

## ANALISIS MOLEKULER SEKUENS DNA IS6110 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DI DARAH DENGAN TEKNIK PCR

Ria Khoirunnisa Apriyan<sup>1\*</sup>

Program Studi D3-Teknologi Bank Darah, Fakultas Kesehatan dan Teknik, Universitas Bandung<sup>1</sup>

\*Corresponding Author : ria.khoirunnisa.19@gmail.com

### ABSTRAK

TBC merupakan penyakit infeksi *Mycobacterium tuberculosis* secara kronis, sehingga deteksi cepat berdampak positif pada pengobatannya. Salah satu metode diagnostik molekuler TBC adalah amplifikasi PCR terhadap DNA *M.tuberculosis*. Melalui metode ini, maka *M.tuberculosis* penyebab TBC dapat dideteksi dalam waktu <24 jam dan memberikan hasil akurat dengan sensitivitas 55-90% dan spesifitas ±99%. Penelitian dilakukan di Laboratorium *Sandia Biotech Diagnostic Centre*, Rumah Sakit Santosa Bandung pada Juni-Agustus 2024. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan *M.tuberculosis* penyebab TBC melalui penanda sekuen DNA IS6110 pada sampel darah dengan teknik PCR sebagai perangkat diagnostik molekuler. Jenis penelitian menggunakan desain deskriptif eksperimental laboratorik. Teknik pengambilan sampel adalah *simple random sampling*, jumlah populasi 100 spesimen darah suspek TBC. Dari 100 populasi, digunakan 20 sampel darah yang memiliki kemurnian DNA dengan nilai rasio absorbansi ( $\lambda 260\text{nm}/\lambda 230\text{nm}$ ) = 2,0-2,2. Tahapannya meliputi pengambilan sampel darah suspek TBC; isolasi DNA; mengukur kemurnian DNA; amplifikasi PCR pada sekuen DNA sampel, kontrol negatif, dan kontrol positif; dan elektroforesis DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa analisis molekuler sekuen DNA IS6110 pada *M.tuberculosis* dengan teknik PCR menggunakan *primer forward* T4 dan *primer reverse* T5 mampu mengapit, mengenali, dan mengamplifikasi sekuen IS6110 menjadi pita DNA berukuran 123bp pada sampel darah suspek TBC. Dari 20 sampel darah suspek TBC yang diuji, 15 sampel (75%) membentuk sekuen IS6110 menjadi pita DNA berukuran 123bp, dan 5 sampel (25%) tidak menunjukkan terbentuknya sekuen IS6110 menjadi pita DNA 123bp.

**Kata kunci** : darah, *mycobacterium tuberculosis*, PCR, sekuen DNA IS6110, TBC

### ABSTRACT

*TB is a chronic infection of Mycobacterium tuberculosis, so early detection has a positive impact on its treatment. One of the molecular diagnostic methods for TB is PCR amplification of M. tuberculosis DNA. Through this method, M. tuberculosis which causes TB can be detected within <24 hours and provides accurate results with a sensitivity of 55-90% and a specificity of ±99%. The study was conducted at the Sandia Biotech Diagnostic Center Laboratory, Santosa Hospital, Bandung in June-August 2024. This study aims to detect the presence of M. tuberculosis which causes TB through the IS6110 DNA sequence marker in blood samples using the PCR technique as a molecular diagnostic tool. This type of research uses a descriptive experimental laboratory design. The sampling technique is simple random sampling, the population is 100 blood specimens of suspected TB. Of the 100 populations, 20 blood samples were used that had DNA purity with an absorbance ratio value ( $\lambda 260\text{nm}/\lambda 230\text{nm}$ ) = 2.0-2.2. The stages include taking blood samples from TB suspects; DNA isolation; measuring DNA purity; PCR amplifying sample DNA sequences, negative controls, and positive controls; and DNA electrophoresis. The results showed that molecular analysis of the IS6110 DNA sequence in M. tuberculosis using the PCR technique using the T4 forward primer and T5 reverse primer was able to flank, recognize, and amplify the IS6110 sequence into a 123bp DNA band in blood samples of TB suspects. Of the 20 blood samples of TB suspects tested, 15 samples (75%) formed the IS6110 sequence into a 123bp DNA band, and 5 samples (25%) did not show the formation of the IS6110 sequence into a 123bp DNA band.*

**Keywords** : blood, IS6110 DNA sequence, *mycobacterium tuberculosis*, PCR, TB

## PENDAHULUAN

*Mycobacterium tuberculosis* telah menginfeksi sepertiga penduduk dunia. Menurut WHO sekitar 8 juta penduduk dunia terserang TBC dengan kematian 2,5 juta orang per tahun. Diperkirakan 95% penderita TB berada di negara-negara berkembang. Tuberkulosis (TBC) adalah satu diantara 10 penyebab kematian tertinggi secara global dan penyebab kematian utama oleh agen infeksius (Hartiyah, L., Rahmiati, & Santoyo, D.D., 2023). Di dunia diperkirakan 10,6 juta (rentang 9,8-11,3 juta) orang menderita penyakit TBC; 1,4 juta (rentang 1,3-1,5 juta) mengalami kematian akibat TBC dengan HIV negatif; dan 187.000 (rentang 158.000-218.000) mengalami kematian dengan HIV positif (Nurhalisah *et.al.*, 2023). Menurut TBC report tahun 2023, estimasi kasus TBC meningkat menjadi 1.060.000 kasus baru per tahun. Angka kematian mencapai 134 ribu per tahun. Penemuan kasus di Indonesia meningkat tinggi pada tahun 2023 dan penderita TBC sebanyak 820.789 kasus yang ditemukan dari estimasi 1.060.000 kasus (Kementerian Kesehatan RI, 2023).

TBC adalah suatu penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *M.tuberculosis* yang dapat merusak paru-paru. Selain itu, penyakit TBC juga dapat menyerang sistem saraf sentral (meningitis, sistem limfatisik, sistem sirkulasi), sistem genitourinaria, tulang dan sendi (Kyaw *et.al.*, 2018). Penyakit TBC biasanya menular melalui udara yang tercemar dengan bakteri *M.tuberculosis* yang dilepaskan pada saat penderita TBC batuk, dan pada anak-anak sumber infeksi umumnya berasal dari penderita TBC dewasa. Bakteri ini bila sering masuk dan terkumpul di dalam paru-paru akan berkembang biak (terutama pada orang dengan daya tahan tubuh yang rendah), dan dapat menyebar melalui pembuluh darah atau kelenjar getah bening (Kristini *et.al.*, 2020). Oleh sebab itu infeksi TBC dapat menginfeksi hampir seluruh organ tubuh seperti paru-paru, otak, ginjal, saluran pencernaan, tulang, kelenjar getah bening, dan lain-lain, meskipun demikian organ tubuh yang paling sering terkena yaitu paru-paru (Irianti, T., Kuswandi, Yasin, N.M., & Kusumaningtyas, 2016.).

Risiko penularan setiap tahun (*Annual Risk of Tuberculosis Infection = ARTI*) di Indonesia dianggap cukup tinggi dan bervariasi antara 1 - 2 %. Pada daerah dengan ARTI sebesar 1 %, berarti setiap tahun diantara 1000 penduduk, 10 orang akan terinfeksi. Sebagian besar dari orang yang terinfeksi tidak akan menjadi penderita TBC, hanya 10 % dari yang terinfeksi yang akan menjadi penderita TBC. Dari keterangan tersebut diatas, dapat diperkirakan bahwa daerah dengan ARTI 1 %, maka diantara 100.000 penduduk rata-rata terjadi 100 penderita tuberkulosis setiap tahun, dimana 50% penderita adalah positif. Faktor yang mempengaruhi kemungkinan seseorang menjadi penderita TBC adalah daya tahan tubuh yang rendah, diantaranya karena gizi buruk atau HIV/AIDS (Angelia *et.al.*, 2020).

Penyakit TBC dikenal sebagai penyakit menular akibat infeksi bakteri patogen yang berkembang dalam jangka waktu lama sehingga semakin cepat deteksi dilakukan maka akan semakin baik pula kemungkinan pengobatannya. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan metode deteksi atau diagnostik yang lebih cepat dan lebih spesifik dibandingkan uji yang selama ini dilakukan secara konvensional. Salah satu metode diagnostik molekuler TBC adalah menggunakan alat dan prinsip amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) terhadap *Deoxyribose Nucleic Acid* (DNA) *M.tuberculosis* penyebab penyakit TBC. Dengan menggunakan metode ini, maka *M.tuberculosis* penyebab penyakit TBC dapat dideteksi dalam waktu kurang dari 24 jam dan memberikan hasil yang akurat dengan sensitivitas 55-90% dan spesifitas sekitar 99% (Jawetz *et.al.*, 2013).

Beberapa penelitian para ahli menjelaskan ESAT-6 dan CPF-10 bagian dari EXS-1 adalah gen penyebab virulensi utama dari *M.tuberculosis* (Kurniati *et.al.*, 2019). Selain itu gen IS6110 digunakan untuk menentukan genotip dari *M. tuberculosis* (Caulfield, A.J., & Wengenack, N.L., 2016). Analisis molekuler TBC menggunakan metode PCR terhadap

DNA *M.tuberculosis*, salah satunya menggunakan penanda sekuens DNA IS6110. Banyak salinan sekuens sisipan 6110 terdapat di dalam kromosom sebagian besar galur *M.tuberculosis*, dan sekuens ini ditemukan di berbagai tempat. IS6110 spesifik untuk *M.tuberculosis* dapat digunakan untuk diagnosis, karena adanya sel *M.tuberculosis* dalam sampel. Oleh karena itu, deteksi IS6110 dengan metode PCR dianggap sebagai penanda molekuler yang berguna untuk analisis molekuler *M.tuberculosis* (Rezeki *et.al.*, 2014; Kyaw *et.al.*, 2018).

Penelitian sebelumnya yang terkait dilakukan oleh Kabir *et.al.*, (2018) menggambarkan uji PCR menggunakan penanda DNA spesifik M.tuberculosis diantaranya penanda gen hsp 65 (165bp), penanda dnaJ (365bp), dan penanda sekuen DNA IS6110 (541bp). Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh McNerney *et.al.* (2012), menyebutkan bahwa primer T4 dan T5 yang digunakan terhadap sampel sputum suspek TBC, akan mengamplifikasi secara spesifik sebagian dari IS6110 membentuk sebuah pita dengan ukuran 123bp. Menurut Barcelos *et.al.*, (2008) menjelaskan bahwa fragmen DNA IS6110 yang dapat dianalisis biasanya mempunyai panjang basa <500 bp, oleh karena lebih mudah berfragmentasi. Penelitian Singh *et.al.*, (2006) melaporkan bahwa hanya beberapa strain *M. tuberculosis* yang tidak mengandung gen IS6110 sehingga dapat mengurangi sensitivitas multiplex RT-PCR dan menyebabkan hasil negatif palsu jika hanya menggunakan gen IS6110. Gen IS6110 dan MPB64 digunakan bersama-sama untuk meningkatkan sensitivitas multiplex RTPCR. Menurut Pan *et.al.*, (2008) kegagalan amplifikasi gen IS6110 dapat disebabkan karena tidak terdapatnya copy IS6110 dalam *M.tuberculosis*, walaupun *M.tuberculosis* yang tidak memiliki IS6110 jumlahnya sedikit.

Penelitian yang relevan dengan anilisis molekuler sekuen DNA IS6110 pada *M.tuberculosis*, dilakukan sebelumnya oleh Umaya, E.R., (2022), memberikan hasil bahwa *gen insertion sequens* (IS) 6110 sebagai penanda TBC gastrointestinal (TBGI), terdeteksi pada 103 sampel jaringan biopsi dengan gejala klinis TBGI. Menurut hasil penelitian tersebut, uji TaqMan qPCR mampu menjadi salah satu alat uji diagnosis pendukung pada penanganan TBGI. Penelitian yang dikemukakan oleh Samosir (2020), menjelaskan metode multiplex PCR dengan gen target ESAT6, IS6110, dan MPT64 dan memancarkan potensi sampel urin sebagai spesimen alternatif diagnosis TBC. Metode multiplex PCR dengan spesimen urin dapat menjadi petunjuk pada kasus TB non-paru dan populasi yang tidak dapat mengeluarkan sputum berkualitas. Penelitian lain oleh Amin *et.al* (2011), menyebutkan yaitu terdapat 356 sampel ditemukan positif TB dengan menggunakan PCR, diantaranya serum (4,8%), darah (36,3%), urine (46.6%), cerebro spinal fluid (CSF) (42.1%), ascetic fluid (67.6%), pleural fluid (52%), pericardial fluid (30%), pus (38.6%), bone marrow (60%), sputum (38.8%) dan bronchoalveolar lavage (BAL) (70%). Penelitian mengenai anilisis molekuler sekuen DNA IS6110 *M.tuberculosis* di darah dengan teknik PCR penting dilakukan sebagai sampel pilihan dalam diagnosis TBC terutama pada suspek yang tidak memiliki sputum berkualitas.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan *M.tuberculosis* penyebab TBC melalui penanda sekuen DNA IS6110 pada sampel darah secara tepat dan cepat dengan menggunakan teknik PCR sebagai perangkat diagnostik molekuler.

## METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Sandia Biotech Diagnostic Centre* (SBDC) Rumah Sakit Santosa, Bandung pada rentang waktu Juni-Agustus 2024. Jenis penelitian menggunakan desain deskriptif eksperimental laboratorik (Sani, K., & Fathnur, 2016). Teknik pengambilan sampel yang dilakukan *simple random sampling* (Sugiyono, 2019), dengan jumlah populasi 100 spesimen darah suspek TBC. Dari 100 total populasi spesimen

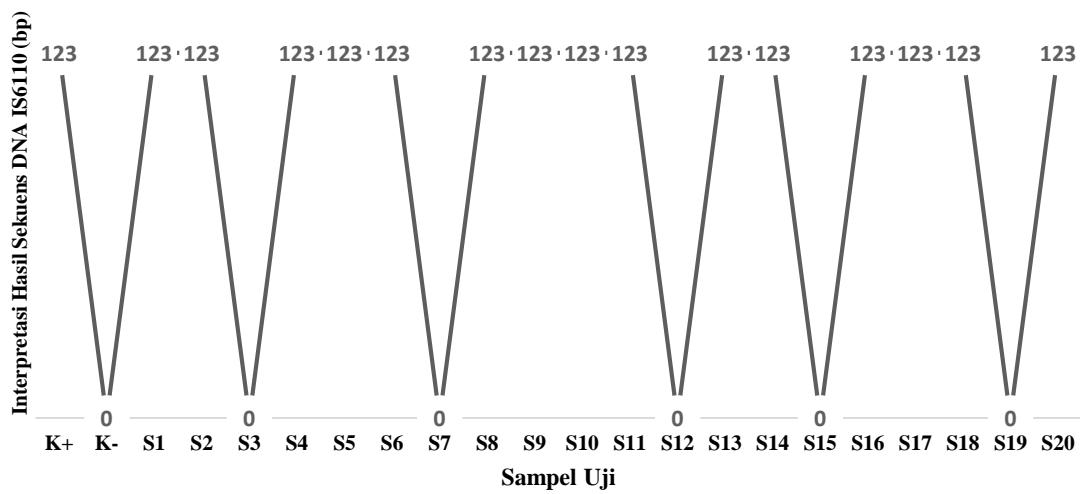
darah suspek TBC, digunakan 20 sampel darah suspek TBC yang memiliki kemurnian DNA dengan nilai rasio absorbansi ( $\lambda 260\text{nm}/\lambda 230\text{nm}$ ) = 2,0-2,2 (Sophian, A & Yustina, 2022).

Tahap pertama untuk diagnosis molekuler *M.tuberculosis* adalah pengambilan sampel darah sebanyak 500-1000 $\mu\text{l}$ . Tahap kedua adalah isolasi DNA dari sampel darah dan sampel kontrol positif. DNA diisolasi dengan menggunakan *High-Pure PCR template Preparation Kit*. Metode yang digunakan berdasarkan buku manual kit tersebut, yaitu isolasi asam nukleat dari keseluruhan darah manusia, sel darah putih, atau kultur sel. Tahap ketiga adalah menjalankan PCR dari 20 sampel darah, sampel kontrol positif dan sampel kontrol negatif. Tahapan ini dilakukan dengan mencampurkan 1 $\mu\text{l}$  *primer forward* MT-1, 1 $\mu\text{l}$  *primer reverse* MT-2, 12,5 $\mu\text{l}$  *master mix* ke dalam masing-masing tabung mikro 1,5 ml yang terdiri atas 20 tabung mikro sampel uji (S<sub>1</sub>-S<sub>20</sub>) masing-masing berisi isolat DNA murni 10,5 $\mu\text{l}$ , tabung mikro kontrol positif (K+) berisi sampel 2 $\mu\text{l}$ +ddH<sub>2</sub>O 8,5 $\mu\text{l}$ , dan tabung mikro kontrol negatif (K-) berisi ddH<sub>2</sub>O 10,5 $\mu\text{l}$ . Semua tabung mikro tersebut diketuk-ketukkan dengan jari dan disentrifugasi dengan kecepatan 5600 rcf selama 2 menit pada suhu 4°C. Tahap keempat adalah Elektroforesis DNA (Caulfield, A.J., & Wengenack, N.L., 2016).

## HASIL

**Tabel 1. Interpretasi Hasil PCR Konfirmasi Dari Sekuen DNA IS6110 *Mycobacterium Tuberculosis* Penyebab TBC**

No	Sampel Uji	Interpretasi Hasil sekuen DNA IS6110		
		Positif TBC		Negatif TBC
1	Kontrol positif (K+)	Pita DNA (+IS6110)	123bp	-
2	Kontrol negatif (K-)	-		Pita DNA0 (-IS6110)
3	S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>4</sub> , S <sub>5</sub> , S <sub>6</sub> , S <sub>8</sub> , S <sub>9</sub> , S <sub>10</sub> , S <sub>11</sub> , S <sub>13</sub> , S <sub>14</sub> , S <sub>16</sub> , S <sub>17</sub> , S <sub>18</sub> , S <sub>20</sub>	Pita DNA (+IS6110)	123bp	-
5	S <sub>3</sub> , S <sub>7</sub> , S <sub>12</sub> , S <sub>15</sub> , S <sub>19</sub>	-		Pita DNA0 (-IS6110)



**Gambar 1. Grafik Hubungan antara Sampel Uji dengan Interpretasi Hasil PCR Konfirmasi Dari Sekuen DNA IS6110 (bp) *Mycobacterium tuberculosis* Penyebab TBC**

Analisis molekuler *Mycobacterium tuberculosis* dengan teknik PCR menggunakan primer khusus, yaitu *primer forward* T4 dan *primer reverse* T5. Primer tersebut akan mengapit, mengenali, dan mengamplifikasi sebagian sekuen IS6110 menjadi pita DNA berukuran 123bp yang ditunjukkan pada Tabel 1. Berdasarkan data pada Tabel 1, dapat

disimpulkan bahwa dari 20 sampel darah suspek TBC yang diuji, 15 sampel darah suspek TBC membentuk sebagian sekuen IS6110 menjadi pita DNA berukuran 123bp, sedangkan 5 sampel darah suspek TBC sisanya tidak menunjukkan terbentuknya sekuen IS6110 menjadi pita DNA 123bp. Terbentuknya sebagian sekuen IS6110 berukuran 123bp, menunjukkan adanya sel *M.tuberculosis* dalam sampel, yang menunjukkan hasil seluruh sampel positif TBC.

## PEMBAHASAN

Berdasarkan diagnostik molekuler *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan metode amplifikasi PCR, tahapan awal yang dilakukan adalah isolasi DNA dari sampel pasien. Isolasi DNA dilakukan untuk memperoleh DNA sebaik mungkin dari sampel yang akan diamplifikasi melalui metode PCR. Menurut Dewanta & Muslih (2021), Kualitas DNA yang baik memiliki kemurnian dengan nilai rasio absorbansi ( $\lambda 260\text{nm}/\lambda 230\text{nm}$ ) = 2,0-2,2. Sehingga pada penelitian ini, diambil 20 dari 100 sampel darah uji suspek TBC yang memiliki kemurnian DNA dengan nilai rasio absorbansi ( $\lambda 260\text{nm}/\lambda 230\text{nm}$ ) = 2,0-2,2 yang menunjukkan kualitas DNA yang baik untuk selanjutnya diuji menggunakan metode amplifikasi PCR (Sophian, A & Yustina, 2022).

Penelitian mengenai analisis molekuler sekuen DNA IS6110 *M.tuberculosis* dengan teknik PCR menggunakan sampel darah sebagai sampel pilihan dalam diagnosis TBC terutama pada suspek yang tidak memiliki sputum berkualitas. Terdapat penelitian sebelumnya terkait uji diagnostik molekuler TBC menggunakan berbagai sampel, khususnya sampel darah yang dilakukan oleh Amin *et.al* (2011), menyebutkan yaitu terdapat 356 sampel ditemukan positif TB dengan menggunakan PCR, diantaranya serum (4,8%), darah (36,3%), urine (46,6%), cerebro spinal fluid (CSF) (42,1%), ascetic fluid (67,6%), pleural fluid (52%), pericardial fluid (30%), pus (38,6%), bone marrow (60%), sputum (38,8%) dan bronchoalveolar lavage (BAL) (70%).

Berdasarkan data yang tersaji pada Tabel 1. dan Gambar 1., dapat diketahui bahwa, 15 ( $S_1, S_2, S_4, S_5, S_6, S_8, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{13}, S_{14}, S_{16}, S_{17}, S_{18}, S_{20}$ ) dari 20 sampel darah suspek TBC yang diuji (75%), membentuk sebagian sekuen IS6110 menjadi pita DNA berukuran 123bp, sedangkan 5 ( $S_3, S_7, S_{12}, S_{15}, S_{19}$ ) dari 20 sampel darah suspek TBC yang diuji (25%), tidak menunjukkan terbentuknya sekuen IS6110 menjadi pita DNA 123bp. Analisis molekuler sekuen DNA IS6110 pada *M.tuberculosis* dengan teknik PCR, menggunakan primer khusus, yaitu *primer forward* T4 (dipesan dengan nama dagang MT-1) dan *primer reverse* T5 (dipesan dengan nama dagang MT-2), yang disusun oleh Eisenach *et.al.* (1993). Primer tersebut akan mengapit, mengenali, dan mengamplifikasi sebagian sekuen IS6110 menjadi pita DNA berukuran 123bp. Sekuen IS6110 yang diamplifikasi merupakan gen penting dari IS, yaitu gen penyandi transposase yang membantu proses transposisi (Kyaw *et.al.*, 2018).

Transposase merupakan jenis enzim yang menarik bagian tepi transposon dan mempercepat reaksi perpindahannya ke bagian genom lain (Li *et.al.*, 2020). Cara kerja transposase diantaranya mendekripsi susunan bagian tepi transposon sepanjang 38bp, memotong untai tunggal bagian tepi untai berlawanan, mengikat *random site* pada DNA target, dan memotong dua untai DNA dipada *site* terpisah 5bp (Rubio-Cosials *et al.*, 2018). Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh McNerney *et.al.* (2012), menyebutkan bahwa *primer* T4 dan T5 yang digunakan terhadap sampel sputum suspek TBC, akan mengamplifikasi secara spesifik sebagian dari IS6110 membentuk sebuah pita dengan ukuran 123bp, yang akan terlihat sejajar di antara *ladder* berukuran 50 bp (pita paling bawah) dan 200bp (pita kedua dari bawah).

Beberapa penelitian para ahli menjelaskan ESAT-6 dan CPF-10 bagian dari EXS-1

adalah gen penyebab virulensi utama dari *M.tuberculosis*. Selain itu gen IS6110 digunakan untuk menentukan genotip dari *M.tuberculosis* (Kurniati *et.al.*, 2019). Penelitian analisis molekuler TBC menggunakan metode PCR terhadap DNA *M.tuberculosis* yang telah dilakukan, menggunakan penanda sekuens DNA IS6110. Banyak salinan sekuens sisipan 6110 (IS6110) terdapat di dalam kromosom sebagian besar galur *M.tuberculosis*, dan sekuens ini ditemukan di berbagai tempat. IS6110 spesifik untuk *M.tuberculosis* dapat digunakan untuk diagnosis, karena adanya sel *M.tuberculosis* dalam sampel (Kyaw *et.al.*, 2018).

Penelitian sebelumnya yang terkait dilakukan oleh Kabir *et.al.*, (2018) menggambarkan uji PCR menggunakan penanda DNA spesifik *M.tuberculosis* diantaranya penanda gen hsp 65 (165bp), penanda dnaJ (365bp), dan penanda sekuens DNA IS6110 (541bp). Berdasarkan penelitian tersebut, secara spesifik sekuen IS6110 teramplifikasi membentuk sebuah pita DNA dengan ukuran 541bp. Berbeda dengan pita DNA yang terbentuk pada penelitian yang dilakukan yaitu 123bp. Hal ini terjadi karena perbedaan primer yang digunakan dalam mengamplifikasi sekuen IS6110. Fragmen DNA yang dapat dianalisis biasanya mempunyai bp <500 bp. Ukuran amplikon merupakan faktor yang mempunyai peran dalam keberhasilan amplifikasi (Caulfield, A.J., & Wengenack, N.L., 2016).

Penelitian yang relevan dengan analisis molekuler sekuen DNA IS6110 pada *M.tuberculosis*, dilakukan sebelumnya oleh Umaya, E.R. (2022), memberikan hasil bahwa *gen insertion sequens* (IS) 6110 sebagai penanda TBC gastrointestinal (TBGI), terdeteksi pada 103 sampel jaringan biopsi dengan gejala klinis TBGI. Menurut hasil penelitian tersebut, uji TaqMan qPCR mampu menjadi salah satu alat uji diagnosis pendukung pada penanganan TBGI. Penelitian yang dikemukakan oleh Samosir (2020), menjelaskan metode multiplex PCR dengan gen target ESAT6, IS6110, dan MPT64 dan memancarkan potensi sampel urin sebagai spesimen alternatif diagnosis TBC. Metode multiplex PCR dengan spesimen urin dapat menjadi petunjuk pada kasus TB non-paru dan populasi yang tidak dapat mengeluarkan sputum berkualitas. Menurut Gomes *et.al.* (2010), penelitian untuk mendeteksi kompleks *M.tuberculosis* menggunakan PCR dan ELISA manik magnetik, 100 kali lebih sensitif daripada elektroforesis gel agarosa konvensional.

Menurut Barcelos *et.al.*, (2008) menjelaskan bahwa fragmen DNA IS6110 yang dapat dianalisis biasanya mempunyai panjang basa <500 bp, oleh karena lebih mudah berfragmentasi. Penelitian Singh *et.al.*, (2006) melaporkan bahwa hanya beberapa strain *M.tuberculosis* yang tidak mengandung gen IS6110 sehingga dapat mengurangi sensitivitas multiplex RT-PCR dan menyebabkan hasil negatif palsu jika hanya menggunakan gen IS6110. Gen IS6110 dan MPB64 digunakan bersama-sama untuk meningkatkan sensitivitas multiplex RTPCR. Menurut Pan *et.al.*, (2008) kegagalan amplifikasi gen IS6110 dapat disebabkan karena tidak terdapatnya *copy* IS6110 dalam *M.tuberculosis*, walaupun *M.tuberculosis* yang tidak memiliki IS6110 jumlahnya sedikit.

Sejalan dengan pernyataan tersebut, Ghenaat *et.al.* (2007), mengemukakan bahwa Sekuen fragmen DNA gen IS6110 merupakan target optimum untuk mendiagnosis *M.tuberculosis* karena keberadaannya pada hampir seluruh strain *M.tuberculosis complex*. Amplifikasi sekuens IS6110 dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah berhasil diterapkan untuk mendeteksi kompleks *M.tuberculosis* dari berbagai jenis spesimen klinis (Osman *et.al.*, 2014; Makeshkumar *et.al.*, 2014). Oleh karena itu, deteksi IS6110 dengan metode PCR dianggap sebagai penanda molekuler yang berguna untuk analisis molekuler *M.tuberculosis* (Rezeki *et.al.*, 2014). Dengan menggunakan metode amplifikasi PCR, maka bakteri patogen *M.tuberculosis* penyebab TBC dapat dideteksi dalam waktu singkat kurang dari 24 jam dan memberikan hasil yang akurat dengan sensitivitas 55-90% dan spesifitas sekitar 99% dibandingkan dengan metode konvensional (Jawetz *et.al.*, 2013).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa analisis molekuler sekuen DNA IS6110 pada *M.tuberculosis* dengan teknik PCR menggunakan primer khusus, yaitu *primer forward* T4 dan *primer reverse* T5 mampu mengapit, mengenali, dan mengamplifikasi sekuen IS6110 menjadi pita DNA berukuran 123bp pada sampel darah suspek TBC. Dari 20 sampel darah suspek TBC yang diuji, 15 sampel (75%) membentuk sekuen IS6110 menjadi pita DNA berukuran 123bp, dan 5 sampel (25%) tidak menunjukkan bentuknya sekuen IS6110 menjadi pita DNA 123bp.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Laboratorium *Sandia Biotech Diagnostic Centre* (SBDC) Rumah Sakit Santosa Bandung dan Program Studi D3-Teknologi Bank Darah, Fakultas Kesehatan dan Teknik, Universitas Bandung yang telah memfasilitasi kegiatan dan memberikan dukungan finansial terhadap penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amin, I., Idrees, M., Awan, Z., Shahid, M., Afzal, S., and Hussain, A. (2011). 'PCR Could be a Method of Choice for Identification of Both Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis', *PubMed*, 4, pp. 332-337.
- Angelia, A., Doda, D.V.D., and Manampiring, A.E. (2020). 'Prevalensi Tuberkulosis Laten dan Evaluasi Kebijakan Rumah Sakit Berdasarkan Persepsi Tenaga Kesehatan terhadap Pencegahan Tuberkulosis', *Jurnal Biomedik (JBM)*, 12(3), pp. 192-199.
- Barcelos, D., Franco, M.F., and Cardoso, S. (2008). 'Effects of Tissue Handling and Processing Steps on PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Formalin-Fixed Paraffinembedded Samples', *Journal of Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 50(6), pp. 321-326.
- Caulfield, A.J., and Wengenack, N.L. (2016). 'Diagnosis of Active Tuberculosis Disease: from Microscopy to Molecular Techniques', *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 4, pp. 33–43.
- Dewanata, P.A., and Muslih, M. (2021). 'Differences in DNA Purity Test Using UV-Vis Spectrophotometer and Nanodrop Spectrophotometer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients', *Indonesian Journal of Innovation Studies*, 15, pp. 1-10.
- Eisenach, K.D., Cave, M.D., Bates, J.H., and Crawford, J.T. (1993). *PCR Detection of Mycobacterium tuberculosis*. United States: ASM Press.
- Ghenaat, J., Omidi, A., Ghazvini, K., Ayatollahi, H., Jafarian, A.H., and Erfanian, M. (2007). 'Comparison of Multiplex PCR and Acid Fast and Auramine-Rhodamine Staining for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria in Paraffinembedded Pleural and Bronchial Tissues with Granulomatous Inflammation and Caseous Necrosis', *Journal Microbiol*, 4, pp.1-9.
- Gomes, L.I., Marques, L. H. D.S., Enk, M. J., De Oliveira, M. C., Coelho P. M. Z., and Rabello, A. (2010). 'Development and Evaluation of a Sensitive PCR-ELISA System for Detection of Schistosoma Infection in Feces', *Journal of PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(4), pp. 664.
- Hartiyah, L., Rusmiati, and Santoyo, D.D. (2023). 'Gambaran Hasil Pemeriksaan Tes Cepat Molekuler *Mycobacterium tuberculosis* di RSUD Ulin Banjarmasin Tahun 2020-2021', *Jurnal Homeostasis*, 6(1), pp. 69-76.
- Irianti, T., Kuswandi, Yasin, N.M., and Kusumaningtyas. (2016). *Anti-Tuberkulosis*.

- Yogyakarta: Grafika Indah.
- Jawetz, Melnick and Adelberg. (2013). *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Selemba Media.
- Kabir, S., Uddina, M.K.M., Chistib, M.J., Fannanac, T., Haqued, M.E., Uddine, M.R., Sayera, M., Banua, M.S., and Ahmed, T. (2018). ‘Role of PCR Method Using IS6110 Primer in Detecting Mycobacterium Tuberkulosis among The Clinically Diagnosed Childhood Tuberkulosis Patients at an Urban Hospital in Dhaka Bangladesh’, *International Journal of Infectious Disease*, 68, pp. 108-114.
- Kementerian Kesehatan RI. (2023). Laporan Program Penanggulangan Tuberkulosis Tahun 2022. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Kristini, Tri, and Hamidah, R. (2020). ‘Potensi Penularan Tuberculosis Paru pada Anggota Keluarga Penderita’, *Jurnal Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 15(1), pp. 24-31.
- Kurniati, A., Dewi, D.N.S.S, and Purwani, N.N. (2019). ‘Rapid and Spesific Detection of MycobacteriumTuberculosis Using Polymerase Chain Reaction’, *Journal of Vocational Health Studies*, 03, pp. 83–88.
- Kyaw, S.P., Hanthamrongwit, J., Jangpatarapongsa, K., Khaenam, P., and Leepiyasakulchai, C. (2018). ‘Sensitive Detection of The IS6110 Sequence of Mycobacterium Tuberculosis Complex Based on PCR-Magnetic Bead ELISA’, *The Royal Society of Chemistry Journal*, 8, pp. 33674-33680.
- Li, N., Kairang, J., Bai, Y., and Fu, H. (2020). ‘Tn5 Transposase Applied in Genomics Research’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), pp. 8329.
- Makeshkumar, V., Madhavan, R., and Narayanan, S. (2014). ‘Polymerase Chain Reaction Targeting Insertion Sequence for The Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis’, *Indian Journal of Medic Res.*, 139(1), pp. 161.
- McNerney, R., Maeurer, M.I., and Abubakar. (2012). ‘Tuberculosis Diagnostics and Biomarkers: Needs, Challenges, Recent Advances, and Opportunities’, *Journal Infectious Disease*, 205(2), pp. 147–158.
- Nurhalisah, Suarnianti, and Restika, I. (2023). ‘Analisis Disparitas Prevalensi Tuberkulosis Paru di Tinjau dari Faktor Sosiodemografi’, *Jurnal Ilmiah Mahasiswa & Penelitian Keperawatan*, 3(3), pp. 112-120.
- Osman, A.L., Saeed, N. S., and Elhassan, M. M. (2014). ‘Polymerase Chain Reaction Targeting Insertion Sequence IS6110 for The Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis among Sudanese Children and Young Adults’, *International Journal of Mycobact.*, 3(4), pp. 252–258.
- Pan, X.B., Wei, L., Han, J.C., and Gao, Y. (2008). ‘Cellular Chromosome DNA Interferes with Fluorescence Quantitative Real-Time PCR Detection of HBV DNA in Culture Medium’, *Journal of Med. Virol.*, 80(1), pp. 47–52.
- Rubio-Cosials, A., Schulz, E.C., Lambertsen, L., Bebel, A., Bork, P., and Barabas, O. (2018). *Transposase-DNA Complex Structures Reveal Mechanisms for Conjugative Transposition of Antibiotic Resistance*. Netherland: Cell Press.
- Rezeki, M., Parwati, I., Hernowo, B.S., and Tjandrawati, A. (2014). ‘Validitas Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction untuk Diagnosis Limfadenitis Tuberkulosis pada Spesimen Blok Parafin’, *Jurnal Majalah Kedokteran Bandung*, 46(3), pp. 162-167.
- Samosir. (2020). *Analisis Deteksi Molekuler Tuberkulosis dari Sampel Urin Menggunakan PCR Multipleks dengan Deteksi Gen ESAT6, IS6110, dan MPT64*. Skripsi. Depok: Universitas Indonesia.
- Sani K., and Fathnur. (2016). *Metodologi Penelitian Farmasi Komunitas dan Eksperimental*. Yogyakarta: Deepublish.
- Singh, H.B., Singh, P., Jadaun, G.P.S., Srivastava, K., Sharma, V.D., and Chauhan, D.S. (2006). ‘Simultaneous Use of Two PCR Systems Targeting IS6110 and MPB64 for Confirmation of Diagnosis of Tuberculous Lymphadenitis’, *Journal of Communicable*

- Disease*, 38(3), pp. 274-279.
- Sophian, A., and Yustina. (2022). ‘Analisis Nilai Kemurnian DNA Menggunakan Nano Fotometer pada Rasio 260/230 yang Diisolasi dari Produk Nugget’, *Muhammadiyah Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(2), pp. 82-86.
- Sugiyono. (2019). *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan RND*. Bandung: Alfabeta.
- Umaya, E.R. (2022). *Deteksi Molekuler Tuberkulosis Ekstra-Paru Gastrointestinal Menggunakan TaqManqPCR dengan Gen Deteksi IS6110*. Skripsi. Depok: Universitas Indonesia.