

# UJI VALIDITAS TEKNIK PCR (*Polymerase Chain Reaction*) DAN PEMERIKSAAN MIKROSKOPIS BAKTERI TAHAN ASAM SEBAGAI ALAT DIAGNOSIS PENDERITA TB PARU DI RUMAH SAKIT PERSAHABATAN, JAKARTA

Basundari Sri Utami<sup>1</sup>, Syahrial Harun<sup>1</sup>, Riyanti Ekowatiningsih<sup>1</sup>,  
Enny Yuwarni<sup>1</sup>, Liliana Kurniawan<sup>1</sup>  
Tjandra Yoga Aditama<sup>2</sup>

## Abstrak

Salah satu faktor yang menghambat program pemberantasan tuberkulosis paru adalah belum tersedianya alat diagnosis cepat yang dapat menentukan adanya bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam sputum. Diagnosis cepat dan tepat sangat penting untuk menentukan pengobatan dan memutus rantai penularan. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu metode pemeriksaan yang prinsip kerjanya memperbanyak (*amplification*) DNA invitro secara enzimatis. Teknik PCR telah dikembangkan untuk diagnosis berbagai penyakit infeksi, seperti Hepatitis, HIV, Human Papillomavirus., dan untuk mendeteksi *M.tuberculosis*.

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan validitas PCR sebagai perangkat diagnosis pada tersangka penderita tuberkulosis. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat bagi program pemberantasan tuberkulosis terutama sebagai informasi tentang validitas diagnosis dan kemungkinan penggunaan PCR sebagai alat diagnosis.

Sebanyak 70 sampel sputum diambil dari tersangka penderita tuberkulosis, diperiksa menggunakan 3 jenis pemeriksaan : mikroskopis bakteri tahan asam (BTA), uji PCR dan metode biakan yang berfungsi sebagai baku emas (*gold standard*). Validitas diagnosis ditentukan dengan menghitung sensitifitas, spesifisitas, nilai duga positif dan negatif, rasio kecenderungan positif dan negatif, akurasi dari masing-masing hasil diagnosis (mikroskopis BTA dan PCR).

Sensitifitas dan spesifisitas pemeriksaan mikroskopis BTA adalah 77,2% (CI = 95%; 0,7837 – 0,7603) dan 95,8% (CI = 95%; 0,96361 - 0,9523) dengan nilai duga positif dan negatif 89,4% dan 90,1% dengan rasio kecenderungan (LR +) = 18,8 dan (LR -) = 0,23. Hasil uji PCR menunjukkan sensitifitas dan spesifisitas pemeriksaan sebesar 90% (CI = 95%; 0,90705 – 0,89295) dan 79% (CI = 95%; 0,7995 - 0,78043) dengan nilai duga positif dan negatif 66% dan 95% dengan rasio kecenderungan (LR +) = 3,18 dan (LR -) = 0,11.

Sebagai perangkat diagnosis TB paru, PCR valid dapat membedakan penderita TB paru dan bukan penderita TB paru, akan tetapi kurang reliabel dibanding hasil pemeriksaan mikroskopis BTA.

## Pendahuluan

Tuberkulosis masih merupakan masalah kesehatan utama di Indonesia. Dari hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 1995, penyakit TB merupakan penyebab kematian nomor tiga setelah penyakit kardiovaskuler dan penyakit saluran pernafasan pada semua kelompok usia, dan nomor satu dari golo-

ngan penyakit infeksi<sup>(1)</sup>. Salah satu faktor yang menghambat program pemberantasan tuberkulosis paru adalah belum tersedianya diagnosis cepat dan tepat yang dapat menentukan adanya bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam sputum. Diagnosis cepat dan tepat tersebut sangat penting bukan saja untuk menentukan pengobatan tetapi juga memutus rantai penularan<sup>(2)</sup>.

1. Puslitbang Pemberantasan Penyakit, Badan Litbang Kesehatan
2. Rumah Sakit Umum Persahabatan, Jakarta.

Diagnosis tuberkulosis paru biasanya ditegakkan dengan menemukan basil tahan asam pada pemeriksaan langsung mikroskopis dan pada biakan sputum penderita tuberkulosis. Pemeriksaan langsung mikroskopis meskipun cepat dan murah, akan tetapi hasilnya kurang sensitif, hanya 30%-70% penderita yang dapat didiagnosis dengan cara ini. Pemeriksaan dengan biakan lebih sensitif, tetapi memerlukan waktu lama, dapat mencapai 6 minggu<sup>(3)</sup>, tidak semua laboratorium mempunyai fasilitas yang memadai untuk melakukan biakan. Pemeriksaan dengan menggunakan pelacak DNA, menunjukkan hasil yang spesifik, tetapi sensitifitasnya sama dengan pemeriksaan mikroskopis<sup>(4,5)</sup>. Sensitifitas dari pemeriksaan dengan menggunakan pelacak DNA dapat ditingkatkan dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)<sup>(6)</sup>.

PCR adalah suatu metode pemeriksaan yang prinsip kerjanya memperbanyak (*amplification*) DNA *invitro* secara enzimatis. Teknik PCR telah dikembangkan untuk diagnosis berbagai penyakit infeksi, seperti Hepatitis, HIV, Human Papillomavirus<sup>(7)</sup>. Penggunaan PCR untuk mendeteksi *M. tuberculosis* telah dikembangkan oleh beberapa peneliti. Hasil yang ditunjukkan sangat sensitif, spesifik dan cepat<sup>(6,8)</sup>. Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan validitas PCR sebagai perangkat diagnosis tersangka penderita tuberkulosis di Rumah Sakit Persahabatan, Jakarta. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat bagi program pemberantasan tuberkulosis sebagai informasi tentang validitas diagnosis dan kemungkinan penggunaan PCR sebagai alat diagnosis.

### Metodologi

Penelitian ini dilakukan pada periode waktu 1994 – 1995, dengan mengambil lokasi penelitian

RSU Persahabatan, Jakarta. Populasi penelitian adalah tersangka penderita tuberkulosis yang datang ke rumah sakit, semua umur, laki-laki dan perempuan. Subyek penelitian adalah pasien Rumah Sakit Umum Persahabatan yang dinyatakan kemungkinan menderita tuberkulosis paru. Sebanyak 70 sampel sputum diambil dari penderita tersebut, sputum yang didapat dari penderita ditempatkan di dalam wadah steril, untuk dilakukan 3 jenis pemeriksaan: mikroskopis bakteri tahan asam (BTA), biakan, dan uji PCR. Pemeriksaan mikroskopis BTA dengan mikroskop dan biakan *M. tuberculosis* dari sputum penderita dilakukan di RS Persahabatan, Jakarta Timur; pemeriksaan sputum penderita dengan PCR dilakukan di laboratorium Puslitbang Pemberantasan Penyakit Menular, Badan Litbang Kesehatan.

Variabel penelitian ini adalah hasil pemeriksaan BTA dengan mikroskop oleh petugas laboratorium RSU Persahabatan, hasil pemeriksaan PCR oleh Puslitbang Pemberantasan Penyakit Menular; sebagai baku emas adalah hasil biakan oleh petugas laboratorium RSU Persahabatan.

Validitas hasil pemeriksaan PCR ditentukan dengan menghitung sensitifitas, spesifisitas, akurasi, nilai duga positif, nilai duga negatif, rasio kecenderungan positif, rasio kecenderungan negatif, validitas hasil PCR akan dibandingkan dengan hasil pemeriksaan mikroskopis BTA sebagai perangkat diagnosis yang selama ini dilakukan, sebagai baku emas adalah hasil biakan petugas laboratorium RSU Persahabatan. Validitas hasil diagnosis dihitung dengan menggunakan tabel 2 x 2 dengan rumus sebagai berikut.

		Baku emas ( <i>gold standar</i> )		Jumlah
		Positif	Negatif	
Hasil BTA/ PCR	Positif	a	b	N1
	Negatif	c	d	N2
Jumlah		N3	N4	N

$$\text{Sensitivitas} = a/N3 \times 100\% \quad \text{Spesifisitas} = d/N4 \times 100\%$$

$$\text{Akurasi} = (a+d)/N \times 100\% \quad \text{Nilai duga positif} = a/N1 \times 100\%$$

$$\text{Nilai duga negatif} = d/N2 \times 100\% \quad \text{Rasio kecenderungan positif} = \text{sensitivitas} / \{ b / (b + d) \}$$

$$\text{Rasio kecenderungan negatif} = \{ c / (a + c) \} / \text{spesifisitas}$$

Primer yang dipakai di dalam teknik PCR adalah INS-1 dan INS-2. INS-1 dan INS-2 adalah oligonukleotida fragmen DNA dari *M. tuberculosis* yang mempunyai panjang 20 pasangan basa. Primer ini merupakan bagian dari segmen DNA IS 986 *M.tuberculosis*. INS-1 berasal dari pasangan basa 631-650 (5-CGTGAGGGC ATCGAGGTGGC-3), dan INS-2 berasal dari pasangan basa 856-875 (5-GCGTAGGCGTO GGTGACAAA-3). Hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan pasangan primer ini adalah fragmen DNA *M.tuberculosis* sebesar 245 pasangan basa<sup>(10)</sup>. Hasil amplifikasi dievaluasi dengan *ethidium bromide agarose electrophoresis* dengan menggunakan pasangan basa standar sebagai kontrol.

### Hasil

Subyek penelitian adalah 70 orang penderita TB pasien RS Persahabatan yang terdiri dari : 42 tersangka penderita laki-laki dan 28 tersangka

penderita perempuan. Berdasarkan hasil biakan, penderita positif TB paru sebanyak 22 dan 48 negatif. (Tabel 1).

### Validitas Diagnosis

#### 1. Validitas Hasil Mikroskopis BTA

Validitas hasil pemeriksaan mikroskopis BTA ditentukan dengan menghitung sensitifitas, spesifisitas, akurasi, nilai duga positif, nilai duga negatif, rasio kecenderungan positif, rasio kecenderungan negatif. Dari hasil penghitungan dengan menggunakan tabel 2 x 2 pada Tabel 2, didapatkan hasil sebagai berikut nilai sensitifitas dan spesifisitas pemeriksaan mikroskopis BTA adalah 77,2% (CI = 95%; 0,7837 – 0,7603) dan 95,8% (CI = 95%; 0,96361 - 0,9523) dengan nilai duga positif dan negatif 89,4% dan 90,1% dengan rasio kecenderungan (LR +) = 18,8 dan (LR -) = 0,23 (Tabel 3). Hasil ini tidak berbeda bermakna dengan hasil biakan ( $\chi^2=0,31042$ ,  $p>0,05$ ).

**Tabel 1**  
**Distribusi Penderita TBC Menurut Hasil Biakan**

	Positif	Negatif	Jumlah
Laki-laki	11	31	42
Perempuan	11	17	28
Jumlah	22	48	70

**Tabel 2**  
**Hasil Pemeriksaan Mikroskopis BTA dibandingkan Hasil Biakan**

		Hasil Biakan		Jumlah
		+	-	
Hasil BTA	+	17	2	19
	-	5	46	51
	Jumlah	22	48	70

**Tabel 3.**  
**Validitas Hasil Mikroskopik TB**

	Sn	Sp	NDP	NDN	AK	LR+	LR-
Mikr. TB	77,2	95,8	89,4	90,1	90	18,8	0,23

$P<0,05$

Besar kesalahan pemeriksaan mikroskopis BTA adalah 7 dari 70 pemeriksaan (10%) (Tabel 2), terdiri dari 2 dari 19 (10,5%) positif palsu dan 5 dari 51 (9,8%) negatif palsu (Tabel 4).

**Tabel 4**  
**Besar Kesalahan Pemeriksaan Mikroskopik BTA**

Positif palsu	Negatif palsu	Besar kesalahan
2/19 (10,5%)	5/51 (9,8%)	7/70 (10 %)

**Tabel 5**  
**Hasil Pemeriksaan PCR dibandingkan Hasil Biakan**

		Hasil Biakan		Jumlah
		+	-	
Hasil PCR	+	20	10	30
	-	2	38	40
Jumlah		22	48	70

**Tabel 6**  
**Validitas Hasil PCR**

	Sn	Sp	NDP	NDN	AK	LR+	LR-
PCR	90	79	66	95	82,8	3,18	0,11

P<0,05

Besar kesalahan pemeriksaan PCR adalah 12 dari 70 pemeriksaan (17,1%) yang terdiri dari 10 dari 30 (33,3%) positif palsu dan 2 dari 40 (5%) negatif palsu (Tabel 7).

**Tabel 7**  
**Besar Kesalahan Pemeriksaan PCR**

Positif palsu	Negatif palsu	Besar kesalahan
10/30 (33,3%)	2/40 (5%)	12/70 (17,1 %)

## 2. Validitas Hasil PCR

Dari hasil penghitungan dengan menggunakan tabel 2 x 2 pada Tabel 5, sensitifitas dan spesifitas pemeriksaan sebesar 90% (CI = 95%; 0,90705-0,89295) dan 79% (CI = 95%; 0,7995-0,78043) dengan nilai duga positif dan negatif 66% dan 95% dengan rasio kecenderungan (LR +) = 3,18 dan (LR -) = 0,11 (Tabel 6), hasil ini tidak berbeda nyata dengan biakan ( $\chi^2 = 1,958$ ,  $p > 0,05$ ).

## Pembahasan

Dari hasil perhitungan statistik diagnosis mikroskopis BTA mempunyai sensitifitas dan spesifitas 77,2% dan 95% dengan LR (*Likelihood Ratio*) 18,8-0,23 (Tabel 3), diagnosis PCR mempunyai sensitifitas dan spesifitas 90% dan 79% dengan LR 3,18-0,11 (Tabel 6). Hasil ini

menunjukkan bahwa diagnosis mikroskopis BTA lebih sesuai dipakai dalam diagnosis TB paru dibanding PCR di rumah sakit.

Keuntungan dari penggunaan diagnosis mikroskopis BTA adalah, cepat, murah dan mudah, tetapi diagnosis mikroskopis hanya dapat mendiagnosis pada jumlah bakteri 5.000-10.000 per mikro liter sputum. Kekurangan yang lain dari diagnosis mikroskopis BTA adalah tidak dapat mengidentifikasi spesies dari *Mycobacterium* dan tidak dapat untuk identifikasi *Mycobacterium* yang resisten terhadap obat anti tuberkulosis, dalam hal demikian pemeriksaan mikroskopis BTA harus selalu dilakukan dengan konfirmasi hasil biakan<sup>(11)</sup>.

Keuntungan dari PCR antara lain: kecepatan pemeriksaan sama dengan mikroskopis, tetapi

dapat untuk identifikasi spesies, untuk diagnosis dini, untuk diagnosis *mycobacterium* yang sulit di biakkan: untuk identifikasi *mycobacterium* pada sampel-sampel seperti urin, kulit, atau jaringan lain, cairan cerebrospinal di mana jumlah *mycobacterium* sangat sedikit (meskipun terdapat 1 *mycobacterium* dalam sediaan), keuntungan yang lain yaitu PCR dapat dipakai sebagai konfirmasi hasil pengobatan<sup>(11)</sup>.

Meskipun sensitifitas dari diagnosis PCR lebih tinggi dibanding mikroskopis BTA, akan tetapi jumlah positif palsu PCR lebih banyak (33,3% dibanding 10,5%) (tabel 4 dan 7). Kox, (1994) mengatakan bahwa permasalahan dalam teknik PCR adalah kesalahan positif palsu, hal ini disebabkan kontaminasi pada tahap amplifikasi<sup>(12)</sup> dalam proses pemeriksaan PCR. Kelemahan yang lain adalah, pemeriksaan PCR sangat mahal.

Hasil-hasil penggunaan PCR di laboratorium yang telah dilaporkan menunjukkan bahwa PCR tidak reliabel dipakai sebagai perangkat diagnosis lapangan, akan tetapi lebih reliabel dipakai di dalam laboratorium dengan fasilitas yang tinggi dengan peralatan yang memadai dan dilakukan oleh seorang teknisi yang berpengalaman<sup>(11)</sup>, hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini, dengan melihat rentang angka LR PCR yaitu 3,18 – 0,11 (Tabel 6).

Dari hasil pembahasan di atas dikemukakan bahwa penggunaan PCR dalam diagnosis TB tidak diperlukan apabila pada pemeriksaan mikroskopis positif dengan gambaran klinis penderita yang menunjang kearah infeksi tuberkulosis terutama di daerah endemis. Diagnosis PCR sangat diperlukan pada keadaan khusus di mana hasil pemeriksaan mikroskopis negatif tetapi gambaran klinis menunjukkan kearah infeksi tuberkulosis paru atau pada dugaan kasus tuberkulosis ekstra pulmonum.

### Kesimpulan

1. Sebagai perangkat diagnosis TB paru, PCR valid dapat membedakan penderita TB paru dan bukan penderita TB paru, akan tetapi kurang reliabel dibanding hasil pemeriksaan mikroskopis BTA.
2. Pemeriksaan dengan menggunakan PCR mempunyai sensitifitas yang lebih tinggi dan spesifisitas lebih rendah dibanding micros-

kopis BTA; tetapi hasil pemeriksaan BTA lebih baik dibandingkan PCR oleh karena kemungkinan penderita positif pada hasil positif BTA lebih besar dari pada hasil positif PCR (18,8 dibanding 3,18).

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada Kepala Puslitbang Pemberantasan Penyakit, kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, yang telah memberikan kesempatan dan kepercayaan pada penulis untuk melakukan penelitian ini.

### Daftar Pustaka

1. Departemen Kesehatan RI; Pedoman Nasional Penanggulangan TUBERKULOSIS, cetakan ke 6., 2001.
2. Gunardi AS; Pemberantasan Penyakit Paru di Indonesia, Pedoman Penataan Diagnostik dan Terapi, Anwar Yunus dan Aryatmo Tjokronegoro (ed), FKUI 1985.
3. Peetosutan E; Arti Pemeriksaan bakteriologis pada tuberkulosis paru, Pedoman Penataan Diagnostik Dan Terapi, FKUI, 1985.
4. Robert MC, Mc. Millan C and Coyle,MS.,1987. Whole Chromosomal DNA probes for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. J.Clin.Microbiol. 25 : 1239-1243.
5. Drake,TA, Hinder JM and Berkin OSW.,1987. Rapid Identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. J.Clin. Microbiol 25 : 1442-45.
6. Noel AB; Lecrossier D, Nash K et al., 1989. Rapid Diagnostic Of Tuberkulosis by amplification of Mycobacterial DNA in Clinical samples. The Lancet 11: 1069-71.
7. Sjobring U, Mec Lenberg M.,1990. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 28: 2200-2204.
8. Kwok B, and Sninsky JJ: Amplification of PCR to the Principles and Amplification for DNA Amplification, Erlich HSE. Stocton Press, New York.

- 
- 
9. Fletcher, R.H., Fletcher,S.W., Wagner, E.H., 1992. Sari Epidemiologi Klinik edisi 2, Gadjah Mada University Press.
  10. Mc Adam, et al., 1990. "In PCR protocols; polymerase chain reaction for the *M.tuberculosis* complex". Mol Microbiol. 4: 1607 – 1613.
  11. Kox LFF, 1996. "Diagnosis of tuberculosis and other mycobacterioses : development and clinical evaluation of PCR assay", Publication Of Thesis, supported by Abbott B.V, 133-151.
  12. Kox LFF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, Leeuwen J, Heusden S, Kuijper S and Kolk AHJ, 1994. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J.Clin.Microbiol 32 : 672-678.
- 

*Sahabat paling baik dari kebenaran adalah Waktu, musuhnya yang paling besar adalah Prasangka, dan pengiringnya yang paling setia adalah Kerendahan Hati.*  
(Charles Caleb Colton)

*Ajaran utama untuk mencapai usia lanjut ialah menghindari kejemuan. Orang tidak boleh kehilangan keinginan. Keinginan merangsang kreativitas, cinta dan umur panjang. ( Alexander A. Bogomoletz)*