

ABSTRAK

Judul : Optimasi Deteksi Multiplex *Multidrug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) dengan metode *Real-Time PCR* (q-PCR)
Nama : Farah Dianisa Surya
Program Studi : Bioteknologi

Kata Kunci: Tuberkulosis, MDR-TB, gen *katG*, gen *rpoB*, Multiplex, Real-Time PCR

Tuberkulosis adalah suatu penyakit menular yang disebabkan oleh kuman pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulosis (TB) masih menjadi masalah kesehatan global. Adanya kasus MDR-TB membuat beban penyakit TB semakin bertambah. MDR-TB merupakan suatu kejadian yang menyebabkan bakteri MTB kebal terhadap OAT. MDR-TB merupakan masalah besar terhadap pencegahan dan pemberantasan TB di dunia maupun di Indonesia. Metode pemeriksaan TB yang masih menjadi *baku emas* saat ini memiliki banyak kelemahan antara lain waktu pemeriksaan yang lama dan kesulitan membedakan sampel TB dan MDR-TB. Oleh karena itu diperlukan metode alternatif yang dapat mendiagnosis TB dan MDR-TB secara cepat, tepat dan akurat menggunakan Real-Time PCR (qPCR).

Tujuan dari penelitian ini adalah menguji keberhasilan desain probe multiplex melalui metode qPCR dalam mendeteksi gen multiplex bakteri *M. tuberculosis* pada sampel MDR-TB. Hasil penelitian akan memberikan informasi yang tepat mengenai optimasi deteksi mutasi gen multiplex pada sampel pasien MDR-TB.

Pada penelitian ini digunakan probe gen multiplex *M.tuberculosis* yang telah didesain untuk deteksi isolat DNA klinis dari sampel sputum pasien TB.

Sebelumnya telah dilakukan pengujian gen singleplex dengan cara membandingkan validasi hasil SYBR dan Probe. Sampel klinis yang telah diuji dengan SYBR memiliki hasil terbaik dipilih dan diuji coba ulang dengan qPCR berbasis probe spesifik gen *katG* dan *rpoB*. Pengujian dengan probe sebagai pembanding ini dapat menilai dan memvalidasi hasil yang lebih akurat mengenai ketepatan dari primer yang telah di desain dalam mendeteksi keberadaan mutasi

pada gen *katG* dan *rpoB* di sampel klinis. Didapatkan kurva amplifikasi yang berbeda pada SYBR dan Probe dengan hasil yang muncul yaitu nilai C_q yang berbeda dan terdapat kenaikan 2 puncak yang berbeda. Pasien yang diklasifikasikan sebagai TB memiliki kurva yang diamplifikasi lebih awal dan plasmid TB diamplifikasi lebih awal. Sedangkan pasien MDR-TB kurva diamplifikasi lebih lambat dibandingkan kurva TB, hal ini menunjukkan bahwa nilai C_q pada TB lebih rendah daripada nilai C_q MDR-TB.

Hasil optimasi qPCR menggunakan sampel pasien MDR-TB menunjukkan nilai C_q yang tidak berbeda jauh antara TB dan MDR-TB dan dihasilkan suhu annealing 60C. Keberhasilan amplifikasi qPCR menggunakan probe gen multiplex (*katG* dan *rpoB*) menunjukkan bahwa desain probe telah spesifik mengamplifikasi gen tersebut. Hasil statistik uji t-test unpaired menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan dari nilai C_q antara TB dan MDR-TB yang ditunjukkan dengan nilai p value $>0,05$.

Tidak adanya perbedaan nilai C_q antara TB dan MDR-TB dikarenakan sampel MDR-TB terlalu sedikit sehingga tidak cukup untuk mewakili pengujian dan kemungkinan sampel yang diperoleh bukan sampel MDR-TB tetapi masih tergolong sampel TB, sehingga diperlukan *genome sequencing* untuk memastikan urutan genome yang dimiliki dan probe dari salah satu gen yaitu probe gen *rpoB* terlalu pendek.

ABSTRACT

Title : Optimization of Multiplex Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) Detection with the Real-Time PCR (q-PCR) method
Name : Farah Dianisa Surya
Study Program : Biotechnology

Keywords: *Tuberculosis, MDR-TB, katG gene, rpoB gene, Multiplex, Real-Time PCR*

Tuberculosis is an infectious disease caused by the pathogen Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (TB) is still a global health problem. The presence of MDR-TB cases increases the burden of TB disease. MDR-TB is an event that causes MTB bacteria to be resistant to OAT. MDR-TB is a big problem in preventing and eradicating TB in the world and in Indonesia. The TB examination method, which is still the gold standard at present, has many weaknesses, including long examination times and difficulty in differentiating TB and MDR-TB samples. Therefore, alternative methods are needed that can diagnose TB and MDR-TB quickly, precisely and accurately using Real-Time PCR (qPCR).

The aim of this study was to test the success of a multiplex probe design using the qPCR method in detecting multiplex genes for M. tuberculosis bacteria in MDR-TB samples. The research results will provide precise information regarding optimization of multiplex gene mutation detection in MDR-TB patient samples.

In this study, an M.tuberculosis multiplex gene probe was used which was designed to detect clinical DNA isolates from TB patient sputum samples.

Previously, singleplex gene testing had been carried out by comparing the validation of SYBR and Probe results. Clinical samples that had been tested with SYBR with the best results were selected and retested with qPCR based on specific probes for the katG and rpoB genes. Testing with this probe as a comparison can

assess and validate more accurate results regarding the precision of the designed primers in detecting the presence of mutations in the katG and rpoB genes in clinical samples. Different amplification curves were obtained for SYBR and Probe with the results that emerged, namely different Cq values and an increase in 2 different peaks. Patients classified as TB had an early amplified curve and an early amplified TB plasmid. Meanwhile, for MDR-TB patients, the curve amplified more slowly than the TB curve, this shows that the Cq value in TB is lower than the Cq value for MDR-TB.

The results of qPCR optimization using MDR-TB patient samples showed Cq values that were not much different between TB and MDR-TB and produced an annealing temperature of 60C. The success of qPCR amplification using multiplex gene probes (katG and rpoB) shows that the probe design specifically amplifies these genes. The statistical results of the unpaired t-test show that there is no significant difference in the Cq value between TB and MDR-TB as indicated by a p value >0.05.

There is no difference in Cq values between TB and MDR-TB because the MDR-TB samples are too small so they are not enough to represent the test and it is possible that the samples obtained are not MDR-TB samples but are still classified as TB samples, so genome sequencing is needed to confirm the genome sequence that is available. and the probe from one of the genes, namely the rpoB gene probe, is too short.