

**SKRIPSI**

**IDENTIFIKASI BAKTERI *Klebssiella pneumoniae*, *Stapylococcus aureus*, *Acinetoabacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae*  
DENGAN METODE MULTIPLEX RT-PCR PADA SAMPEL  
SALIVA PASIEN TB PARU**



**Oleh:**

**YAYAT JULIO  
NIM. 2110262094**

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



a).Tempat/tgl: Payakumbuh/31 Juli 2001; b).Nama Orang Tua: (Ayah) Gusedisel (Ibu) Syamsinar; c).Program Studi: Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis ; d).Fakultas Ilmu Kesehatan; e).No NIM: 2110262094; f).Tgl Lulus: 2025; g).Predikat lulus: Pujian; h).IPK: 3,68 ; i).Lama Studi: 4 Tahun; j). Alamat: Jln. Koto kociak kubu tapak rajo, Payakumbuh Utara.

**IDENTIFIKASI BAKTERI *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* DENGAN METODE MULTIPLEX RT-PCR PADA SAMPEL SALIVA PASIEN TB PARU**

**SKRIPSI**

Oleh: Yayat Julio

Pembimbing: 1. Dr.rer.nat. Ikhwan Resmala Sudji, M.Si, 2. Dra. Suraini, M.Si

**Abstrak**

Tuberkulosis paru (TB) merupakan salah satu penyakit menular yang masih menjadi masalah kesehatan global, terutama di negara berkembang. Pada pasien TB, infeksi sekunder oleh bakteri patogen seperti *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* sering kali memperburuk kondisi klinis dan meningkatkan risiko komplikasi. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan bakteri tersebut dalam sampel saliva pasien TB menggunakan metode Multiplex RT-PCR serta mengidentifikasi keberadaan dan kemurnian DNA hasil isolasi dari sampel saliva. Sampel saliva dari dua pasien TB dikumpulkan melalui metode spontaneous dan induced, kemudian dianalisis dengan pemeriksaan NAAT dan spectrophotometer untuk mengukur kemurnian dan konsentrasi DNA. Metode PCR digunakan untuk mendeteksi keberadaan bakteri pembawa pneumonia sekunder secara cepat dan akurat. Hasil menunjukkan adanya deteksi bakteri patogen tersebut pada sampel saliva, dengan variasi tingkat keberadaan dan kemurnian DNA yang memenuhi standar. Dari hasil ini, dapat disimpulkan bahwa deteksi bakteri sekunder penting dilakukan secara dini untuk penanganan yang tepat dan penurunan komplikasi pada pasien TB. Diharapkan, penggunaan metode PCR ini dapat dimanfaatkan sebagai alat diagnostik cepat dan handal dalam mendukung keberhasilan pengobatan serta pencegahan infeksi sekunder pada pasien TB.

**Kata kunci : Tuberkulosis paru (TB), Saliva pasien TB, Multiplex RT-PCR.**

Skripsi ini telah dipertahankan didepan sidang penguji dan dinyatakan LULUS

Pada 15 Agustus 2025. Abstrak ini telah disetujui oleh penguji :

Tanda Tangan			
Yayat Julio	Dr.rer.nat. Ikhwan Resmala Sudji, M.Si	Dra. Suraini, M.Si	Prof. Dr. Suryani, M.Si

Mengetahui,

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

(.....)







a). Place/Date: Payakumbuh/July 31, 2001; b). Name of Parents: (Father) Gusedisel (Mother) Syamsinar; c). Study Program: Applied Bachelor of Medical Laboratory Technology; d). Faculty of Health Sciences; e). Student ID Number: 2110262094; f). Graduation Date: 2025; g). Graduation Predicate: Honors; h). GPA: 3.68; i). Length of Study: 4 Years; j). Address: Jln. Koto kociak kubu tapak rajo, North Payakumbuh.

**IDENTIFICATION OF *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, and *Streptococcus pneumoniae* BACTERIA USING THE MULTIPLEX RT-PCR METHOD IN SALIVA SAMPLES OF PULMONARY TB PATIENTS**

**THESIS**

by: Yayat Julio

Supervisor: 1. Dr.rer.nat. Ikhwan Resmala Sudji, M.Si, 2. Dra. Suraini, M.Si

**Abstract**

Pulmonary tuberculosis (TB) is an infectious disease that remains a global health problem, especially in developing countries. In TB patients, secondary infections by pathogenic bacteria such as *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, and *Streptococcus pneumoniae* often worsen clinical conditions and increase the risk of complications. This study aims to detect the presence of these bacteria in saliva samples of TB patients using the Multiplex RT-PCR method and to identify the presence and purity of DNA isolated from the saliva samples. Saliva samples from two TB patients were collected using the spontaneous and induced methods, then analyzed using NAAT and a spectrophotometer to measure the purity and concentration of DNA. The PCR method was used to detect the presence of bacteria that cause secondary pneumonia quickly and accurately. The results showed the detection of these pathogenic bacteria in saliva samples, with varying levels of presence and DNA purity that met standards. From these results, it can be concluded that early detection of secondary bacteria is important for appropriate treatment and reducing complications in TB patients. It is hoped that the use of this PCR method can be utilized as a rapid and reliable diagnostic tool to support successful treatment and prevent secondary infections in TB patients.

**Kata kunci : Pulmonary tuberculosis (TB), Saliva of TB patients, Multiplex RT-PCR**

This thesis has been defended in front of the examiner and declared **PASSED** on 15 Agustus 2025. This abstract has been approved by the examiner.

Signature			
Yayat Julio	Dr. rer. nat. Ikhwan Resmala Sudji, M.Si	Dra. Suraini, M.Si	Prof. Dr. Suryani, M.Si

Knowing,

Head of Study Program Dr.Apt. Dewi Yudiana Shinta, M.Si

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Sampai sekarang Tuberkulosis (TB) masih merupakan salah satu penyakit menular penyebab tingginya morbiditas dan mortalitas di dunia. Tuberkulosis adalah penyakit infeksius kronik dan berulang biasanya mengenai organ paru yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (Cocozza et al., 2020).

Menurut (WHO), Pada tahun 2019, melaporkan bahwa melaporkan bahwa Tuberkulosis (TB) adalah penyebab kematian infeksius tertinggi di dunia. Sekitar 10 juta orang terinfeksi Tuberkulosis (TB) seluruh dunia dan 7 negara dengan kasus TB terbanyak yaitu India 27%, China 9%, Indonesia 8%, Filipina 6%, Nigeria 4%, Bangladesh 4%, Afrika selatan 3%. Presentase TBC paru semua tipe pada orang berjenis kelamin laki-laki lebih besar dari pada orang berjenis kelamin perempuan dikarenakan laki-laki kurang memperhatikan pemeliharaan kesehatan diri sendiri serta laki-laki sering kontak dengan faktor risiko dibandingkan perempuan (MedPro). Kondisi di Indonesia menurut laporan WHO tahun 2018, Indonesia menduduki peringkat ke-3 dengan penderita Tuberkulosis (TB) terbanyak di dunia, setelah India dan China (WHO, 2018).

Menurut (Kemenkes RI, 2018), pada tahun 2016 bahwa diperkirakan kasus baru tuberkulosis 10,4 juta atau dalam 100.000 populasi terdapat 142 kasus. Di Indonesia terkonfirmasi Jumlah kasus baru TB pada tahun 2017 adalah sebanyak

420.994 kasus. Akan tetapi 3.860 orang diantaranya adalah kasus baru BTA positif. Selanjutnya tahun 2017, jumlah kasus TB terkonfirmasi yaitu 6.644 orang, sebanyak 4.149 orang merupakan kasus baru BTA positif. Data tersebut menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kasus TB pada tahun 2017 sebesar 14,04% jika dibandingkan dengan tahun 2016 (Kemenkes, RI)

Pengambilan sampel saliva merupakan metode yang mudah dilakukan, dan lebih nyaman bagi pasien dibandingkan dengan pengambilan sampel darah atau sputum yang lebih invasif (Shakeeb et al., 2021). Hal ini sangat penting dalam konteks pasien TB paru yang mungkin sudah mengalami ketidaknyamanan akibat penyakit dan pengobatan yang sedang dijalani. Selain itu, dalam perspektif keamanan, penggunaan sampel saliva mengurangi risiko penularan kepada petugas kesehatan selama proses pengambilan sampel, terutama jika dibandingkan dengan pengambilan sputum yang dapat menghasilkan aerosol infeksius (Laxton et al., 2023).

Saliva juga menawarkan representasi yang baik dari flora oral dan mikroorganisme saluran pernapasan atas, termasuk bakteri target dalam penelitian ini. Hal ini menjadikan saliva sebagai sampel yang ideal untuk mendeteksi keberadaan patogen potensial pada pasien TB paru.

Selain *Mycobacterium Tuberculosis*, pada pasien penderita tuberkulosis tidak hanya di temukan bakteri *Mycobacterium Tuberculosis* namun juga bakteri seperti *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacte baumannii*, *Streptococcus pneumoniae* keberadaan bakteri ini mempengaruhi kondisi pasien TB paru (Bir et al., 2024). Aplikasi metode Multiplex RT-PCR dalam penelitian

ini memungkinkan deteksi simultan beberapa spesies bakteri target dari satu sampel saliva, meningkatkan efisiensi dan kecepatan diagnosis.

Dari uraian di atas, Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan bakteri Pneumonia *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* pada pasien TB paru menggunakan metode multiplek PCR pada sampel saliva. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan kontribusi penting dalam pengembangan metode diagnostik yang lebih cepat, akurat, dan efektif untuk manajemen pada sampel saliva pasien TB paru.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas, maka yang menjadi rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah ada bakteri pneumonia *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* pada sampel saliva pasien TB paru.

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Tujuan penelitian ini secara umum adalah untuk mengetahui keberadaan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* pada metode Multiplek PCR real-time PCR pada sampel saliva pasien TB paru.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Mengidentifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada sampel saliva pasien TB paru.

2. Mengidentifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* pada sampel saliva pasien TB paru.
3. Mengidentifikasi bakteri *Acinetobacter baumannii* pada sampel saliva pasien TB paru.
4. Mengidentifikasi bakteri , *Streptococcus pneumoniae* pada sampel saliva pasien TB paru.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Bagi Peneliti**

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan bagi peneliti khususnya mengenai tentang metode *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (Multiplex PCR) real time PCR pada sampel saliva pasien TB paru. Dalam mendeteksi infeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae* pada sampel saliva pasien TB paru.

### **1.4.2 Bagi Akademik**

Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai data dasar mengenai Identifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae* dengan metode *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (Multiplek PCR) real time PCR pada sampel saliva pasien TB paru serta menambah referensi bagi akademik dan mahasiswa Teknologi Laboratorium Medik.

### **1.4.3 Bagi Institusi Pendidikan**

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi pendidikan mengenai metode *Multiplek Polymerase Chain Reaction* (Multiplek PCR) real time PCR pada sampel saliva pasien TB paru dan menambah bahan pembelajaran di perpustakaan Universitas Perintis Indonesia.



## **BAB V**

### **PEMBAHASAN**

*Tuberkulosis* (TB) merupakan salah satu penyakit menular yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat global, khususnya di negara berkembang. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan secara klinis dapat menyebabkan berbagai komplikasi yang mengancam nyawa, terutama apabila tidak didiagnosis dan diobati secara tepat waktu (Tamunu et al., 2022).

Penggunaan metode *Multiplex Quantitative Real Time PCR* (qRT-PCR) menjadi sangat penting karena kemampuannya dalam mendeteksi berbagai patogen secara cepat dan akurat, sehingga mendukung diagnosis yang tepat dan penentuan terapi yang sesuai (Yang & Rothman, 2020). Pada umumnya, teknik PCR konvensional menggunakan satu pasang primer (singleplex) untuk mengamplifikasi satu target DNA spesifik. Namun, dengan penambahan set primer kedua (duplex) atau beberapa set primer sekaligus (multiplex), dimungkinkan untuk melakukan amplifikasi beberapa target DNA secara bersamaan dalam satu reaksi (Singh et al., 2024). Keunggulan utama dari metode PCR *real-time* multipleks (mpPCR) terletak pada kecepatannya dalam menganalisis sampel, memungkinkan deteksi simultan berbagai patogen dalam waktu yang lebih singkat (Yang & Rothman, 2020).

Metode PCR *real-time* multipleks menawarkan beberapa keunggulan signifikan. Pertama, metode ini memungkinkan peningkatan throughput pengujian, mengurangi potensi kesalahan pipet, dan memungkinkan penentuan langsung jumlah DNA yang diperlukan. Proses validasinya juga lebih efisien

karena mencakup semua primer yang digunakan dalam satu kali pengujian, sehingga mempermudah proses dokumentasi. Selain itu, dengan melakukan beberapa reaksi PCR dalam satu tabung, metode ini dapat menghemat penggunaan bahan habis pakai dan reagen, yang pada gilirannya mengurangi dampak lingkungan dari proses analisis (Mohammadi et al., 2025).

Spesifisitas yang lebih tinggi (melalui penggunaan probe) dan sensitivitas PCR real-time, ditambah dengan aplikasinya yang lebih luas termasuk kuantifikasi, menjadikan teknik ini sebagai metode yang paling sering digunakan. Saat ini, metode ini telah menjadi pendekatan standar dalam bidang pengujian GMO di Eropa, (Maulani & Bloom, 2015).

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

Penelitian ini menggunakan metode *Multiplex Real-Time Quantitative* PCR (RT-qPCR) dengan kit Pneumoplex 3.0 untuk mendeteksi keberadaan empat patogen bakteri penting: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, dan *Streptococcus pneumoniae*. Metode ini memungkinkan deteksi simultan beberapa target bakteri dalam satu reaksi, meningkatkan efisiensi dan kecepatan diagnosis (Yang & Rothman, 2020).

Hasil penelitian menunjukkan variasi yang signifikan dalam profil bakteri antara sampel kontrol dan sampel pasien. Kontrol negatif (NC) tidak menunjukkan amplifikasi untuk semua target bakteri, mengkonfirmasi tidak adanya kontaminasi dan validitas hasil. Kontrol positif (PC) menunjukkan

amplifikasi yang konsisten untuk semua target bakteri, dengan nilai Cq berkisar antara 14,05 hingga 14,88, memvalidasi kinerja kit dan protokol PCR.

Pada sampel pasien Ny. RN (9A), terdeteksi keberadaan tiga dari empat patogen target. *Staphylococcus aureus* terdeteksi dengan nilai Cq 37,91, mengindikasikan konsentrasi yang relatif rendah. *Klebsiella pneumoniae* menunjukkan konsentrasi yang lebih tinggi dengan nilai Cq 25,85, sementara *Streptococcus pneumoniae* terdeteksi pada level moderat dengan Cq 34,33. *Acinetobacter baumannii* tidak terdeteksi dalam sampel ini. Profil ini menggambarkan infeksi polimikrobial dengan dominasi *Klebsiella pneumoniae*.

Sampel dari pasien Ny. YA (11A) menunjukkan profil yang berbeda. *Klebsiella pneumoniae* terdeteksi dengan konsentrasi tinggi (Cq 21,94), diikuti oleh *Acinetobacter baumannii* (Cq 39,64) dan *Streptococcus pneumoniae* (Cq 34,90) dalam konsentrasi yang lebih rendah. *Staphylococcus aureus* tidak terdeteksi dalam sampel ini. Profil ini menunjukkan infeksi polimikrobial yang lebih kompleks dibandingkan sampel sebelumnya.

Penggunaan metode Multiplex RT-qPCR dengan kit Pneumoplex 3.0 menunjukkan beberapa keunggulan signifikan. Metode ini mampu mendeteksi keberadaan bakteri target bahkan dalam konsentrasi rendah, seperti yang terlihat pada deteksi *S. aureus* dengan Cq 37,91 pada sampel Ny. RN. Hal ini sejalan dengan temuan (Maulani & Bloom, 2015) yang melaporkan sensitivitas dan spesifisitas tinggi metode multiplex RT-qPCR dalam deteksi patogen pernapasan. Kemampuan untuk mendeteksi beberapa patogen dalam satu reaksi meningkatkan efisiensi diagnosis dan memungkinkan identifikasi cepat infeksi polimikrobial.

Ini sangat penting dalam manajemen klinis, terutama untuk pasien dengan kondisi kritis (Setia et al., 2020).

Nilai Cq yang diperoleh memungkinkan estimasi kuantitatif relatif dari beban bakteri dalam sampel. Ini memberikan informasi berharga tentang dominasi patogen tertentu dalam infeksi polimikrobial, yang dapat membantu dalam penentuan strategi pengobatan yang tepat (Ruiz-Villalba et al., 2021). Dibandingkan dengan metode kultur konvensional, Multiplex RT-qPCR menawarkan hasil yang jauh lebih cepat, memungkinkan diagnosis dan pengobatan yang lebih cepat. Studi oleh (Islam Sajib et al., 2024) menunjukkan bahwa penggunaan metode molekuler seperti ini dapat secara signifikan mengurangi waktu diagnosis dari beberapa hari menjadi hanya beberapa jam.

Deteksi Patogen Sulit Dikultur memungkinkan deteksi patogen yang sulit dikultur atau membutuhkan waktu pertumbuhan yang lama, seperti *Streptococcus pneumoniae*, yang sering kali sulit diidentifikasi melalui metode kultur konvensional (Oon et al., 2023). Kedua sampel pasien menunjukkan keberadaan *Klebsiella pneumoniae* dengan konsentrasi yang relatif tinggi (Cq 25,85 dan 21,94). Ini konsisten dengan literatur yang melaporkan *Klebsiella pneumoniae* sebagai patogen oportunistik yang sering ditemukan dalam infeksi nosokomial dan komunitas (Gorrie et al., 2022). Perbedaan profil bakteri antara dua sampel pasien menggambarkan kompleksitas dan variabilitas infeksi polimikrobial. Ini menekankan pentingnya diagnosis yang akurat dan spesifik untuk setiap pasien dalam menentukan strategi pengobatan yang tepat (Maulani & Bloom, 2015).

Keberadaan *Streptococcus pneumoniae* dalam kedua sampel dengan nilai Cq yang moderat (34,33 dan 34,90) menunjukkan potensi infeksi pneumokokal. Mengingat peran *Streptococcus pneumoniae* dalam penyakit pernapasan serius, temuan ini memiliki implikasi penting untuk manajemen klinis. *Acinetobacter baumannii* terdeteksi hanya pada satu sampel (Ny. YA) dengan konsentrasi rendah (Cq 39,64). Ini menggambarkan variabilitas dalam distribusi patogen dan potensi peran *Acinetobacter baumannii* sebagai patogen oportunistik dalam infeksi polimikrobial (Howard et al., 2012).

*Staphylococcus aureus* terdeteksi hanya pada satu sampel (Ny. RN) dengan konsentrasi rendah (Cq 37,91). Ini menekankan pentingnya deteksi sensitif untuk patogen yang mungkin hadir dalam konsentrasi rendah namun tetap berpotensi signifikan secara klinis (Bonacorsi et al., 2021).

## **5.2 Sensitivitas & Spesifisitas Multiplex Real-Time qPCR**

Sensitivitas dan spesifisitas Multiplex *real-time* qPCR merupakan aspek krusial yang menentukan keandalan metode ini dalam deteksi patogen, terutama untuk infeksi saluran pernapasan yang umum. Beberapa studi telah mendemonstrasikan keunggulan teknik ini dalam hal sensitivitas yang tinggi dan spesifisitas yang baik. (Valones et al., 2009) melaporkan bahwa metode ini mampu mendeteksi hingga 10 copy number DNA target per reaksi untuk berbagai patogen saluran pernapasan, jauh melampaui sensitivitas metode kultur konvensional. Spesifisitas yang tinggi juga telah dibuktikan oleh (Compton, 2020), yang menunjukkan kemampuan Multiplex *real-time* qPCR dalam membedakan spesies bakteri yang berkerabat dekat dengan akurasi tinggi,

termasuk patogen pernapasan seperti *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Staphylococcus aureus*.

Keunggulan Multiplex *real-time* qPCR dalam deteksi patogen pernapasan umum ini memiliki implikasi signifikan untuk diagnosis dan manajemen klinis. Studi oleh (Maulani & Bloom, 2015) mengkonfirmasi efektivitas metode ini dalam mendeteksi secara simultan berbagai patogen pernapasan, termasuk keempat bakteri yang disebutkan sebelumnya, dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Hal ini memungkinkan identifikasi cepat penyebab infeksi, bahkan dalam kasus ko-infeksi yang melibatkan multiple patogen. Meskipun demikian, (Jiang et al., 2022) menekankan pentingnya optimasi dan validasi yang cermat untuk setiap assay Multiplex *real-time* qPCR, terutama ketika menangani sampel dari pasien dengan infeksi pernapasan yang kompleks. Terlepas dari tantangan ini, sensitivitas dan spesifisitas tinggi yang ditawarkan oleh Multiplex *real-time* qPCR menjadikannya alat diagnostik yang sangat berharga dalam setting klinis, memungkinkan deteksi dini dan manajemen yang lebih efektif untuk infeksi bakteri pernapasan yang umum.

### **5.3 Efek Klinis Infeksi Bakteri Patogen Paru Non MTB pada Pasien TB**

Infeksi ko-patogen bakteri non-MTB pada pasien *tuberkulosis* (TB) dapat secara signifikan mempengaruhi perjalanan klinis dan prognosis penyakit. Empat bakteri patogen paru yang sering ditemukan sebagai ko-infeksi pada pasien TB adalah *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Streptococcus pneumoniae*. Masing-masing bakteri ini memiliki efek klinis yang spesifik dan dapat memperburuk kondisi pasien TB.



*Klebsiella pneumoniae*, sebagai patogen oportunistik, dapat menyebabkan pneumonia bakterial yang parah pada pasien TB dengan sistem imun yang sudah terganggu. Studi oleh (Luies & Preez, 2020) menunjukkan bahwa ko-infeksi *K. pneumoniae* pada pasien TB dapat mempercepat kerusakan jaringan paru dan meningkatkan risiko pembentukan abses paru. *Pseudomonas aeruginosa*, yang terkenal dengan kemampuannya membentuk biofilm, dapat menyebabkan infeksi kronis yang sulit diobati pada saluran pernapasan pasien TB. Penelitian oleh (Nickerson et al., 2024) mengungkapkan bahwa ko-infeksi *Pseudomonas aeruginosa* sering dikaitkan dengan eksaserbasi gejala respiratori dan penurunan fungsi paru yang lebih cepat pada pasien TB.

*Staphylococcus aureus*, terutama strain yang resisten metisilin (MRSA), dapat menyebabkan pneumonia nekrotikan yang mengancam jiwa pada pasien TB. Menurut studi yang dilakukan oleh (Afşin et al., 2024), ko-infeksi *S. aureus* pada pasien TB dikaitkan dengan peningkatan mortalitas dan komplikasi seperti empiema. Sementara itu, *Streptococcus pneumoniae*, penyebab utama pneumonia komunitas, dapat memperburuk inflamasi paru pada pasien TB. Penelitian oleh (Kolloli & Subbian, 2017) menunjukkan bahwa ko-infeksi *Streptococcus pneumoniae* dapat mempercepat perkembangan kavitas paru dan meningkatkan risiko bakteremia pada pasien TB.

#### **4.1.Relevansi Multiplex Real-Time qPCR dalam Diagnosis Klinik**

*Multiplex Real-Time qPCR* memiliki relevansi yang sangat signifikan dalam diagnosis klinis, terutama dalam menghadapi tantangan resistensi antimikroba yang terus meningkat. Keunggulan utama teknik ini adalah kemampuannya untuk mendeteksi dan mengkuantifikasi beberapa target bakteri

secara simultan dalam satu reaksi. Penelitian oleh (Albuquerque et al., 2019) menunjukkan bahwa *Multiplex Real-Time* qPCR dapat mengidentifikasi hingga 20 patogen yang berbeda sekaligus dalam satu sampel klinis. Kemampuan ini sangat penting dalam menangani infeksi polimikrobial dan memberikan diagnosis yang cepat dan akurat. Dengan hasil yang dapat diperoleh dalam hitungan jam, dibandingkan dengan metode kultur konvensional yang membutuhkan beberapa hari, teknik ini memungkinkan pengambilan keputusan klinis yang lebih cepat dan tepat. Hal ini berpotensi mengurangi penggunaan antibiotik spektrum luas yang tidak perlu, dan pada akhirnya menurunkan risiko pengembangan resistensi antimikroba (Kolloli & Subbian, 2017).

#### **4.2. Peran Nilai Ct dalam Interpretasi Klinis**

Nilai Ct (*Cycle threshold*) dalam *Real-Time* PCR merupakan parameter kunci yang mencerminkan jumlah siklus amplifikasi yang diperlukan agar sinyal fluoresensi melampaui ambang batas yang telah ditentukan, dengan nilai yang berbanding terbalik terhadap jumlah DNA target dalam sampel awal. Dalam konteks diagnostik klinis dan penelitian, nilai Ct memberikan informasi semi-kuantitatif tentang beban patogen, dengan nilai Ct yang lebih rendah menunjukkan konsentrasi DNA target yang lebih tinggi. Studi oleh (Bonacorsi et al., 2021) mendemonstrasikan korelasi signifikan antara nilai Ct dan jumlah koloni bakteri, sementara penelitian (Yang & Rothman, 2020) pada kasus COVID-19 mengungkapkan bahwa nilai Ct yang lebih tinggi berkaitan dengan penurunan kemungkinan kultur virus yang viable. Meskipun nilai Ct menawarkan wawasan berharga untuk interpretasi hasil PCR, (Tamara et al., 2021) menekankan pentingnya kehati-hatian dalam interpretasi, mengingat adanya

variabilitas antar laboratorium dan pengaruh faktor-faktor seperti kualitas sampel dan metode ekstraksi. Oleh karena itu, penggunaan nilai Ct dalam praktik klinis harus selalu diintegrasikan dengan penilaian klinis yang komprehensif dan pertimbangan faktor-faktor kontekstual lainnya untuk memastikan interpretasi yang akurat dan relevan secara klinis.

#### **4.3.Keunggulan Metode Multiplex qRT-PCR dalam Diagnosis**

*Multiplex Quantitative Real Time PCR* (qRT-PCR) telah menunjukkan dirinya sebagai metode diagnostik yang inovatif dan transformatif. Metode ini menawarkan berbagai keuntungan yang signifikan dibandingkan dengan pendekatan konvensional (Singh et al., 2024). Salah satu keunggulan utamanya adalah kemampuannya untuk mendeteksi beberapa target genetik secara bersamaan dalam satu reaksi tunggal. Pendekatan ini membawa efisiensi yang luar biasa, tidak hanya dalam hal penghematan waktu dan reagen, tetapi juga dalam meminimalkan risiko kontaminasi silang dan kesalahan pipet yang sering terjadi pada pengujian singleplex yang dilakukan secara terpisah. Hal ini sejalan dengan temuan yang dilaporkan oleh (Elnifro et al., 2000).

qRT-PCR menunjukkan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang sangat tinggi. Hal ini dibuktikan dengan nilai Ct (*Cycle threshold*) yang rendah pada kontrol positif, berkisar antara 14 hingga 17, serta tidak adanya amplifikasi pada kontrol negatif (Ct = N/A). Karakteristik ini menjamin hasil yang sangat akurat dan dapat diandalkan, bahkan ketika mendeteksi patogen dengan konsentrasi yang sangat rendah.

Metode *multiplex* qRT-PCR menggunakan probe fluoresen yang spesifik untuk setiap bakteri target, yaitu *Staphylococcus aureus* (Cy5), *Klebsiella pneumoniae* (FAM), *Acinetobacter baumannii* (HEX), dan *Streptococcus pneumoniae* (ROX). Penggunaan probe spesifik ini memungkinkan identifikasi dan diferensiasi yang jelas dari berbagai patogen secara bersamaan dalam satu sampel. Keunggulan lain dari metode ini adalah adanya kontrol internal (IC) yang terdeteksi pada setiap sampel menggunakan probe Cy5-5. Kontrol internal ini berperan penting sebagai validasi untuk memastikan integritas proses ekstraksi DNA dan efisiensi amplifikasi PCR. Dengan adanya kontrol ini, hasil negatif dapat diinterpretasikan dengan keyakinan bahwa bukan disebabkan oleh kegagalan teknis dalam proses pengujian.

*Multiplex* qRT-PCR menunjukkan akurasi, kecepatan, dan efisiensi yang tinggi, menjadikannya metode ideal untuk skrining rutin pada pasien TB yang berisiko tinggi mengalami ko-infeksi. Selain itu, metode ini juga sangat berguna untuk memantau respons pasien terhadap terapi yang diberikan. Teknologi ini merepresentasikan kemajuan yang signifikan dalam bidang diagnostik molekuler. Seperti yang dikemukakan oleh (Kabay et al., 2022), metode ini berpotensi menjadi standar emas dalam diagnosis infeksi paru kompleks di masa depan. Dengan demikian, *multiplex* qRT-PCR membuka peluang baru untuk meningkatkan akurasi dan kecepatan diagnosis, yang pada akhirnya dapat meningkatkan penanganan pasien dengan infeksi paru kompleks.

