

## DETEKSI GEN *MSG* UNTUK PENINGKATKAN KETEPATAN DIAGNOSIS *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* PADA PASIEN HIV DENGAN PNEUMONIA

Conny Riana Tjampakasari<sup>1,2</sup>; Andi Yasmon<sup>1</sup>; Fitrahwati Sudarmo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia  
Jalan Pegangsaan Timur 16, Jakarta Pusat 10320

<sup>2</sup>Program Doktor Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

<sup>3</sup>Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia  
Jalan Salemba Raya, Jakarta Pusat, 10430  
connyrianat@yahoo.com

### Abstract

*Pneumocystis jirovecii* is the cause of opportunistic infections in the lower respiratory tract of immunocompromised patients, especially in human immunodeficiency virus (HIV). Until now the case of *P. jirovecii* in Indonesia is not known with certainty because the data obtained only based on patient's clinical condition. Culture is still on going research while microscopic as a gold standard has some limitation, among others, takes a long time in the process, requires special skills to work and interpret results. The diagnosis of *P.jirovecii* infection in Indonesia is still based on clinical and microscopic examination, which takes a long time, is less sensitive and specific. Based on this reason then developed rPCR that more sensitive and specific. In addition the results obtained are less sensitive and specific. Based on that, in this study developed real-time PCR (rPCR) molecular test that more sensitive and specific using gene Major Surface Glicoprotein (MSG). MSG is detection target of its presence in the fungus cell wall is very abundant and has a sustainable sequence. The rPCR was successfully optimized with a minimum DNA detection capability of 6.55 cop /  $\mu$ l and did not cross-react with other microorganisms tested in this study. Obtained 50 clinical samples consisting of sputum and sputum induction. The result of comparison between microscopic test and rPCR show that rPCR increase positive results up to 20%. The rPCR test can detect *P.jirovecii* on clinical samples of sputum and induced sputum from HIV patients with pneumonia with CD4  $>$  200 or  $\leq$  200 cells.

**Keywords** : real time PCR, HIV, *pneumocystis jirovecii*.

### Abstrak

*Pneumocystis jirovecii* adalah penyebab infeksi oportunistik di saluran pernapasan bawah pada individu dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah, terutama pada pasien HIV. Pemeriksaan infeksi *P. jirovecii* di Indonesia masih berdasarkan pemeriksaan klinis dan mikroskopis, yang memerlukan waktu yang cukup lama, kurang sensitif dan spesifik. Berdasarkan hal tersebut maka dalam penelitian ini dikembangkan uji molekuler real time PCR (rPCR) yang lebih sensitif dan spesifik. Uji rPCR telah berhasil dioptimasi dengan kemampuan deteksi minimum DNA 6,55 copy/ $\mu$ l dan tidak bereaksi silang dengan mikroorganisme yang diuji pada penelitian ini. Dibandingkan dengan uji mikroskopis, uji rPCR memberikan hasil positif 20% lebih tinggi daripada uji mikroskopis. Uji rPCR dapat mendeteksi *P.jirovecii* pada sampel klinis sputum dan sputum induksi dari pasien HIV dengan pneumonia dengan jumlah sel CD<sup>4+</sup>  $>$  200 maupun  $\leq$  200. Oleh karena itu, uji rPCR yang telah dioptimasi dalam studi ini dapat mendeteksi *P.jirovecii* pada sampel klinis sputum dan sputum induksi dari pasien HIV dengan pneumonia dengan jumlah sel CD<sup>4+</sup>  $>$  200 maupun  $\leq$  200.

**Kata Kunci** : real time PCR, HIV, *pneumocystis jirovecii*.

### Pendahuluan

*Pneumocystis* diklasifikasikan sebagai jamur *Ascomycota* memiliki tropisme yang unik pada paru-paru, karena keberadaannya sebagai patogen alveolar tanpa menginvasi inang. Jamur ini memiliki beberapa nama sesuai dengan spesies yang diinfeksi yaitu *Pneumocystis murina* pada

mencit, *Pneumocystis carinii* dan *Pneumocystis wakefieldiae* pada tikus, dan *pneumocystis oryctolagi* pada kelinci. Pada manusia, jamur ini disebut sebagai *Pneumocystis jirovecii*. *Pneumocystis jirovecii* menyebabkan *Pneumocystis pneumonia* (PjP) dikenal sebagai penyebab infeksi oportunistik di saluran pernapasan bawah pada

individu dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah, terutama mereka dengan infeksi HIV.

Kasus pertama PjP yang menandakan terjadinya epidemi HIV dilaporkan pada pria yang berhubungan seks dengan laki-laki dan pengguna narkoba intravena pada tahun 1981. Studi EuroSIDA menyatakan lebih dari 8.500 orang terinfeksi HIV, kejadian PjP muncul dari 4,9 kasus per 100 orang per tahun menjadi 0,3 kasus per 100 orang per tahun setelah antiretroviral (ART) tersedia secara luas. Di Amerika Serikat, Studi HIV pada pasien rawat jalan telah dilaporkan dengan kejadian episode pertama PjP yaitu 3,9 kasus per 1000 orang per tahun untuk periode 2003-2007. Sebuah studi besar rumah sakit di Amerika Serikat menemukan bahwa ada penurunan persentase PjP pada pasien HIV, dari 31 % pada awal epidemi HIV menjadi 9 % setelah kombinasi antiretroviral dikenal. Di Amerika Serikat dan Eropa, PjP masih terjadi terutama di kalangan orang-orang yang tidak tahu bahwa mereka terinfeksi HIV, yang tidak mencari perawatan medis, atau yang tidak mematuhi atau merespon terapi antiretroviral atau profilaksis *Pneumocystis* (Dohn *et al* 2000, Francisco *et al* 2005).

Insiden infeksi *P. jirovecii* di negara berpenghasilan menengah dan rendah (Kroasia dan India) lebih tinggi dibandingkan dari negara maju (prevalensi di India 45,2%, dan Kroasia 57,7%). Di Asia, seperti Thailand infeksi *P. jirovecii* didiagnosa sebanyak 18,7% dari 286 pasien HIV/AIDS. Diagnosis infeksi *P. jirovecii* lainnya menggunakan metode non invasif (induksi sputum) dengan PCR ada 21% pasien dari 52 pasien HIV/AIDS diduga terinfeksi *P. jirovecii*, di Kamboja dan Vietnam infeksi *P. jirovecii* terdeteksi sebanyak 52-55% pada pasien HIV menggunakan pemeriksaan pulsan negatif sputum. Hingga saat ini di Indonesia, belum terdapat data prevalensi infeksi *P. jirovecii* yang didiagnosis menggunakan uji yang akurat. Selama ini uji diagnosis yang rutin dilakukan adalah berdasarkan gejala klinis dengan angka kejadian sebesar 14,55% (Rodriguez *et al* 2011, Babic *et al* 2014, Alison dan Karen, 2012, Rozaliyani, 2009). Hal ini menyebabkan belum tersedianya angka pasti insiden infeksi *P. jirovecii* di Indonesia.

Komponen yang berperan dalam infeksi *P. jirovecii* antara lain *Major Surface Glycoprotein* (MSG) di permukaan jamur. Variasi dari protein MSG tampaknya terjadi melalui transkripsi regulasi dan melibatkan penataan ulang kompleks genom yang dihasilkan oleh ekspresi varian gen MSG. Peran MSG pada interaksi dengan molekul host (termasuk fibronektin, vitronektin, dan surfaktan) serta dalam pengikatan sel epitel alveolar. Selain

MSG, *P. jirovecii* memiliki dinding sel diperkaya  $\beta$ -glukan.  $\beta$ -glukan berperan menginduksi pelepasan mediator inflamasi dari makrofag alveolar, sehingga memicu timbulnya peradangan paru-paru (Cathenrot *et al* 2010, Calderon *et al* 2011, Anaisie *et al* 2009, Akson *et al* 2008).

Meskipun efek profilaksis dan imunomodulasi dari terapi anti retroviral secara aktif tinggi (HAART), *Pneumocystis pneumonia* tetap sebagai infeksi oportunistik yang penting pada pasien yang terinfeksi HIV, dan merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada individu dengan fungsi kekebalan tubuh yang menurun. Faktor yang terkait dengan risiko peningkatan mortalitas pada pasien sakit kritis dengan *Pneumocystis pneumonia* termasuk pasien usia lanjut dan jumlah sel CD<sup>4+</sup>. Faktor risiko terkuat untuk *Pneumocystis pneumonia* yaitu jumlah sel CD<sup>4+</sup> di bawah 200 sel/L (Stansell *et al* 1997, Krajicek *et al*, 2008).

*P. jirovecii* adalah jamur yang tidak dapat dikultur pada medium artifisial. Selama ini diagnosis secara mikroskopis memiliki kelemahan antara lain kurang sensitif, oleh sebab itu perlu dilakukan uji molekuler. Uji molekuler yang dapat digunakan antara lain uji PCR. Uji PCR ada dua tipe yaitu PCR konvensional dan real time PCR (rPCR). Kelebihan rPCR dibandingkan PCR konvensional adalah lebih cepat, *reproducible*, dan memiliki kemampuan kuantitatif. Ada dua metode rPCR yaitu metode TaqMan dan SYBR Green. Pada metode SYBR Green, pewarna fluoresen berikatan dengan molekul DNA untai ganda, menghasilkan emisi sinyal fluoresen. Intensitas sinyal meningkat dengan bertambahnya jumlah siklus karena akumulasi produk PCR. Namun, produk PCR non-spesifik dan primer dimer dapat muncul dalam bentuk sinyal fluoresen, sehingga menghasilkan positif palsu. Pada metode TaqMan (*probe-based PCR*), hanya produk PCR yang diinginkan saja yang terdeteksi, karena hanya hibridisasi spesifik antara probe dan target saja yang menghasilkan sinyal fluoresen. Oleh karena itu, dilakukan uji PCR berbasis TaqMan probe yang memberikan hasil spesifik dibandingkan SYBR Green. Uji TaqMan sering diterapkan pada sampel klinis yang mengandung flora normal yaitu pada sputum (Qiagen, 2016).

Metode rPCR dapat digunakan untuk pemeriksaan menggunakan gen spesifik yang dimiliki oleh *P. jirovecii*, antara lain, gen mtLSURNA, gen MSG, dan gen Kex-1. Pada uji rPCR digunakan gen MSG sebagai target, karena pada *P. jirovecii* protein ini sangat berlimpah dan memiliki sekuens yang lestari. MSG mungkin

merupakan fungsi kunci kolonisasi *P. jirovecii* di alveoli dan penghindaran sistem imun.

Metode rPCR terhadap sampel sputum pasien terinfeksi HIV memiliki sensitivitas 100% dan spesifisitas 84.9%. Metode rPCR sudah banyak dikembangkan, namun di Indonesia metode ini belum ada. Oleh karena itu dilakukan optimasi uji Taqman rPCR untuk diaplikasikan pada pemeriksaan *P. jirovecii* pada pasien dengan gejala *Pneumocystis pneumonia*.

## Metode

### Pengambilan Sampel Sputum dan Sputum Induksi

Sampel berasal dari pasien HIV dengan gejala pneumonia yang rawat di bagian rawat jalan Pokdisus dan rawat inap divisi neurologi dan penyakit dalam RSCM Jakarta dan RSAL Mintohardjo. Sampel yang diambil berupa cairan sputum dan sputum induksi. Pasien yang diikutsertakan dalam penelitian ini adalah pasien yang bersedia ikut serta dalam penelitian dengan menandatangani *inform consent*. Pengambilan sampel dilakukan setelah memperoleh lolos kaji etik dari Panitia Tetap Etik Penelitian Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan nomor surat 77/UN2.F1/ETIK/2015.

### Lisis Sputum

Sampel sputum dan sputum induksi di lisis menggunakan larutan sputolisin dithiothreitol (DTT) (CDC, 2015), dengan cara mensuspensikan 1 ml sampel sputum dalam 1 ml larutan sputolisin dithiothreitol (DTT), kemudian sampel tersebut di vortex selama 30 detik untuk menghomogenasikan larutan. Kemudian, sampel akan diinkubasi pada

suhu 37°C selama 15 menit. Setelah dilakukan inkubasi, sampel dicampur dengan 1 ml pospat buffer salin pH 7,4 dan divortex kembali selama 15 detik, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit, dan setelah itu pelet akan dikumpulkan dan bagian supernatan disingkirkan (Walker et al, 1989).

Pelet yang diperoleh akan dibagi menjadi 2 bagian. Sebagian pelet digunakan untuk uji mikroskopis, dan sebagian pelet akan digunakan pada uji rPCR. Pelet yang akan digunakan pada uji rPCR ditambahkan 1 ml pospat buffer salin pH 7,4 terlebih dahulu dan kemudian divortex selama 15 detik (Walker et al, 1989)..

### Uji Mikroskopis

Uji mikroskopis digunakan untuk mengetahui antara sampel positif dan negatif *P. jirovecii*. Uji ini dilakukan menggunakan pewarnaan Giemsa yang telah dimodifikasi dengan sulfatasi. Sel *Pneumocystis jirovecii* dapat dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x (Walker et al, 1989).

### Ekstraksi DNA Jamur *P. jirovecii*

Ekstraksi sampel sputum dilakukan sesuai dengan prosedur pada kit ekstraksi QIAmp DNA Minikit (Qiagen) .

### Real Time PCR (rPCR)

*P. jirovecii* pada sampel sputum dideteksi menggunakan kappa probe fast qPCR kit Master Mix (Bio-Rad iCycler<sup>TM</sup>). Primer dan probe yang digunakan dalam penelitian ini sebagaimana dilaporkan oleh Jackop, 2004 dan Catharina et al, 2006 (Tabel 1)

Tabel 1  
Sekuen Primer Dan Probe *Pneumocystis Jirovecii*

Primer	Sekuen (5'-3')	Posisi
PCP Forward	CAAAAATAACAYTSACATCAACRAGG	223-248
PCP Reverse	AAATCATGAACGAAATAACCATTGC	378-354
Probe	Sekuen	
PCP probe	FAM-TGCAAACCAACCAAGTGTACGACAGG-TAMRA	252-277

### Optimasi Suhu Annealing

Optimasi suhu *annealing* dilakukan dengan teknik rPCR bergradien pada suhu 56°C - 66°C yang terdiri dari 8 reaksi dan dilakukan sebanyak dua kali (duplo). Satu kali amplifikasi dilakukan dalam volume total 10 µL reaksi PCR yang terdiri dari 1 x kappa fast probe 5 µL. Konsentrasi primer 10 µM dengan volume masing-masing primer *MSGforward* dan *reverseP. jirovecii* masing-masing sebanyak 0,4 µL. Konsentrasi *Msg probe* 10 µM dengan volume 0,2 µL, cetakan DNA 1,5 µL dan ditambah *distilled water* sampai 10 µL.

### Optimasi Konsentrasi Primer

Konsentrasi primer dan probe dilakukan optimasi pada konsentrasi yang berbeda dilakukan sebanyak 3 reaksi dan dilakukan dua kali (duplo). Konsentrasi primer 10 µM dengan volume masing-masing 0,5 µL; 0,7 µL; dan 1 µL dengan total volume 20 µL dengan kondisi suhu optimal yang telah didapatkan sebelumnya yaitu 58°C. Konsentrasi optimal ditetapkan berdasarkan sinyal fluoresen yang terbentuk dan *Cycle threshold* (Ct).

### Optimasi Konsentrasi Probe

Konsentrasi primer dan probe dilakukan optimasi pada konsentrasi yang berbeda dilakukan sebanyak 3 reaksi dan dilakukan dua kali (duplo). Konsentrasi probe 10 µM dengan volume masing-masing 0,5 µL; 0,7 µL; dan 1 µL dengan total volume 20 µL dengan kondisi suhu optimal yang telah didapatkan sebelumnya yaitu 58°C dan volume primer 10 µM yang didapat sebelumnya yaitu sebanyak 1 µL. Konsentrasi optimal ditetapkan berdasarkan sinyal fluoresen yang terbentuk dan *Cycle threshold* (Ct).

### Uji Inhibitor

Uji inhibitor dilakukan untuk mengetahui bahwa metode ekstraksi DNA dari sampel sputum tidak menyertakan zat tertentu ke dalam ekstrak DNA, yang dapat mengganggu atau menghambat proses amplifikasi DNA. Pada uji ini dilakukan 5 reaksi yang terdiri dari 1 kontrol positif, dan 4 sampel DNA yang telah diekstraksi dengan volume elusi akhir 50 µL, 60 µL, 70 µL dan 80 µL. Setelah memperoleh volume elusi, kemudian dilakukan uji volume cetakan DNA dengan untuk masing – masing volume elusi 3 µL, 5 µL dan 7 µL.

### Uji Spesifisitas Teknik (Uji Reaksi Silang)

Dalam uji spesifisitas akan dilakukan uji kemampuan untuk mendeteksi bakteri lainnya yang

juga terdapat dalam sampel sputum, dalam uji ini dilakukan 9 reaksi dan dilakukan duplo. Spesifitas rPCR pada pemeriksaan jamur *Pneumocystis jirovecii* diuji dengan menggunakan sampel dari pasien pneumonia yang disebabkan oleh mikroorganisme *Pneumocystis jirovecii*. Uji ini direaksikan dengan isolat bakteri penyebab pneumonia. Mikroorganisme lainnya yang digunakan pada uji ini antara lain *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter Baumannii*, dan *Staphylococcus aureus*.

### Uji Sensitifitas Teknik (Ambang Batas Deteksi DNA)

Dalam uji sensitifitas akan dilakukan uji kemampuan untuk mendeteksi minimal DNA. Dalam uji ini dilakukan 10 reaksi dan dilakukan secara duplo. DNA standar diencerkan secara berseri ( $10^{-4}$ - $10^{-10}$ ) dengan jumlah konsentrasi untuk *P.jirovecii* sebanyak  $11,03 \times 10^{-4}$  –  $11,03 \times 10^{-10}$  ng/µL (copy number =  $6,55 \times 10^6$  copy/µL –  $6,55$  copy/µL), sebagai cetakan digunakan sebanyak 1 µL untuk setiap pengenceran yang akan digunakan sebagai cetakan DNA. Reaksi PCR diujikan pada pengenceran tersebut untuk mengetahui deteksi minimal DNA yaitu pengenceran terendah yang memberikan hasil positif pada rPCR.

### Uji Coba Sampel

Dalam uji coba sampel ini akan dilakukan untuk mengetahui kemampuan uji rPCR dalam mendeteksi *Pneumocystis jirovecii*, yang akan dibandingkan dengan pemeriksaan mikroskopik. Selain itu juga Mendapatkan data uji rPCR pada jenis sampel klinis sputum dan sputum induksi pasien HIV dengan jumlah sel  $CD^{4+} > 200$  maupun  $\leq 200$  dengan gejala pneumonia. Uji coba sampel dilakukan dengan menggunakan 50 sampel yang terdiri dari sputum dan sputum induksi yang telah diperiksa menggunakan uji mikroskopik.

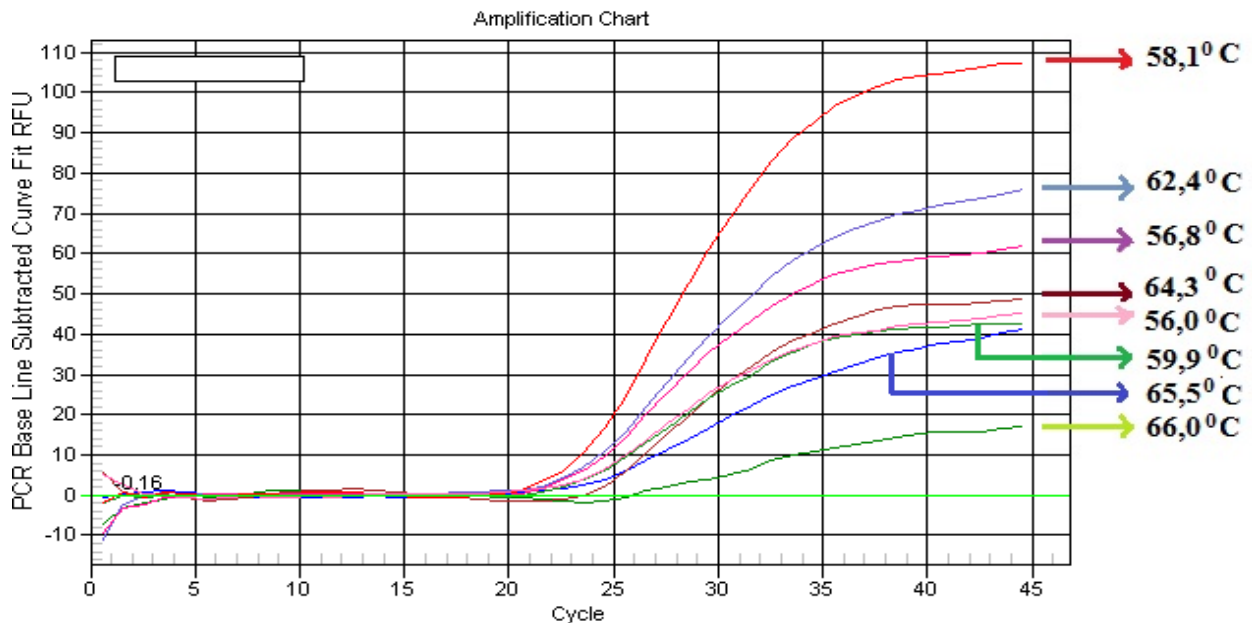
## Hasil dan Pembahasan

### Optimasi Suhu Annealing

Suhu *annealing* yang optimal untuk *P. jirovecii* adalah 58 °C selama 1 menit (Gambar 1). Suhu annealing pada reaksi rPCR mempengaruhi efisiensi penempelan dari primer dan probe yang digunakan. Primer dan gen target yang digunakan untuk deteksi *Pneumocystis jirovecii* pada penelitian ini yaitu gen *MSG* (*Major Surface Glycoprotein*).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mencari gen yang spesifik pada *P. jirovecii*, dan gen *MSG* pada *P. jirovecii* memiliki spesifisitas yang cukup tinggi. Primer berfungsi sebagai penginisiasi reaksi polymerase DNA secara invitro. Selain itu juga

berfungsi untuk membatasi daerah yang akan diamplifikasi pada reaksi PCR. Agar dapat menempel pada gen target, maka primer dan probe membutuhkan suhu yang sesuai.



Gambar 1

Hasil optimasi suhu annealing *P. jirovecii* menggunakan rPCR.

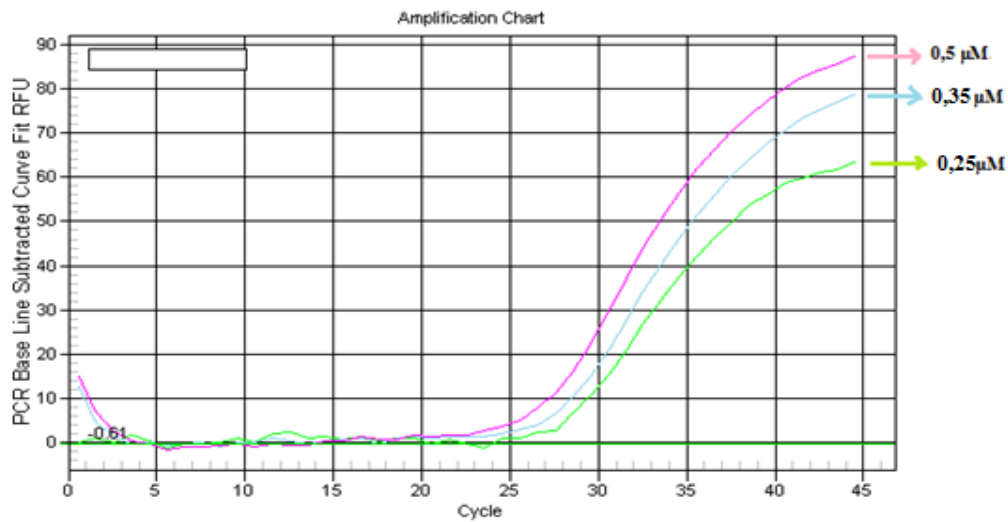
### Keterangan Gambar

Garis warna merah (tanda panah paling atas): suhu 58,1°C;  
Garis warna biru muda: suhu 62,4°C;  
Garis warna hijau: suhu 56,8°C;  
Garis warna coklat: suhu 64,3°C;  
Garis warna merah muda: suhu 56°C;  
Garis warna hijau tua: suhu 59,9°C;  
Garis warna biru tua: suhu 65,5°C; dan  
Garis hijau muda (tanda panah paling bawah): suhu 66°C.

### Optimasi Konsentrasi Primer

Hasil optimasi primer *P. jirovecii* menunjukkan hasil amplifikasi signal optimal pada konsentrasi primer 0,5 µM (Gambar 2). Pada penelitian ini konsentrasi optimum primer yang diperoleh adalah 0,5 µM. Pada penelitian (Catharina

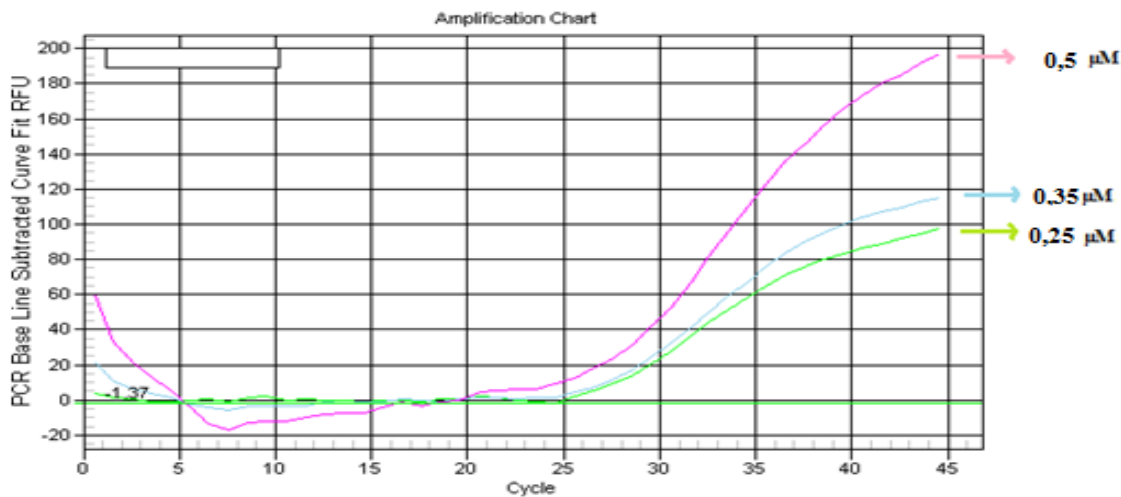
F, et al , 2006) menggunakan konsentrasi primer 0,6 µM. Perbedaan konsentrasi tersebut disebabkan oleh sistem uji yang digunakan. Primer berperan dalam inisiasi reaksi polimerisasi DNA secara invitro, karena tanpa primer, reaksi polimerisasi tidak akan terjadi meskipun enzim dan komponen lainnya sudah tersedia. Primer juga berfungsi untuk membatasi daerah aman yang akan diamplifikasi pada reaksi PCR. Primer PCR menyediakan spesifisitas untuk uji PCR, dan primer yang hanya mengamplifikasi satu produk akan memberikan uji sensitifitas terbaik. Primer PCR harus memiliki potensial pembentukan struktur sekunder yang rendah, termasuk hibridisasi silang dengan oligonukleotida lainya dalam PCR (Jackop 2004, Catharina et al 2006).



Gambar 2

Hasil optimasi konsentrasi primer *P. jirovecii*.

Keterangan gambar: garis merah muda: 0,5  $\mu\text{M}$ ; garis biru muda: 0,35  $\mu\text{M}$ ; garis hijau: 0,25  $\mu\text{M}$ .



Gambar 3

Hasil optimasi konsentrasi probe *P. jirovecii*.

Keterangan gambar: Garis merah muda: 0,5  $\mu\text{M}$ ; garis biru muda: 0,35  $\mu\text{M}$ ; garis hijau: 0,25  $\mu\text{M}$

### Optimasi Konsentrasi Probe

Hasil optimasi probe *P. jirovecii* menunjukkan hasil amplifikasi signal optimal pada konsentrasi probe 0,5  $\mu\text{M}$  (Gambar 3). Probe merupakan suatu fragmen DNA yang di label dan memiliki urutan nukleotida yang berkomplementer dengan produk amplifikasi PCR spesifik. Selain urutan nukleotida sesuai dengan target, efisiensi penempelan probe juga dipengaruhi oleh suhu annealing dan konsentrasi probe.

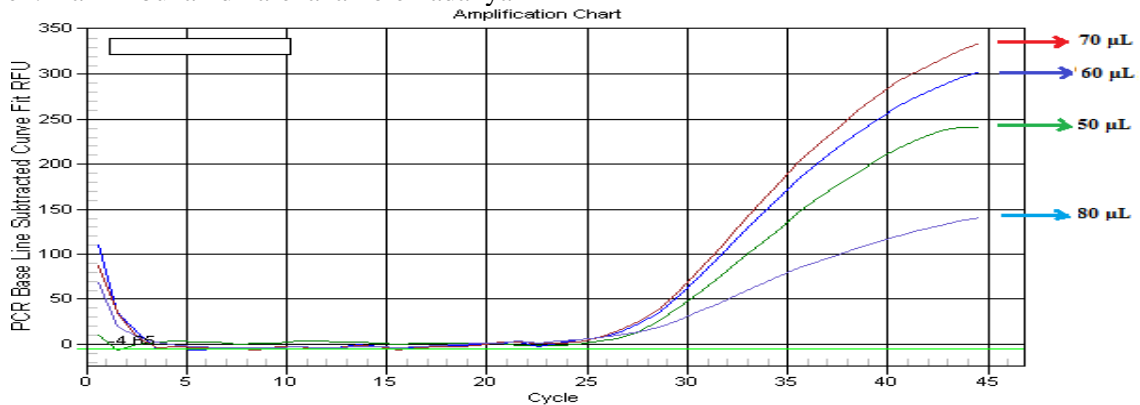
### Uji Inhibitor

#### Optimasi Volume Elusi DNA *Pneumocystis jirovecii* dan Volume Cetakan DNA *Pneumocystis jirovecii*

Hasil uji volume elusi memperlihatkan hasil volume elusi akhir optimal pada 70  $\mu\text{L}$  (Gambar 4) dan hasil uji cetakan DNA memperlihatkan volume optimal yang dapat digunakan sebagai cetakan dari sampel sputum adalah 5  $\mu\text{L}$  (Gambar 5). Pada volume elusi yang lebih kecil, hasil rPCR menunjukkan efisiensi amplifikasi yang rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya inhibitor yang terdapat didalam suspensi hasil ekstraksi DNA dengan volume 50  $\mu\text{L}$  pada sampel sputum. Salah

satu cara untuk mengeliminasi adanya inhibitor yaitu dengan meningkatkan volume elusi ketika ekstraksi DNA. Adapun hasil elusi DNA dengan volume yang lebih besar diperoleh uji rPCR volume elusi yang tidak efisien. Hal ini bukan dikarenakan oleh adanya

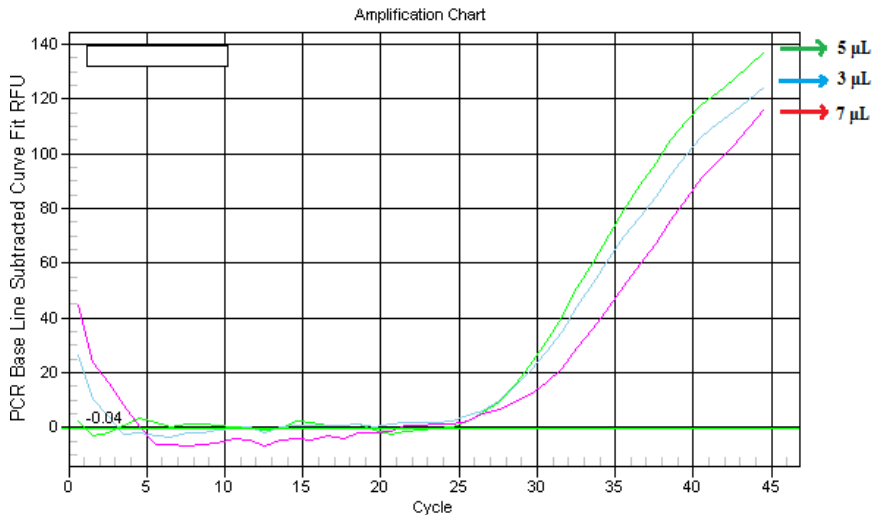
inhibitor, melainkan karena konsentrasi DNA yang semakin rendah akibat volume yang besar, seperti ditunjukkan hasil uji rPCR pada volume elusi 80  $\mu$ L (Gambar 4).



Gambar 4

Hasil optimasi volume elusi akhir ekstraksi DNA *P.jirovecii* pada sputum.

Keterangan gambar : garis merah : 70  $\mu$ L; garis biru : 60  $\mu$ L; Garis hijau : 50  $\mu$ L; dan garis biru muda : 80  $\mu$ L



Gambar 5

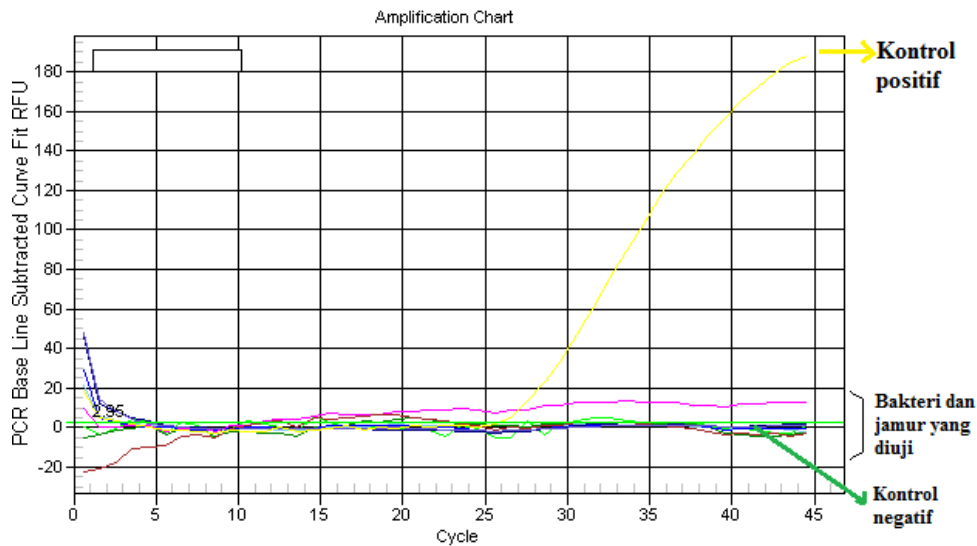
Hasil optimasi volume cetakan DNA *P.jirovecii*.

Keterangan gambar : garis hijau: 5  $\mu$ L; Garis biru: 3  $\mu$ L; dan garis merah: 7  $\mu$ L

### Uji Spesifisitas *Pneumocystis jirovecii*

Uji spesifisitas rPCR *P.jirovecii* dilakukan untuk mengetahui spesifisitas primer dan probe yang telah diperoleh pada uji optimasi sebelumnya, metode ini tidak dapat bereaksi dengan genom mikroorganisme lainnya. Uji spesifisitas ini menggunakan beberapa mikroorganisme yang dapat dideteksi dalam sputum yaitu *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*

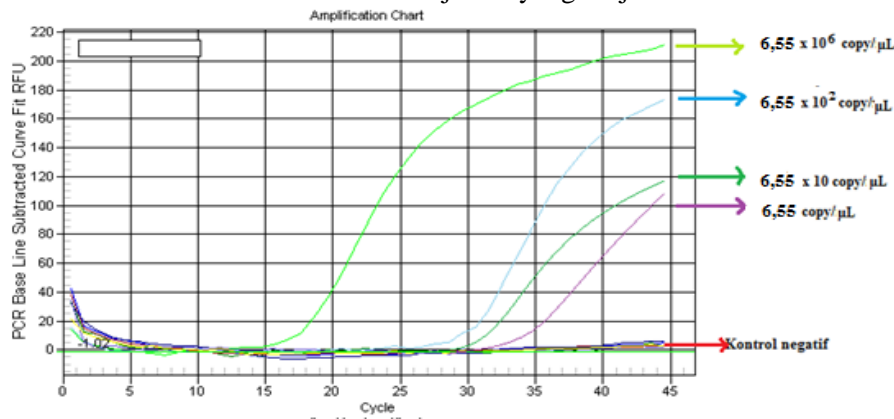
*H37Rv*, *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, dan *Staphylococcus aureus*. Mikroba ini dipilih berdasarkan atas kekerapannya dalam menyebabkan pneumonia. Hasil uji spesifisitas rPCR tidak terjadi reaksi silang pada penggunaan primer *P. jirovecii* (Gambar 6)



Gambar 6.

Hasil uji spesifisitas teknik rPCR.

Keterangan gambar: garis kuning: kontrol positif, garis hijau: kontrol negatif dan garis kurung hitam: bakteri dan jamur yang diuji .



Gambar 7

Hasil Uji Sensitifitas *P. jirovecii*.

Keterangan gambar: garis merah: kontrol negatif, garis hijau muda: copy number DNA  $6,55 \times 10^6$  copy/ $\mu$ L; garis biru: copy number DNA  $6,55 \times 10^2$  copy/ $\mu$ L, garis hijau: copy number DNA  $6,55 \times 10$  copy/ $\mu$ L dan garis ungu: copy number DNA 6,55 copy / $\mu$ L.

### Uji Sensitifitas *Pneumocystis jirovecii*

Dari hasil uji sensitifitas, diperoleh jumlah konsentrasi DNA *P. jirovecii* minimum yang masih dapat terdeteksi menggunakan uji radalah  $11,03 \times 10^{-10}$  ng/ $\mu$ L (6,55 copy/ $\mu$ L). (Gambar 7)

#### Uji Coba Sampel *Pneumocystis jirovecii*

Uji coba sampel dilakukan dengan menggunakan 50 sampel sputum yang telah diperiksa menggunakan uji mikroskopik. Uji mikroskopik sampel sputum dilakukan dengan cara pewarnaan Giemsa yang dimodifikasi dengan sulfatasi. Pewarnaan Giemsa secara rutin telah digunakan untuk deteksi tropozoit dan badan intrakistik pada pulasan BAL dan sputum pada

pasien infeksi *P. jirovecii* tapi tidak mewarnai dinding kista. Sulfatasi sebelum pewarnaan menggunakan Giemsa membantu visualisasi betuk kista, karena sulfatasi memodifikasi permukaan kista *P. jirovecii* dan membantu pewarna polikrom, misalnya Giemsa untuk bereaksi. Dari analisis 50 sampel secara mikroskopik diperoleh 39 sampel negatif *P.jirovecii* dan 11 sampel positif *P. jirovecii*. Hasil uji rPCR, diperoleh 21 sampel positif *P. jirovecii*. Hasil ini menunjukkan bahwa uji rPCR lebih sensitif dalam mendeteksi adanya *P. jirovecii* pada sampel klinis dari pada metode mikroskopik, karena rPCR mampu mendeteksi DNA *P. jirovecii* pada jumlah yang sangat rendah (Murshi, 2012).



Tabel 2.

Hasil Analisa Mikroskopik dan rPCR <i>P. jirovecii</i>				
No	Metode	Hasil		Total sampel
		Positif	Negatif	
1	Mikroskopik	11	39	50
2	rPCR	21	29	50

Tabel 3.

Hasil analisa rPCR dengan jenis sampel				
No.	Jenis sampel	Hasil rPCR		Total Sampel
		(+)	(-)	
1	Sputum	16	25	41
2	Sputum Induksi	5	4	9

Tabel 4

Hasil analisa rPCR dengan jumlah sel CD <sup>4+</sup>				
No.	Jumlah sel CD <sup>4+</sup>	Hasil rPCR		Total Sampel
		(+)	(-)	
1	CD <sup>4+</sup> ≤ 200	6	5	11
2	CD <sup>4+</sup> > 200	14	25	39

Berdasarkan analisis kedua metode ini, dari 11 sampel positif yang diuji menggunakan metode mikroskopik, ada 4 sampel yang memberikan hasil negatif ketika diuji menggunakan rPCR. 39 sampel negatif yang diuji menggunakan metode mikroskopik ada 14 yang memberikan hasil positif jika diuji menggunakan rPCR. Analisis ini memperlihatkan bahwa, deteksi *P. jirovecii* menggunakan rPCR (42%) memberikan hasil yang lebih baik dari pada pemeriksaan menggunakan metode mikroskopik (22%), karena rPCR mampu meningkatkan rata-rata positif sekitar 20% dibanding mikroskopik. Pada pemeriksaan mikroskopik, dapat memberikan interpretasi hasil yang tidak tepat, Hal ini terjadi karena pemeriksaan mikroskopik memiliki kelemahan dalam analisis hasil, antara lain dapat terjadi kesalahan analisis karena pemeriksaan ini membutuhkan ketrampilan dan ketelitian yang baik dalam menganalisa sampel, baik dalam mewarnai sel maupun mengamati preparat sel. Pemeriksaan PCR pada umumnya dapat memberikan hasil positif palsu dan negatif palsu karena menggunakan satu macam primer. Pada metode rPCR, kemungkinan hasil positif palsu dan negatif palsu tersebut dapat dihilangkan dengan cara penggunaan sepasang primer dan probe yang spesifik terhadap target gen serta penambahan kontrol positif dan kontrol negatif pada deteksi *P.jirovecii* rPCR. Pada penelitian ini digunakan sepasang primer MSG forward dan MSG reverse serta probe MSG. Primer dan probe ini berguna untuk amplifikasi target gen MSG dari *P. jirovecii*.

Major surface glikoprotein dipilih sebagai target karena memiliki sekuens yang bervariasi dan lestari. Selain itu menurut jurnal (Kutty. 2008), gen MSG dapat meningkatkan sensitifitas dari teknik (Epsy et al 2006, Robert et al 2004, Kutty et al 2008, Thermo Scientific 2016) .

Untuk mengetahui spesifisitas primer dan probe MSG, maka dilakukan pemeriksaan sekuens primer dan probe MSG dengan Blast primer dan probe. Hasil blast menunjukkan bahwa primer dan probe yang digunakan spesifik untuk *P. jirovecii* (Lampiran 3 dan 4). Selain itu, produk rPCR yang diperoleh dan sepasang primer MSG diperiksa menggunakan metode sekuensing DNA. Metode ini berguna untuk mengetahui bahwa produk PCR hasil amplifikasi benar merupakan sekuens DNA *P. jirovecii*. Hasil sekuensing produk rPCR dengan sepasang primer MSG, menunjukkan bahwa primer yang digunakan memang berkomplementer dengan sekuens *P. jirovecii*.

Analisa rPCR berdasarkan jenis sampel sputum memberikan hasil dari 41 sampel sputum diperoleh 16 sampel positif *P.jirovecii* (39% positif), dan pada sampel sputum induksi dari 9 diperoleh 5 sampel positif *P. jirovecii* (55,56% positif) (Tabel 2). Hasil tersebut memperlihatkan bahwa jenis sampel sputum dan sputum induksi memberikan rata-rata hasil positif yang hampir sama dan tidak mempengaruhi hasil rPCR, namun perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk verifikasi data ini dengan jumlah sampel yang sesuai antara sputum dan sputum induksi.

Berdasarkan hasil analisa rPCR pada sampel pasien HIV dengan jumlah  $CD^{4+} > 200$  adalah 14 sampel positif (10 sampel sputum dan 4 sampel sputum induksi) dan 25 sampel negatif (21 sampel sputum dan 4 sampel sputum induksi). Serta, hasil rPCR pada sampel pasien HIV dengan jumlah  $CD^{4+} \leq 200$  adalah 6 sampel positif (5 sampel sputum dan 1 sampel sputum induksi) dan 5 sampel negatif (4 sampel sputum dan 1 sampel sputum induksi). Berdasarkan jumlah sel  $CD^{4+}$ , diperoleh 40% positif (14 sampel  $CD^{4+} > 200$  dan 6 sampel  $CD^{4+} \leq 200$ ) dan 60% negatif (25 sampel  $CD^{4+} > 200$  dan 5 sampel  $CD^{4+} \leq 200$ ). Pada hasil analisa memperlihatkan bahwa pasien HIV dengan nilai  $CD^{4+} > 200$  dapat memiliki *P. jirovecii* didalam tubuhnya dan pada pasien HIV dengan jumlah sel  $CD^{4+} \leq 200$  ada yang tidak memiliki *P. jirovecii* di tubuhnya (Lampiran 2). Analisis ini memperlihatkan bahwa jumlah sel  $CD^{4+}$  tidak mempengaruhi keberadaan *P. jirovecii* pada tubuh manusia. Hal ini terjadi karena infeksi *Pneumocystis* dapat diperoleh sejak lahir dan PjP dapat muncul melalui reaktivasi infeksi laten ketika sistem imun host menurun. Seseorang dapat memiliki *P. jirovecii* pada tubuhnya dikarenakan oleh transmisi *P. jirovecii*, yang dapat terjadi secara de novo seperti, dari lingkungan, seseorang dengan PjP, atau dari seseorang yang memiliki *P. jirovecii* ditubuhnya (kolonisasi *P. jirovecii*). Pada pasien HIV dengan jumlah sel  $CD^{4+} > 200$  memberikan hasil rPCR positif, kemungkinan karena adanya kolonisasi *P. jirovecii*, sedangkan pada pasien dengan jumlah sel  $CD^{4+} \leq 200$  dengan hasil rPCR negatif kemungkinan pasien tidak pernah memperoleh *P. jirovecii* selama hidupnya (Alison dan Karen, 2012).

Sel  $CD^{4+}$  berperan pada respon imun adaptif baik respon imun humoral maupun selular terhadap infeksi *P. jirovecii*, seperti makrofag, sel dendritik, netrofil dan sitokin yang bekerja untuk menyingkirkan infeksi. Peran utama sel T  $CD^{4+}$  dalam mengatur infeksi *P. jirovecii* telah dikemukakan dan merupakan bukti jelas adanya hubungan antara penurunan jumlah sel  $CD^{4+}$  pada pasien HIV dengan peningkatan resiko infeksi *P. jirovecii*. Jumlah sel  $CD^{4+}$  berhubungan dengan kolonisasi *Pneumocystis*. Kolonisasi *Pneumocystis* meningkat dengan jumlah  $CD^{4+}$  menurun. Untuk mengetahui kondisi *P. jirovecii* (PjP atau kolonisasi) dari seseorang tidak hanya dilihat melalui hasil pemeriksaan molekular seperti rPCR, tapi juga harus dilihat dari diagnosis klinis pasien. Pada pasien yang telah mengalami PjP umumnya menunjukkan gejala klinis seperti sesak napas, demam dan batuk non-purulent, sedangkan pada pasien dengan kolonisasi

*P. jirovecii* biasanya belum menunjukkan gejala klinis tersebut (Alison dan Karen, 2012, Alison et al 2008).

## Kesimpulan

Berdasarkan uraian yang telah dikemukakan diperoleh hasil sebagai berikut: Kondisi optimal uji deteksi *P. jirovecii* menggunakan rPCR adalah suhu *annealing*  $58^{\circ}C$ , konsentrasi primer MSG 0,5  $\mu M$ , konsentrasi probe MSG 0,5  $\mu M$ . Cetakan DNA untuk *P. jirovecii* adalah 5  $\mu L$ . Uji rPCR tidak bereaksi silang dengan mikroorganisme uji lainnya. Dan, batas ambang deteksi minimal yang diperoleh dari metode teknik rPCR adalah  $11,03 \times 10^{-10}$  ng/ $\mu L$  (jumlah copy = 6,55 copy/ $\mu L$ ). Hasil uji coba sampel diperoleh 11 (22%) sampel positif menggunakan uji mikroskopik dan 21 (42%) sampel positif rPCR, menunjukkan rPCR lebih sensitif dalam deteksi *P. jirovecii*. rPCR mampu meningkatkan rata-rata positif sekitar 20% dibanding mikroskopik. Hasil rPCR memberikan rata-rata hasil positif pada sampel sputum dan sputum induksi yang hampir sama. rPCR dapat mendeteksi keberadaan *P. jirovecii* pada sampel klinis sputum dan sputum induksi dari pasien HIV dengan pneumoniadengan jumlah sel  $CD^{4+}$  baik  $>200$  maupun  $\leq 200$ .

## Daftar Pustaka

- Alison M dan Karen AN. (2012). Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and Its Role in Disease. *J Clin Microbiol Rev.*; 25(2):297-317
- Alison M, Kenneth W, Kamyar A, and Laurence H. (2008). Epidemiology and Clinical Significance of *Pneumocystis* Colonization. *J Infect Dis.*; 197:10 –7
- Anaissie EJ, McGinnis MR, and Pfaller MA. (2009). *Clinical Mycology*. Churchill Livingstone 1<sup>st</sup> Edition. Elsevier.
- Babic EA, Vilibic CT, Erceg M, Mlinaric ME and Begovac J. 2014. Prevalence of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia (2010-2013): The First Croatian Report. *Acta Microbiol Immunol Hung*; 61 (2): 181-8
- Calderon EJ, Varela JM, Joly ID, and Cas ED. (2011). *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. ISBN: 978-1-61209-685-8.
- Catharina F, Jacobs JA, Becker P, Templeton KE, Bakkens J, Kuijper EJ. (2006). Inter-laboratory Comparison of three Different real-

- time PCR Assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples. *J Med Microbiol*; 55(pt9): 1229-35
- Catherinot E, Lanternier F, Bournoux ME, Lecuit M, Couderc LJ, and Lortholary O. (2010). *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Infect Dis Clin North Am.*; 24 (1): 107-38
- CDC. *Pneumocystis: Pneumocystis jirovecii*. DPDx. Unduh <http://www.cdc.gov/dpdx/pneumocystis/>. 8 Agustus 2015
- Dohn MN, White ML, Vigdorth EM, Ralph BC, Hertzberg VS, Baughman RP. (2000). Geographic clustering of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Am J Respir Crit Care Med*; 162:1617.
- Epsy MJ, Uhl JR, Sloan LM. 2006. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Application for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev*; 19(1):165-256
- Francisco JM, Marco MC, Conde M, Carmen de la H, Respaldiza N, Antonia G, (2005). *Pneumocystis jirovecii* in General Population. *Emerg Infect Dis.*; 11(2): 245-250
- Jackop Frans. (2004). Genetic Investigation of *Pneumocystis jirovecii*: Detection, Cotrimoxazol Resistance and Population Structure. University of Stellenbosch. Unduh 21 April 2015
- Krajicek BJ, Limper AH, and Thomas CF Jr. (2008). Advances in the biology, pathogenesis and identification of *Pneumocystis* pneumonia. *Curr Opin Pulm Med.*; 14(3):228-34.
- Kutty G, Maldarelli, Achaz G and tin. (2008). The Major Surface Glycoprotein Genes in *Pneumocystis jirovecii*. *J infect Dis*; 198(5): 741-749
- Munshi A. (2012) DNA Sequencing Methods and Application. ISBN. Unduh <http://library.umac.mo/ebooks/b28050393.pdf>. 4 Juni 2016
- Qiagen. PCR Protocol and Application. <https://www.qiagen.com/resources/molecular-biology-methods/pcr/>. Unduh 3 Juni 2016.
- Robert GF, Belaz S, Revest M, Tattevin P, Jouneau S, Decaux O. (2014). Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Immunocompromised Patients by Real-Time PCR: a 4-Year Prospective Study. *J Clin Microbiol*; 52(9): 3370–3376.
- Rodriguez YDA, Wissmann G, Muller AL, Pederiva MA, Brum MC, Brackmann RL. (2011). *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Developing Countries. *J Parasite.*; 18(3): 219-228
- Rozaliyani A. (2009). Karakteristik klinis, radiologis dan laboratoris pneumonia *Pneumocystis* pada pasien AIDS dengan gejala pneumonia di beberapa rumah sakit di Jakarta. Jakarta: Medical Research Unit FKUI; h. 22-51
- Stansell JD, Osmond DH, Charlebois E, LaVange L, Wallace JM, Alexander BV. (1997). Predictors of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.*; 155(1): 60-6.
- Thermo Scientific. T042 Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometer: Assesment of Nucleic Acid Purity. Unduh <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>. 2 Mei 2016.
- Walker J, Corner G, Ho J, Hunt C, and Pickering L. (1989). Giemsa Staining for Cysts and Trophozoites of *Pneumocystis carinii*. *J Clin Pathol*; 42(4):432-4