

Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan Teknik PCR pada Cairan Efusi Pleura Penderita Tuberkulosis Paru

*Diana Krisanti Jasaputra, Jahja Teguh Widjaja, Teresa Liliana Wargasetia,
Iryanthi Makangiras
Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung*

Abstract

Tuberculosis pleural effusion is a manifestation of extrapulmonary tuberculosis, which is rampant in various countries in the world, including Indonesia. Nowadays one-third of the world population has been infected by tuberculosis. Every year there are approximately 8 million new tuberculosis patients throughout the world and nearly 3 million people die of this disease every year. Pathogenesis of tuberculosis pleural effusion is a pleural hypersensitivity reaction accompanied by a small number of *Mycobacterium tuberculosis*. The objective of this research was to detect *Mycobacterium tuberculosis* in pleural effusion liquid by means of PCR technique to establish diagnosis of tuberculosis pleural effusion. On this research, detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR technique was compared with microscopic examination by means of Ziehl-Neelsen (ZN) method. The research result showed that 9 out of 11 samples were positive by using PCR technique whereas with ZN method all samples showed negative result. The conclusion of this research was that *Mycobacterium tuberculosis* in small numbers could be detected in pleural effusion liquid by means of PCR technique so that diagnosis could certainly be established.

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, Pleural Effusion

Pendahuluan

Dewasa ini sepertiga penduduk dunia telah terinfeksi tuberkulosis, setiap tahun terdapat sekitar 8 juta penderita baru tuberkulosis di seluruh dunia dan hampir 3 juta orang meninggal setiap tahun akibat penyakit ini. Paling sedikit satu orang akan terinfeksi tuberkulosis setiap detik, dan setiap 10 detik akan ada satu orang yang meninggal akibat tuberkulosis di dunia. Tuberkulosis membunuh hampir satu juta wanita setiap tahun, angka ini lebih tinggi dari kematian wanita akibat proses kehamilan dan persalinan, dan tuberkulosis membunuh 100.000 anak setiap tahunnya. Sampai saat ini tidak ada satu negara pun di dunia ini yang telah bebas tuberkulosis. Data WHO menunjukkan bahwa negara Indonesia

adalah penyumbang kasus tuberkulosis terbesar ketiga di dunia. Jumlah penderita tuberkulosis menular di Indonesia adalah 262.000 orang setiap tahun dan jumlah seluruh penderita baru adalah 583.000 orang pertahunnya. Orang Indonesia yang meninggal akibat tuberkulosis diperkirakan sekitar 140.000 setiap tahunnya.¹

Efusi Pleura TB terutama disebabkan oleh proses eksudasi. Angka kejadian efusi pleura adalah 31% dari seluruh penderita TBC Paru. Hipotesis terakhir mengenai patogenesis efusi pleura TB adalah adanya fokus perkejuan di daerah subpleural yang pecah ke dalam rongga pleura dalam 6-12 minggu setelah infeksi primer. Antigen *Mycobacterium tuberculosis* yang masuk ke dalam rongga pleura

berinteraksi dengan sel-sel T, dan segera tersensitisasi oleh *Mycobacterium tuberculosis* tersebut. Hal ini menyebabkan reaksi hipersensitivitas tipe lambat dan akumulasi cairan. Cairan tersebut umumnya eksudat, namun mungkin juga berupa cairan serous dan biasanya mengandung kuman *Mycobacterium tuberculosis* dalam jumlah kecil.²

Diagnosis konvensional efusi pleura yang disebabkan oleh tuberkulosis selama ini adalah dengan gejala klinik, radiologi dan laboratorium (rivalta, BTA/kultur sputum dan tes mantoux). Kelemahan diagnosis di atas adalah hasil rivalta dapat positif diduga karena penyebab selain infeksi tuberkulosis misalnya; haemoptoe, pneumonia, tumor dan infark paru. Sedangkan untuk diagnosis tuberkulosis paru digunakan *gold standard* BTA sputum dan radiologi paru atau tanpa radiologi, sedang untuk tes mantoux karena di Indonesia merupakan daerah endemik tuberkulosis maka pada infeksi tuberkulosis hasil tes mantoux sering positif palsu. Pemeriksaan konvensional yaitu dengan mikroskop dan kultur untuk diagnosis tuberkulosis memiliki keterbatasan yaitu pemeriksaan mikroskopik memerlukan jumlah kuman yang banyak untuk pendeteksian (5.000 - 10.000 kuman/cc) dan cara kultur memerlukan waktu pertumbuhan yang lama (6-8 minggu).³

Salah satu teknik pemeriksaan yang relatif baru dan sedang populer adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Prinsip utama teknik ini adalah amplifikasi DNA kuman sehingga deteksi dapat dilakukan. Identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* dengan teknik PCR dapat dilakukan dengan cepat dan tidak memerlukan jumlah kuman yang banyak. Penelitian ini mendeteksi

kuman *Mycobacterium tuberculosis* dengan teknik PCR pada sampel penelitian berupa cairan efusi pleura penderita tuberkulosis paru. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan hasil pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen dari rekam medis RS Immanuel Bandung.

Subjek dan Lokasi Penelitian

Subjek Penelitian : pasien yang telah didiagnosis secara klinik dan radiologis menderita efusi pleura yang pertama kali datang di Rumah Sakit Immanuel Bandung.

Kriteria Inklusi :

1. Penelitian dilakukan terhadap penderita efusi pleura kasus baru yang diduga karena tuberkulosis yang belum pernah mendapatkan terapi di Rumah Sakit Immanuel / Sub Bagian Paru Bagian Ilmu Penyakit Dalam, mulai Maret 2005 sampai Desember 2005.
2. Penderita laki-laki dan perempuan usia 15 tahun ke atas (>14 tahun dianggap dewasa).

Kriteria Eksklusi :

1. Penderita efusi pleura *suspect* proses spesifik yang sedang memperoleh pengobatan anti TBC.
2. Penderita efusi pleura yang usianya belum mencapai 15 tahun.
3. Penderita efusi pleura oleh sebab-sebab lain.

Lokasi penelitian adalah di Laboratorium Penelitian & Pengembangan Ilmu Kedokteran Dasar (LP2IKD) Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha & Laboratorium Biotek Rumah Sakit Rajawali Bandung.

Bahan, Alat dan Cara Kerja Penelitian

Bahan yang digunakan pada pemeriksaan PCR yaitu cairan efusi pleura, isopropanol, proteinase K, etanol, buffer lisis, H₂O free DNA, KIT PCR (terdiri atas enzim DNA polymerase, dNTPs, buffer 10 ×), sepasang primer, agarose, buffer TAE, *loading dye*, *parafilm*, kontrol positif, dan kontrol negatif. Sedangkan alat-alat yang digunakan adalah tabung Eppendorf (1,5 ml dan 0,2 ml), tip berbagai ukuran, pipet mikro, alat sentrifugasi, *waterbath*, alat elektroforesis, dan iluminator UV.

Tahapan awal prosedur kerja pemeriksaan PCR adalah isolasi DNA. Cairan efusi pleura dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml. Kemudian dilakukan sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 13.000 rpm dan supernatan dibuang. Selanjutnya ditambahkan 250 µl larutan buffer lisis dan 10 µl (10 mg/ml) proteinase K ke dalam tabung Eppendorf tadi. Kemudian campuran tadi dimasukkan ke dalam *waterbath* selama 1 jam pada suhu 55°C sambil sesekali dikocok secara perlahan-lahan. Kemudian campuran tersebut didiamkan dalam suhu kamar selama 5 menit. Setelah itu, campuran ditambah 100 µl larutan *protein precipitation* dan divorteks dengan kecepatan tinggi selama 20 detik serta dilakukan sentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 6.000 rpm. Kemudian supernatan dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml yang diisi 300 µl larutan isopropanol, selanjutnya tabung dibolak-balikkan sampai terlihat endapan. Kemudian campuran tersebut disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 13.000 rpm, setelah itu supernatan dibuang, dan endapan ditambah 300 µl larutan etanol 70 %,

disentrifugasi selama 1 menit pada 6.000 rpm. Lalu supernatan dibuang dan dikeringkan di atas kertas tisu. Tabung berisi hasil isolasi DNA tersebut ditutup dengan *parafilm* yang dilubangi secukupnya.

DNA kemudian dikeringkan dan dilarutkan dalam 20 µl larutan H₂O, di"*updown*" lalu dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 65°C selama 30 menit.

Tahapan selanjutnya adalah proses PCR yang diawali dengan penyiapan sampel: 1 µl DyNAzyme 1U, 39 µl H₂O, 5 µl buffer 10 ×, 1 µl 10mM dNTP Mix, 1 µl primer *forward*, 1 µl primer *reverse*, dan 2 µl DNA sampel dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 200 µl.

Pada penelitian ini digunakan kontrol positif KIT untuk mengetahui apakah reagen-reagen dari kit masih baik. Reagen-reagen berikut ini dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf : 0,5 µl DyNAzyme, 40,5 µl H₂O, 5 µl buffer 10 ×, 1 µl 10mM dNTP Mix, 1 µl Primer 1, 1 µl Primer 2, 1 µl λ DNA. Selain itu juga digunakan kontrol positif sampel dan kontrol negatif untuk pengontrolan kualitas PCR.

PCR diawali dengan tahap denaturasi awal selama 5 menit. PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. Setiap siklus terdiri atas tahapan denaturasi pada 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada 50°C selama 2 menit dan pemanjangan rantai pada 72°C selama 1 menit. Kemudian tahap pemanjangan rantai akhir dilakukan dalam waktu 5 menit pada 72°C.

Untuk visualisasi hasil PCR, dilakukan elektroforesis dengan cara sebagai berikut :

a. Pembuatan Gel Agarose :

Gel Agarose dibuat dengan menambahkan agarose sebanyak 0,35

gram dan larutan TAE 1× sebanyak 35 ml ke dalam tabung Erlenmeyer. Lalu campuran tersebut dididihkan. Setelah uap panas menghilang, ditambahkan 1,2 µl Etidium Bromida ke dalam campuran. Lalu campuran dituangkan ke dalam plat agar dan dibiarkan hingga memadat.

b. Elektroforesis :

Agar diletakkan dalam alat elektroforesis yang telah dipenuhi oleh larutan TAE 1×. Kemudian sampel, kontrol +, kontrol - yang akan diperiksa dicampur dengan *loading dye* di atas *parafilm*. Setelah itu kemudian dimasukkan ke dalam sumur-sumur pada agar. Kemudian elektroforesis dijalankan selama 20 menit. Hasilnya dilihat dengan sinar UV.

Hasil dan Pembahasan

Sampel-sampel penelitian diambil dari para pasien yang secara klinis didiagnosis menderita efusi pleura tuberkulosis dengan gejala antara lain: sesak, nyeri dada, batuk dan panas badan. Subjek penelitian sebanyak 11 orang dengan kisaran usia 15-70 tahun. Dari tabel 1 dapat dilihat bahwa

penderita efusi pleura paling banyak dijumpai pada usia 31-40 tahun. Data epidemiologi subjek penelitian menunjukkan bahwa jumlah penderita efusi pria lebih banyak dibandingkan wanita.

Secara radiologis semua penderita menunjukkan adanya gambaran efusi pleura namun ada yang menunjukkan infiltrat tuberkulosis dan ada pula yang tanpa infiltrat tuberkulosis. Data hasil pemeriksaan secara mikroskopik (Ziehl-Neelsen) dan hasil PCR disajikan pada tabel 2.

Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* secara mikroskopik (Ziehl-Neelsen) menunjukkan hasil yang negatif pada semua penderita, sedangkan dari hasil PCR menunjukkan hasil 9 positif dan 2 negatif. Dari hasil penelitian tampak bahwa deteksi kuman *Mycobacterium tuberculosis* dari cairan efusi pleura dengan menggunakan teknik PCR lebih sensitif bila dibandingkan dengan pemeriksaan Ziehl-Neelsen secara mikroskopik sehingga dapat memberikan diagnosis tuberkulosis yang lebih akurat.

Tabel 1. Data Epidemiologi Subjek Penelitian

Usia	Pria	Wanita	Jumlah
15 – 20	1	0	1
21 – 30	2	0	2
31 – 40	3	1	4
41 – 50	0	1	1
51 – 60	0	0	0
61 – 70	3	0	3
Jumlah	9	2	11

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Secara Mikroskopik (Ziehl-Neelsen) dan Hasil PCR

Ziehl-Neelsen	PCR		Jumlah
	⊕	⊖	
⊕	0	0	0
⊖	9	2	11
Jumlah	9	2	11

Kesimpulan

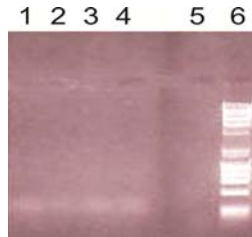
Kuman *Mycobacterium tuberculosis* dalam jumlah kecil dapat dideteksi dalam cairan efusi pleura dengan teknik PCR sehingga diagnosis pasti dapat ditegakkan.

Daftar Pustaka

1. Aditama T.Y. *Tuberkulosis Diagnosis, Therapi & Masalahnya*. Edisi IV.IDI. Jakarta, 2002; 24-25, 144.
2. Khatami, K. Pleural Tuberculosis. Shiraz E-Medical Journal University of Medical Sciences, Department of Internal Medicine. 2000.
3. Hanifa U., Soemohardjo S., Achmad H, Widodo M.A. *Perbandingan Pemeriksaan PCR, Kultur M.tuberculosis dan BTA Cairan Pleura Serta Pemeriksaan Radiologi Paru untuk Menegakkan Diagnose Efusi Pleura Tuberkulosis di Rumah Sakit Umum Mataram*, 2001; <http://digilib.brawijaya.ac.id>. Accessed on 20 /5/ 2005.

Lampiran

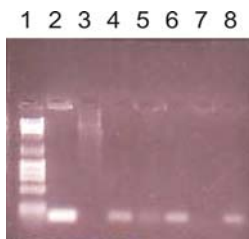
Hasil deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan teknik PCR dapat dilihat pada gambar 1,2, dan 3 berikut ini.



Ket. gambar:

1. Kontrol positif
2. Sampel no. 1 (+)
3. Sampel no. 2 (+)
4. Sampel no. 3 (+)
5. Kontrol negatif
6. Marker

Gambar 1. Hasil deteksi *M. tuberculosis* dengan PCR



Ket. gambar:

1. Marker
2. Kontrol positif
3. Kontrol negatif
4. Sampel no. 4 (+)
5. Sampel no. 5 (+)
6. Sampel no. 6 (+)
7. Sampel no. 7 (-)
8. Sampel no. 8 (+)

Gambar 2. Hasil deteksi *M. tuberculosis* dengan PCR



Ket. gambar:

1. Marker
2. Kontrol positif
3. Kontrol negatif
4. Sampel no. 9 (+)
5. Sampel no. 10 (-)
6. Sampel no. 11 (+)

Gambar 3. Hasil deteksi *M. tuberculosis* dengan PCR

