siklus dan titik leleh (T_m). Siklus dan nilai T_m yang tidak tepat dapat mengakibatkan penempelan primer pada urutan yang tidak sesuai. Ini dapat kita lihat pada produk akhir yang mana ukuran produk tidak tepat dan menimbulkan banyak pita pada hasil elektroforesis.¹⁶ Hasil bias ini yang perlu dihindari. Pembacaan hasil tidak tepat akan mengakibatkan interpretasi yang salah terhadap data klinis yang diinformasikan. Sehingga keahlian teknis dalam memperoleh data yang valid juga perlu diperhatikan selain keahlian dalam pengolahan data klinis. Pada penelitian ini hasil optimasi yang diperoleh yaitu konsentrasi DNA pada 5 μmol , dengan optimasi siklus pada 35 siklus, dan T_m 60°C. Hasil produk PCR yang diperoleh berupa pita tunggal tidak berbayang pada 279 pasang basa, yang sesuai dengan hasil *Primer-BLAST*, sedangkan perhitungan jumlah pasang basa yang dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan pendekatan regresi linier adalah 275,423 pb.

Hasil identifikasi berdasarkan 17 sampel darah pasien fase konversi menunjukkan adanya nilai positif pada 2 pasien seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 3. Hasil ini berkebalikan dengan data hasil pemeriksaan apusan dengan pewarnaan mikroskopis, yang menunjukkan bahwa seluruh pasien negatif mengandung *M. tuberculosis*. Berdasarkan hasil perhitungan, persentase jumlah sampel PCR yang negatif adalah 88,24% dan jumlah sampel yang positif adalah 11,76%. Dapat dinyatakan hal ini memenuhi target yang telah ditetapkan oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia mengenai persyaratan angka konversi sebesar 80%.² Namun, deteksi negatif secara mikroskopis pada 2 pasien yang positif dengan menggunakan PCR

akan menimbulkan masalah yang besar di kemudian hari. Hal inilah yang menyebabkan tidak terkendalinya infeksi TB lanjutan yang mengarah kepada resistensi dan menyebabkan penyebaran yang tidak terkendali. Penelitian Emma (2017) menunjukkan bahwa MDR-TB semakin menyebar dengan kecepatan transmisi yang lebih mematikan.¹⁷ Evaluasi penggunaan obat juga dapat semakin digencarkan hingga tingkat pelayanan di puskesmas karena tingkat kepatuhan sangat memengaruhi keberhasilan pengobatan pasien TB. Jika Gambar 3 dibuat dalam bentuk statistik, nilai pengujian dengan mikroskopis dan PCR tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Perlu disadari bahwa adanya nilai identifikasi yang berbeda ini sangat berisiko bagi penularan penyakit TB. Keberhasilan untuk mencapai angka konversi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya yaitu adanya kemauan dari pasien untuk sembuh dan kepatuhan dalam minum obat secara teratur hingga obat tersebut habis, adanya petugas pemantau minum obat (PMO) yang selalu mengawasi pasien dalam minum obat, serta pemerintah yang mendukung pemberantasan penyakit TB.¹⁸ Penelitian lain menyebutkan bahwa pengetahuan penderita TB BTA positif merupakan salah satu faktor internal yang memengaruhi konversi dahak pada akhir fase awal. Hal ini sama dengan yang dipaparkan Schito pada penelitiannya mengenai eradikasi TB.¹⁹ Saat ini pemeriksaan standar untuk pengobatan pada fase konversi dilakukan dengan menggunakan pewarnaan saja. Dari hasil penelitian ini, diperlihatkan bahwa pemeriksaan dengan menggunakan PCR dapat dijadikan rekomendasi di masa depan karena keakuratan hasil yang diperoleh sehingga mencegah terjadinya resistensi TB.

Simpulan

Penelitian ini telah berhasil melakukan identifikasi bakteri *M. tuberculosis* pada sampel darah pasien TB pada fase konversi.

Kondisi optimal amplifikasi yang diperoleh adalah pada siklus 35, *melting temperature* (Tm) 60°C dan konsentrasi DNA templat 5 µmol. Ukuran pita produk PCR secara teoritis adalah 279 pb dan hasil perhitungan berdasarkan regresi linier adalah 275,423 pb. Ukuran yang diperoleh tidak jauh berbeda antara teoritis dan hasil dari perhitungan regresi linier. Hasil penelitian menunjukkan adanya 2 sampel yang positif mengandung *M. tuberculosis* dari 17 sampel yang diidentifikasi, sedangkan berdasarkan data objektif pada identifikasi secara mikroskopis, tidak ada satupun sampel yang positif. Kedua sampel positif secara PCR namun negatif secara mikroskopis ini besar kemungkinan tidak dilakukan pengobatan ke fase lanjutan karena metodologi mikroskopis yang dijadikan acuan. Paparan penelitian ini diharapkan dapat dijadikan rujukan fasilitas kesehatan khususnya puskesmas untuk menyesuaikan kembali metodologi yang digunakan dalam identifikasi agen penginfeksi. Jika hal ini terjadi terus menerus, maka resistensi dan kematian akan tetap terjadi dan tidak bisa dikendalikan lagi.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada pimpinan dan staf Puskesmas Janti Malang, khususnya kepada bagian pengobatan TB.

Pendanaan

Penelitian ini didanai oleh Universitas Ma Chung melalui Skema Penelitian Ma Chung *Research Grant* 2020.

Konflik Kepentingan

Seluruh penulis yang terlibat dalam penelitian ini menyatakan tidak ada potensi konflik kepentingan terkait penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi artikel ini.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018 [Diakses pada: 7 Oktober 2019]. Tersedia dari: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274453>
2. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 67 Tahun 2016 Tentang Penanggulangan Tuberkulosis. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2016.
3. Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur. Profil kesehatan Kota Malang tahun 2017 [Diakses pada: 15 November 2019]. Tersedia dari: <https://dinkes.jatimprov.go.id/userimage/dokumen/PROFIL%20KESEHATAN%20JATIM%20TAHUN%202017.pdf>
4. Caulfield AJ, Wengenack NL. Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis.* 2016;4:33–43. doi: 10.1016/j.jctube.2016.05.005
5. Ganavalli SA, Shetty PC, Kulkarni RD, Biradar U. PCR as a diagnostic tool for extra-pulmonary tuberculosis. *J Clin Diagnostic Res.* 2013;7(6):1012–5. doi: 10.7860/JCDR/2013/5425.3075
6. Rakotosamimanana N, Rabodoarivelo MS, Palomino JC, Martin A, Razanamparany VR. Exploring tuberculosis by molecular tests on DNA isolated from smear microscopy slides. *Int J Infect Dis.* 2017;56(March):248–52. doi: 10.1016/j.ijid.2016.12.005
7. Rinanda T. Analisis sekuensing 16S rRNA di bidang mikrobiologi. *J Kedokt Syiah Kuala.* 2011;11(3):172–7.
8. Djelouagji Z, Drancourt M. Inactivation of cultured *Mycobacterium tuberculosis* organisms prior to DNA extraction. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1594–5. doi: 10.1128/JCM.44.4.1594-1595.2006
9. Olson ND, Morrow JB. DNA extract

- characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Res Notes*. 2012;5: 668. doi: 10.1186/1756-0500-5-668.
10. Koetsier G, Cantor E. A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers. *New Engl Biolab*. 2019; 1(1):1–8.
 11. Buszewski B, Rogowska A, Pomastowski P, Złoch M, Railean-Plugaru V. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *J AOAC Int*. 2017;100(6):1607–23. doi: 10.5740/jaoacint.17-0207
 12. Winand R, Bogaerts B, Hoffman S, Lefevre L, Delvoye M, Van Braekel J, et al. Targeting the 16s rRNA gene for bacterial identification in complex mixed samples: Comparative evaluation of second (Illumina) and third (Oxford Nanopore Technologies) generation sequencing technologies. *Int J Mol Sci*. 2020;21(1):298. doi: 10.3390/ijms21010298
 13. Freeland JR. The importance of molecular markers and primer design when characterizing biodiversity from environmental DNA. *Genome*. 2017;60(4):358–74. doi: 10.1139/gen-2016-0100
 14. Boesenberg-Smith KA, Pessarakli MM, Wolk DM. Assessment of DNA yield and purity: An overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clin Microbiol Newsl*. 2012;34(1):1–6. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2011.12.002
 15. Sales KGdS, Miranda DEdO, da Silva FJ, Otranto D, Figueredo LA, Dantas-Torres F. Evaluation of different storage times and preservation methods on phlebotomine sand fly DNA concentration and purity. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):1–6. doi: 10.1186/s13071-020-04270-4
 16. Yalçınkaya B, Yumbul E, Mozioglu E, Akgoz M. Comparison of DNA extraction methods for meat analysis. *Food Chem*. 2017;221:1253–7. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.032
 17. McBryde ES, Meehan MT, Doan TN, Ragonnet R, Marais BJ, Guernier V, et al. The risk of global epidemic replacement with drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Int J Infect Dis*. 2017; 56:14–20. doi: 10.1016/j.ijid.2017.01.031
 18. Ramadhani A. Pengaruh pelaksanaan pengawas menelan obat (PMO) terhadap konversi BTA (+) pada pasien tuberkulosis paru di RSDK tahun 2009/2010. *J Media Medika Muda*. 2012:1–21.
 19. Schito M, Hanna D, Zumla A. Tuberculosis eradication versus control. *Int J Infect Dis*. 2017;56:10–3. doi: 10.1016/j.ijid.2016.11.007