

Optimasi suhu amplifikasi DNA pada *quantitative polymerase chain reaction* untuk identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* resistan isoniazid

(Optimization of DNA amplification temperature in quantitative polymerase chain reaction for Identification of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*)

Dwi Veni Endarwati^{1*}, Asep Iin Nur Indra², Acep Tantan², Yogi Khoirul Abror², Betty Nurhayati², Fusvita Merdekawati²

¹Jurusan Teknologi Laboratorium Medik, Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Indonesia

²Bidang Biologi Molekuler, Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Indonesia

Diterima: 15 Januari 2024 | Direvisi: 31 Maret 2024 | Disetujui: 2 April 2024

Terbit daring: 15 Juni 2024

Abstrak

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan merupakan ancaman serius bagi kesehatan global. Metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi bakteri penyebab TB adalah *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR). Pada metode ini, suhu denaturasi dan ekstensi merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan yang perlu dioptimalkan. Penelitian ini bertujuan mengoptimasi suhu denaturasi dan ekstensi pada amplifikasi DNA *M. tuberculosis*. Penelitian menggunakan desain *quasi* eksperimen. Suhu yang dioptimasi adalah 93, 94, 95, 96, dan 97°C untuk denaturasi dan 58, 59, 60, 61, dan 62°C untuk ekstensi. Sampel uji adalah sampel dahak sebanyak 1 mL yang dikoleksi dari pasien dengan *M. tuberculosis* yang resistan terhadap isoniazid. Optimasi dilakukan menggunakan tujuh primer uji, yaitu S315T, S315N, S315I, S315R, S315G, S315L, dan R463B dengan target gen *katG*. Data hasil optimasi diolah dengan MS Excel dengan mengambil nilai Ct paling rendah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu optimal untuk denaturasi berbeda-beda untuk setiap primer yang digunakan. Primer S315T, S315R, dan S315G optimal pada suhu denaturasi 96°C, primer S315N optimal pada 94°C, primer S315I dan R463B optimal pada 93°C, dan primer S315L optimal pada 95°C, dengan suhu yang paling banyak digunakan adalah 96°C. Suhu ekstensi optimal pada 58°C untuk primer S315T, S315N, S315I, dan R463B, pada 60°C untuk primer S315R dan S315G, dan pada 61°C untuk primer S315L. Dapat disimpulkan bahwa suhu optimal pada penelitian untuk denaturasi adalah 96°C dan untuk ekstensi adalah 58°C.

Kata kunci: *Mycobacterium tuberculosis* | nilai Ct | *real time* PCR | suhu denaturasi | suhu ekstensi

Abstract

Tuberculosis (TB) is a disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* and is a serious threat to global health. The methods can be used to detect and identify the bacteria is quantitative polymerase chain reaction (qPCR). In this method, denaturation and extension temperatures are determining factors of success that needs to be optimized. This study aims to optimize denaturation and extension temperatures in *M. tuberculosis* DNA amplification. The research used quasi-experimental design. The denaturation temperature optimized were 93, 94, 95, 96, and 97°C, and the extension temperature optimized were 58, 59, 60, 61, and 62°C. The test sample was a 1 ml sputum sample isolated from a patient with isoniazid-resistant *M. tuberculosis*. Optimization was performed using seven test primers, namely S315T, S315N,

* Penulis korespondensi: E-mail: venendarwatidwi@gmail.com

© The Author(s) 2024. This article is licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution, and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, and indicate if changes were made.

S315I, S315R, S315G, S315L, and R463B with the *katG* gene target and data analysis using Ms Excel. Data optimization results were processed with Excel by taking the lowest Ct value. The results showed that the optimization temperatures for denaturation were different for each primer used. Primers S315T, S315R, and S315G, optimal with denaturation temperature of 96°C, primer S315N optimal with 94°C, primers S315I and R463B optimal with 93°C, and for primer S315L optimal with 95°C, with the most widely used temperature is 96°C. The optimal extension temperature was 58°C for primers S315T, S315N, S315I, and R463B, at 60°C for primers S315R and S315G, and at 61°C for primer S315L. In conclusion, the optimal denaturation temperature in this study was 96°C and the optimal extension temperature was 58°C.

Keywords: Ct value | denaturation temperature | extension temperature | *Mycobacterium tuberculosis* | real time PCR

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) ialah suatu penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan telah menjadi tantangan kesehatan secara global. Pada tahun 2021, diperkirakan terdapat sekitar 10,6 juta kasus TB di seluruh dunia, dengan 6 juta kasus pada pria, 3,4 juta kasus pada wanita, dan 1,2 juta kasus pada anak-anak (WHO, 2022). Pada saat ini, Indonesia berada pada peringkat kedua, setelah India, dengan jumlah kasus TB tertinggi di dunia. Pada tahun 2022, kasus TB di Indonesia mencapai lebih dari 700 ribu (Kemenkes, 2022).

Penyakit TB biasanya menyerang paru-paru dan dapat juga memengaruhi organ tubuh yang lain. Infeksi TB dapat menyebar melalui udara, yaitu ketika seseorang yang terinfeksi batuk atau bersin, sehingga menjadikan penyakit ini sangat menular. Orang yang terinfeksi TB dapat mengalami gejala seperti batuk yang berlangsung lama, demam, penurunan bobot badan, dan kelelahan. Strategi eliminasi TB telah dicanangkan oleh Organisasi Kesehatan Dunia (World Health Organization, WHO), yang bertujuan secara signifikan untuk mengurangi beban penyakit TB dan menghentikan penyebarannya. Salah satu cara untuk menghentikan penyebaran adalah upaya diagnosis dengan pemeriksaan yang tepat dan cepat pada pasien TB (WHO, 2022).

Metode pemeriksaan di negara endemik TB yang banyak digunakan adalah pemeriksaan mikroskopis (Kemenkes 2020). Pemeriksaan

mikroskopis BTA (bakteri tahan asam, karena *M. tuberculosis* merupakan bakteri yang tahan asam), mempunyai sensitivitas yang rendah, memiliki kualitas yang berbeda-beda, dan belum mampu menunjukkan kepekaan terhadap obat yang digunakan. Metode lain yang biasanya digunakan untuk mendeteksi TB adalah metode tes cepat molekuler (TCM) dengan alat GeneXpert MTB/RIF. WHO telah merekomendasikan TCM sebagai metode pemeriksaan yang dapat mengidentifikasi keberadaan *M. tuberculosis* yang resistan terhadap rifampisin secara simultan. Inisiasi dini terapi yang akurat dapat diberikan untuk mengurangi kasus TB secara umum. Hasil penelitian skala besar menunjukkan bahwa pemeriksaan TCM mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik dibandingkan pemeriksaan mikroskopis. Akan tetapi, pemeriksaan metode TCM ini terbatas hanya untuk pendeteksian resistansi terhadap rifampisin (Affiyanti *et al.*, 2023).

Metode lain untuk pemeriksaan TB ialah dengan *quantitative* PCR (qPCR). Pemeriksaan qPCR dapat sangat spesifik dalam mendeteksi *M. tuberculosis*. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Ginting & Krisdianilo (2021) melaporkan bahwa beberapa hasil yang tidak terdeteksi dengan pemeriksaan mikroskopis BTA dapat dideteksi dengan teknik qPCR. Selain itu, metode qPCR dapat mendeteksi *M. tuberculosis* yang resistan terhadap isoniazid, sedangkan TCM hanya terbatas pada pendeteksian *M. tuberculosis* yang resistan terhadap rifampisin

(Habous *et al.*, 2019). Penelitian yang dilakukan oleh Deniariasih *et al.* (2013) menyebutkan bahwa suhu ekstensi yang optimal dan yang umum digunakan untuk deteksi target gen *katG multidrug resistance tuberculosis* (MDR-TB) dengan metode PCR adalah pada suhu 56°C dengan waktu yang diperlukan selama 2 menit.

Deteksi MDR-TB terhadap resistansi beberapa obat dengan metode qPCR telah banyak diteliti. Deteksi gen *katG* MDR-TB dengan metode qPCR banyak dilakukan pada urutan kodon 315 (Rahmaryani *et al.*, 2017; Franco-Sotomayor *et al.*, 2019). Resistansi isoniazid terjadi ketika bakteri *M. tuberculosis* mengembangkan mutasi yang membuat bakteri tersebut tidak terpengaruh oleh obat. Mutasi ini bisa terjadi secara alami atau diinduksi oleh penggunaan obat yang tidak tepat. Mutasi yang paling sering menyebabkan resistansi isoniazid adalah mutasi pada gen *katG*, yang mengkode enzim *katG* (Purkan *et al.*, 2016). Enzim *katG* bertanggung jawab untuk mengkatalisis detoksifikasi isoniazid. Mutasi pada gen *katG* dapat menyebabkan perubahan pada struktur enzim *katG* yang menyebabkan ketidakmampuan bakteri mengkatalisis detoksifikasi isoniazid (Jhun & Koh, 2020; Fauziah *et al.*, 2020).

Penelitian sebelumnya menunjukkan rentang suhu ekstensi metode qPCR yang optimal dan paling umum digunakan untuk deteksi *Plasmodium falciparum* ialah 60–72°C (Feranisa, 2016). Belum terdapat penelitian tentang suhu denaturasi dan suhu ekstensi pada sampel sputum untuk deteksi *M. tuberculosis*. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh suhu denaturasi dan ekstensi DNA yang optimal untuk identifikasi *M. tuberculosis* yang resistansi terhadap isoniazid dengan menggunakan metode qPCR pada tujuh primer.

Metode

Etik dan rancangan penelitian

Penelitian ini sudah dinyatakan layak etik oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung (No. 44/KEPK/EC/XII/23).

Jenis penelitian yang digunakan adalah *Quasi Eksperimen*. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa variasi suhu denaturasi dan suhu ekstensi. Variasi suhu denaturasi dan suhu ekstensi yang dipilih mencakup rentang suhu yang sesuai untuk amplifikasi DNA *M. tuberculosis*. Pada penelitian ini menggunakan variasi suhu denaturasi 93, 94, 95, 96, dan 97°C dan suhu ekstensi 58, 59, 60, 61, dan 62°C.

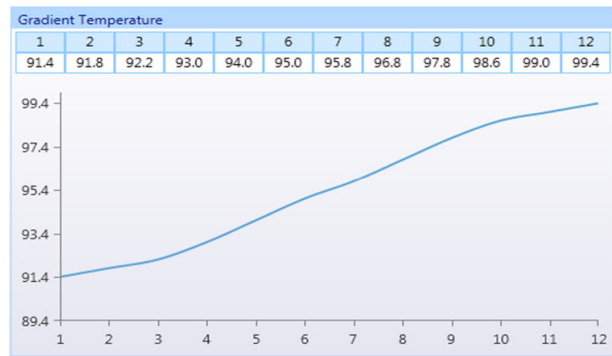
Real time PCR

Penelitian ini menggunakan sampel dahak penderita TB yang resistansi isoniazid yang diperoleh dari Laboratorium Provinsi Jawa Barat. DNA diekstraksi dengan metode *spin column*. Isolat DNA selanjutnya digunakan untuk proses optimasi suhu deteksi *M. tuberculosis* metode qPCR. Tujuh primer gen *katG* S315 dan R463 yang digunakan dalam proses qPCR adalah dari Ligo macrogen Singapore. Formulasi qPCR dilakukan dengan mencampurkan GoTaq® Green Master Mix, Primer, dan templat DNA. Suhu denaturasi dan ekstensi pada proses qPCR yang akan dioptimasi diatur dengan menggunakan komputer yang terhubung dengan qPCR (Gentier 96, Tianlong, China). Ct ideal yang digunakan ialah 19–25 (Narang *et al.*, 2022).

Proses amplifikasi diawali dengan proses transkripsi balik (*reverse transcription*) yang dilakukan pada denaturasi awal pada suhu 95°C selama 2 menit dalam 1 siklus. Selanjutnya, proses denaturasi (sesuai dengan variasi suhu pada rancangan penelitian) dilakukan selama 15 detik, annealing pada suhu 5°C dalam waktu 1 menit, dan ekstensi pada suhu 58°C dalam waktu 1 menit, dengan masing-masing dilakukan sebanyak 40 siklus. Pada tahap akhir, *cooling* dilakukan pada suhu 35°C selama 30 detik dalam 1 siklus. Proses amplifikasi pada penelitian ini dilanjutkan dengan ekstensi pada variasi suhu ekstensi seperti disebutkan pada rancangan penelitian.

Variasi suhu denaturasi dan suhu ekstensi dilakukan dengan *mode gradient* seperti pada

Gambar 1. Kolom yang sesuai dengan penelitian ini adalah pada kolom 4, 5, 6, 7, dan 8. Masing-masing kolom terdapat variasi lima suhu denaturasi (93, 94, 95, 96, dan 97°C) dan lima variasi suhu ekstensi (58, 59, 60, 61, dan 62°C), seperti pada **Gambar 2**. Pengaturan dilakukan untuk setiap blok dengan gen target *katG* pada kodon 315 untuk primer S315T, S315N, S315I, S315R, S315G, S315L dan kodon 463 untuk primer R463B.



Gambar 1 Gradient variasi suhu denaturasi yang digunakan dalam penelitian.

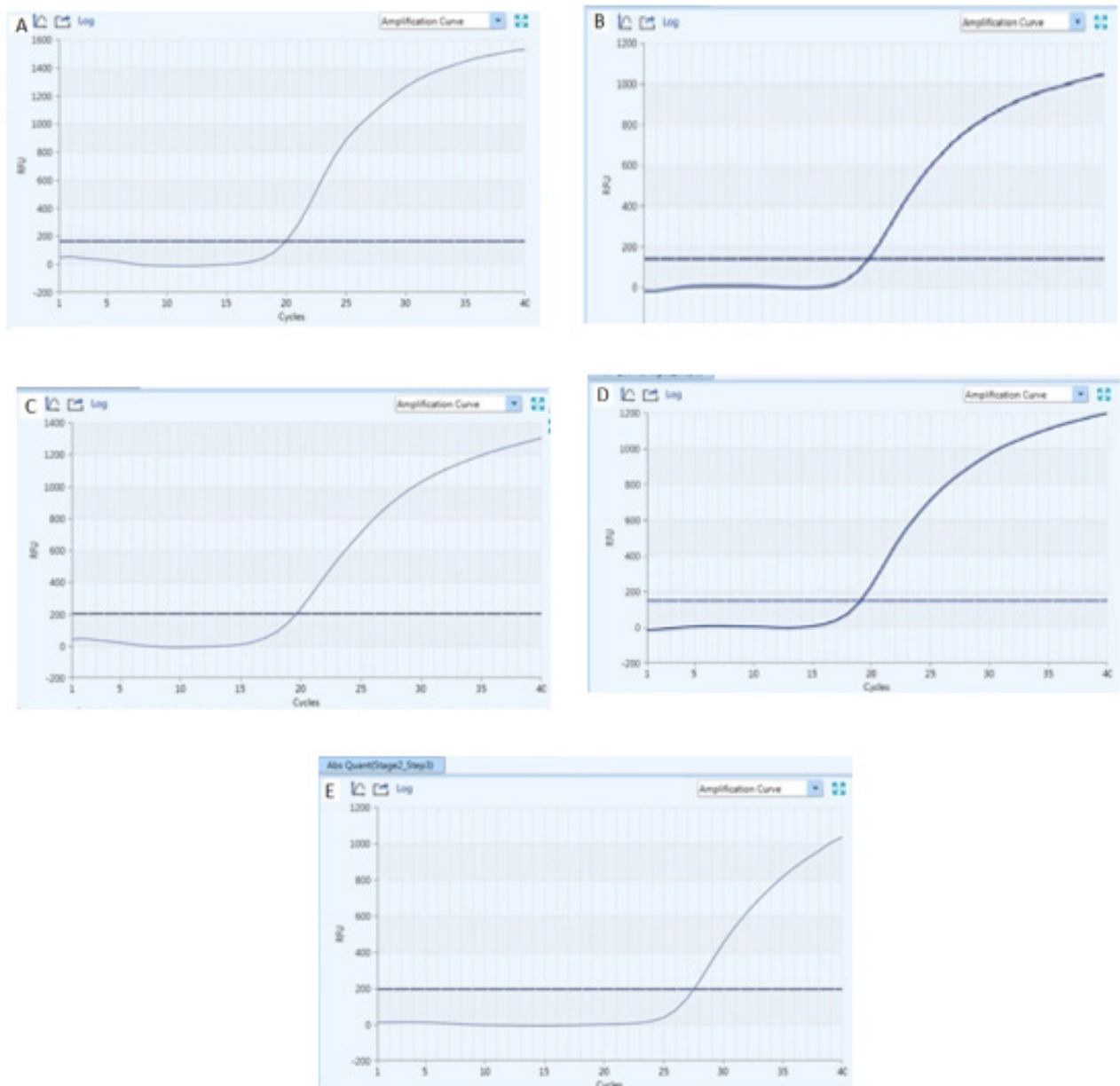
4	5	6	7	8
Primer 1/T SYBR Green I Ref Dye	Primer 1/T SYBR Green I Ref Dye	Primer 1/T SYBR Green I Ref Dye	Primer 1/T SYBR Green I Ref Dye	Primer 1/T SYBR Green I Ref Dye
Primer 2/N SYBR Green I Ref Dye	Primer 2/N SYBR Green I Ref Dye	Primer 2/N SYBR Green I Ref Dye	Primer 2/N SYBR Green I Ref Dye	Primer 2/N SYBR Green I Ref Dye
Primer 3/I SYBR Green I Ref Dye	Primer 3/I SYBR Green I Ref Dye	Primer 3/I SYBR Green I Ref Dye	Primer 3/I SYBR Green I Ref Dye	Primer 3/I SYBR Green I Ref Dye
Primer 4/R SYBR Green I Ref Dye	Primer 4/R SYBR Green I Ref Dye	Primer 4/R SYBR Green I Ref Dye	Primer 4/R SYBR Green I Ref Dye	Primer 4/R SYBR Green I Ref Dye
Primer 5/G SYBR Green I Ref Dye	Primer 5/G SYBR Green I Ref Dye	Primer 5/G SYBR Green I Ref Dye	Primer 5/G SYBR Green I Ref Dye	Primer 5/G SYBR Green I Ref Dye
Primer 6/L SYBR Green I Ref Dye	Primer 6/L SYBR Green I Ref Dye	Primer 6/L SYBR Green I Ref Dye	Primer 6/L SYBR Green I Ref Dye	Primer 6/L SYBR Green I Ref Dye
Primer 7/B SYBR Green I Ref Dye	Primer 7/B SYBR Green I Ref Dye	Primer 7/B SYBR Green I Ref Dye	Primer 7/B SYBR Green I Ref Dye	Primer 7/B SYBR Green I Ref Dye

Gambar 2 Pemetaan sampel dan gen target penelitian.

Penelitian ini menggunakan konsentrasi 400 nM untuk primer S315T, S315I, S315G, S315L, dan R463B, konsentrasi 200 nM untuk primer S315N, dan konsentrasi 300 nM untuk primer S315R. Hasil kurva amplifikasi pada berbagai variasi suhu ditunjukkan oleh **Gambar 3**.

Kurva amplifikasi pada **Gambar 3** menunjukkan kurva pada suhu ekstensi, masing masing mewakili tujuh primer yang berbeda, yaitu primer S315T, S315N, S315I, S315R, S315G, S315L, dan R463B

dengan variasi lima suhu denaturasi. Sebagai contoh, **Gambar 3.A** menunjukkan kurva amplifikasi yang terbentuk dari hasil optimasi suhu ekstensi 58°C; **Gambar 3.B** menunjukkan kurva amplifikasi yang terbentuk dari hasil optimasi suhu ekstensi 59°C, dan seterusnya untuk **Gambar 3.C-E**. Secara visual, kurva yang terbentuk hampir sama. Namun, jika dilihat dari nilai Ct, ketujuh primer memiliki nilai Ct yang berbeda-beda. Perbedaan nilai Ct tersebut dapat dilihat selengkapnya pada **Tabel 1**.



Gambar 3 Kurva amplifikasi pada lima variasi suhu ekstensi: A. 58°C, B. 59°C, C. 60°C, D. 61°C, dan E. 62°C.

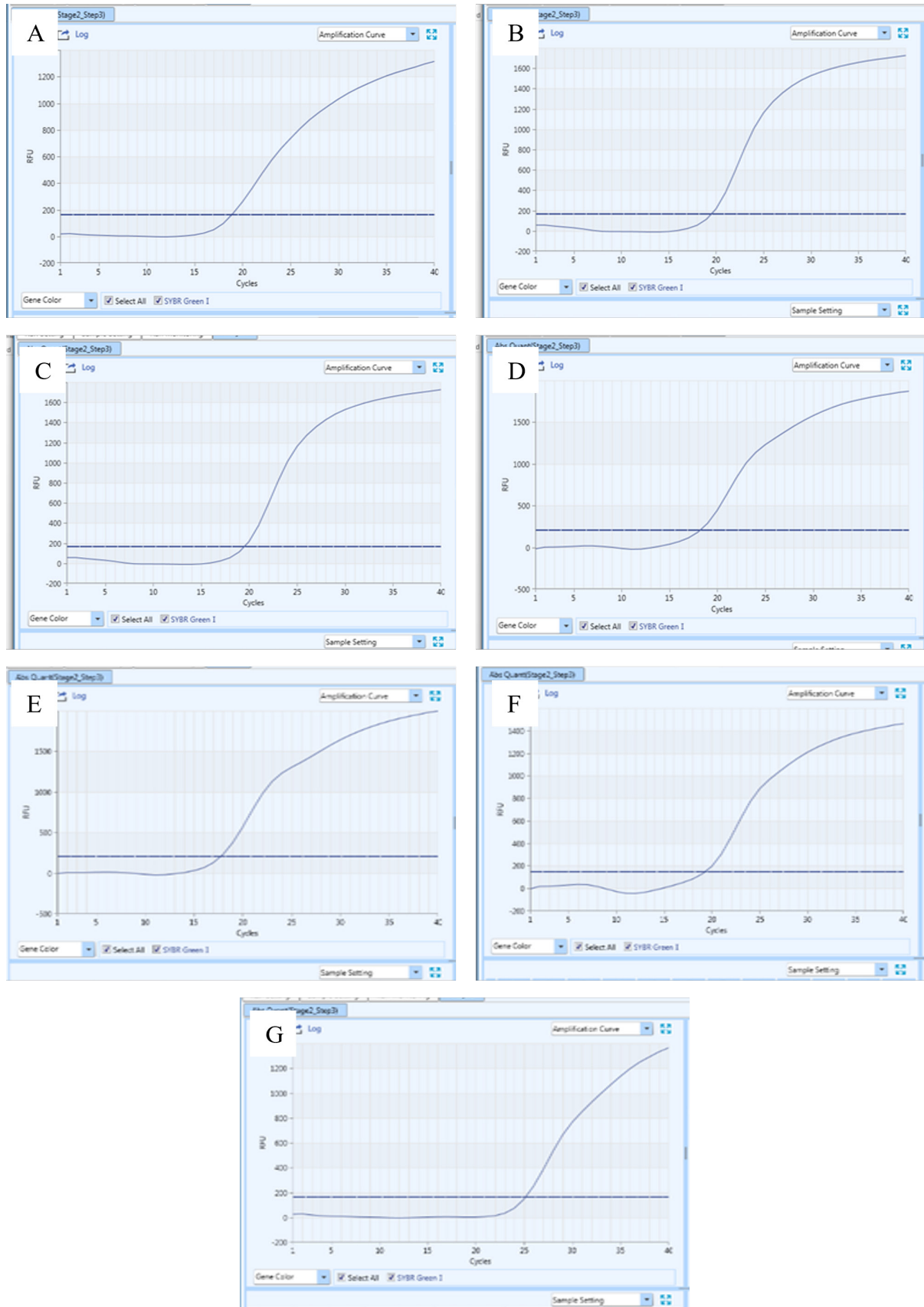
Pada hasil optimasi pada tujuh primer dengan lima suhu denaturasi dan lima suhu ekstensi didapatkan hasil nilai Ct seperti terlihat pada **Tabel 1**. Hasil Ct terendah berturut-turut ialah 18,941; 19,535; 18,754; 18,238; 17,746; 19,309;

dan 25,207 masing-masing untuk primer S315T, S315N, S315I, S315R, S315G, S315L, dan R463B, di mana kurva amplifikasi ditampilkan pada **Gambar 4**.

Tabel 1 Hasil optimasi suhu denaturasi dan ekstensi pada metode real time PCR untuk deteksi DNA *Mycobacterium tuberculosis*

Primer (konsentrasi)	Suhu ekstensi (°C)	Nilai Ct pada variasi suhu denaturasi				
		93°C	94°C	95°C	96°C	97°C
S315T (400 nM)	58	19,238	19,27	19,605	18,941	19,543
	59	20,121	19,949	19,52	19,34	19,363
	60	19,738	19,48	19,879	19,434	19,676
	61	20,184	20,012	22,973	19,129	20,566
	62	20,809	19,965	19,793	19,832	20,199
S315N (200 nM)	58	19,879	19,535	19,949	19,598	19,566
	59	20,277	19,965	20,176	20,09	20,027
	60	20,324	19,957	19,887	19,973	19,98
	61	26,465	25,926	26,129	26,145	25,645
	62	21,137	20,512	20,457	20,535	20,246
S315I (400 nM)	58	18,754	19,254	19,426	18,785	19,559
	59	21,074	20,402	20,098	19,637	20,582
	60	20,004	19,152	18,934	19,051	19,176
	61	20,465	19,348	19,488	19,887	19,801
	62	21,09	20,145	19,863	19,824	19,887
S315R (300 nM)	58	20,512	20,105	19,965	19,887	20,988
	59	21,527	19,965	20,184	20,34	20,355
	60	20,973	18,871	18,746	18,238	19,098
	61	24,457	20,668	20,223	20,486	20,496
	62	25,449	20,238	20,027	20,074	20,863
S315G (400 nM)	58	20,355	19,238	19,293	19,473	19,348
	59	20,715	19,488	19,449	19,637	19,605
	60	19,504	18,277	17,746	17,684	18,418
	61	22,34	20,207	19,973	19,863	20,074
	62	23,449	20,035	19,996	19,684	20,871
S315L (400 nM)	58	20,348	20,137	20,379	20,246	20,379
	59	20,387	20,121	20,465	20,379	19,879
	60	20,691	20,449	19,809	19,941	19,848
	61	19,91	19,551	19,309	19,879	20,504
	62	20,262	19,746	19,699	19,941	19,504
R463B (400 nM)	58	25,207	25,574	25,965	25,512	26,074
	59	25,605	25,746	25,996	26,145	25,785
	60	26,41	25,621	26,402	27,41	26,793
	61	27,027	26,332	26,496	26,418	26,543
	62	27,559	26,535	26,98	27,207	27,35

Angka yang dicetak tebal merupakan nilai Ct terendah



Gambar 4 Kurva amplifikasi menggunakan tujuh primer yang berbeda dengan nilai Ct terkecil: A. Primer S315T, B. Primer S315N, C. Primer S315I, D. Primer S315R, E. Primer S315L, F. Primer S315G, dan G. Primer R463B.

Pembahasan

Pada penelitian ini, optimasi suhu denaturasi dan suhu ekstensi DNA dilakukan untuk mendapatkan kondisi suhu yang optimal untuk deteksi *M. tuberculosis* dengan menggunakan *real time* PCR. Penelitian ini menggunakan primer untuk mendeteksi *M. tuberculosis*, yaitu hasil Ct terendah berturut-turut ialah primer S315T 18,941; S315N 19,535; S315I 18,754; S315R 18,238; S315G 17,746; S315L 19,309; dan R463B 25,207. Selain itu, nilai Ct 18-26 digunakan sebagai bentuk validitas dari reagen yang digunakan. Penelitian ini meneliti optimasi baik suhu denaturasi dan suhu ekstensi yang digunakan untuk berbagai primer deteksi TB resistan isoniazid. Optimasi dalam penelitian ini ditentukan oleh suhu denaturasi atau ekstensi yang memiliki Ct paling rendah pada primer yang paling banyak atau mewakili sebagian besar dari ketujuh primer yang digunakan.

Secara umum, rentang suhu denaturasi DNA adalah 93–97°C, namun ada urutan target DNA tertentu yang terdenaturasi secara optimal pada suhu di luar rentang tersebut. Untuk menemukan suhu denaturasi optimal, maka dilakukan pengujian suhu dengan menggunakan PCR *gradient*. Oleh karena itu, proses optimasi suhu denaturasi pada penelitian ini menggunakan *mode gradient*. *Mode* tersebut memungkinkan untuk melakukan proses amplifikasi dengan suhu denaturasi yang berbeda pada waktu dan kondisi yang sama (Efrianti *et al.*, 2019; Bio-rad, 2022).

Penelitian Azzahra *et al.* (2019) memperlihatkan suhu denaturasi yang berbeda dapat menghasilkan Ct yang berbeda. Suhu denaturasi yang tinggi dapat meningkatkan spesifitas hasil denaturasi, sedangkan suhu denaturasi yang terlalu rendah dapat menyebabkan *template* DNA yang beruntai ganda tidak dapat terpisah dengan baik. Jika denaturasi tidak sempurna, maka DNA beruntai ganda dapat kembali saling berikatan atau primer tidak dapat menempel pada untai tunggal DNA hasil denaturasi, sehingga dapat menurunkan

sensitivitas hasil proses PCR (Handayani, 2019). Hasil dari optimasi suhu denaturasi dengan lima variasi suhu menunjukkan nilai Ct yang berbeda. Ct rendah menunjukkan bahwa kurva amplifikasi pada suhu denaturasi tersebut muncul terlebih dahulu dibandingkan dengan pada suhu yang lain. Hal tersebut disebabkan karena pada suhu tersebut (yang memiliki Ct rendah) akan memiliki jumlah DNA yang terdenaturasi lebih banyak dibandingkan dengan suhu yang lain.

Langkah terakhir dari amplifikasi PCR adalah ekstensi, di mana terjadi proses pemanjangan untai DNA baru yang dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target. Suhu ekstensi memungkinkan polimerase DNA untuk berikatan dengan primer secara efisien dan menghasilkan produk amplifikasi yang akurat. Suhu ekstensi pada empat primer (S315T, S315N, S315I, dan R463B) dari tujuh primer yang digunakan menghasilkan Ct rendah pada suhu 58°C, sementara pada primer S315R dan S315G terjadi pada suhu 60°C, dan primer S315L terjadi pada suhu 61°C. Penelitian Loiseau *et al.* (2023) menunjukkan bahwa suhu ekstensi yang optimal untuk PCR bergantung pada panjang target DNA. Suhu ekstensi yang terlalu tinggi dapat merusak DNA polimerase, sedangkan suhu ekstensi yang terlalu rendah dapat memperlambat proses pemanjangan primer.

Nilai Ct dari suatu reaksi juga bergantung pada jumlah templat yang digunakan pada awal reaksi. Jika jumlah templat pada awal reaksi dalam jumlah banyak maka siklus yang dibutuhkan agar produk memberikan sinyal fluoresensi menjadi relatif sedikit sehingga nilai Ct menjadi rendah. Sebaliknya, jika pada awal reaksi jumlah templat sedikit maka siklus yang dibutuhkan menjadi lebih banyak sehingga nilai Ct akan meningkat (Bio-rad, 2006).

Sensitivitas dapat diukur dari seberapa awal Ct suatu target muncul dalam suatu kurva amplifikasi. Ukuran sensitivitas sebenarnya diukur dari volume templat berdasarkan pada kesesuaian hasil yang diberikan kurva standar dengan jumlah templat

tanpa mengurangi efisiensi dari amplifikasi yang diinginkan (Life Technologies, 2022). Penelitian ini tidak menggunakan kurva standar sehingga parameter yang digunakan untuk optimalisasi suhu denaturasi dan suhu ekstensi hanya dilihat berdasarkan nilai Ct paling rendah.

Simpulan

Optimasi suhu denaturasi dan ekstensi untuk deteksi *M. tuberculosis* menggunakan *q*PCR pada tujuh primer (S315T, S315N, S315I, S315R, S315G, S315L, dan R463B) berdasarkan nilai Ct terendah menunjukkan suhu denaturasi optimal pada primer S315T, S315R dan S315G adalah pada suhu 96°C, primer S315N pada suhu 94°C, primer S315I dan R463B pada suhu 93°C, dan primer S315L pada suhu 95°C. Suhu denaturasi yang paling banyak digunakan pada ke-7 primer ini adalah 96°C. Sementara itu, suhu ekstensi optimal pada primer S315T, S315N, S315I, dan R463B adalah pada suhu 58°C, primer S315R dan S315G pada suhu 60°C, primer S315L pada suhu 61°C, dengan suhu ekstensi optimum yang dapat mewakili semua primer adalah pada suhu 58°C.

Ucapan terima kasih: Penulis mengucapkan terima kasih kepada Aditya, S.Tr.Kes, laboran di Laboratorium Biologi Molekuler, Poltekkes Kemenkes Bandung yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.

Pendanaan: DVE memperoleh pendanaan pada tahun 2023 melalui Program Tugas Belajar Kementerian Kesehatan RI.

Konflik kepentingan: Semua penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam penelitian ini.

Kontribusi penulis: DVE menulis naskah dan melaksanakan penelitian; AINI merancang penelitian; AC menganalisis hasil penelitian; serta YKA, FM, dan BN melakukan interpretasi data penelitian,

Referensi

Affiyanti W, Fauziah PN, Latifah I, Aditia E, Masdianto M. 2023. Sensitivitas dan spesifisitas GeneXpert pada suspek tuberkulosis di RSAL

dr. Mintohardjo. *ANAKES: Jurnal Ilmiah Analisis Kesehatan*, 9(1): 88–95.

Azzahra S, Merdekawati F, Hardiana AT, Mulia YS, Ernawati E. 2019. Optimasi volume templat DNA dan suhu denaturasi untuk deteksi *Brugia malayi* menggunakan real-time PCR. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*, 11(2): 198–203. DOI: 10.34011/JURISKESBDG.V11I2.740

Bio-rad. 2006. Real-time PCR applications guide. Link: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf. Downloaded: 18 Oktober 2023

Bio-rad. 2022. Maximize your optimization power. Buletin 2592. Link: https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2592.pdf. Downloaded: 17 Oktober 2023

Deniariasih NW, Ratnayani K, Yowani SC. 2013. Optimasi PCR (polymerase chain reaction) fragmen 724 pb gen *katG multi drug resistance tuberculosis* untuk meningkatkan produk amplifikasi. *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(3): 110–116.

Efrianti UR, Azizah N, Julio E, Nurjayadi M. 2019. Deteksi bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhimurium* berbasis real time PCR. Prosiding Program Kreativitas Mahasiswa. Hlm 8. Link: <https://simbelmawa.kemdikbud.go.id/prosiding/pkm/article/view/57/49>. Downloaded: 17 October 2023.

Fauziah PN, Romlah S, Asrori AK. 2020. Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* dari kultur MGIT berdasarkan gen *katG*. *Journal of Indonesian Medical Laboratory and Science*, 1(1): 1–10. DOI: 10.53699/joimedlabs.v1i1.2

Feranisa A. 2016. Komparasi antara polymerase chain reaction (PCR) dan loop mediated isothermal amplification (LAMP) dalam diagnosis molekuler. *ODONTO: Dental Journal*, 3(2): 145–151. DOI: 10.30659/odj.3.2.145-151.

- Franco-Sotomayor G, Garzon-Chavez D, Leon-Benitez M, de Waard JH, Garcia-Bereguian MA. 2019. A first insight into the *katG* and *rpoB* gene mutations of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Ecuador. *Microbial Drug Resistance*, 25(4): 524–527. DOI: 10.1089/mdr.2018.0203.
- Ginting SS, Krisdianilo V. 2021. Seminar pemeriksaan dengan metode *real time polymerase chain reaction assay* (RT-PCR) sebagai tes cepat *Mycobacterium tuberculosis* dari sampel dahak pasien tuberculosis di Puskesmas Lubuk Pakam. *Jurnal Pengmas Kestra*, 1(2): 241–245.
- Habous M, E Elimam MA, Kumar R, L Deesi ZA. 2019. Evaluation of GeneXpert *Mycobacterium tuberculosis*/Rifampin for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampicin resistance in nonrespiratory clinical specimens. *International Journal of Mycobacteriology*, 8(2): 132–137. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_83_19.
- Handayani H. 2019. Metode deteksi tuberculosis. Ponorogo (ID): Uwais Inspirasi Indonesia.
- Jhun BW, Koh WJ. 2020. Treatment of isoniazid-resistant pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 83(1): 20–30. DOI: 10.4046%2Ftrd.2019.0065.
- Kemenkes RI [Kementerian Kesehatan Republik Indonesia]. 2020. Temukan TB obati sampai sembuh penatalaksanaan tuberkulosis resisten obat di Indonesia. Ed. Pambudi I, Lukitosari E, Dewi RK, Permata Y. Jakarta (ID): Kementerian Kesehatan RI.
- Kemenkes RI [Kementerian Kesehatan Republik Indonesia]. 2022. Profil kesehatan indonesia. Jakarta: Kemenkes RI. Link: <https://www.kemkes.go.id/id/indonesia-health-profile-2022>.
- Life technologies. 2022. Real-time PCR handbook. p. 70. Link: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>. Downloaded: 17 October 2023.
- Loiseau M, Boukhalfa A, Aouissi M. 2023. Optimization of PCR parameters for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 56(1): 53–60.
- Narang A, Marras SAE, Kurepina N, Chauhan V, Shashkina E, Kreiswirth B, Varma-Basil M, Vinnard C, Subbian S. 2022. Ultrasensitive detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using superselective primer-based real-time PCR assays. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24): 15752. DOI: 10.3390/ijms232415752.
- Purkan, Ihsanawati, Natalia D, Syah YM, Retnoningrum DS, Kusuma HS. 2016. Mutation of *katG* in a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase for isoniazid activation. *Ukrainian Biochemical Journal*, 88(5): 71–81. DOI: 10.15407/ubj88.05.071.
- Rahmaryani, IGAA, Ariani NK, Dewi DSW, Ani NKS, Sundari AA, Hartati KWY, Yowani SC. 2017. DNA probe design for detection mutation at codon 315 in *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis* to *real-time polymerase chain reaction*. *Journal of Health Sciences and Medicine*, 1(2): 31–41. DOI: 10.24843/JHSM.2017.v01.i02.p08.
- WHO [World Health Organization]. 2022. Global tuberculosis report 2022. Link: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>. Download: 17 October 2023.