

**PENILAIAN HASIL PEMERIKSAAN
MYCOTEC DAN METODE PCR
PADA PASIEN SUSPEK TUBERKULOSIS (TB) PARU**

MARIA FELISITAS BLEO

N121 06 023



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**PENILAIAN HASIL PEMERIKSAAN
MYCOTEC DAN METODE PCR
PADA PASIEN SUSPEK TUBERKULOSIS (TB) PARU**

SKRIPSI

**Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi syarat-syarat
untuk mencapai gelar sarjana**



MARIA FELISITAS BLEO

N121 06 023

**PROGRAM KONSENTRASI
TEKNOLOGI LABORATORIUM KESEHATAN
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

**PENILAIAN HASIL PEMERIKSAAN
MYCOTEC DAN METODE PCR
PADA PASIEN SUSPEK TUBERKULOSIS (TB) PARU**



Drs. H. Hasyim Bariun, M.Si., Apt
NIP. 19470314 198003 1 001

Pembimbing Pertama,

Pembimbing Kedua,

Prof. dr. H. Muh. Nasrum Massi, Ph.D
NIP. 19670910 199603 1 001

dr.Dianawaty Amiruddin,M.Kes, Sp.KK
NIP.19750518 200212 2 002

Pada tanggal Agustus 2013

PENGESAHAN

**PENILAIAN HASIL PEMERIKSAAN
MYCOTEC DAN METODE PCR
PADA PASIEN SUSPEK TUBERKULOSIS (TB) PARU**

Oleh:

MARIA FELISITAS BLEO

N121 06 023

**Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada tanggal Agustus 2013**

Panitia Penguji Skripsi:

- | | | |
|----------------------------|--------------------------------------|--------|
| 1. Ketua | : Usmar, S.Si., M.Si., Apt | :..... |
| 2. Sekretaris | : Dr.Hj.Sartini.,M.Si.,Apt | :..... |
| 3. Anggota | : Dr.Herlina Rante.,M.Si.,Apt | :..... |
| 4. Anggota
(Ex.Officio) | : Drs. H. Hasyim Bariun, M.Si., Apt | :..... |
| 5. Anggota
(Ex.Officio) | : Prof.dr. H. Muh Nasrum Massi, Ph.D | :..... |
| 6. Anggota
(Ex.Officio) | : dr.Dianawaty Amiruddin,M.Kes, SpKK | :..... |

**Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin**

**Prof.Dr. Elly Wahyudin, DEA.,Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, Agustus 2013

Penyusun,

MARIA FELISITAS BLEO

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang penilaian hasil pemeriksaan Mycotec TB^{XP} (recombinant) dan metode PCR pada pasien suspek tuberkulosis paru. Penelitian ini bertujuan untuk menilai sensitifitas dan spesifitas pemeriksaan Mycotec TB^{XP} (recombinant) dan metode PCR. Penelitian menggunakan 34 sampel pasien suspek TB paru yang dilakukan pemeriksaan di Balai Besar Pengobatan dan Pencegahan Penyakit Paru Makassar dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Dari hasil analisis data, ditarik kesimpulan bahwa metode PCR mempunyai tingkat keakuratan dan sensitifitas yang cukup tinggi dibandingkan dengan pemeriksaan Mycotec TB^{XP} (recombinant), sehingga pemeriksaan PCR dapat digunakan untuk mendukung hasil pemeriksaan BTA dalam penegakan diagnosis TB paru.

ABSTRACT

A research on the assessment results Mycotec TB^{XP} (recombinant) and PCR method in patients with suspected pulmonary tuberculosis has been done. This study aims to assess the sensitivity and specificity of the examination Mycotec TB^{XP} (recombinant) and PCR methods. In this study using 34 samples of patients with suspected pulmonary TB were examined at the Center for Treatment and Prevention of Lung Disease Makassar and Laboratory of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Hasanuddin Makassar. From the analysis of the data, be concluded that the PCR method has a level of accuracy and sensitivity are quite high compared to the examination Mycotec TB^{XP} (recombinant), so that PCR can be used to support the results of smear examination in diagnosis of pulmonary tuberculosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan rahmat, kasih dan bimbingan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini sebagaimana mestinya.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tugas akhir ini banyak kendala yang dihadapi. Namun berkat dukungan dan bantuan semua pihak dan atas izin Yang maha Kuasa, penyusunan tugas akhir ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu pada kesempatan ini, penulis secara istimewa mengucapkan terima kasih kepada kedua orang tua tercinta, Ayahanda **Donatus Blaan**, Ibunda **Norma Nolana**, semua saudara dan orang tercinta juga untuk keluarga besar di Maumere- Flores dan Bali atas segala cinta, doa dan dukungan serta pengorbanannya untuk kesuksesan penulis.

Pada kesempatan ini pula penulis dengan tulus menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada **Drs.H.Hasyim Bariun, M.Si., Apt** selaku pembimbing utama, **Prof. dr. H.Muh.Nasrum Massi, MD.,PhD** selaku pembimbing pertama serta **dr.Dianawaty Amiruddin, M.Kes, Sp.KK** selaku pembimbing kedua atas keikhlasan waktu, tenaga dan pikiran dalam membimbing, menasehati, memberikan masukan dan saran mulai dari proses perencanaan penelitian hingga selesainya penyusunan skripsi ini.

Demikian pula penulis dengan tulus menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt, selaku Dekan Fakultas Farmasi.

2. Ketua Konsentrasi Teknologi Laboratorium Kesehatan dan seluruh Dosen Fakultas Farmasi beserta Staf atas bimbingan, asuhan dan pelayanan yang baik selama penulis menjalani pendidikan.
3. Kepala dan Staf Laboratorium Mikrobiologi Biomolekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Unhas Makassar dan Laboratorium Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat atas fasilitas dan bimbingan serta bantuannya selama penulis melaksanakan penelitian.
4. Ibu **Prof. Dr. rer-nat. Marianti A. Manggau., Apt** selaku penasehat akademik atas segala bantuan, bimbingan dan arahnya selama penulis menjalani pendidikan.
5. Teman-teman seperjuangan terkhusus sahabatku Cathleen, Yanti, Enjel, Evi dan untuk Elis, Yati, Anti, Leni di Pondok 3Dara, terima kasih untuk segala kebersamaan yang banyak memberi motivasi untuk tetap sabar dan menjadikan hidup lebih bersemangat.
6. Semua pihak yang telah membantu dengan caranya masing-masing baik materil maupun moril selama mengikuti pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, terima kasih untuk segalanya kiranya Tuhan selalu memberkati.

Akhir kata, penulis menyadari skripsi ini masih banyak kekurangan namun semoga karya ini bermanfaat untuk kemajuan dan pengembangan ilmu pengetahuan serta diberkati oleh Yang Maha Kuasa. Amin

Makassar, Agustus 2013

Maria Felisitas Bleo

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBARAN PERSETUJUAN.....	iii
LEMBARAN PENGESAHAN	iv
LEMBARAN PERNYATAAN.....	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT	vii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Tuberkulosis	4
II.1.1 Definisi	4
II.1.2 <i>Mycobakterium tuberculosis</i>	4
II.1.3 Klasifikasi <i>Mycobakterium tuberculosis</i>	5
II.1.4 Karakteristik <i>Mycobakterium tuberculosis</i>	6
II.1.5 Komponen Utama Dinding <i>Mycobakterium tuberculosis</i>	8
II.1.7 Tuberkulosis Paru Serta Respon Imun	9
II.2 Tinjauan Umum Tentang Antibodi.....	14
II.2.1 Immunoglobulin (Ig).....	14

II.2.2 Tes Serologis untuk Mendeteksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
II.3 Tinjauan Umum Tentang Asai Imunokromatografi.....	18
II.4 Tinjauan Umum Tentang Mycotec TB ^{xp} (recombinant).....	19
II.5 Deoxyribonucleic Acid (DNA).....	20
II.5.1 Struktur Deoxyribonucleic Acid	20
II.5.2 Ekstraksi DNA	21
II.6 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	24
II.7 Tahapan Dalam PCR.....	26
II.7.1 Denaturasi	26
II.7.2 Annealing (Penempelan Primer).....	27
II.7.3 Pemanjangan Primer (Extention)	27
II.8 Elektroforesis Gel Agarose	29
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....	32
III.1 Desain penelitian	32
III.2 Tempat dan Waktu Penelitian	32
III.2.1 Tempat Penelitian.....	32
III.2.2 Waktu Penelitian.....	32
III.3 Populasi Penelitian	32
III.4 Sampel dan Cara pemilihan Sampel.....	32
III.4.1 Sampel	32
III.4.2 Besar Sampel.....	33
III.5 Kriteria Penelitian.....	34
III.6 Izin Subjek Penelitian.....	34
III.7 Definisi Operasional.....	35
III.8 Alat dan Bahan Penelitian.....	35

III.8.1 Alat Yang digunakan.....	35
III.6.2 BahanYang digunakan	36
III.9 Prosedur Kerja.....	36
III.9.1 Pengambilan Sampel.....	36
III.9.2 Pemeriksaan Dengan Mycotec TB ^{xp} (recombinant).....	37
III.9.3 Isolasi DNA Metode Chelex.....	38
III.9.4 Deteksi DNA <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> dengan Single Polymerase Chain Reaction (PCR).....	39
III.9.5 Pembuatan Gel Agarose	39
III.10 Pengumpulan dan Analisis Data	40
III.11 Kesimpulan.....	40
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	41
IV.1 Hasil Penelitian.....	41
IV.2 Pembahasan	47
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
V.1 Kesimpulan	51
V.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA.....	52
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Deskripsi Umum	41
2. Hasil Pewarnaan BTA dan Mycotec TB ^{XP} (recombinant).....	41
3. Hasil Pewarnaan BTA dan PCR Pasien suspek TB Paru.....	42
4. Hasil Pemeriksaan Mycotec TB ^{XP} (recombinant) dan PCR.....	45
5. Uji Sensitivitas dan Spesifisitas Mycotec TB ^{XP} (recombinant) terhadap metode PCR.....	46
6. Uji Sensitivitas dan Spesifisitas menggunakan metode PCR tehadap Mycotec TB ^{XP} (recombinant).....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dengan pewarnaan Ziehl Nelsen ..	6
2. Skema Patogenesis TB.....	10
3. DNA double helix	21
4. Tahapan Reaksi PCR.....	28
5. Hasil Pemeriksaan dengan PCR.....	43
6. Hasil pemeriksaan dengan Mycotec TB ^{XP} (recombinant).....	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Alur Penelitian	55
2. Data Hasil Penelitian.....	56
3. Gambar Penelitian	45

BAB I

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TBC) adalah penyakit infeksi yang bersifat kronis dan menular, disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, Sebagian besar kuman TBC menyerang paru-paru tetapi dapat juga menyerang organ tubuh lainnya.(1,2)

Kuman penyebab penyakit Tuberkulosis pertama kali ditemukan oleh Robert Koch pada tahun 1881, sebagai penyebab penyakit tuberculosis (TBC) yang pada umumnya menginfeksi paru-paru (tuberculosis paru), *Mycobacterium sp* merupakan bakteri berbentuk basil yang ramping, lurus atau bengkok dengan ukuran 0,2-0,4 x 2–10µm, tidak bergerak, selnya mengandung banyak lipid sehingga sulit untuk dicat dengan pengecatan biasa, harus dengan pengecatan khusus misalnya cara Ziehl Neelsen, karena *Mycobacterium* termasuk bakteri tahan asam dan tahan alkohol. *Mycobacterium* bersifat aerobik dan dengan pertumbuhan yang agak lambat. (3)

Kuman ini terdapat dalam butir – butir percikan dahak yang disebut droplet nuclei dan melayang di udara untuk waktu yang lama sampai terhisap oleh orang atau mati dengan sendirinya jika terkena sinar matahari langsung. (4)

Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 1995, menempatkan TBC sebagai penyebab kematian ketiga terbesar setelah penyakit kardiovaskuler dan penyakit saluran pernafasan, dan merupakan nomor satu terbesar dalam kelompok penyakit infeksi. Angka kejadian TBC dunia oleh WHO (2006), masih menempatkan Indonesia sebagai negara terbesar nomor 3 di dunia setelah India dan Cina dengan jumlah kasus baru sekitar 539.000 orang dan jumlah kematian sekitar 101.000 orang pertahun, dan penyakit TBC sebagai penyebab kematian utama setelah penyakit jantung dan saluran pernafasan (6).

Diagnosis TB paru ditegakkan melalui pendekatan klinis, radiologis, tes laboratorium dan pemeriksaan penunjang lainnya. Metode kultur sputum yang menjadi baku emas membutuhkan waktu yang lama dan tidak semua laboratorium melakukan tes ini. Dan menurut rekomendasi Komite Nasional Penanggulangan TB Paru (KOMNAS-TB) dan WHO, pemeriksaan standar yang dilakukan pada pasien dengan tersangka TB yaitu pemeriksaan mikroskopik BTA dengan pewarnaan Ziehl Neelsen. Namun pemeriksaan ini juga memiliki kekurangan dimana sampel berkualitas jelek yaitu sputum yang encer seperti air liur atau bahkan air liur biasa.(2,6)

Sekarang ini upaya pengembangan pemeriksaan yang handal, mudah dan cepat masih terus dikembangkan. Diantaranya pemeriksaan serologis dengan metode tes rapid menggunakan Mycotec TB^{XP}(recombinant). Perangkat diagnostik Mycotec TB^{XP} (recombinant)

adalah tes secara imunokromatografi untuk mendeteksi antibodi terhadap tuberkulosis aktif dalam serum atau plasma manusia secara kualitatif. Dan seiring kemajuan teknologi di bidang biomolekuler digunakan teknik pemeriksaan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mendeteksi DNA kuman TB dalam waktu yang lebih cepat atau mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* yang tidak tumbuh pada sediaan biakan. Kriteria PCR yang menyatakan seseorang positif TB adalah jika terdapat band (pita) sesuai target (123 bp) yang terlihat pada saat proses pembacaan gel agarosa hasil elektroforesis. (7,11)

Dari kendala yang ditemukan diatas mendorong peneliti untuk melakukan penelitian dengan rumusan masalah yaitu apakah ada perbedaan akurasi dari konversi pada hasil pemeriksaan Mycotec TB^{XP} (recombinant) dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pasien suspek tuberkulosis (TB) paru.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menilai sensitifitas dan spesifitas pemeriksaan Mycotec TB^{XP} (recombinant) dan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Manfaat penelitian adalah menjadi bahan informasi khususnya bagi para tenaga laboratorium kesehatan dalam menentukan gambaran deteksi DNA tuberkulosis dan bagaimana pula gambaran pemeriksaan menggunakan Mycotec TB^{XP} (recombinant).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tuberkulosis

II.1.1 Definisi

Tuberkulosis adalah penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, sebagian besar bakteri tuberkulosis menyerang paru, tetapi dapat juga mengenai organ lain (1,5).

II.1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Kuman penyebab tuberkulosis ini berbentuk batang ramping lurus atau sedikit bengkok dengan kedua ujungnya membulat. Tuberkulosis yang disingkat TBC atau TB adalah penyakit menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Umumnya TB menyerang paru-paru, sehingga disebut dengan *Pulmonary TB*. Tetapi kuman TB juga bisa menyebar ke bagian/ organ lain dalam tubuh, dan TB jenis ini lebih berbahaya dari *pulmonary TB*. Bila kuman TB menyerang otak dan sistem saraf pusat, akan menyebabkan *kematian*. Kuman TB dapat menginfeksi hampir seluruh organ tubuh, seperti ginjal, jantung, saluran kencing, tulang, sendi, otot, usus, kulit, dan kulit. Kuman TB berbentuk batang dan memiliki sifat khusus, yaitu tahan terhadap asam pada pewarnaan, sehingga sering disebut juga sebagai Basil/ Bakteri Tahan Asam (BTA). Bakteri TB akan cepat mati bila terkena sinar matahari langsung. Tetapi dalam tempat yang lembab, gelap, dan pada suhu kamar,

kuman dapat bertahan hidup selama beberapa jam. Dalam tubuh, kuman ini dapat tertidur lama (dorman) selama beberapa tahun (5,6,11).

Mycobacterium tuberculosis dapat tumbuh optimum pada suhu 37°C, sedangkan pH optimum untuk pertumbuhan adalah 6,8. Pola pertumbuhan lambat, dengan waktu pembelahan sekitar 20 jam, pada media pertumbuhan koloni tampak setelah 2 – 3 minggu dan biasanya pertumbuhannya sangat rapat. Resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap faktor fisika dan kimia lebih tinggi jika dibandingkan dengan bakteri lain, hal ini disebabkan sifat hidrofobik permukaan sel dan sifat pertumbuhannya yang bergerombol (11).

II.1.3 Klasifikasi

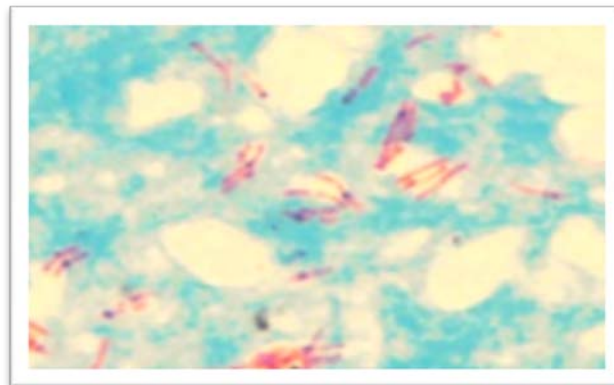
Klasifikasi bakteri berdasarkan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, determinasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* adalah sebagai berikut:

- Kingdom : Procaryote
- Divisio : Cyanobacteria
- Ordo : Actinomycetales
- Famili : Mycobacteriaceae
- Genus : *Mycobacterium*
- Spesies : *Mycobacterium tuberculosis* (13).

II.1.4 Karakteristik *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis atau bakteri TBC berbentuk batang lurus atau bengkok berukuran kira-kira 0,4 x 3,0 µm. Berpasangan atau membentuk kelompok, genus *Mycobacterium* merupakan kelompok bakteri gram positif, berukuran lebih kecil dibandingkan bakteri lainnya. (12,14).

Pewarnaan cara Ziehl-Neelsen atau Tan Thiam Hok, bakteri berwarna merah dengan latar belakang berwarna biru, sedangkan pada pewarnaan fluorokrom bakteri ini memberikan fluoresensi kuning jingga, terlihat sendiri-sendiri, berpasangan atau membentuk kelompok kecil, ukuran tersebut tergantung pada lingkungan pertumbuhan, sehingga kadang berbentuk filamen panjang dan bercabang, bakteri ini dapat juga terlihat seperti biji (12,14).



Gambar 1. *Mycobacterium tuberculosis* dengan pewarnaan Ziehl Neelsen(12)

Genus *Mycobacterium* mempunyai karakteristik unik karena dinding selnya banyak mengandung lipid dan lapisan tebal peptidoglikan yang

mengandung arabinogalaktan, lipoarabinomannan dan asam mikolat. Asam mikolat tidak dijumpai pada bakteri dan hanya dijumpai pada dinding sel *Mycobacterium*. *Mycobacterium tuberculosis* dibedakan dari sebagian besar bakteri dan mikobakteria lainnya karena bersifat patogen dan dapat berkembang biak dalam sel fagosit hewan dan manusia. Selain bersifat patogen *Mycobacterium tuberculosis* dapat meningkatkan respon imun sel T dan sel B (12).

Lipid yang membuat bakteri *Mycobacterium tuberculosis* tahan terhadap asam (asam alkohol) sehingga disebut bakteri tahan asam (BTA) dan juga lebih tahan terhadap gangguan kimia. *Mycobacterium tuberculosis* dapat hidup pada udara kering maupun dalam keadaan dingin (dapat hidup bertahun-tahun dalam lemari es). Hal ini terjadi karena bakteri berada dalam keadaan *dormant* (tidak aktif).

Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* di dalam jaringan, hidup sebagai parasit intraseluler yakni dalam sitoplasma makrofag. Makrofag yang semula memfagosit malah kemudian disenangi karena banyak mengandung lipid (12).

Sifat *Mycobacterium tuberculosis* yang aerob menunjukkan bahwa bakteri lebih menyenangi jaringan yang tinggi kandungan oksigennya, dalam hal ini tekanan oksigen pada bagian apeks paru-paru lebih tinggi dari bagian lain.

Dinding sel yang banyak mengandung lipid akan melindungi bakteri dari proses fagolisosom, hal ini dapat menerangkan mengapa bakteri dapat hidup pada makrofag normal yang tidak teraktivasi (12).

II.1.5 Komponen Utama Dinding *Mycobacterium Tuberculosis*

Kemampuan *Mycobacterium tuberculosis* dalam menginfeksi hospes dan bertahan terhadap pengaruh faktor lingkungan tidak lepas dari struktur dan komponen penyusun sel, unsur-unsur yang tercantum di bawah ini terutama ditemukan dalam dinding sel. Dinding sel mikobakteria dapat merangsang hipersensitivitas jenis lambat, dan merangsang suatu kekebalan terhadap infeksi (14).

a. Lemak (lipid)

Mikobakteria kaya akan lemak kompleks (lipid), kandungan lemak pada dinding sel antara 20 hingga 40% dari berat keringnya. Di dalam sel, lemak terikat oleh protein dan polisakarida. Lemak bertanggung jawab terhadap sebagian besar reaksi-reaksi seluler jaringan dari bakteri tuberkulosis. Selain itu lemak juga bertanggung jawab terhadap sifat tahan asam, apabila lemak bakteri tuberkulosis dihilangkan dengan eter, maka sifat tahan asam akan hilang .

b. Protein

Masing-masing tipe mikobakteria berisi beberapa protein yang mendatangkan reaksi tuberkulin. Ikatan protein pada fraksi lilin, dengan injeksi menyebabkan sensitivitas tuberkulin. Protein ini juga dapat menimbulkan pembentukan berbagai antibodi.

Antigen ESAT-6 dengan berat molekul 6 kDa, 16 kDa, 38 kDa merupakan protein antigen yang dikeluarkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat menimbulkan antibodi (7,14).

c. Polisakarida

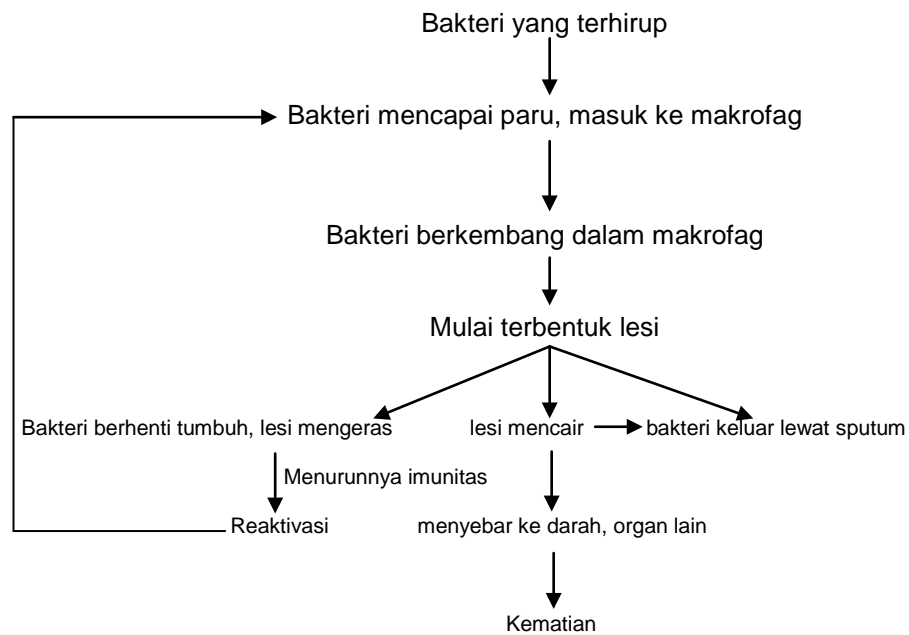
Peranan polisakarida dalam patogenesis belum diketahui secara pasti, namun dari hasil penelitian mengindikasikan bahwa beberapa polisakarida dapat merangsang hipersensitivitas tipe cepat dan bertindak sebagai antigen dalam reaksi dengan serum orang terinfeksi (14).

II.1.6 Patogenesis Tuberkulosis Paru

Tuberkulosis primer terjadi pada individu yang terpapar pertama kali dengan bakteri tuberkulosis, sedangkan tuberkulosis paru kronik (reaktivasi atau pasca primer) adalah hasil reaktivasi infeksi tuberkulosis pada suatu fokus dormant yang terjadi beberapa tahun lalu.

Organ tubuh yang paling banyak diserang tuberkulosis adalah paru. Beberapa penelitian menunjukkan adanya kenaikan limfosit alveolar, netrofil pada sel bronko alveolar pada pasien tuberkulosis paru.

Patogenesis tuberkulosis dimulai dari masuknya bakteri sampai timbulnya berbagai gejala klinis yang digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2 : Skema Patogenesis TB (1)

Infeksi biasanya terjadi melalui debu atau titik cairan (*droplet*) yang mengandung bakteri tuberkulosis. Bakteri yang berhasil masuk melalui inhalasi akan berkembang biak dengan cara membelah diri dan selanjutnya akan terjadi peradangan pada jaringan terinfeksi. Saluran limfe akan membawa *Mycobacterium tuberculosis* ke kelenjar limfe disekitar hilus paru, selanjutnya bakteri akan menetap dan berkembang biak dalam paru, kelenjar limfe atau organ lain. Perkembangan penyakit ditentukan oleh jumlah bakteri yang masuk dan daya tahan serta hipersensitivitas hospes (12,15).

Penyakit yang disebabkan oleh mikobakteria bukan karena toksin dari bakteri tersebut. Penyakit timbul akibat menetap dan berproliferasinya mikobakteria virulen serta adanya interaksi dengan inang. Sifat virulensi ini disebabkan oleh adanya senyawa sulfida (yang mengandung unsur

belerang) yang menyebabkan bakteri dapat hidup di dalam sel karena menghambat penggabungan fagosom-lisosom. *Mycobacterium tuberculosis* juga dapat membentuk suatu antioksidan, yaitu enzim *superoksida dismutase* (SOD) sehingga bakteri ini dapat hidup dalam makrofag sebagai bakteri aerob yang dapat menghasilkan O_2 (14).

II.1.7 Tuberkulosis Paru Serta Respon Imun

Terdapat dua macam respon imun pertahanan tubuh terhadap infeksi tuberkulosis yaitu respon imun selular (sel T dan makrofag yang teraktivasi) bersama sejumlah sitokin dan pertahanan secara humoral (*anti body-mediated*). Respon imun seluler lebih banyak memegang peranan dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi tuberkulosis. Pertahanan secara humoral tidak bersifat protektif tetapi lebih banyak digunakan untuk membantu menegakkan diagnosis. (16)

Mycobacterium tuberculosis di inhalasi sehingga masuk ke paru-paru, kemudian di telan oleh makrofag. Makrofag tersebut mempunyai 3 fungsi utama, yakni :

1. Memproduksi enzim proteolitik dan metabolit lainnya yang memperlihatkan efek *mycobactericidal*.
2. Memproduksi sitokin sebagai respon terhadap *Mycobacterium tuberculosis* yakni IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α TGF- β . Sitokin mempunyai efek imunoregulator yang penting.
3. Untuk memproses dan menyajikan anti gen terhadap limfosit T.

Sitokin yang dihasilkan makrofag mempunyai potensi untuk menekan efek imunoregulator dan menyebabkan manifestasi klinis terhadap tuberkulosis. IL-1 merupakan pirogen endogen menyebabkan demam sebagai karakteristik tuberkulosis. IL-6 akan meningkatkan produksi imunoglobulin oleh sel B yang teraktivasi, menyebabkan hiperglobulinemia yang banyak dijumpai pada pasien tuberkulosis. TGF berfungsi sama dengan IFN untuk meningkatkan produksi metabolit nitrit oksida dan membunuh bakteri serta diperlukan untuk pembentukan granuloma untuk mengatasi infeksi mikobakteri. Selain itu TNF dapat menyebabkan efek patogenesis seperti demam, menurunnya berat badan dan nekrosis jaringan yang merupakan ciri khas tuberkulosis. Pada pasien tuberkulosis TNF juga berperan untuk meningkatkan kerentanan sel T melakukan apoptosis baik secara spontan maupun oleh stimulasi *Mycobacterium tuberculosis* secara in vitro. IL-10 menghambat produksi sitokin oleh monosit dan limfosit sedangkan TGF menekan proliferasi sel T dan menghambat fungsi efektor makrofag(19).

Limfosit T merupakan mediator obligat kekebalan, mereka tidak bekerja sendiri tetapi harus berinteraksi dengan sel-sel imun respon lainnya untuk mencapai resistensi yang optimal. Semua populasi sel T (CD4 , CD8 dan sel) berperan dalam proteksi. Sel T yang mengekspresikan reseptor , 95% lebih terdiri dari sel T post timus terdapat pada organ perifer dan darah. Sebaliknya sel T hanya sedikit terdapat

pada daerah tersebut, tetapi lebih banyak terdapat pada jaringan mukosa seperti paru-paru. Bukti bahwa sel T sangat diperlukan untuk resistensi tuberkulosis berdasarkan percobaan bahwa tikus mutan yang dihilangkan sel T dengan cara delesi gen yang mengkode sel T γ , relatif resisten terhadap infeksi BCG subletal selama 4 minggu infeksi, kemudian pertumbuhan BCG meningkat dan akhirnya tikus tersebut akan mati karena infeksi BCG.(19)

Beberapa bukti menunjukkan bahwa sel T berperan pada respon imunitas awal terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Selain sel T, sel lain juga menghasilkan IFN dan mengekspresikan aktivitas sitolitik yang berperan pada resistensi. Sel NK maupun sel T menghasilkan IFN dan melisis sel target yang tersensitisasi mikobakterium. *Mycobacterium tuberculosis* relatif resisten terhadap makrofag. Keberadaan *Mycobacterium tuberculosis* pada individu sehat selama beberapa tahun tanpa menyebabkan penyakit menunjukkan bahwa sistem imun gagal menghilangkan patogen tersebut dan harus mengandalkan efek mikobakterisidal dan menghambat pertumbuhan mikobakteri.(19)

Sel T berperan pada respon imunitas awal yaitu pada paru-paru dan limfo nodi yang baru terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, sebelum terbentuk respon sel T yang reaktif terhadap *Mycobacterium tuberculosis* akan menghasilkan IFN, TNF, IL-2, IL-4, IL-5 dan IL-10 sama dengan sitokin yang dihasilkan oleh sel T. Selain itu supernatan dari sel T yang

dirangsang oleh *Mycobacterium tuberculosis* akan meningkatkan agregasi makrofag dan selanjutnya berperan pada pembentukan granuloma(19).

II.2 Tinjauan Umum Tentang Antibodi

II.2.1 Immunoglobulin (Ig)

Antibodi atau immunoglobulin merupakan substansi pertama yang diidentifikasi sebagai molekul dalam serum yang mampu menetralkan sejumlah mikroorganisme penyebab infeksi. Molekul disintesis oleh sel B dalam 2 bentuk yang berbeda, yaitu sebagai reseptor permukaan (untuk mengikat antigen), dan sebagai antibodi yang disekresikan ke dalam cairan ekstraseluler (17).

Immunoglobulin terdiri atas molekul-molekul protein yang walaupun satu dengan lain memiliki banyak persamaan dalam hal struktur dan sifat biologik, berbeda dalam susunan asam amino yang membentuk molekul, sesuai kelas dan fungsinya. Antibodi yang dibentuk sebagai reaksi terhadap salah satu jenis antigen mempunyai susunan asam amino yang berbeda dengan antibodi yang dibentuk terhadap antigen lain, dan masing-masing hanya dapat berikatan dengan antigen yang relevan. Sifat inilah yang disebut spesifisitas antibodi (17,18).

Immunoglobulin merupakan molekul glikoprotein yang terdiri atas komponen polipeptida sebanyak 82 – 96 % dan selebihnya karbohidrat. Fungsi utama dalam respon imun adalah mengikat dan menghancurkan antigen. Oponisasi antigen oleh immunoglobulin sehingga meningkatkan

fagositosis, memudahkan *Antigen Presenting Cell* (makrofag) memproses dan menyajikan antigen ke sel limfosit T (17).

Hingga sekarang Ig dikenal dalam 5 kelas utama dalam serum manusia, yaitu IgG, IgA, IgM, IgD dan IgE. Klasifikasi ini didasarkan atas perbedaan dalam struktur kimia yang mengakibatkan perbedaan dalam sifat biologik maupun sifat fisika immunoglobulin. Di laboratorium, kelas immunoglobulin ini ditentukan berdasarkan sifat migrasi masing-masing pada elektroforesis dan sifat-sifat serologik (17).

Imunoglobulin (Ig) di bentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat adanya kontak dengan antigen. Antibodi yang terbentuk secara spesifik ini akan mengikat anti gen baru lainnya yang sejenis.(19)

Respon imun primer terjadi sewaktu antigen pertama kali masuk ke dalam tubuh, yang ditandai dengan munculnya IgM beberapa hari setelah pemaparan. Kadar IgM mencapai puncaknya pada hari ke-7. pada 6-7 hari setelah pemaparan, barulah bisa di deteksi IgG pada serum, sedangkan IgM mulai berkurang sebelum kadar IgG mencapai puncaknya yaitu 10-14 hari setelah pemaparan antigen. Respon imun sekunder terjadi apabila pemaparan antigen terjadi untuk yang kedua kalinya, yang di sebut juga *booster*. Puncak kadar IgM pada respon sekunder ini umumnya tidak melebihi puncaknya pada respon primer, sebaliknya kadar IgG meningkat jauh lebih tinggi dan berlangsung lebih lama. Perbedaan

dalam respon ini disebabkan adanya sel B dan sel T *memory* akibat pemaparan yang pertama.

IgG merupakan komponen utama imunoglobulin serum, kadarnya dalam serum sekitar 13 mg/ml, merupakan 75% dari semua imunoglobulin. Kadar IgG meninggi pada infeksi kronis dan penyakit autoimun. Antibodi yang pertama dibentuk dalam respon imun adalah IgM, oleh karena itu kadar IgM yang tinggi merupakan petunjuk adanya infeksi dini.(19)

II.2.2 Tes Serologis untuk mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis*

Metode diagnostik serologis pada tuberkulosis pertama kali diperkenalkan oleh Arloing yaitu teknik hemaglutinasi pada tahun 1898. Pada tahun 1972 Engvall dan Perlmann memperkenalkan teknik ELISA Tes imunoserologis untuk mendiagnosis tuberkulosis berdasarkan atas pendeteksian antibodi IgG dan IgM terhadap antigen mikobakterial spesifik atau penggabungan beberapa antigen.(20)

Berbagai materi antigen dikembangkan untuk memperbaiki sensitivitas dan spesifisitas tes imunoserologik pada penyakit tuberkulosis. Antigen 60 merupakan antigen yang terbaik yang digunakan pada metode TB ELISA. Antigen yang terbaru seperti 38 kDa yang beridentitas dengan antigen 5 dan Kp90 (Kreatech Diagnostics, Madrid, Spain) telah dikembangkan secara komersial mempunyai spesifisitas yang lebih tinggi. Penggabungan berbagai antigen dapat memperbaiki sensitivitas dan

spesifisitas. Deteksi IgG terhadap 38 kDa antigen mempunyai sensitivitas 64% dan spesifisitas 81% (20).

Imunodominant 16 kDa antigen *Mycobacterium tuberculosis* yaitu Ag16, ditemukan homolog dengan *low molecular-weight heat shock protein*. Antigen ini mengandung epitop sel B yang spesifik terhadap *Mycobacterium tuberculosis* kompleks. Respon serologik terhadap epitop berkolerasi baik dengan total IgG yang terkait untuk lipoarabinomannan, protein 16 kDa dan 38 kDa mendukung bahwa epitop pada kedua antigen ini adalah imunodominant. Ag16 adalah imunogenik pada stadium awal infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan pada tuberkulosis primer.(20)

Salah satu antigen spesifik terbaru yang dikembangkan adalah ESAT-6 (*Early Secreted Antigenic Target 6*) yang merupakan *low molecular-weight* antigen yang secara dini disekresi dan diekpresikan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. ESAT-6 pertama kali dikembangkan pada tahun 1995. *Cell-mediated response* terhadap antigen ini berhubungan dengan kontak yang terbaru terjadi, dan meningkatkan resiko penyakit. ESAT-6 tidak didapatkan pada vaksin BCG (*Bacille Calmette-Guérin*). Antigen ini merupakan indikator yang sangat spesifik untuk infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (7,20).

Salah satu kit rapid imunokromatografi yang dikomersilkan adalah Mycotec TB^{XP} (recombinant) yang mengandung antigen 16 kDa, 38 kDa dan 6 kDa ESAT-6. Mycotec TB^{XP} (recombinant) memiliki sensitivitas

72% dan spesifisitas 82% jika dibandingkan dengan metode gold standar yaitu kultur (7,20).

II.3 Tinjauan Umum Tentang Asai Immunokromatografi

Asai imunokromatografi (ICA) atau disebut juga aliran samping (*Lateral Flow Test*) atau dengan singkat disebut uji strip (Strip test) tergolong dalam kelompok imunoasai berlabel seperti imunofluoresen (IF), RIA dan imunoasai enzim (EIA)

Asai imunokromatografik merupakan perluasan yang logis dari teknologi uji aglutinasi lateks yang berwarna, yaitu uji serologi yang telah dikembangkan sejak tahun 1956 oleh Singer dan Plotz untuk penyakit artritis rematoid.

Berbeda dengan uji IF dan RIA, asai imunokromatografik tidak membutuhkan alat canggih (mikroskop *fluoresens* dan *radio counter*) untuk membacanya cukup hanya dengan melihat adanya perubahan warna memakai mata telanjang, sehingga jauh lebih praktis (17).

Berbeda dengan uji ELISA, antibodi pelacak dari uji (ICA) tidak berlabel enzim tetapi berlabel partikel halus berwarna, yaitu *colloidal gold* (merah), sehingga tidak membutuhkan substrat. Partikel *colloidal gold* amat halus (1 – 20 nm) maka daya migrasinya kuat dan dalam waktu yang amat singkat dapat mencapai garis atau dot pengikat (antigen) dan menimbulkan signal berwarna yang spesifik, sehingga waktu pemeriksaan amat cepat (sekitar 15 menit) (12, 22).

II.4 Tinjauan Umum Tentang Mycotec TB^{XP} (recombinant)

Salah satu dari sekian banyak tes atau pemeriksaan yang menggunakan metode imunokromatografi, yang banyak beredar di pasaran dan digunakan di laboratorium kesehatan adalah pemeriksaan dengan menggunakan Mycotec TB^{XP} (recombinant).

Perangkat diagnostik Mycotec TB^{XP} (recombinant) adalah tes secara imunokromatografi untuk mendeteksi antibodi terhadap tuberkulosis aktif dalam serum atau plasma manusia secara kualitatif. Penggunaan beberapa antigen rekombinan memungkinkan pengikatan semua *isotypes* antibodi terhadap tuberkulosis, sehingga tes ini dapat digunakan untuk mendeteksi tuberkulosis paru dan juga di luar paru.(7)

Tes ini menggunakan konjugat *gold colloidal particle* yang akan bergerak menuju area tes yang telah dilapisi beberapa antigen tuberkulosis rekombinan (38 kDa, 16 kDa dan 6 kDa *Early Secreted Antigen Target-6* (ESAT-6)).

Jika sampel penderita yang diperiksa mengandung antibodi terhadap tuberkulosis, maka akan terbentuk garis berwarna merah muda atau ungu pada area tes (T), sisa dari kompleks yang tidak terikat dengan antibodi tuberkulosis tersebut akan terus bergerak ke arah area kontrol (C) sehingga terbentuk garis berwarna merah muda atau ungu di area kontrol (C). Hal tersebut menandakan bahwa tes bereaksi dengan baik.(7)

Perangkat diagnostik Mycotec TB^{XP} (recombinant) akan tetap stabil pada suhu 2 - 30°C, jika kemasannya belum dibuka. Tes dapat digunakan

sampai batas kadaluarsa yang tertera pada etiket kemasannya. Penyimpanan di *freezer* (dalam keadaan beku), atau pada suhu terlalu panas sangat tidak dianjurkan.(7)

Mycotec TB^{XP} (recombinant) memerlukan serum atau plasma manusia sebagai sampel. Serum atau plasma yang segar akan memberikan hasil yang terbaik. Serum atau plasma dapat disimpan sampai 3 hari pada suhu 2 – 8°C, penyimpanan serum dapat dilakukan pada suhu - 20°C atau lebih bila pengetesan tidak memungkinkan dilakukan dalam waktu 3 hari.

Pemeriksaan antibodi tuberkulosis dengan menggunakan Mycotec TB^{XP} (recombinant) telah melewati penelitian atau evaluasi di *National Tuberculosis Reference Laboratory Center* (NTRLC), Thailand. Percobaan klinis pada 30 orang sehat dan 30 orang tersangka tuberkulosis (sesuai dengan foto thorax dan gejala klinis), menunjukkan hasil sensitivitas 87% dan spesifisitas 90% (7).

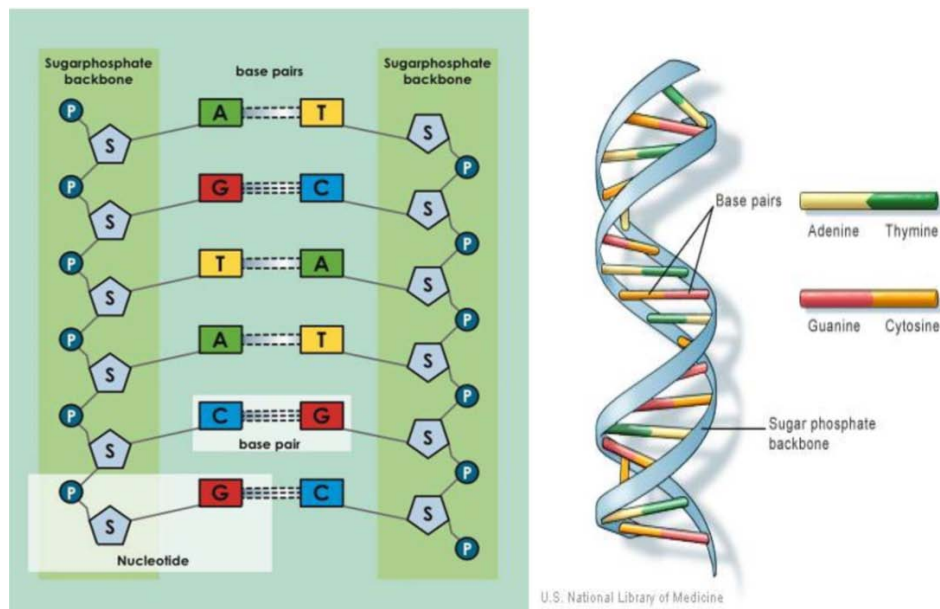
II.5 Deoxyribonucleic Acid (DNA)

II.5.1 Struktur Deoxyribonucleic Acid (DNA)

DNA terbentuk dari empat tipe nukleotida yang berikatan secara kovalen membentuk rantai polinukleotida (rantai DNA) dengan rangka gula fosfat tempat melekatnya basa – basa. Dua rantai polinukleotida saling berikatan melalui ikatan hydrogen antara basa –basa nitrogen dari rantai yang berbeda. Semua basa berada dalam bentuk heliks ganda dan

rangka gula fosfat berada di bagian luar. Purin selalu berpasangan dengan pirimidin (A-T, G-C).

Untuk memaksimalkan pengemasan pasangan basa tersebut kedua rangka gula fosfat tersebut berpilin membentuk heliks ganda, dengan satu putaran komplementer setiap 10 pasang basa. Polaritas dari rantai DNA ditunjukkan dengan sebutan ujung 5' dan ujung 3'. Ujung 3' membawa gugus OH bebas pada posisi 3' dari cincin gula, dan ujung 5' membawa gugus fosfat bebas pada posisi 5' dari cincin gula.(23)



Gambar 3: DNA double helix.(23)
DNA to Protein A Laboratory Project in Molecular Biology.America, New York.

II.5.2 Ekstraksi DNA

Isolasi DNA merupakan langkah awal dari berbagai percobaan. Metodenya cukup sederhana yang meliputi lisis sel, memisahkan DNA dari molekul lain seperti protein, RNA, lemak dan karbohidrat, dan

kemudian dilakukan pengendapan DNA. Walaupun prinsip dasar isolasi untuk berbagai sel serupa, tetapi prosedurnya disesuaikan dengan karakteristik organisme, karena struktur dinding sel dan komposisi organisme sangat berbeda-beda.

Pada bakteri, sel bakteri mempunyai dinding sel berlapis dan membran sel. Struktur ini dapat dipecah dengan lisosom dan detergen natrium dedosil sulfat (SDS). Akibat perlakuan ini isi sel keluar. Protein dipisahkan dengan ekstraksi menggunakan fenol, sedangkan RNA dihilangkan dengan enzim Rnase. Akhirnya DNA diperoleh dengan pengendapan menggunakan etanol. (22)

Tahap pertama dalam isolasi DNA adalah proses perusakan atau penghancuran membran dan dinding sel. Pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan dari awal isolasi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel. Tahap penghancuran sel atau jaringan memiliki beberapa cara yakni dengan cara fisik seperti menggerus sampel dengan menggunakan mortar dan pestle dalam nitrogen cair atau dengan menggunakan metode freezing-thawing dan iradiasi. Cara lain yakni dengan menggunakan kimiawi maupun enzimatik. Penghancuran dengan menggunakan kimiawi seperti penggunaan detergen yang dapat melarutkan lipid pada membran sel sehingga terjadi destabilisasi membran sel. Ada beberapa metode kimia untuk ekstraksi DNA antara lain (22).

1. Metode enzim proteinase-K

Metode ini menggunakan proteinase-K seperti untuk melisiskan membran pada sel darah serta mendegradasi protein globular maupun rantai polipeptida dalam komponen sel. Setelah sampel mendapat perlakuan dengan metode enzim, maka bila jumlah atau volume sampel kecil (kurang dari 100 μ l) dilanjutkan dengan metode Boom. Bila volume sampel besar (lebih dari 100 μ l) dilanjutkan dengan metode ekstraksi fenol dan presipitasi alkohol.(10)

2. Metode ekstraksi fenol dan presipitasi alkohol

Metode ini biasanya digunakan untuk ekstraksi DNA pada sampel darah dan cairan tubuh. Hemoglobin dapat dihilangkan pada ekstraksi fenol.(10)

3. Metode Chelex

Metode ini digunakan untuk ekstraksi DNA pada sampel darah, dan cairan tubuh lainnya. Dimana sampel yang dibutuhkan sedikit saja yaitu sekitar 200 μ l. (10,25)

Metode kimia yang digunakan yaitu sel dapat dihancurkan dengan menggunakan senyawa kimia seperti buffer TES yang terdiri dari Tris, EDTA (Etilen Diamin Tetra Acetat) dan SDS (Sodium Deodesil Sulfat). Larutan EDTA berfungsi sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium. Ion Mg^{2+} tersebut untuk mempertahankan integritas sel maupun mempertahankan aktivitas enzim nuklease yang dapat merusak asam nukleat. Adapun SDS yakni sejenis detergen yang bersifat basa

kuat yang dapat digunakan untuk merusak membran sel. Hal ini mengakibatkan sel mengalami lisis. Kotoran atau debris sel yang ditimbulkan akibat pengrusakan sel oleh EDTA dan SDS dibersihkan dengan proses sentrifugasi sehingga yang tertinggal hanya molekul nukleotida (DNA dan RNA). Untuk menghilangkan protein dari larutan digunakan fenol kloroform dimana fenol berfungsi mengikat protein dan sebagian kecil RNA, sedangkan kloroform berfungsi untuk membersihkan protein dan polisakarida dari larutan. Protein juga dapat dihilangkan dengan bantuan enzim proteinase. Agar molekul RNA juga dibersihkan dari larutan, enzim RNase juga digunakan untuk merusak molekul tersebut dengan hilangnya protein dan RNA maka DNA dapat diisolasi secara utuh. Hal ini dilakukan dengan cara memurnikan DNA dengan etanol 70% serta ditambahkan NH_4 asetat yang berfungsi untuk melekatkan DNA. Penambahan isopropanol akan menyebabkan DNA mengendap berupa tepung berwarna putih, endapan DNA tersebut dimurnikan kembali sebelum dilarutkan dengan buffer TES (26).

II.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi berantai polymerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara in vitro. PCR ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis. Metode PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA sebanyak ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10^6 - 10^7 kali.

Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap n siklus PCR akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non target. (23)

Pada reaksi PCR diperlukan beberapa komponen utama, yaitu:

- a. DNA cetakan. Merupakan fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 10^5 - 10^6 molekul. Kemurnian DNA target sangat penting, karena dapat mempengaruhi reaksi amplifikasi dan perlu memperhatikan kestabilan genetik dari urutan nukleotida yang ditargetkan.
- b. Oligonukleotida primer. Merupakan suatu sekuen oligonukleotida pendek (18– 28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA yang mempunyai kandungan G + C sebesar 50 – 60% untuk kestabilan penempelan primer.
- c. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP). Larutan stok dNTP sebaiknya dinetralkan menjadi pH 7,0. Konsentrasi yang biasa digunakan untuk setiap dNTP berkisar antara 20-200 μ M dan keempat dNTP yang digunakan (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sebaiknya mempunyai konsentrasi yang sama untuk memperkecil kesalahan penggabungan nukleotida selama proses polimerasi.

- d. Taq DNA Polimerase. Ini merupakan enzim yang digunakan dalam katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini berasal dari bakteri *Thermus aquaticus*. Enzim Taq polimerase mempunyai kemampuan polimerasi DNA yang sangat tinggi dengan suhu aktivitas optimum sekitar 75°C – 80°C.
- e. Larutan buffer. Buffer yang dianjurkan untuk melakukan PCR yaitu 10 – 50mM Tris-HCl pH 8,3 - 8,8 (suhu 20°C); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; dan komponen lain yang perlu ditambahkan adalah 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); Tween 20 sebanyak 0,05 - 0,01% untuk mempertahankan kestabilan enzim Taq DNA polimerase.(9,23)

II.7 Tahapan Dalam PCR

II.7.1 Denaturasi

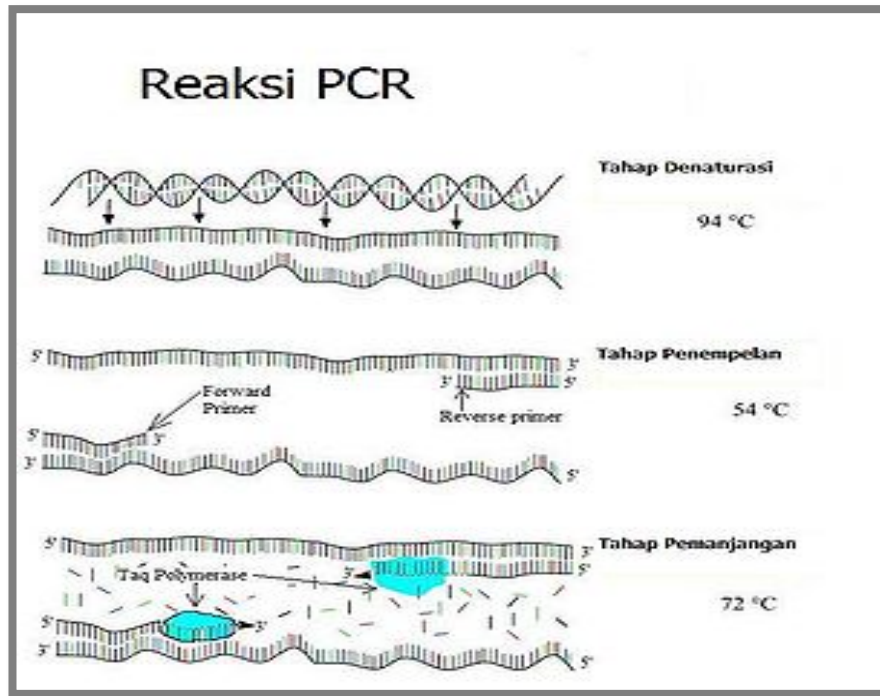
Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusnya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya. Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu 90°C – 95°C.

II.7.2 Annealing (Penempelan Primer)

Pada tahap penempelan primer (annealing), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses annealing ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada templat. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu 50°C – 60°C. Selanjutnya, DNA polymerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada 72°C.(26)

II.7.3 Pemanjangan Primer (Extention)

Pada tahap *extension* ini terjadi proses pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Pada setiap satu kilobase (1000bp) yang akan diamplifikasi memerlukan waktu 1 menit. Sedang bila kurang dari 500bp hanya 30 detik dan pada kisaran 500 tapi kurang dari 1kb perlu waktu 45 detik, namun apabila lebih dari 1kb akan memerlukan waktu 2 menit di setiap siklusnya. Adapun temperatur ekstensi berkisar antara 70-72°C.(27)



Gambar 4. Tahapan Reaksi PCR (27)

Reaksi-reaksi tersebut di atas diulangi lagi dari 25-30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru yang merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi (9).

Metode PCR tersebut sangat sensitif. Sensitivitas tersebut membuatnya dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA. Metode ini juga sering digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuen genom. Dengan menggunakan

metode PCR, dapat diperoleh pelipatgandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{-19} mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit. Hal ini menunjukkan bahwa pelipatgandaan suatu fragmen DNA dapat dilakukan secara cepat. Kelebihan metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, misalnya dengan DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 μ g, oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dan reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50-100 μ l. DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuen DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampurkan kultur bakteri di dalam tabung PCR (9).

II.8 Elektroforesis Gel Agarosa

Proses [elektroforesis](#) gel merupakan salah satu teknik utama dalam biologi molekular. Pada prinsipnya elektroforesis gel memisahkan makromolekul berdasarkan laju perpindahannya melewati suatu gel di bawah pengaruh medan listrik. Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekul bersangkutan. Campuran DNA, RNA atau protein ditempatkan dalam sumur di dekat satu ujung lempeng tipis gel polimetrik. Gel ini ditahan oleh pelat kaca dan direndam dalam larutan aqueous (dengan pelarut air). Elektroda dilekatkan pada kedua ujung dan diberikan tegangan. Setiap makromolekul kemudian bermigrasi ke arah elektroda

yang bermuatan berlawanan pada laju yang sebagian besar ditentukan oleh muatan dan ukuran molekulnya. Metode ini biasanya dilakukan untuk tujuan analisis, namun dapat pula digunakan sebagai teknik preparatif untuk memurnikan molekul sebelum digunakan dalam metode-metode lain seperti [spektrometri massa](#), [PCR](#), [kloning](#), [sekuensing](#) DNA, yang merupakan metode-metode karakterisasi lebih lanjut (28).

Gel yang biasa digunakan adalah [polimer](#) bertautan silang (*crosslinked*) yang porositasnya dapat diatur sesuai dengan kebutuhan. Pemisahan asam nukleat yang ukuran molekulnya lebih besar (lebih besar dari beberapa ratus [basa](#)), digunakan gel [agarosa](#) (dari ekstrak [rumput laut](#)) yang sudah dimurnikan. Dalam proses elektroforesis, sampel DNA ditempatkan ke dalam sumur (*well*) pada gel yang direndam dalam larutan buffer dengan konsentrasi rendah dan dialirkan [listrik](#). Molekul-molekul DNA tersebut akan bergerak di dalam cairan gel ke arah salah satu [kutub listrik](#) sesuai dengan [muatannya](#). Untuk asam nukleat, arah pergerakannya adalah menuju [elektroda](#) positif disebabkan oleh muatan negatif alami pada rangka [gula-fosfat](#) yang dimilikinya dengan muatan negatif. Untuk menjaga agar laju perpindahan asam nukleat benar-benar hanya berdasarkan ukuran atau panjangnya, zat seperti [natrium hidroksida](#) atau [formamida](#) digunakan untuk menjaga agar asam nukleat berbentuk lurus.(28)

Dengan prinsip yang sama protein didenaturasi dengan [deterjen](#) (misalnya natrium dodesil sulfat, SDS) untuk membuat protein tersebut

berbentuk lurus dan bermuatan negatif. Setelah proses ini selesai, dilakukan proses pewarnaan (*staining*) agar molekul sampel yang telah terpisah dapat dilihat. [Etidium bromida](#), [perak](#), atau pewarna "biru Coomassie" (*Coomassie blue*) dapat digunakan untuk keperluan ini. Jika molekul sampel berpendar dalam sinar [ultraviolet](#) (misalnya setelah "diwarnai" dengan etidium bromida), gel [difoto](#) di bawah sinar ultraviolet. Pita-pita (*band*) pada lajur-lajur (*lane*) yang berbeda pada gel akan tampak setelah proses pewarnaan satu lajur merupakan arah pergerakan sampel dari sumur gel. Pita-pita yang berjarak sama dari sumur gel pada akhir elektroforesis mengandung molekul-molekul yang bergerak di dalam gel selama elektroforesis dengan kecepatan yang sama yang biasanya berarti bahwa molekul-molekul tersebut berukuran sama. Marka atau [penanda](#) (*marker*) yang merupakan campuran molekul dengan ukuran berbeda-beda dapat digunakan untuk menentukan ukuran molekul dalam pita sampel dengan mengelektroforesis marka tersebut pada lajur di gel yang paralel dengan sampel. Pita-pita pada lajur marka tersebut dapat dibandingkan dengan pita sampel untuk menentukan ukurannya. Jarak pita dari sumur gel berbanding terbalik terhadap [logaritma](#) ukuran molekul.(28)