

## **SKRIPSI**

**IDENTIFIKASI BAKTERI *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* PADA SAMPEL SPUTUM PENDERITA TB DENGAN METODE MULTIPLEX QUANTITATIVE REAL TIME PCR (qRT-PCR)**



Oleh:  
ULIYA FITRI AINI  
NIM: 2110262133

**PROGRAM STUDI DIV TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS  
FAKULTAS ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS PERINTIS INDONESIA  
PADANG  
2025**



a).Tempat/tgl: Pekanbaru/08 Maret 2003; b).Nama Orang Tua : (Ayah) Rakhmat (Ibu) Almh. Violita Linda ; c).Program Studi : Sarjana Terapan TLM; d).Fakultas Ilmu Kesehatan; e).No NIM : 2110262133;f).Tgl Lulus : 2025; g).Predikat lulus : ; h).IPK : 3,84; i).Lama Studi : 4 Tahun; j). Alamat: Jl. Tanjung Jaya Gg. Jaya No. 13, Kel. Tangkerang Utara, Kec. Bukit Raya, Kota Pekanbaru, Riau.

**IDENTIFIKASI BAKTERI *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* PADA SAMPEL SPUTUM PENDERITA TUBERKULOSIS (TB) DENGAN METODE MULTIPLEX QUANTITATIVE REAL TIME PCR (qRT-PCR)**

**SKRIPSI**

Oleh: Uliya Fitri Aini

Pembimbing: L. Dr. rer. nat. Ikhwana Resmala Sudji, M.Si. 2. M. Diki Juliandi, M.Biotek

**ABSTRAK**

Tuberkulosis (TB) yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* merupakan masalah kesehatan global, dengan Indonesia sebagai salah satu negara dengan beban TB tertinggi. Diagnosis dini dan pengobatan yang tepat sangat penting untuk mengendalikan penyebaran penyakit ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan bakteri infeksi paru, yaitu *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae*, pada sampel sputum penderita TB menggunakan metode Multiplex Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). Sampel sputum diambil dari empat pasien TB yang telah terkonfirmasi positif. DNA diisolasi dan dianalisis menggunakan kit CROWN Lab® Pneumoplex 3.0. Hasil menunjukkan adanya ko-infeksi bakteri non-TB pada semua sampel, dengan *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae* terdeteksi pada sebagian besar sampel. Metode qRT-PCR terbukti efektif dalam mengidentifikasi patogen infeksi paru, yang menyoroti pentingnya diagnosis komprehensif untuk penanganan TB yang lebih efektif. Temuan ini dapat membantu dalam pengembangan strategi pengobatan yang lebih personal dan meningkatkan hasil klinis bagi pasien TB.

**Kata kunci :** Tuberkulosis, Bakteri Patogen nonMTB, Multiplex Quantitative Real-Time PCR, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*.

Skripsi ini telah dipertahankan di depan sidang penguji dan dinyatakan LULUS pada 07 Agustus 2025

Abstrak ini telah disetujui oleh penguji:

Tanda Tangan			
Nama Terang	Dr. rer. nat. Ikhwana Resmala Sudji, M.Si	M. Diki Juliandi, M.Biotek	Prof. Dr. Suryani, M.Si

Mengetahui

Ketua Program Studi : Dr. Apt. Dewi Yudiana Shinta, M. Si

Tanda Tangan



a).Tempat/tgl: Pekanbaru/08 Maret 2003; b).Nama Orang Tua : (Ayah) Rakhmat (Ibu) Almh. Violita Linda ; c).Program Studi : Sarjana Terapan TLM; d).Fakultas Ilmu Kesehatan; e).No NIM : 2110262133;f).Tgl Lulus : 2025; g).Predikat lulus ; h).IPK : 3,84; i).Lama Studi : 4 Tahun; j). Alamat: Jl. Tanjung Jaya Gg. Jaya No. 13, Kel. Tungkerang Utara, Kec. Bukit Raya, Kota Pekanbaru, Riau.

**IDENTIFICATION OF *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, AND *Streptococcus pneumoniae* BACTERIA IN SPUTUM SAMPLES OF TUBERCULOSIS (TB) PATIENTS USING MULTIPLEX QUANTITATIVE REAL TIME PCR (qRT-PCR) METHOD**

**THESIS**

By: Uliya Fitri Aini

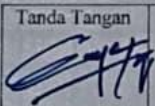
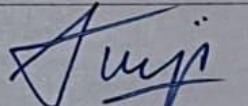
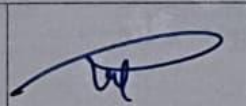
Mentor: L. Dr. rer. nat. Ikhwan Resmala Sudji, M.Si, 2. M. Diki Juliandi, M.Biotek

**ABSTRACT**

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is a global health issue, with Indonesia being one of the countries with the highest TB burden. Early diagnosis and appropriate treatment are crucial for controlling the spread of this disease. This study aims to identify the presence of co-infecting bacteria, namely *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, and *Streptococcus pneumoniae*, in sputum samples from TB patients using the Multiplex Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) method. Sputum samples were collected from four patients who had been confirmed positive for TB. DNA was isolated and analyzed using the CRown Lab® Pneumoplex 3.0 kit. The results indicated the presence of non-TB bacterial co-infections in all samples, with *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* detected in the majority of cases. The qRT-PCR method proved effective in identifying infecting pathogens, highlighting the importance of comprehensive diagnosis for more effective TB management. These findings may assist in the development of more personalized treatment strategies and improve clinical outcomes for TB patients.

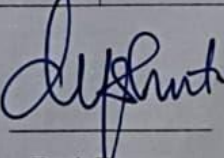
**Keywords :** Tuberculosis, Non-MTB Pathogenic Bacteria, Multiplex Quantitative Real-Time PCR, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*

This thesis was seccesfully defended before the examination board PASSED on August 07, 2025  
The abstract has been reviewed and accepted by the examiners:

Tanda Tangan			
Nama Terang	Dr. rer. nat. Ikhwan Resmala Sudji, M.Si	M. Diki Juliandi, M.Biotek	Prof. Dr. Suryani, M.Si

Mengetahui

Ketua Program Studi : Dr. Apt. Dewi Yudiana Shinta, M. Si

  
Tanda Tangan



### LEMBAR PERSETUJUAN

Judul : Identifikasi Bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* Pada Sampel Sputum Penderita Tuberkulosis TB dengan Metode Multiplex Quantitative Real Time PCR (RT-PCR)

Nama Mahasiswa : Uliya Fitri Aini

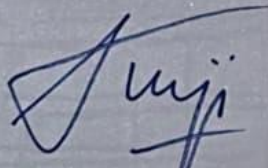
NIM : 2110262133

Program Studi : Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medik

Skripsi ini telah disetujui oleh Pembimbing untuk diajukan dihadapan dalam ujian skripsi penelitian, yang merupakan salah satu syarat menyelesaikan Pendidikan Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medik pada Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Perintis Indonesia.

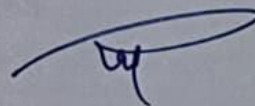
### Menyetujui Komisi Pembimbing

Pembimbing I



Dr. rer. nat. Ikhwan Resmala Sudji, M.Si  
NIDN : 1023097901

Pembimbing II



M. Diki Juliandi, M.Biotek  
NIDN : 1010079501

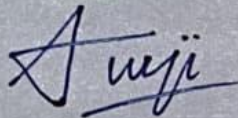
## HALAMAN PENGESAHAN

Identifikasi Bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* Pada Sampel Sputum Penderita Tuberkulosis (TB) dengan Metode Multiplex Quantitative Real Time PCR (RT-PCR)

Disusun oleh :  
Uliya Fitri Aini  
NIM : 2110262133

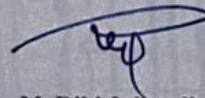
Telah diseminarkan dengan Pembimbing Seminar Skripsi Penelitian  
Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis  
Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Perintis Indonesia  
Pada Tanggal 07 Agustus 2025

Pembimbing I



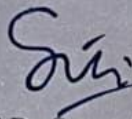
Dr. rer. nat. Ikhwan Resmala Sudji, M.Si  
NIDN: 1023097901

Pembimbing II



M. Diki Juliandi, M.Biotek  
NIDN : 1010079501

Penguji

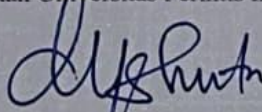


Prof. Dr. Suryani, M.Si  
NIDN. 0027056501

Skripsi ini telah memenuhi persyaratan  
Sebagai laporan penelitian akhir yang telah dikerjakan

Mengetahui:

Ketua Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis Fakultas  
Ilmu Kesehatan Universitas Perintis Indonesia



Dr. Apt. Dewi Yuliana Shinta, M. Si  
NIDN. 1016017002

## PERNYATAAN KEASLIAN PROPOSAL PENELITIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Uliya Fitri Aini

NIM : 2110262133

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi penelitian yang ditulis dengan judul **"IDENTIFIKASI BAKTERI *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* PADA SAMPEL SPUTUM PENDERITA TUBERKULOSIS (TB) DENGAN METODE MULTIPLEX QUANTITATIVE REAL TIME PCR (qRT-PCR)"** adalah kerja/karya sendiri dan bukan merupakan duplikat dari hasil karya orang lain, kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan. Jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar maka status kelulusan saya menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, Oktober 2025

Menyatakan



Uliya Fitri Aini

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Tuberkulosis (TBC) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* biasanya menyerang paru-paru. Ketika penderita Tuberkulosis batuk, bersin, berbicara, atau meludah, penyakit itu menyebar melalui percikan udara (*droplet*). TB aktif dapat membunuh 20% hingga 70% penderitanya dalam waktu sepuluh tahun jika tidak diobati, tergantung pada tingkat keparahannya (WHO, 2024).

Pada tahun 2022, ada 7,5 juta kasus TB di seluruh dunia dengan jumlah tertinggi sejak WHO memulai pemantauan TB global pada tahun 1995, yang mencakup banyak orang yang mengidap TB pada tahun-tahun sebelumnya, tetapi diagnosis dan pengobatannya tertunda oleh gangguan terkait COVID, yang menyebabkan sekitar 1,3 juta kematian secara global (WHO, 2023). Asia Tenggara menyumbang 46% dari perkiraan kasus TB secara global pada tahun 2022, lebih banyak dari wilayah WHO lainnya. India (27,0% dari kasus TB secara global), Indonesia (10%), Cina (7,1%), Filipina (7,0%), Pakistan (5,7%), dan Bangladesh (3,6%) adalah beberapa negara dan wilayah yang paling terkena dampak pada tahun 2022 (WHO, 2023).

Strategi *The WHO's End TB* dalam post-2015 yang mengikuti Strategi Stop TB bertujuan untuk mengakhiri epidemi TB global pada tahun 2035, sejalan dengan *Sustainable Development Goals* (WHO, 2022). Begitupun di Indonesia berusaha untuk menekan angka kenaikan TB dan kematian yang disebabkan oleh TB, melalui PERPRES No.67 Tahun 2021 Tentang Penanggulangan Tuberculosis Pasal 1 No. 2. Eliminasi TBC adalah pengurangan terhadap TBC secara berkesinambungan guna

menekan angka penyakit serendah mungkin agar tidak menjadi masalah kesehatan, No. 3. Penanggulangan TBC adalah segala upaya kesehatan yang mengutamakan aspek promotif dan preventif tanpa mengabaikan aspek kuratif dan rehabilitatif untuk melindungi kesehatan masyarakat, menurunkan angka kesakitan, kecacatan atau kematian, memutuskan penularan, mencegah resistensi obat TBC, dan mengurangi dampak negatif yang ditimbulkan akibat TBC. Pasal 4 Target Eliminasi TBC pada tahun 2030: a. penurunan angka kejadian (incidence rate) TBC menjadi 65 (enam puluh lima) per 100.000 (seratus ribu) penduduk; dan b. penurunan angka kematian akibat TBC menjadi 6 (enam) per 100.000 (seratus ribu) penduduk (PERPRES No. 67, 2021).

Segala upaya untuk menekan angka prevalensi dan kematian akibat TB telah diatur oleh organisasi kesehatan baik dalam skala nasional maupun internasional termasuk dengan meningkatkan kualitas pemeriksaan TB. Sebagian besar kasus TB dapat disembuhkan jika didiagnosis secara dini guna mendapatkan pengobatan yang tepat, sehingga dapat mengurangi penularan infeksi. Di fasilitas pelayanan kesehatan (fasyankes) yang tidak memiliki alat-alat penunjang diagnosis penyakit yang canggih melakukan pemeriksaan mikroskopik konvensional TB untuk mendiagnosa TB dan memantau pengobatan pasien TB dengan mendeteksi basil tahan asam (BTA) pada sediaan sputum dengan metode Ziehl Neelsen yang mana interpretasi hasilnya berdasarkan skala IUATLD (KEMENKES RI, 2023). Menurut (Aung et al., 2023) metode seperti mikroskopi apusan basil tahan asam (BTA) sederhana dan sensitif untuk diagnosis, tetapi tidak dapat menunjukkan jumlah BTA dalam sampel sebagai informasi yang diperlukan untuk mengawasi pengobatan anti-TB. Diperlukan metode yang lebih efektif dalam upaya untuk



mencapai diagnosis TB secara dini yang akurat dengan pertimbangan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi.

*Nucleic Acid Amplification Test* (NAAT) adalah teknik diagnostik molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi secara cepat dan akurat keberadaan asam nukleat dalam patogen seperti *Mycobacterium tuberculosis*. NAAT memungkinkan identifikasi langsung dari sampel klinis tanpa proses kultur yang lama dalam kasus diagnosis TB. Berdasarkan Surat Edaran Dirjen P2P Kemenkes RI Nomor 936 Tahun 2021, *Nucleic Acid Amplification Test* (NAAT) dengan kompleksitas rendah maupun sedang telah ditetapkan sebagai *gold standard* atau alat diagnostik utama untuk tuberkulosis (TB). Semua orang yang dianggap menderita tuberkulosis diharuskan menjalani pemeriksaan dengan menggunakan tes NAAT tersebut untuk mengetahui status resistensi mereka terhadap rifampisin dan Tes Cepat Molekuler (TCM) yang merupakan bagian dari NAAT kompleksitas rendah atau sedang digunakan oleh Program Tuberkulosis Nasional (KEMENKES RI, 2023).

TCM yang diatur KEMENKES sebagai *gold standard* pemeriksaan TB juga di diatur dalam program WHO periode 2023-2027. Pertemuan tingkat tinggi diadakan pada bulan September 2023, bersamaan dengan pertemuan tingkat tinggi tentang cakupan universal dan pencegahan, kesiapsiagaan, dan respons pandemi (prevention, preparedness and response / PPPR). Deklarasi politik tersebut mencakup komitmen dan target baru untuk periode 2023-2027 untuk mempercepat kemajuan dalam memberantas TBC. Target baru tersebut termasuk menjangkau 90% orang yang membutuhkan layanan pencegahan dan perawatan TB; menggunakan tes cepat yang direkomendasikan WHO sebagai metode pertama untuk mendiagnosis TB (WHO, 2023).

Tidak hanya memperhatikan metode pemeriksaan guna menekan prevalensi angka TB, namun juga perlu memikirkan faktor hambatan dari bakteri lainnya yang menginfeksi paru dikarenakan hal itu dapat mempengaruhi diagnosis, pengobatan, dan prognosis pasien tuberkulosis, yang merupakan hambatan utama dalam pemberantasan tuberkulosis. Infeksi sekunder yang disebabkan oleh bakteri infeksi paru lainnya menyebabkan komplikasi pada penderita TB. Maka perlu dilakukannya pemeriksaan dini dengan dugaan pneumonia pada penderita TB. Hal ini sangat penting guna menekan prevalensi TB yang disebabkan oleh faktor komplikasi, maka butuh metode diagnosa yang tepat. Dengan metode Multiplex Quantitative Real Time (qRT-PCR) maka bakteri infeksi paru penyebab komplikasi pada pasien TB dapat dideteksi dengan cepat dan akurat, sehingga terapi yang tepat dapat segera diberikan. Metode Multiplex Quantitative Real Time (qRT-PCR) dapat mendeteksi lebih dari satu jenis bakteri patogen (Grohmann et al., 2021)

Metode Multiplex Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) dapat mendeteksi bakteri paru lainnya seperti *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* dalam sekali pemeriksaan (Aung et al., 2023). Dengan demikian peneliti tertarik untuk melakukan “Identifikasi Bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* Pada Sampel Sputum Penderita TB dengan Metode Multiplex Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)”.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka di rumuskan masalah sebagai berikut “Apakah *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter*

*baumanni*, dan *Streptococcus pneumoniae* teridentifikasi pada sampel sputum penderita TB dengan metode Multiplex Quantitative Real Time (RT-PCR) ? ”

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Untuk mengidentifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* pada penderita TB dengan metode Multiplex Quantitative Real Time PCR (RT-PCR).

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Untuk mengidentifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada sputum penderita TB dengan metode Multiplex Quantitative RT-PCR.
2. Untuk mengidentifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* pada sputum penderita TB dengan metode Multiplex Quantitative RT-PCR.
3. Untuk mengidentifikasi bakteri *Acinobacter baumannii* pada sputum penderita TB dengan metode Multiplex Quantitative RT-PCR.
4. Untuk mengidentifikasi bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada sputum penderita TB dengan metode Multiplex Quantitative RT-PCR.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

1. Memperkaya pengetahuan ilmiah tentang metode deteksi bakteri paru Non *Mycobacterium tuberculosis* : *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* pada sputum penderita TB dengan metode Multiplex Quantitative RT-PCR.
2. Memberikan pemahaman lebih mendalam tentang Pneumoplex 3.0 sebagai alat dalam metode Multiplex RT-PCR untuk mengidentifikasi bakteri Non *Mycobacterium tuberculosis* : *Klebsiella pneumoniae*,

*Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* pada sputum penderita TB.

#### **1.4.2 Manfaat Praktis**

1. Menambah wawasan peneliti mengenai bakteri infeksi paru Non *Mycobacterium tuberculosis*.
- 2 Sebagai referensi bagi peneliti selanjutnya.



## **BAB V**

### **PEMBAHASAN**

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang umumnya menyerang paru-paru dan menyebar melalui percikan udara saat penderita batuk, bersin, atau berbicara. TB aktif dapat menyebabkan kematian 20–70% dalam sepuluh tahun tanpa pengobatan (WHO, 2024). Pada tahun 2022, tercatat 7,5 juta kasus TB di dunia, dengan Asia Tenggara menyumbang hampir setengahnya, termasuk Indonesia yang menjadi salah satu negara dengan beban TB terbesar (WHO, 2023).

Diagnosis dini dan pengobatan tepat sangat penting untuk menekan angka prevalensi dan penularan, dengan Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) dan Tes Cepat Molekuler (TCM) sebagai gold standar diagnosis TB (Kemenkes RI, 2023). Infeksi sekunder oleh bakteri paru non-TB dapat memperburuk kondisi pasien TB karena mempengaruhi kinerja dari efektivitas obat TB hal ini menyebabkan tingkat kesembuhan pasien rendah, sehingga metode Multiplex Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) yang mampu mendeteksi berbagai patogen secara cepat dan akurat menjadi penting dalam mendukung diagnosis dan terapi yang tepat. Umumnya, pengujian PCR menggunakan satu set primer (singleplex) untuk mengamplifikasi satu target spesifik. Namun, dengan menambahkan set primer kedua (duplex) atau beberapa set primer sekaligus (multiplex), amplifikasi berbagai target dalam satu reaksi dapat dilakukan secara paralel. Keunggulan utama dari metode PCR real-time multipleks (mpPCR) adalah kecepatan dalam pemeriksaan sampel. Metode ini memungkinkan throughput pengujian yang lebih tinggi, mengurangi kesalahan pipet, dan menentukan jumlah DNA yang dibutuhkan secara langsung. Selain itu,

proses validasi mencakup semua primer yang digunakan dalam satu kali uji, sehingga mempermudah dokumentasi. Melakukan beberapa reaksi PCR dalam satu tabung juga membantu menghemat bahan habis pakai dan reagen, sehingga mengurangi dampak lingkungan dari proses analisis (Grohmann et al., 2021). Karena spesifisitas yang lebih tinggi (dengan menggunakan probe) dan sensitivitas PCR real-time serta penerapannya yang lebih luas termasuk kuantifikasi, (Weidner et al., 2024). Pemeriksaan ini dilakukan sebagai langkah diagnostik molekuler untuk mendeteksi infeksi sekunder yang mungkin menyertai tuberkulosis, yang dapat memperparah kondisi klinis pasien.

### **5.1 Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* menggunakan Metode Multiplex Real Time Quantitative Real Time PCR dengan Kit Pneumoplex 3.0**

Hasil pemeriksaan pneumonia menggunakan metode Multiplex Quantitative Real Time PCR menunjukkan adanya infeksi bakteri paru non MTB pada sampel sputum penderita TB. Sampel RNA teridentifikasi positif untuk *Staphylococcus aureus* (Ct 28.80), *Klebsiella pneumoniae* (Ct 21.14), dan *Streptococcus pneumoniae* (Ct 33.21). Sampel HAR menunjukkan keberadaan *Staphylococcus aureus* (Ct 37.48), *Klebsiella pneumoniae* (Ct 20.25), *Acinobacter baumannii* (Ct 37.21), dan *Streptococcus pneumoniae* (Ct 34.43). Sampel SYAFL positif untuk *Klebsiella pneumoniae* (Ct 29.07) dan *Streptococcus pneumoniae* (Ct 32.57). Sementara itu, sampel SYAF hanya menunjukkan keberadaan *Staphylococcus aureus* (Ct 37.74). Nilai Ct yang bervariasi menunjukkan perbedaan konsentrasi DNA target dalam sampel, di mana nilai Ct yang lebih rendah mengindikasikan jumlah DNA target yang lebih tinggi.

Hasil penelitian ini menunjukkan dari empat sampel terdeteksi bakteri bakteri patogen non-TB pada setiap sampel dengan bakteri yang berbeda beda.

Keberadaan berbagai patogen ini didukung oleh penelitian (Liu et al., 2023) yang menyatakan bahwa *Klebsiella pneumoniae* merupakan salah satu patogen paling umum yang menyebabkan ko-infeksi pada pasien TB paru. Studi retrospektif di China (2019–2021) menemukan bahwa 31,4% pasien TB mengalami ko-infeksi bakteri, dengan *Klebsiella pneumoniae* dikonfirmasi pada 76 pasien. Sekitar 42% isolat *K. pneumoniae* bersifat multidrug-resistant (MDR). Ko-infeksi ini lebih sering terjadi pada pasien TB yang menjalani retreatment, dengan kebutuhan respiratory support yang lebih tinggi dan tingkat inflamasi lebih berat. Selain itu, pada kelompok pasien TB dengan ko-infeksi, juga ditemukan *A. baumannii* (2,6%) dan *S. aureus* (2,6%) sebagai patogen penyerta. Keberadaan berbagai patogen ini dalam satu sampel menegaskan efektivitas metode multiplex qRT-PCR dalam mendeteksi infeksi ganda, yang seringkali luput dari metode diagnostik konvensional (Grohmann et al., 2021).

Studi lain tahun 2024 melaporkan prevalensi ko-infeksi bakteri pada pasien TB paru sebesar 10,91%. *Acinobacter baumannii* ditemukan pada 31,57% kasus ko-infeksi, *Klebsiella pneumoniae* pada 26,31%, dan *Staphylococcus aureus* juga teridentifikasi meski dengan prevalensi lebih rendah. Baik *A. baumannii* maupun *K. pneumoniae* menunjukkan tingkat resistensi obat yang sangat tinggi (60–100%) terhadap berbagai kelas antibiotik. Penelitian ini menegaskan pentingnya deteksi dini ko-infeksi bakteri untuk mencegah komplikasi, memperbaiki diagnosis, dan menentukan terapi yang tepat pada pasien TB (Bir et al., 2024). Oleh karena itu metode Multiplex Quantitative Real Time

PCR (qRT-PCR) yang mampu mendeteksi berbagai patogen secara cepat dan akurat menjadi penting dalam mendukung diagnosis dan terapi yang tepat.

## **5.2 Relevansi Multiplex Real-Time qPCR dalam Diagnosis Klinik**

Multiplex qRT-PCR memungkinkan deteksi simultan berbagai patogen, termasuk bakteri atipikal dan gen resistensi antibiotik, yang seringkali tidak terdeteksi oleh metode konvensional. Panel pengujian untuk pneumonia dapat mendeteksi hingga 27 patogen utama dan 7 gen penanda resistensi antibiotik dalam sekali running (MENKES, 2023). Kemampuan ini sangat relevan dalam menghadapi tantangan resistensi antimikroba yang terus meningkat. Dengan mengidentifikasi gen resistensi secara langsung dari sampel klinis, klinisi dapat memilih antibiotik yang paling efektif sejak awal, menghindari penggunaan antibiotik yang tidak efektif dan berkontribusi pada upaya global untuk mengendalikan penyebaran resistensi. Oleh karena itu, integrasi multiplex qRT-PCR ke dalam alur kerja diagnostik rutin memiliki potensi besar untuk meningkatkan kualitas perawatan pasien dan efisiensi sistem kesehatan secara keseluruhan (Narasimhan et al., 2023).

## **5.3 Peran Nilai Ct dalam Interpretasi Klinis**

Nilai Cycle threshold (Ct) yang diperoleh dari analisis qRT-PCR memegang peranan krusial dalam interpretasi klinis hasil deteksi patogen. Nilai Ct secara langsung berbanding terbalik dengan jumlah materi genetik target awal dalam sampel semakin rendah nilai Ct, semakin tinggi konsentrasi DNA bakteri yang ada, dan sebaliknya. Dalam penelitian ini, variasi nilai Ct yang diamati untuk berbagai patogen ko-infeksi memberikan informasi kuantitatif mengenai beban bakteri masing-masing patogen. Misalnya, nilai Ct yang sangat rendah untuk *Klebsiella*



*pneumoniae* pada sampel HAR (Ct 20.25) menunjukkan beban bakteri yang tinggi, yang mungkin mengindikasikan infeksi aktif dan signifikan oleh patogen tersebut. Interpretasi nilai Ct ini memungkinkan klinisi untuk tidak hanya mengidentifikasi keberadaan patogen tetapi juga untuk memperkirakan tingkat keparahan infeksi dan memantau respons terhadap pengobatan (dr. Sadewa, 2022).

#### **5.4 Keunggulan Metode Multiplex qRT-PCR dalam Diagnosis**

Multiplex Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) telah membuktikan dirinya sebagai alat diagnostik yang revolusioner dalam penelitian ini, menawarkan keunggulan signifikan dibandingkan metode konvensional. Keunggulan utamanya adalah kemampuannya untuk mendeteksi beberapa target genetik secara simultan dalam satu reaksi tunggal. Ini tidak hanya menghemat waktu dan reagen secara substansial, tetapi juga meminimalkan risiko kontaminasi silang dan kesalahan pipet yang sering terjadi pada pengujian singleplex terpisah (Grohmann et al., 2021). Sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dari qRT-PCR yang ditunjukkan oleh nilai Ct yang rendah pada kontrol positif (Ct 14–17) dan tidak adanya amplifikasi pada kontrol negatif (Ct = N/A), menjamin hasil yang sangat akurat dan dapat diandalkan, bahkan untuk deteksi patogen dengan konsentrasi rendah.

Penggunaan probe fluoresen yang spesifik untuk setiap target bakteri (*Staphylococcus aureus* (Cy5), *Klebsiella pneumoniae* (FAM), *Acinobacter baumannii* (HEX), dan *Streptococcus pneumoniae* (ROX)) memungkinkan diferensiasi yang jelas dan identifikasi simultan dari berbagai patogen dalam satu sampel. Selain itu, keberadaan kontrol internal (IC) yang terdeteksi pada setiap sampel (Cy5-5) berfungsi sebagai validasi penting untuk memastikan integritas proses ekstraksi DNA dan efisiensi amplifikasi PCR, sehingga hasil negatif dapat

diinterpretasikan dengan keyakinan bahwa itu bukan karena kegagalan teknis. Akurasi, kecepatan, dan efisiensi multiplex qRT-PCR menjadikannya metode yang ideal untuk skrining rutin pada pasien TB yang berisiko tinggi mengalami ko-infeksi, serta untuk memantau respons terhadap terapi. Teknologi ini merepresentasikan langkah maju yang signifikan dalam diagnostik molekuler, berpotensi menjadi standar emas dalam diagnosis infeksi paru kompleks di masa depan (Zhang et al., 2022).