

Pengembangan dan Validasi *In-house* PCR (hPCR) untuk Deteksi *Mycobacterium tuberculosis*

Radita Ning Anggraeny¹, Maelita Ramdani Moeis¹, Lidya Chaidir²

¹Bioteknologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, ITB

²Unit Penelitian Kesehatan, Universitas Padjajaran

Abstrak

Latar belakang: Deteksi tuberkulosis (TB) dengan metode bakteri tahan asam (BTA) kurang sensitif, sedangkan metode kultur membutuhkan waktu yang lama. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan serta memvalidasi hPCR sebagai metode rekomendasi bagi laboratorium dalam mendeteksi TB yang mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik dibandingkan metode BTA.

Metode: 150 sampel sputum dikoleksi di bagian TB Balai Pengembangan Laboratorium Kesehatan (BPLK), Provinsi Jawa Barat. Hasil dekontaminasi sampel sputum diperiksa menggunakan metode BTA dan kultur, serta bahan yang sama disimpan di -20°C untuk aplikasi hPCR. Temperatur annealing, konsentrasi MgCl₂, Taq Polymerase, primer, serta jumlah siklus dioptimasi dalam hPCR dengan gen target hsp65, kemudian diaplikasikan pada sampel dekontaminasi sputum dengan penambahan reaksi urasil-N-glikosilase sebelum PCR untuk menghilangkan kontaminasi carry-over.

Hasil: Hasil optimasi hPCR gen target hsp65 berupa temperatur annealing 64°C, MgCl₂ 3mM, Taq Polimerase 1,5U, primer 0,25µM dan 45 siklus. Validasi melibatkan 138 sampel yang kontrol positifnya positif, dengan hasil sensitivitas dan spesifisitas PCR terhadap kultur 56,25 dan 98,89 persen, dengan limit deteksi 94 pg DNA MTb. Sensitivitas dan spesifisitas BTA terhadap kultur menunjukkan 79,17 dan 92,22 persen.

Kesimpulan: Metode hPCR yang dikembangkan kurang sensitif, sehingga tidak dapat digunakan sebagai rujukan pada pemeriksaan rutin pasien suspek TB. (*J Respir Indo. 2014; 34: 204-10*)

Kata kunci: Bakteri Tahan Asam (BTA), *in-house* PCR, kultur, *Mycobacterium tuberculosis*, sensitivitas-spesifisitas.

Development and Validation of *In-house* PCR (hPCR) for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis*

Abstract

Backgrounds: Detection of tuberculosis (TB) using Acid Fast Bacteria (AFB) method lacks sensitivity, while culture is time consuming. The purpose of this study was to develop and validate hPCR assay as the recommended method for Tb detection in the laboratory that has better sensitivity-specificity compared to AFB method.

Methods: 150 sputum samples were collected in TB section of the Health Laboratory Development Unit (BPLK), West Java. Decontaminated sputum was examined by AFB and culture methods, and these specimens were stored at -20°C for hPCR. Annealing temperature, MgCl₂, Taq Polymerase, primers and number of cycles were optimized for hPCR of hsp65 gene, then applied to decontaminated sputum samples with an added uracyl-N-glycosylase reaction before PCR to remove carry-over contamination.

Results: The optimized condition for hPCR was annealing temperature 64°C, 3mM MgCl₂, 1,5U Taq Polymerase, 0,25µM primers and 45 cycles with a limit of detection of 94pg DNA. Only 138 samples with a positive positive-control were used for validation. Compared with culture, the sensitivity and specificity were 56.25% and 98.89% for hPCR, 79.17% and 92.22% for AFB method.

Conclusions: The developed hPCR was not sensitive enough, therefore it could not be used as reference for routine test in TB suspect patients. (*J Respir Indo. 2014; 34: 204-10*)

Keywords: Acid Fast Bacteria (AFB), culture, *in-house* PCR, *Mycobacterium tuberculosis*, sensitivity-specificity.

Korespondensi: Radita Ning Anggraeny

Email: raditaninganggraeny@gmail.com; HP: 081347541764

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular berbahaya yang banyak berkembang di Indonesia. Terjadi pertambahan jumlah kasus baru sebanyak seperempat juta kasus dan diantaranya menyebabkan sekitar 140.000 kematian setiap tahun. Indonesia dikategorikan sebagai negara dengan beban penyakit TB yang tinggi dan pada tahun 2013 Indonesia termasuk dalam negara ke-4 tertinggi di dunia dengan masalah TB.¹

Pemeriksaan yang komprehensif pada pasien suspek TB dilakukan untuk dapat menegaskan diagnosis dan dugaan yang berdasar serta beralasan untuk dapat menentukan terapi pengobatan yang tepat.² Pemeriksaan mikroskopis BTA sebagai metode deteksi pasien suspek TB memiliki kekurangan yaitu sensitivitas dan spesifisitas yang rendah, sedangkan untuk kultur yang merupakan *gold standard* pemeriksaan World Health Organization (WHO), memiliki sensitivitas yang tinggi akan tetapi memiliki kekurangan dalam lamanya waktu yang diperlukan untuk mengetahui hasil.³ Diperlukan pengembangan suatu metode pemeriksaan dengan mempertimbangkan segi sensitivitas, spesifisitas, nilai dugaan positif dan nilai dugaan negatif yang cukup optimal serta dapat diterapkan sebagai acuan yang tetap (*established*).

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan serta melakukan validasi *in-house* PCR (hPCR) sebagai metode deteksi *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Metode yang diharapkan dapat dikembangkan adalah berbasis molekuler yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode PCR dapat digunakan sebagai alat uji komplemen pada pasien suspek TB. Laboratorium dengan fasilitas pendukung PCR dapat mengembangkan metode hPCR (hPCR), yaitu metode yang menyesuaikan karakteristik laboratorium tersebut dengan memberdayakan infrastruktur, tenaga, serta sumber sampel laboratorium, sehingga kecepatan dan keakuratan dalam mendeteksi *M. tuberculosis* dapat dimaksimalkan.² Melalui PCR diharapkan dapat dikembangkan suatu metode deteksi yang cepat, murah, akurat serta sensitif dan spesifik untuk

mendeteksi *M. tuberculosis*. Metode hPCR mampu menunjukkan tingginya sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan.⁴⁻¹²

Metode PCR menawarkan sensitivitas yang tinggi dengan mengamplifikasi sejumlah kecil DNA serta telah dievaluasi secara luas untuk penggunaan deteksi *M. tuberculosis*.⁴ Data terbanyak untuk target amplifikasi deteksi *M. tuberculosis* menggunakan IS6110 sebanyak 69%.⁵ Target potensial lain adalah gen pengkode protein 38-kDa, *hsp65*, 32-kDa, 16S rRNA,^{13,14} serta sebanyak 20% dari studi hPCR menggunakan dUTP-UNG sebagai faktor eliminasi *carry-over contamination*.^{5,15} Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai rekomendasi untuk metode pemeriksaan rutin bagi para klinisi dan teknisi laboratorium.

METODE

Pada perancangan primer, sekuen gen *hsp65* diambil dari database genom *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv accession number NC_000962.2 GI:57116681, anotasi *groEI*. Gen *hsp65* mengkode *heat-shock protein* berupa *molecular chaperone*. Primer dirancang dengan program <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/primertool.cgi> lalu diuji dengan DNA *M. tuberculosis* H37Rv (galur acuan).

Isolasi DNA *M. tuberculosis* H37Rv: Koloni *M. tuberculosis* H37Rv (galur acuan) dari media LJ diekstraksi dengan metode modifikasi *Cetyltrimethylammonium Bromide* (CTAB).¹⁶ Koloni dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 mL berisi 600 µL bufer TE dan diinkubasi pada 80°C selama 20 menit, kemudian suspensi didinginkan pada suhu ruang. 50 µL *lysozyme* (10 mg/mL) ditambahkan kedalam suspensi lalu *divorteks*, kemudian diinkubasi 37°C semalam (*overnight*). 10 µL *proteinase-K* (20 mg/mL, Thermo) dimasukkan kedalam suspensi, lalu 35 µL SDS 20% ditambahkan kemudian, larutan *divorteks* lalu diinkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit. Kemudian 100 µL 5 M NaCl dimasukkan dalam suspensi lalu *divorteks*. 100 µL CTAB 5%, ditambahkan pada larutan dan *divorteks* hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit. Larutan suspensi didinginkan

pada suhu ruang, lalu ditambahkan 700 µL kloroform: isoamil alkohol (24:1) dan disentrifugasi pada 12.000g selama 5 menit. Dihasilkan tiga fasa: bening, padat dan keruh. Larutan fasa bening yang mengandung DNA bakteri dipindahkan ke dalam tabung mikro baru, dan ditambahkan 360 µL isopropanol lalu dicampur dengan cara membolak-balikkan tabung. Larutan diinkubasi pada suhu -20°C selama 30 menit, lalu disentrifugasi 12.000g selama 15 menit dan dihasilkan pelet. Supernatan dibuang, lalu pelet DNA yang tersisa ditambahkan 1 mL etanol 70% dingin, dibolak balik kemudian disentrifugasi pada 12.000g selama 7 menit, dan supernatan kembali dibuang. Pelet disentrifugasi lagi pada 12.000g selama 2 menit, supernatan yang masih tersisa dibuang. Tabung mikro dibiarkan terbuka dan terbalik diatas kertas tissue pada temperatur ruang hingga pelet kering selama 10 sampai 15 menit. Pelet DNA lalu dilarutkan dengan 25-80µLTE *buffer* dan disimpan dalam temperatur ruang selama 2 jam untuk kemudian disimpan di 4°C semalam, kemudian dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer untuk mengetahui konsentrasi DNA yang terisolasi. Selanjutnya suspensi DNA *M. tuberculosis* H37Rv digunakan sebagai cetakan DNA untuk optimasi PCR serta aplikasi hPCR terhadap sampel klinis.

Sampel klinis diambil secara acak, didapatkan 228 sampel sputum dikoleksi dari pasien TB paru yang datang ke Balai Pengembangan Laboratorium Kesehatan (BPLK) Provinsi Jawa Barat, Bandung (Februari-September 2013). Sebanyak 150 sampel berasal dari sputum pasien suspek yang didiagnosis mengalami gejala klinis TB serta di antaranya melibatkan 78 sampel pasien yang telah mengalami fase pengobatan. Seluruh sampel diperiksa dengan metode BTA dan kultur LJ, serta sampel yang sama diaplikasikan terhadap hasil optimasi hPCR.

Pada tahap pemeriksaan BTA dan kultur, sampel dibuat sediaan mikroskopis kemudian diwarnai dengan metode Ziehl Neelsen (ZN) lalu diamati di bawah mikroskop binokuler perbesaran 1000X.¹⁷ Pembacaan hasil merujuk pada skala *International Union Against*

Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD).

Sampel didekontaminasi dengan NaOH 4% steril (1:1 v/w) serta dihomogenisasi menggunakan vorteks, didiamkan selama 10 menit lalu ditambahkan larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) steril hingga 45 mL dan disentrifugasi 4300 rpm (4900g) selama 15 menit. Supernatan dibuang dan sedimen dihomogenisasi dengan 400 µL PBS steril, 200 µL larutan campuran disimpan dalam tabung mikro sebagai bahan isolasi DNA dan 200 µL ditanam ke dalam media LJ. Sebanyak 200 µL PBS steril yang digunakan dari setiap *batch* koleksi disimpan didalam tabung mikro sebagai kontrol ekstraksi. Sampel sputum dan kontrol PBS hasil preparasi disimpan pada -20°C untuk kemudian dilakukan ekstraksi DNA. Kultur yang berhasil tumbuh dan diidentifikasi sebagai *M. tuberculosis* didasarkan pada kecepatan tumbuh yaitu 4 sampai 8 minggu, bentuk koloni kering seperti bunga kol dengan struktur kasar dan rapuh, berwarna *buff* atau kuning pucat.¹⁸

Pada tahap optimasi hPCR, DNA *M. tuberculosis* H37Rv konsentrasi 9,4 ng/µL digunakan sebagai bahan cetakan selama proses optimasi PCR serta kontrol positif dalam aplikasi hPCR terhadap sampel. Proses optimasi terdiri dari optimasi *annealing temperature* (Ta), konsentrasi MgCl₂, jumlah *Taq* Polymerase dan konsentrasi primer. Kemudian dilakukan penentuan limit deteksi, jumlah siklus optimal, serta melakukan aplikasi akhir dengan menambahkan faktor eliminasi *Uracil N-Glycosylase* (UNG) dalam reaksi optimasi hPCR.

Pada tahap ekstraksi DNA, sedimen hasil dekontaminasi yang telah disimpan dalam -20°C, dicairkan lalu diekstraksi dengan menggunakan Qiagen DNA mini kit pada DNA sampel, disertakan pula kontrol ekstraksi berupa PBS steril dari setiap *batch* koleksi.

Pada tahap *In-house* PCR, konsentrasi akhir serta kondisi *thermocycle* hPCR yang telah dioptimasi diimplementasikan pada DNA hasil ekstraksi sampel klinis dengan gen *hsp65* sebagai target amplifikasi. Desain setiap *batch* pengujian hPCR terdiri atas; 11 sampel, 1 kontrol ekstraksi (berisi PBS), 1 kontrol negatif ruang mix (*nuclease free water-Clean room*), 1 kontrol negatif ruang ekstraksi (pelarut akhir

ekstraksi/buffer AE-Extraction room) dan 1 kontrol positif (DNA *M. tuberculosis* H37Rv 9,4 ng/μL). Sebanyak 5 μL hasil hPCR divisualisasi dengan agarose 1,5% dalam TBE 1X (Promega), dan SYBR^{safe}2,5X (Invitrogen) serta digunakan 100bp DNA ladder (Thermo) sebagai marker. Faktor UNG berfungsi sebagai faktor eliminasi kontaminasi silang dari produk PCR (amplikon) positif dengan komposisi 1X *buffer* UNG dan 0,1 U UNG. Satu siklus aktivasi (inkubasi) UNG 37°C selama 10 menit ditambahkan pada awal proses PCR.

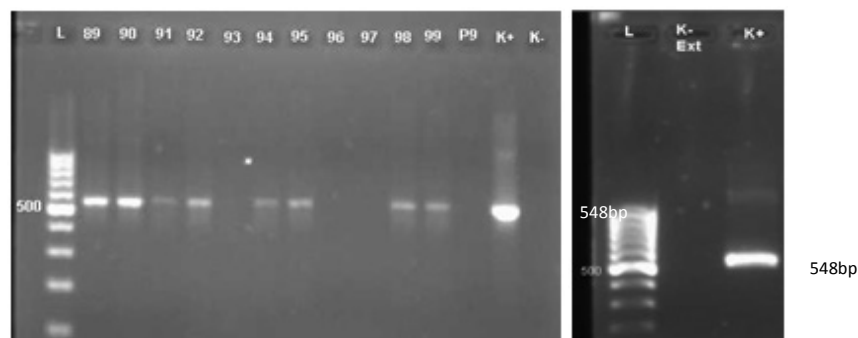
HASIL

Melalui bantuan program bioinformatik, didapatkan sepasang primer (*forward*: GTCATCGGAGCCGGTAAGCC, *reverse*: GCTTGCAA CAGCGTCACACC) yang mengamplifikasi fragmen DNA berukuran 548bp dari bagian gen *hsp65*. Dasar penggunaan gen *hsp65* adalah pada nilai

potensialnya dalam mendiferensiasi spesies *M. tuberculosis* terhadap *M. tuberculosis complex*, sehingga diharapkan gen target *hsp65* menjadi target yang spesifik.¹⁷

Optimasi hPCR

Hasil optimasi hPCR menggunakan konsentrasi akhir: 1X *bufferTaq* (Thermo); 1X *buffer* UNG (Fermentas); 0,2 mM dNTP/dUTP (Thermo); 0,25 μM primer *forward-reverse* gen *hsp65* (α-DNA); 3 mM MgCl₂ (Thermo); 1,5 U *Taq* Polymerase (Thermo); dan 0,1 U UNG (Fermentas), serta sebanyak 5 μL sampel hasil ekstraksi sebagai cetakan dalam 25 μL total volume reaksi hPCR. Limit deteksi gen *hsp65* menunjukkan 94 pg DNA *M. tuberculosis*, dengan jumlah siklus optimal sebanyak 45 siklus. *Thermocycle* PCR yang digunakan adalah: 1X 37°C, 10 menit; 1X 95°C, 10 menit; 45X 95°C, 2 menit - 64°C, 30 detik - 72°C, 1 menit; 1X 72°C, 5 menit. Kemudian kondisi PCR tersebut diaplikasikan pada setiap *batch* sampel (Gambar 1.)



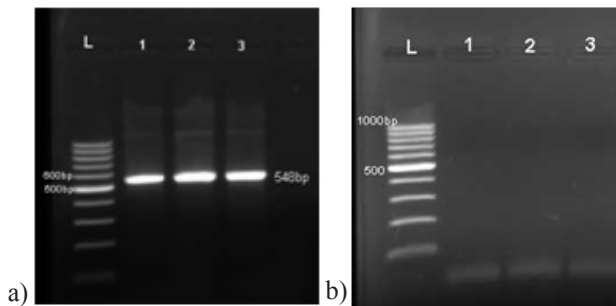
Gambar 1. Elektroferogram hPCR (gen *hsp65*) pada sampel 89-99 (*batch* 1) Positif: sampel 89, 90, 91, 92, 94, 95, 98, 99. P9: PBS sebagai kontrol ekstraksi *batch* 9. K+: Kontrol positif K-: Kontrol negatif; CR: *nuclease free water* dalam BSC *clean room*, Ext: *buffer* AE (pelarut ekstraksi) dalam ruang ekstraksi, agarose 1,5%, L: 100bp DNA ladder.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan Kultur*, BTA* dan hPCR

Tes	Pasien suspek TB				Pasien gagal pengobatan			
	Analisis per sampel		Analisis per pasien		Analisis per sampel		Analisis per pasien	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Kultur	54	95 (1)	30	49	42	24 (12)	37	28
BTA	Scanty: 6 1+ : 19 2+ : 12 3+ : 11	102	24	55	Scanty: 9 1+ : 17 2+ : 16 3+ : 10	26	44	21
hPCR	32	118	17	62	13	65	11	54
Jumlah	150 sampel		79 pasien		78 sampel		65 pasien	

* dilakukan oleh tenaga laboratorium kompeten, () NTM : Non tuberculous mycobacteria

Hasil uji UNG (Uracyl N-Glycosylase)



Gambar 2. Elektroferogram: a) amplicon 548pb (gen *hsp65*, mengandung Urasil), 1,2,3 adalah ulangan sebagai template PCR b); b) hasil PCR aplikasi UNG (template/amplicon gagal teramplifikasi), agarose 1,5%, L: 100bp DNA ladder.

Tabel 2. Analisis validasi metode *two by two* BTA vs Kultur

	Kultur Positif		Kultur Negatif		Total	
BTA Positif	38	a	7	c	45	a+c
BTA Negatif	10	b	83	d	93	b+d
Total	48	a+b	90	c+d		

a) Positif, b) Negatif palsu, c) Positif palsu, d) Negatif

Enzim UNG yang digunakan dalam hPCR mampu mengatasi kejadian *carry over contamination*, hal ini dibuktikan dengan uji berupa amplicon 548pb sebagai *template* hPCR yang menggunakan UNG. Hasil elektroferogram menunjukkan urasil pada amplicon telah terdenaturasi kemudian gagal teramplifikasi dalam proses polimerisasi (Gambar 2.).

Pemeriksaan BTA, kultur dan analisis sensitivitas hPCR

Analisis nilai sensitivitas dan spesifisitas ini digunakan untuk mengetahui apakah hasil deteksi positif terhadap MTb pada kultur (sebagai standar baku emas) sama dengan metode hPCR yang dikembangkan. Apabila hPCR menunjukkan hasil positif sedangkan kultur tidak, maka hasil tersebut dikategorikan sebagai positif palsu (jika limit deteksi hPCR dianggap sama dengan atau lebih besar dari kultur). Sebaliknya, jika hPCR menunjukkan hasil negatif sedangkan pada kultur tumbuh sesuai dengan persyaratan koloni MTb, maka hasil hPCR dianggap negatif palsu.

Analisis hPCR dilakukan pada keseluruhan sampel pasien suspek maupun pasien yang mengalami fase pengobatan. Penggunaan sampel dari pasien yang telah mengalami fase pengobatan dimaksudkan untuk mengkonfirmasi dan mendukung

hasil hPCR terhadap kultur, akan tetapi kelompok sampel dari pasien pengobatan menunjukkan hasil deteksi hPCR yang sangat kecil dibandingkan deteksi pada sampel pasien suspek TB (Tabel 2.). Diduga dalam sampel sputum pasien fase pengobatan terdapat suatu inhibitor dari hasil ekstraksi DNA-nya sehingga menghambat deteksi gen target pada hPCR, yang seharusnya dapat lebih ditegaskan dengan penggunaan kontrol internal.

Sehingga pada analisis validasi ditetapkan hanya dibatasi berasal dari sampel pasien suspek TB saja, dengan hasil hPCR dari *batch* yang sesuai yaitu saat kontrol positif menunjukkan pita amplifikasi 548pb dan kontrol negatif tidak menunjukkan pita maupun kontaminan pada hasil elektroferogram. Kemudian data hasil pemeriksaan BTA vs kultur dan hPCR vs kultur, dianalisis serta diformulasikan ke dalam tabel *two by two* untuk mendapatkan perhitungan validasi.

PEMBAHASAN

Secara teori, dengan performa yang baik PCR mampu mengamplifikasi bahkan satu *copy* DNA. Pada penelitian ini dihasilkan performa hPCR untuk diagnosis TB yaitu deteksi *M. tuberculosis* (MTb) pada sampel sputum pasien suspek tidak konsisten dengan hasil studi serupa yang telah dipublikasikan. Hal ini diduga oleh beberapa penyebab, yaitu limit deteksi gen *hsp65* dari *assay* yang dibangun ini cukup tinggi yaitu 94 pg, mengakibatkan kemungkinan hPCR tidak mampu mendeteksi jumlah DNA MTb yang sangat sedikit pada sampel. Penyebab lainnya diduga pengaruh dari masa simpan sampel yang dapat mengurangi jumlah DNA viabel untuk bahan hPCR, serta diduga terdapat penghambat dalam reaksi hPCR yang terkandung dalam hasil isolasi DNA sampel yang berasal dari proses dekontaminasi.

Analisis setiap pasien juga dilakukan pada penelitian ini, yaitu didasarkan atas kebutuhan laboratorium pemeriksaan dalam menyimpulkan hasil setiap pasien baik dengan sampel tunggal maupun ulangan. Dalam analisis setiap pasien ini, aturan asumsi diperlakukan sama pada setiap pemeriksaan. Sebagai gambaran, 150 sampel sputum berasal dari

Tabel 3. Analisis validasi metode *two by two* hPCR vs Kultur

	Kultur Positif	Kultur Negatif	Total	
PCR Positif	27	1	28	a+c
PCR Negatif	21	89	110	b+d
Total	48	90		

a) Positif, b) Negatif palsu, c) Positif palsu, d) Negatif

Tabel 4. Sensitivitas, Spesifisitas, uji pemeriksaan dengan metode baku emas

Uji	Baku	Sen(%)	Spe(%)	PPV (%)	NPV (%)
BTA	Kultur	79,17	92,22	84,44	89,25
hPCR	Kultur	56,25	98,89	96,43	80,91

Sen: Sensitivitas, Spe: Spesifisitas, PPV: *Positive Predictive Value*, NPV: *Negative Predictive Value* Perhitungan untuk mendapatkan nilai sensitivitas = $a/a+b$; nilai spesifisitas = $c/c+d$; PPV = $a/a+c$ dan NPV = $d/b+d$, (dalam persentase).^{19,20}

79 pasien suspek TB dengan variasi setiap pasien mengirimkan satu hingga tiga sampel untuk diperiksa. Hasil positif suatu pemeriksaan dari salah satu sampel akan memberikan kesimpulan positif pada pemeriksaan analisis setiap pasien tersebut. Berbeda dengan analisis per sampel, analisis setiap pasien ini menyertakan keseluruhan sampel pasien suspek TB termasuk pada hasil hPCR *batch* yang tidak memunculkan kontrol positif, tetapi sampel dalam *batch* menunjukkan hasil amplifikasi pada 548pb, hal ini berkaitan dengan efisiensi pemeriksaan PCR.

Hasil analisis setiap pasien suspek TB yang dituangkan ke dalam metode validasi memberikan nilai berupa sensitivitas, spesifisitas, *positive predictive value* (PPV) dan *negative predictive value* (NPV) sedikit lebih rendah dari hasil validasi analisis per sampel-nya. Pada analisis per pasien ini dapat ditemukan 2 pasien dengan BTA negatif, tetapi menghasilkan hPCR yang positif. Pada awalnya letak komplemen hPCR terhadap hasil BTA negatif diharapkan lebih banyak terjadi, dimana metode BTA dilakukan sebagai skrining awal. Jika BTA memberikan hasil negatif disamping gejala klinis yang menunjang pada pasien suspek TB maka alternatif hPCR dapat berperan dalam menunggu hasil kultur yang cukup lama. Disebabkan oleh limit deteksi hPCR yang dibangun lebih tinggi dibandingkan metode BTA, penggunaan pemeriksaan hPCR akhirnya kurang efektif untuk dilakukan. Metode hPCR ini dapat membantu menegaskan diagnosis TB pada pasien suspek dalam hal spesifisitas yang tinggi untuk mengatasi isu pengobatan yang tidak

tepat pada pasien. Pentingnya isu pengobatan yang tepat pada pasien suspek TB sangat berpengaruh pada kualitas hidup dan kesehatan pasien itu sendiri.

Kerangka ekonomi yang awal mula dibawa untuk membangun metode hPCR ini ternyata tidak dapat memberikan hasil sensitivitas yang cukup baik, yaitu dalam mendeteksi *M. tuberculosis* dalam sampel. Pemilihan produk komponen reagen PCR yang ditentukan dari kerangka awal, ternyata berpengaruh terhadap hasil kerja dan deteksi hPCR. Sensitivitas hPCR yang dikembangkan dalam mendeteksi *M. tuberculosis* terhadap kultur lebih rendah dibandingkan metode pemeriksaan BTA terhadap kultur, yaitu 56,25%. Akan tetapi nilai spesifisitas hPCR menunjukkan 79,17%, jauh lebih tinggi dibandingkan metode BTA. Metode hPCR mampu meningkatkan spesifisitas deteksi MTb dibandingkan metode BTA. Nilai PPV pada metode hPCR menunjukkan bahwa dengan hasil test positif, dugaan sampel dalam analisis terinfeksi TB sebesar 96,43%, sedangkan dengan nilai NPV menunjukkan bahwa dengan hasil tes negatif, kemungkinan sampel dalam analisis tidak menderita TB sebesar 80,91%.

KESIMPULAN

Metode hPCR yang dikembangkan sudah cukup baik pada nilai spesifisitasnya dalam mendeteksi *M. tuberculosis* pada sampel pasien suspek TB dibandingkan dengan pemeriksaan BTA, akan tetapi kurang sensitif dalam mendeteksi *M. tuberculosis* dalam sampel, dan tidak disarankan sebagai rujukan pada pemeriksaan rutin. Hal ini disebabkan rendahnya kemampuan deteksi metode terhadap DNA *M. tuberculosis* yang terdapat pada sampel. Untuk pengembangan hPCR kedepan disarankan menggunakan metode *Realtime* PCR (qPCR) dengan konstruk primer yang sama, atau menggunakan tahapan amplifikasi *whole-genome* *M. tuberculosis* sebelum menggunakan target gen *hsp65*, untuk mengatasi sedikitnya DNA *M. tuberculosis* pada sampel serta menggunakan internal kontrol sebagai kontrol ekstraksi dan proses PCR.

DAFTAR PUSTAKA

1. World of Health Organization. *Global Tuberculosis Report*. [Online]. 2013 [cited 2013 Februari 11]; Available from: URL: http://www.apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf.

2. Aditama TY. Penguatan laboratorium pengendalian tuberkulosis, Rencana Aksi Nasional Stop TB, Kementerian Kesehatan RI. Dirjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. 2011.
3. Putra IWA, Surjanto E, Suradi, Aditama TY. Nilai diagnostik pemeriksaan reaksi rantai polimerase pada tuberkulosis paru sputum basil tahan asam negatif. *J Respir Indo*. 2008;28(3):136-43.
4. Kulkarni S, Singh P, Memon A, Nataraj G, Kanade S, Kelkar R, et al. An in-house multiplex PCR assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*, its validation and comparison with a single target TB-PCR kit. *Indian J Med Res*. 2012;135(5):788-94.
5. Greco S, Rulli M, Girardini E, Piersimoni C, Saltini C. Diagnostic accuracy of in-house pcr for pulmonary tuberculosis in smear positive patients : meta-analysis and meta-regression. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):569-76.
6. Forbes BA, Hicks KES. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in clinical laboratory by PCR. *J Clin Microbiol*. 1993;31(7):1688-94.
7. Eing BR, Becker A, Sohns A, Ringelmann R. Comparison of roche cobas amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with in-house PCR and culture for detection of *M. Tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1998;36(7):20.
8. Gouveia ACC, Eisenach KD, Vinhas SA, Ribeiro FKC, Peres RL, Dietze R, et al. Use of in-house PCR for identification of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC broth cultures of respiratory specimens. *Mem InsOswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2008;103(4):386-91.
9. Muhumuza J, Asimwe BB, Kayes S, Mugenyi P, Whalen C, Mugerwa RD, et al. Introduction of an in-house PCR for routine identification of *M. tuberculosis* in a low-income country. *Int J Tuberculosis Lung Dis*. 2006;10(11):1262-7.
10. Kaul KL. Molecular Detection of *Mycobacterium tuberculosis* impact on patient care. *ClinChem*. 2001;47(8):1553-8.
11. Scherer LC, Sperhake RD, Ruffino-Netto A, Rossetti ML, Vater C, Klatser P, Kritski AL. Cost-effectiveness analysis of PCR for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 2009;9:216.
12. Schirm L, Oostendorp LAB, Muldr JG. Comparison of Amplicor, In-House PCR and conventional culture for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 1995;33(12):3221-4.
13. Negi SS, Anand R, Pasha ST, Gupta S, Basir SF, Khare S. diagnostic potential of IS6110, 38Kda, 65Kda and 85B sequence-based polymerase chain reaction in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Indian J Med Microbiol*. 2007;25(1):43-9.
14. Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim M, Bai GH, Park YG. Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:1649-56.
15. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymeration chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8.
16. Almeida IN, Carvalho WS, Rossetti ML, Costa ERD, Miranda SS. Evaluation of six different DNA extraction method for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6110: Preliminary study. *BMC Res Notes*. 2013;6:561.
17. Rie AV, Fitzgerald D, Kabuya G, Deun AV, Tabala M, Jarret N et al. Sputum smear microscopy: evaluation of impact of training, microscope distribution, and use of external quality assessment guidelines for resource-poor settings. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(3):897-901.
18. Supriyanto. Petunjuk Teknis Pemeriksaan Biakan, Identifikasi dan Uji Kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* pada media padat. Kementerian Kesehatan RI, Dirjen Bina Upaya Kesehatan, Dirjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. 2012. p.54-5.
19. Akobeng AK. Understanding diagnostic test 1: sensitivity, specifity and predictive values. *Acta Paediatrica*. 2006;96:338-41.
20. Banoo S, Bell D, Bossvyt P, Herring A, Mabey D, Poole F, et al. Evaluating of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. The TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel-Evaluating Diagnostics. *Nature Rev Microbiol*. 2010. p.S17-S27.