

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) masih menjadi persoalan kesehatan utama secara global. Angka kasus TB selalu bertambah meskipun berbagai program penanggulangan telah dijalankan. Penyakit ini lebih dominan terjadi di negara-negara dengan status berkembang. Tuberkulosis adalah penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri. Jenis bakteri yang berkaitan erat dengan tuberkulosis, yaitu *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, dan *Mycobacterium canettii*. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri yang paling umum menyebabkan *tuberculosis* (Kemenkes, 2019).

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri patogen yang menyerang paru-paru dan sistem pernapasan (Kanabalan *et al.*, 2021). Bakteri ini ditularkan melalui *droplet* udara ketika individu yang terinfeksi batuk, bersin, atau berbicara, sehingga mempermudah penyebarannya dalam populasi padat. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dikategorikan sebagai bakteri yang sulit diberantas sepenuhnya sebab memiliki sifat mampu bertahan dalam fase *dormant* di dalam tubuh *host* yang turut meningkatkan risiko reaktivasi infeksi di kemudian hari (CDC, 2021).

Laporan *Global Tuberculosis Report 2024* dari *World Health Organization* (WHO) menempatkan TB sebagai salah satu dari sepuluh penyebab utama kematian di dunia serta menjadi penyakit infeksi dengan tingkat mortalitas tinggi. Penderita TB diperkirakan mencapai 10,8 juta orang dengan tingkat kematian mencapai 1,4 juta kematian per tahun, baik di kalangan penderita TB biasa maupun TB resisten obat (WHO, 2024). Kasus TB di Indonesia senantiasa menjadi masalah kesehatan yang mendesak, menempati urutan kedua dunia setelah India dalam jumlah kasus TB terbanyak, dengan insiden mencapai 1.060.000 dan kematian sebanyak 134.000 (Kemenkes RI, 2023).

Upaya mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* secara cepat dan akurat menjadi hal yang krusial khususnya bagi Indonesia saat ini. Deteksi dini *Mycobacterium tuberculosis* sangat penting untuk menekan penyebaran infeksi, mengurangi

mortalitas, serta mencegah terjadinya resistensi obat, yang menjadi masalah besar dalam penanganan TB (CDC, 2021). Metode deteksi *Mycobacterium tuberculosis* yang konvensional, seperti pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen atau kultur bakteri di laboratorium, memiliki beberapa keterbatasan. Pemeriksaan mikroskopis adalah metode yang cepat dan murah namun pemeriksaan ini memiliki sensitivitas yang rendah sebab memerlukan spesimen sputum sekurang-kurangnya 500 *mycobacterial*/ml guna mencapai sensitivitas tinggi (Fadla *et al.*, 2018; Rasyid, 2020). Pemeriksaan baku emas untuk diagnosis penyakit TB seperti metode kultur juga memiliki kekurangan yakni memakan waktu lama yaitu sekitar 4-6 minggu untuk mendapatkan hasil. Lamanya waktu yang dibutuhkan untuk kultur tersebut memperlambat penanganan TB melalui diagnosis dan pengobatan (Fadla *et al.*, 2018; Rasyid, 2020). Proses diagnosa dan pengobatan yang lambat menyebabkan pasien TB terus menularkan penyakit, sehingga menjadi masalah kesehatan masyarakat yang serius.

Metode diagnostik berbasis molekuler yang mampu mendeteksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* melalui sampel klinis, seperti sputum, menjadi solusi potensial di era perkembangan teknologi kesehatan saat ini. Metode *polymerase chain reaction* (PCR) menawarkan waktu deteksi yang lebih singkat dan sensitivitas serta spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan metode konvensional (Fahiruddin *et al.*, 2022). *Polymerase Chain Reaction* dapat mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan daya lacak yang tinggi atau dengan sensitivitas yang lebih tinggi, yaitu sebanyak 40 (90,0%) sampel positif dari 44 sampel pasien penderita TBC (Widaningsih *et al.*, 2012). Metode PCR sangat bergantung pada kualitas dan kuantitas DNA yang diekstraksi dari sputum sebab berdampak langsung terhadap keberhasilan proses PCR.

Sputum merupakan salah satu sampel utama yang digunakan untuk mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* guna menegakkan diagnosis TB dan tersusun oleh bahan yang kompleks. Sputum mengandung berbagai jenis zat penghambat, seperti lendir, protein, dan senyawa organik lain yang dapat mengganggu proses ekstraksi DNA dan amplifikasi pada PCR (Kolia-Diafouka *et al.*, 2018). Metode ekstraksi DNA seperti kit komersial sering digunakan untuk mendapatkan DNA yang bersih

dan berkualitas. Penggunaan kit komersial tersebut tetap menghadapi berbagai keterbatasan, seperti biaya yang tinggi, durasi pengerjaan yang lama, prosedur yang rumit, serta tuntutan peralatan laboratorium modern yang belum tentu tersedia di daerah dengan sumber daya terbatas (Abdel-latif and Osman, 2018; Eslami *et al.*, 2017). Metode ekstraksi DNA yang tepat sangat penting untuk diterapkan di negara berkembang seperti Indonesia.

Salah satu pendekatan yang semakin diminati dalam beberapa tahun terakhir adalah metode ekstraksi DNA dengan teknik *boiling*. Metode ini menawarkan prosedur yang lebih sederhana, di mana dinding sel bakteri dihancurkan melalui pemanasan pada suhu tinggi, sehingga DNA dapat dilepaskan ke dalam larutan dan selanjutnya digunakan untuk keperluan diagnostik molekuler. Kelebihan dari teknik *boiling* yaitu tidak memerlukan bahan kimia berbahaya atau peralatan laboratorium yang mahal, pengerjaan untuk ekstraksi yang mudah dan tidak membutuhkan waktu yang lama. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam teknik *boiling* adalah durasi dan suhu pemanasan yang digunakan. Waktu pemanasan yang terlalu lama maupun terlalu singkat akan menghambat tingkat efektivitas ekstraksi, sama halnya dengan suhu yang terlalu tinggi maupun terlalu rendah. Kedua faktor tersebut dapat memicu kerusakan DNA atau tidak cukupnya waktu maupun suhu untuk merusak dinding sel secara optimal (Fihiruddin *et al.*, 2022). Optimalisasi lebih lanjut diperlukan untuk menentukan kondisi durasi dan suhu yang paling ideal dalam ekstraksi DNA menggunakan metode *boiling*.

Sejumlah penelitian telah membahas mengenai penggunaan metode *boiling* untuk mengekstraksi DNA. Thakur *et al.* (2011) membandingkan empat metode ekstraksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) dari sampel cairan serebrospinal (CSF) guna menentukan metode terbaik untuk amplifikasi asam nukleat dalam diagnosis meningitis tuberkulosis menggunakan PCR real-time. CSF disimpan pada suhu -20°C dan kemudian diinokulasi dengan konsentrasi MTB tertentu (10–10³ CFU/ml). Metode ekstraksi yang menggunakan metode *boiling*, di mana sampel dipanaskan pada suhu 95°C dengan waktu 5 menit. Perlakuan ini dilakukan untuk melemahkan dinding sel MTB agar DNA lebih mudah diekstraksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode kombinasi manual (*boiling*) dan

otomatis dengan MagNA PureR (protokol 4) memiliki sensitivitas terbaik dengan batas deteksi 100 salinan DNA MTB per reaksi PCR, dibandingkan dengan metode lainnya yang hanya mampu mendeteksi hingga 1.000 salinan per reaksi. Kelemahan dari penelitian ini adalah sampel CSF memiliki jumlah bakteri yang lebih sedikit dibandingkan sampel paru, sehingga efektivitas ekstraksi DNA tetap menjadi tantangan (Thakur *et al.*, 2011). Tarhan dan Ceyhan (2017) juga melakukan evaluasi terhadap tiga metode ekstraksi DNA dari sputum, salah satu metode yang dikaji adalah metode *boiling*. Mereka menemukan bahwa metode *boiling* selama 20 menit di suhu 100°C memiliki sensitivitas yang mampu menghasilkan DNA dengan jumlah cukup untuk deteksi menggunakan PCR, namun kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan cenderung rendah (Tarhan and Ceyhan, 2017). Elshahawy *et al.* (2021) mengevaluasi metode *boiling* ekstraksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* yang diperoleh langsung dari sputum positif dari pasien tuberkulosis. Sensitivitas metode *boiling* dalam menghasilkan DNA dari sampel sputum sekitar 43,75%, menyebabkan DNA yang dihasilkan berkualitas rendah dan kurang murni (Elshahawy *et al.*, 2021). Setianingsih *et al.* (2024) melakukan ekstraksi untuk mendeteksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Ia menyatakan bahwa pemanasan pada 95°C memastikan bahwa DNA bebas dari kontaminan seperti protein dan lipid (Setianingsih *et al.*, 2024). Penelitian ini tidak memuat informasi *detail* terkait durasi optimal yang digunakan.

Jumlah bakteri dalam sputum pasien pada diagnostik TB dapat sangat rendah sehingga kualitas dan kuantitas DNA yang diekstraksi menjadi sangat krusial. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi pengaruh durasi dan suhu *boiling* terhadap kualitas dan kuantitas ekstraksi DNA dari sputum pasien TB, sehingga dapat menghasilkan metode yang optimal untuk digunakan dalam mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* diagnosis TB.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana perbandingan hasil konsentrasi DNA sputum metode *boiling* dan kit komersial?

2. Bagaimana perbandingan hasil kemurnian DNA sputum metode *boiling* dan kit komersial?
3. Bagaimana pengaruh durasi dan suhu *boiling* terhadap kuantitas dan kualitas DNA?
4. Bagaimana efektivitas metode *boiling* dalam mengekstraksi DNA?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh durasi dan suhu *boiling* terhadap kualitas dan kuantitas hasil ekstraksi DNA dari sputum untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Gambaran perbandingan hasil konsentrasi DNA sputum metode *boiling* dan kit komersial.
2. Gambaran perbandingan hasil kemurnian DNA sputum metode *boiling* dan kit komersial.
3. Menganalisis pengaruh durasi dan suhu *boiling* terhadap kualitas dan kuantitas DNA sputum yang diekstraksi.
4. Menganalisis efektivitas metode *boiling* dalam mengekstraksi DNA.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Masyarakat

1. Mempermudah diagnosis dini TBC melalui metode yang lebih efisien dan akurat, sehingga meningkatkan peluang pengobatan yang tepat waktu.
2. Membantu pengendalian penyebaran TBC dengan mempercepat deteksi kasus aktif.

1.4.2 Perkembangan Ilmu Pengetahuan

1. Menjadi acuan dalam pengembangan teknik ekstraksi DNA yang lebih efektif untuk aplikasi diagnostik molekuler.
2. Menambah wawasan ilmiah tentang pengaruh suhu dan durasi *boiling* terhadap kualitas dan kuantitas DNA yang diekstraksi.

1.4.3 Penelitian

1. Memberikan parameter optimal untuk ekstraksi DNA sputum yang dapat diterapkan atau divalidasi lebih lanjut.
2. Membuka peluang pengembangan metode diagnostik berbasis molekuler yang sederhana dan terjangkau untuk patogen lain.

