

**DETEKSI GEN ITS2 *Candida albicans* PADA SPUTUM PENDERITA  
TUBERCULOSIS MENGGUNAKAN METODE RT-PCR**

**SKRIPSI**



**MIFTAKHUL JANNAH**

**P27834122078**

**KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA  
POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES SURABAYA  
PROGRAM STUDI SARJANA TERAPAN  
JURUSAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS**

**2023**

**DETEKSI GEN ITS2 *Candida albicans* PADA SPUTUM PENDERITA  
TUBERCULOSIS MENGGUNAKAN METODE RT-PCR**

**Skripsi ini Diajukan**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar**

**Sarjana Terapan Kesehatan Teknologi Laboratorium Medis**



**MIFTAKHUL JANNAH**

**P27834122078**

**KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA**

**POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES SURABAYA**

**PROGRAM STUDI SARJANA TERAPAN**

**JURUSAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS**

**2023**

LEMBAR PERSETUJUAN

DETEKSI GEN ITS2 *Candida albicans* PADA SPUTUM PENDERITA  
TUBERCULOSIS MENGGUNAKAN METODE RT-PCR

Oleh:

MIFTAKHUL JANNAH

NIM. P27834122078

Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui isi dan susunannya sehingga dapat diajukan pada Ujian Sidang Skripsi yang diselenggarakan oleh Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Surabaya

Surabaya, Juni 2023

Pembimbing I



Retno Sasongkowati, S.Pd, S.Si, M.Kes

NIP. 19651003198803 2 002

Pembimbing II



Anita Dwi Anggraini, S.ST, M.Si

NIP. 19880804 202012 2 001

Mengetahui:  
Ketua Jurusan Teknologi Laboratorium Medis  
Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Surabaya



Retno Sasongkowati, S.Pd, S.Si, M.Kes

NIP. 19651003198803 2 002

**LEMBAR PENGESAHAN**

**DETEKSI GEN ITS2 *Candida albicans* PADA SPUTUM PENDERITA  
TUBERCULOSIS MENGGUNAKAN METODE RT-PCR**

Oleh:

**MIFTAKHUL JANNAH**  
NIM. P27834122078

**Skripsi ini telah dipertahankan dihadapan Tim Penguji Ujian Skripsi  
Jenjang Pendidikan Tinggi Program Studi Sarjana Terapan Jurusan  
Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kementerian  
Kesehatan Surabaya**

**Surabaya, Juni 2023**

**Tim Penguji**

**Tanda Tangan**

**Penguji I : Retno Sasongkowati, S.Pd, S.Si, M.Kes**  
NIP. 19651003198803 2 002

.....

**Penguji II : Anita Dwi Anggraini, S.ST, M.Si**  
NIP. 19880804 202012 2 001

.....

**Penguji III : Dra. Sri Sulami Endah Astuti, M.Kes**  
NIP. 19630927198903 2 001

.....



**Retno Sasongkowati, S.Pd, S.Si, M.Kes**  
NIP. 19651003198803 2 002

## **MOTTO DAN PERSEMBAHAN**

### **MOTTO**

Matahari sudah lenyap, tapi aku punya cahaya

“ Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan ” \_QS. Al-Insyirah : 5

### **HALAMAN PERSEMBAHAN**

Segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan hidayahnya, saya persembahkan skripsi ini sebagai salah satu bentuk ibadah dan bentuk rasa terimakasih kepada Allah SWT, kepada Ayah, Ibu, adik Mira yang telah mengisi dunia saya dengan banyak kebahagiaan, sehingga seumur hidup tidak cukup untuk menikmati semuanya. Terima kasih kepada keluarga, santoso, dan teman-teman atas semua cinta dan dukungan yang telah kalian berikan kepada saya. Terima kasih banyak diri sendiri yang mampu bertahan dalam proses bekerja serta melanjutkan pendidikan ini sampai selesai serta semuanya yang telah mendo'akan, memberikan kasih sayang, bimbingan, didikan juga dukungan untuk keberhasilan saya.

## ABSTRAK

Kandidiasis ialah infeksi jamur yang ada di Indonesia. Kandidiasis bisa menyerang mulut, vagina, kuku, kulit, bronkus, serta paru-paru. Penyakit jamur bersifat akut juga subakut yang disebabkan *Candida albicans*. Untuk mendiagnosis infeksi jamur, teknik identifikasi berbasis kultur telah muncul sebagai gold standart untuk diagnosis infeksi jamur. Teknologi molekuler saat ini memungkinkan pengujian *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) guna mendeteksi jamur *Candida albicans* dengan cepat. Wilayah ITS2 ialah penanda yang biasanya dipakai untuk banyak kelompok jamur. Tujuan penelitian guna mengetahui adanya gen ITS2 *Candida albicans* pada sputum penderita *Tuberculosis* (TB) menggunakan metode RT-PCR.

Penelitian ini termasuk penelitian deskriptif kuantitatif memakai metode *cross sectional study* yakni sampel sputum penderita *Tuberculosis* (TB) di Rumah Sakit Pusat TNI Angkatan Laut (RSPAL) Dr. Ramelan Surabaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Mei 2023 di Laboratorium Mikrobiologi dan Biologi Molekuler Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Surabaya. Selanjutnya dilakukan observasi deteksi gen ITS2 *Candida albicans* menggunakan metode RT-PCR.

Hasil penelitian yang sudah dilakukan dari 30 sampel sputum penderita *Tuberculosis* (TB) ditemukan 19 sampel dengan hasil positif jamur *Candida sp.* serta dari 19 sampel tersebut semua sampel terdeteksi gen ITS2 jamur *Candida albicans* dengan memakai metode RT-PCR, hingga didapatkan presentase 63,34% dari total 30 sampel.

**Kata kunci :** *Candida albicans*, *Tuberculosis*, gen ITS2, RT-PCR.

## **ABSTRACT**

*Candidiasis is a fungal infection that occurs in Indonesia. Candidiasis can attack the mouth, vagina, nails, skin, bronchi and lungs. Acute and subacute fungal disease caused by Candida albicans. For diagnosing fungal infections, culture-based identification techniques have emerged as the gold standard for diagnosing fungal infections. Current molecular technology allows Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) testing to quickly detect the Candida albicans fungus. The ITS2 region is a commonly used marker for many groups of fungi. The aim of the research was to determine the presence of the Candida albicans ITS2 gene in the sputum of Tuberculosis (TB) sufferers using the RT-PCR method.*

*This research is a quantitative descriptive study using a cross sectional study method, namely sputum samples from Tuberculosis (TB) sufferers at the Central Hospital of the Indonesian Navy (RSPAL) Dr. Ramelan Surabaya. The research was carried out from February to May 2023 at the Microbiology and Molecular Biology Laboratory, Medical Laboratory Technology, Health Polytechnic, Ministry of Health, Surabaya. Next, observations were made for the detection of the Candida albicans ITS2 gene using the RT-PCR method.*

*The results of research conducted from 30 sputum samples from Tuberculosis (TB) sufferers found 19 samples with positive results for Candida sp. and from these 19 samples, all samples detected the ITS2 gene of the Candida albicans fungus using the RT-PCR method, until a percentage of 63.34% was obtained from a total of 30 samples.*

**Keywords:** *Candida albicans, Tuberculosis, ITS2 gene, RT-PCR,*

## **KATA PENGANTAR**

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat ALLAH SWT yang telah memberikan limpahan rahmat, taufiq, serta hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyusun skripsi yang berjudul “DETEKSI GEN ITS2 *Candida albicans* PADA SPUTUM PENDERITA TUBERCULOSIS MENGGUNAKAN METODE RT-PCR”. Penyusunan ini, penulis ajukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam sidang skripsi Program Studi Terapan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, untuk menyempurnakan skripsi ini, penulis mengharapkan saran dan kritik yang bermanfaat dari para pembaca. Penulis berharap agar skripsi ini dapat memberi manfaat bagi pembaca dan memajukan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Juni 2022

Penulis

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT sehingga skripsi ini dapat dibuat dan diselesaikan dengan segala rahmat serta karunia-Nya yang telah memberikan saya kekuatan serta kesehatan dalam menyelesaikan Skripsi ini. Serta adanya bantuan berbagai pihak yang turut memberikan dukungan, kritik dan saran yang membangun, oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Luthfi Rusyadi, SKM, M.Sc selaku Direktur Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan D4 Alih Jenjang Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis Surabaya.
2. Ibu Retno Sasongkowati, S.Pd, S.Si, M.Kes selaku Ketua Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya. Serta dosen pembimbing 1 yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, petunjuk, saran, kritik, arahan dan dukungan sehingga skripsi ini dapat terwujud.
3. Ibu Suliati, S.Pd, S.Si, M.Si selaku Ketua Program Studi Diploma IV Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya.
4. Ibu Anita Dwi Anggraini, S.ST, M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, petunjuk, saran, kritik, arahan dan dukungan sehingga skripsi ini dapat terwujud.

5. Ibu Dra. Sri Sulami Endah Astuti, M.Kes selaku dosen penguji yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, petunjuk, saran, kritik, arahan dan dukungan sehingga skripsi ini dapat terwujud.
6. Bapak dan Ibu Dosen, Asisten Dosen beserta Staf karyawan Teknologi Kesehatan Laboratorium Surabaya yang telah mendukung proses pengerjaan skripsi serta memberikan ilmu kepada penulis selama kuliah di Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya.
7. Kepada Ayah Mohammad Imam Fahrudin, Ibu Suyatmi tercinta yang selama ini telah memberi motivasi, semangat, kasih sayang serta doa yang telah dipanjatkan kepada Allah dan semangat kepada saya selama menempuh pendidikan kuliah di Program Studi Diploma IV Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya.
8. Kepada adik tersayang Amiiroh zakiiyyatul laili yang telah memberikan semangat serta dukungannya
9. Untuk Achmad Priyas Budi Santoso, A.Md.Kes yang selalu menemani dan memberikan masukan maupun solusi pada setiap permasalahan yang saya hadapi dari awal perkuliahan hingga penelitian saya yang penuh permasalahan hingga Skripsi ini dapat terselesaikan. Terimakasih juga sudah menjadi tempat bercerita, mengeluh, ataupun tertawa dari proses meraih gelar Sarjana Terapan.
10. Bangtan Sonyeondan (RM, Jin, Suga, J-hope, V, JK, dan Park Jimin) yang selalu memberikan hiburan dan menjadi moodboster disaat peneliti lelah, serta selalu menjadi inspirasi bagi peneliti.

11. Teman seperjuangan saya (Kakak Dika, Kakak Tari, Kakak Dian, Anisa, Mita) yang telah memberikan dukungan, nasihat, semangat dan membantu saya selama melanjutkan kuliah alih jenjang hingga tugas akhir ini dapat terselesaikan.
12. Diri sendiri yang telah mampu bertahan dalam proses bekerja serta melanjutkan pendidikan ini sampai selesai.
13. Kepada ibu ida serta segenap Tim Rumah Sakit RSPAL dr Ramelan Surabaya yang banyak membantu serta memberikan izin untuk mengambil sampel di Rumah Sakit RSPAL dr Ramelan Surabaya
14. Teman-teman seperjuangan D4 Alih Jenjang Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya.
15. Serta masih banyak lagi pihak-pihak yang sangat berpengaruh dalam proses penyelesaian skripsi yang tidak bisa peneliti sebutkan satu per satu

Penulis berusaha untuk dapat menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini dengan sebaik-baiknya dan telah memberikan yang terbaik. Namun penulis menyadari bahwa tidak ada yang sempurna dimuka bumi ini sebabkan kesempurnaan hanya milik Allah SWT Sehingga Penulis menyadari bahwa Karya Tulis Ilmiah ini masih banyak kekurangan karna keterbatasan dari penulis.

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL.....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PERSETUJUAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>MOTTO DAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>UCAPAN TERIMAKASIH .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Teoritis .....	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
1.4.3 Manfaat Untuk Masyarakat .....	6

<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	7
2.1.1 Taksonomi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	7
2.1.2 Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
2.1.3 Patogenesis <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	9
2.2 <i>Candida albicans</i> .....	11
2.2.1 Taksonomi <i>Candida albicans</i> .....	11
2.2.2 Definisi dan Epidemiologi.....	12
2.2.3 Patogenesis .....	13
2.2.4 <i>Candida albicans</i> pada pasien Tuberkulosis .....	14
2.3 Pemeriksaan Jamur .....	16
2.3.1 <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (SDA) .....	16
2.3.2 <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR) .....	23
2.3.2.1 Pengertian .....	23
2.3.3 Prinsip - Prinsip Dasar PCR .....	24
2.3.3.1 Komponen PCR.....	25
2.3.4 Tahap Proses PCR.....	26
2.3.5 Analisis Deteksi Amplifikasi pada Real Time PCR.....	28
2.3.6 Optimasi PCR.....	30
2.4 Gen ITS2 .....	32

<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS .....</b>	<b>34</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	34
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep .....	35
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>38</b>
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian .....	38
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	38
4.3 Populasi Penelitian .....	38
4.4 Sampel Penelitian .....	39
4.4.1 Kriteria Inklusi Sampel .....	39
4.4.2 Kriteria Eksklusi Sampel.....	39
4.5 Variabel Penelitian .....	39
4.6 Definisi Operasional Variabel Penelitian .....	40
4.6.1 Gen ITS2 .....	40
4.6.2 <i>Candida albicans</i> .....	40
4.6.3 Sputum Penderita Tuberkulosis (TB).....	40
4.7 Prosedur Penelitian.....	41
4.7.1 Prosedur Pemeriksaan Kultur .....	41
4.7.2 Prosedur Pemeriksaan dengan Alat <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)..	42
4.7.3 Prosedur Ekstraksi DNA Bakteri <i>Mycrobacterium Tuberculosis</i> .....	43
4.7.3.1 Uji Kemurnian DNA Jamur <i>Candida albicans</i> .....	44
4.7.3.2 Identifikasi Gen ITS2 .....	45

<b>4.8 Teknik Analisa Data.....</b>	<b>45</b>
<b>4.9 Alur penelitian .....</b>	<b>46</b>
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>47</b>
5.1 Penyajian Data.....	47
5.2 Analisis Data .....	54
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>56</b>
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>60</b>
7.1 Kesimpulan .....	60
7.2 Saran .....	60
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>62</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>67</b>

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1 <i>Mycobacteriumtuberculosis</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>Gambar 2.2 <i>Candida albicans</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>Gambar 2.3 Mikroskopis BTA .....</b>	<b>15</b>
<b>Gambar 2.4 <i>Candida sp</i> pada Media SDA .....</b>	<b>16</b>
<b>Gambar 2.5 Kurva Amplifikasi RT-PCR .....</b>	<b>29</b>
<b>Gambar 5.2 Grafik Deteksi Gen ITS2 <i>Candida albicans</i> Pada RT-PCR.....</b>	<b>52</b>
<b>Gambar 5.3 Presentase Deteksi Gen ITS2 <i>Candida albicans</i>.....</b>	<b>53</b>

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 4.3.7.1 Uji Kemurnian DNA Jamur <i>Candida albicans</i>. .....</b>	<b>44</b>
<b>Tabel 5.1 Hasil Kultur Sampel Sputum Tuberculosis Pada Media SDA.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabel 5.2 Kuantifikasi Pemeriksaan Uji Kemurnian dan Konsentrasi DNA Menggunakan Nano Spektrofotometer.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabel 5.3 Hasil RT-PCR dengan Nilai Ct (<i>Cycle Threshold</i>).....</b>	<b>51</b>
<b>Tabel 5.4 Presentase Hasil Pemeriksaan Deteksi Gen ITS2 <i>Candida albicans</i> Menggunakan Metode RT-PCR.....</b>	<b>52</b>

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Izin Pemakaian Laboratorium.....	67
Lampiran 2 Surat Etik RSPAL Dr. Ramelan Surabaya.....	68
Lampiran 3 Berita Acara Revisi .....	69
Lampiran 4 Kartu Bimbingan Skripsi .....	70
Lampiran 5 Hasil Kultur .....	71
Lampiran 6 Hasil Kuantifikasi.....	72
Lampiran 7 Hasil Amplifikasi.....	73
Lampiran 8 Surat Keterangan Hasil Deteksi Plagiasi .....	74
Lampiran 9 Inokulasi Sampel.....	75
Lampiran 10 Identifikasi Makroskopis Pada Media SDA.....	76
Lampiran 11 Hasil Mikroskopis Pengecatan LCB.....	79
Lampiran 12 Kurva Amplifikasi.....	81
Lampiran 13 Log Book Penelitian.....	83

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

*Mycobacterium tuberculosis* ialah agen penyebab penyakit menular tuberkulosis (TB). Penyakit menular tuberkulosis merupakan salah satu dari 10 penyebab kematian teratas. Menurut laporan WHO pada tahun 2018, negara-negara berkembang khususnya di Asia, Afrika, Timur Tengah, juga Amerika Latin, melaporkan lebih dari 95% kasus penyakit paru-paru terkait tuberkulosis. Hanya 570.000 kasus TBC yang dilaporkan ke Kementerian Kesehatan RI, padahal diperkirakan terdapat 1.026.000 kasus TBC di sana. Dari data WHO ditahun 2019, Negara yang lebih buruk jumlah kasus Tuberkulosis dari Indonesia ialah India, dimana India mempunyai jumlah penduduk 1, 3 milyar. Indonesia diurutan ketiga setelah Tiongkok (WHO, 2019). Riwayat keluarga yang melakukan kontak dekat dengan pasien TBC, status sosial, usia, kemiskinan, jenis kelamin laki-laki, infeksi HIV, merokok, asma, serta tunawisma merupakan faktor risiko terkena penyakit ini (Amiri et al., 2018).

Pemeriksaan *Ziehl Neelsen* (ZN) dapat mendeteksi bakteri tahan asam penyebab Tuberkulosis, serta pemantauan pada masa pengobatan. Namun di pemeriksaan *Ziehl Neelsen* (ZN) sering diketemukan mikroorganisme lainnya, salah satunya ialah jamur. Jamur yang sering diketemukan sebagai penyebab penyakit paru ialah jamur *Candida sp.* Terdapat beberapa jenis *Candida sp* yang telah teridentifikasi, salah satunya ialah *Candida albicans* (PAAA Nugraha, 2017).

Candidiasis ialah sebutan untuk penyakit yang disebabkan oleh *Candida albicans*. Indonesia ialah negara beriklim tropis dimana kandidiasis merupakan suatu infeksi jamur bisa terjadi. Penyakit jamur akut juga subakut yang disebabkan oleh spesies *Candida sp* di Indonesia bisa terinfeksi jamur dikarenakan negara beriklim tropis, suhu, kelembapan udara yang tinggi, serta kondisi kulit yang rentan berkeringat berlebihan juga lembap, kebersihan diri yang buruk, serta kurangnya pengetahuan mengenai masalah kesehatan. Mulut, vagina, kuku, kulit, paru-paru, bronkus, juga kulit semuanya bisa terinfeksi kandidiasis. Penyakit ini dapat menyerang orang-orang dari segala usia, jenis kelamin, serta bisa diketemukan di seluruh dunia (Erna, 2020).

Pasien tuberkulosis mungkin mengalami kandidiasis oral, suatu manifestasi klinis awal. Pasien dengan kandidiasis oral yang juga menderita tuberkulosis mungkin mengalami peningkatan morbiditas. Mirip dengan infeksi mikroba lainnya, infeksi jamur pada paru-paru umumnya bermanifestasi sebagai batuk, batuk darah, batuk berdahak, sesak napas, demam, nyeri dada, atau bahkan tidak ada gejala sama sekali. Pemberian obat anti tuberkulosis pada pasien tuberkulosis dalam jangka waktu lama akan menekan flora normal sehingga mencegah pertumbuhan jamur oportunistik. Gejala yang tidak spesifik dan seringnya infeksi jamur paru terjadi bersamaan dengan penyakit lain, seringkali sulit untuk mendiagnosis infeksi jamur dan menentukan apakah infeksi tersebut ada di paru-paru. Oleh karena itu, pengujian laboratorium sangat penting dalam menentukan apakah terinfeksi jamur dalam spesimen (Agustini, 2020).

Pemeriksaan mikroskopis, analisis molekuler, tes serologis, dan kultur spesimen merupakan metode yang dapat digunakan di laboratorium untuk mendiagnosis kandidiasis. Kultur bertujuan untuk mengidentifikasi adanya jamur komensal maupun jamur patogen. Kultur jamur dilakukan dengan mengisolasi spesimen di media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA), selanjutnya inkubasi 4 - 6 hari di suhu ruang. Dilanjutkan dengan Identifikasi makroskopis dan mikroskopis *Candida sp.* Teknik kultur metode konvensional merupakan gold standart untuk diagnosis infeksi jamur, akan tetapi memiliki sensitivitas yang rendah. Tes biokimia memakan waktu yang lama, selain itu uji biokimia terkadang gagal mengidentifikasi mikroorganisme. Identifikasi molekuler jauh lebih cepat, sensitif dan spesifik dibandingkan dengan teknik konvensional (Clancy & Nguyen, 2018).

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) ialah teknik amplifikasi asam nukleat. Teknik ini sangat sensitif dan dapat mengamplifikasi target DNA, bahkan untuk DNA sel tunggal. Multiplex-PCR adalah metode yang cepat, sensitif dan spesifik yang menggabungkan banyak primer spesies dalam satu tabung PCR. Oleh karena itu, dapat digunakan untuk mendeteksi gen penyebab secara bersamaan (Anwar, 2022).

Isolasi DNA genom merupakan langkah pertama yang penting dalam proses deteksi molekuler. DNA yang dimurnikan dan belum terkontaminasi oleh komponen sel lain berikut prinsip isolasi DNA. Penghancuran dinding sel jamur merupakan langkah kunci dalam isolasi DNA jamur. Metode mekanis dan lisis keduanya dapat digunakan untuk menyelesaikan tugas ini. Kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan dipengaruhi oleh teknik isolasi. Aksesibilitas sampel DNA mempengaruhi hasil amplifikasi DNA pada PCR (Hermansyah et al., 2018).

*Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2) DNA inti (nrDNA) adalah penanda molekuler yang digunakan untuk membedakan spesies *Candida albicans*. Di antara gen 28S, yang mengkode subunit rRNA besar, dan gen 5.8S, yang mengkode subunit rRNA kecil, terdapat wilayah nonkode yang disebut ITS2. Keuntungan menggunakan ITS2 sebagai penanda DNA adalah memiliki urutan yang pendek. PCR merupakan metode amplifikasi yang sederhana dan dapat digunakan untuk menentukan derajat kedekatan suatu hubungan antar spesies, yang telah terbukti menjadi penanda genetik spesifik spesies yang dapat diandalkan untuk patogen jamur, dan memiliki tingkat variabilitas antarspesies dan intraspesies yang tinggi (Hasanah, 2018).

Berdasarkan latar belakang diatas penulis ingin melaksanakan penelitian mengenai Deteksi gen ITS2 *Candida albicans* di sputum penderita Tuberkulosis menggunakan metode RT-PCR. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi spesies *Candida albicans*. pada sampel sputum penderita Tuberkulosis (TB).

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang diatas dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut : Apakah terdapat gen ITS 2 *Candida albicans* pada sputum penderita Tuberkulosis (TB) menggunakan metode RT-PCR?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Untuk mengetahui adanya gen ITS2 *Candida albicans*. pada sputum penderita Tuberkulosis (TB) menggunakan metode RT-PCR

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

- 1) Mengisolasi jamur *Candida albicans* pada sputum penderita Tuberkulosis (TB).
- 2) Menganalisis secara mikroskopis dan makroskopis jamur *Candida albicans* pada sputum penderita Tuberculosis (TB)
- 3) Menganalisis gen ITS2 *Candida albicans* pada sputum penderita Tuberkulosis (TB) menggunakan metode RT-PCR.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.2 Manfaat Teoritis**

Manfaat penelitian ini memberikan informasi serta wawasan tentang keberadaan gen ITS2 *Candida albicans* pada sputum penderita Tuberkulosis (TB) menggunakan metode RT-PCR.

#### **1.4.3 Manfaat Praktis**

Manfaat penelitian ini memberikan informasi juga pengetahuan bagi klinisi dalam penyebaran infeksi jamur pada penderita Tuberkulosis (TB) agar memberikan terapi antibiotik secara tepat sebagai salah satu upaya pencegahan kandidiasis.

#### **1.4.4 Manfaat Untuk Masyarakat**

Manfaat yang diambil masyarakat dari penelitian ini yakni dapat memberikan informasi edukasi agar lebih berhati – hati dalam penggunaan antibiotik sesuai dengan anjuran dokter serta menjaga pola hidup yang bersih serta sehat.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

##### 2.1.1 Taksonomi *Mycobacterium tuberculosis*

Klasifikasi bakteri berdasarkan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Volume 3 tahun 2009, determinasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* adalah sebagai berikut ;

Kingdom	: <i>Procaryate</i>
Divisio	: <i>Cyanobacteria</i>
Ordo	: <i>Actinomycetales</i>
Famili	: <i>Mycobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Mycobacterium</i>
Spesies	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

##### 2.1.2 Morfologi *Mycobacterium tuberculosis*

###### 1. Bentuk

Memiliki panjang 1-4 m dan ketebalan 0,3-0,6 m, *Mycobacterium tuberkulosis* merupakan jenis kuman kecil berbentuk batang. *Mycobacterium tuberkulosis* terutama terdiri dari lipid atau lemak, yang memberikan bakteri ketahanan terhadap kondisi fisik dan asam. Karena bersifat aerobik, kuman tuberkulosis membutuhkan oksigen untuk bertahan hidup. Di lingkungan dengan kadar oksigen tinggi *Mycobacterium tuberkulosis* sering ditemukan. Daerah tersebut menjadi tempat yang kondusif untuk penyakit Tuberkulosis. Bakteri penyebab tuberkulosis adalah *Mycobacterium*

*tuberculosis* memiliki tingkat pertumbuhan yang lambat, koloni mungkin tidak terbentuk selama enam sampai delapan minggu atau bahkan lebih lama. Ketika kelembapan 70% dan suhu 37°C, kondisi kehidupan ideal bakteri tercapai. Pada suhu 25°C atau lebih tinggi dan di atas 40°C kuman tidak dapat tumbuh (Suari, 2018).



**Gambar 2.1** *Mycobacterium tuberculosis*, dengan metode ziehl Neelsen perbesaran objektif 100X (Kemenkes, 2018).

## **2. Sifat dan Daya Tahan**

*Mycobacterium tuberculosis* bisa mati setelah dua jam terpapar sinar matahari langsung. Alasannya adalah karena kuman tersebut tidak tahan akan sinar UV. *Mycobacterium tuberculosis* bisa bertahan selama beberapa jam di lingkungan lembab juga gelap serta sangat resisten. Dengan demikian mikroorganisme tersebut bisa saja berada dalam keadaan dorman (tidur), basil dalam waktu yang lama di dalam jaringan tubuh dalam dahak dapat hidup selama 8 hingga 10 hari. (Handayani, 2020).

### **3. Sifat Pertumbuhan**

*Mycobacterium tuberculosis* mengandalkan oksidasi berbagai komponen karbon sederhana untuk menghasilkan energinya sebagai aerob obligat. Pertumbuhan didorong oleh meningkatnya kadar CO<sub>2</sub>. Basil tuberkulosis membutuhkan waktu sekitar 18 jam untuk bereplikasi. Dibandingkan dengan bentuk patogen, bentuk saprofit mempunyai kecenderungan untuk tumbuh lebih cepat, berkembang biak dengan baik di suhu antara 22°C dan 23°C, dan menghasilkan lebih sedikit pigmen tahan asam (Handayani, 2020).

#### **2.1.3 Patogenesis *Mycobacterium tuberculosis***

Penularan tuberkulosis paru secara langsung melalui udara terjadi antara pasien tuberkulosis dan orang sehat. Oleh karena itu, kontak erat antara penderita TBC dengan orang yang tertular (terinfeksi), seperti berbagi kamar tidur atau tempat kerja penularan tersebut dapat terjadi. Mayoritas penderita tuberkulosis tidak menyadari bahwa mereka mengidap penyakit tersebut. Tergantung ada atau tidaknya sinar matahari, serta kualitas ventilasi dan kelembapan ruangan, batuk yang mengandung basil tuberkulosis dapat melayang di udara selama kurang lebih satu hingga dua jam. Kuman dapat hidup sehari-hari atau bahkan berbulan-bulan di lingkungan yang gelap dan lembap (Budiartini, 2020).

Jika orang sehat menghirup droplet, maka droplet tersebut akan masuk ke sistem pernapasannya dan hinggap di dinding sistem pernapasannya. Meskipun tetesan kecil dapat masuk ke alveoli di lobus mana pun, tetesan besar selalu berakhir di saluran pernapasan bagian atas. Basil tuberkulosis akan menjadi fokus utama infeksi di tempat penularannya berfungsi sebagai tempat berkembang biaknya, dan tubuh orang yang terkena akan merespons dengan peradangan. Setelah itu infeksi akan menyebar melalui

sistem peredaran darah. Limfokinase akan menjadi yang pertama diaktifkan, dan karena diproduksi dalam jumlah yang lebih besar, ia juga akan mengaktifkan makrofag, yang jumlahnya akan menentukan apakah jumlah bakteri dalam infeksi berkurang atau tidak (Budiartini, 2020).

Membunuh bakteri atau kuman adalah tugas makrofag. Klien akan pulih dan sistem kekebalan tubuhnya akan menguat jika proses ini berhasil dan jumlah makrofagnya lebih banyak. Kuman tersebut akan menempel pada jaringan paru-paru dengan membentuk tuberkel, yaitu biji kecil seukuran kepala peniti. Hal ini akan terjadi jika imunitas tubuh mulai menurun pada saat itu. Pada akhirnya akan timbul masalah karena tuberkel tersebut membesar dan menyatu seiring berjalannya waktu. Hemoptoe terjadi ketika pasien batuk darah karena pembuluh darah pecah akibat pengangkatan jaringan nekrotik (Budiartini, 2020).

Tuberkulosis dapat ditularkan dengan berbagai cara, yaitu :

- 1) Sumber penularan ialah penderita *Mycobacterium tuberculosis* positif.
- 2) Pasien melepaskan kuman ke udara sebagai droplet nuklei ketika mereka batuk atau bersin. Sekitar 3.000 cipratan dahak dapat dihasilkan oleh satu kali batuk.
- 3) Pada kebanyakan kasus, penularan terjadi di ruangan yang sudah lama terdapat cipratan dahak. Meskipun sinar matahari langsung bisa membunuh kuman, ventilasi bisa mengurangi percikan.
- 4) Percikan mampu bertahan selama beberapa jam di keadaan yang gelap juga lembap.

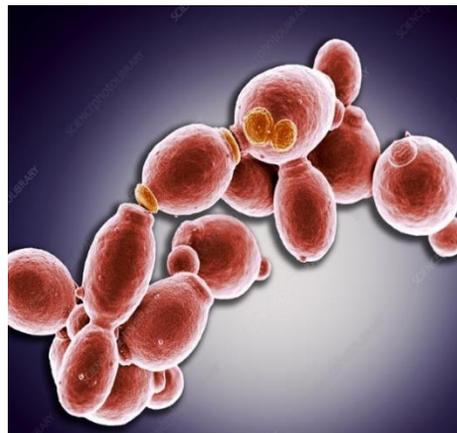
- 5) Jumlah kuman yang dihembuskan pasien dari paru-parunya menentukan seberapa menularnya dia. Tingkat penularan dari penderita meningkat seiring dengan derajat positif hasil pemeriksaan dahak (Keputusan Menteri Kesehatan, 2019).

## 2.2 *Candida albicans*

### 2.2.1 Taksonomi *Candida albicans*

Klasifikasi *Candida albicans* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Fungi</i>
Divisio	: <i>Ascomycota</i>
Ordo	: <i>Saccharomycetes</i>
Famili	: <i>Saccharomycetales</i>
Genus	: <i>Candida</i>
Spesies	: <i>Candida albicans</i>



**Gambar 2.2** *Candida albicans* (dr. Samanthi, 2021).

### 2.2.2 Definisi dan epidemiologi

*Candida albicans* tersebar luas di seluruh lingkungan pada kulit dan alat kelamin wanita, organisme ini merupakan populasi komensal yang khas. Populasi spesies ini meningkat seiring dengan penggunaan antibiotik spektrum luas dan dapat menginfeksi manusia, terutama orang dengan gangguan kekebalan tubuh. *Candida albicans* adalah penyebab utama sebagian besar infeksi. Pasien dengan gangguan imunitas mungkin mengalami infeksi lain yang disebabkan *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, dan *Candida seudotropicalis* karena organisme ini resisten terhadap obat antijamur.

Mengenai *Candida sp.* Infeksi terjadi pada praktik medis (30,3 persen) atau pembedahan (13,9 persen) di Asia-Pasifik, sedangkan sebanyak 23,1 persen terjadi di unit perawatan intensif dan sebanyak 10,1 persen terjadi pada kasus hemato-onkologi (Handayani, 2020). *Candida albicans* merupakan spesies yang paling umum di dunia, rata-rata mencakup 66 persen dari seluruh *Candida sp.* Menurut studi epidemiologi yang dilakukan di Hongkong mengenai prevalensi kandidiasis di Asia, rata-rata 56 persen kasus disebabkan oleh spesies *Candida albicans*. *Candida albicans* terus menjadi penyebab utama infeksi *Candida* dalam aliran darah, terhitung 33,3% di Singapura, 55,5% di Taiwan, juga 41,6% di Jepang. Di Thailand kejadian *Candida parapsilosis* (45%) sedikit lebih tinggi dibandingkan *Candida albicans* (44,5%). Agen etiologi utama di Malaysia adalah *Candida parapsilosis* dan *Candida tropicalis*, dengan *Candida albicans* menyumbang 11,76 persen kasus kandidemia. Karena prevalensi kandidiasis invasif meningkat seiring dengan bertambahnya populasi

individu yang rentan juga pengobatan terhambat resistensi antijamur, *Candida albicans* paling sering ditemukan, dengan tingkat prevalensi berkisar antara 37% di Amerika Latin hingga 70% di Norwegia (Puspitasari *et al*, 2019).

### **2.2.3 Patogenesis**

Mikroorganisme endogen yang disebut *Candida albicans*. hidup di saluran kelamin wanita, rongga mulut, saluran pencernaan, dan kadang-kadang di kulit. *Candida albicans* ialah ragi dimorfik yang bisa berkembang sebagai sel ragi, sel hifa, ataupun pseudohifa di bawah mikroskop. Mikroorganisme komensal atau patogen yang disebut *Candida albicans* dapat ditemukan pada 40 hingga 80 persen orang dewasa sehat. Ketika sistem kekebalan tubuh inang mengalami gangguan dan flora normal atau mikroorganisme yang tinggal di inang menjadi sumber infeksi, jenis infeksi ini umumnya dikenal sebagai infeksi *Candida albicans* terjadi (Handayani, 2020).

Paparan terhadap agen penyebab juga peluang terjadinya infeksi merupakan faktor penting dalam infeksi oportunistik. Adanya benda asing perubahan membran mukosa juga kulit, serta penurunan imunitas seluler merupakan faktor predisposisi. *Candida albicans* mempunyai komponen virulensi yang dapat membantu kemampuannya menyebarkan infeksi selain menyebabkan sistem kekebalan tubuh inangnya lemah. Kemampuan untuk bertransformasi antara sel ragi dan sel hifa merupakan salah satu faktor virulensi utama, bersama dengan molekul permukaan yang memungkinkan organisme menempel di permukaan sel inang dan penetrasi dinding sel serta kerusakan yang disebabkan oleh protease asam dan fosfolipase (Handayani, 2020).

Tiga jenis infeksi *Candida* dapat dibedakan kandidiasis mukokutan, kandidiasis sistemik, dan kandidiasis superfisial. Mukosa, kulit, dan kuku semuanya dapat terkena infeksi kandidiasis superfisial. Kulit, rongga mulut, juga mukosa vagina semuanya terkena kandidiasis mukokutan. Saluran kemih dan saluran pernafasan bagian bawah mungkin terkena kandidiasis sistemik, yang dapat menyebabkan kandidemia. endokardium, meninges, tulang, ginjal, dan mata sering menjadi lokasi terjadinya infeksi. Tanpa pengobatan penyakit ini bisa menyebar secara fatal (Lestari, 2015).

#### **2.2.4 *Candida albicans* pada pasien Tuberkulosis (TB)**

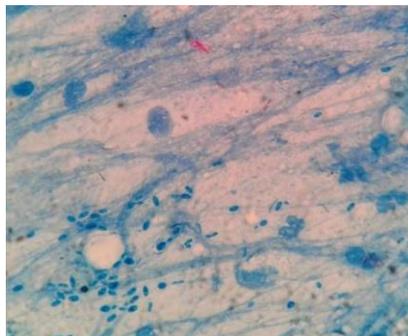
*Candida albicans* merupakan jamur floranormal namun bisa menjadi patogen yang dapat memicu kondisi *Immunocompromise* atau lemah karena keadaan tertentu. *Candida albicans* merupakan jamur yang memiliki patogenesis yang tinggi diantara genus *Candida sp.* karena *Candida albicans* memiliki enzim *Secreted aspartyl proteinase* (SAP), enzim *B phospholipase*, juga *lipase* yang dapat melisiskan protein tubuh. Infeksi *Candida albicans* mampu menyebabkan invasi sekunder di paru-paru yang sebelumnya sudah menderita penyakit lain contohnya Tuberkulosis, gejalanya sama dengan meningitis tuberkulosis karena penderita yang sistem imunitesnya tertekan atau *Immunocompromise* (Asih, 2019).

Setiap tahun, lebih dari satu juta orang yang telah berhasil diobati untuk Tuberkulosis (TB) namun dikembangkan terinfeksi jamur mematikan, yang disebabkan oleh infeksi jamur. Sebuah penelitian memperkirakan bahwa lebih dari satu juta orang terinfeksi kandidiasis paru kronis setelah dirawat penyebabnya *Mycobacterium tuberculosis* setiap tahun. Sebagian besar kasus terjadi di negara -

negara dengan tingkat *Mycobacterium tuberculosis* yang tinggi termasuk Bangladesh, Cina, India, Indonesia dan Filipina (WHO , 2019).

*Candida albicans* adalah jamur di udara yang setiap orang hirup, biasanya tidak menyebabkan penyakit, kecuali pada orang dengan sistem kekebalan lemah seperti orang-orang dengan leukemia, asma parah, *cystic fibrosis*, HIV/AIDS dan pada orang-orang dengan paru-paru yang rusak seperti mereka yang terdiagnosa Tuberkulosis. Sekitar setengah dari mereka yang terinfeksi meninggal dalam waktu lima tahun (WHO, 2019) .

Gejala - gejala kandidiasis paru kronis yaitu penurunan berat badan, sesak napas yang parah, kelelahan dan batuk darah - sangat mirip dengan Tuberkulosis sehingga dokter sering salah mendiagnosis dan meresepkan pengobatan yang salah. Infeksi dapat tumbuh tanpa terdeteksi selama bertahun-tahun, pada saat itu sudah terlambat untuk berhasil diobati (Purnami, 2017).



**Gambar 2.3** Mikroskopis *Bakteri Tahan Asam* (BTA) serta ditemukan bentukan spora, dengan metode Ziehl Neelsen perbesaran objektif 100X (Dokumentasi pribadi, 2022).

## 2.3 Pemeriksaan Jamur

### 2.3.1 *Sabouraud Dextrose Agar (SDA)*

*Sabouraud Dextrose Agar (SDA)* ialah media kultur yang dipakai dalam budidaya *Candida albicans*. Nutrisi yang didapat pada media kultur disiapkan guna pertumbuhan mikroorganisme di laboratorium, mempengaruhi morfologi, warna koloni, juga kuantitas koloni jamur. Media tumbuh sintetik dan non sintetik dapat dibedakan secara kimia. Senyawa organik dan anorganik murni ditambahkan ke media sintetik seperti *Sabouraud Dextrose Agar (SDA)* dan *Potato dextrose Agar (PDA)*, yang secara selektif menumbuhkan jamur sebab keasamannya yang rendah (pH 4,5–5,6) menghambat pertumbuhan bakteri (Basarang, dkk., 2020).



**Gambar 2.4** Media SDA yang ditumbuhkan jamur *Candida sp.* (Geni *et all*, 2016).

## 1. Jenis Media

- a) Menurut konsistensinya : media *Sabouraud Dextrose Agar* ialah media bentuk padat (solid).
- b) Menurut fungsinya : media *Sabouraud Dextrose Agar* ialah media selektif sebagai pertumbuhan jamur serta menghambat pertumbuhan bakteri.
- c) Menurut bahan penyusunnya : media *Sabouraud Dextrose Agar* tersusun dari bahan sintesis.
- d) Menurut wadahnya : media *Sabouraud Dextrose Agar* ialah media yang disimpan pada plate atau cawan petri (Handayani, 2020).

## 2. Fungsi Media

Adapun fungsi media secara umum yaitu :

- a) Isolasi mikroorganisme kultur murni,
- b) Memanipulasi komposisi media pertumbuhannya
- c) Menumbuhkan mikroorganisme
- d) Memperbanyak jumlah
- e) Menguji sifat-sifat fisiologinya
- f) Menghitung jumlah mikroba
- g) Media *Sabouraud Dextrose Agar* banyak di gunakan untuk media jamur, pada media ini pertumbuhan jamur optimal di suhu 25°C - 30°C (Handayani, 2020).

**3. Komposisi Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) :**

- a) *Mycological peptone* 10 g
- b) *Glucose* 40 g
- c) Agar 15 g.

**4. Fungsi dari komponen media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)**

- a) *Mycological peptone* : menyediakan nitrogen serta sumber vitamin yang diperlukan sebagai pertumbuhan organisme di *Sabouraud dextrose agar* (SDA)
- b) *Glucose* : dalam konsentrasi yang tinggi dimasukkan untuk sumber energi
- c) *Agar* : berperan bagai bahan pematat

**5. Digunakan pada pemeriksaan mikrobiologi**

- a) Untuk budidaya jamur patogen, komensal dan ragi
- b) Baik untuk isolasi terutama dermatofit
- c) Digunakan untuk menentukan kandungan mikroba dalam kosmetik
- d) Digunakan dalam evaluasi mikologi makanan, dan secara klinis membantu dalam diagnosis ragi dan jamur penyebab infeksi (Handayani, 2020).

## 6. Prosedur Pembuatan Media:

- a) Menyiapkan semua alat serta bahan, mencuci bersih alat yang dipakai
- b) Melakukan perhitungan bahan, lalu dilakukan penimbangan bahan

Perhitungan penimbangan media SDA ialah :

SDA 20 ml @ 30 plate

$$\text{SDA} : \frac{65 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ ml aquadest} = 39 \text{ gr media SDA}$$

- c) Memanfaatkan timbangan triple beam untuk menimbang bahan sesuai dengan temuan perhitungan. Menimbang kaca arloji yang kosong dan menambahkan media seperlunya adalah langkah pertama. Memasukkan media SDA kedalam Erlenmeyer yang terisi aquadest 600 ml.
- d) Gunakan hot plate untuk melarutkan media SDA secara merata.
- e) Pengukuran pH pada media SDA maksimal 5 titik.
- f) Sterilkan Erlenmeyer dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, bungkus dengan kapas dan kain kasa, atau tutupi dengan bahan.
- g) Dengan menggabungkan satu kapsul klorampenikol dengan sepuluh mililiter PZ steril, Anda dapat membuat larutan klorampenikol.
- h) Mencampur media SDA yang sudah disterilisasi dengan larutan kloramphenicol sebanyak 1% dari keseluruhan volume media atau 1 ml dalam 100 ml media.
- i) Menuang media SDA kemasing-masing Petridisk
- j) Dibiarkan media pada petridisk mebeku sempurna

- k) Dimasukan media pada ke inkubator ( $\pm 37^{\circ} C$ ), selama 24 jam untuk uji kualitas media, dengan posisi terbalik ( agar media tidak mengembun).
- l) Pelarutan tidak boleh sampai mendidih, pelarutan harus sempurna, sehingga tidak ada kristal yang tersisa (Jannah, 2020).

## **7. Uji Kualitas Media**

Uji sterilisasi dan uji spesifisitas harus dilakukan agar media memenuhi harapan kualitas. Untuk memastikan apakah bahan ataupun sediaan yang diperlukan telah memenuhi standart, dilakukan uji sterilisasi. Media dapat diinkubasi dalam inkubator selama sehari untuk dilakukan uji sterilisasi. Pertumbuhan bakteri tidak boleh diamati pada media yang ideal. Namun, koloni yang berkembang kurang dari dua bisa diterima. Sementara hal ini berlangsung, pengendalian bakteri yang sesuai dengan jenis serta tujuan media yang dibuat digunakan dalam uji spesifikasi. Hal ini berguna dalam menentukan jenis, kelompok, dan tujuan media yang dibutuhkan. Pengujian kualitas media jadi maupun media yang diproduksi sendiri mencakup berbagai topik. Jadi penting untuk memperhatikan persiapan media (Handayani, 2020).

## **8. Secara visual**

secara visual, khususnya dengan memeriksa kekeruhan, warna, dan isyarat visual lainnya. jika warna tidak sesuai dengan media yang diharapkan, harus dicurigai adanya perbedaan pH dan diuji menggunakan kertas pH ataupun pH meter. Jika pH media beda 0,2 satuan, bisa tambahkan asam ataupun basa, atau dibuat media baru. Media SDA mempunyai warna kuning agak kecoklatan (Handayani, 2020).

## **9. Uji Sterilitas**

Pengujian sterilitas sangat penting, bila menggunakan media yang diperkaya akan zat seperti agar darah ataupun agar coklat. Pengujian sterilitas media meliputi:

- a) Dari setiap wadah media yang dihasilkan diambil 5% volumenya.
- b) Media diinkubasi pada suhu 35°C selama satu sampai dua hari.
- c) Indikasi tidak dapat digunakannya seluruh media dalam wadah adalah tumbuhnya lebih dari dua koloni mikroorganisme dalam cawan petri ataupun lebih.

## **10. Uji Spesifitas**

Dengan memasukkan organisme kontrol positif juga negatif, uji spesifitas dapat dilakukan. Strain kuman juga dikenal sebagai mikroorganisme pengontrol kualitas, dimana mikroorganisme tertentu yang dapat tumbuh subur di lingkungan tertentu. Ketika tumbuh di lingkungan yang tepat mikroorganisme ini dapat menunjukkan stabilitas reproduksi permanen dan memiliki karakteristik morfologi, biokimia, dan serologis yang dapat diuji ( Handayani, 2020).

## **11. Penyimpanan Media**

Wadah Petridisk digunakan untuk menyimpan media dan bahan penolong setelah dibuat. Wadah diberi label nama media juga tanggal pembuatan, kemudian diletakkan terbalik. Karena petridisknya terbalik maka labelnya ditempelkan di badan media agar mudah dilihat di saat pengambilan media. Dikarenakan tutup Petridisk lebih besar dari badannya, membaliknya akan memudahkan pelepasannya, meningkatkan sirkulasi udara karena udara masuk lewat bagian atas, dan mencegah

uap air hasil pemanasan menetes ke dalam media. Media sisa yang sudah dibuat bisa disimpan di lemari es suhu konstan atau 40°C. Karena mikroorganisme sulit tumbuh pada media dengan suhu rendah, hal ini dilakukan guna menjaga kualitas media serta mencegah tumbuhnya mikroorganisme di sana.

Jika media yang sudah jadi disimpan di tempat yang gelap dan dingin, media tersebut dapat disimpan dengan ketentuan sebagai berikut :

- a) Media didalam tabung dengan tutup kapas/aluminium foil : 1 minggu
- b) Media didalam tabung dengan tutup screw cap : 3 bulan
- c) Media didalam cawan petri : 1-2 minggu (Hadayani, 2020).

## **12. Nilai kritis Pembuatan Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)**

- a) Penimbangan media harus sesuai dengan perhitungan
- b) Media tidak boleh mendidih ketika dihomogenisasi dengan pemanasan. Ketidakseimbangan pH, warna yang lebih gelap, penurunan kekuatan gel, dan penurunan kualitas media semuanya dapat disebabkan oleh pemanasan yang berlebihan. Untuk memungkinkan pematangan media yang sempurna, pelarutan harus sempurna, tidak meninggalkan kristal.
- c) PH media harus diperhitungkan karena hanya pada pH tersebut mikroorganisme akan tumbuh paling efektif. PH yang tepat untuk media SDA ialah 5,6 dikurangi 0,2. Untuk mendapatkan hasil pengukuran pH yang akurat, pH harus diperiksa pada suhu 25°C. PH dapat dibuat kurang asam dengan menambahkan HCl 0,01 N, dan dikurangi basa dengan menambahkan NaOH tetes demi tetes sampai pH yang diinginkan tercapai.

- d) Karena penambahan antibiotik di media terjadi setelah sterilisasi, maka penting untuk melakukannya secara aseptik atau di dekat api untuk mencegah masuknya kontaminan.
- e) Kloramfenikol adalah antibiotik yang paling sering digunakan, namun dapat menggunakan antibiotik apa pun dikarenakan media SDA dirancang guna menumbuhkan jamur, bukan bakteri di media tersebut. Pertumbuhan bakteri pada media akan menghambat kemampuan mengamati media.
- f) Jumlah antibiotik yang ditambahkan ialah 1% dari media atau 1 ml per 100 ml media. Dibutuhkan sebanyak itu guna mencegah bakteri tumbuh di media (Jannah, 2020).

### **2.3.2 Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

#### **2.3.2.1 Pengertian**

Reaksi berantai polimerase (PCR) adalah salah satu pendekatan amplifikasi asam nukleat in vitro yang paling banyak mendapat perhatian dan paling sering dipakai. Menggunakan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam termosiklik, PCR dipakai guna menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan menganalisis molekul DNA baru yang melengkapi molekul DNA target. Target DNA memiliki posisi diapit oleh sepasang primer dan panjangnya dapat berkisar antara puluhan dan ribuan nukleotida. Primer yang diletakkan sebelum area target disebut primer maju, juga primer yang ditempatkan setelah area target disebut primer terbalik. Enzim polimerase adalah yang bertanggung jawab untuk mencetak urutan molekul DNA yang baru ditemukan. *Reverse Transcriptase* digunakan pada molekul mRNA sebelum proses PCR untuk menghasilkan molekul DNA komplementer (cDNA).

Molekul cDNA berfungsi sebagai amplifikasi RNA selama tahap proses PCR. Proses RT-PCR adalah nama fase ini (Widayat. dkk, 2019).

Karena kloning gen sebelumnya dianggap mustahil, teknologi PCR mampu memajukan bioteknologi secara signifikan pada awal dekade setelah penemuannya. Pentingnya teknologi ini telah mempengaruhi setiap bidang penelitian biologi, termasuk kesehatan, lingkungan, dan pertanian. Hal ini memungkinkan keberhasilan penyelesaian proyek pengurutan kode genetik manusia dan penemuan berbagai obat baru serta identifikasi spesies baru dan pengobatan penyakit serius. seperti kanker dan penyakit menular dapat ditemukan lebih dini.

Kemampuan mengurutkan basis DNA manusia menggunakan teknologi PCR yang berhasil diselesaikan dalam waktu singkat telah memberikan dampak yang signifikan pada bidang kedokteran dan mengarah pada praktik pengobatan yang dipersonalisasi, atau berfokus pada kebutuhan pasien tertentu. Selain meningkatnya jumlah aplikasi PCR, teknologi ini terus ditingkatkan dan diubah sebagai respons terhadap tantangan baru dalam penelitian. PCR memiliki kekurangan, seperti risiko paparan yang tinggi, kebutuhan peralatan dan biaya pemeriksaan yang mahal, serta waktu pemrosesan 2 hingga 3 jam. Karena proses kerjanya lebih rumit, laboratorium perlu dilengkapi dengan personel yang memiliki pengetahuan dan keahlian khusus untuk mengurangi kemungkinan kesalahan teknis (Anita *et all*, 2020).

### **2.3.3 Prinsip-prinsip Dasar PCR**

Prinsip dari RT-PCR adalah secara sistematis mengumpulkan sinyal fluoresen dari beberapa siklus dari satu atau lebih reaksi berantai polimerase. Nilai numerik

dibuat untuk setiap sampel menggunakan sinyal fluoresen dari setiap reaksi. Dengan nilai prediksi positif 100% dan nilai negatif 98,86%, RT-PCR memiliki sensitivitas sekitar 97,5% dan spesifisitas 100% dalam mengidentifikasi spesies dermatofit (IRIMIE et al., 2011).

### **2.3.3.1 Komponen PCR**

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen adalah (Sogandi, 2018) :

#### **a) Desain primer (oligonukleotida) dan probe real time**

Primer atau oligonukleotida merupakan urutan pendek yang digunakan sebagai primer maju untuk memulai proses sintesis rantai DNA dan sebagai primer terbalik untuk memperkuat fragmen DNA tertentu. Berdasarkan kombinasi acak yang mungkin ditemukan dalam urutan genom, panjang primer biasanya berkisar antara 18 hingga 30 nukleotida. Selain primer, proses RT-PCR juga memerlukan probe sebagai tempat melekatnya primer. Desain primer dan probe yang digunakan, dirancang menggunakan NCBI. Keberhasilan suatu proses PCR bergantung pada rancangan primer dan probe yang dibuat spesifik dengan DNA mikroorganisme yang akan diteliti. Sehingga rancangan tersebut tidak akan mengamplifikasi DNA lain (Sugita et al., 2006).

#### **b) RNA *Template***

RNA *template* merupakan bentuk RNA yang membawa informasi dari DNA di dalam nukleus ke tempat ribosom untuk sintesis protein di dalam sel. RNA *template* berfungsi untuk sintesis protein.

#### **c) Buffer mengandung ion Mg (Mg<sup>2+</sup>)**

Buffer merupakan komponen RT-PCR yang berfungsi untuk menjamin pH medium. Proses ini berlangsung pada pH tertentu. Buffer yang mengandung ion Mg<sup>2+</sup>

dapat meningkatkan interaksi primer dengan template yang terbentuk kompleks larut dengan dNTPs. Ion  $Mg^{2+}$  berasal dari  $MgCl_2$  yang dapat sebagai kofaktor yang menstimulasi aktivasi DNA.

**d) Enzim DNA *polymerase***

Untuk mengkatalisis DNA saat reaksi polimerase DNA diperlukan enzim polimerase DNA. Enzim ini diperlukan pada tahap elongasi DNA dan akan bergabung dengan primer untuk menghasilkan *copy* DNA yang berfungsi sebagai cetakan DNA untuk proses selanjutnya yang berlangsung pada suhu 70 - 78°C

**e) *Deoxy Ribo Nukleotida trifosfat (dNTP)***

dNTP ialah campuran dari dATP (*deoksiadenosin trifosfat*), dGTP (*deoksiguanosin trifosfat*), dCTP (*deoksisitidin trifosfat*) serta dTTP (*deoksitimidin trifosfat*). diproses PCR, dNTP berfungsi untuk *building block* yang diperlukan saat proses elongasi DNA. dNTP akan menempel pada gugus - OH yang berada pada ujung 3' dari primer dan bentuk untaian baru yang komplementer dengan rantai DNA template. dNTP juga berfungsi mengikat ion  $Mg^{2+}$  sehingga bisa merubah konsentrasi efektif ion yang diperlukan guna reaksi polimerisasi.

**2.3.4 Tahap Proses PCR**

Proses PCR terdiri dari tiga tahapan, yaitu denaturasi DNA templat, penempelan (*annealing*) primer, dan polimerisasi (*extension*) rantai DNA. Adapun tiga tahapan dalam proses PCR adalah :

**a. Denaturasi**

Sebelum enzim Taq polimerase dimasukkan ke dalam tabung reaksi pada prosedur PCR, dilakukan denaturasi awal. Denaturasi DNA adalah rangkaian

mengubah DNA untai ganda jadi DNA untai tunggal. sebagai memastikan bahwa molekul DNA didenaturasi menjadi DNA beruntai tunggal, proses ini biasanya memerlukan waktu tiga menit. Sebelum menambahkan enzim Taq polimerase ke dalam tabung reaksi pada prosedur PCR, denaturasi awal telah selesai (Aisyah, 2019).

**b. *Annealing* (penempelan primer)**

Persyaratan paling umum guna membuat primer yang baik ialah ukurannya antara 18 dan 25 basa, mengandung antara 50 dan 60 persen G+C, dan memiliki primer yang identik di kedua sisi. Selain itu, rangkaian DNA di setiap primer itu sendiri tidak boleh saling melengkapi karena hal itu akan menyebabkan terbentuknya struktur sekunder juga menurunkan efisiensi PCR. 30 hingga 45 detik adalah waktu yang umum untuk PCR. Suhu meningkat seiring dengan pemanjangan ukuran primer. Kisaran suhu penempelan adalah 36 hingga 72°C, namun suhu tipikalnya adalah 50 hingga 60°C (Aisyah, 2019).

**c. *Pemanjangan Primer* (*Extention*)**

Taq polimerase mulai memperluas DNA primer dari ujung 3' pada titik ini. Enzim ini dapat merakit nukleotida dengan kecepatan 35 hingga 100 nukleotida per detik pada suhu 72°C, tergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam, juga molekul DNA target. Alhasil, tahap ekstensi primer PCR untuk produk dengan panjang 2000 pasangan basa hanya membutuhkan waktu satu menit. Waktu yang dipakai tahap ini biasanya ditingkatkan menjadi 5 menit pada akhir siklus PCR sehingga semua produk PCR harus membentuk DNA beruntai ganda. (Aisyah, 2019).

Proses yang disebutkan di atas diulangi 25 hingga 30 kali (siklus), dan sebagai hasilnya, molekul DNA beruntai ganda baru yang diproduksi di jumlah yang jauh lebih

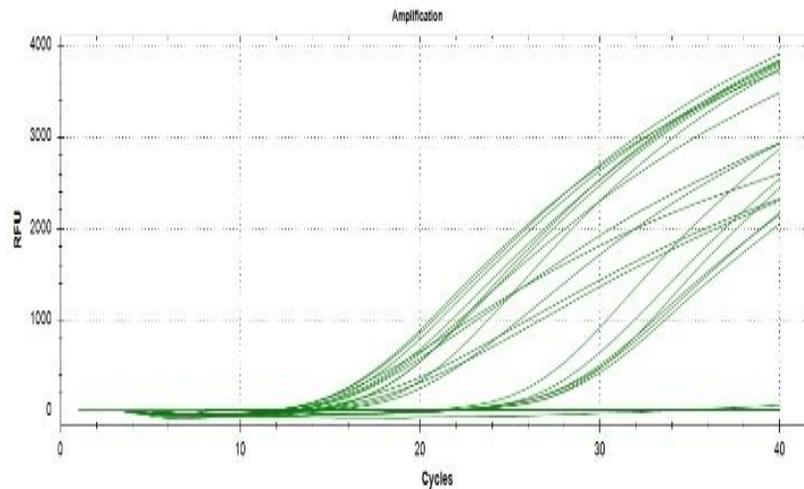
besar daripada DNA cetakan yang dipakai diperoleh pada akhir setiap siklus. Konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi menentukan jumlah siklus amplifikasi. Elektroforesis gel agar digunakan untuk menentukan ukuran produk PCR. Dengan menggunakan teknik ini, DNA disuntikkan ke dalam gel agarosa, yang kemudian digabungkan dengan listrik. Hasilnya untaian DNA besar di antara gel menunjukkan hasil yang menjanjikan, sedangkan untaian DNA kecil bergerak dengan cepat (Nugroho, 2019).

Ada banyak manfaat yang diduga terkait dengan PCR. Berdasarkan kekhususan, efektifitas, dan keakuratannya. Kekhususan PCR disebabkan oleh kemampuannya untuk memperkuat dan menghasilkan produk dalam beberapa siklus. akurasi yang tinggi dikarenakan DNA polimerase dapat mencegah terjadinya kesalahan di saat amplifikasi produk. Biaya terkait PCR masih cukup tinggi, dan hal ini menjadi masalah. Selain itu manfaat lebih lanjut dari metode PCR adalah kemampuan untuk mereplikasi fragmen DNA (110 bp,  $5 \times 10^{-9}$  mol) sebanyak 200.000 kali setelah menyelesaikan 20 siklus reaksi selama 220 menit. Jumlah DNA cetakan yang dibutuhkan untuk reaksi ini sekitar 5 ug, dan jumlah oligonukleotida yang dibutuhkan hanya sekitar 1 nm. Reaksi ini biasanya dilakukan dalam volume 50 - 100 ul. Metode PCR dapat digunakan untuk menduplikasi sekuens DNA pada genom jamur dengan menghomogenkan koloni hasil kultur jamur ditabung PCR karena DNA cetakan tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu (Nugroho, 2019).

### **2.3.5 Analisis Deteksi Amplifikasi pada Real Time PCR**

Saat menganalisis data dari eksperimen PCR waktu nyata, penting untuk mengetahui kapan atau selama siklus mana alat tersebut pertama kali mengidentifikasi

target amplifikasi. Besaran ini, yang menunjukkan awal fase eksponensial, dikenal sebagai  $C_t$  (*Cycle threshold* ambang batas) atau  $C_p$  (*Crossing Point*). Konsentrasi asam nukleat target yang lebih tinggi dalam bahan awal akan menghasilkan peningkatan sinyal atau kurva amplifikasi yang lebih awal karena hubungan antara  $C_p$  dan konsentrasi.



**Gambar. 2.5** Kurva amplifikasi pada *Real Time PCR*  
Sumber: Gambar Pribadi 2023.

$C_p$  (*Crossing ponite*) yang lebih rendah akan dihasilkan terlebih dahulu karena diperlukan siklus amplifikasi yang lebih sedikit guna mencapai titik dimana sinyal fluoresensi SYBR *Green* yang terdeteksi lebih tinggi dari ambang batas fluoresensi ditentukan, semakin banyak target atau templat yang ada di awal reaksi. Waktu amplifikasi target dengan SYBR *Green*, yang diselingi dengan semua dsDNA, memerlukan penambahan tahap kurva leleh untuk menilai spesifisitas produk. Suhu leleh ( $T_m$ ) adalah titik di mana DNA mulai mengalami denaturasi. Ukuran dan komposisi nukleotida sama-sama mempengaruhi nilai  $T_m$ . Untuk menentukan data  $T_m$

dari setiap produk yang diamplifikasi, dsDNA harus didenaturasi menjadi DNA untai tunggal (ssDNA), yang akan melepaskan sinyal fluoresensi (Nolan et al., 2006).

### **2.3.6 Optimasi PCR**

Untuk mendapatkan hasil terbaik dari proses PCR maka dilakukan optimasi PCR. Dengan mengubah kondisi proses PCR optimasi tercapai. Faktor-faktor berikut berdampak pada pengoptimalan :

#### **a) Suhu**

Salah satu elemen yang mempengaruhi keberhasilan PCR adalah suhu. Proses anil, denaturasi, dan ekstensi primer semuanya dipengaruhi oleh suhu. Panjang cetakan DNA yang dipakai juga panjang fragmen DNA target menentukan suhu denaturasi cetakan yang berkisar antara 93 hingga 95°C. Efisiensi PCR akan dipengaruhi oleh penurunan aktivitas DNA polimerase yang disebabkan oleh suhu denaturasi yang terlalu tinggi, selain itu berpotensi merusak cetakan DNA. Sementara itu, denaturasi cetakan DNA yang tidak lengkap dapat disebabkan oleh suhu rendah. Produk PCR dalam jumlah kecil akan dihasilkan dari suhu annealing yang tinggi karena produk hibridisasi template primer tidak mencukupi. Karena banyaknya ketidakcocokan pasangan basa, anil pada suhu yang terlalu rendah dapat menghasilkan produk yang tidak spesifik. Derajat spesifisitas PCR sangat dipengaruhi oleh toleransi ketidakcocokan.

Kondisi yang biasanya digunakan untuk proses anil primer adalah 55 hingga 65°C (Coleman dan Tsongalis, 2005). Kisaran suhu ini khusus untuk primer PCR.  $T_m$  primer yang digunakan berdampak pada pemilihan suhu annealing. Berdasarkan ( $T_m$ -

5)°C hingga (T<sub>m</sub>+5)°C, suhu anil dapat dihitung. Biasanya, 72°C digunakan sebagai suhu ekstensi primer selama proses PCR (Handoyo & Rudiretna, 2001).

**b) Jenis Polimerase DNA**

DNA rantai panjang akan memiliki kemampuan yang berbeda dengan DNA rantai pendek dalam mengkatalisis reaksi polimerisasi DNA dirangkaian PCR yang berlangsung pada tahap ekstensi. Panjang DNA target yang diamplifikasi menentukan jenis DNA polimerase yang digunakan. Suatu jenis polimerase dengan aktivitas tinggi diperlukan panjang fragmen DNA > 3 kilobase.

**c) Konsentrasi dNTPs, MgCl<sub>2</sub>,**

Panjang target DNA yang diamplifikasi mempengaruhi konsentrasi dNTP. 200 uM dNTP diperlukan untuk panjang target DNA 1 kilobase. Konsentrasi MgCl<sub>2</sub> yang ideal biasanya berkisar antara 1 dan 1 dan 5 mM. Terlalu sedikit MgCl<sub>2</sub> akan berdampak negatif pada hasil PCR. Sementara itu, akumulasi produk non-target akibat mispriming akan terjadi pada konsentrasi yang berlebihan. Tergantung pada berapa lama fragmen DNA perlu diamplifikasi, jumlah DNA polimerase yang berbeda digunakan. Campuran reaksi 50 L memerlukan 1 titik 25–2 unit untuk fragmen DNA yang panjangnya kurang dari 2 kilobase dan 3 unit untuk fragmen DNA yang lebih panjang.

**d) Buffer PCR**

Ada dua jenis PCR Buffer yang diperdagangkan: buffer garam rendah (pH 8 titik 75 serta kapasitas buffer rendah) juga buffer garam tinggi (pH 9 titik 2 jugakapasitas buffer tinggi). DNA target yang diamplifikasi biasanya menentukan jenis buffer PCR yang digunakan. DNA target dengan panjang lebih dari 5 kilobase biasanya

memerlukan buffer garam tinggi, sedangkan DNA target dengan panjang 0 - 5 kilobase biasanya memerlukan buffer garam rendah.

**e) Waktu Proses Amplifikasi**

Waktunya ditentukan oleh denaturasi cetakan DNA, anil dan proses ekstensi primer. Biasanya denaturasi berlangsung 30 hingga 90 detik. Templat DNA akan rusak karena waktu denaturasi yang terlalu lama, yang juga bisa menurunkan aktivitas DNA polimerase. Sedangkan waktu denaturasi yang singkat mengakibatkan proses denaturasi tidak sempurna. Panjang primer mempengaruhi bagaimana prosedur anil dipilih. Meskipun 30 detik cukup untuk panjang primer antara 18 dan 22 basa, 60 detik harus berlalu sebelum anil selesai untuk panjang primer lebih dari 22 basa (Handoyo & Rudiretna, 2001).

**2.4 Gen ITS 2**

Gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dari DNA telah menjadi gen target populer dalam beberapa tahun terakhir untuk analisis keanekaragaman jamur juga sudah dipilih sebagai penanda standart untuk barcode DNA jamur. Wilayah ITS yang merupakan komponen Kompleks gen RNA ribosom (rDNA) telah digunakan sebagai target penelitian pada jamur *Candida sp.* wilayah pada ribosom antara 18S dan 28S merupakan wilayah non-coding. Wilayah konservasi 5.8S memisahkan dua spacer, ITS1 dan ITS2, dari wilayah ITS yang terletak di antara DNA ribosom 18S dan 28S. Urutan yang sangat bervariasi yang dikenal sebagai wilayah ITS1 dan ITS2 telah digunakan untuk mengidentifikasi jamur pada tingkat spesies (Sasongkowati, *et all*, 2022).

Keuntungan wilayah ITS-2 dibandingkan wilayah target molekuler lainnya adalah memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi karena adanya sekitar 100 pengulangan genom. Setiap gen rDNA jamur *Candida albicans* mengandung wilayah ITS-2 yang telah mengalami evolusi pesat (Jorgensen et al., 1987). DNA ribosom nuklir (rDNA) telah menjadi rangkaian seleksi target yang paling sering dipakai, serta ITS (*Internal Transcribed Spacer*) kedua atau ITS2 dari rDNA sudah terbukti memberikan penanda genetik spesifik spesies yang dapat dipercaya untuk patogen jamur. rDNA semua spesies *Candida* berhasil diamplifikasi oleh daerah pengkode rDNA yang mengapit wilayah ITS-2. Setelah siklus terakhir Real-Time PCR untuk diferensiasi spesies, Membatasi polimorfisme panjang fragmen dengan pewarna SYBR *Green* memungkinkan diferensiasi amplikon yang mengandung rangkaian spesifik spesies dari wilayah ITS-2 (Ardila, 2020).

Uji PCR dilakukan dalam 20 L total volume yang mengandung 10 L 2 X Power SYBR *Green* PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA), 0,2 mM primer (wilayah ITS-2) dan 5 L masing-masing sampel DNA. Kondisi bersepeda terdiri dari denaturasi awal langkah pada 95 °C (5 menit), diikuti oleh 40 siklus pada 95°C (30 detik), 58 °C (30 detik), dan 72 °C (30 detik), dan langkah disosiasi akhir pada 56-95° C dengan laju pemanasan 0,3°C/s.10 Untuk memperkirakan kesetaraan antara CFU dan fentogram (fg). (Felipe, 2020).

## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka Konseptual

Penyakit Tuberkulosis (TB) ialah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium Tuberculosis*, (WHO, 2018). *Mycobacterium Tuberculosis* ialah kuman berbentuk basil tahan asam (Suari, 2018).

Menurut Kementerian Kesehatan angka kejadian kasus TB di Indonesia 1.026.000, namun baru dilaporkan di Kementerian Kesehatan sebanyak 570.000 kasus Tuberkulosis di Indonesia. Indonesia menempati urutan ketiga setelah Tiongkok. (Amiri et al., 2018).

Sputum penderita Tuberkulosis sering di temukan organisme lain salah satunya adalah jamur *Candida albicans* ( PAAA Nugraha, 2017). Kandidiasis mampu menyerang mulut, vagina, kuku, kulit, bronkus, serta paru-paru. Penyakit ini ditemukan di seluruh dunia serta bisa menyerang semua usia baik laki-laki maupun perempuan. (Erna, 2019).

Dengan melakukan pemeriksaan mikroskopis, identifikasi molekuler, uji serologis, dan kultur spesimen, laboratorium dapat mendiagnosis kandidiasis. Untuk mengidentifikasi, budaya berusaha adanya jamur komensal maupun jamur patogen. Kultur sputum penderita Tuberkulosis menggunakan media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA).

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik amplifikasi asam nukleat. Teknik ini sangat sensitif dan dapat mengamplifikasi target DNA, bahkan untuk DNA sel tunggal. Multiplex-PCR adalah metode yang cepat, sensitif dan spesifik yang menggabungkan banyak primer spesies dalam satu tabung PCR. Oleh karena itu, dapat digunakan untuk mendeteksi gen penyebab secara bersamaan. (Anwar, 2022).

Urutan internal transcribed spacer 2 (ITS2), yaitu DNA inti (nrDNA), merupakan penanda molekuler yang digunakan untuk membedakan spesies *Candida albicans*. Wilayah ITS2, yang non-coding, terletak di antara gen 28S dan gen 5.8S, yang mengkode subunit besar RNA ribosom (rRNA) (Hasanah, 2018).

### 3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

*Mycobacterium tuberculosis* merupakan suatu bakteri penyebab penyakit menular tuberkulosis (TB). Penyakit menular tuberkulosis salah satu dari 10 penyebab kematian terbesar di dunia adalah tuberkulosis (TB). Lebih dari 95% penderita penyakit paru-paru yang disebabkan oleh tuberkulosis telah teridentifikasi di negara - negara berkembang, khususnya di Asia, Afrika, Timur Tengah, dan Amerika Latin (WHO, 2018). *Mycobacterium tuberculosis* adalah sejenis kuman kecil berbentuk batang dengan ukuran 1-4 m dan 0,3-0,6 m. *Mycobacterium tuberculosis* terutama terdiri dari lemak atau lipid, yang memberikan bakteri ketahanan terhadap asam dan kekuatan fisik. (Suari, 2018).

Selain bakteri tahan asam, mikroorganisme lain, termasuk jamur, juga sering ditemukan pada pasien tuberkulosis yang menjalani pemantauan pengobatan. *Candida sp.* merupakan jamur yang sering diidentifikasi sebagai pemicu penyakit paru-paru. *Candida albicans*, yang menginfeksi lebih dari 90% dan menyebabkan kandidiasis invasif dan non-invasif, salah satu jenis *Candida sp* yang telah dilakukan identifikasi. (PAAA Nugraha, 2017). Prevalensi infeksi jamur oportunistik baru-baru ini meningkat, yang biasanya tidak mampu menyebabkan penyakit pada orang sehat. Sementara mereka adalah patogen potensial pada *immunocompromised* individu pada pasien dengan penyakit yang mendasarinya, konsumsi luas antibiotik, gangguan imunitas pada pasien tuberkulosis paru.

Pemeriksaan mikroskopis, analisis molekuler, tes serologis, dan kultur spesimen merupakan metode yang dapat digunakan di laboratorium untuk mendiagnosis kandidiasis. Tujuan kultur adalah untuk mengidentifikasi morfologi jamur dalam

spesimen dan untuk memvalidasi temuan analisis mikroskopis. Spesimen dari pasien digunakan untuk mengisolasi jamur *Candida albicans* pada media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA), yang kemudian digunakan untuk melakukan kultur. Selanjutnya inkubasi sampai ada pertumbuhan koloni jamur pada media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA), dan dilanjutkan dengan Identifikasi makroskopis dan mikroskopis *Candida albicans*. Teknik kultur metode konvensional diikuti dengan tes biokimia memakan waktu yang lama. Selain itu, uji biokimia terkadang gagal mengidentifikasi mikroorganisme, Pendekatan molekuler jauh lebih cepat, sensitif dan spesifik dibandingkan dengan tehnik konvensional (Handayani, 2022).

DNA dapat diamplifikasi secara invitro menggunakan reaksi berantai polimerase (PCR), suatu proses enzimatis. Pendekatan yang disukai untuk identifikasi dan karakterisasi jamur adalah pengembangan teknik molekuler berbasis PCR. Melalui aplikasi berbasis PCR, teknik PCR mengisolasi DNA dari kualitas dan kuantitas untuk dianalisis (Retno, 2022). Teknik ini sangat sensitif dan dapat mengamplifikasi target DNA bahkan untuk DNA sel tunggal. Multiplex-PCR adalah metode yang cepat, sensitif dan spesifik yang menggabungkan banyak primer spesies spesifik dalam satu tabung PCR. Oleh karena itu dapat digunakan untuk mendeteksi gen penyebab secara bersamaan (Anwar, 2022).

Deteksi isolasi DNA genom merupakan langkah pertama yang penting dalam penelitian molekuler. Untuk mendapatkan DNA murni yang tidak terkontaminasi komponen sel lain merupakan ide dasar di balik isolasi DNA. Penghancuran dinding sel jamur merupakan langkah kunci dalam isolasi DNA jamur. Metode mekanis dan lisis keduanya dapat digunakan untuk penelitian ini. Jenis dan kuantitas DNA yang

dihasilkan dipengaruhi oleh teknik isolasi. Ketersediaan sampel DNA sebagai template, DNA taq polimerase, primer, oligonukleotida, dan buffer menentukan hasil amplifikasi DNA pada PCR (Hermansyah et al., 2018).

Urutan DNA inti (nrDNA) transkripsi internal spacer 2 (ITS2), yang digunakan sebagai penanda molekuler untuk membedakan spesies *Candida albicans*, digunakan. Di antara gen 5.8S, yang mengkode subunit kecil RNA ribosom (rRNA), dan gen 28S, yang mengkode subunit besar rRNA, terdapat wilayah non-kode yang disebut ITS2 (Hasanah, 2018).

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian dekriptif kuantitatif dengan *cross sectional study* yakni sampel sputum penderita *Tuberculosis* (TB). Untuk melihat adanya jamur *Candida albicans* pada sputum penderita *Mycrobacterium Tuberculosis* (TB) dengan menggunakan metode RT-PCR.

#### **4.2 Tempat dan Waktu penelitian**

Sampel Penelitian dilakukan di Rumah Sakit Pusat TNI Angkatan Laut (RSPAL) Dr. Ramelan Surabaya untuk pengambilan sampel sputum penderita *Tuberculosis* (TBC). Kemudian dilakukan kultur jamur dari sampel sputum penderita *Tuberculosis* di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Surabaya, pada bulan Februari sampai Mei 2023. Selanjutnya dilakukan deteksi gen ITS 2 *Candida albicans* di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Surabaya.

#### **4.3 Populasi Penelitian**

Populasi dari penelitian ini adalah penderita *Tuberculosis* (TB) menggunakan sampel sputum sebagai bahan pemeriksaan yang diambil di Rumah Sakit Pusat TNI Angkatan Laut (RSPAL) Dr. Ramelan Surabaya.

#### **4.4 Sampel penelitian**

Sampel penelitian ini adalah pasien penderita *Tuberculosis* (TB) yang diambil sampel sputum sebagai bahan pemeriksaan, dengan kriteria *proporsive sampling* sebagai berikut :

- 1) Pasien penderita *Mycrobacterium Tuberculosis* (TB)
- 2) Volume sputum minimal 2 ml.
- 3) Penelitian ini adalah penelitian klinis, yang diteliti adalah sampel sputum penderita *Mycrobacterium Tuberculosis* (TB), Untuk penelitian metode deskriptif diperlukan sampel sebanyak 30 responden.

##### **4.4.1 Kriteria Inklusi Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari isolate sputum penderita Tuberculosis (TB) di Rumah Sakit Pusat TNI Angkatan Laut (RSPAL) Dr. Ramelan Surabaya yang ditemukan adanya jamur *Candida albicans*.

##### **4.4.2 Kriteria Eksklusi Sampel**

Sampel yang tidak digunakan dalam penelitian ini yakni isolate sputum pasien penderita Tuberculosis (TB) yang pada saat di kultur tidak ditemukan jamur *Candida albicans*.

#### **4.5 Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini yakni jamur *Candida albicans* pada sputum penderita *Tuberculosis* (TB) dan Gen ITS2.

## **4.6 Definisi Operasional Variabel Penelitian**

### **4.6.1 Gen ITS 2**

Urutan DNA inti (nrDNA) transkripsi internal spacer 2 (ITS2), yang digunakan sebagai penanda molekuler untuk membedakan spesies *Candida albicans*, digunakan. Di antara gen 5.8S, yang mengkode subunit kecil RNA ribosom (rRNA), dan gen 28S, yang mengkode subunit besar rRNA, terdapat wilayah non-kode yang disebut ITS2 (Mulyatni dkk, 2011).

### **4.6.2 *Candida albicans***

Ragi dimorfik *Candida albicans*, dapat berkembang menjadi sel ragi, hifa, atau pseudohifa. Mikroorganisme komensal atau patogen yang disebut *Candida albicans* dapat ditemukan pada 40 hingga 80 persen orang sehat. infeksi *Candida albicans* bisa menyebabkan invasi sekunder pada paru paru yang sebelumnya telah menderita penyakit lain contohnya *Tuberculosis* (TB), gejalanya sama dengan meningitis *tuberculosis* karena penderita yang sistem imunitasnya tertekan atau *Immunocompremise*.

### **4.6.3 Sputum penderita Tuberkulosis (TB)**

Sputum yang didapatkan dari penderita Tuberkulosis yang disebabkan oleh bakteri basil tahan asam *Mycrobacterium tuberculosis*.

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Prosedur Pemeriksaan Kultur

#### 1. Alat :

- a) Bunsen
- b) Tabung reaksi
- c) Ose / Sengkelit

#### 2. Bahan :

- a) Media *Sabaroud Dextrose Agar* (SDA)

#### 3. Langkah Kerja :

Metode Pertama dengan *Sabaroud Dextrose Agar* (SDA)

- a) Memakai Alat Pelindung Diri
- b) Mempersiapkan alat dan bahan yang digunakan.
- c) Memijarkan inokulum ose hingga membara , didinginkan
- d) Inokulasi sampel pada media *Sabaroud Dextrose Agar* (SDA) dengan ose steril.  
Spesimen diinokulasi sebanyak 1 inokulum penuh dengan cara distreak plate pada media *Sabaroud Dextrose Agar* (SDA) dengan menggoreskan hingga melukai permukaan agar.
- e) Memijarkan kembali inokulum ose hingga membara, didinginkan.
- f) Inkubasi media SDA pada suhu 35 - 37°C selama 96 - 144 jam
- g) Biakan dinyatakan positif bila ada pertumbuhan koloni berwarna putih susu atau putih cream berbau khas ragi. Dari koloni pada media SDA disubkultur ke media SDA lain yang selanjutnya digunakan untuk identifikasi spesies.

- h) Inokulasi koloni dari SDA sebanyak 1 inokulum penuh dan ditanamkan pada media SDA dengan menggosokkan pada permukaan agar.
- i) Menginkubasi media SDA pada suhu 35 - 37°C selama 96 jam dengan dibungkus menggunakan kertas buram atau aluminium foil agar terhindar dari cahaya (untuk melindungi pengaruh cahaya terhadap kemampuan kromogenik media)
- j) Pada hari ke 6 jika tidak ada pertumbuhan pada media SDA. Maka dilaporkan “Tidak Ada Pertumbuhan Jamur”
- k) Biakan dinyatakan positif bila ada pertumbuhan koloni *Candida sp.* sehingga dapat dilakukan identifikasi tingkat spesies menggunakan metode RT - PCR

#### **4.7.2 Prosedur Pemeriksaan dengan Alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

##### **1. Alat :**

- a) Alat PCR
- b) Tabung effendorf
- c) Centrifuge
- d) Vortex
- e) Inkubator
- f) Mikropipet 20 ul, 100 ul, 1000 ul
- g) Yellow Tip, Blue Tip dan White Tip

##### **2. Bahan :**

- a) Reagen Multiplex PCR
- b) Reagen Mixing
- c) Primer R dan Primer F

#### 4.7.3 Prosedur Ekstraksi DNA Bakteri *Mycrobacterium Tuberculosis*

Suspensi yang telah dibuat dilanjutkan ke ekstraksi DNA langkah langkah berikut :

- a) Pipet 200  $\mu$ l aquabidest ditambahkan 2 ose koloni jamur, homogenkan
- b) Ditambahkan sebanyak 450 $\mu$ l *Nucleic Lysis Solution* ke dalam tabung efendorf, vortex
- c) Inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar (37°C) setiap 5 menit sekali dihomogenkan
- d) Centrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit 20 detik
- e) Supernatan dibuang sisakan sedimen, lalu sedimen divortex 15 detik
- f) Ditambahkan sebanyak 150 $\mu$ l *Nucleic Lysis Solution*, inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam
- g) Tambahkan *protein presipitation resolution* sebanyak 50 $\mu$ l, vortex selama 15 detik
- h) Centrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 4 menit.
- i) Pipet supernatant, pindahkan ke tabung efendorf baru dan tambahkan 300 $\mu$ l isopropanol, homogenkan
- j) Centrifuge 12.000 rpm selama 3 menit.
- k) Pindahkan supernatan ke tabung efendorf baru, tambahkan 300 $\mu$ l etanol 70%.
- l) Sentrifuge 12.000 rpm selama 3 menit.
- m) Etanol dibuang, tabung efendorf dibalik, untuk memisahkan dari endapan dan dikeringkan diatas tisu selama 10 – 15 menit
- n) Endapan yang terbentuk ditambahkan DNA *Rehydration* sebanyak 50 $\mu$ l.

- o) Inkubasi 1 x 24 jam pada suhu 4°C

#### 4.7.3.1 Uji Kemurnian DNA Jamur *Candida albicans*.

Spektrofotometer yang diatur dengan rasio panjang gelombang 260 nm digunakan untuk memeriksa kemurnian sampel DNA yang diperoleh dari hasil ekstraksi. Blanko air suling steril digunakan untuk mengkalibrasi panjang gelombang spektrofotometer. Panjang gelombang ini digunakan untuk mengukur serapan sampel DNA. Dengan rumus *Optical Density* (OD) 260/280, jika hasilnya 1,8 - 2,0 maka tingkat kemurnian DNA yang dihasilkan tinggi dan dapat digunakan lebih lanjut. Interpretasi hasil dari nilai perbandingan OD 260/280 nm adalah sebagai berikut:

OD rasio 260/280 < 1,8	Terkontaminasi protein
OD rasio 260/280 ± 1,8-2,0	Tingkat kemurnian DNA tinggi
OD rasio 260/280 > 2.0	Terkontaminasi RNA

Prosedur untuk melakukan uji kemurnian DNA sebagai berikut :

- 1) Nyalakan alat MaestroNano.
- 2) Pilih tipe sampel (dsDNA).
- 3) Angkat penutup besi, teteskan 2µl aquabidest (sebagai blanko) tepat dibagian tengah atas *quartz glass* (dalam lingkaran).
- 4) Tutup penutup besi dan tekan “*blank*”.
- 5) setelah menentukan blanko, angkat penutup besi dan bersihkan *quartz glass*.
- 6) Pipet 2µl sampel hasil ekstraksi dan teteskan dibagian tengah atas *quartz glass* (dalam lingkaran).

7) Tekan “sampel”, kemudian tunggu hingga hasil pembacaan muncul.

#### **4.7.3.2 Identifikasi Gen ITS 2**

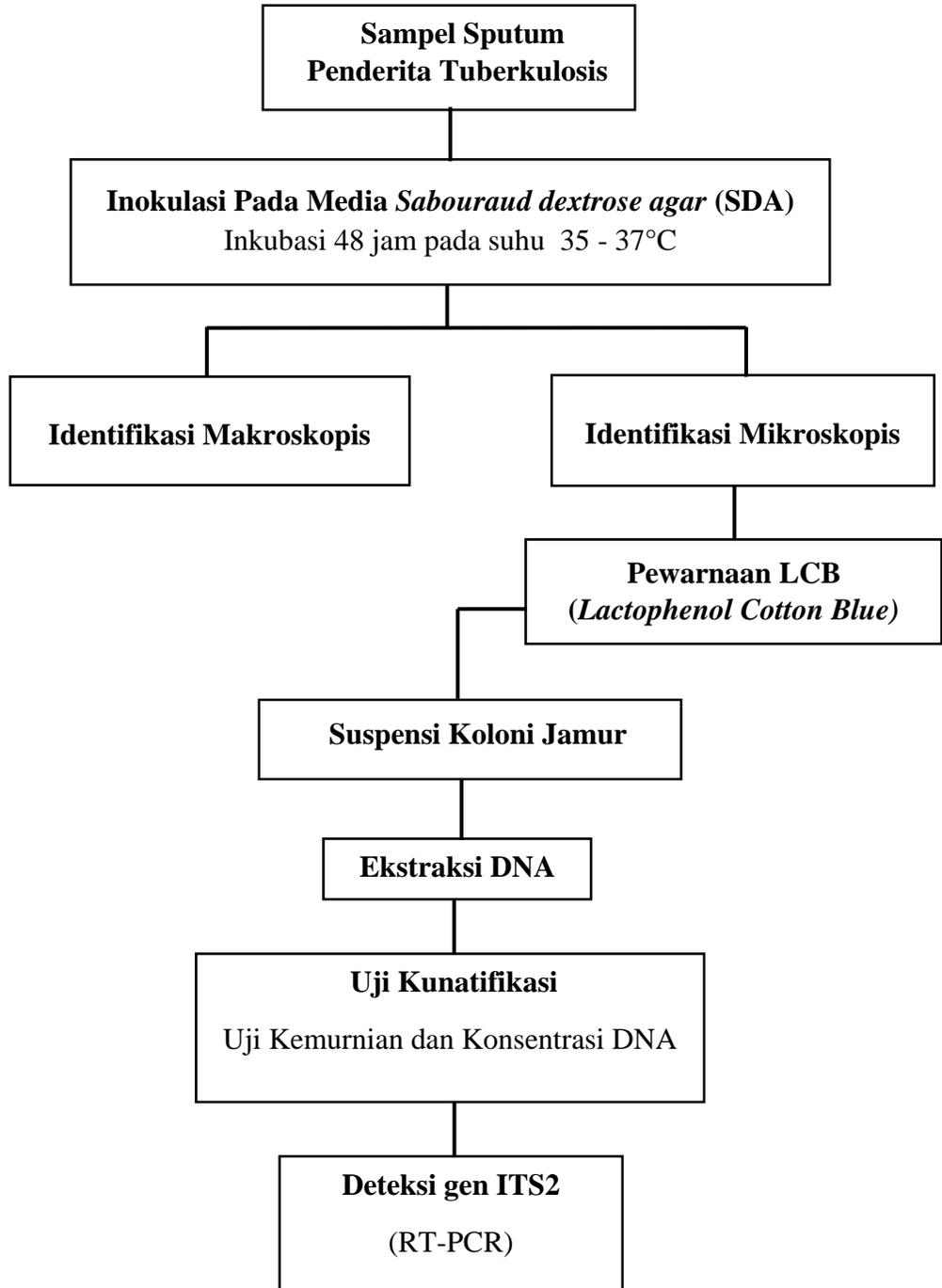
Pada proses gen ITS 2 Primer yang digunakan yakni primer primer forward 5'-GGGTTTGCTTGAAAGACGGTA-3' dan primer reverse 5'-TTGAAGATATACGTGGTGGACGTTA-3' di qPCR dengan hasil pembacaan 108bp. Kondisi PCR yang digunakan untuk identifikasi adalah tahap denaturasi awal langkah pada 95°C (5 menit), diikuti oleh 40 siklus pada 95°C (30 detik ), 58°C ( 30 detik ), dan 72°C (30 detik ), dan langkah disosiasi akhir pada 56 – 95°C dengan laju pemanasan 0,3°C/s. Untuk memperkirakan kesetaraan antara CFU dan Fentogram (fg).

#### **4.8 Teknik Analisa Data**

Teknik analisa data yang digunakan adalah :

- a) Pengakuan Hasil Konsentrasi dan Kemurnian DNA Sesuai Standart. Pada panjang gelombang ini, penyerapan sampel DNA diukur. Jika hasil rumus *Optical Density* (OD) 260/280 adalah 1,8 - 2,0 maka tingkat kemurnian DNA yang dihasilkan tinggi (>5 ng/uL), dan tahap Real Time - Polymerase Chain Reaction (RT - PCR) dapat melanjutkan.
- b) Identifikasi Hasil Amplifikasi DNA berupa *Cycle Threshold* (CT). Nilai CT berbanding terbalik dengan target DNA pada sampel. (semakin rendah nilai CT menunjukkan hasil target DNA yang besar).

#### 4.9 Alur Penelitian



## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Penyajian Data

Peneliti telah melakukan pemeriksaan terhadap 30 sampel sputum yang memenuhi kriteria di Rumah Sakit Pusat Angkatan Laut dr. Ramelan (RSPAL) Surabaya. Data hasil kultur pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) disajikan dalam tabel sebagai berikut :

**Tabel 5.1 Hasil Kultur Sampel Sputum Tuberculosis Pada Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)**

NO	KODE SAMPEL	HASIL PEMERIKSAAN		KESIMPULAN
		MAKROSKOPIS	MIKROSKOPIS	
1	S1	-	-	Negatif
2	S2	+	+	Positif
3	S3	-	-	Negatif
4	S4	+	+	Positif
5	S5	-	-	Negatif
6	S6	+	+	Positif
7	S7	+	+	Positif
8	S8	-	-	Negatif
9	S9	+	+	Positif
10	S10	+	+	Positif
11	S11	-	-	Negatif
12	S12	-	-	Negatif
13	S13	-	-	Negatif
14	S14	+	+	Positif
15	S15	-	-	Negatif
16	S16	+	+	Positif
17	S17	+	+	Positif
18	S18	+	+	Positif
19	S19	+	+	Positif
20	S20	+	+	Positif

21	S21	+	+	Positif
22	S22	+	+	Positif
23	S23	-	-	Negatif
24	S24	+	+	Positif
25	S25	-	-	Negatif
26	S26	+	+	Positif
27	S27	+	+	Positif
28	S28	+	+	Positif
29	S29	+	+	Positif
30	S30	-	-	Negatif
31	Kontrol	+	+	Positif

**Keterangan Hasil :**

Keterangan Makroskopis :

(+) : Terdapat Pertumbuhan koloni jamur berbentuk bulat berwarna putih kekuningan dan berbau khas ragi

(-) : Tidak terdapat pertumbuhan koloni jamur berbentuk bulat berwarna putih kekuningan dan berbau khas ragi

Keterangan Mikroskopis :

(+) : Terdapat bentukan *germinating blastospores* berbentuk bulat dari *budding yeast cell* pada pengecatan LCB (*Lactophenol Cotton Blue*)

(-) : Tidak Terdapat bentukan *germinating blastospores* berbentuk bulat dari *budding yeast cell* pada pengecatan LCB (*Lactophenol Cotton Blue*).

Berdasarkan **tabel 5.1** menunjukkan hasil kultur jamur *Candida sp* dari 30 sampel sputum Tuberkulosis. Identifikasi Makroskopis ditemukan 19 sampel positif adanya jamur *Candida sp.* ditandai dengan adanya pertumbuhan koloni jamur berbentuk bulat berwarna putih kekuningan dan berbau khas ragi pada media

*Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) serta dilanjutkan pembacaan mikroskopis menggunakan pengecatan LCB (*Lactophenol Cotton Blue*) terdapat bentukan *germinating blastospores* berbentuk bulat dari *budding yeast cell* pada pengecatan LCB (*Lactophenol Cotton Blue*). Didapatkan 19 sampel positif dilakukan deteksi menggunakan metode RT-PCR. Dari 30 sampel *Tuberculosis* terdapat 11 sampel negatif atau tidak ada pertumbuhan Jamur *Candida sp.*

Setelah dilakukan kultur jamur dilakukan pengamatan makroskopis dan mikroskopis pewarnaan LCB (*Lactophenol Cotton Blue*). 19 Sampel yang positif dilanjutkan ke tahap selanjutnya yaitu suspensi koloni jamur, suspensi koloni tersebut dilakukan ekstraksi DNA serta dilakukan deteksi gen ITS2 *Candida albicans* menggunakan metode RT-PCR. Sampel hasil ekstraksi DNA diperiksa menggunakan nano spektrofotometer untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi DNANYa. Adapun hasil yang diperoleh sebagai berikut :

**Tabel 5.2 Kuantifikasi Pemeriksaan Uji Kemurnian dan Konsentrasi DNA Menggunakan Nano Spektrofotometer dengan Hasil Tabel dibawah ini**

No	Sampel	Nilai Kemurnian DNA (A260/A280)	Nilai Konsentrasi DNA (ng/ $\mu$ L)
1	S2	1.932	6.71
2	S4	1.897	14.33
3	S6	1.811	41.95
4	S7	1.851	24.38
5	S9	1.969	72.23
6	S10	1.850	79.01
7	S17	1.845	41.09
8	S16	1.810	55.19
9	S17	1.986	22.13
10	S18	1.927	14.54
11	S19	1.854	32.77

12	S20	1.870	36.13
13	S21	1.810	30.20
14	S22	1.909	78.58
15	S24	1.812	42.03
16	S26	1.859	14.11
17	S27	1.964	26.60
18	S28	1.900	8.38
19	S29	1.847	66.18
20	Kontrol	1.980	12.34

Dari hasil kuantifikasi pemeriksaan kemurnian dan konsentrasi DNA sesuai dengan **tabel 5.2** dapat dilihat bahwa 19 sampel bernilai antara 1.8 – 2.0 dapat disimpulkan bahwa sampel memiliki kemurnian yang tinggi dan telah memenuhi standart yang sesuai. Selanjutnya nilai konsentrasi DNA pada 19 sampel dapat dinilai diatas 5.00 ng/ul sehingga dapat disimpulkan bahwa 19 sampel tersebut telah memenuhi standart yang ditentukan. Selanjutnya sampel dapat diteruskan untuk dilakukan deteksi gen ITS2 *Candida albicans* menggunakan RT.PCR

**Tabel 5.3 Total Sampel 20 dilakukan RT-PCR dengan Hasil Tabel dibawah ini :**

No	Sampel	Nilai CT (Cycle Threshold)	Pewarna	Keterangan
1	S2	15.04	SYBR	Positif
2	S4	11.80	SYBR	Positif
3	S6	13.19	SYBR	Positif
4	S7	11.84	SYBR	Positif
5	S9	14.05	SYBR	Positif
6	S10	34.19	SYBR	Positif
7	S14	21.05	SYBR	Positif
8	S16	11.55	SYBR	Positif
9	S17	21.66	SYBR	Positif
10	S18	13.59	SYBR	Positif
11	S19	20.41	SYBR	Positif
12	S20	12.66	SYBR	Positif
13	S21	12.58	SYBR	Positif

14	S22	21.13	SYBR	Positif
15	S24	13.34	SYBR	Positif
16	S26	14.24	SYBR	Positif
17	S27	21.23	SYBR	Positif
18	S28	12.86	SYBR	Positif
19	S29	21.75	SYBR	Positif
20	Kontrol	11.94	SYBR	Positif

Dari **tabel 5.3** menunjukkan hasil deteksi gen ITS2 *Candida albicans* pada 19 sampel dari 30 sampel yang sebelumnya telah dilakukan kultur kultur jamur. Didapatkan hasil positif karena nilai CT pada sampel tidak melebihi siklus yang telah ditentukan yaitu 40 siklus.

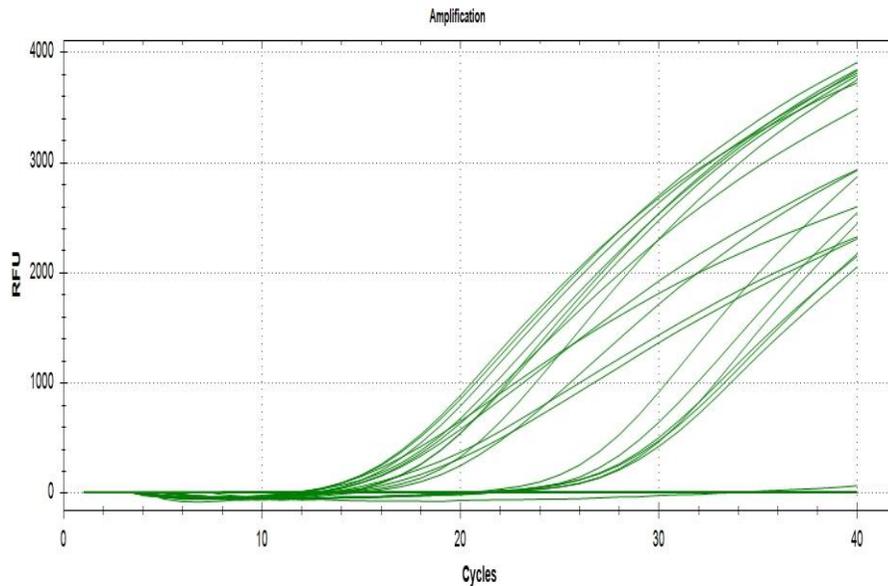
Dari hasil uji deteksi gen ITS2 yang ditunjukkan nilai *Cycle Threshold* (CT) gen ITS2 yang telah terdeteksi pada 19 sampel jamur *Candida albicans* pada sputum *Tuberculosis*. *Cycle Threshold* (CT) didefinisikan sebagai siklus termal dimana sinyal fluoresen reaksi melewati ambang batas. Menjalankan sampel selama 40 siklus adalah jumlah siklus yang diperlukan untuk mendeteksi gen ITS2. Sampel dianggap positif mendeteksi gen *Candida albicans* ITS2 apabila nilai CT yang muncul kurang atau tidak mendekati nilai siklus.

Dari data diatas maka jika dipresentasikan hasil pemeriksaan identifikasi *Candida albicans* pada metode RT – PCR akan didapat sebagai berikut :

**Tabel 5.4 Presentase Hasil Pemeriksaan Deteksi Gen ITS2 *Candida albicans* Menggunakan Metode RT-PCR**

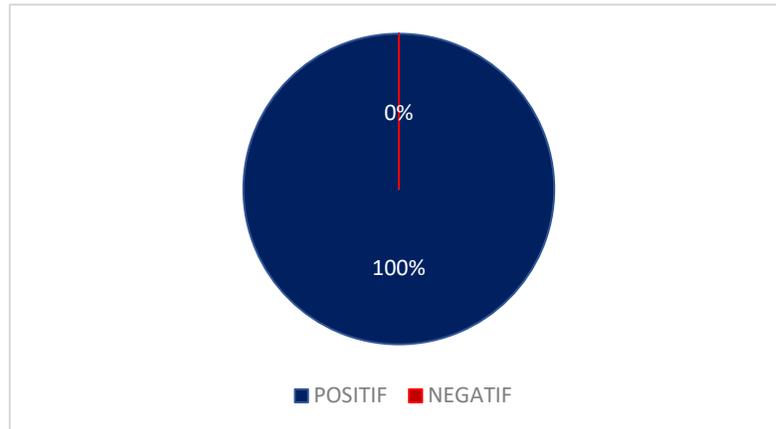
No	Interpretasi Hasil	Presentase
1	Negatif	36,66% (11 Sampel)
2	<i>Candida albicans</i>	63,34% (19 Sampel)

Dari 30 sampel sputum penderita *Tuberculosis* didapatkan 11 sampel negatif *Candida albicans* dengan perhitungan presentase  $\frac{11}{30} \times 100 \% = 36,66 \%$  serta didapatkan 19 sampel positif *Candida albicans* dengan perhitungan presentase  $\frac{19}{30} \times 100 \% = 63,34 \%$ .



**Gambar 5.2 Kurva Deteksi Gen ITS2 *Candida albicans* Pada RT-PCR**

Pada **gambar 5.2** menunjukkan kurva hasil amplifikasi dari gen ITS2 jamur *Candida albicans* pada 19 sampel dan 1 kontrol positif dinyatakan positif adanya gen ITS2 *Candida albicans*.



**Gambar 5.3** Presentase Deteksi Gen ITS2 *Candida albicans*

Pada **Gambar 5.3** dapat diketahui bahwa presentase gen ITS2 sebanyak 100% dari 19 sampel yang dilakukan identifikasi molekuler terdeteksi adanya gen ITS2 pada jamur *Candida albicans* dari sampel sputum *Tuberculosis*. Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa dari 30 sampel yang telah dilakukan kultur jamur yang terdeteksi adanya gen ITS2 *Candida albicans* sebanyak 19 sampel.

## 5.2 Analisis Data

Dari 30 sampel sputum *Tuberculosis* yang telah dilakukan kultur jamur dapat diketahui terdapat 19 sampel yang positif terdapat jamur *Candida sp.* Identifikasi Makroskopis pada media SDA (*Saboroud Dextrose Agar*) ditandai adanya pertumbuhan koloni jamur berbentuk bulat berwarna putih kekuningan dan berbau khas ragi, dilanjutkan identifikasi Mikroskopis ditandai adanya bentukan *germinating*

*blastospores* berbentuk bulat dari *budding yeast cell* pada pengecatan LCB (*Lactophenol Cotton Blue*).

Suspensi koloni jamur yang positif kemudian dilanjutkan ke tahap ekstraksi DNA. Setelah selesai dilakukan ekstraksi DNA, selanjutnya dilihat kemurnian dan konsentrasi DNA menggunakan nano spektrofotometer dengan mengambil sebanyak 2 uL sampel. Selanjutnya dilihat dari hasil ekstraksi sampel apakah sudah sesuai dengan standart acuan pembacaan kemurnian dan konsentrasi DNA sehingga dapat dilanjutkan ke tahap deteksi gen ITS2 menggunakan Real Time PCR.

Dari **tabel 5.3** merupakan produk kuantitatif RT-PCR yang berupa nilai CT (*Cycle Threshold*). Nilai CT (*Cycle Threshold*) menunjukkan berapa banyak siklus yang harus dilalui sebelum fluoresensi mencapai ambang batas. Nilai CT berkorelasi terbalik dengan konsentrasi DNA target dalam sampel (nilai CT yang lebih rendah menunjukkan konsentrasi DNA target yang tinggi). RT-PCR ini menggunakan pewarna SYBR *Green* dimana pewarna ini akan berfluoresensi ketika berikatan dengan seluruh double - stranded DNA (dsDNA). Setiap siklus akan merekam sinyal fluoresen yang dipancarkan SYBR *Green* saat berikatan dengan dsDNA, sehingga menunjukkan jumlah produk yang diperkuat saat reaksi berlangsung. (Syahbani, 2022).

Sampel dinyatakan positif karena nilai CT yang diperoleh lebih kecil atau kurang dari jumlah siklus, dan siklus yang diperlukan untuk running sampel yaitu 40 siklus. Dari 19 sampel yang telah dilakukan deteksi gen ITS2 didapatkan nilai CT dibawah 40, maka dari itu dinyatakan positif gen ITS2. Dapat disimpulkan dari 30 sampel yang

telah dilakukan kultur jamur didapatkan 19 sampel yang positif jamur *Candida albicans* dan terdapat adanya gen ITS2.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Data hasil penelitian 30 pemeriksaan Deteksi gen ITS2 *Candida albicans* pada sputum penderita *Tuberculosis* menggunakan metode RT-PCR 11 Sampel negatif jamur *Candida albicans*, 19 sampel positif jamur *Candida albicans*. Sampel tersebut dilakukan kultur jamur dan dilakukan identifikasi makroskopis dan mikroskopis. Sampel sputum penderita *Tuberculosis* diinokulasi pada media SDA (*Saboroud Dextrose Agar*) lalu diinkubasi di suhu 37°C dengan waktu 48 jam. Karakteristik jamur *Candida albicans* yang tumbuh di media SDA (*Saboroud Dextrose Agar*) berbentuk bulat, koloni berwarna putih kekuningan atau cream serta berbau khas ragi. Secara mikroskopis memperlihatkan bentukan *germinating blastospores* berbentuk bulat dari *budding yeast cell* pada pengecatan LCB (*Lactophenol Cotton Blue*).

Sampel yang telah dilakukan kultur jamur selanjutnya dibuat suspensi dengan aquabidest steril (*aqua pro injection* bebas pirogen) untuk dilakukan langkah selanjutnya yaitu ekstraksi DNA, lalu diinkubasi pada kulkas 4°C selama 1 x 24 jam. Selanjutnya sampel dilakukan kuantifikasi uji kemurnian serta konsentrasi DNA menggunakan alat nano spektrofotometer. Hasil dari uji spektrofotometer nanodrop adalah berupa nilai kemurnian DNA pada A260/A280 serta nilai konsentrasi DNA.

Hasil DNA uji spektrofotometer nanodrop dikatakan berkualitas baik apabila mempunyai nilai kemurnian antara 1.8 – 2.0. Sedangkan untuk nilai konsentrasinya yang berkualitas baik adalah diatas 100ng/uL dan tidak dianjurkan apabila nilainya dibawah 5 ng/ uL (Syahbani, 2022). Apabila hasil uji kemurnian DNA dan konsentrasi

DNA sesuai dengan standart maka sampel bisa diteruskan dengan deteksi gen ITS2 *Candida albicans* menggunakan RT-PCR dengan pembacaan hasil berupa nilai CT (*Cycle Threshold*).

Pada sputum Tuberculosis terdapat jamur *Candida albicans*. yang dapat menyebabkan infeksi oportunistik dimana host akan mengalami kondisi *Immunocompromised* yang merupakan gangguan jangka panjang pada fungsi imunitas seluler dan humoral yang dapat terjadi akibat pengobatan *imunopresif* atau proses penyakit. Deteksi *Candida albicans* bisa dilakukan dengan menggunakan metode RT-PCR yang dapat mendeteksi DNA.

Gen ITS2 merupakan hasil amplifikasi dari sekuens DNA ribosom 5,8S dan 28S (rDNA) yang berfungsi sebagai gen penyandi. ITS Ketika molekul prekursor RNA penanda struktural diubah menjadi ribosom, urutan RNA dari proses transkripsi awal antara subunit prekursor ribosom dipotong selama proses penyambungan. Gen 5.8S dan 28S terletak di sebelah gen ITS2. Agar wilayah ITS berbeda atau bervariasi antar spesies, biasanya mengalami perubahan atau mutasi (Mulyatni dkk, 2011).

Identifikasi jamur *Candida albicans* menggunakan wilayah DNA ribosom (rDNA) ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Karena rangkaian DNA wilayah rDNA ITS berevolusi lebih cepat dibandingkan wilayah gen lainnya, maka urutan DNA tersebut bervariasi antar spesies. (Ardila, 2022). Untuk membedakan atau memvariasikan antar spesies, wilayah ITS biasanya mengalami perubahan atau mutasi. Wilayah ITS2 memiliki keunggulan dibandingkan wilayah target molekuler lainnya, seperti memiliki tingkat sensitivitas yang sangat tinggi karena pengulangan genom

sekitar 100. Semua gen rDNA jamur *Candida albicans* mengandung wilayah ITS2 yang juga memiliki laju evolusi yang cepat.

Hasil akhir menunjukkan 11 sampel negatif *Candida albicans* dan 19 sampel dinyatakan positif dengan ditandai munculnya nilai CT (*Cycle Threshold*). 11 hasil negatif tersebut tidak sepenuhnya tidak ada pertumbuhan jamur. Namun terdapat 4 sampel tidak ada pertumbuhan jamur dan 7 sampel terdapat pertumbuhan jamur kapang sehingga interpretasi hasil negatif. Kelemahan dari penelitian ini adalah jamur yang diidentifikasi hanya jamur *Candida albicans* sehingga pembahasan kurang luas dan menyeluruh. Disarankan untuk peneliti selanjutnya dilakukan deteksi menyeluruh pertumbuhan jamur pada media SDA (*Saboroud Dextrose Agar*) sehingga dapat dikelompokkan dari sampel sputum penderita *Tuberculosis* terdapat jamur oportunistik dengan jamur kontaminan.

Presentase hasil sesuai dengan gambar 5.3 sebesar 100% sampel yang terdeteksi adanya gen ITS2 *Candida albicans*. Amplifikasi gen ITS2 telah dianggap sebagai metode sederhana dan akurat untuk penanda isolate jamur *Candida albicans*. Deteksi gen ITS2 *Candida albicans* menggunakan metode RT-PCR merupakan salah satu usaha yang dapat dilakukan untuk mendeteksi ada atau tidaknya jamur *Candida albicans* sehingga kita dapat mengetahui jamur tersebut patogen dan dapat menyebabkan virulensi pada pasien penderita *Tuberculosis*.

Deteksi jamur *Candida albicans* yang diterapkan dalam kurva standart dari fragmen kloning wilayah ITS2 sebagai acuan oleh karena itu, diharapkan dapat dilakukan penelitian tambahan mengenai analisis sequencing mutasi yang terjadi pada

wilayah ITS2 sehingga wilayah ITS2 ini dapat digunakan untuk memastikan ada tidaknya infeksi jamur *Candida albicans*.

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian tentang deteksi gen ITS2 *Candida albicans* pada sputum penderita *Tuberculosis* menggunakan metode RT-PCR. Maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Pada 30 sampel sputum Tuberculosis pemeriksaan identifikasi makroskopis dan mikroskopis pada media SDA (*Saboroud Dextrose Agar*) terhadap identifikasi jamur *Candida albicans* pada sputum pasien penderita Tuberculosis didapatkan hasil 11 sampel negatif (36,66%), 19 sampel positif jamur *Candida albicans* 63,34%
2. Hasil dari deteksi gen ITS2 *Candida albicans* menggunakan metode RT-PCR pada 19 sampel dinyatakan positif terdapat adanya gen ITS2 *Candida albicans* pada sputum penderita Tuberculosis

#### 7.2 Saran

Dari hasil penelitian ini dapat disarankan :

1. Saran bagi peneliti selanjutnya :
  - a) Bagi peneliti selanjutnya diharapkan bisa mengembangkan penelitian yang lebih baik dengan melakukan analisis sekuensing DNA untuk mengetahui jenis mutasi menggunakan sampel pasien penderita Tuberculosis

- b) Dapat menambahkan kriteria dari inklusi sampel serta percobaan dengan metode lain untuk mengetahui perbandingan identifikasi jamur *Candida albicans* dengan jamur spesies lain pada pasien Tuberkulosis, agar pengobatan disesuaikan dengan klinisi pasien Tuberkulosis sehingga dilakukan terapi pengobatan dengan cepat dan tepat.
2. Saran bagi masyarakat diharapkan berhati - hati dalam perawatan Tuberkulosis serta konsumsi obat sesuai anjuran dan arahan dokter, agar disesuaikan dengan klinisi pasien sehingga dapat menghindari infeksi jamur oportunistik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amiri, M.R.J., Siami, R. & Khaledi, A. (2018). Tuberculosis Status and Coinfection of Pulmonary Fungal Infections in Patients Referred to Reference Laboratory of Health Centers Ghaemshahr City during 2007-2017. *Ethiopian journal of healthsciences*, 28(6), 683 – 690. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v28i6.2>
- Anwar, Aan Yulianingsih, Basri, Acce, Jakaria, Febrianti.,(2022). *Detection of Fungal Gene of Candida spp. from Troat Swab of Tuberculosis Patient with Polymerase Chain Reaction Method*. Health Information: Jurnal Penelitian Poltekkes Kemenkes Kendari, Indonesia ISSN: 2085-0840 ISSN-e: 2622-5905 Periodicity: Bianual vol. 14, no. 1, 2022
- Agustina, Anita Suswanti; FAJRUNNIMAH, Rizana. Perbandingan Metode RT-PCR dan Tes Rapid Antibodi untuk Deteksi COVID-19. *Jurnal Kesehatan Manarang*, [S.l.], v. 6, n. Khusus, p. 47 - 54, oct. 2020. ISSN 2528-5602.
- Apriliana Puspitasari, Arthur Pohan Kawilarang, Evy Ervianti, Abu Rohiman (2019). *Profile of New Patients of Candidiasis*. Departemen/Staf Medik Fungsional Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya Tahun 2019.
- Ayu Purnama Asih , 2019. “Gambaran *Candida Albicans* Pada Penderita Tuberkulosis Paru Di Rumah Sakit Khusus Paru Provinsi Sumatera Selatan Tahun 2019,” *Repository Poltekkes Kemenkes Palembang*.
- Budiartini, Gambaran asuhan keperawatan pada pasien tuberkulosis paru dalam pemenuhan defisit pengetahuan di wilayah kerja UPT Puskesmas I Abiansemal Tahun 2020.

- Basarang, Mardiah, Andi Fatmawati, 2020. Penggunaan Serbuk Infus Bekatul Sebagai Bahan Baku Bekatul Dextrosa Agar Untuk Pertumbuhan Jamur. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan* 11 (1), (2020). 1 – 9
- Clancy, C. J., & Nguyen, M. H (2018). Non-culture diagnostics for invasive candidiasis: Promise and unintended consequences. *Journal of Fungi*, 4(1), 1-12. <http://doi.org/10.3390/jof4010027>.
- Coleman, W. B., & Tsongalis, G. J. (2005). Molecular diagnostics; For the clinical laboratorium. In *Molecular Diagnostics; For the Clinical Laboratorian*. <http://doi.org/10.1007/978-1-59259-928-8>
- Desak Gede Dwi Agustini, 2020. Karya Tulis Ilmiah “ Gambaran Hasil Pemeriksaan Jamur pada Sputum Pasien di Rumah Sakit Daerah Mangusada Kabupaten Bandung” , Kementrian Kesehatan R.I. Poltekes Kemenkes Denpasar, 2020.
- Diah Nugrahaeni, dkk. 2015. Profil Enzim *Secreted Aspartyl Proteinase* (SAP) Pada Isolat Pasien Kandidiasis Vulvovaginalis (KVV)
- Dokumen pribadi, 2022. Mikroskopis *Bakteri Tahan Asam* (BTA) serta ditemukan bentukan spora, dengan metode Ziehl Neelsen perbesaran objektif 100X
- Dr. Samanthi, 2021. <http://www.sciencephoto.com/media/996325/view/Candida-albicans-sem>. Kandida albikan, SEM C043/5772.
- Erda Fitri Ardila, 2022. Deteksi jamur *Candida albicans* pada isolat swab luka diabetes mellitus menggunakan *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya 2022.
- Erna Sulistyani, 2020 Pengenalan Dinding Sel *C. Albicans* oleh sistem imunitas innate, UPT PERCETAKAN dan Universitas Jember, 2020
- El-Naggar et al, 2010. Oral Chronic Hyperplastic Candidiasis and Its Potential Risk of Malignant Transformation: A Systematic Review and Prevalence Meta-Analysis. 2010.

- Felipe Delatorre Busser, dkk. 2020 Strategi PCR Waktu Nyata Untuk Deteksi dan Kuantifikasi dari *Candida albicans* dalam darah manusia, *Journal Of The Sao Paulo Institute Of Tropical Medicine*, 2020
- Geni, L., Zuraida & Violita, V. (2016). Hitung Jumlah Koloni Jamur dan Identifikasi Jamur pada Sputum Penderita Tuberkulosis Paru dari Rumah Sakit X dan Y di Jakarta. *Artikel Ilmu Kesehatan*, 8(1), 37-45.
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Ubitas*, 9(1), 17-29.
- Hermansyah, Novian Sutami dan Miksusanti, 2018. Amplifikasi PCR Domain D1/D2 28s Rdna Menggunakan Primer ITS1 Dan ITS4 Sampel DNA Dari *Candida Tropicalis*. Yang Diisolasi Dengan Metode Pendinginan. *Indo. J. Pure App. Chem.* 1 (1), pp. 1-9, 2018.
- Keputusan Kemenkes RI. NOMOR HK.01.07/MENKES/755/2019. *Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Tuberkulosis*. 2019.
- Kemenkes RI. *Standart Prosedur Oprasional Pemeriksaan Mikroskopis TB* 2012.
- Kemenkes RI. Petunjuk Teknis Pemeriksaan Biakan, Identifikasi, dan Uji Kepekaan *Mycrobacterium Tuberculosis* pada Media Padat 2012.
- Kristianto Nugroho, Dwi Widyajantie, Sayyidah Afridatul, Elisa Apriliani. (2019). *Pemanfaatan Teknologi Droplet Digital PCR (ddPCR) dalam Kegiatan Analisis Molekuler Tanaman*. *Jurnal Bios Logos. Accredited by Ministry of Research, Technology and Higher Education* No. 28/E/KPT/2019.
- Lailly Nur Uswatul Hasanah, 2018. Identifikasi Vektor Potensial Malaria Asal Bangsring Banyuwangi Berdasarkan Marka Molekuler *Internal Transcribed Spancer 2* (ITS 2). *Digital Repoditory* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember Jurusan Biologi Tahun 2018.

- Luh Putu. L & Theodore Dharma. T, 2017. Penyakit Paru Obstruktif Kronis (PPOK). Dalam rangka menjalani kepaniteraan klinik madya dibagian ilmu penyakit dalam RSUP Sanglah, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Tahun 2017.
- Miftakhul Jannah. “Identifikasi Kapang *Aspergillus sp.* pada bumbu giling yang dijual dipasar pacar keling surabaya” Karya tulis ilmiah Universitas Muhammadiyah Surabaya tahun 2020.
- Muhammad Nur Syahbani “Deteksi Gen Coa BAKTERI *Staphylococcus aureus* Pada Jerawat Wajah tahun 2022.
- Mulyani, A, S., Priyatmojo, A., & Purwantara, A. (2001). Sekuen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA ribosomal *Oncobasidium thcobromac* dan jamur sekerabat pembanding. *Merana Perkebunan*, 79(1), 1-5.
- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559-1582. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
- Nur Aisyah, Dewi Indriyani Roslim, 2019. Optimasi Suhu Annealing Pasangan Primer Untuk Amplifikasi Daerah ETS (External Transcribed Spacer) Pada Tumbuhan Durik-Durik (*Syzygium sp.*) ASAL RIAU. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau Kampus Bina Widya Pekanbaru. 28293, Indonesia Tahun 2019
- Putu Agoes Adi Ariestyawan Nugraha, *Prevalensi Jamur pada Pemeriksaan Mikroskopis Sputum Pasien TB di Instalasi Mikrobiologi RSUP Sanglah Denpasar*, Bali, 2017;1;2
- PE Lestari, Peran faktor virilensi pada patogenesis infeksi *Candida albicans*, Bagian Ilmu Biomedik Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember 2015

Retno Sasongkowati, Anita Dwi Anggraini, Dellanis Arina Putri. “Deteksi Jamur *Candida albicans* pada urine penderita infeksi saluran kemih menggunakan metode RT-PCR. *The Journal Of Muhammadiyah Medical Laboratory Technologist*. No. 5 No. 2, November 2022.

Ratna Handayani. “Perbandingan metode konvensional (*Saboroud Dextrose Agar*) dan metode otomatis (Vitek 2) terhadap identifikasi *Candida albicans* pada sputum pasien TB Follow Up” Politeknik kesehatan kemenkes surabaya tahun 2020.

Suari Melinda Dewi, Hubungan Kualitas Fisik Rumah dengan kejadian TBC Paru di wilayah kerja puskesmas, 2018.

Widayat, Tri Winarni Agustini, Meiny Suzery, Ahmad Ni'matullah A, Sylvia Rahmi Putri dan Kurdiano, 2019. Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sebagai Alat Deteksi DNA Babi dalam Beberapa Produk Non-Pangan. *Indonesian Journal of Halal*, 2019.

World Health Organization, 2019, *Treatment Of Tuberculosis Guidelines, 4th Ed.*

World Health Organization, 2019, *WHO Global Tuberculosis Report 2015*, [http://www.who.inp/tb/publication/global\\_report/en/](http://www.who.inp/tb/publication/global_report/en/). 12 Oktober 2019

## LAMPIRAN 1 SURAT IZIN PEMAKAIAN LABORATORIUM



**KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA**  
**DIREKTORAT JENDERAL TENAGA KESEHATAN**  
**POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES SURABAYA**

Jl. Pucang Jajar Tengah No. 56 Surabaya - 60282 Telp. (031) 5027058 Fax. (031) 5028141  
Website : www.poltekkesdepkes-sby.ac.id Email : admin@poltekkesdepkes-sby.ac.id



**SURAT IJIN**  
**MELAKUKAN PEMAKAIAN SARANA LABORATORIUM**  
NOMOR : KH.01.01/11/664/2023

Memperhatikan Surat

Nama : Miftakhul Jannah  
NIM : P27834122078  
Tanggal : 2 Februari 2023  
Perihal : Izin pemakaian sarana Laboratorium Biologi Molekuler

Dengan ini kami menyatakan tidak keberatan atas permohonan izin pemakaian sarana Laboratorium oleh :

Nama : Miftakhul Jannah  
NIM : P27834122078  
Tempat Penelitian : Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan  
Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes KemenKes  
Surabaya.  
Keperluan : Melakukan Penelitian  
Judul Penelitian : Deteksi Gen ITS2 *Candida albicans* pada Sputum  
Penderita Tuberculosis Menggunakan Metode RT-PCR

Sehubungan dengan ijin pemakaian sarana laboratorium tersebut, maka yang bersangkutan harus memperhatikan hal-hal sebagai berikut :

1. Mentaati Segala Peraturan dan Instruksi Kerja (IK) yang berlaku
2. Menjaga Kebersihan, Kerapian sarana dan prasarana laboratorium
3. Menghubungi dan melapor kepada Penanggung Jawab Laboratorium dan atau Instruktur Laboratorium dalam hal persiapan penelitian dan penggunaan fasilitas Laboratorium yang diperlukan

Demikian atas perhatiannya disampaikan terima kasih.

Dikeluarkan di : Surabaya  
Pada Tanggal : 12 Mei 2023

An, Direktur Poltekkes Kemenkes Surabaya  
Ketua Jurusan Teknologi Laboratorium Medis



Retno Sasongkowati, S.Pd., S.Si., M.Kes  
NIP. 196510031988032002

## LAMPIRAN 2 SURAT ETIK RSPAL Dr. RAMELAN SURABAYA

  
KOMITE ETIK PENELITIAN  
RESEARCH ETHICS COMMITTEE  
RUMAH SAKIT PUSAT TNI ANGKATAN LAUT Dr. RAMELAN  
Dr. RAMELAN NAVAL CENTRAL HOSPITAL

**KETERANGAN LAYAK ETIK**  
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL  
"ETHICAL APPROVAL"

No: 38/EC/KEP/2023

Protokol penelitian yang diusulkan oleh :  
*The research protocol proposed by*

**Peneliti utama** : Miftakhul Jannah, AMD. Kes.  
*Principal In Investigator*

**Peneliti lain** : 1. -  
*Participating In Investigator(s)* 2. -

**Nama Institusi** : Poltekkes Kemenkes Surabaya  
*Name of the Institution*

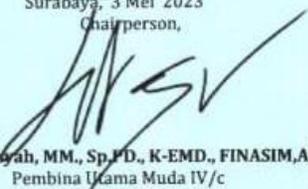
**"Deteksi Gen Its2 Candida albicans Pada Sputum Penderita Tuberculosis  
Menggunakan Metode Rt-Pcr"**  
**"Detection of Its2 Candida albicans Gene in Sputum of Tuberculosis Patients Using the  
Rt-Pcr Method"**

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah,  
3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Risiko, 5) Bujukan/Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan 7) Persetujuan  
Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya  
indikator setiap standar.

*Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values,  
3) Equitable Assessment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion/Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed  
Concent, referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicators of each standard.*

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 3 Mei 2023 sampai dengan tanggal 3 Mei 2024.  
*This declaration of ethics applies during the period May 3, 2023 until May 3, 2024.*

Surabaya, 3 Mei 2023  
Chair person,

  
Dr. dr. Libriansyah, MM., Sp.PD., K-EMD., FINASIM, AIFO-K., CIPA.  
Pembina Utama Muda IV/c  
NIP. 196904221999031004

### LAMPIRAN 3 BERITA ACARA REVISI

#### BERITA ACARA REVISI PROPOSAL SKRIPSI

JUDUL : DETEKSI GEN ITS2 *Candida albicans* PADA SPUTUM PENDERITA  
TUBERCULOSIS MENGGUNAKAN METODE RT-PCR

NAMA : MIFTAKHUL JANNAH

NO	NAMA PENGUJI	TOPIK REVISI	TANDA TANGAN
1.	Retno Sasongkowati, S.Pd, S.Si, M.Kes NIP. 19651003198803 2 002	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Perbaiki penulisan pada cover</li><li>2. Prosedur Ekstraksi DNA diperbaiki</li><li>3. Alur penelitian lebih diperjelas</li></ol>	
2.	Anita Dwi Anggraini, S.ST, M.Si NIP. 19880804 202012 2 001	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Perbaiki penulisan pada cover</li><li>2. Perbaiki deskripsi Gen ITS2</li><li>3. Perbaiki kata "mengetahui" pada tujuan umum point pertama</li><li>4. Kerangka konseptual dijabarkan oleh bukti-bukti ilmiah</li><li>5. Hipotesa tidak diperlukan pada penelitian deskriptif</li><li>6. Perbaiki penulisan kata "dengan" pada metode penelitian point pertama</li><li>7. Alur penelitian lebih diperjelas</li><li>8. Mencari jurnal 5 tahun terakhir</li></ol>	
3.	Dra. Sri Sulami Endah Astuti, M.Kes NIP. 19630927198903 2 001	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Perbaiki penulisan pada cover</li><li>2. Kerangka Konseptual dijabarkan oleh bukti-bukti ilmiah</li><li>3. Alur penelitian lebih diperjelas</li><li>4. Mencari jurnal 5 tahun terakhir</li></ol>	

## LAMPIRAN 4 KARTU BIMBINGAN SKRIPSI



**KEMENTERIAN KESEHATAN RI**  
 DIREKTORAT JENDERAL TENAGA KESEHATAN  
 POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES SURABAYA  
 JURUSAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS  
 PROGRAM STUDI SARJANA TERAPAN REGULER  
 Jl. Karangmenjangan No. 18 A – Tlp. (031)5020718  
 Surabaya



---

**KARTU BIMBINGAN  
SKRIPSI**

NAMA : MIFTAKHUL JANNAH  
 NIM : P27834122018  
 JUDUL SKRIPSI : DETEKSI GEM. TUB. *Candida albicans* PADA SPUTUM  
 PENDERITA TUBERCULOSIS MENGGUNAKAN METODE FT-PCR

NO	TANGGAL	POKOK BIMBINGAN	SARAN	PARAF
1	22.5.2023	EVALUASI & KONSUL HASIL	ACC	[Signature]
2	22.5.2023	EVALUASI & KONSULTASI HASIL	ACC	[Signature]
3	24.5.2023	BAB 5	Revisi	[Signature]
4	24.5.2023	BAB 5	Revisi	[Signature]
5	25.5.2023	BAB 5	Acc. Lanjut bab 6	[Signature]
6	26.5.2023	BAB 5	Acc. Lanjut bab 6	[Signature]
7	29.5.2023	BAB 6	Revisi	[Signature]
8	30.5.2023	BAB 6	Acc. Lanjut bab 7	[Signature]
9	30.5.2023	BAB 6	Revisi	[Signature]
10	31.5.2023	BAB 6	Acc. Lanjut bab 7	[Signature]
11	1.6.2023	BAB 7	Acc	[Signature]
12	1.6.2023	BAB 7	Acc	[Signature]
13	5.6.2023	Skripsi full halaman	Acc Lanjut Sitang	[Signature]
14	5.6.2023	Skripsi full halaman	Acc Lanjut Sitang	[Signature]

CATATAN : Minimal Bimbingan Penulisan Proposal Skripsi dilakukan sebanyak 2 kali untuk 2 (dua) Pembimbing

Setuju dan Siap Diujikan  
 Tgl. Persetujuan : .....  
 Dosen Pembimbing I  
Retno Sasongkowi, S.Pd, S.Si, M.Kes  
 NIP. 19651003198803 2 002

Tgl. Persetujuan : .....  
 Dosen Pembimbing II  
Arika Dwi Anggraini, S.ST, M.Si  
 NIP. 19880804 202012 2 001



Surabaya, .....20.....  
 Direktur Jendral  
 Tenaga Kesehatan  
 Jurusan  
Retno Sasongkowi, S.Pd, S.Si, M.Kes  
 NIP. 19651003198803 2 002

## LAMPIRAN 5 HASIL KULTUR



**KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA**  
**BADAN PENGEMBANGAN DAN PEMBERDAYAAN**  
**SUMBER DAYA MANUSIA KESEHATAN**  
**POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES SURABAYA**

Jl. Pucang Jajar Tengah No. 56 Surabaya - 60282 Telp. (031) 5027058 Fax. (031) 5028141  
 Website : www.poltekkesdepkes-sby.ac.id Email : admin@poltekkesdepkes-sby.ac.id



### HASIL PEMERIKSAAN

046.1/H.LAB/2023

Nama : Miftakhul Jannah  
 NIM : P27834122078  
 Judul Skripsi : Deteksi Gen ITS2 *Candida albicans* Pada Sputum Penderita Tuberculosis Menggunakan Metode RT-PCR  
 Hasil Pemeriksaan : Hasil Kultur Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis Jamur *Candida Sp* pada Media SDA  
 Tanggal Pemeriksaan : 11 Maret - 14 Mei 2023

NO	KODE SAMPEL	MAKROSKOPIS	MIKROSKOPIS	HASIL	NO	KODE SAMPEL	MAKROSKOPIS	MIKROSKOPIS	HASIL
1	S1	-	-	Negatif	16	S16	+	+	Positif
2	S2	+	+	Positif	17	S17	+	+	Positif
3	S3	-	-	Negatif	18	S18	+	+	Positif
4	S4	+	+	Positif	19	S19	+	+	Positif
5	S5	-	-	Negatif	20	S20	+	+	Positif
6	S6	+	+	Positif	21	S21	+	+	Positif
7	S7	+	+	Positif	22	S22	+	+	Positif
8	S8	-	-	Negatif	23	S23	-	-	Negatif
9	S9	+	+	Positif	24	S24	+	+	Positif
10	S10	+	+	Positif	25	S25	-	-	Negatif
11	S11	-	-	Negatif	26	S26	+	+	Positif
12	S12	-	-	Negatif	27	S27	+	+	Positif
13	S13	-	-	Negatif	28	S28	+	+	Positif
14	S14	+	+	Positif	29	S29	+	+	Positif
15	S15	-	-	Negatif	30	S30	-	-	Negatif

#### KETERANGAN HASIL MAKROSKOPIS

(+) : Terdapat Pertumbuhan koloni jamur berbentuk bulat berwarna putih kekuningan dan berbau khas ragi  
 (-) : Tidak terdapat pertumbuhan koloni jamur berbentuk bulat berwarna putihkekuningan dan berbau khas ragi

#### KETERANGAN HASIL MIKROSKOPIS

(+) : Terdapat bentuk germinating blastospores berbentuk bulat dari *budding yeast cell* pada pengecatan LCB  
 (-) : Tidak Terdapat bentuk germinating blastospores berbentuk bulat dari *budding yeast cell* pada pengecatan LCB



Retno Sasongkwati, S.Pd, S.Si, M.Kes  
 NIP. 19651003 198803 2 002

Surabaya, 13 Juni 2023

Koordinator Laboratorium

Ratno Tri Utomo, S.S.T  
 NIP. 19820421 200604 1 013

## LAMPIRAN 6 HASIL KUANTIFIKASI



**KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA**  
**BADAN PENGEMBANGAN DAN PEMBERDAYAAN**  
**SUMBER DAYA MANUSIA KESEHATAN**  
**POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES SURABAYA**

Jl. Pucang Jajar Tengah No. 56 Surabaya - 60282 Telp. (031) 5027058 Fax. (031) 5028141  
Website : www.poltekkesdepkes-sby.ac.id Email : admin@poltekkesdepkes-sby.ac.id



### HASIL PEMERIKSAAN

046.2/H.LAB/2023

Nama : Miftakhul Jannah  
NIM : P27834122078  
Judul Skripsi : Deteksi Gen ITS2 *Candida albicans* Pada Sputum Penderita Tuberculosis Menggunakan Metode RT-PCR  
Hasil Pemeriksaan : Hasil Uji Kemurnian dan Konsentrasi DNA  
Tanggal Pemeriksaan : 11 Maret - 14 Mei 2023

No	Sampel	Nilai Kemurnian DNA (A260/A280)	Nilai Konsentrasi DNA (ng/ $\mu$ L)
1	S2	1.932	6.71
2	S4	1.897	14.33
3	S6	1.811	41.95
4	S7	1.851	24.38
5	S9	1.969	72.23
6	S10	1.850	79.01
7	S17	1.845	41.09
8	S16	1.810	55.19
9	S17	1.986	22.13
10	S18	1.927	14.54
11	S19	1.854	32.77
12	S20	1.870	36.13
13	S21	1.810	30.20
14	S22	1.909	78.58
15	S24	1.812	42.03
16	S26	1.859	14.11
17	S27	1.964	26.60
18	S28	1.900	8.38
19	S29	1.847	66.18
20	Kontrol	1.980	12.34



Retno Sasongkowi, S.Pd, S.Si, M.Kes  
NIP. 19651003 198803 2 002

Surabaya, 13 Juni 2023

Koordinator Laboratorium

Ratno Tri Utomo, S.S.T  
NIP. 19820421 200604 1 013

## LAMPIRAN 7 HASIL AMPLIFIKASI



**KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA**  
**BADAN PENGEMBANGAN DAN PEMBERDAYAAN**  
**SUMBER DAYA MANUSIA KESEHATAN**  
 POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES SURABAYA



Jl. Pucang Jajar Tengah No. 56 Surabaya - 60282 Telp. (031) 5027058 Fax. (031) 5028141  
 Website : www.poltekkesdepkes-sby.ac.id Email : admin@poltekkesdepkes-sby.ac.id

### HASIL PEMERIKSAAN

046.3/H.LAB/2023

Nama : Miftakhul Jannah  
 NIM : P27834122078  
 Judul Skripsi : Deteksi Gen ITS2 *Candida albicans* Pada Sputum Penderita Tuberculosis Menggunakan Metode RT-PCR  
 Hasil Pemeriksaan : Hasil Deteksi Gen Wilsayah ITS2 *Candida albicans*.  
 Tanggal Pemeriksaan : 11 Maret - 14 Mei 2023

No	Sampel	Nilai CT	Pewarna	Keterangan
1	S2	15.04	SYBR	Positif
2	S4	11.80	SYBR	Positif
3	S6	13.19	SYBR	Positif
4	S7	11.84	SYBR	Positif
5	S9	14.05	SYBR	Positif
6	S10	34.19	SYBR	Positif
7	S14	21.05	SYBR	Positif
8	S16	11.55	SYBR	Positif
9	S17	21.66	SYBR	Positif
10	S18	13.59	SYBR	Positif
11	S19	20.41	SYBR	Positif
12	S20	12.66	SYBR	Positif
13	S21	12.58	SYBR	Positif
14	S22	21.13	SYBR	Positif
15	S24	13.34	SYBR	Positif
16	S26	14.24	SYBR	Positif
17	S27	21.23	SYBR	Positif
18	S28	12.86	SYBR	Positif
19	S29	21.75	SYBR	Positif
20	Kontrol	11.94	SYBR	Positif



Retno Sasongkowati, S.Pd, S.Si, M.Kes  
 NIP. 19651003 198803 2 002

Surabaya, 13 Juni 2023

Koordinator Laboratorium

Ratno Tri Utomo, S.S.T  
 NIP. 19820421 200604 1 013

## LAMPIRAN 8 SURAT KETERANGAN HASIL DETEKSI PLAGIASI

	POLTEKKES KEMENKES SURABAYA	Kode : PJM-FORM-AKD-D2-04-A4
		Tanggal : 1 Maret 2022
	Formulir Surat Keterangan Hasil Deteksi Plagiat Tugas Akhir setelah Ujian	Revisi : 0
		Halaman : 1 / 1 halaman

### SURAT KETERANGAN HASIL DETEKSI PLAGIASI SETELAH UJIAN

Nomor : 0003/TLM/2024

Berdasarkan hasil pemindaian laporan dan artikel tugas akhir atas :

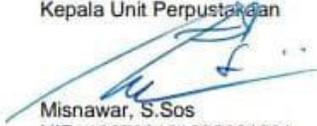
Nama : Miftakhul Jannah  
NIM : P27834122078  
Program Studi : DIV Teknologi Laboratorium Medis  
Judul Tugas Akhir : Deteksi Gen ITS2 Candida albicans Pada Sputum Penderita Tuberculosis Menggunakan Metode RT-PCR  
Judul Artikel : Deteksi Gen ITS2 Candida albicans Pada Sputum Penderita Tuberculosis Menggunakan Metode RT-PCR  
Tanggal Pengajuan : 16 Januari 2024

dengan ini kami sampaikan bahwa kami telah melakukan analisis kemiripan laporan dan artikel tugas akhir tersebut di atas dengan basis data online dengan perangkat lunak Turnitin dengan hasil sebagai berikut :

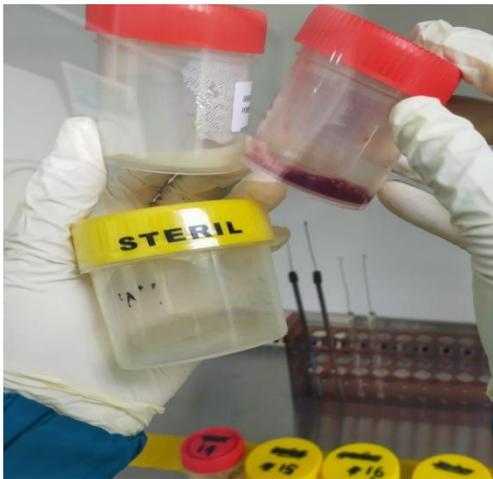
No	Dokumen	Tingkat Kemiripan	Indeks Kemiripan	Kesesuaian dengan Syarat Bebas Plagiat
1	Laporan Tugas Akhir	24%	24%	< 25%
2	Artikel Tugas Akhir	24%	24%	< 25%

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 17 Januari 2024  
Kepala Unit Perpustakaan

  
Misnawar, S.Sos  
NIP. 196709101992031001

**LAMPIRAN 9 INOKULASI SAMPEL**



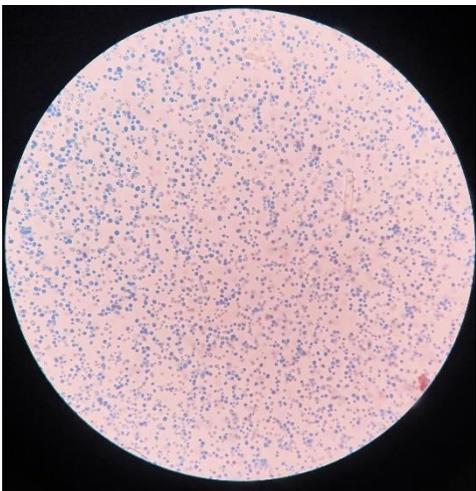
Sampel Sputum Tuberculosis



Inokulasi Sampel pada Media SDA

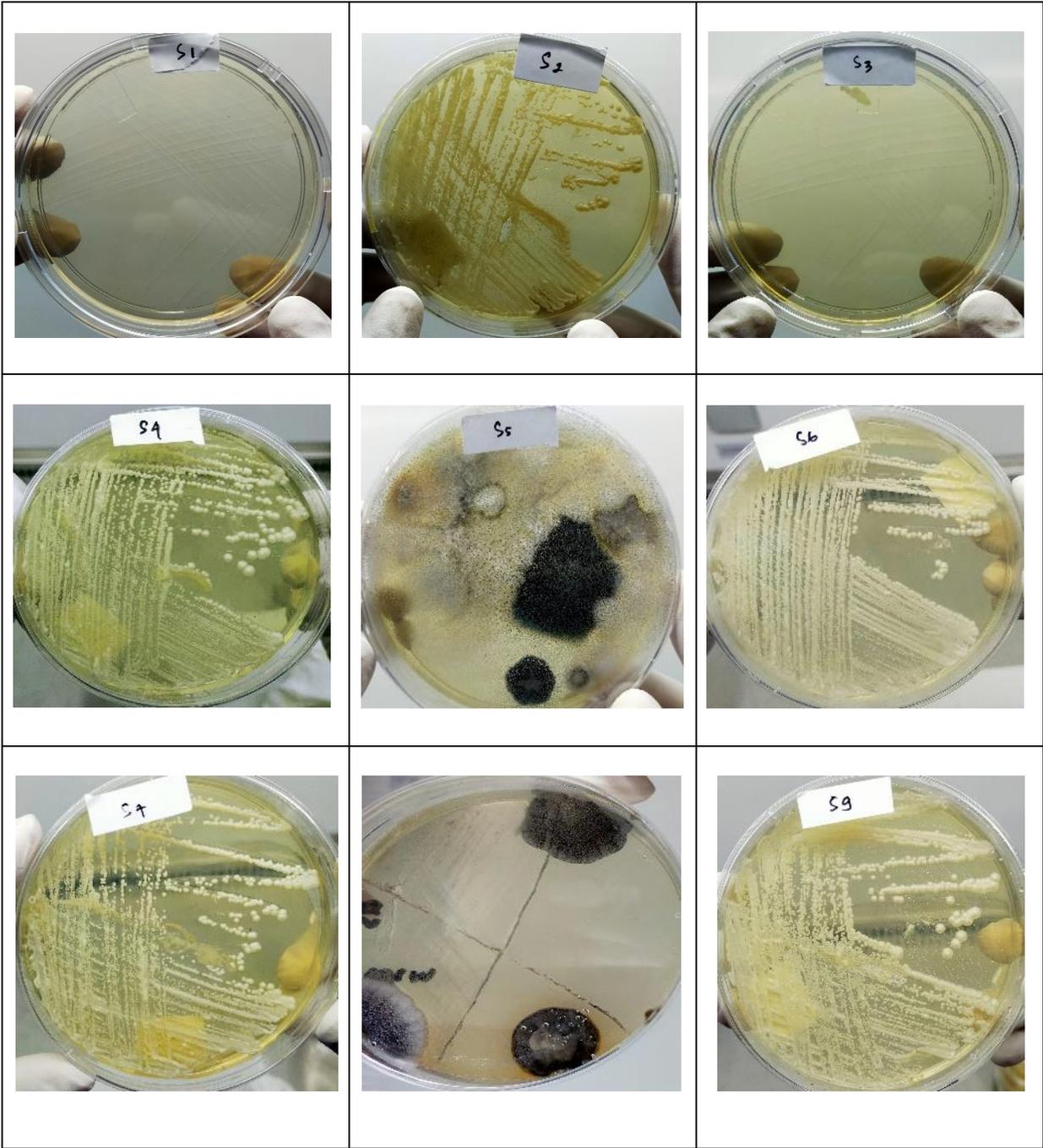


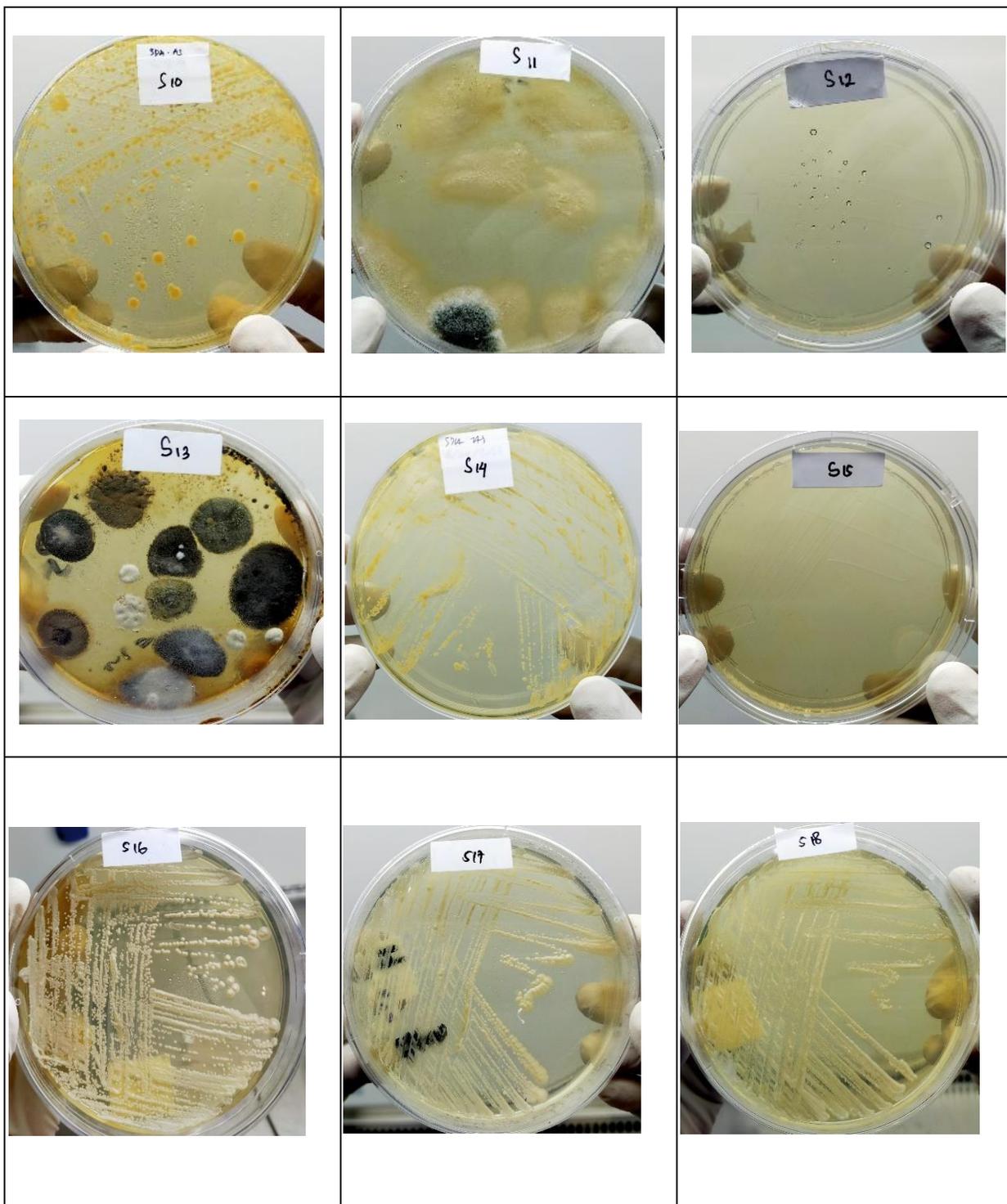
Hasil Inokulasi pada Media SDA  
(Makroskopis)

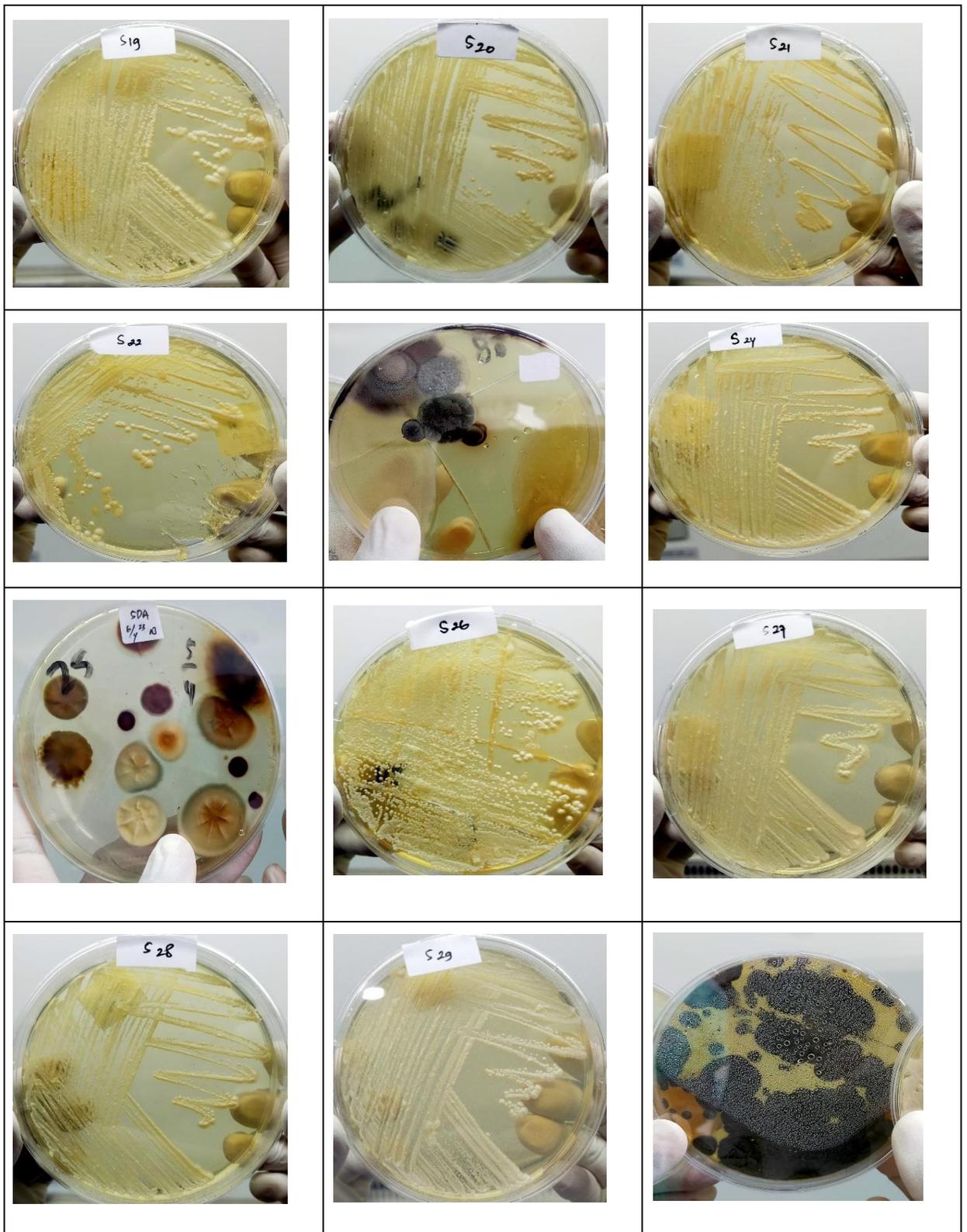


Hasil Mikroskopis

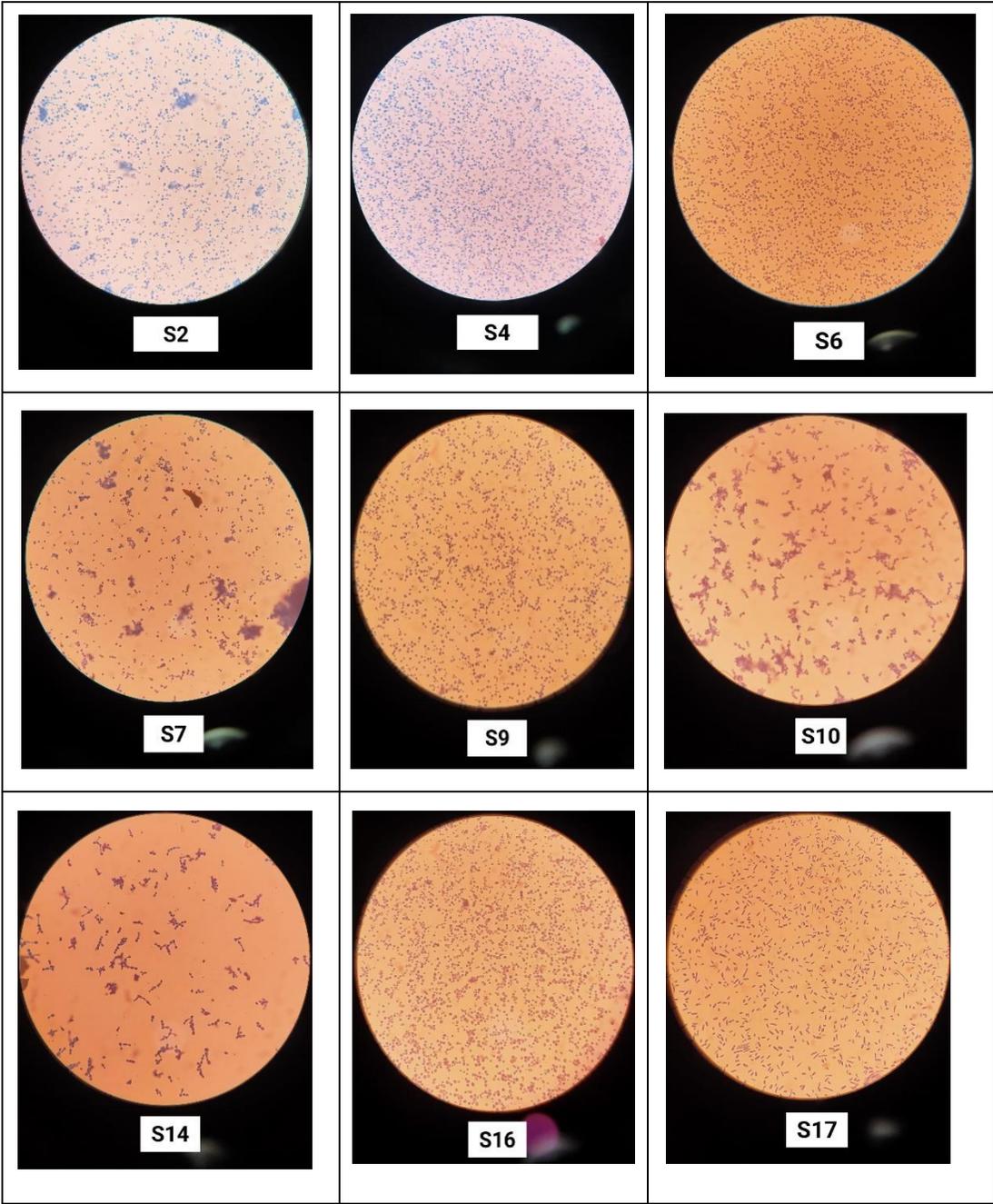
LAMPIRAN 10 IDENTIFIKASI MAKROSKOPIS PADA MEDIA SDA

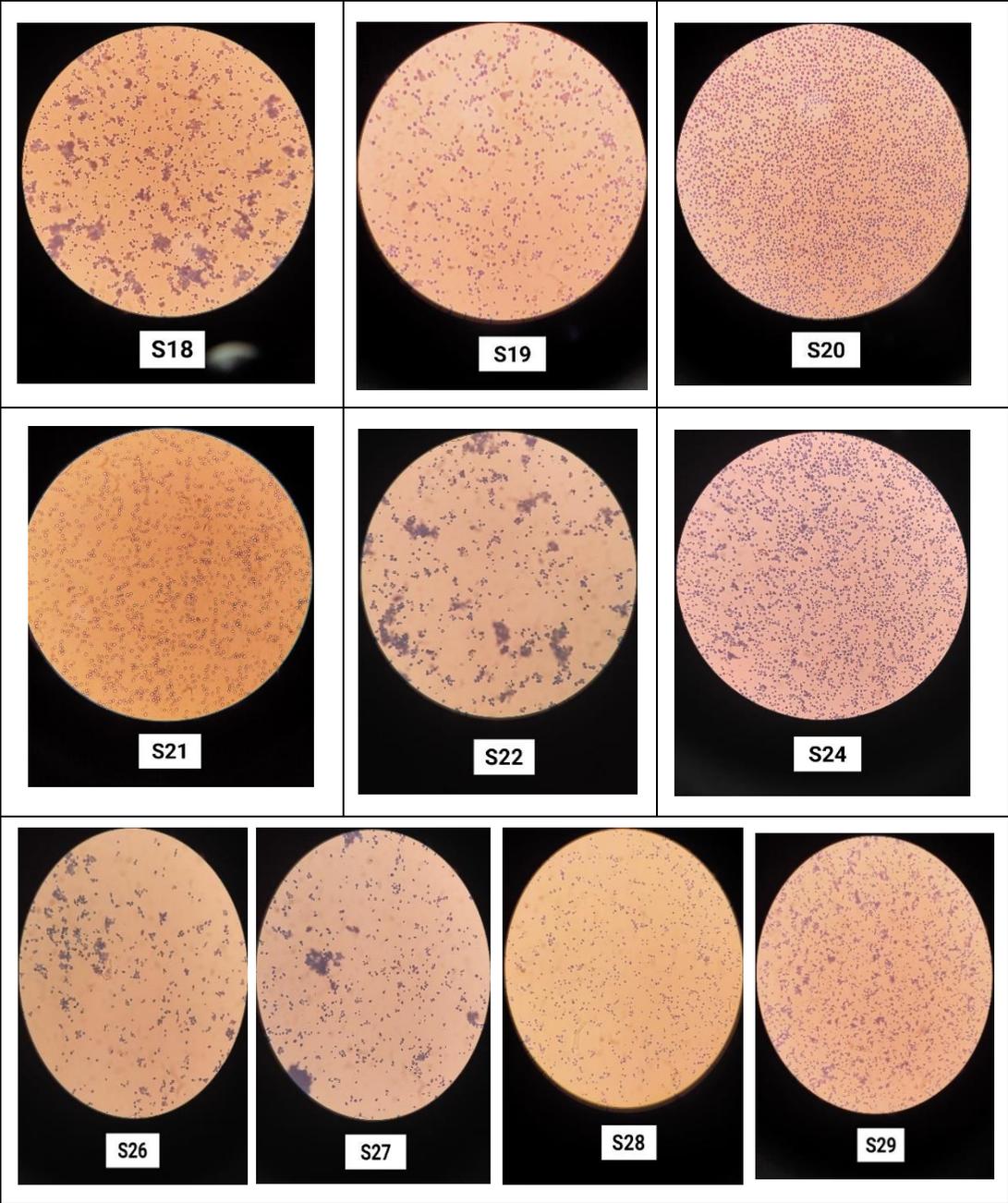




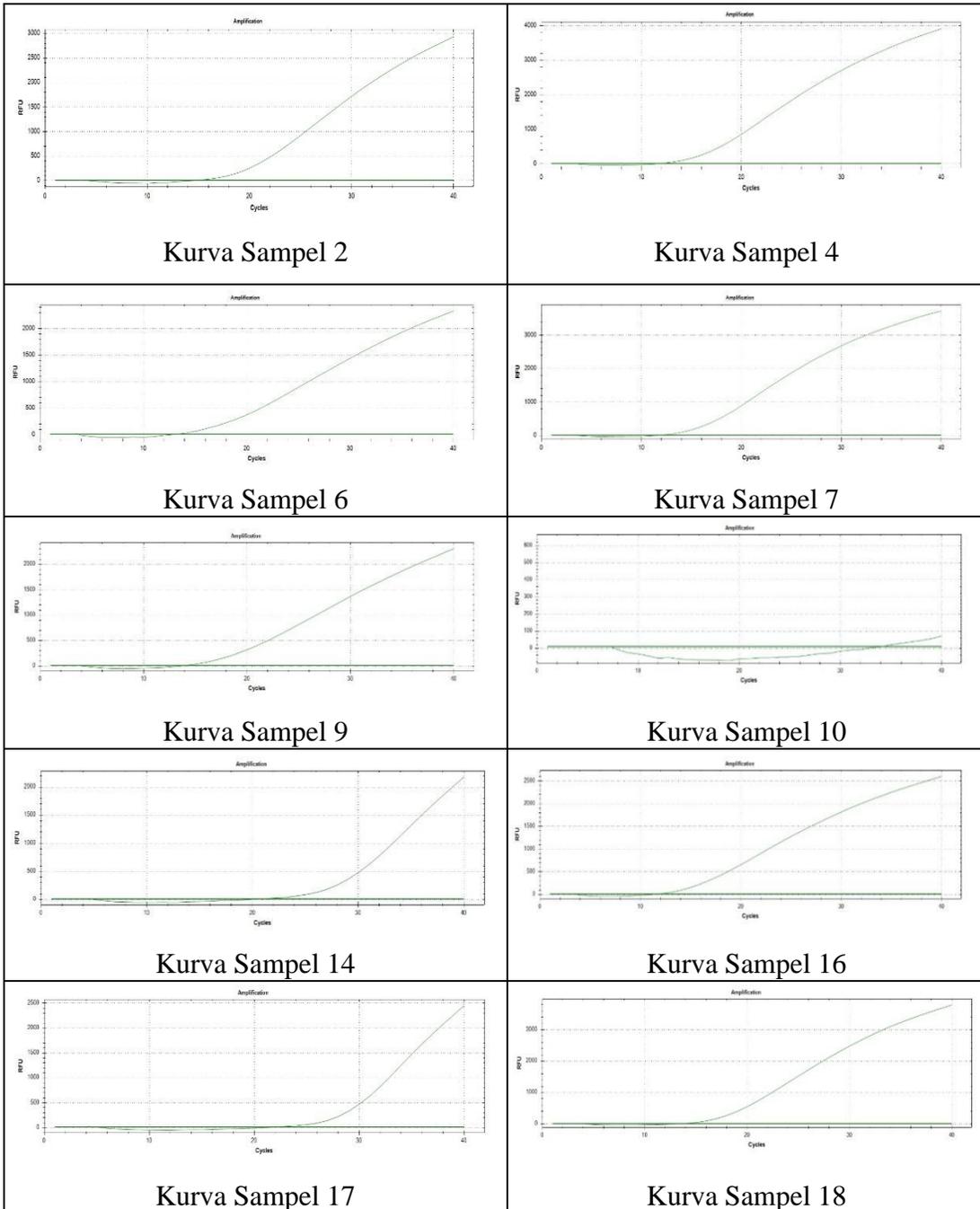


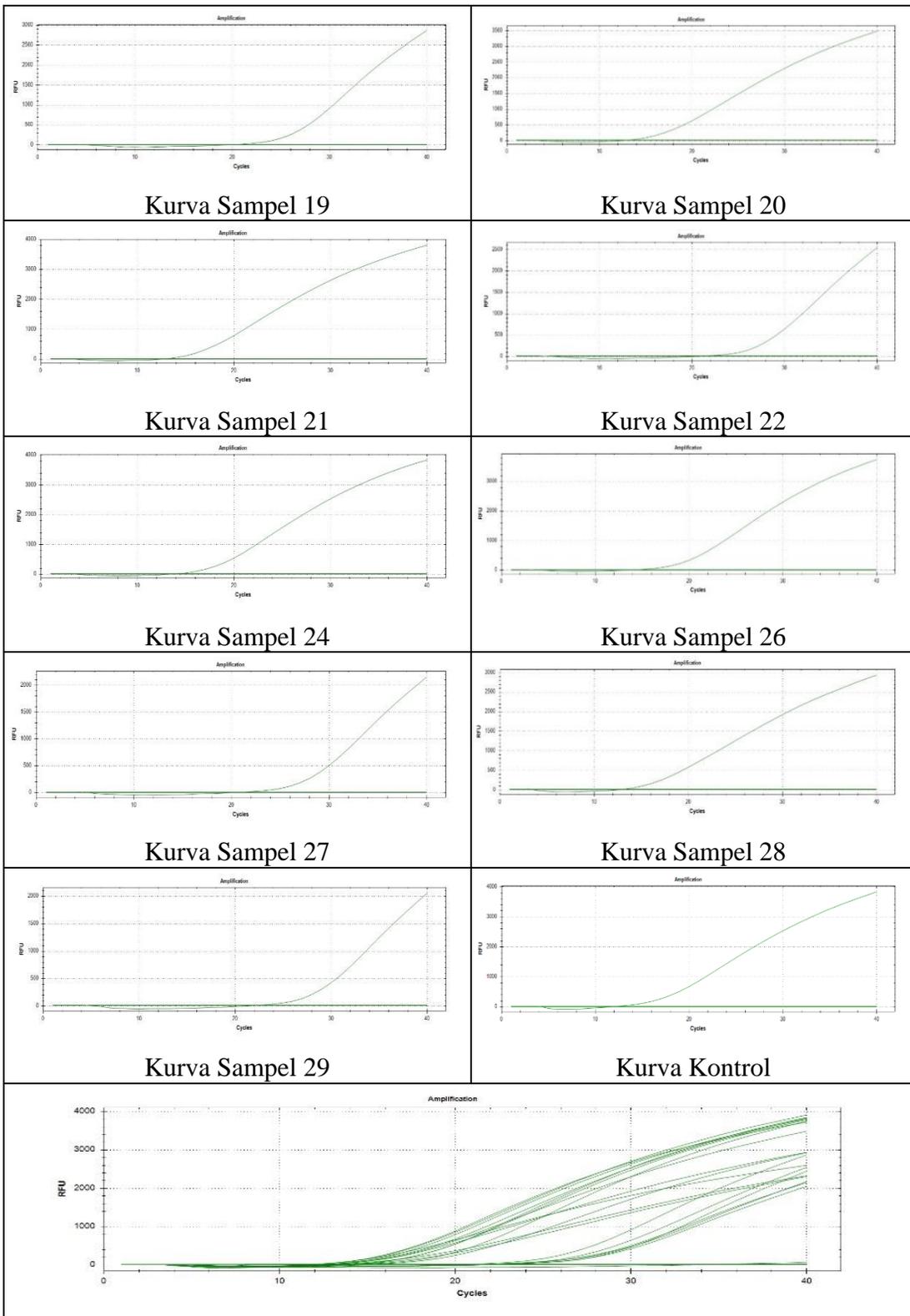
LAMPIRAN 11 HASIL MIKROSKOPIS PENGECATAN LCB





## LAMPIRAN 12 KURVA AMPLIFIKASI





**LAMPIRAN 13**

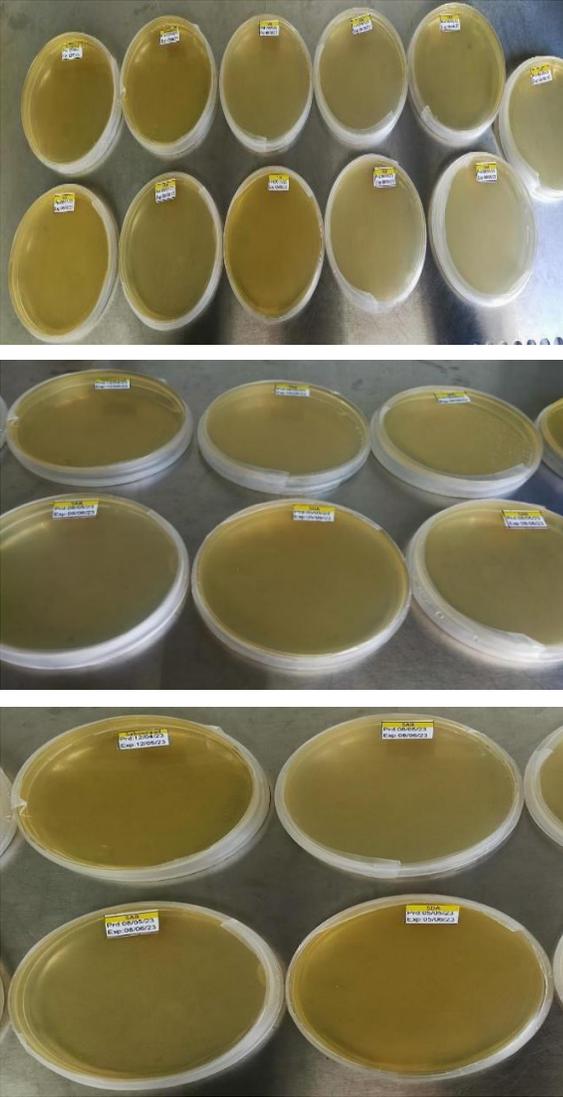
**LOG BOOK PENELITIAN MAHASISWA**

Nama : Miftakhul Jannah

NIM : P27834122078

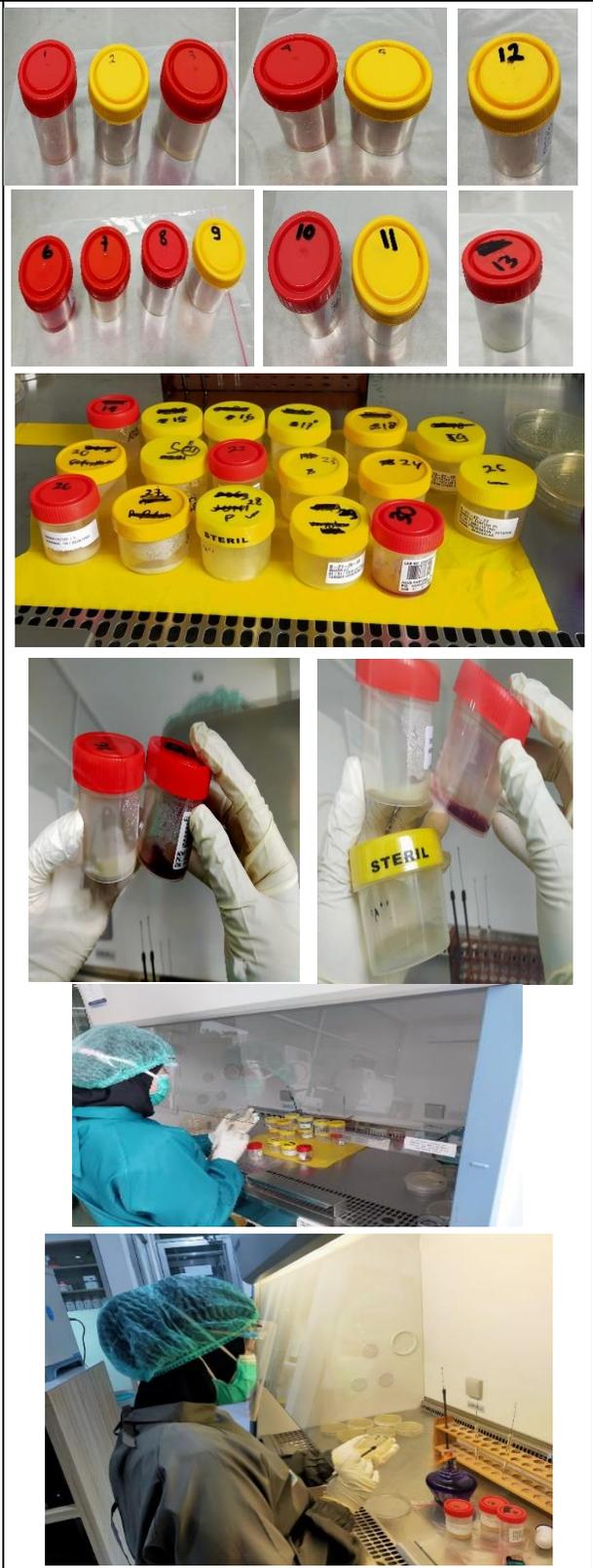
Prodi : DIV Alih Jenjang Teknologi Laboratorium Medis

Judul : Deteksi Gen ITS2 *Candida albicans*. Pada Sputum Penderita *Tuberculosis*  
Menggunakan Metode RT-PCR.

Pelaksanaan	Kegiatan	Dokumentasi
4 Maret - 30 April 2023	Pembuatan media SDA ( <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> )	

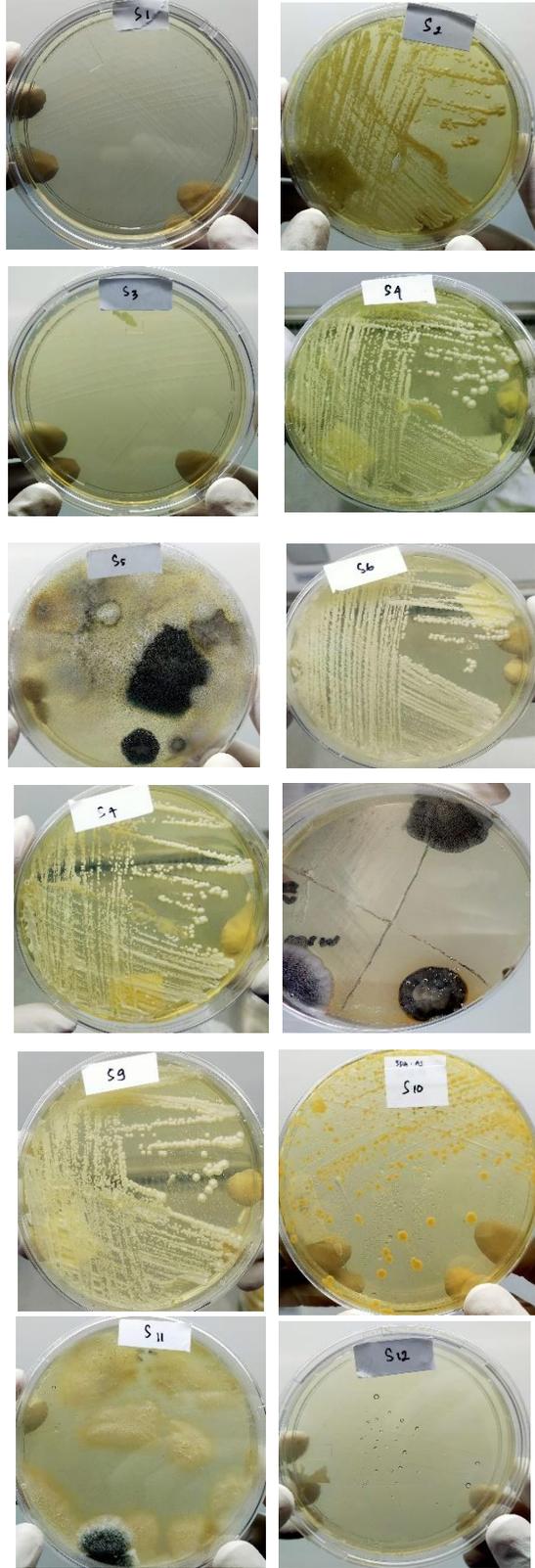
Maret - Mei  
2023

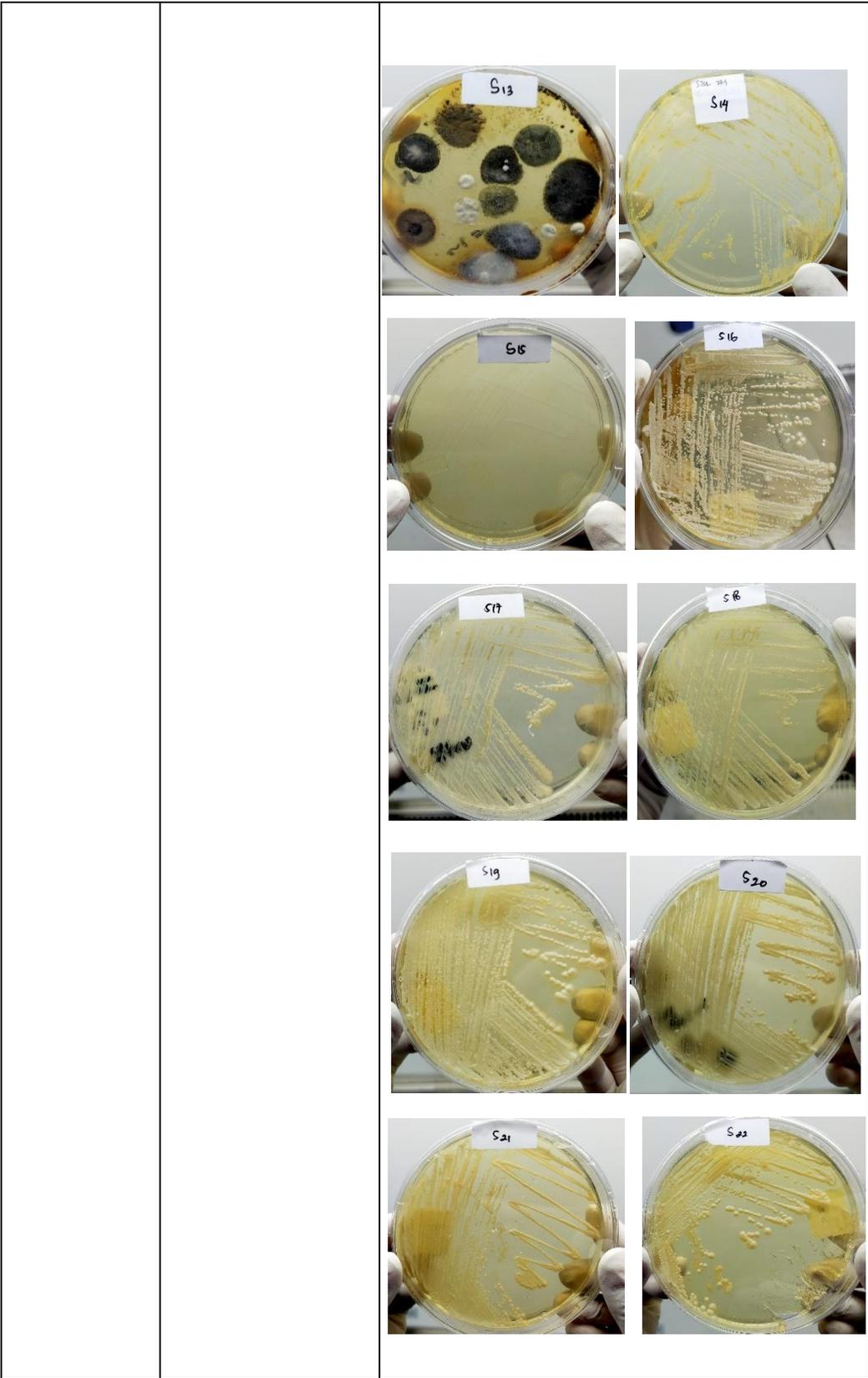
Pengambilan  
Sampel Sputum  
*Tuberculosis*

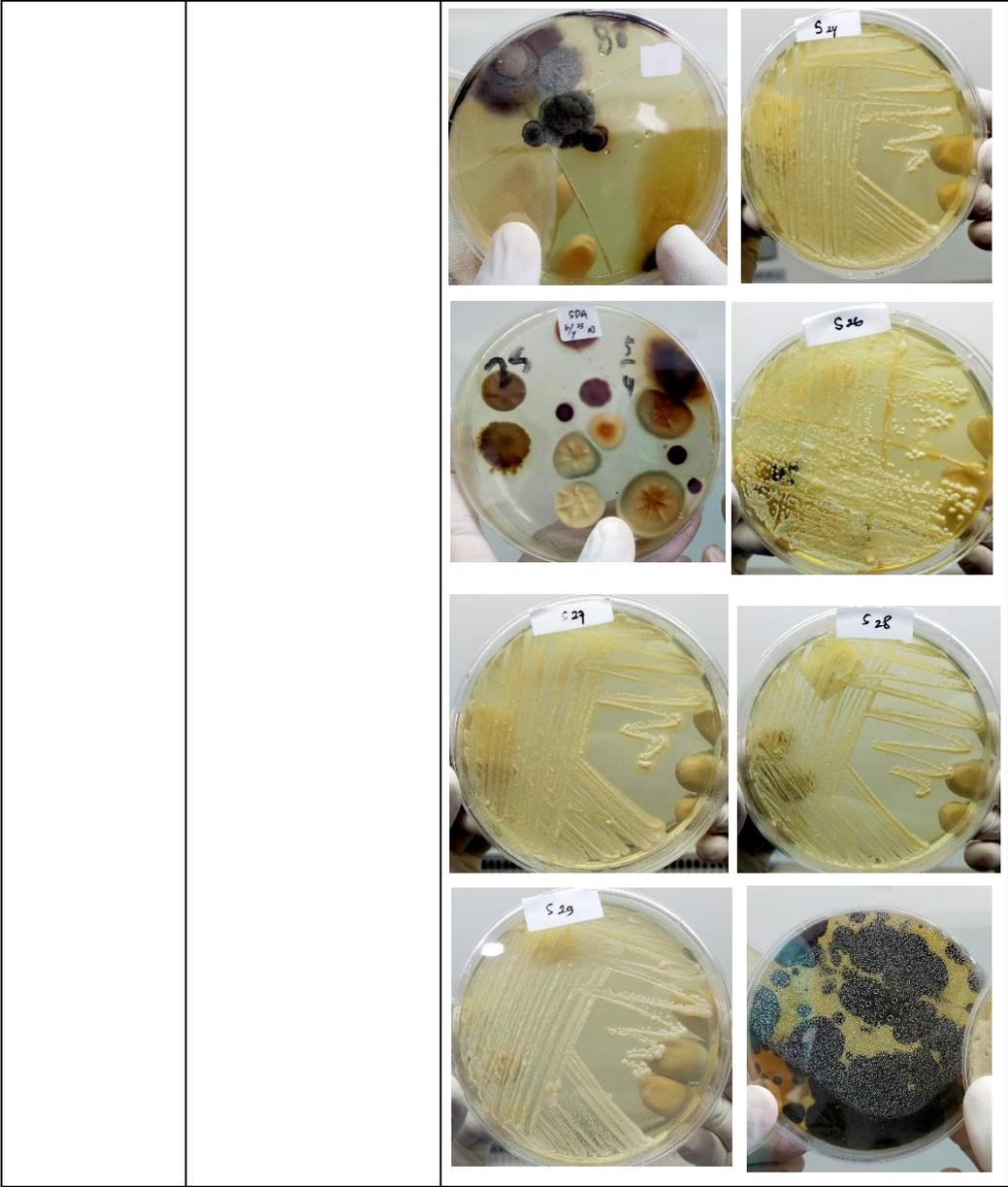


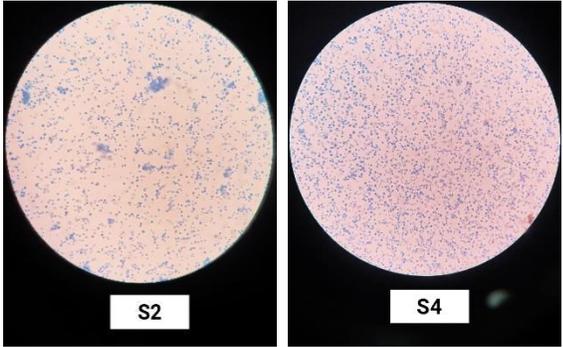
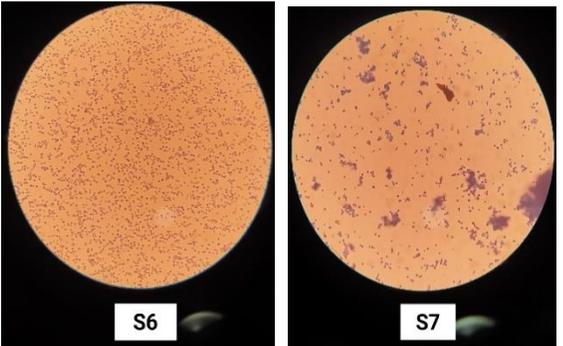
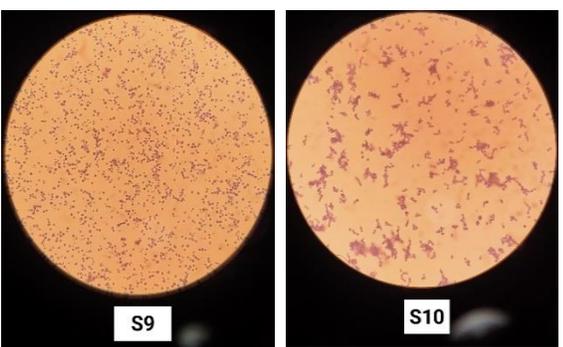
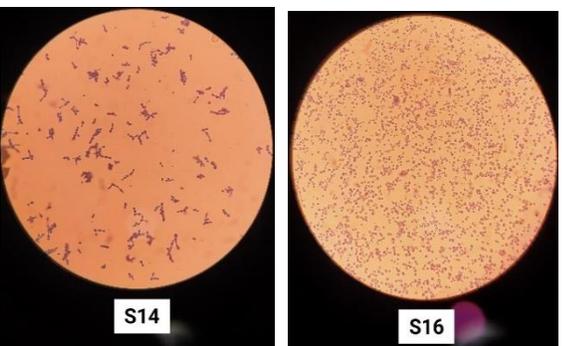
Maret - Mei  
2023

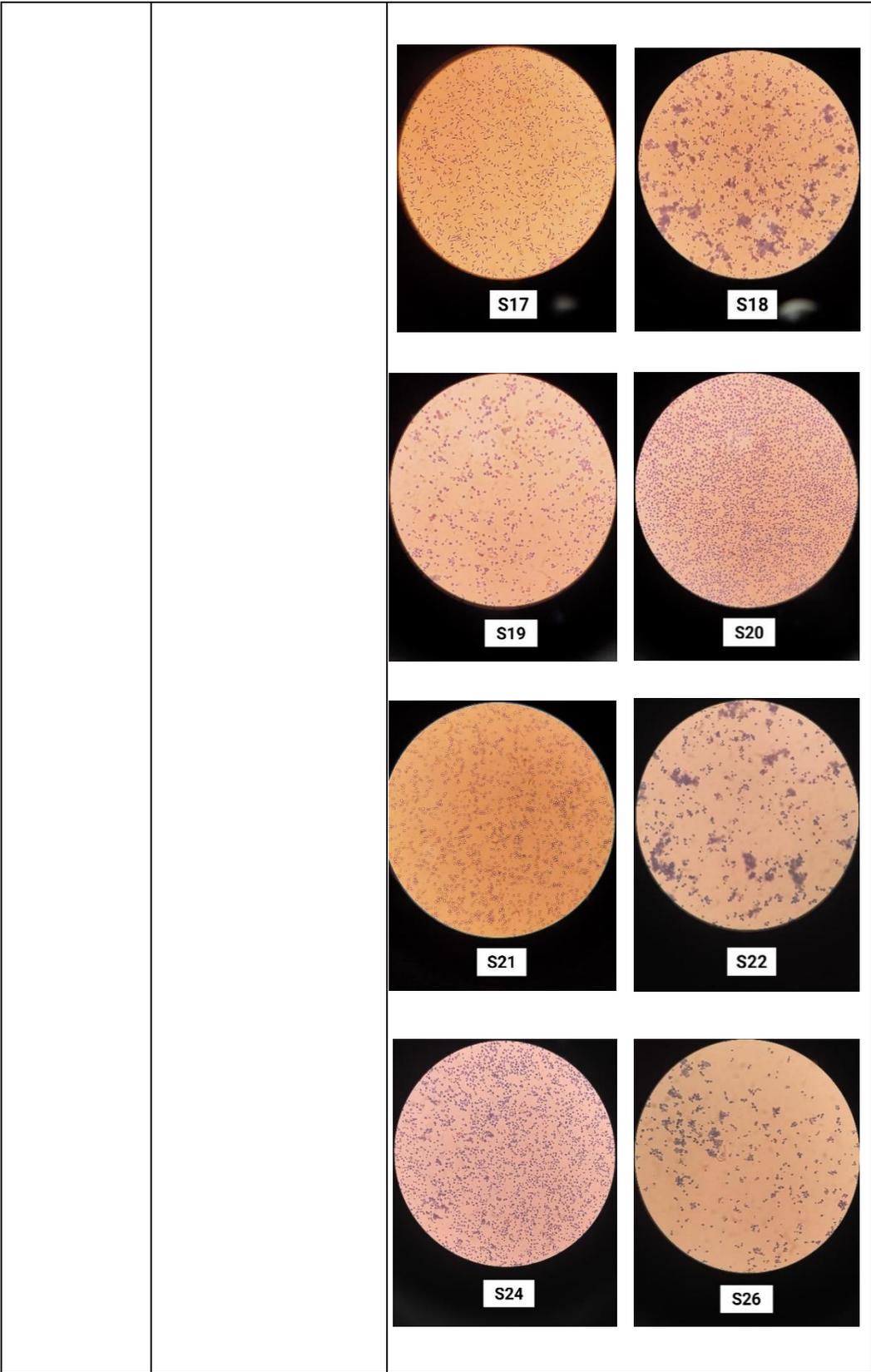
Pengamatan  
Makroskopis  
pada media SDA  
(*Sabouraud  
Dextrose Agar*)

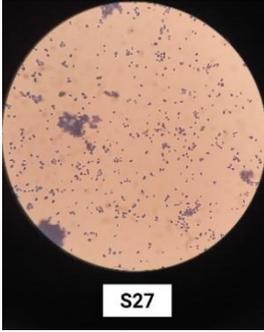
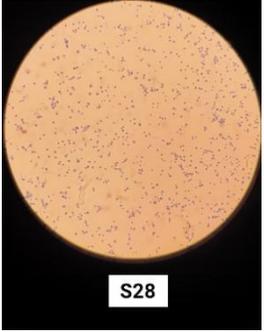
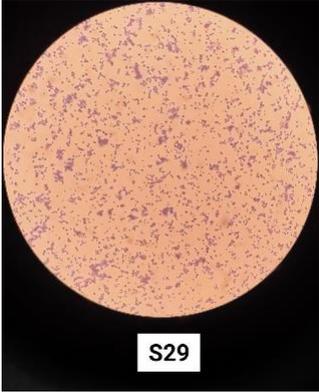






<p>Maret - Mei 2023</p>	<p>Pengamatan Mikroskopis</p>	 <p>S2 S4</p>  <p>S6 S7</p>  <p>S9 S10</p>  <p>S14 S16</p>
-------------------------	-------------------------------	--



		 <p>S27</p>  <p>S28</p>  <p>S29</p>
--	--	---

Mei 2023

Ekstraksi  
DNA



<p>Mei 2023</p>	<p>Kuantifikasi Uji Kemurnian dan Konsentrasi DNA</p>	
<p>Mei 2023</p>	<p>Amplifikasi</p>	 