

# PETUNJUK TEKNIS

## PEMERIKSAAN *LINE PROBE ASSAY* (LPA) LINI DUA



# PETUNJUK TEKNIS

## PEMERIKSAAN *LINE PROBE ASSAY* (LPA) LINI DUA

Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit  
Kementerian Kesehatan  
Republik Indonesia  
2020



## KATA PENGANTAR

Pemeriksaan uji kepekaan kuman *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) diperlukan untuk mengetahui status kepekaan kuman TBC terhadap obat anti TBC. Uji kepekaan ini dibutuhkan untuk dapat menentukan pilihan obat anti TBC yang paling tepat untuk pasien. Pemeriksaan uji kepekaan kuman *M.tb* dilakukan dengan metode konvensional yang membutuhkan waktu yang relatif lama (2 - 3 bulan) dan metode cepat yang membutuhkan waktu lebih cepat (7 hari). Uji kepekaan dengan metode cepat yang digunakan di Indonesia saat ini adalah pemeriksaan *Line Probe Assay* (LPA) yang dapat memeriksa status kepekaan kuman terhadap obat TBC lini pertama (INH dan Rifampisin) dan LPA lini dua yang dapat mengetahui status kepekaan kuman terhadap obat TBC lini dua (fluorokuinolon dan obat injeksi lini dua).

Pemeriksaan LPA lini dua telah digunakan oleh Program Nasional Penanggulangan Tuberkulosis sejak tahun 2017, dan jumlahnya telah berkembang dari 3 (tiga) laboratorium (Laboratorium Tuberkulosis UKK LMK FKUI, Laboratorium Mikrobiologi RSUP Persahabatan, dan BBLK Surabaya), menjadi 7 laboratorium, dengan tambahan yaitu RSUP Dr. Kariadi, Laboratorium HUMRC Makassar, BBLK Palembang, dan Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat. Laboratorium LPA akan dikembangkan sesuai dengan situasi dan perkembangan kasus TBC Resistan Obat. Dalam melakukan pemeriksaan LPA lini dua, perlu adanya standar pelaksanaan yang harus dikerjakan oleh setiap petugas. Petunjuk teknis Pemeriksaan LPA lini dua disusun untuk menjadi acuan bagi petugas laboratorium, klinisi maupun pemegang program dalam melakukan pemeriksaan LPA lini dua.

Kami sampaikan penghargaan dan terima kasih kepada Laboratorium Rujukan Nasional (LRN) Molekuler untuk TBC dari Departemen Mikrobiologi FKUI Jakarta serta seluruh pihak yang terlibat dalam penyusunan dan penyempurnaan petunjuk teknis ini. Semoga petunjuk teknis ini bermanfaat bagi semua pihak yang terkait.

Jakarta, 20 Oktober 2020  
Direktur Jenderal P2P



dr. Achmad Yurianto

## KATA SAMBUTAN

Indonesia termasuk lima besar negara dengan jumlah penderita tuberkulosis (TB) terbanyak di dunia. Estimasi kasus TBC di Indonesia tahun 2019 sebesar 845.000 dengan estimasi pasien TBC Resistan Obat (TBC RO) adalah 23.000 orang. Adapun capaian penemuan kasus TB 2019 sebesar 568.987 dan capaian keberhasilan pengobatan sebesar 83%.

Sebagai upaya untuk meningkatkan angka keberhasilan pengobatan, pada tahun 2016 World Health Organization (WHO) mengeluarkan rekomendasi penggunaan paduan pengobatan jangka pendek (9 – 11 bulan) untuk pasien TBC RO. Paduan pengobatan jangka pendek ini lebih singkat jika dibandingkan pasien yang mendapat paduan pengobatan individual selama 19-24 bulan. Paduan pengobatan jangka pendek ini diharapkan juga dapat mengurangi angka putus berobat pasien TBC RO di Indonesia. Pemeriksaan uji resistensi lini dua dibutuhkan untuk pasien TB resistan obat sebelum mendapatkan paduan pengobatan jangka pendek atau jangka Panjang. Selama ini pemeriksaan uji kepekaan lini dua dilakukan menggunakan metode konvensional dengan media padat maupun cair yang membutuhkan waktu 2–3 bulan. WHO telah merekomendasikan pemeriksaan uji kepekaan lini dua secara cepat dengan menggunakan LPA (*Line Probe Assay*) lini dua. Pemeriksaan ini dapat mengetahui secara cepat resistansi terhadap obat antituberculosis golongan fluorokuinolon (levofloxacin dan moxifloxacin) serta obat injeksi lini dua (amikasin, kanamisin, dan capreomisin) dalam waktu 24-48 jam. Pasien TBC RO yang terbukti tidak resistan terhadap fluorokuinolon dan obat injeksi lini dua dapat diberikan pengobatan paduan jangka pendek.

Hasil pemeriksaan dengan LPA lini dua harus mengikuti prosedur operasional sesuai standar agar mutu hasil pemeriksaan selalu terjamin. Dalam upaya memenuhi tuntutan masyarakat terhadap standar mutu pemeriksaan LPA lini dua, maka disusun buku **Petunjuk Teknis Pemeriksaan *Line Probe Assay* (LPA) Lini Dua** sebagai acuan bagi laboratorium pemeriksa dan semua pihak yang terlibat dalam pemeriksaan LPA lini dua.

Kami mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah berkerja sama, khususnya Kelompok Kerja Laboratorium TB dalam menyusun **Petunjuk Teknis Pemeriksaan *Line Probe Assay* (LPA) Lini Dua** ini.

Harapan kami semoga pedoman ini bermanfaat. Masukan dan saran yang bersifat membangun untuk penyempurnaan pedoman ini sangat kami harapkan.

Jakarta, Oktober 2020

Kepala Laboratorium Rujukan Nasional Molekuler FK-UI



dr. Fera Ibrahim, MSc, PhD, SpMK(K)

NIP 19600217 198903 2 002

## TIM PENYUSUN

**Pengarah** : Direktur Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit (P2P)

**Penanggung Jawab** : Kasubdit Tuberkulosis

**Editor** : dr Endang Lukitosari, MPH  
dr Retno Kusuma Dewi, MPH  
Lydia Mursida, S.Si  
Andriansjah Rukmana, M. Biomed, PhD  
Fransisca Sunny, S.Si

### Kontributor :

Anastasia Armimi, S.Si	Subdit Tuberkulosis Dit P2PML
Anisa Hermawantu, S.ST	BBLK Surabaya***
Andriansjah Rukmana, M. Biomed, PhD	LRN Departemen Mikrobiologi FKUI*
Arinda Putri Wihardi, SKM	BBLK Surabaya***
Ariyani Kiranasari, Dra, Mbiomed, DMM	LRN Departemen Mikrobiologi FKUI*
Budi Hartati	LRN Departemen Mikrobiologi FKUI*
Budi Haryanto, dr, Sp.MK	RSUP Persahabatan
Citra Wulandari	BBLK Palembang
Desi Aulia, SKM	Subdit Tuberkulosis Dit P2PML
Dewi Wulandari, S.Si	RSUP Persahabatan
Dian Eka Restu S, Amd.AK	BBLK Surabaya***
Endang Lukitosari, dr, MPH	Subdit Tuberkulosis Dit P2PML
Fathur Gunawan, Amd.AK	HUMRC Makassar
Femmy Irawanti, drg	Subdit Mutu dan Akreditasi Yankes
Fransisca Sunny, S.Si	LRN Departemen Mikrobiologi FKUI*
Hary Agustian Handoko	BBLK Palembang
Ita Andayani, S.ST	BBLK Surabaya***
Iva Puspitasari, Sp.MK	RSUP Dr Kariadi Semarang
Jonathan Marbun, B.Sc	WHO
Junaidi, AMAK	BBLK Palembang
Lydia Mursida, S.Si	Subdit Tuberkulosis Dit P2PML
Nida Annisa Makiyah, S.Farm	LRN Departemen Mikrobiologi FKUI*
Novia Rachmayanti, M.Biomed	PSM Chemonic
Mikyal Faralina, SKM	WHO
Ramadhan Prasetyo	Labkesda Provinsi Jawa Barat**
Ratnameyda Kania Tripati, S.Si	LRN Departemen Mikrobiologi FKUI*
Rena Titis NK, SKM	Subdit Tuberkulosis Dit P2PML
Retno Kusuma Dewi, MPH	Subdit Tuberkulosis Dit P2PML
Rifky W Rachman, M.Si	Labkesda Provinsi Jawa Barat**
Roni Chandra, M.Biomed	TB Star

Ryan Bayusantika Ristandi, Sp.PK, MMRS	Labkesda Provinsi Jawa Barat**
Sandeep Meharwal, PhD	PSM Chemonics
Sri Purwati	RSUP Dr Kariadi Semarang
Tiara Verdinawati, SKM	Subdit Tuberkulosis Dit P2PML
Titiek Sulistyowati, M.Ked Klin, SpMK	BBLK Surabaya***
Triana Yuliarsih, SKM	Subdit Tuberkulosis Dit P2PML
Tugur Ariyani, S.Si, MM, DMM	RSUP Persahabatan
Yuliana Sari, S.Si	HUMRC

Keterangan:

\* LRN Molekuler, Serologi, MOTT, dan Riset Operasional TBC Departemen Mikrobiologi FKUI

\*\* LRN Mikrokopis Tuberkulosis

\*\*\*LRN Biakan dan Uji Kepekaan Tuberkulosis Fenotipik

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	i
KATA SAMBUTAN .....	ii
TIM PENYUSUN .....	iii
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR LAMPIRAN .....	x
DAFTAR SINGKATAN .....	xi
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Prinsip Kerja dan Kontrol Kualitas .....	2
1. Prinsip Kerja .....	2
2. Kontrol Kualitas Amplifikasi dan Hibridisasi .....	3
3. Keterbatasan Pemeriksaan .....	4
BAB II. KEBIJAKAN PROGRAM P2TB DALAM PENGGUNAAN LPA LINI DUA .....	5
A. Algoritma Penggunaan LPA Lini Dua dalam Program Tuberkulosis .....	5
B. Alur Pengiriman Spesimen LPA Lini Dua .....	7
1. Jumlah Dahak .....	7
2. Pengiriman dan Penerimaan Spesimen .....	7
3. Pengelompokan Pembagian Wilayah Rujukan Pemeriksaan TBC .....	7
4. Pembagian Wilayah Rujukan Spesimen Pemeriksaan LPA Lini Dua .....	8
C. Manajemen Logistik .....	10
1. Perencanaan .....	10
2. Pengadaan .....	11
3. Penyimpanan .....	12
4. Permintaan dan Distribusi Logistik .....	12
5. Pencatatan dan Pelaporan Logistik .....	14
6. Pengawasan Mutu Logistik .....	14
BAB III. KEAMANAN DAN KESELAMATAN KERJA (K3) .....	15
A. Sumber Daya Manusia (SDM) .....	15
B. Ruangan .....	15
C. Alat dan Bahan .....	16
1. Alat .....	16
2. Bahan .....	17
D. Penanganan Tumpahan dan Penanganan Limbah Infeksius .....	17
1. Penanganan Tumpahan .....	17
2. Penanganan Limbah Infeksius .....	18
E. Tanggap Darurat .....	19
BAB IV. INSTALASI ALAT LPA LINI DUA .....	20
A. <i>Thermocycler</i> .....	20
1. Deskripsi Alat <i>Thermocycler</i> .....	20
2. Komponen Alat <i>Thermocycler</i> .....	20
3. Hal-Hal yang Perlu Diperhatikan dalam Instalasi Alat <i>Thermocycler</i> ..	20



4. Prosedur Instalasi Alat <i>Thermocycler</i> .....	20
5. Cara Mengoperasikan Alat <i>Thermocycler</i> .....	21
B. TwinCubator.....	21
1. Deskripsi.....	21
2. Komponen Alat TwinCubator .....	21
3. Hal-Hal yang Perlu Diperhatikan dalam Instalasi Alat TwinCubator ..	21
4. Prosedur Instalasi Alat TwinCubator .....	21
5. Cara Mengoperasikan Alat TwinCubator.....	22
C. GT-Blot .....	22
1. Deskripsi Alat GT-Blot .....	22
2. Komponen Alat GT-Blot .....	22
3. Hal-Hal yang Perlu Diperhatikan dalam Instalasi Alat GT-Blot .....	22
4. Prosedur Instalasi Alat GT-Blot .....	23
5. Cara Mengoperasikan Alat GT-Blot.....	23
6. Proses Mengeringkan Strip ( <i>Drying of Strips</i> ) .....	25
7. Interpretasi Hasil.....	25
D. GenoScan .....	26
1. Deskripsi Alat GenoScan.....	26
2. Komponen Alat GenoScan.....	26
3. Hal-Hal yang Perlu Diperhatikan dalam Instalasi Alat.....	26
4. Prosedur Instalasi Alat GenoScan.....	27
a. Pembongkaran .....	27
b. Pemasangan Scanner GenoScan .....	27
c. Instalasi Software GenoScan .....	27
BAB V. PROSEDUR PEMERIKSAAN TBC MENGGUNAKAN .....	29
LPA LINI DUA.....	29
A. Pra-Analisis .....	29
1. Spesimen .....	29
2. Reagen LPA Lini Dua .....	29
3. Pengemasan, Pengiriman, dan Penerimaan Reagen LPA Lini Dua .....	30
B. Analisis .....	31
1. Preparasi Spesimen .....	31
2. Ekstraksi DNA.....	32
3. Pembuatan <i>Master Mix</i> , Penambahan Sampel DNA, dan Profil Amplifikasi .....	32
4. Hibridisasi.....	34
C. Pasca-Analisis .....	36
1. Evaluasi dan Interpretasi Hasil .....	36
2. Pengulangan LPA Lini Dua.....	65
3. Penyelesaian Masalah.....	65
BAB VI. PEMANTAPAN MUTU .....	68
A. Pemantapan Mutu Internal (PMI).....	68
B. Pemantapan Mutu Eksternal (PME).....	68
1. PME untuk Sertifikasi Awal .....	68
2. PME Rutin Laboratorium LPA Lini Dua .....	71
BAB VII. PEMELIHARAAN DAN PENYELESAIAN MASALAH.....	72
A. Pemeliharaan Alat LPA Lini Dua.....	72

1. Pembersihan dan Pemeliharaan Alat TwinCubator .....	72
2. Pembersihan dan Pemeliharaan Alat GT-Blot.....	73
3. Pemeliharaan GenoScan .....	75
B. Penyelesaian Masalah .....	79
BAB VIII. PENCATATAN DAN PELAPORAN .....	81
BAB IX. PEMBIAYAAN .....	86
A. Biaya Transportasi Spesimen untuk Pemeriksaan LPA Lini Dua .....	86
B. Biaya Pemeriksaan LPA Lini Dua.....	86
REFERENSI .....	88
LAMPIRAN .....	89

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Rujukan Pemeriksaan LPA Lini Dua (7 lab) .....	9
Tabel 2. Ringkasan Hasil Interpretasi LPA Lini Dua .....	38
Tabel 3. Interpretasi LPA Lini Dua pada FLQ .....	41
Tabel 4. Interpretasi LPA Lini Dua pada Obat Injeksi Lini Kedua .....	47

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Gambaran Skematik 3 Tahapan Prosedur LPA Lini Dua .....	3
Gambar 2. Algoritma Penggunaan LPA Lini Dua .....	5
Gambar 3. Alur Permintaan dan Distribusi Logistik.....	13
Gambar 4. Skema Ruangan Laboratorium LPA Lini Dua .....	15
Gambar 5. Pembuatan <i>Master Mix</i> .....	32
Gambar 6. Penambahan Sampel DNA .....	33
Gambar 7. Tahapan Hibridisasi LPA Lini Dua.....	36
Gambar 8. Zona Reaksi <i>Strip</i> LPA Lini Dua.....	37
Gambar 9. Kontrol Konjugat (CC).....	37
Gambar 10. Kontrol Amplifikasi .....	37
Gambar 11. Pita MTB (TUB) pada <i>Strip</i> LPA Lini Dua.....	38
Gambar 12. Kontrol Lokus.....	39
Gambar 13. Lokus <i>gyrA</i> untuk Resistansi FLQ .....	40
Gambar 14. Contoh Interpretasi LPA Lini Dua.....	50
Gambar 15. Tahapan Proses Duplo untuk Uji Silang LPA Lini Dua pada Spesimen Sputum.....	69
Gambar 16. Tahapan Proses Duplo untuk Uji Silang LPA Lini Dua pada Spesimen Biakan.....	70
Gambar 17. TwinCubator .....	72
Gambar 18. Alur Pelaporan Error dan Kerusakan Alat LPA.....	79

## **DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1. Pembagian Wilayah Rujukan Pemeriksaan Tuberkulosis (TBC) .....	89
Lampiran 2. Prosedur Ekstraksi DNA dari Sampel Biakan MGIT / Sputum .....	92
Lampiran 3. Volume Reagen yang Harus Disiapkan dalam Tahapan Hibridisasi ..	94
Lampiran 4. Lembar Interpretasi Hasil Pemeriksaan LPA Lini Dua .....	95
Lampiran 5. Formulir TBC-06.....	96
Lampiran 6. Formulir TBC-05.....	100
Lampiran 7. Formulir TBC-04.....	102
Lampiran 8. Format Pola Resistansi dan IKU.....	103

## DAFTAR SINGKATAN

AC	: <i>Amplification Control</i>
AG/CP	: <i>Aminoglycosides/Cyclic Peptides</i>
AMK	: Amikasin
BHP	: Bahan Habis Pakai
CAP	: Kapreomisin
CB	: <i>Clinical Breakpoint</i>
CC	: <i>Conjugate Control</i>
CON-C	: <i>Conjugate Concentrate</i>
CON-D	: <i>Conjugate Buffer</i>
DEN	: <i>Denaturation Solution</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
FLQ	: Fluorokuinolon
HYB	: <i>Hybridization Buffer</i>
IKU	: Indikator Kinerja Utama
KAN	: Kanamisin
LPA	: <i>Line Probe Assay</i>
LRN	: Laboratorium Rujukan Nasional
MOTT	: <i>Mycobacterium other than tuberculosis</i>
MUT	: <i>Mutation</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PME	: Pemantapan Mutu Eksternal
PMI	: Pemantapan Mutu Internal
RIN	: <i>Rinse Solution</i>
RO	: <i>Reverse Osmosis</i>
SGOT	: Serum Glutamic-Oxaloacetic Transaminase
SGPT	: Serum Glutamic-Pyruvic Transaminase
SLID	: <i>Second-Line Injectable Drug</i>
STR	: <i>Stringent Wash Solution</i>
SUB-C	: <i>Substrate Concentrate</i>
SUB-D	: <i>Substrate Buffer</i>
TBC MDR	: Tuberculosis <i>Multi Drug-resistant</i>
TBC RR	: Tuberculosis Resistan Rifampisin
QTcF	: <i>Corrected QT interval by Fredericia</i>
VIO	: Viomisin
WT	: <i>Wild Type</i>



## BAB 1. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Pada tahun 2017 diperkirakan terdapat 10 juta insidens kasus Tuberkulosis (TBC) di seluruh dunia, sebanyak 558.000 diantaranya merupakan kasus TBC RR (TBC Resistan Rifampisin). Dari 558.000 kasus TBC RO tersebut hanya 160.684 yang berhasil ditemukan dan diobati pada tahun 2017. WHO memperkirakan sekitar 190.000 pasien TBC RO akan meninggal karena tidak adanya akses terhadap layanan TBC RO yang efektif. Data surveilans TBC RO di seluruh dunia juga menunjukkan hasil yang kurang memuaskan dalam hal angka keberhasilan pengobatan dengan paduan pengobatan individual, yaitu sekitar 55% (WHO Global TBC Report 2018).

Pada bulan Mei 2016 WHO mengeluarkan rekomendasi penggunaan paduan pengobatan jangka pendek 9-11 bulan untuk tiga kelompok pasien, yaitu: pasien TBC RR atau MDR yang belum pernah diobati dengan Obat Anti Tuberkulosis (OAT) lini kedua; atau pada pasien yang kemungkinan kecil terjadi resistansi; atau terbukti tidak resistan terhadap fluorokuinolon dan obat injeksi lini kedua (SLID/*Second Line Injectable Drug*). Rekomendasi ini berdasarkan pada hasil kajian dari berbagai studi observasional mengenai penggunaan paduan pengobatan jangka pendek di beberapa negara Asia dan Afrika (Bangladesh, Benin, Burkina Faso, Burundi, Kamerun, Afrika Tengah, Kongo, Nigeria, Swaziland, dan Uzbekistan) yang menunjukkan angka keberhasilan pengobatan menggunakan paduan jangka pendek mencapai 84% (95%CI: 79%-87%) dibandingkan dengan angka keberhasilan pengobatan menggunakan paduan pengobatan individual yang hanya mencapai 62% (95%CI: 53%-70%).

Program Penanggulangan Tuberkulosis di Indonesia menggunakan paduan pengobatan jangka pendek pada September 2017. Pemeriksaan laboratorium yang telah direkomendasikan oleh WHO untuk mengetahui status resistansi pasien terhadap fluorokuinolon dan obat injeksi lini kedua adalah pemeriksaan *Line Probe Assay* (LPA) lini dua. Sampai tahun 2016, Program Penanggulangan TBC menggunakan pemeriksaan LPA lini satu, namun pemeriksaan ini tidak dilakukan lagi sejak tahun 2017 karena adanya pemeriksaan Xpert MTB/RIF. Pada tahun 2017, mulai dikembangkan laboratorium LPA lini dua untuk mendukung paduan pengobatan jangka pendek pada pasien TBC RO. Pada tahun 2018, *Global Laboratory Initiative* (GLI) mengeluarkan panduan interpretasi dan pelaporan hasil pemeriksaan LPA yang menjelaskan resistansi terhadap obat individual secara lebih detail.



## B. Prinsip Kerja dan Kontrol Kualitas

Pemeriksaan LPA lini dua adalah uji *in vitro* kualitatif untuk identifikasi *M. tuberculosis* kompleks dan resistansi terhadap fluorokuinolon (FLQ; misal: levofloksasin dan moksifloksasin) dan aminoglikosida (*aminoglycosides*)/peptida siklik (*cyclic peptides*) (AG/CP; antibiotik injeksi seperti kanamisin, amikasin, dan kapreomisin) dari spesimen dahak dengan BTA positif atau negatif dan biakan.

Spesies penyebab tuberkulosis (TBC) - *M. tuberculosis complex* adalah: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis subsp. bovis*, *M. bovis subsp. caprae*, *M. bovis BCG*, *M. Microti*, *M. canettii*, dan *M. pinnipedii*. GenoType MTBDRsl Ver.2.0 yang meliputi QRDR (*Quinolone Resistance Determination Region*) dari *gyrA* (kodon 85-96) dan *gyrB* (kodon 536-541) untuk mendeteksi resistansi FLQ; *rrs* (posisi asam nukleat 1401, 1402, dan 1484); dan nukleotida -37 sampai -2 di depan regio promoter *eis* untuk mendeteksi resistansi obat injeksi lini kedua. Daerah yang dicakup oleh semua probe MUT belum diketahui sedangkan hanya beberapa daerah yang dicakup oleh probe WT yang sudah diketahui.

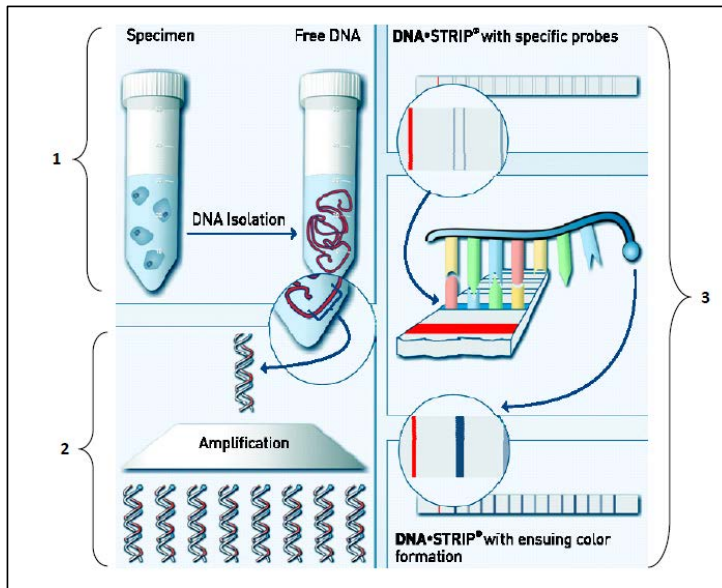
Sensitivitas dan spesifitas LPA lini dua untuk tiap obat berbeda. Kemampuan LPA lini dua untuk deteksi FLQ dari sampel sputum menunjukkan sensitivitas 86,2% dan spesifitas 98,6%, sedangkan kemampuan LPA linid ua untuk deteksi obat injeksi lini kedua mempunyai sensitivitas 87% dan spesifitas 99,5%.

### 1. Prinsip Kerja

Prinsip kerja LPA lini dua terbagi dalam tiga tahap (Gambar 1):

- a. Ekstraksi DNA dari spesimen dahak yang telah didekontaminasi menggunakan NALC-NaOH- atau hasil biakan (dari media padat/cair).
- b. Amplifikasi multipleks dengan primer biotinilasi (*biotinylated primers*).
- c. *Reverse hybridization* yang terdiri dari beberapa tahapan, yaitu:
  - *Denaturation*
  - *Hybridization*
  - *Stringent washing*
  - *Conjugate reaction*
  - *Substrate reaction*

DNA yang sudah teramplifikasi kemudian dihibridisasi dengan *probe*. Jika DNA dan *probe* berikatan maka akan terbentuk pita yang akan terdeteksi secara visual melalui pembentukan warna. Warna yang terbentuk disebabkan reaksi enzimatis antara streptavidin yang berikatan dengan primer biotinilasi (HAIN, 2012).



Gambar 1. Gambaran Skematik 3 Tahapan Prosedur LPA Lini Dua

Semua reagen yang dibutuhkan untuk proses amplifikasi, seperti polimerase dan primer, disertakan dalam *Amplification Mixes* (Campuran Amplifikasi) A dan B (AM-A dan AM-B). Strip membran dilapisi dengan *Probe* yang berkomplementer dengan asam nukleat. Setelah denaturasi, amplicon untai tunggal (*single-stranded amplicon*) dari DNA spesimen akan mengikat *probe* (hibridisasi). Adanya kombinasi komposisi *buffer* dan suhu tertentu mengakibatkan ikatan untai DNA komplementer yang sangat spesifik menjadi sangat kuat. Dengan demikian, *probe* tersebut dapat dengan mudah membedakan beberapa variasi urutan di daerah gen yang diperiksa. Streptavidin yang berkonjugasi dengan fosfatase alkali (*alkaline phosphatase*) akan mengikat biotin pada amplicon dan selanjutnya fosfatase alkali mengubah substrat (yang ditambahkan kemudian) menjadi zat warna yang akan terlihat pada strip membran sebagai endapan berwarna. Adanya *template* (cetakan) pada strip memudahkan interpretasi.

## 2. Kontrol Kualitas Amplifikasi dan Hibridisasi

Setiap strip memiliki **6 zona kontrol** yang berfungsi untuk memastikan pengujian dan komponen kit berfungsi dengan benar :

- **Zona Kontrol Konjugasi/Conjugate Control zone (CC)** untuk memeriksa ikatan konjugat pada strip dan reaksi kromogenik yang benar.
- **Zona Kontrol Amplifikasi/Amplification Control zone (AC)** untuk memeriksa keberhasilan dari reaksi amplifikasi.
- **Empat zona Kontrol Lokus/Locus Control (*gyrA*, *gyrB*, *rrs*, dan *eis*)** untuk memeriksa sensitivitas optimal dari reaksi untuk masing-masing lokus gen yang diuji.

### 3. Keterbatasan Pemeriksaan

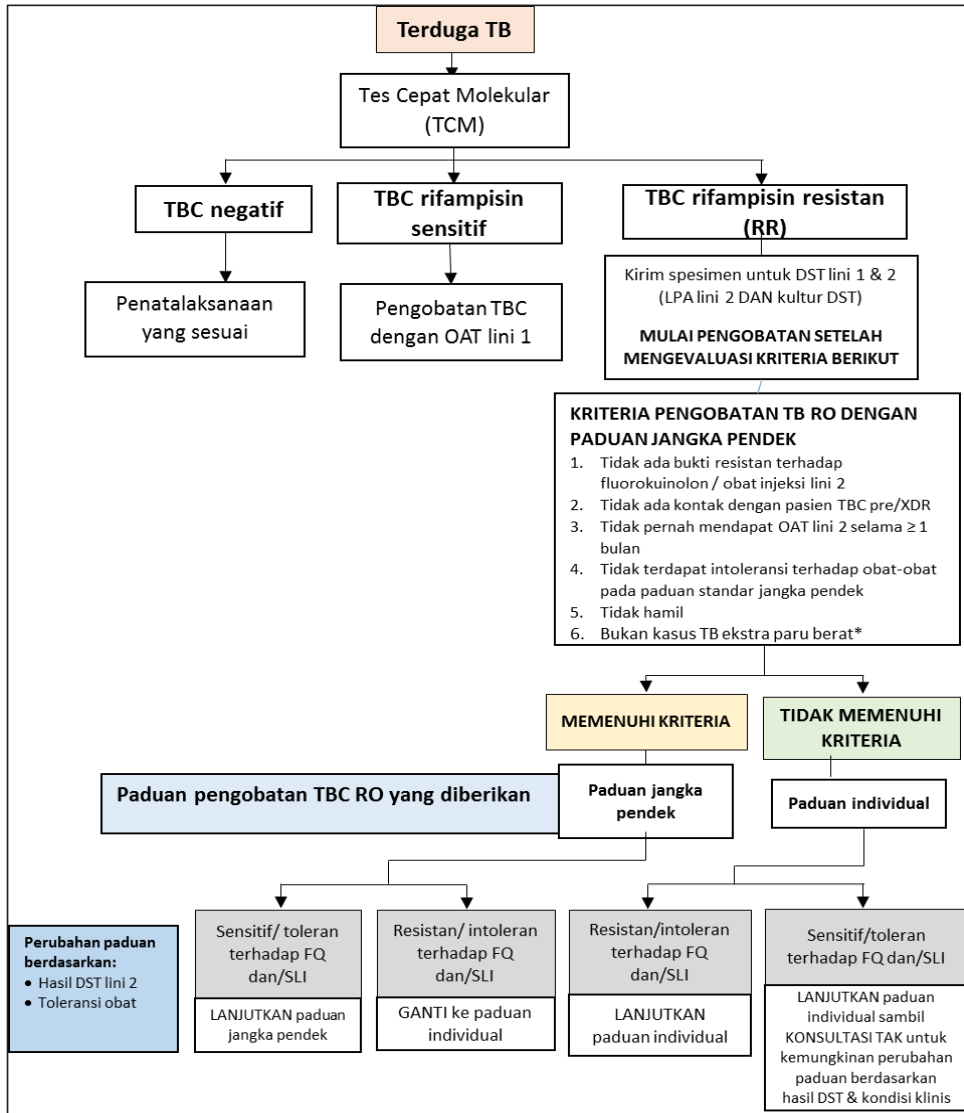
Pemeriksaan LPA lini dua memiliki keterbatasan, yaitu:

- Alat hanya dapat mendeteksi sekuens asam nukleat, bukan asam amino.
- Mutasi yang terjadi tanpa adanya perubahan asam amino (*silent mutation*) mungkin tidak akan mengubah profil resistansi.
- Mutasi *in silico* (*in-silico mutations*) tidak dapat dideteksi secara fenotipik.
- Pengguna harus mengetahui pola distribusi mutasi yang terjadi di negara/daerah masing-masing.
- Tidak ada *probe* spesifik untuk resistansi parsial, heteroresistan, strain infeksi ganda, dan *strain harboring mutations*.
- Data klinis dan hasil lab perlu dipertimbangkan.
- Cetakan DNA harus teramplifikasi dengan baik.
- Variasi urutan di daerah genom, primer dan *probe*, dapat mengindikasikan hasil yang salah.
- LPA dapat mendeteksi mutasi regio yang paling sering diidentifikasi pada strain resistan, namun beberapa mutasi yang berada di luar regio tidak bisa diabaikan. Strain WT (*wild type*) pun masih mempunyai kemungkinan untuk mengalami resistansi. Oleh karena itu, pemeriksaan DST secara fenotipik masih dibutuhkan pada beberapa kasus untuk memberikan hasil pemeriksaan yang lengkap.
- Beberapa mutasi diidentifikasi secara khusus oleh *probe* MUT, sedangkan beberapa kasus yang diduga kuat mengalami resistansi (*inferred*) diidentifikasi dengan melihat pita yang tidak muncul pada *probe* WT.
- Tidak munculnya pita pada *probe* WT tanpa adanya pita simultan pada *probe* MUT kemungkinan disebabkan oleh adanya mutasi resistansi. Kesalahan sistematis mungkin terjadi karena mutasi sinonim dan non-sinonim (mis. mutasi filogenetik). Secara global kasus ini jarang terjadi (<1% isolat), tetapi kasus ini mungkin sering terjadi secara lokal.
- LPA kurang efisien dibandingkan dengan DST berbasis kultur konvensional dalam mendeteksi resistansi pada sampel yang mengandung bakteri resistan dan rentan terhadap OAT (mis. strain heteroresistan).
- LPA dapat mendeteksi bakteri resistan dengan melihat mutasi (yang terdeteksi oleh *probe* MUT) jika bakteri resistan mewakili setidaknya 5% dari total populasi. Apabila bakteri resistan disimpulkan oleh tidak munculnya pita pada *probe* WT mungkin akan ada kasus resistan yang terlewatkan, jika populasi resistan kurang dari 95% dari total populasi bakteri.

## BAB II. KEBIJAKAN PROGRAM P2TB DALAM PENGGUNAAN LPA LINI DUA

### A. Algoritma Penggunaan LPA Lini Dua dalam Program Tuberkulosis

Pemeriksaan LPA lini dua berdasarkan Petunjuk Teknis Pengobatan Pasien TBC Resistan Obat dengan Paduan Pengobatan Jangka Pendek adalah sebagai berikut:



Gambar 2. Algoritma Penggunaan LPA Lini Dua

**Keterangan alur:**

- Untuk semua pasien TBC dengan hasil pemeriksaan TCM TBC RR, ambil dua (2) dahak berkualitas baik, satu (1) dahak untuk pemeriksaan LPA lini dua dan satu (1) dahak untuk pemeriksaan uji kepekaan.
- Bila tidak terdapat risiko intoleransi dan/resistansi terhadap fluorokuinolon dan/obat injeksi lini kedua berdasarkan anamnesis dan atau hasil uji kepekaan, pasien akan mulai paduan pengobatan jangka pendek.
- Bila terdapat risiko intoleransi/resistansi terhadap fluorokuinolon dan/obat injeksi lini kedua berdasarkan anamnesis, uji kepekaan, atau faktor risiko hasil pengobatan buruk (seperti TBC berat), pasien harus diberikan paduan individual.
- Ketika hasil uji kepekaan keluar, paduan pengobatan harus dievaluasi ulang, dengan 5 opsi berikut:
  - 1) Untuk pasien yang sudah mendapatkan paduan standar jangka pendek dan hasil uji kepekaan tidak terdapat resistansi terhadap fluorokuinolon/obat injeksi lini kedua, pengobatan paduan standar jangka pendek dapat dilanjutkan.
  - 2) Untuk pasien yang sudah mendapatkan paduan standar jangka pendek dan hasil uji kepekaan menunjukkan tambahan resistansi terhadap fluorokuinolon/obat injeksi lini kedua, pengobatan pasien harus berganti menjadi paduan individual berdasarkan hasil uji kepekaan (pengobatan dimulai dari awal).
  - 3) Untuk pasien yang sudah mendapatkan paduan individual dan terkonfirmasi resistan terhadap fluorokuinolon/obat injeksi lini kedua berdasarkan hasil uji kepekaan, pengobatan paduan individual dilanjutkan.
  - 4) Untuk pasien yang mendapatkan paduan individual berdasarkan pertimbangan intoleransi terhadap fluorokuinolon/obat injeksi lini kedua, paduan harus dievaluasi ulang dan disesuaikan (bila diperlukan) berdasarkan hasil uji kepekaan.
  - 5) Untuk pasien yang mendapatkan paduan individual tetapi tidak terbukti resistan terhadap fluorokuinolon/obat injeksi lini kedua berdasarkan hasil uji kepekaan, pengobatan paduan individual dilanjutkan sambil berkonsultasi dengan para Tim Ahli Klinis (TAK) akan kemungkinan perubahan paduan berdasarkan hasil uji kepekaan dan kondisi klinis → pasien tidak pindah ke paduan standar jangka pendek apabila telah mendapatkan pengobatan dengan paduan individual > 1 bulan.

Bila terjadi kasus intoleransi kanamisin (misalnya terjadi gangguan pendengaran sensoris, gangguan fungsi ginjal, gangguan keseimbangan, terjadi kehamilan selama pengobatan), kanamisin dapat diganti dengan kapreomisin dengan dosis yang sama dengan kanamisin.

## B. Alur Pengiriman Spesimen LPA Lini Dua

### 1. Jumlah Dahak

Pemeriksaan diagnosis TBC dan TBC RO membutuhkan dua dahak sesuai algoritma diagnosis dalam Permenkes 67 tahun 2016 tentang Penanggulangan Tuberkulosis. Pemeriksaan TCM dilakukan pada 1 (satu) dahak berkualitas baik. Dahak kedua digunakan sebagai cadangan jika diperlukan pengulangan pemeriksaan TCM pada pasien dengan hasil Error, Invalid dan Indeterminate; serta pada pasien dengan hasil TCM RR dari kelompok pasien resiko rendah TBC RO.

Pemeriksaan LPA lini dua dilakukan setelah pasien telah terkonfirmasi Resistan Rifampisin dari pemeriksaan TCM. Pasien yang telah terkonfirmasi sebagai TBC RR kemudian dirujuk ke RS dan Balai Kesehatan Pelaksana Layanan TBC RO dan diambil 2 (dua) dahak SS (Sewaktu-Sewaktu) dengan interval minimal 1 jam atau SP (Sewaktu-Pagi) untuk pemeriksaan LPA lini dua dan uji kepekaan.

### 2. Pengiriman dan Penerimaan Spesimen

Pengiriman spesimen untuk pemeriksaan LPA lini dua dilakukan oleh fasyankes TBC RO kepada laboratorium rujukan pemeriksaan LPA lini dua sesuai dengan standar pengemasan dan pengiriman spesimen. Pengiriman spesimen harus dilengkapi dengan form TB05 dan salinan hasil pemeriksaan TCM yang menunjukkan hasil RR. Pemeriksaan LPA lini dua akan dilakukan jika data dasar pasien RR telah terdaftar di SITB. Laboratorium akan menghubungi pihak pengirim jika terdapat spesimen yang berasal dari pasien yang belum terdaftar maupun belum ada hasil RR dari pemeriksaan TCM pada SITB. Jika dalam waktu 7 hari kalender, pasien RR tersebut belum terdaftar di Sistem Informasi Tuberkulosis (SITB) maka laboratorium tidak akan melakukan pemeriksaan LPA lini dua dan membuang spesimen tersebut.

Jika laboratorium menerima > 9 sampel, maka dapat dilakukan pemeriksaan LPA dengan mesin GT-Blot untuk mengurangi penggunaan kontrol. Pemeriksaan LPA dapat dilakukan dalam interval 2 kali seminggu atau sesuai dengan jumlah banyaknya sampel yang diterima untuk pemeriksaan LPA lini dua. Laboratorium tetap dapat melakukan pemeriksaan LPA lini dua meskipun hanya ada 1 sampel dengan waktu tunggu kedatangan dalam waktu 3 (hari). Jika dalam waktu 1-2 bulan laboratorium hanya menerima < 5 sampel maka perlu dilakukan evaluasi terhadap akses penggunaan TCM yang terlalu longgar dan alur rujukan pemeriksaan LPA lini dua. Laboratorium dapat menginformasikan hal tersebut kepada Dinas Kesehatan Provinsi dan Subdit Tuberkulosis.

### 3. Pengelompokkan Pembagian Wilayah Rujukan Pemeriksaan TBC

Berdasarkan kemampuan laboratorium rujukan uji kepekaan maupun LPA lini dua, terdapat 2 (dua) kelompok provinsi yaitu:

- a. Kelompok 1, provinsi yang merujuk 2 (dua) dahak untuk uji kepekaan dan LPA lini dua ke 1 (satu) laboratorium.
- b. Kelompok 2, provinsi yang merujuk 1 (satu) dahak ke laboratorium uji kepekaan dan 1 (satu) dahak ke laboratorium LPA lini dua secara terpisah.

A. Kelompok 1 - Laboratorium rujukan uji kepekaan dan LPA lini dua berada di 1 laboratorium

1. Untuk rujukan pemeriksaan uji kepekaan dan LPA lini dua yang berada 1 tempat, maka RS dan Balai Kesehatan Pelaksana Layanan TBC RO mengirimkan 2 dahak ke laboratorium uji kepekaan dan LPA lini dua tersebut.
2. Laboratorium LPA lini dua memilih spesimen dengan hasil BTA positif lebih tinggi. Jika hasil BTA *scanty* atau BTA negatif, maka pemeriksaan LPA lini dua tetap dilanjutkan.
3. Jika hasil LPA lini dua invalid atau indeterminate, maka pemeriksaan LPA lini dua diulang dari isolat. Jika biakan tidak tumbuh, pemeriksaan LPA lini dua tidak dilanjutkan. Pengulangan hanya dilakukan 1 kali.

B. Kelompok 2 – Laboratorium rujukan uji kepekaan terpisah dengan laboratorium LPA lini dua

1. Untuk rujukan pemeriksaan uji kepekaan yang terpisah dengan laboratorium LPA lini dua, maka RS dan Balai Kesehatan Pelaksana Layanan TBC RO mengirimkan 1 dahak ke laboratorium uji kepekaan, dan 1 dahak ke laboratorium LPA lini dua.
2. Jika hasil LPA lini dua invalid atau indeterminate, maka laboratorium LPA lini dua mengulang pemeriksaan mulai dari ekstraksi DNA sehingga diperoleh DNA baru. Namun jika memungkinkan, laboratorium LPA lini dua dapat meminta isolat ke laboratorium uji kepekaan atau meminta dahak baru dari pasien untuk dilakukan pengulangan. Pengulangan hanya dilakukan 1 kali.
3. Identitas pasien yang memiliki hasil invalid difokan oleh laboratorium LPA lini dua ke laboratorium uji kepekaan melalui telpon/WA.

Pembagian wilayah rujukan pemeriksaan Tuberkulosis meliputi pemeriksaan LPA lini dua, biakan, dan uji kepekaan TBC dapat dilihat pada lampiran 1.

4. **Pembagian Wilayah Rujukan Spesimen Pemeriksaan LPA Lini Dua**

Saat ini di Indonesia terdapat 7 (tujuh) laboratorium yang mampu melaksanakan pemeriksaan LPA lini dua, yaitu :

- a. Laboratorium Tuberkulosis UKK LMK FKUI
- b. Laboratorium Mikrobiologi RSUP Persahabatan
- c. BBLK Surabaya
- d. BBLK Palembang
- e. Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat

- f. RSUP Dr Kariadi Semarang
- g. HUMRC Makassar

Pembagian wilayah rujukan spesimen untuk pemeriksaan LPA lini dua dengan 7 laboratorium rujukan dapat dilihat pada tabel 1 berikut. Pembagian ini dimungkinkan berubah sesuai pengaturan yang dilakukan oleh Program Pengendalian TBC.

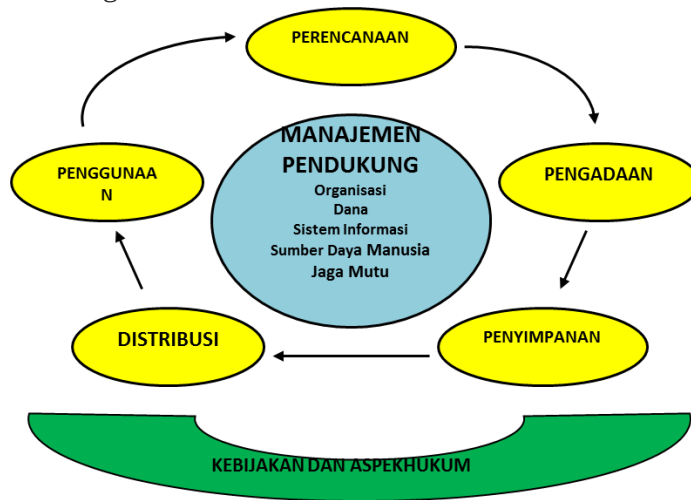
Tabel 1. Rujukan Pemeriksaan LPA Lini Dua (7 lab)

No	Laboratorium LPA Lini dua	Jejaring Rujukan Provinsi / Fasyankes TBC RO
1	Laboratorium Mikrobiologi RSUP Persahabatan	RSUP Persahabatan
2	BBLK Surabaya	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jawa Timur</li> <li>• Bali</li> <li>• Nusa Tenggara Barat</li> <li>• Nusa Tenggara Timur</li> <li>• Kalimantan Tengah</li> <li>• Kalimantan Selatan</li> <li>• Kalimantan Timur</li> <li>• Kalimantan Utara</li> </ul>
3	Laboratorium Tuberkulosis UKK LMK FKUI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seluruh RS di wilayah Provinsi DKI Jakarta (Kecuali RSUP Persahabatan)</li> <li>• Banten</li> <li>• Lampung</li> <li>• Kalimantan Barat</li> <li>• RSP Gunawan, Cisarua</li> </ul>
4	Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat	Jawa Barat (kecuali RSP Gunawan, Cisarua)
5	BBLK Palembang	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aceh</li> <li>• Sumatera Utara</li> <li>• Sumatera Barat</li> <li>• Bengkulu</li> <li>• Jambi</li> <li>• Sumatera Selatan</li> <li>• Bangka Belitung</li> <li>• Riau</li> <li>• Kepulauan Riau</li> </ul>
6	Laboratorium RSUP Dr. Kariadi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jawa Tengah</li> <li>• D.I. Yogyakarta</li> </ul>
7	HUMRC Makassar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gorontalo</li> <li>• Sulawesi Utara</li> <li>• Sulawesi Tengah</li> <li>• Sulawesi Tenggara</li> <li>• Sulawesi Barat</li> <li>• Sulawesi Selatan</li> <li>• Maluku</li> <li>• Maluku Utara</li> <li>• Papua</li> <li>• Papua Barat</li> </ul>



### C. Manajemen Logistik

Logistik Program Pengendalian Tuberkulosis (P2TBC) merupakan komponen yang penting dalam program pengendalian TBC. Manajemen logistik P2TBC merupakan suatu rangkaian kegiatan yang dilakukan untuk menjamin agar logistik tersedia di setiap layanan pada saat dibutuhkan dengan jumlah yang cukup dan kualitas yang baik. Kegiatan pengelolaan logistik dimulai dari perencanaan, pengadaan, penyimpanan, pendistribusian, sampai dengan penggunaan, serta adanya sistem manajemen pendukung yaitu organisasi, dana, sistem informasi, sumber daya manusia dan juga mutu. Hal ini dapat dilihat pada siklus pengelolaan logistik di bawah ini.



Logistik yang dibahas dalam petunjuk teknis ini adalah alat hibridasi (menggunakan twinkubator dan GT Blot merek HAIN), alat untuk interpretasi hasil (menggunakan genoscan merk HAIN) dan kit yang dikategorikan sebagai logistik non OAT yang pengelolaannya masuk ke dalam jejaring pengelolaan logistik P2TBC. Secara umum pengelolaan program TBC dilakukan pada setiap tingkat, mulai dari tingkat Pusat, Dinas Kesehatan Provinsi, Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota sampai dengan di fasyankes, baik rumah sakit, puskesmas maupun fasyankes lainnya yang melakukan pelayanan pasien TBC. Sampai tahun 2019 manajemen logistik LPA lini dua masih diatur oleh Kementerian Kesehatan.

#### 1. Perencanaan

Perencanaan adalah kegiatan pertama dalam siklus pengelolaan logistik. Kegiatan ini meliputi proses penilaian kebutuhan, menentukan sasaran, menetapkan tujuan dan target, menentukan strategi, dan sumber daya yang akan digunakan. Perencanaan logistik berdasarkan kebutuhan program TBC (program *oriented*) bukan berdasarkan kebutuhan biaya (*budget oriented*). Proses pelaksanaan perencanaan logistik Non OAT untuk LPA lini dua dapat dilaksanakan dengan memperhatikan:

- a. Jenis logistik
- b. Standar logistik

c. Jumlah kebutuhan

Jumlah kebutuhan kit direncanakan dengan mempertimbangan:

- a. Target dan jumlah penemuan kasus pasien rifampisin resistan
- b. Estimasi utilisasi kit
- c. Data jumlah penggunaan tahun sebelumnya per triwulan
- d. Stok yang tersedia dan masih dapat dipergunakan

Jumlah kebutuhan kit dihitung dengan cara:

$\frac{[\sum (\text{Target penemuan kasus RR per bulan} \times \text{Estimation Utilization Rate per bulan})]}{70}$
---

Keterangan:

- |   |   |
|---|---|
| Target penemuan kasus RR per bulan<br><br>Estimation Utilization Rate per bulan<br>70 (tujuh puluh) | : disesuaikan dengan target penemuan kasus RR sesuai jejaring laboratorium LPA<br><br>: % estimasi utilisasi<br>: jumlah tes yang bisa digunakan (1 box = 96 tes<br>26 tes untuk kontrol) |
|---|---|

## 2. Pengadaan

Pengadaan logistik merupakan proses penyediaan logistik yang dibutuhkan pada institusi maupun layanan kesehatan. Pengadaan yang baik harus dapat memastikan logistic yang diadakan sesuai dengan jenis, jumlah, tepat waktu sesuai dengan kontrak kerja, dan harga yang kompetitif serta memperhatikan masa kadaluarsanya.

Hal-hal yang harus diperhatikan dalam pengadaan logistik Non OAT adalah sebagai berikut:

- a. Proses pengadaan harus mengikuti peraturan perundang-undangan yang berlaku.
- b. Logistik yang diadakan sesuai dengan kebutuhan P2TBC.
- c. Jumlah kebutuhan memperhitungkan stok penyangga (*buffer stock*) sebesar 10% dari total kebutuhan.
- d. Mutu logistik yang diadakan sesuai dengan standar yang telah ditentukan untuk setiap jenis logistik.
- e. Terdapat garansi purna jual (*after sales service*) untuk pengadaan alat kesehatan berupa, antara lain:
  - 1) Pelatihan bagi pengguna
  - 2) Garansi *services* minimal 1 tahun
  - 3) Ketersediaan suku cadang (*spare part*) minimal 5 tahun
  - 4) Adanya perwakilan perusahaan di beberapa daerah di Indonesia untuk kemudahan pemeliharaan alat di daerah. Sampai tahun 2018 belum

ada perwakilan distributor dan *Authorized Service Provider* (ASP) untuk alat LPA di Indonesia.

### 3. Penyimpanan

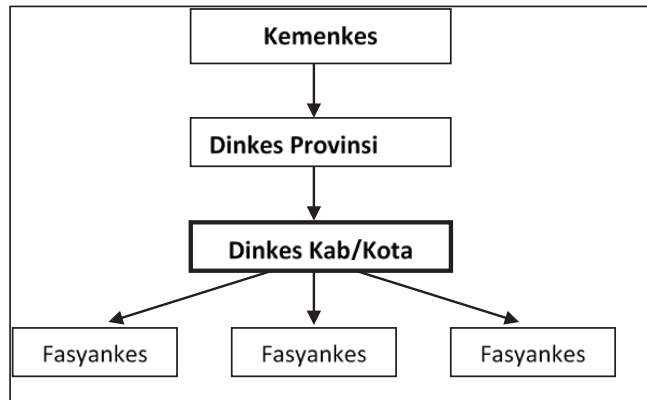
Penyimpanan adalah suatu kegiatan menyimpan logistik yang diterima termasuk memelihara yang mencakup aspek tempat penyimpanan, penataan penyimpanan logistik dan administrasi keluar masuk logistik yang disimpan. Dengan melakukan penataan penyimpanan yang baik dan benar serta didukung administrasi penyimpanan yang tertib, maka mutu logistik akan terpelihara dan menghindari penggunaan yang tidak bertanggung jawab, menjaga kelangsungan persediaan serta memudahkan pencarian dan pengawasan.

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam kegiatan penyimpanan logistik antara lain:

- a. Penyimpanan logistik sesuai dengan persyaratan suhu masing-masing jenis logistik, tempat yang kering, dan tidak boleh terkena sinar matahari langsung.  
Penyimpanan logistik LPA yang memerlukan suhu khusus adalah kit. Terdapat 2 jenis kit yang terdiri dari:
  - Kit ekstraksi DNA yang disimpan pada suhu 2-8 °C.
  - Kit LPA lini dua yang dibagi menjadi 2:
    - ✓ bagian atas berisi *master mix* yang perlu disimpan di suhu -20 °C
    - ✓ bagian bawah untuk hibridisasi perlu disimpan pada suhu 2-8 °C.
- b. Penyimpanan logistik dilengkapi dengan pencatatan ketersediaan, keluar masuk logistik dalam kartu stok, Surat Bukti Barang Keluar (SBBK), dan buku inventaris barang.
- c. Penyimpanan logistik sesuai dengan *FEFO* (*First Expired First Out*).
- d. Logistik yang telah kadaluwarsa dilaporkan dalam laporan bulanan secara berjenjang untuk ditindaklanjuti dengan proses penghapusan dan pemusnahan sesuai ketentuan pengelolaan Barang Milik Negara/Daerah (BMN/D).
- e. Pemusnahan Limbah Bahan Berbahaya dan Beracun (B3) mengacu kepada peraturan pemerintah yang mengaturnya.

### 4. Permintaan dan Distribusi Logistik

Distribusi adalah pengeluaran dan pengiriman logistik dari satu tempat ke tempat lainnya dengan memenuhi persyaratan baik administratif maupun teknis untuk memenuhi ketersediaan jenis dan jumlah logistik agar sampai di tempat tujuan. Distribusi dilaksanakan berdasarkan permintaan untuk memenuhi kebutuhan logistik di setiap tingkat pelaksana P2TBC. Proses distribusi ini harus memperhatikan aspek keamanan, mutu, dan manfaat. Alur permintaan dan distribusi dilakukan sesuai Gambar 3 di bawah ini.



Gambar 3. Alur Permintaan dan Distribusi Logistik

Alur Distribusi Logistik TBC:

- a. Distribusi dari Pusat dilaksanakan atas permintaan dari Dinas Kesehatan Provinsi.
- b. Distribusi dari Provinsi kepada Kabupaten/ Kota atas permintaan Kabupaten/ Kota.
- c. Distribusi dari Kabupaten/Kota berdasarkan permintaan Fasyankes.
- d. Setelah ada kepastian jumlah logistik yang akan didistribusikan, maka satuan kerja pengirim akan menyampaikan surat pemberitahuan kepada satuan kerja penerima mengenai jumlah, jenis, dan waktu pengiriman logistik.
- e. Membuat Surat Bukti Barang Keluar (SBBK) dan Berita Acara Serah Terima (BAST).
- f. Apabila terjadi kelebihan atau kekurangan logistik maka satuan kerja penerima menginformasikan ke satuan kerja pengirim untuk dilakukan relokasi atau penambahan logistik tersebut.
- g. Proses distribusi ke tempat tujuan harus memperhatikan sarana/transportasi pengiriman yang memenuhi syarat sesuai ketentuan obat atau logistik lainnya yang dikirim.
- h. Penerimaan logistik dilaksanakan pada jam kerja.
- i. Penetapan frekuensi pengiriman logistik haruslah memperhatikan antara lain anggaran yang tersedia, jarak dan kondisi geografis, fasilitas gudang, dan sarana yang ada.

Hal-hal yang harus diperhatikan dalam proses permintaan dan distribusi logistik adalah sebagai berikut:

- a. Permintaan dilakukan oleh Fasyankes/RS/Laboratorium pelaksana LPA lini dua secara berjenjang melalui Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota kemudian Dinas Kesehatan Provinsi selanjutnya Kementerian Kesehatan.
- b. Untuk laboratorium LPA yang baru, diberikan kit sesuai dengan kebutuhan PME awal dan estimasi beban pemeriksaan LPA lini dua.

- c. Cara perhitungan kebutuhan logistik non-OAT dihitung berdasarkan perkiraan penggunaan sebelumnya selama triwulan dengan ditambahkan 10% untuk stok penyangga dikurangi sisa stok yang masih bisa digunakan.
- d. Permintaan logistik dilakukan per triwulan dan sesuai jadwal dan mencapai batas aman stok minimal (kebutuhan 2 bulan). Apabila logistik mencapai batas minimal atau habis sebelum jadwal permintaan triwulan, maka diperbolehkan mengajukan surat permintaan tambahan logistik dilengkapi dengan penjelasan pengajuan tambahan permintaan.
- e. Pemenuhan tambahan permintaan logistik dapat dilakukan melalui realokasi logistik antar laboratorium yang diketahui oleh Pengelola Logistik tingkat Provinsi dan/atau antar provinsi yang diketahui oleh Pengelola Logistik tingkat Kementerian Kesehatan.
- f. Distribusi logistik dilakukan dengan dilengkapi SBBK dan BAST logistik yang dikirim untuk ditandatangani oleh pejabat yang berwenang.
- g. Proses pengiriman logistik mengacu kepada persyaratan sarana dan transportasi termasuk pengemasan (*packing*) dan asuransi yang dibutuhkan bagi distribusi logistik.
- h. Apabila terjadi ketidaksesuaian jenis, jumlah (kelebihan atau kekurangan) dalam penerimaan logistik maka satuan kerja penerima menginformasikan segera ke satuan kerja pengirim beserta bukti ketidaksesuaian tersebut.
- i. Penerimaan logistik dilaksanakan pada jam kerja.
- j. Penetapan frekuensi distribusi logistik mempertimbangkan anggaran yang tersedia, jarak dan kondisi geografis, fasilitas gudang dan sarana yang ada.

#### 5. Pencatatan dan Pelaporan Logistik

Pencatatan dan pelaporan penggunaan logistik dilakukan sesuai dengan peraturan atau sistem informasi yang ditetapkan pada P2TBC baik secara manual maupun elektronik.

#### 6. Pengawasan Mutu Logistik

Pengawasan mutu didefinisikan sebagai suatu konsep pengawasan yang mencakup segala aspek yang secara individual atau bersama-sama dapat mempengaruhi mutu suatu produk. Pengawasan mutu *post market* dilakukan di setiap tingkatan pelaksana pengelolaan logistik TBC, mulai dari Pusat, Provinsi, Kabupaten/Kota hingga Fasyankes bekerjasama dengan Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM).

## BAB III. KEAMANAN DAN KESELAMATAN KERJA (K3)

### A. Sumber Daya Manusia (SDM)

Kriteria SDM:

- Penanggungjawab laboratorium minimal Spesialis Patologi Klinik (Sp.PK), Spesialis Mikrobiologi Klinik (Sp.MK), atau Master Biomedis (M.Biomed) yang memiliki latar belakang biologi molekuler.
- Pelaksana pemeriksaan LPA lini dua memiliki pendidikan minimal D3 analis kesehatan atau yang setara dan telah mengikuti pelatihan LPA lini dua.

### B. Ruangan

Pelaksanaan pemeriksaan LPA lini dua membutuhkan ruangan dengan spesifikasi tertentu. Idealnya diperlukan 5 (lima) ruangan terpisah, yaitu:

- (1) ruang ekstraksi DNA (BSL 2)
- (2) ruang pembuatan *master mix*
- (3) ruang penambahan genom DNA
- (4) ruang amplifikasi
- (5) ruang hibridisasi

Apabila tidak tersedia ruangan yang cukup sesuai dengan jumlah di atas, maka ruang amplifikasi dan hibridisasi dapat digabung (sehingga menjadi 4 ruangan).

Skema dengan 4 ruangan dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Skema Ruangan Laboratorium LPA Lini Dua

Di dalam ruang ekstraksi DNA diperlukan *biosafety cabinet* (BSC) tipe 2A untuk menjamin keselamatan pekerja laboratorium dari bahaya terinfeksi. *Laminar flow cabinet* diperlukan di ruangan pembuatan *master mix* dan penambahan genom untuk menghindari kontaminasi spesimen oleh partikel DNA dari udara luar. Alur kerja juga harus diatur satu arah mulai dari ruangan pembuatan *master mix* lalu ke ruangan penambahan genom DNA.

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Peralatan dasar dari masing-masing ruangan dapat dilihat dibawah ini:

a) Ruang ekstraksi DNA

- BSC tipe 2A
- *Heat block/water bath*
- Mikropipet

b) Ruang pembuatan *master mix*

- *Laminar flow cabinet*
- Mikropipet
- Sentrifus mini
- *Vortex*
- *Cold block* untuk enzim

c) Ruang penambahan genom DNA

- *Laminar flow cabinet*
- Mikropipet

d) Ruang amplifikasi

- Mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*)/ *Thermocycler*

e) Ruang hibridisasi

- *Shaking water bath*/alat hibridisasi LPA (menggunakan TwinCubator dan GT Blot)
- *Timer*
- Pinset
- Mikropipet
- Pemanas air
- Alat untuk interpretasi hasil (menggunakan GenoScan)

Selain alat-alat di atas, juga diperlukan:

- Lemari es -20°C untuk menyimpan beberapa reagen PCR dan LPA.
- Lemari es 4°C untuk menyimpan beberapa reagen LPA.
- Gelas ukur

## 2. Bahan

Bahan habis pakai (BHP) yang harus dipersiapkan adalah:

- Tabung PCR 0,2 ml (bebas DNase dan RNase)
- Tabung sentrifus 50 ml
- Tabung 1,5 ml dengan tutup ulir
- Tip 10µl, 20µl, 100µl, dan 1000µl berfilter
- Kertas saring
- Sarung tangan sekali pakai
- Reagen untuk biakan (bila digunakan spesimen biakan)
- Reagen dekontaminasi spesimen
- Air distilasi
- Air (*molecular biology grade*; untuk kontrol negatif)
- Plastik limbah

## D. Penanganan Tumpahan dan Penanganan Limbah Infeksius

### 1. Penanganan Tumpahan

#### a. Alat dan Bahan:

- Larutan hipoklorit 1% (diencerkan saat akan digunakan)
- Forsep, sapu, dan serokan (alat penampung sampah) yang dapat disterilisasi (*autoclavable*), atau alat mekanik lain untuk menangani benda tajam
- Kertas tisu atau bahan penyerap lainnya
- Kantong *biohazard* untuk membuang tumpahan yang terkontaminasi
- Tempat sampah benda tajam yang kosong
- Sarung tangan
- Pelindung wajah (kacamata dan masker atau pelindung wajah)
- Sepatu *boots* kedap air

#### b. Pedoman umum pada insiden tumpahan:

- Hindari menghirup material yang terkandung di udara dan segera tinggalkan ruangan. Beritahu yang lain untuk meninggalkan ruangan
- Tutup pintu dan pasang tanda bahaya
- Lepas pakaian yang terkontaminasi, balik bagian yang terkontaminasi ke dalam dan masukkan ke kantong *biohazard*
- Cuci semua bagian kulit yang terpapar dengan sabun dan air
- Informasikan pada *supervisor* dan tim keamanan kerja

#### c. Pembersihan Tumpahan

Ikuti tahapan berikut pada saat akan membersihkan tumpahan di laboratorium:

- Petugas laboratorium keluar dan memasang tanda peringatan **"BAHAYA TUMPAHAN, DILARANG MASUK!"** di depan pintu laboratorium.



- Biarkan aerosol hilang/mengendap selama setidaknya 30 menit sebelum masuk kembali ke laboratorium. Persiapkan alat untuk pembersihan (*spill kit*).
  - Kenakan alat pelindung diri (baju laboratorium, pelindung wajah, sarung tangan lapis ganda, dan sepatu *boots*).
  - Tutupi area tumpahan dengan kertas tisu/absorban.
  - Tuang larutan hipoklorit 1% pada kertas tisu/absorban di mulai dari area luar menuju area inti tumpahan.
  - Biarkan selama 20 menit.
  - Bersihkan daerah tumpahan menggunakan pinset dan buang ke dalam plastik otoklaf.
  - Tuangkan kembali disinfektan pada area tumpahan, kemudian keringkan dengan kertas tisu/absorban yang baru.
  - Buang kertas tisu/absorban tersebut ke dalam plastik otoklaf.
  - Bersihkan area sekitarnya dengan disinfektan. Gerakan pembersihan dilakukan secara sirkuler dimulai dari bagian terluar menuju ke pusat tumpahan.
  - Jika terdapat pecahan, ambillah dengan pinset dan buang dalam wadah benda tajam.
  - Buangan limbah tisu dan pecahan di atas harus diperlakukan sebagai limbah infeksius.
  - Lepaskan masker dan sarung tangan masukkan ke dalam plastik otoklaf.
  - Lepaskan jas laboratorium dan masukkan ke dalam plastik otoklaf lainnya untuk dilakukan sterilisasi.
- Cucilah tangan dan area kulit yang terpapar dengan sabun cair dan air mengalir.

## 2. Penanganan Limbah Infeksius

Pemeriksaan LPA lini dua menghasilkan limbah infeksius berupa sisa spesimen, tip, *tube*, serta BHP lainnya yang telah terkontaminasi. Seluruh materi biologis dan non-biologis yang sudah digunakan harus ditangani sebagai limbah medis yang berpotensi untuk menularkan penyakit. Pembuangan limbah medis harus dipisahkan dari sampah non-infeksius, dilakukan sesegera mungkin dan dilakukan oleh petugas laboratorium yang telah mendapatkan pelatihan Keamanan dan Keselamatan Kerja (K3).

Penanganan limbah tersebut adalah sebagai berikut:

- 1) Pot dahak dan tutupnya, serta limbah padat lainnya harus direndam dalam larutan hipoklorit 0,1% atau disinfektan lain selama minimal 12 jam.
- 2) Limbah padat yang sudah direndam, dimasukkan pada plastik otoklaf yang kemudian dihancurkan dalam insenerator.
- 3) Sterilisasi dengan otoklaf dibutuhkan suhu 121°C dengan tekanan udara 1,5-2 atm selama 20 menit.

- 4) Limbah cair dibuang melalui sistem IPAL (Instalasi Pengolahan Air Limbah).
- 5) Setelah proses otoklaf, penanganan limbah dapat dilanjutkan dengan insinerasi.

### **E. Tanggap Darurat**

Dalam penggunaan alat LPA lini dua terdapat risiko bahaya kebakaran dan bahaya materi infeksius. Tanggap darurat mencakup respon terhadap kecelakaan kerja dan bencana alam. Laboratorium harus memiliki prosedur tetap dan fasilitas penanganan kecelakaan kerja dan bencana alam, seperti *spill kit* dan Alat Pemadam Api Ringan (APAR).

Langkah yang harus dilakukan bila terjadi kecelakaan di laboratorium adalah:

1. Memastikan kecelakaan kerja ditangani sesuai dengan Standar Prosedur Operasional (SPO).
2. Melakukan tindakan pengobatan penderita kecelakaan.
3. Mengetahui faktor penyebab kecelakaan.
4. Melakukan perbaikan untuk pencegahan selanjutnya.

## BAB IV. INSTALASI ALAT LPA LINI DUA

### A. *Thermocycler*

#### 1. Deskripsi Alat *Thermocycler*

*Thermocycler* merupakan perangkat PCR atau DNA *amplifier* yang berfungsi sebagai pengganda DNA dan menentukan urutan nukleotida suatu DNA yang mengalami mutasi.

#### 2. Komponen Alat *Thermocycler*

Adapun peralatan pendukung alat ini antara lain :

- a. Kabel *power*
- b. Instrumen *Thermocycler (main unit)*
- c. *Dry block* (jika menggunakan *dry block* terpisah)
- d. Pena sentuh (*Stylus pen touchscreen* jika menggunakan tampilan *touchscreen*)
- e. Buku Manual Alat (*Manual book*)
- f. Laporan Kalibrasi (*Calibration report*)
- g. Prosedur kerja singkat

#### 3. Hal-Hal yang Perlu Diperhatikan dalam Instalasi Alat *Thermocycler*

Hal-hal yang perlu diperhatikan saat menginstal alat *thermocycler* adalah:

- a. Pastikan suhu lingkungan dan ruangan  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  dengan kelembaban  $50\% \pm 20\%$ .
- b. Pastikan peralatan tidak berada tepat di bawah *Air Conditioner (AC)*. Apabila tepat berada di bawah AC, maka usahakan mengubah arah aliran udara dengan menggeser *diffuser AC*.
- c. Pastikan komponen alat dalam kondisi lengkap (lihat ceklist alat).
- d. Pastikan daya listrik (*power consumption*) sesuai dengan kebutuhan, Jika memiliki tegangan regulator otomatis (*Auto Voltage Regulator*), tambahkan dengan UPS untuk melindungi pasokan listrik saat terjadi listrik padam.

#### 4. Prosedur Instalasi Alat *Thermocycler*

Berikut adalah prosedur instalasi alat *thermocycler*:

- a. Buka palet kayu dan kotak pelindung untuk pengiriman menggunakan peralatan pengungkit dan palu, lakukan dengan hati-hati jangan sampai merusak bagian dalam palet.
- b. Periksa seluruh peralatan yang ada dalam kotak (sesuaikan dengan ceklist pengiriman peralatan).
- c. Sambungkan/pasang peralatan yang berkaitan dengan *Thermocycler* (sesuai instruksi instalasi pada buku panduan). Pastikan semua peralatan sudah terpasang, selanjutnya lakukan pengecekan sumber listrik.
- d. Periksa kebutuhan sumber listrik peralatan yang akan diinstal (lihat buku panduan).

- e. Periksa output power supply PLN dan UPS sebelum melakukan koneksi peralatan terhadap sumber listrik.

## 5. Cara Mengoperasikan Alat *Thermocycler*

Berikut adalah tahapan untuk mengoperasikan alat *Thermocycler*.

- a. Nyalakan peralatan dengan menekan tombol *power* (on/off)
- b. Lihat menu utama pada layar, pilih pemeriksaan yang sesuai dengan jenis pemeriksaan TBC
- c. Apabila tidak terdapat protokol/prosedur pemeriksaan yang sesuai dengan jenis pemeriksaan LPA, lakukan *input* protokol/prosedur baru sesuai dengan jenis pemeriksaan
- d. Simpan protokol pemeriksaan yang sudah diinput agar memudahkan saat operasional berikutnya.

## B. TwinCubator

### 1. Deskripsi Alat TwinCubator

TwinCubator merupakan alat hibridisasi menggunakan kit teknologi DNA•STRIP. TwinCubator memiliki *thermal block* 12-sumur yang dirancang untuk mengakomodasi strip DNA. Teknik kerja alat TwinCubator adalah menggoyangkan sampel, dan mengatur tinggi rendahnya suhu pada *thermal block* yang diprogram sebelum digunakan.

### 2. Komponen Alat TwinCubator

Komponen alat terdiri dari:

- a. *Thermal block*
- b. Alat TwinCubator

### 3. Hal-Hal yang Perlu Diperhatikan dalam Instalasi Alat TwinCubator

Hal-hal yang perlu diperhatikan adalah:

- a. Pastikan kabel *power* tidak terpasang ke sumber listrik saat pemasangan alat.
- b. Hati-hati saat memindahkan/mengangkat alat karena berat alat mencapai 12 kg.
- c. Alat diletakkan dengan jarak 10-15 cm dari dinding.

### 4. Prosedur Instalasi Alat TwinCubator

Prosedur instalasi TwinCubator adalah sebagai berikut:

- a. Buka kemasan *thermal block* dan instrumen.
- b. Catat masing-masing serial number (SN) *thermal block* dan instrumen. SN *thermal block* terdapat pada bagian bawah, sedangkan SN instrumen ada di bagian belakang.
- c. (Jika memiliki lebih dari satu instrumen, pastikan SN *thermal block* dan SN instrumen sesuai seperti yang tertera di lembar checklist.
- d. Periksa kondisi alat, pastikan tidak ada kerusakan.
- e. Letakkan *thermal block* pada instrumen secara benar hingga terdengar suara 'KLIK'.

## 5. Cara Mengoperasikan Alat TwinCubator

Berikut adalah tahapan untuk mengoperasikan alat TwinCubator:

- a. Nyalakan TwinCubator dengan menekan tombol **ON** yang berada di bagian belakang alat sehingga layar PC menyala warna kuning.
- b. Masukkan 12-sumur berisi strip ke dalam *thermal block*.
- c. Atur suhu, waktu inkubasi, dan rpm menggunakan *keypad*. Informasi tersebut akan ditampilkan pada layar PC.
- d. Tekan tombol **START** untuk menjalankan alat.

## C. GT-Blot

### 1. Deskripsi Alat GT-Blot

Alat GT-Blot adalah alat pencuci hibridisasi otomatis yang menginkubasi strip LPA pada suhu yang sesuai dan melakukan berbagai langkah inkubasi dan pencucian secara otomatis.

### 2. Komponen Alat GT-Blot

Komponen GT-Blot terdiri dari komponen alat, BHP, dan reagen.

#### a. Komponen Alat

Komponen alat terdiri dari:

- UPS (*Uninterruptible Power Supply*)
- Tabung Reagen
- Baki alat/ *tray*
- Wadah Limbah

#### b. BHP dan reagen

BHP dan reagen terdiri dari:

- Kit GenoType MTBCDRplus yang berisi:  
DNA STRIP *test membranes*, *Denaturation Solution* (DEN), *Hybridization Buffer* (HYB), *Stringent Wash Solution* (STR), , *Conjugate Concentrate* (CON-C), *Conjugate Buffer* (CON-D), *Substrate Concentrate* (SUB-C), dan *Substrate Buffer* (SUB-D).
- BHP tambahan yang harus disediakan:
  - ✓ Tabung steril volume 15 ml
  - ✓ Kertas penyerap
  - ✓ Tip 200 µl
  - ✓ Sarung tangan

### 3. Hal-Hal yang Perlu Diperhatikan dalam Instalasi Alat GT-Blot

Hal-hal yang perlu diperhatikan adalah:

- a. Jangan menyentuh bagian yang bergerak dari alat yang sedang beroperasi.
- b. Jangan mencoba membuka pasokan listrik atau mengganggu komponen listrik alat.
- c. Penting untuk tidak mencoba menjalankan alat tanpa cairan. Kerusakan serius pada alat dapat terjadi. Operator harus menempatkan sensor di *tray* sebelum memulai pengujian.

#### 4. Prosedur Instalasi Alat GT-Blot

Prosedur instalasi GT-Blot adalah sebagai berikut:

- a. Memastikan alat diterima dengan baik dan diletakkan secara hati-hati di tempat yang stabil dan kuat serta di ruangan yang sejuk.
- b. Dilakukan pencatatan data/cek alat sesuai SN dan lainnya terkait pengisian formulir yang menyertai alat dan setelah lengkap dikirim kembali ke perusahaan penyedia untuk mempermudah proses perbaikan kerusakan.
- c. Memastikan alat berfungsi dengan baik.

#### 5. Cara Mengoperasikan Alat GT-Blot

Berikut adalah tahapan untuk mengoperasikan alat GT-Blot:

- 1) Pastikan daya telah dimatikan.
- 2) Pastikan tabung limbah dialirkan ke wadah kosong yang sesuai.
- 3) Salah satu tabung limbah adalah *gravity fed*. Pastikan wadah limbah berada di bawah mesin dan tabung limbah tidak terperangkap di bawah kaki.
- 4) Hidupkan daya (belakang kiri mesin) dan pastikan bahwa alat menginisialisasi dengan benar.
- 5) Urutan inisialisasi alat adalah sebagai berikut:
  - Layar akan menunjukkan "**BeeBlot Ready Press Start**"
  - Jarum aspirat bergerak ke atas ke posisi awal
  - Lengan jarum akan bergerak ke kiri ke posisi awalnya
  - *Tray* akan berpindah ke posisi asalnya
  - LED hijau di depan alat akan AKTIF
  - Kipas belakang berputar
- 6) Tempatkan semua selang dalam wadah yang diisi dengan air suling/deionisasi.
- 7) Ikuti perintah *keypad*, dan pastikan air mengalir melalui jarum pengeluaran (*dispensing needles*) di bawah lengan saat pencucian berlangsung
  - "**BeeBlot tekan START**".
- 8) Dengan menggunakan panah kiri atau kanan, pilih "**Washing - Assay 11**" lalu tekan **START** tiga kali.
  - "**Cleaning Cycle A**" Tekan **START**. Setelah siklus pembersihan A selesai tekan **START**.
  - "**Cleaning Cycle B**" Tekan **START**.
- 9) Saat siklus pembersihan sedang berlangsung, siapkan larutan CON dan SUB.
- 10) Setelah siklus pembersihan B selesai, matikan alat (tekan **OFF**).
- 11) Keringkan tabung dengan kain kering.
- 12) Tempatkan semua larutan di tempat masing-masing (warna yang cocok (dan masukkan tabung konduksi (misalnya larutan HYB berwarna hijau, dan slotnya ditandai dengan titik hijau). Pastikan volume larutan dalam setiap botol sesuai dengan jumlah strip.

- Nyalakan alat (tekan **ON**).
  - "**BeeBlot start**" Tekan **START**.
- 13) Dengan menekan tombol panah kanan pilih "**Assay 01**" Tekan **START** tiga kali.
  - 14) Penting untuk memposisikan sensor suhu di dalam *tray* sebelum pengujian dimulai. Angkat sensor suhu dengan hati-hati dan masukkan ke dalam *tray*. Pastikan sensor dipasang dengan benar sebelum memulai pengujian.
  - 15) Pemanasan larutan HYB dan STR selama 15 menit akan dimulai.
  - 16) Saat pemanasan sedang berlangsung, masukkan 20µl larutan denaturasi "DEN" di sudut masing-masing sumur pada *tray*. Tidak perlu mengganti tip, tetapi tip harus diganti jika terjadi kontaminasi.
  - 17) Tambahkan 20µl produk PCR ke larutan DEN, pipet ke atas dan ke bawah untuk mencampur dan inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Berhati-hatilah agar tidak mencemari sumur sebelahnya saat penambahan sampel. Ganti tip setiap kali menambahkan sampel.
  - 18) Ambil potongan strip LPA menggunakan pinset dan beri label dengan *special marker pen* di bawah tanda berwarna pada strip. Selalu gunakan sarung tangan saat memegang strip.
  - 19) Setelah pemanasan selesai, tekan **START** dan pilih jumlah sumur yang akan digunakan menggunakan tombol panah kiri atau kanan. Pilihannya harus berupa bilangan genap antara 2 dan 48. Tekan **START**.
  - 20) Memposisikan sensor dan tekan **START**.
  - 21) Mulai uji - tekan **START**
  - 22) Tutup penutup alat - tekan **START**
  - 23) Setelah rangkaian proses awal selesai, alat akan memasukkan larutan HYB ke dalam *tray* dan akan menambahkan air ke dalam sumur yang tidak digunakan, untuk mendapatkan suhu optimal. Pastikan semua sumur sudah terisi.
  - 24) "**Add Amplicon**" - buka pintu alat dan letakkan strip di masing-masing sumur menggunakan pinset.
  - 25) Strip harus benar-benar terendam oleh larutan dan sisi strip yang bertanda (garis biru) harus menghadap ke atas.
  - 26) Gunakan pinset (atau tip steril) untuk membalik strip yang mungkin posisinya terbalik selama perendaman. Bersihkan pinset menggunakan hipoklorit untuk menghindari kontaminasi silang.
  - 27) Tutup pintu alat dan tekan **START**.
  - 28) *Tray* akan mulai bergerak dan lampu LED hijau akan menunjukkan tanda **ON**. Suhu akan mulai naik.
  - 29) Setelah suhu 45°C tercapai, hibridisasi akan dimulai dan berlanjut selama 30 menit inkubasi.
  - 30) Sesuai dengan program alat, alat akan menyedot dan menambahkan *reagen* pada interval waktu yang tepat dan melakukan inkubasi pada suhu yang sesuai dengan prosedur.

HYB ( <i>hybridization</i> )	hijau	30 menit 45°C
STR ( <i>stringent wash</i> )	merah	15 menit 45°C
RIN ( <i>rinse solution</i> )		1 menit
CON ( <i>diluted conjugate</i> )	orange	30 menit 25°C
RIN ( <i>rinse solution</i> )		1 menit 25°C
Pencucian dengan air distilasi		1 menit 25°C
SUB ( <i>diluted substrate</i> )	kuning	3 menit 25°C
Pencucian dengan air distilasi (2 kali)		masing-masing 1 menit

- 31) Setelah proses berhenti, akan muncul “**ASPIRATE TRAY?**”, tekan **START**.
- 32) Setelah aspirasi selesai, buka pintu alat dan keluarkan *tray*. Keluarkan selang dari wadah reagen dan letakkan dalam wadah yang diisi dengan larutan hipoklorit 1% dan jalankan proses pencucian dua kali dan ulangi siklus pencucian dua kali dengan air de-ionisasi.
- 33) Untuk mengeluarkan *tray*, lepaskan tiga klem di bagian bawah *tray*, angkat sensor dan geser *tray* ke arah luar.
- 34) Keringkan selang dan simpan dalam wadah. Tutup wadah reagen dan simpan pada 2-8°C.

## 6. Proses Mengeringkan Strip (*Drying of Strips*)

Berikut langkah-langkah mengeringkan strip secara otomatis oleh GT-Blot 48:

- a. Setelah hibridisasi, keringkan sisa air pada *tray* menggunakan tisu
- b. Balik posisi *tray* (strip berada di baris depan sumur, dari kanan ke kiri).
- c. Letakkan kembali *tray* ke GT-Blot 48.
- d. Isi air pada sumur sensor suhu untuk memastikan mesin bekerja secara benar.
- e. Jalankan program pengeringan, strip akan kering otomatis.

### **CATATAN:**

Strip yang tidak benar-benar kering akan mempengaruhi hasil analisis GenoScan.

## 7. Interpretasi Hasil

Interpretasi hasil dapat dilakukan secara manual atau menggunakan alat GenoScan.

### a. Interpretasi Manual

Tahapan interpretasi secara manual:

- 1) Gunakan pinset untuk memindahkan strip ke lembar interpretasi hasil yang tersedia dalam kit atau dapat diunduh dari situs web terkait.
- 2) Tempel strip pada lembar interpretasi hasil dengan selotip bening.



- 3) Berhati-hatilah saat mencetak lembar interpretasi hasil yang diunduh dari situs web (file bentuk PDF) agar ukuran kertas sesuai dengan aslinya dan strip dapat ditempel pada posisi yang tepat.

**Catatan:** Tahapan interpretasi secara manual yang lebih rinci dapat dilihat pada BAB V.C.

b. Interpretasi dengan Alat GenoScan

Tahapan interpretasi hasil menggunakan alat GenoScan:

- 1) Gunakan program “**Assay 12**” dengan merubah posisi *tray* secara memutar dan dilakukan proses pengeringan strip.
- 2) Lakukan interpretasi hasil menggunakan alat GenoScan dengan mengangkat *tray* yang berisi strip kering dan dilakukan sesuai petunjuk alat.

**Catatan:** Tahapan interpretasi dengan GenoScan yang lebih rinci dapat dilihat pada BAB V.C.

## D. GenoScan

### 1. Deskripsi Alat GenoScan

GenoScan merupakan alat yang digunakan untuk analisis LPA. *Software* GenoScan akan membaca strip dari gambar digital yang dihasilkan oleh mesin GenoScan, menganalisis pola strip, dan mendukung dalam evaluasi interpretasi hasil.

### 2. Komponen Alat GenoScan

Komponen terdiri atas:

- a. *Scanner*
- b. Komputer
- c. Kabel pendukung
- d. *Software*

### 3. Hal-Hal yang Perlu Diperhatikan dalam Instalasi Alat

Hal-hal yang perlu diperhatikan adalah:

- a. Instalasi *scanner*, komputer, dan *software* GenoScan dilakukan oleh petugas yang terlatih dan diberi wewenang oleh Hain Lifescience.
- b. Persyaratan lingkungan laboratorium:  
Tempatkan *scanner* GenoScan pada permukaan datar dengan luas ruangan yang cukup di sekitar alat. Hindari pemasangan di sudut dan tempat-tempat yang terlalu banyak aktifitas.
- c. Pastikan bahwa laci alat yang terbuka tidak melebihi batas meja. Hal ini dapat menyebabkan cedera pada petugas atau kerusakan pada alat.
- d. Hindari getaran, radiasi elektromagnetik (kecuali komputer), dan sinar matahari yang terik.
- e. Lindungi alat dari debu, zat kimia yang merusak, dan uap asam.

#### 4. Prosedur Instalasi Alat GenoScan

Instalasi alat GenoScan terdiri dari proses membongkar alat dari kemasannya, memasang, dan memulai seluruh sistem GenoScan. Dibawah ini adalah rincian prosedur instalasi GenoScan.

##### a. Pembongkaran

Hal-hal yang harus diperhatikan saat mengeluarkan alat dari palet kayu adalah:

- 1) Periksa kemasan alat dan alat apakah ada tanda-tanda kerusakan akibat transportasi.
- 2) Pertimbangkan berat alatnya. Mintalah bantuan orang lain untuk mengangkat alat. **Peringatan:** Mengangkat alat dengan berat maksimal tanpa bantuan dapat menyebabkan cedera.
- 3) Lepaskan semua perekat dan kunci yang mengikat pada kemasan alat.
- 4) Simpan semua kemasan alat agar dapat digunakan kembali saat terjadi kerusakan atau keluhan.
- 5) Pastikan bahwa nomor seri alat sesuai dengan catatan pengiriman.
- 6) Pastikan kelengkapan komponen alat yang diterima sesuai dengan daftar.
- 7) Sebelum penggunaan pertama, diamkan alat selama beberapa jam untuk memastikan bahwa semua air yang terkondensasi telah menguap.

##### b. Pemasangan Scanner GenoScan

Pemasangan *scanner* dilakukan dengan:

- 1) Sambungkan alat ke *grid* menggunakan kabel daya dan catu daya. Stop kontak kabel listrik ada di bagian belakang alat. Slot kabel tidak dapat tertukar karena masing-masing memiliki bentuk yang berbeda.
- 2) Hubungkan *Scanner* GenoScan ke slot USB komputer menggunakan kabel yang disediakan.
- 3) *Scanner* GenoScan tidak memiliki tombol ON/OFF. Perangkat ini segera menyala setelah terhubung ke jaringan melalui catu daya dan kabel daya, terhubung ke komputer melalui kabel USB, dan diaktifkan oleh *software* GenoScan. Alat ini dimatikan dengan menutup *software* GenoScan atau dengan memutus sumber listrik.
- 4) Jika pemasangan sistem GenoScan berhasil, isi ceklist untuk instalasi dan kirim salinan ke Hain Lifescience.

##### **CATATAN:**

Bila tidak digunakan, lampu *scanner* akan mati secara otomatis setelah 15 menit. Ketika diaktifkan oleh *software* GenoScan, *software* siap digunakan setelah fase *warm-up*.

##### c. Instalasi Software GenoScan

Secara umum, *software* GenoScan sudah diinstal pada komputer yang disediakan dan tidak harus diinstal di tempat.

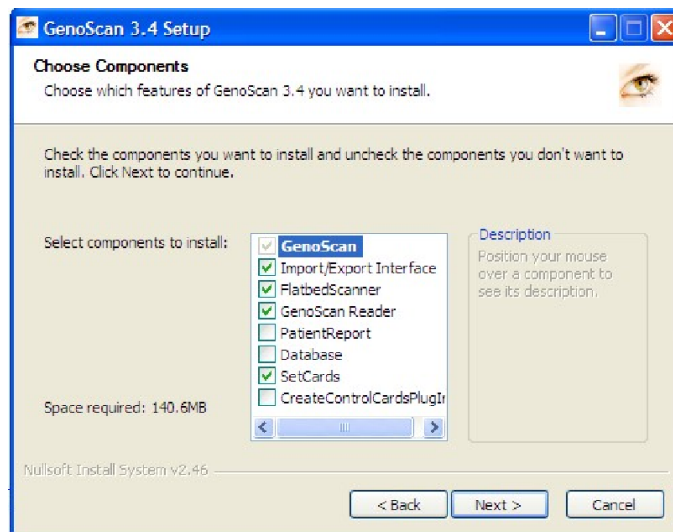
**PERINGATAN:**

*Software* harus diinstal di bawah wewenang administrator. Saat instalasi, semua pengaturan akses harus dialokasikan. Jika pengaturan akses tidak dialokasikan, ini dapat menyebabkan kesalahan dalam prosedur program, dan validitas hasil tidak lagi dijamin.

Tahapan pemasangan *software*:

- 1) Masukkan CD ke *drive* komputer yang sesuai.
- 2) Pengaturan rutin akan dimulai secara otomatis (jika tidak dimulai, cari drive CD-ROM di "File Explorer" dan file Setup.exe dan buka dengan mengklik dua kali tombol kiri mouse).
- 3) Ikuti prosedur pemasangan. Anda dapat memilih antara prosedur pemasangan berbahasa Inggris, Jerman, Prancis, atau Italia.
- 4) Seperti yang ditunjukkan pada gambar di bawah, empat komponen harus dicentang.

Setelah instalasi, lakukan *restart system*.



- 5) Setelah instalasi berhasil dilakukan, keluarkan CD dari komputer dan simpan di tempat yang aman.

## BAB V. PROSEDUR PEMERIKSAAN TBC MENGGUNAKAN LPA LINI DUA

### A. Pra-Analysis

Tahapan pra-analisis meliputi persiapan spesimen, reagen LPA lini dua, dan alat.

#### 1. Spesimen

##### a. Persyaratan Spesimen

Hasil dekontaminasi spesimen dahak dengan BTA positif atau negatif menggunakan NALC-NaOH serta spesimen biakan (media padat/cair) dapat digunakan sebagai uji awal untuk ekstraksi DNA.

##### b. Penyimpanan dan Transportasi

Penyimpanan dan transportasi dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- Transportasi spesimen harus dilakukan sesegera mungkin atau maksimal 2 hari dengan menggunakan metode *cold chain* (*ice pack/ice gel*).
- Sebelum didekontaminasi, spesimen harus disimpan dalam pot dahak steril pada suhu 2-8°C.
- Spesimen yang sudah didekontaminasi tidak boleh digunakan lebih dari 4 hari.
- Setelah dilakukan dekontaminasi dan resuspensi pelet bakteri dengan *buffer* fosfat, spesimen dapat disimpan pada suhu -20°C atau -80°C, maksimal 5 hari sampai dilakukan ekstraksi DNA.

#### 2. Reagen LPA Lini Dua

##### a. Komponen Kit Ekstraksi DNA

Kit ekstraksi terdiri dari 2 komponen, yaitu:

- *Lysis Buffer* (A-LYS) mengandung <1% *nonionic tenside*, <0,2% NaOH, dan pewarna
- *Neutralization Buffer* (A-NB)

Kit ekstraksi harus disimpan pada suhu **2-8°C**.

##### b. Komponen Kit LPA Lini Dua

Kit LPA Lini Dua terdiri dari **Komponen Kit 1** yang digunakan dalam **hibridisasi** dan **Komponen Kit 2** yang digunakan dalam **amplifikasi**, yang mengandung bahan sebagai berikut:

###### 1) Komponen Kit 1 (simpan di 2-8°C)

- Strip membran dengan *probe* spesifik
- *Denaturation Solution* (DEN) mengandung <2% NaOH dan pewarna
- *Hybridization Buffer* (HYB) mengandung <10% *anionic tenside* dan pewarna
- *Stringent Wash Solution* (STR) mengandung >25% of a *quaternary ammonium compound*, <1% *anionic tenside*, dan pewarna

- *Rinse Solution* (RIN) mengandung *buffer*, <1% NaCl, dan <1% *nonionic tenside*
- *Conjugate Concentrate* (CON-C) mengandung streptavidin yang berkonjugasi dengan fosfatase alkali dan pewarna
- *Conjugate Buffer* (CON-D) mengandung *buffer*, 1% *blocking reagent*, dan <1% NaCl
- *Substrate Concentrate* (SUB-C) mengandung <70% dimethyl sulfoxide, <10% 4-nitro blue tetrazolium chloride, dan <10% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
- *Substrate Buffer* (SUB-D) mengandung *buffer*, <1% MgCl<sub>2</sub>, dan <1% NaCl

(Selain reagen, dalam Komponen Kit 1 juga terdapat *tray*, lembar interpretasi hasil, instruksi pengerjaan, dan kartu *template* untuk interpretasi hasil).

## 2) Komponen Kit 2 (simpan di **-20°C**)

- *Amplification Mix A* (AM-A GT) mengandung *buffer*, nukelotida, dan *Taq polymerase*
- *Amplification Mix B* (AM-B GT) mengandung *salts* (garam), primer spesifik, dan pewarna

Jangan menukar atau mencampur *Amplification Mixes* atau strip membran dari kit yang berbeda kecuali nomor lotnya identik.

### **Penyimpanan dan pembuangan kit:**

- Simpan kit ekstraksi DNA pada suhu 2-8°C.
- Simpan semua reagen dari Komponen Kit 1 pada suhu 2-8°C. Sebelum digunakan, ambil *buffer* HYB, STR, dan RIN seperlunya dan sisanya disimpan kembali pada suhu 2-8°C.
- Simpan reagen dari Komponen Kit 2 pada suhu -20°C dan jangan sampai terkontaminasi dengan DNA.
- Hindari pembekuan dan pencairan berulang dari AM-A dan AM-B.
- Jangan gunakan reagen di luar tanggal kadaluwarsa.
- Buang reagen dan limbah yang tidak terpakai sesuai SPO.

### **Petunjuk dalam penanganan unsur Komponen Kit:**

Dilakukan sesuai SPO; walaupun HYB dan SUB tidak diklasifikasikan sebagai bahan berbahaya.

## 3. Pengemasan, Pengiriman, dan Penerimaan Reagen LPA Lini Dua

### a. Pengemasan


Pengemasan kit LPA lini 2 membutuhkan suhu tertentu, yaitu suhu -20°C dan suhu 2-8°C.

- 1) Komponen kit 2 (kit amplifikasi) harus dikemas dengan suhu -20°C (mengggunakan *dry ice*).

Cara pengemasannya adalah sebagai berikut:

- Siapkan kotak *styrofoam* sesuai dengan ukuran kit yang akan dikirim.
  - Siapkan *dry ice* sesuai dengan kebutuhan.
  - Masukkan *dry ice* ke dalam *styrofoam* dan letakkan *dry ice* mengelilingi kit LPA (di bagian dasar, sisi samping kanan, sisi samping kiri, sisi depan, sisi belakang dan sisi atas kit)
  - Tutup rapat *styrofoam* dan rekatkan lakban di sekeliling tutupnya.
- 2) Kit ekstraksi dan komponen kit 1 (kit hibridisasi) harus dikemas dengan suhu 2-8°C (menggunakan *ice gel/ice pack*).

Cara pengemasannya adalah sebagai berikut:

- Siapkan kotak *styrofoam* sesuai dengan ukuran kit yang akan dikirim.
  - Siapkan *ice gel* sesuai dengan kebutuhan.
  - Masukkan *ice gel* ke dalam *styrofoam* dan letakkan *ice gel* mengelilingi kit LPA (di bagian dasar, sisi samping kanan, sisi samping kiri, sisi depan, sisi belakang dan sisi atas kit)
  - Tutup rapat *styrofoam* dan rekatkan lakban di sekeliling tutupnya.
- 3) Masukkan kotak *styrofoam* yang berisi komponen kit 1, kit ekstraksi, dan komponen kit 1 ke dalam kardus besar. Rekatkan tutup kardus dengan lakban.
- 4) Tempelkan alamat pengirim dan tujuan yang di bagian atas kardus.
- 5) Tempelkan label tanda arah panah (  ) sesuai arah atas kit dan tulisan JANGAN DIBALIK. Tempelkan label tersebut di bagian samping kanan dan kiri kardus.

#### b. Pengiriman

Pengiriman kit menggunakan jasa ekspedisi dan pastikan kit sampai di tempat tujuan pada saat jam kerja agar kit dapat langsung disimpan. Biaya pengiriman bisa diklaim ke Dinas Kesehatan Provinsi.

#### c. Penerimaan

Pada saat kit diterima, kit harus segera dibuka dan disimpan di suhu yang sesuai (Untuk suhu penyimpanan dapat dilihat pada BAB V.A.2).

## B. Analisis

### 1. Preparasi Spesimen

Spesimen dahak harus melalui proses dekontaminasi menggunakan metode NALC/NaOH yang mengacu pada Petunjuk Teknis Pemeriksaan Biakan dan Uji Kepekaan. Pemeriksaan LPA lini dua diawali dengan pemeriksaan mikroskopis BTA sebelum dilakukan proses dekontaminasi dan hasilnya dicatat di IKU (Indikator Kinerja Utama) Laboratorium LPA. Preparat mikroskopis BTA dan hasil dekontaminasi akan dimusnahkan jika dalam waktu 7 hari kalender, data dasar pasien RR yang akan dilakukan pemeriksaan LPA lini dua tidak terdaftar di SITB.

Setelah proses dekontaminasi, pelet harus disuspensikan kembali dengan buffer fosfat hingga 1,5-2 ml. Karena adanya kemungkinan spesimen yang tidak homogen, maka spesimen dekontaminasi harus dicampur sebelum dianalisis; jika tidak, sensitivitas tes mungkin akan terpengaruh. Resuspensi pelet tersebut dapat digunakan untuk pemeriksaan LPA serta biakan dan uji kepekaan masing-masing sebanyak 500  $\mu$ l, dan sisa pelet dapat disimpan pada suhu 2-8°C selama 7 hari. Biakan dapat dilakukan dengan menggunakan medium padat (misalnya Loewenstein-Jensen, Middlebrook) atau medium cair (misalnya MGIT).

## 2. Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA dilakukan dalam ruangan ekstraksi DNA dan dibagi menjadi **3 tahap**, yaitu: memisahkan sel dari media, melisiskan sel dalam kondisi basa pada suhu tinggi, dan netralisasi (prosedur ekstraksi DNA dapat dilihat pada Lampiran 2). DNA yang sudah diekstraksi dapat langsung digunakan atau disimpan pada suhu -20°C. Spesimen dahak dengan BTA positif atau negatif yang didekontaminasi dengan NALC-NaOH, biakan media padat (misalnya Lowenstein-Jensen, Middlebrook) atau media cair (misalnya MGIT) dapat digunakan sebagai bahan awal untuk ekstraksi DNA. Area kerja harus bebas dari kontaminasi DNA.

Kontrol yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah H37Rv sebagai kontrol positif dan ddH<sub>2</sub>O sebagai kontrol negatif. Prosedur ekstraksi DNA dapat dilihat pada Lampiran 2.

## 3. Pembuatan *Master Mix*, Penambahan Sampel DNA, dan Profil Amplifikasi

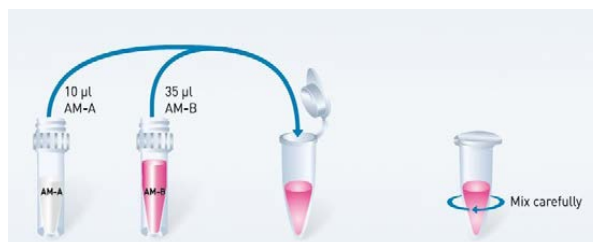
### a. Pembuatan *Master Mix*

Prosedur ini dilakukan dalam ruangan pembuatan *master mix*. Semua reagen yang dibutuhkan untuk amplifikasi seperti polimerase dan primer terdapat didalam campuran AM-A dan AM-B. Langkah pembuatan *master mix* adalah sebagai berikut:

- 1) Setelah dicairkan, *spin down* AM-A dan AM-B sebentar.
- 2) Satu sampel membutuhkan larutan *master mix* dengan campuran:
  - 10  $\mu$ l AM-A (lihat Kit Komponen 2)
  - 35  $\mu$ l AM-B (lihat Kit Komponen 2)
  - 5  $\mu$ l Larutan DNA

Volume akhir: 50  $\mu$ l

(Lakukan pencampuran di ruangan bebas kontaminasi DNA).



Gambar 5. Pembuatan *Master Mix*

- 3) Hitung kebutuhan total reagen sesuai dengan jumlah sampel. Sebaiknya **melebihi 4 master mix**: 1 untuk sampel **kontrol (+)**, 1 untuk **kontrol (-)**, 1 untuk **kontrol master mix**, dan 1 untuk **kontrol pipet error**. Hal tersebut dilakukan untuk mengurangi kekurangan pengambilan reagen dengan pipet.

**b. Penambahan Sampel DNA**

Prosedur ini dilakukan di ruang penambahan genom DNA. Langkah-langkah penambahan sampel DNA, yaitu:

- 1) Tambahkan 5 µl larutan DNA sampel ke dalam *master mix*.
- 2) Tambahkan 5 µl larutan DNA H37Rv (hasil ekstraksi pada tahapan sebelumnya) sebagai kontrol positif amplifikasi ke dalam *master mix*.
- 3) Gunakan kontrol negatif ekstraksi sebagai kontrol negatif dalam amplifikasi dengan cara menambahkan 5 µl larutan kontrol negatif ekstraksi ke dalam *master mix*.

(Tidak perlu menambahkan apapun ke dalam tabung berisi *master mix* yang diperuntukkan sebagai kontrol *master mix*).



Gambar 6. Penambahan Sampel DNA

**Catatan:**

- *Master mix* harus disiapkan setiap akan melakukan uji (kondisi *fresh*).
- **JANGAN** menggunakan *vortex* untuk mencampur larutan pada tahapan 3a dan 3b.

**c. Profil Amplifikasi**

Saat menggunakan **thermal cycler**, pilih protokol "**MDR DIR**" untuk spesimen klinis atau protokol "**MDR CUL**" untuk spesimen biakan. Pada alat yang tidak memiliki protokol "**MDR DIR**" dan "**MDR CUL**", *thermal cycler* dapat diatur sebagai berikut:

		<b>Spesimen Klinis</b>	<b>Spesimen Biakan</b>
15 menit	95°C	1 siklus	1 siklus
30 detik	95°C	20 siklus	10 siklus
2 menit	65°C		
25 detik	95°C	30 siklus	20 siklus
40 detik	50°C		
40 detik	70°C		
8 menit	70°C	1 siklus	1 siklus



Tingkat pemanasan	≤2,2 °C/detik	≤2,2 °C/detik
-------------------	---------------	---------------

Produk amplifikasi dapat disimpan pada suhu +8 sampai -20 °C

#### 4. Hibridisasi

Proses hibridisasi didahului dengan memanaskan *shaking water bath* manual atau otomatis sampai 45°C (penyimpangan maksimum yang dapat ditoleransi dari suhu target adalah ± 1°C).

**Catatan:** Pastikan suhu mencapai 45°C selama proses hibridisasi.

Jika reagen dan *buffer* disimpan dalam suhu dingin, sesuaikan dahulu suhunya dengan suhu kamar sebelum digunakan. Hangatkan larutan HYB dan STR sampai suhu 37-45°C sebelum digunakan. Reagen harus bebas dari presipitat (catatan: larutan CON-D tampak buram/*opaque*). Kocok perlahan jika perlu. Sebelum digunakan, adaptasikan seluruh reagen dan *buffer* dengan suhu kamar.

Campurkan 10 µl CON-C dengan 990 µl CON-D untuk masing-masing produk PCR (spesimen dan kontrol). Volume ini dapat digandakan sesuai dengan jumlah pengujian yang akan dilakukan. Larutan ini harus dibuat sesaat sebelum mengerjakan sampel (keadaan segar) dan biarkan pada suhu kamar. Lakukan hal yang sama pada larutan SUB-C dan SUB-D (10 µl SUB-C dicampur dengan 990 µl SUB-D). Larutan SUB-C stabil selama 4 minggu jika disimpan pada suhu kamar dan terlindungi dari cahaya. Perbandingan larutan CON-C, CON-D, SUB-C, dan SUB-D dapat dilihat pada Lampiran 3.

Langkah kerja hibridisasi sebagai berikut:

- 1) **Masukkan 20 µl Denaturation Solution (DEN, biru) di sudut masing-masing sumur yang digunakan.**
- 2) **Tambahkan 20 µl produk PCR, homogenkan dengan pipet** agar DEN dan DNA produk PCR tercampur dengan baik untuk memastikan bahwa seluruh DNA amplicon mengalami denaturasi dan menjadi untai tunggal. **Satu sumur menggunakan satu tip berfilter.** Kemudian inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Sementara itu, ambil strip dari tabung menggunakan pinset dan tandai dengan *special marker pen* di bawah penanda yang berwarna. Selalu kenakan sarung tangan saat menangani strip.
- 3) **Tambahkan 1 ml HYB** ke masing-masing sumur dengan hati-hati. **Goyangkan tray dengan kecepatan 300 rpm sampai warna larutan homogen.** Berhati-hatilah untuk tidak menumpahkan larutan ke sumur disebelahnya.
- 4) **Letakkan strip di masing-masing sumur menggunakan pinset. Pinset jangan menyentuh cairan di dalam sumur.**

Strip harus benar-benar terendam dalam larutan dan berada di dasar sumur, serta sisi yang memiliki penanda berwarna harus menghadap ke atas. Bila posisi strip terbalik, kembalikan ke posisi semula dengan pinset atau dengan ujung tip mikropipet. **Bersihkan pinset dengan hipoklorit**

**1% dilanjutkan dengan alkohol 70% setiap akan digunakan untuk menghindari kontaminasi.** Ini juga berlaku untuk semua langkah berikut.

- 5) **Tempatkan tray** pada *shaking water bath* dan **inkubasi selama 30 menit pada suhu 45°C.**

Sesuaikan frekuensi getaran pada *shaking water bath* agar pencampuran larutan konstan dan rata. Untuk memungkinkan perpindahan panas yang adekuat, *tray* harus dicelupkan ke dalam air sampai setinggi 1/3 dari ketinggianannya.

- 6) **Aspirat HYB** menggunakan mikropipet dan tip 1000 µl steril.
- 7) **Tambahkan 1 ml STR** ke masing-masing strip **lalu inkubasi selama 15 menit pada suhu 45°C** dalam *shaking water bath* atau alat hibridisasi LPA.

(Tahapan berikutnya dikerjakan pada suhu kamar).

- 8) **Aspirat larutan STR.**

Larutan STR dibuang ke dalam wadah limbah dengan menggunakan mikropipet dan tip 1000 µl.

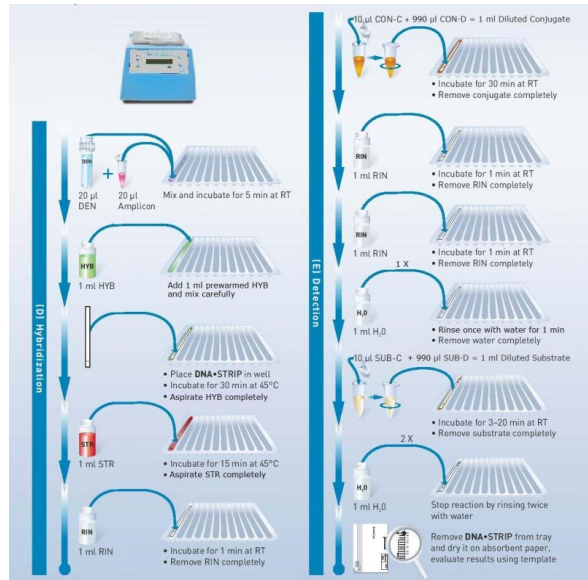
**Cuci masing-masing strip 1 kali dengan 1 ml Rinse Solution (RIN) selama 1 menit pada water bath** atau alat hibridisasi LPA. **Buang RIN setelah inkubasi** menggunakan mikropipet dan tip 1000 µl.

- 9) **Tambahkan 1 ml larutan konjugat CON-C dan CON-D yang sudah dicampur** pada masing-masing strip **dan inkubasi selama 30 menit** pada *water bath* atau alat hibridisasi LPA. **Buang larutan** menggunakan mikropipet dan tip 1000 µl.
- 10) **Cuci masing-masing strip dua kali dengan RIN selama 1 menit, buang semua cairan** yang tersisa dengan cara membalik *tray* dan tiriskan perlahan dengan cara diketuk-ketuk pada kertas saring.
- 11) **Cuci masing-masing strip dengan 1 ml aquabides selama 1 menit, buang semua cairan** yang tersisa dengan cara membalik *tray* dan tiriskan perlahan dengan cara diketuk-ketuk pada kertas saring.
- 12) **Tambahkan 1 ml larutan substrat SUB-C dan SUB-D yang sudah dicampur** pada masing-masing strip **dan inkubasi di area yang terlindungi dari cahaya tanpa digoyangkan.** Bergantung pada kondisi saat pengujian (misalnya suhu kamaran), waktu inkubasi substrat (waktu sampai pita terlihat jelas), dapat bervariasi antara **3-20 menit**. Masa inkubasi substrat yang terlalu lama dapat menyebabkan hasil positif palsu & meningkatkan warna pada latar belakang yang dapat mengganggu interpretasi hasil.
- 13) **Hentikan reaksi segera setelah garis terlihat jelas dengan membilasnya sebanyak dua kali menggunakan akuabides selama 1 menit.** Buang semua cairan yang tersisa dengan cara membalik *tray* dan tiriskan perlahan dengan cara diketuk-ketuk pada kertas saring.
- 14) **Dengan pinset, ambil strip dari tray dan tiriskan, lalu tempelkan pada lembar interpretasi hasil menggunakan transparant/magic tape (selotip bening).**

**Catatan:**

Kontrol yang digunakan saat hibridisasi adalah kontrol positif, kontrol negatif, dan kontrol *master mix*.

Tahapan hibridisasi dalam pemeriksaan LPA lini dua dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Gambar 7. Tahapan Hibridisasi LPA Lini Dua

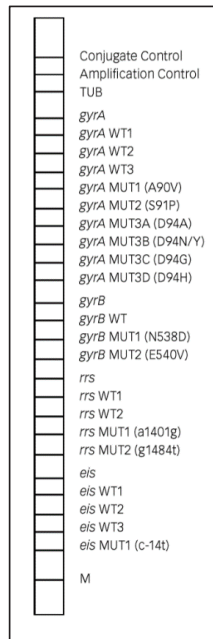
## C. Pasca-Analisis

### 1. Evaluasi dan Interpretasi Hasil

#### a. Zona Reaksi pada Strip LPA Lini Dua

Tempelkan strip pada lembar interpretasi hasil (Lampiran 4) dan hindarkan dari cahaya. Tempel strip yang telah dipreparasi pada bidang yang ditunjuk dengan menyelaraskan pita CC dan AC dengan masing-masing garis pada lembar interpretasi hasil. Karena alasan teknis, jarak antara *probe* tunggal pada strip mungkin sedikit berbeda. Untuk evaluasi yang akurat, gunakan pola (*template*) yang tersedia dalam kit dan selaraskan dengan masing-masing pita Kontrol Lokus. Tentukan hasil interpretasi dan catat di masing-masing kolom.

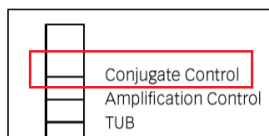
Setiap strip memiliki total 27 zona reaksi (lihat gambar 8) yang terdiri dari:



Gambar 8. Zona Reaksi Strip LPA Lini Dua

**1) Kontrol Konjugat (Conjugate Control/CC)**

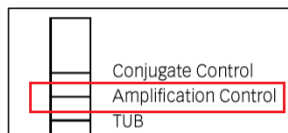
Harus muncul pita pada zona ini, yang menunjukkan efisiensi dari ikatan konjugat dan reaksi substrat.



Gambar 9. Kontrol Konjugat (CC)

**2) Kontrol Amplifikasi (Amplification Control / AC)**

Bila amplifikasi dilakukan dengan benar, amplikon kontrol akan berikatan dengan zona Kontrol Amplifikasi.



Gambar 10. Kontrol Amplifikasi

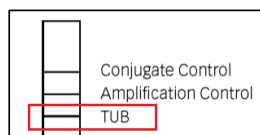
Pita dari AC bisa saja samar atau bahkan hilang sama sekali. Hal ini sering terjadi pada pemeriksaan tidak langsung (menggunakan isolat klinis/kultur) dan jarang terjadi pada pemeriksaan langsung (menggunakan sampel klinis/sputum).

Dalam kasus tersebut berlaku ketentuan:

- Pada hasil “Terdeteksi MTB” (pita TUB muncul) maka hasil tersebut **valid**. Hal ini dimungkinkan karena adanya kompetisi reaksi tunggal selama amplifikasi. Kompetisi reaksi tunggal selama proses amplifikasi berlangsung dapat menyebabkan pita kontrol amplifikasi hilang. Dalam kasus ini, pemeriksaan telah dilakukan dengan benar dan tidak perlu dilakukan pengulangan.
- Pada hasil “Tidak terdeteksi MTB” (pita TUB tidak muncul), pita CC dan AC **HARUS** selalu muncul.
- Tidak munculnya pita AC pada hasil “Tidak terdeteksi MTB” mengindikasikan bahwa selama proses reaksi amplifikasi terjadi kesalahan atau terdapat inhibitor. Pada kasus ini, hasil tersebut dilaporkan sebagai “**Invalid**” dan harus dilakukan pengulangan.

### 3) *M. tuberculosis complex (TUB)*

Zona ini berhibridisasi dengan amplikon yang dihasilkan dari semua anggota *M. tuberculosis* kompleks. Jika TUB negatif, maka spesimen yang diuji tidak mengandung bakteri *M. tuberculosis* kompleks.



Gambar 11. Pita MTB (TUB) pada *Strip* LPA Lini Dua

- Jika muncul pita TUB, CC, dan AC maka hasilnya “**Terdeteksi MTB**”.
- Jika pita TUB tidak muncul, sementara pita CC dan AC muncul maka hasilnya “**Tidak terdeteksi MTB**”.
- Pada beberapa kondisi, dapat muncul hasil **Invalid** (lihat pada Tabel 2). Hasil Invalid perlu dilakukan pengulangan (maksimal satu kali), dan ketentuan pengulangan dapat dilihat pada BAB II.B.3 dan BAB V.C.2

Tabel 2. Ringkasan Hasil Interpretasi LPA Lini Dua

No.	CC	AC	TUB	Lokus	Interpretasi
1	+	+/-	+	+	Valid, Terdeteksi MTB
2	-	-	+	+/-	Invalid*
3	+	-	-	+/-	Invalid *
4	-	+	-	+/-	Invalid*
5	-	-	-	+	Invalid*
6	+	+	-	+/-	Valid, Tidak terdeteksi MTB

Keterangan:

\*) Perlu dilakukan pengulangan pemeriksaan LPA lini dua

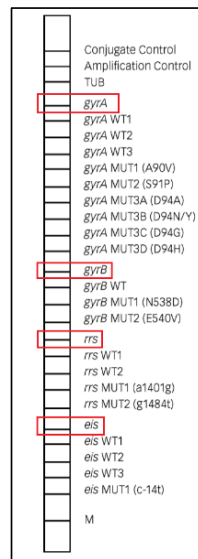
**4) Kontrol Lokus (*Locus Controls* / *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*)**

Zona Kontrol Lokus mendeteksi daerah gen yang spesifik untuk masing-masing lokus:

- *gyrA* dan *gyrB* untuk OAT fluorokuinolon (Levofloksasin dan Moksifloksasin)
- *rrs* dan *eis* untuk OAT injeksi lini kedua (Kanamisin, Amikasin, dan Kapreomisin)

Jika pita kontrol lokus tidak muncul, maka hasilnya dinyatakan **“Indeterminate”** untuk kelompok obat yang sesuai dengan lokus kontrol tersebut. Misalnya: pita *gyrA* tidak muncul maka resistansi terhadap OAT fluorokuinolon dinyatakan Indeterminate.

Pada kasus yang hasilnya Indeterminate, pemeriksaan LPA harus diulang. Jika setelah diulang masih ada hasil yang Indeterminate, laporkan hasil tersebut sebagai Indeterminate (untuk kelompok obat yang lokus kontrolnya tidak muncul) dan laporkan hasil yang dapat diinterpretasikan (dari kelompok obat yang lokus kontrolnya muncul).



Gambar 12. Kontrol Lokus

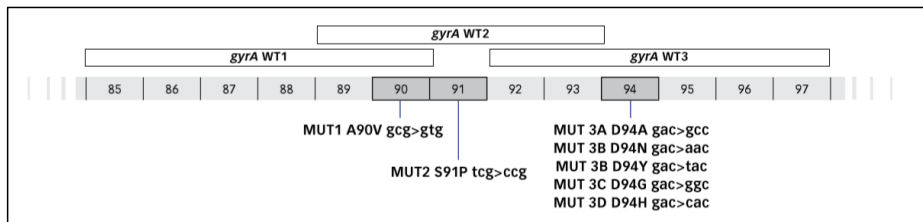
Masing-masing gen *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, dan *eis* terdiri dari zona reaksi WT (*wild type*) dan MUT (*mutation/mutasi*). Zona reaksi WT terdiri dari daerah genom dengan resistansi yang telah diketahui. Zona reaksi MUT berhubungan dengan probe yang mengidentifikasi resistansi paling umum dari gen yang diperiksa.

Penentuan resistansi didasarkan pada hal-hal berikut:

- Jika semua pita WT muncul dan tidak ada pita MUT yang muncul, maka hasil LPA dinyatakan **“Tidak Terdeteksi Resistan”** (*Resistance not Detected*)
- Jika pita WT ada yang tidak muncul dan tidak ada pita MUT yang muncul, maka hasil LPA dinyatakan **“Resistensi Inferred”** (*Resistance Inferred*).
- Jika pita MUT muncul, maka hasil LPA dinyatakan **“Terdeteksi Resistan”** (*Resistance Detected*).

### **Interpretasi LPA Lini Dua pada Fluorokuinolon (FLQ)**

*gyrA* yang ditemukan pada LPA lini dua menentukan resistansi FLQ (*Quinolone-resistance determining region/QRDR*). Daerah penentuan resistansi kuinolon (QRDR) dari gen *gyrA*, kodon ini dapat diketahui oleh *probe* WT dan terjadinya mutasi spesifik (baik asam amino dan perubahan nukleotida) diketahui melalui *probe* MUT pada LPA lini dua.



Gambar 13. Lokus *gyrA* untuk Resistansi FLQ

Secara lebih detail interpretasi LPA lini dua pada golongan FLQ dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 3. Interpretasi LPA Lini Dua pada FLQ

Regio Target	Probe LPA lini dua	Mutasi atau Regio Mutasi	Interpretasi Hasil	Tambahan Tindakan Diagnostik <sup>a</sup>	Implikasi Klinis
<i>gyrA</i> WT1	<i>gyrA</i> WT1 tidak muncul	kodon 85-89	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistensi Lfx <b>Inferred</b> (diduga kuat)</li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan resistansi Mfx dosis rendah <b>Inferred</b></li> </ul>	<p><b>Rekomendasi:</b> Melakukan uji kepekaan untuk Mfx pada tingkat CB untuk meniadakan resistansi</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lfx <b>tidak</b> efektif</li> <li>Mfx dosis tinggi <b>dapat</b> digunakan. Regimen harus dievaluasi berdasarkan hasil uji kepekaan pada tingkat <i>clinical breakpoint</i>/CB</li> </ul> <p><b>Catatan:</b> rekomendasi ini tidak perlu dilakukan jika pemeriksaan sekuesing tersedia sebelum dilakukan iniasi pengobatan, adanya identifikasi mutasi tidak berasosiasi dengan resistansi FLQ, atau jika fenotipik uji kepekaan menunjukkan sensitivitas pada CC.</p>
<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> MUT 1 muncul	A90V	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistensi Lfx <b>terdeteksi</b></li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan resistansi Mfx level rendah <b>terdeteksi</b></li> </ul>	<p><b>Rekomendasi:</b> melakukan uji kepekaan fenotip Mfx pada tingkat CB untuk meniadakan resistansi.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lfx <b>tidak</b> efektif.</li> <li>Mfx dosis tinggi <b>dapat</b> digunakan. Regimen harus dievaluasi kembali berdasarkan hasil uji kepekaan pada tingkat CB.</li> </ul>



Regio Target	Probe LPA lini dua	Mutasi atau Regio Mutasi	Interpretasi Hasil	Tambahkan Tindakan Diagnostik <sup>a</sup>	Implikasi Klinis
	<i>gyrA</i> MUT2 muncul	S91P	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistansi Lfx <b>terdeteksi</b></li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan resistansi Mfx level rendah <b>terdeteksi</b></li> </ul>	<p><b>Rekomendasi:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>melakukan uji kepekaan fenotip Mfx pada tingkat CB untuk meniadakan resistensi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lfx <b>tidak</b> efektif.</li> <li>Mfx dosis tinggi <b>dapat</b> digunakan. Regimen harus dievaluasi kembali berdasarkan hasil uji kepekaan pada tingkat CB.</li> </ul>
	<i>gyrA</i> WT2, MUT1 dan MUT2 tidak muncul	kodon 89-93	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistansi Lfx <b>Inferred</b> (diduga kuat)</li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan Mfx level rendah <b>Inferred</b></li> </ul>	<p><b>Rekomendasi:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Melakukan uji kepekaan untuk Mfx pada tingkat CB untuk meniadakan resistansi</li> </ul> <p><b>Opsional:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>melakukan sekuensing <i>gyrA</i> QRDR untuk mengidentifikasi mutasi yang spesifik</li> <li>melakukan uji kepekaan Lfx dan Mfx pada CC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lfx <b>tidak</b> efektif.</li> <li>Mfx dosis tinggi <b>dapat</b> digunakan. Regimen harus dievaluasi kembali berdasarkan hasil uji kepekaan pada tingkat CB.</li> </ul> <p><b>Catatan:</b></p> <p>rekomendasi ini tidak perlu dilakukan jika pemeriksaan sekuensing tersedia sebelum dilakukan iniasi pengobatan, adanya identifikasi mutasi tidak berasosiasi dengan resistansi FLQ, atau jika fenotipik uji kepekaan menunjukkan sensitivitas pada CC.</p>

Regio Target	Probe LPA lini dua	Mutasi atau Regio Mutasi	Interpretasi Hasil	Tambahkan Tindakan Diagnostik <sup>a</sup>	Implikasi Klinis
	<i>gyrA</i> MUT3A muncul	D94A	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistansi Lfx <b>terdeteksi</b></li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan Mfx level rendah <b>terdeteksi</b></li> </ul>	<p><b>Rekomendasi:</b> melakukan uji kepekaan fenotip Mfx pada tingkat CB untuk meniadakan resistansi.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lfx <b>tidak</b> efektif.</li> <li>Mfx dosis tinggi <b>dapat</b> digunakan. Regimen harus dievaluasi kembali berdasarkan hasil uji kepekaan pada tingkat CB.</li> </ul>
<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT3B muncul	D94N atau D94Y	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistansi Lfx <b>terdeteksi</b></li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan Mfx level tinggi <b>terdeteksi</b></li> </ul>	Tidak diperlukan diagnosa tambahan.	Lfx dan Mfx <b>tidak</b> efektif.
	<i>gyrA</i> MUT3C muncul	D94G	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistansi Lfx <b>terdeteksi</b></li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan Mfx level tinggi <b>terdeteksi</b></li> </ul>	Tidak diperlukan diagnosa tambahan.	Lfx dan Mfx <b>tidak</b> efektif.

Regio Target	Probe LPA lini dua	Mutasi atau Regio Mutasi	Interpretasi Hasil	Tambahkan Tindakan Diagnostik <sup>a</sup>	Implikasi Klinis
grrA WT3	grrA MUT3D muncul	D94H	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistensi Lfx <b>terdeteksi</b></li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan peningkatan konsentrasi tinggi pada MIC untuk Mfx <b>terdeteksi</b></li> </ul>	Tidak diperlukan diagnosa tambahan.	Lfx dan Mfx <b>tidak</b> efektif.
grrA WT3	grrA WT3, MUT3A, MUT3B MUT 3C, MUT 3D tidak muncul	codon 92-96	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistensi Lfx <b>Inferred</b> (diduga kuat)</li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan Mfx level rendah <b>Inferred</b></li> </ul>	<p><b>Rekomendasi:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>melakukan uji kepekaan fenotip Mfx pada tingkat CB untuk meniadakan resistansi.</li> </ul> <p><b>Opsional:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>melakukan sekuensing grrA QRDR untuk mengidentifikasi mutasi yang spesifik</li> <li>melakukan uji kepekaan Lfx dan Mfx pada CC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lfx <b>tidak</b> efektif.</li> <li>Mfx dosis tinggi <b>dapat</b> digunakan. Regimen harus dievaluasi kembali berdasarkan hasil uji kepekaan pada tingkat CB.</li> </ul> <p><b>Catatan:</b></p> <p>rekomendasi ini tidak perlu dilakukan jika pemeriksaan sekuensing tersedia sebelum dilakukan iniasi pengobatan, adanya identifikasi mutasi tidak berasosiasi dengan resistansi FLQ, atau jika fenotipik uji kepekaan menunjukkan sensitivitas pada CC.</p>

Regio Target	Probe LPA lini dua	Mutasi atau Regio Mutasi	Interpretasi Hasil	Tambahkan Tindakan Diagnostik <sup>a</sup>	Implikasi Klinis
gyrB WT	gyrB MUT1 muncul	N538D codon 499 <sup>b</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistensi Lfx <b>terdeteksi</b></li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan Mfx level rendah <b>terdeteksi</b></li> </ul>	<p><b>Rekomendasi:</b> melakukan uji kepekaan fenotip Mfx pada tingkat CB untuk meniadakan resistansi.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lfx <b>tidak</b> efektif.</li> <li>Mfx dosis tinggi <b>dapat</b> digunakan. Regimen harus dievaluasi kembali berdasarkan hasil uji kepekaan pada tingkat CB.</li> </ul>
	gyrB MUT2 muncul	E540V codon 501 <sup>b</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistensi Lfx <b>terdeteksi</b></li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan Mfx level rendah <b>terdeteksi</b></li> </ul>	<p><b>Rekomendasi:</b> melakukan uji kepekaan Mfx pada tingkat CB untuk meniadakan resistansi.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lfx <b>tidak</b> efektif.</li> <li>Mfx dosis tinggi <b>dapat</b> digunakan. Regimen harus dievaluasi kembali berdasarkan hasil uji kepekaan pada tingkat CB.</li> </ul>

Regio Target	Probe LPA lini dua	Mutasi atau Regio Mutasi	Interpretasi Hasil	Tambahkan Tindakan Diagnostik <sup>a</sup>	Implikasi Klinis
	gyrB WT, MUT1 dan MUT2 tidak muncul	codon 536-541 (codon 497-502) <sup>b</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistensi Lfx <b>Inferred</b> (diduga kuat)</li> <li>Mutasi yang dihubungkan dengan Mfx level rendah <b>Inferred</b></li> </ul>	<p><b>Rekomendasi:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>melakukan uji kepekaan Mfx pada tingkat CB untuk meniadakan resistansi.</li> </ul> <p><b>Opsional:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>melakukan sekuensing <i>gyrA</i> QRDR untuk mengidentifikasi mutasi yang spesifik</li> <li>melakukan uji kepekaan Lfx dan Mfx pada CC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lfx <b>tidak</b> efektif.</li> <li>Mfx dosis tinggi <b>dapat</b> digunakan. Regimen harus dievaluasi kembali berdasarkan hasil uji kepekaan pada tingkat CB.</li> </ul> <p><b>Catatan:</b></p> <p>rekomendasi ini tidak perlu dilakukan jika pemeriksaan sekuensing tersedia sebelum dilakukan iniasi pengobatan, adanya identifikasi mutasi tidak berasosiasi dengan resistansi FLQ, atau jika fenotipik uji kepekaan menunjukkan sensitivitas pada CC.</p>

**Interpretasi LPA Lini Dua terhadap Obat Injeksi Lini Kedua**

Tabel 4. Interpretasi LPA Lini Dua pada Obat Injeksi Lini Kedua

Regio Target	Probe LPA lini dua	Mutasi atau Regio Mutasi	Hasil Interpretasi Kanamisin (Km)	Hasil Interpretasi Amikasin (Amk)	Hasil Interpretasi Kapreomisin (Cm)	Tambahan Tindakan Diagnostik <sup>a</sup>	Implikasi Klinis
rrs <i>WT1</i>	rrs <i>MUT1</i> muncul	a1401g	Resistansi Km <b>terdeteksi</b>	Resistansi Amk <b>terdeteksi</b>	Resistansi Cm <b>terdeteksi</b>	Tidak diperlukan diagnosa tambahan.	Km, Amk, Cm <b>tidak</b> efektif.
	rrs <i>WT1</i> and <i>MUT1</i> <b>tidak</b> muncul	1400 regio	Resistansi Km <b>Inferred</b> (diduga kuat)	Resistansi Amk <b>Inferred</b> (diduga kuat)	Resistansi Cm <b>Inferred</b> (diduga kuat)	<p><b>Rekomendasi:</b> Lakukan ulang pemeriksaan LPA lini dua dan jika didapatkan hasil yang sama, maka lakukan pemeriksaan uji kepekaan untuk Amk, Km, Cm.</p> <p><b>Opsional:</b> Lakukan sekvensing untuk mengidentifikasi mutasi spesifik</p>	<p>Km, Cm <b>kemungkinan tidak</b> efektif.</p> <p>Hasil uji kepekaan dapat menjadi rujukan untuk penggunaan Amikasin dalam regimen pengobatan.</p>

Regio Target	Probe LPA lini dua	Mutasi atau Regio Mutasi	Hasil Interpretasi Kanamisin (Km)	Hasil Interpretasi Amikasin (Amk)	Hasil Interpretasi Kapreomisin (Cm)	Tambahan Tindakan Diagnostik <sup>a</sup>	Implikasi Klinis
rrs WT2	rrs MUT2 muncul	g1484t	Resistansi Km <b>terdeteksi</b>	Resistansi Amk <b>terdeteksi</b>	Resistansi Cm <b>terdeteksi</b>	Tidak diperlukan diagnosa tambahan.	Km, Amk, Cm <b>tidak</b> efektif.
	rrs WT2 and MUT2 <b>tidak muncul</b>	Mutasi terjadi pada regio 1484	Resistansi Km <b>Inferred</b> (diduga kuat)	Resistansi Amk <b>Inferred</b> (diduga kuat)	Resistansi Cm <b>Inferred</b> (diduga kuat)	<b>Rekomendasi:</b> Lakukan ulang pemeriksaan LPA lini dua dan jika didapatkan hasil yang sama, maka lakukan pemeriksaan uji kepekaan untuk Amk, Km, Cm.  <b>Opsional:</b> Lakukan sekuensing untuk mengidentifikasi mutasi spesifik	Km, Amk, Cm <b>kemungkinan tidak</b> efektif.
eis WT1	eis WT1 tidak muncul	Mutasi terjadi pada -37 region	Resistansi Km <b>Inferred</b> (diduga kuat)	Resistansi Amk <b>tidak terdeteksi</b> ,	Resistansi Cm <b>tidak terdeteksi</b> .	<b>Opsional:</b> Lakukan sekuensing untuk mengidentifikasi mutasi spesifik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Km <b>tidak</b> efektif.</li> <li>• Amk, Cm kemungkinan efektif.</li> </ul>

Regio Target	Probe LPA lini dua	Mutasi atau Regio Mutasi	Hasil Interpretasi Kanamisin (Km)	Hasil Interpretasi Amikasin (Amk)	Hasil Interpretasi Kapreomisin (Cm)	Tambahan Tindakan Diagnostik <sup>a</sup>	Implikasi Klinis
eis WT2	eis MUT1 muncul	c-14t	Resistansi Km <b>terdeteksi</b> .	Resistansi Amk tidak <b>terdeteksi</b> .	Resistansi Cm tidak <b>terdeteksi</b> .	<b>Opsional:</b> Lakukan sekuensing untuk mengidentifikasi mutasi spesifik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Km <b>tidak</b> efektif.</li> <li>• Amk, Cm kemungkinan efektif.</li> </ul>
	eis WT2 dan MUT1 tidak muncul	Mutasi terjadi pada -10 to -15 region	Resistansi Km <b>Inferred</b> (diduga kuat)	Resistansi Amk <b>tidak terdeteksi</b>	Resistansi Cm <b>tidak terdeteksi</b>	<b>Opsional:</b> Lakukan sekuensing untuk mengidentifikasi mutasi spesifik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Km kemungkinan <b>tidak</b> efektif.</li> <li>• Amk, Cm kemungkinan efektif.</li> </ul>
eis WT3	eis WT3 tidak muncul	Mutasi terjadi pada -2 region <b>Ctt.</b> Tidak ada bukti mutasi yang terjadi pada regio ini berhubungan dengan resistan (1)	Resistansi Km <b>tidak terdeteksi</b>	Resistansi Amk <b>tidak terdeteksi</b>	Resistansi Cm <b>tidak terdeteksi</b> .	<b>Opsional:</b> Lakukan sekuensing untuk mengidentifikasi mutasi spesifik	Km, Amk, Cm kemungkinan efektif.



b. Interpretasi Hasil secara Manual

Strip hasil pemeriksaan LPA lini dua ditempel pada form interpretasi hasil. Jika ada pita yang muncul pada strip, maka pada kolom gen dituliskan "+", dan jika sebaliknya dituliskan "-".

Berikut adalah ketentuan penulisan untuk kolom invalid, MTB, dan resistansi OAT:

- Jika hasil Invalid, beri tanda centang (✓) pada kolom Invalid
- Pada kolom MTB, hasil terdeteksi MTB ditulis dengan **D** sedangkan tidak terdeteksi MTB ditulis dengan **ND**
- Pada kolom OAT, hasil terdeteksi resistan ditulis dengan **RD** sedangkan tidak terdeteksi resistan ditulis dengan **RND**. Hasil resistan inferred ditulis dengan **RI** dan hasil indeterminate ditulis dengan **IDT**.

**Catatan:**

Hasil RD ditulis dengan tinta **MERAH**.

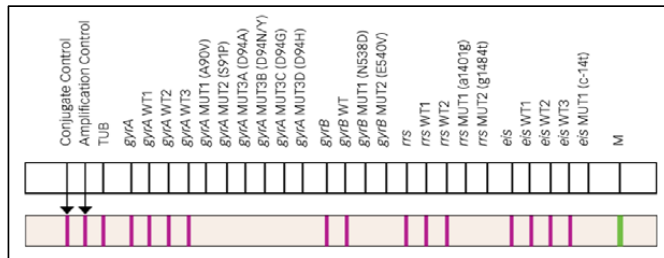
Contoh interpretasi LPA Lini Dua dapat dilihat pada Gambar 14.

	Gen																										Resistensi																
	CC	AC	IIR	99A	99A WT1	99A WT2	99A WT3	99A MUT1	99A MUT2	99A MUT3	99A MUT4	99A MUT5	99A MUT6	99A MUT7	99A MUT8	99A MUT9	99A MUT10	99A MUT11	99A MUT12	99A MUT13	99A MUT14	99A MUT15	99A MUT16	99A MUT17	99A MUT18	99A MUT19	99A MUT20	99A MUT21	99A MUT22	99A MUT23	99A MUT24	99A MUT25	99A MUT26	Invalid	MTB	Lfx	Mfx	Mfx DT	Km	Amik	Cn		
1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	D	RND	RND	RND	RND	RND	RND	RND	
2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	D	RD	RD	RD	RND	RND	RND	RND
3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	D	RI	RI		RND	RND	RND	RND
4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	D	IDT	IDT	IDT	RND	RND	RND	RND
5	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓									

Gambar 14. Contoh Interpretasi LPA Lini Dua

**KASUS 1:**

Tidak ada mutasi yang terdeteksi atau inferred di daerah genomik.  
Semua pita WT muncul dan tidak ada pita MUT yang muncul.



Hasil Genotipik:

Tidak terdeteksi resistansi

Tindakan Diagnosa Tambahan:

Opsional:

- Melakukan uji kepekaan untuk Lfx pada CC (misalnya CC: 1.0 mg/L dalam MGIT dan 7H10) dan/atau untuk Mfx di CC dan CB (misalnya CC: 0.25 mg/L dalam MGIT dan 0.5 mg/L pada 7H10; CB 1.0 mg/L dalam MGIT dan 2.0 mg/L pada 7H10).
- Melakukan uji kepekaan untuk OAT injeksi lini kedua.

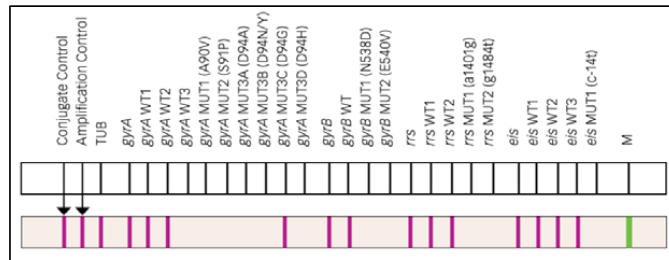
Keputusan untuk melakukan tindakan ini harus dipandu oleh pertimbangan pada kelompok risiko pasien individual untuk resistansi (misalnya paparan sebelumnya terhadap OAT lini kedua, kecurigaan adanya kegagalan pengobatan), dan oleh prevalensi resistansi dalam pengaturan geografis tertentu, karena ini faktor-faktor mempengaruhi nilai predeksi tes.

Implikasi Klinis:

Memulai pengobatan MDR. Meninjau regimen pengobatan berdasarkan hasil uji kepekaan.

**KASUS 2:**

Deteksi mutasi yang dihubungkan dengan resistansi Moksifloksasin dosis tinggi



Jika salah satu pita MUT berikut muncul:

- *gyrA* MUT3C (*gyrA* D94G ) (lihat gambar di atas sebagai contoh)
- *gyrA* MUT3D (*gyrA* D94H )
- *gyrA* MUT3B (*gyrA* D94N/Y)

Hasil Genotipik:

Levofloksasin : Resistansi terdeteksi

Moksifloksasin : Mutasi yang dihubungkan dengan resistansi Mfx dosis tinggi terdeteksi

Tindakan Diagnosa Tambahan:

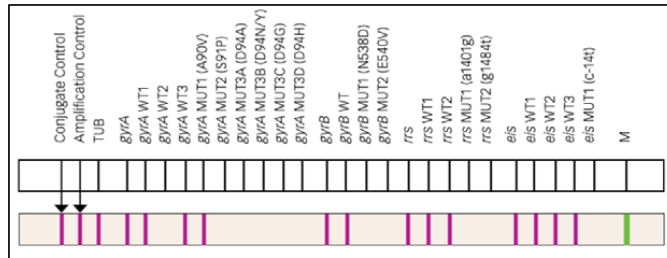
Opsional: melakukan uji kepekaan terhadap OAT injeksi lini kedua.

Implikasi Klinis:

Mfx pada dosis tinggi tidak dapat di pertimbangkan sebagai obat yang efektif.

**KASUS 3:**

Deteksi mutasi yang dihubungkan dengan resistansi Moksifloksasin dosis rendah



Jika salah satu pita MUT berikut tidak muncul :

- *gyrA* MUT1 (*gyrA* A90V) (lihat gambar di atas sebagai contoh)
- *gyrA* MUT2 (*gyrA* S91P)
- *gyrA* MUT3A (*gyrA* D94A)
- *gyrB* MUT1 (*gyrB* N538D)
- *gyrB* MUT2 (*gyrB* E540D)

Hasil Genotipik:

Levofloksasin : Resistansi terdeteksi

Moksifloksasin : Mutasi yang dihubungkan dengan resistansi Mfx dosis rendah terdeteksi

Tindakan Diagnosa Tambahan:

Rekomendasi : melakukan uji kepekaan terhadap Mfx pada CB berdasarkan kasus 1

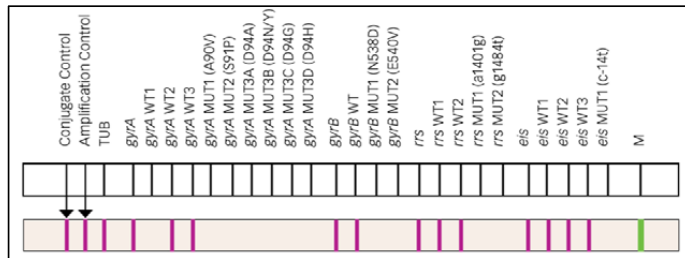
Opsional : melakukan uji kepekaan terhadap OAT injeksi lini kedua

Implikasi Klinis:

Mfx dosis tinggi dapat digunakan. Regimen dapat dievaluasi ulang berdasarkan hasil uji kepekaan pada CB.

**KASUS 4:**

Tidak di ketahui mutasi yang tepat, hanya inferred di daerah FLQ (yaitu *gyrA* dan *gyrB*)



Jika salah satu pita WT berikut tidak muncul :

- *gyrA* WT1 (lihat gambar di atas sebagai contoh)
- *gyrA* WT2
- *gyrA* WT3
- *gyrB* WT

dan tidak ada pita MUT yang muncul pada daerah *gyrA* dan *gyrB*.

Hasil Genotipik:

Levofloksasin : Resistan inferred

Moksifloksasin : Mutasi yang dihubungkan dengan resistansi Mfx dosis rendah inferred

Tindakan Diagnosa Tambahan:

Rekomendasi : melakukan uji kepekaan terhadap Mfx pada CB berdasarkan kasus 1

Opsional tapi direkomendasikan pada beberapa aturan:

Sekuensing *gyrA* dan *gyrB* QRDR untuk mengidentifikasi mutasi resistansi dan mengecualikan mutasi identik/tidak identik yang tidak menyebabkan resistansi (menghasilkan positif palsu) (interpretasi berdasarkan kasus 2-4 dan ikuti rekomendasi untuk uji kepekaan)

Jika sekuensing tidak tersedia, dilakukan uji kepekaan pada CC untuk Lfx dan/atau Mfx sesuai dengan kasus 1.

Opsional : melakukan uji kepekaan terhadap OAT injeksi lini kedua

Implikasi Klinis:

Levofloksasin tidak efektif.

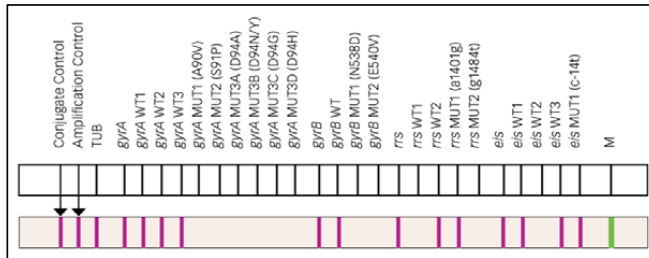
Mfx dosis tinggi dapat digunakan. Regimen dapat dievaluasi ulang berdasarkan hasil uji kepekaan pada CB.

**Catatan:**

Rekomendasi ini tidak digunakan jika sekuensing tersedia sebelum inisiasi pengobatan, identifikasi mutasi yang tidak berhubungan dengan resistansi FLQ atau jika uji kepekaan menunjukkan kerentanan pada CC.

**KASUS 5:**

Deteksi mutasi yang menyebabkan resistensi terhadap OAT injeksi lini kedua.



Jika salah satu dari pita MUT berikut ini muncul:

- *rrs* MUT1 (*rrs* a1401g) (lihat gambar di atas sebagai contoh)
- *rrs* MUT2 (*rrs* g1484t)
- *eis* MUT1 (*eis* c-14t)

Hasil Genotipik:

Jika mutasi hanya terjadi pada *rrs* atau terjadi pada *rrs* dan *eis*:

- Amikasin : Terdeteksi resistan
- Kanamisin : Terdeteksi resistan
- Kapreomisin : Terdeteksi resistan

Jika mutasi hanya terjadi pada *eis* c-14t :

- Amikasin : Tidak terdeteksi resistan
- Kanamisin : Terdeteksi resistan
- Kapreomisin : Tidak terdeteksi resistan

Tindakan Diagnosa Tambahan:

Opsional : melakukan uji kepekaan terhadap FLQ sesuai dengan kasus 1.

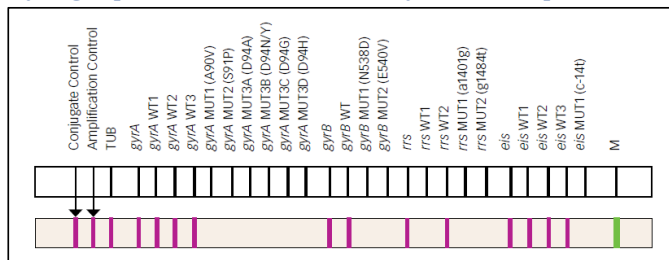
Implikasi Klinis:

Pada kasus hanya terjadi mutasi pada *rrs* atau mutasi pada *rrs* dan *eis*, resistansi terjadi pada OAT injeksi lini kedua.

Pada kasus mutasi hanya terjadi pada *eis* c-14t: amikasin efektif

**KASUS 6:**

Mutasi yang tepat tidak diketahui, hanya inferred pada daerah *rrs*



Jika salah satu dari pita WT berikut ini tidak muncul:

- *rrs* WT1 (lihat gambar di atas sebagai contoh)
- *rrs* WT2

dan tidak ada pita MUT yang muncul di daerah *rrs*.

Hasil Genotipik:

Jika mutasi terjadi pada daerah *rrs* 1400:

- Amikasin : Resistan inferred
- Kanamisin : Resistan inferred
- Kapreomisin : Resistan inferred

Jika mutasi terjadi pada daerah *rrs* 1484:

- Amikasin : Resistan inferred
- Kanamisin : Resistan inferred
- Kapreomisin : Resistan inferred

Tindakan Diagnosa Tambahan:

Rekomendasi : mengulang pemeriksaan dan bila hasilnya sama maka lakukan uji kepekaan untuk Amikasin.

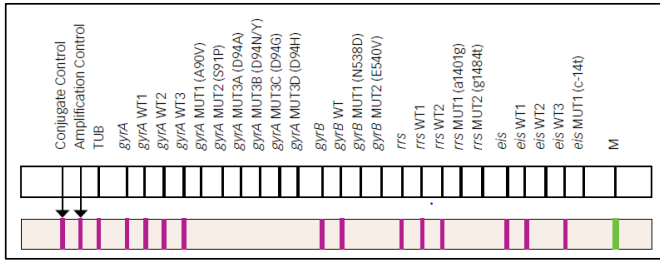
Opsional : melakukan sekuensing untuk mengidentifikasi mutasi yang tepat. Lakukan uji kepekaan terhadap FLQ sesuai dengan kasus 1.

Implikasi Klinis:

Kanamisin dan kapreomisin kemungkinan tidak efektif.

**KASUS 7:**

Mutasi yang tepat tidak diketahui, hanya inferred pada daerah *eis*



Jika salah satu dari pita WT berikut ini tidak muncul:

- *eis* WT1 (misalnya *eis* g-37t)
- *eis* WT2 (misalnya *eis* c-12t atau g-10a) (lihat gambar di atas sebagai contoh)

dan tidak ada pita MUT yang muncul di daerah *eis*.

Hasil Genotipik:

Jika mutasi pada *eis* inferred (dan tidak ada mutasi tambahan pada daerah *rrs*):

- Amikasin : Tidak terdeteksi resistan
- Kanamisin : Resistan inferred
- Kapreomisin : Tidak terdeteksi resistan

Tindakan Diagnosa Tambahan:

Opsional : melakukan uji kepekaan terhadap FLQ sesuai dengan kasus 1 dan juga untuk Amikasin dan Kapreomisin.

Implikasi Klinis:

Amikasin tidak efektif untuk pengobatan



### c. Interpretasi Hasil Menggunakan GenoScan

Interpretasi dengan GenoScan terdiri dari beberapa tahapan:

#### 1) Membuka Software GenoScan

Berikut langkah membuka *software* GenoScan:

- a) Klik **ikon GenoScan** pada desktop atau masuk ke menu **Start-Program-Hain Lifescience-Genoscan**.
- b) Muncul “Registration Dialog”, Masukkan kode yang disediakan program.
- c) Masukkan **User Name** pada baris pertama dan **License Key** pada baris kedua.
- d) Klik **OK**, Jika kode yang dimasukkan tidak sesuai, *software* tidak akan terbuka.

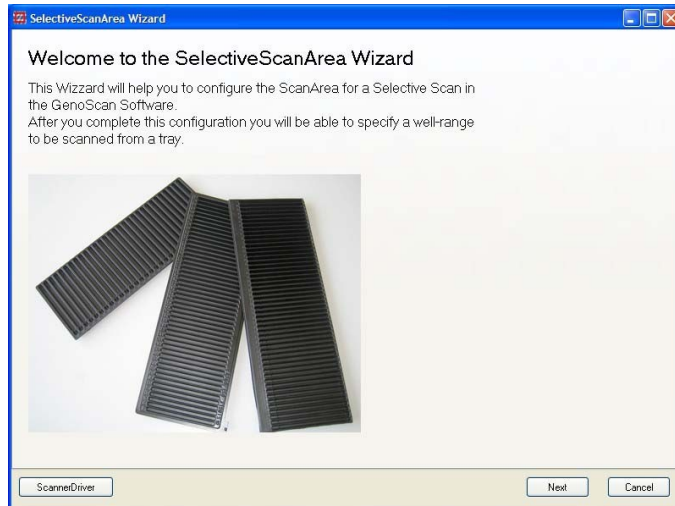
#### **CATATAN**

Jika tidak memiliki kode yang valid, silakan hubungi Hain Lifescience.

#### 2) Konfigurasi Area Scan

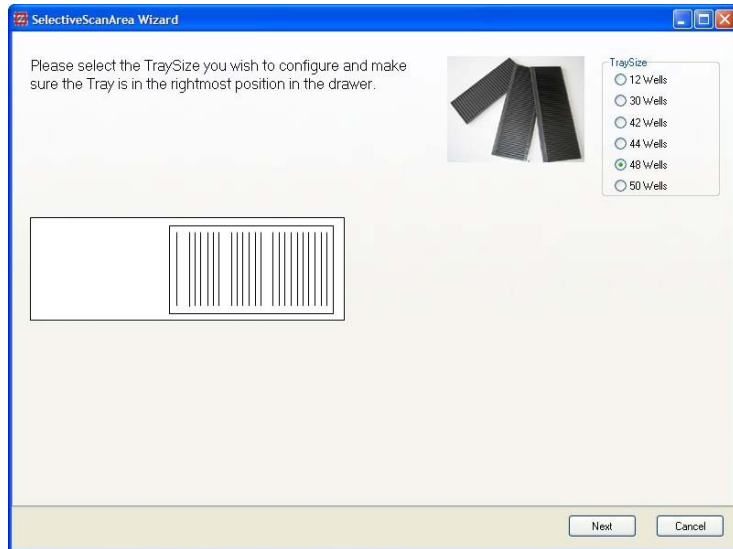
Berikut ini adalah langkah-langkah dalam konfigurasi area *scan* pada GenoScan:

- a) Buka software GenoScan, lalu pilih “**ScanArea Configuration Wizard for GenoScan Reader**”, selanjutnya akan muncul tampilan seperti berikut:

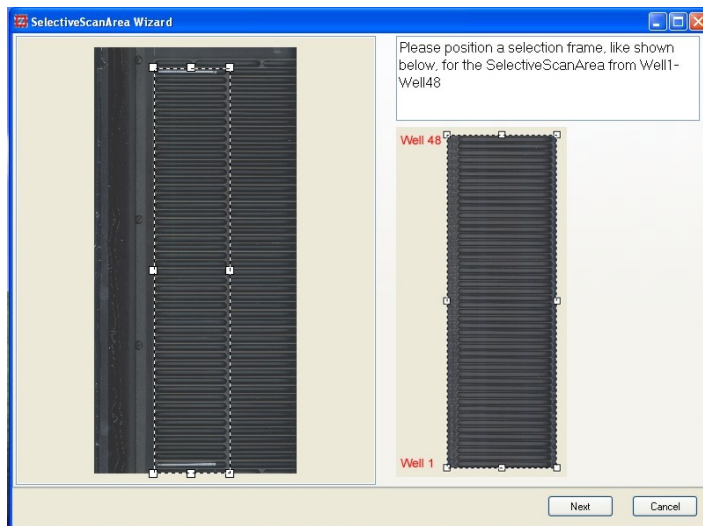


Kemudian klik **Next** untuk memulai konfigurasi atau **Cancel** untuk keluar.

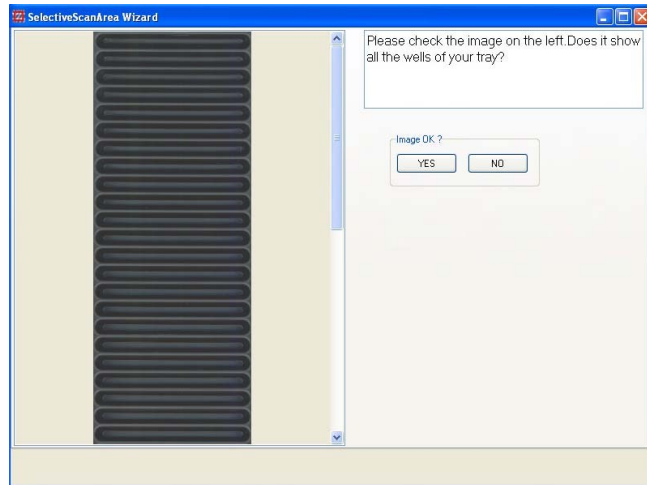
- b) Pilih tipe *tray*, untuk *tray* GT-BLOT 48 pilih “**48 Wells**”.



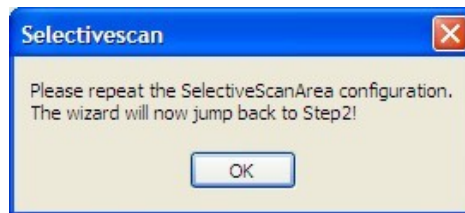
- c) Letakkan *tray* berisi strip pada laci GenoScan, lalu klik **Next**. Pastikan sumur nomor pertama di posisi bagian kiri.
- d) Tampilan *tray* akan muncul pada area scan, lalu *block* bagian
- e) *tray* dari bagian paling atas hingga bawah, seanjutnya klik **Next**.



- f) Jika area scan sudah sesuai, klik **OK**. Sebaliknya, jika Jika area scan belum sesuai, klik **NO**.



- g) Untuk area scan yang belum sesuai, silakan ulangi konfigurasi area scan dengan klik **OK**. Tampilan akhir tray yang terkonfirmasi akan muncul pada area scan, lalu klik **Finish**. Pilih **YES** untuk menseleksi tipe tray lainnya, pilih **NO** untuk menutup program.



### 3) Cara melakukan Scanning Strip

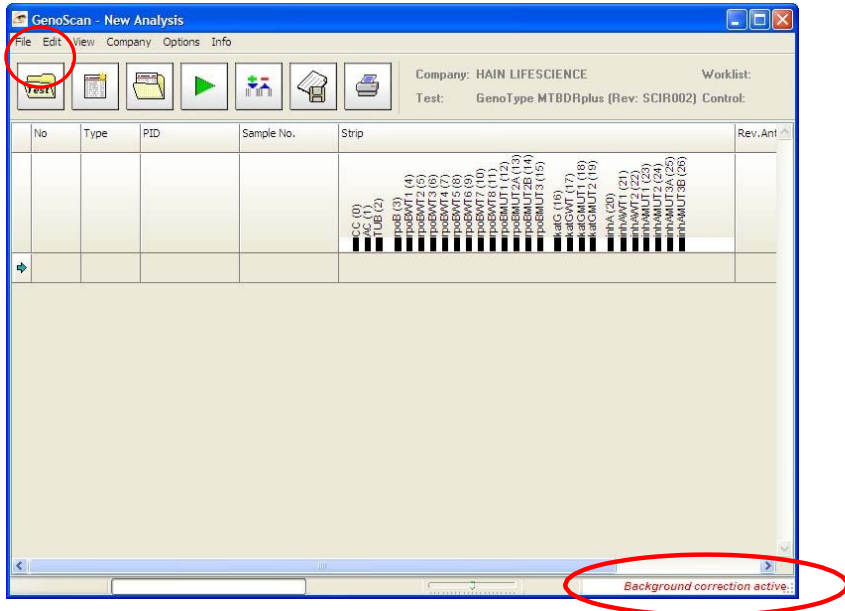
Proses scanning strip terdiri dari beberapa tahapan yaitu tahapan *scanning*, memilih area *scan*, pengaturan *trimming* strip, meminimalisasi bayangan, dan *alignment* strip.

#### Tahapan scanning:

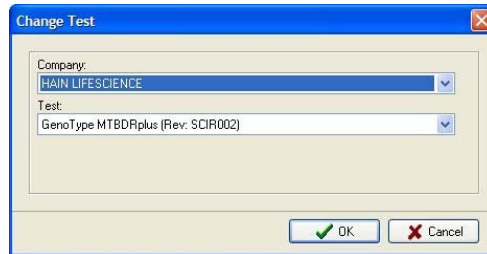
Tahapan *scanning* dilakukan sebagai berikut:

- a) Pastikan GenoScan terhubung dengan komputer.
- b) Buka *software* GenoScan pada desktop.

- c) Pastikan **Background Correction** aktif. Jika belum aktif, centang **Background Correction** pada menu **Option**.



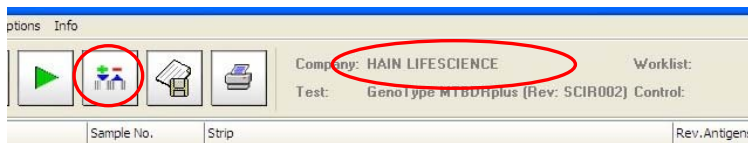
- d) Pilih tes dengan klik tombol **Test**.  
 e) Masukkan **“HAIN LIFESCIENCE”** pada kolom **Company** dan pilih SetCard yang sesuai pada drop-down menu kolom **Test**.



**PERINGATAN**

Cek *lot number* kit dan SetCard. Jika *lot number* keduanya tidak sesuai, maka interpretasi hasil tes bisa saja salah.

- f) Tampilan **Company** akan muncul sebagai **“HAIN LIFESCIENCE”**. Tampilan Control kosong, karena kontrol tidak diperlukan untuk tes dari HAIN LIFESCIENCE.



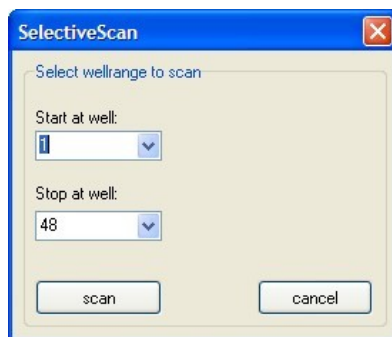
- g) Klik tanda panah hijau pada menu bar.

- h) Muncul pemberitahuan bahwa scanner sedang fase warm-up (jika scanner jarang digunakan). Tunggu hingga proses warm-up selesai.
- i) Setelah proses scan selesai, pindahkan *tray* dari laci GenoScan.

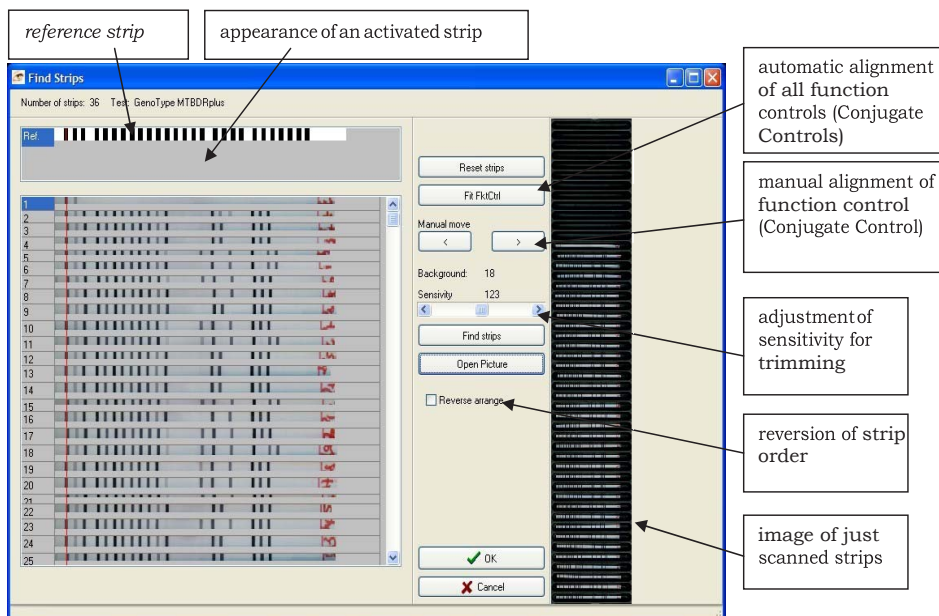
#### Memilih Area Scan (Selective Scan):

*Selective scan* dilakukan untuk memilih area yang akan dilakukan interpretasi hasil. Tahapan nya terdiri dari:

- a) Klik kanan tombol hijau *scan*, lalu akan muncul kotak dialog.
- b) Menu ini dapat digunakan untuk membaca tes lainnya dalam satu *tray* dengan menentukan sumur pertama dan terakhir yang di-scan.



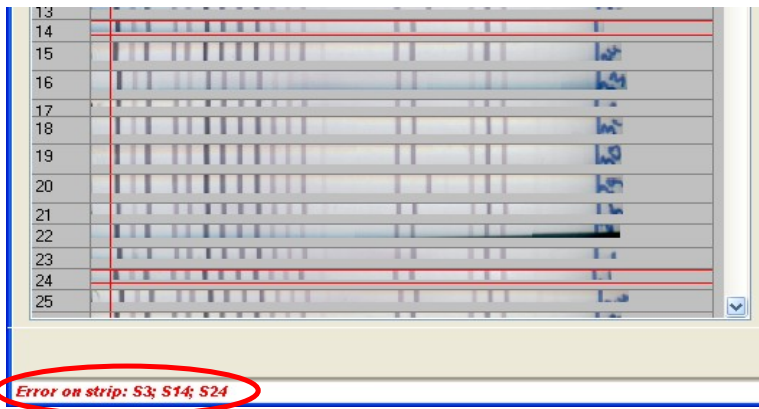
- c) Setelah proses scan, strip referensi dan strip yang sudah ter-trim akan ditampilkan pada **Find Strips**.
- d) Klik kiri gambar original untuk memperbesar gambar.
- e) Jika area scan pada gambar di bagian kanan lebih banyak, ulangi proses konfigurasi area scan dan scan kembali.



Pengaturan *Trimming Strip*:

Selama proses *scan*, terkadang posisi strip tidak sejajar (antara bagian awal dan akhir strip), maka perlu dilakukan pengaturan *trimming* strip untuk mensejajarkan strip hasil pemeriksaan LPA sehingga memudahkan dalam proses interpretasi. Pengaturan dilakukan dengan cara:

- a) Strip yang tidak ter-*trim*/terpotong sempurna akan dikotaki warna merah, atau dapat dilihat pada keterangan di bagian bawah **Find Strips** (S3=Strip3, dsb).
- b) Strip *trimming* dapat diatur dengan menggeser ke kiri/kanan kontrol **Sensitivity** untuk memperbesar/memperkecil strip hingga kotak merah dan keterangan **“Error on strip”** hilang.



Meminimalisasi Bayangan (*Shadowing*)

Strip yang memiliki bayangan/*shadowing* tinggi dapat mengganggu analisis. Pengaturan dapat dilakukan pada kontrol **Sensitivity** sehingga bayangan yang ditimbulkan dapat serendah mungkin.



*Alignment Strip* secara Manual dan Otomatis

*Alignment* strip dilakukan untuk mensejajarkan sisi kiri dan kanan strip. *Alignment* strip dilakukan dengan cara:

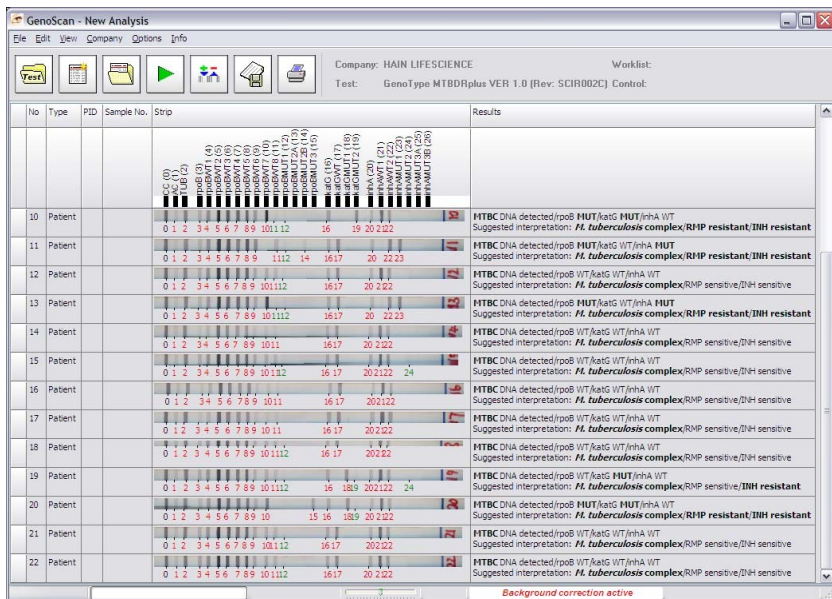
- a) Klik **Fit FktCtrl** untuk meratakan strip dengan referensi
- b) i strip secara otomatis.
- c) Klik tombol panah kiri/kanan **Manual Move** untuk meratakan strip secara manual.
- d) Klik **OK** pada bagian bawah **Find Strips** untuk melanjutkan analisis, atau klik **Edit-Rework last scan** untuk edit hasil *trimming* scan terakhir.

**Catatan:** Hasil akan lebih baik jika strip yang rata dengan referensi strip.



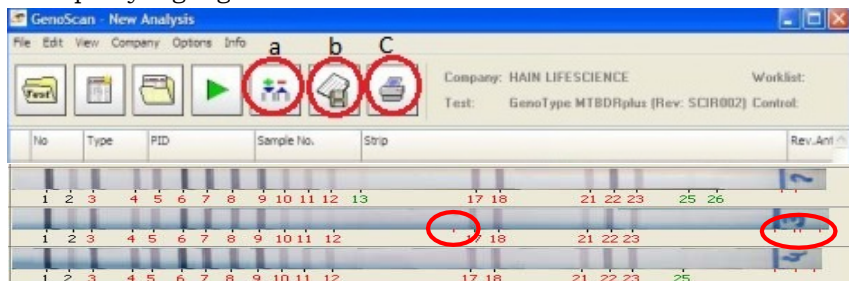
#### 4) Analisis GenoScan

Berikut adalah tampilan analisis strip oleh GenoScan:



Berikut cara menyimpan, mencetak, dan mengedit file hasil:

- Jika ingin mengedit pita, klik tombol **Edit (a)** pada menu bar, lalu klik pita yang ingin diedit.



- Klik tombol **Simpan (b)** pada menu bar untuk menyimpan file
- Klik tombol **Print (c)** pada menu bar untuk mencetak file

## 2. Pengulangan LPA Lini Dua

a. Berikut adalah kriteria hasil yang dapat dilakukan pengulangan LPA Lini Dua:

- Hasil Invalid
- Terdapat minimal 1 hasil Indeterminate (IDT)
- Ketiga obat SLID memiliki hasil Resistansi Inferred (RI)

b. Syarat Pengulangan LPA Lini Dua:

- Pengulangan hanya boleh dilakukan 1 kali
- Jika hasil ulangan masih IDT, maka hasil yg dikeluarkan adalah **Hasil kedua** dan **disertai kalimat “Tunggu hasil DST”**.

\*Jika hasil kedua diskordan pada obat lainnya maka:

- Gabungkan hasil I dan II
- Pilih hasil yang memiliki tingkat resistensi lebih tinggi

Contoh:

	FQ			SLID		
	Lfx	Mfx	MfxDT	Km	Amk	Cm
Hasil I	IDT	IDT		RI	RND	RND
Hasil II	RND	RND		RND	RND	RND
<b>Hasil Akhir</b>	<b>RND</b>	<b>RND</b>		<b>RI</b>	<b>RND</b>	<b>RND</b>

## 3. Penyelesaian Masalah

Berikut adalah contoh masalah dari proses ekstraksi DNA dan hibridisasi beserta penyelesaiannya:

a. Ekstraksi DNA

- Larutan DNA mengandung inhibitor  
Solusi: pastikan material spesimen awal sesuai dengan standar
- Larutan DNA mengandung kontaminasi protein  
Solusi: tambahkan proses/waktu sentrifugasi saat memproses lisat sel dengan A-NB
- Pengambilan sampel, penyimpanan, transportasi, atau persiapan sampel yang tidak sesuai  
Solusi: lakukan permintaan spesimen baru dan ulangi ekstraksi DNA
- Reagen ekstraksi terkontaminasi.  
Solusi: ulangi ekstraksi dengan reagen baru.

b. Hibridisasi

- 1) Secara keseluruhan warna pita lemah atau tidak ada pita (termasuk zona Kontrol Konjugasi-CC)
  - Suhu ruangan terlalu rendah atau reagen tidak disesuaikan dengan suhu kamar.  
Solusi: pastikan suhu ideal dan ulangi proses hibridisasi.
  - Tidak ditamapkannya atau terlalu sedikit penambahan jumlah CON-C dan/atau SUB-C yang digunakan.  
Solusi: ulangi proses hibridisasi sesuai prosedur yang benar.



- 2) Warna pita lemah atau tidak ada pita kecuali untuk zona Kontrol Konjugasi/CC
  - Kualitas DNA yang diekstraksi tidak memungkinkan proses amplifikasi yang efisien.  
Solusi: ulangi ekstraksi.
  - AM-A dan AM-B tidak tercampur dengan benar, tertukar, atau ditambahkan dalam jumlah yang salah.  
Solusi: siapkan *master mix* baru dan ulang amplifikasi.
  - Suhu inkubasi terlalu tinggi.  
Solusi: pastikan suhu inkubasi sesuai dengan prosedur dan ulangi proses hibridisasi.
- 3) Pewarnaan tidak homogen
  - Strip tidak sepenuhnya terendam selama tahap inkubasi.  
Solusi: pastikan tiap strip benar-benar terendam dan ulangi proses hibridisasi.
  - *Tray* tidak bergerak dengan kecepatan yang sesuai (300 rpm).  
Solusi: cek program pada alat hibridisasi, kemudian ulangi proses hibridisasi.
- 4) Warna latar belakang gelap
  - Larutan CON dan/atau SUB yang digunakan terlalu pekat. Solusi: pastikan volume larutan tepat sesuai prosedur dan ulangi proses hibridisasi.
  - Strip terendam terlalu lama dalam larutan campuran SUB.  
Solusi: pastikan waktu inkubasi tepat sesuai prosedur dan ulangi proses hibridisasi.
  - Langkah pencucian tidak dilakukan dengan prosedur yang benar.  
Solusi: pastikan volume larutan RIN dan akubides, serta waktu pencucian sesuai prosedur; dan ulangi proses hibridisasi.
  - Larutan pencuci terlalu dingin.  
Solusi: pastikan penggunaan larutan pencuci diadaptasikan dengan suhu kamar sebelum proses hibridisasi.
- 5) Hasil tak terduga
  - Suhu inkubasi yang salah. Solusi: cek program dan suhu pada alat.
  - Larutan HYB dan/atau STR tidak dihangatkan atau dicampur dengan benar.  
Solusi: pastikan larutan HYB dan/atau STR dihangatkan sebelum digunakan dan pastikan dicampur dengan benar.
  - Kontaminasi tumpahan antar sumur.  
Solusi:
    - ✓ pastikan mengganti tip berfilter setiap membuang larutan
    - ✓ pastikan menggoyang sumur secara perlahan (300 rpm), dan hati-hati ketika memindahkan *tray*.
  - Kontaminasi DNA dengan DNA yang diekstraksi atau diamplifikasi sebelumnya.  
Solusi: ulangi ekstraksi.

- Kontaminasi reagen amplifikasi. Dalam kasus ini, spesimen kontrol negatif menunjukkan pita tambahan selain CC dan AC. Solusi: ulangi amplifikasi menggunakan reagen baru.
- Muncul warna pita yang kuat dan dalam waktu yang cepat, bergantung pada jumlah DNA amplifikasi yang digunakan dan kondisi reaksi spesifik.  
Solusi: dalam kasus tersebut, hentikan inkubasi substrat segera setelah sinyalnya terlihat jelas untuk mencegah munculnya pita hibridisasi silang. Jika perlu, amplicon yang digunakan untuk hibridisasi dapat dikurangi hingga 5 µl.
- Tidak adanya biakan murni sebagai bahan awal.  
Solusi: kultur ulang untuk menyingkirkan kontaminasi.
- *Sampling*, penyimpanan, transportasi, atau persiapan spesimen yang tidak benar.  
Solusi: minta spesimen baru dan ulangi pengujian.
- Kesalahan saat ekstraksi DNA. Solusi: ulangi ekstraksi.

## BAB VI. PEMANTAPAN MUTU

Pemantapan mutu laboratorium adalah suatu sistem yang dirancang untuk meningkatkan dan menjamin mutu serta efisiensi pemeriksaan laboratorium secara berkesinambungan sehingga hasilnya dapat dipercaya. Pemantapan mutu laboratorium LPA lini dua terdiri dari:

### A. Pemantapan Mutu Internal (PMI)

Strip harus dibaca oleh 2 (dua) orang dalam satu laboratorium LPA lini dua. Jika terjadi diskordan, maka dibaca ulang oleh supervisor laboratorium LPA lini dua.

### B. Pemantapan Mutu Eksternal (PME)

Pemantapan Mutu Eksternal (PME) adalah suatu proses berkala dan berkesinambungan yang dilakukan oleh laboratorium yang lebih tinggi jenjangnya untuk memantau kinerja pemeriksaan LPA lini dua. Laboratorium Rujukan Nasional untuk Molekuler, MOTT dan riset operasional (disingkat LRN molekuler) menjadi penanggung jawab pelaksanaan PME laboratorium LPA lini dua.

PME LPA lini dua dilakukan dengan 2 cara:

#### 1. PME untuk Sertifikasi Awal

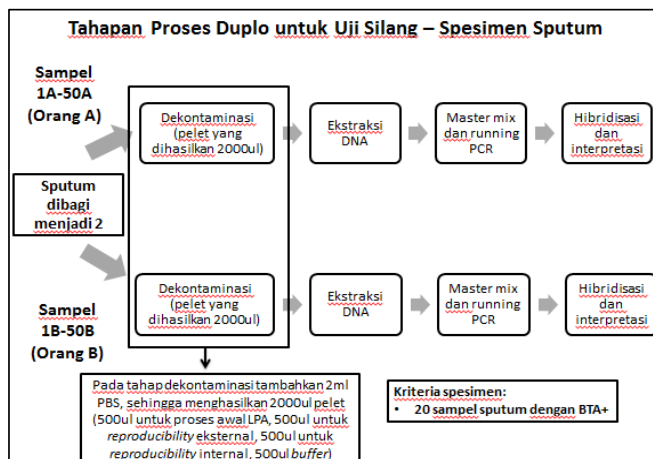
##### a. Uji Silang

PME untuk laboratorium LPA lini dua dilakukan oleh LRN molekuler dengan cara membandingkan hasil LPA antara laboratorium yang melakukan LPA. Pelayanan pemeriksaan LPA lini dua hanya dapat dilakukan oleh laboratorium yang telah lulus sertifikasi uji silang.

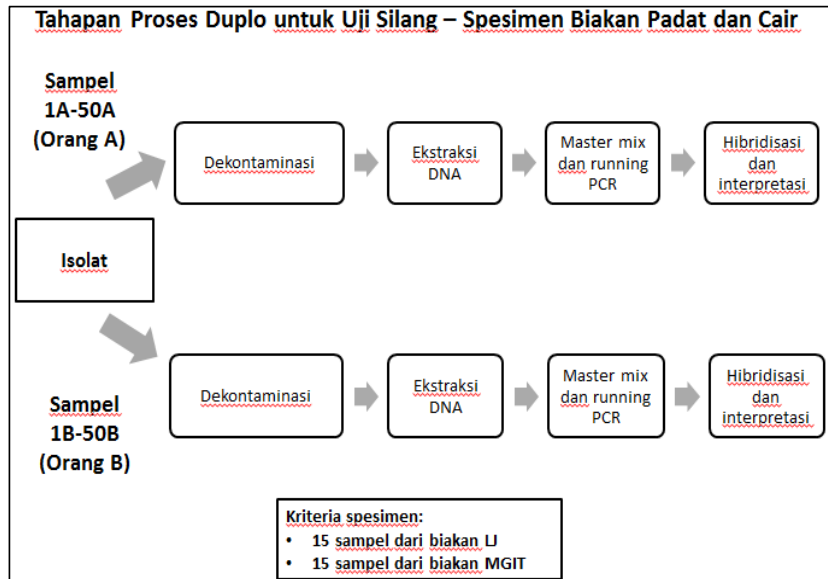
Prosedur uji silang dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1) Laboratorium LPA lini dua menduplikasi 50 spesimen awal, sehingga terdapat 100 strip hasil pemeriksaan LPA lini dua. Spesimen awal ini terdiri dari 30 spesimen biakan dan 20 spesimen dahak BTA positif. Spesimen yang digunakan tidak harus Resistan Rifampisin.
- 2) Proses duplikasi dimulai sejak tahap dekontaminasi. Satu orang mengerjakan spesimen 1A-50A dan satu orang mengerjakan spesimen 1B-50B.
- 3) 100 pelet hasil dekontaminasi dan/atau isolat (media padat atau cair) disimpan di laboratorium LPA masing-masing dengan suhu -20°C. Pelet dapat disimpan pada suhu -20°C selama 6 bulan atau -80°C selama > 6 bulan.

- 4) 100 strip hasil pemeriksaan LPA lini dua dengan jawabannya disalin (*scan*) dengan resolusi yang tinggi. *Scan* hasil interpretasi spesimen nomor 1A-50A dan nomor 1B-50B, masing-masing dalam satu file pdf. File tersebut dikirimkan ke Subdit TBC melalui [email lpabn.indonesia@gmail.com](mailto:lpabn.indonesia@gmail.com).
- 5) Subdit TBC mengirimkan *scan* strip LPA (dengan jawaban) ke LRN molekuler dan fasilitator.
- 6) LRN molekuler dan fasilitator akan membaca kembali hasil tersebut dan memilih 30 spesimen (campuran PAN S, PAN R, R terhadap FL dan R terhadap SLIDs). Spesimen tersebut terdiri dari 50% spesimen biakan 50% spesimen dahak.
- 7) LRN molekuler menginformasikan kepada Laboratorium LPA untuk menguji ulang 30 spesimen yang dipilih dan meminta laboratorium tersebut untuk mengirimkan pelet dan/atau isolat tersebut ke LRN molekuler menggunakan *cryovial* 1,5 ml.
  - o Pelet hasil dekontaminasi diambil sebanyak 500 µl, dimasukkan ke dalam *cryovial free DNA*. Kemudian dikemas sesuai dengan standar pengiriman (*triple layer packaging*).
  - o Jika isolat berasal dari media padat, maka masukkan 3-4 koloni atau satu ose penuh berukuran 10 µl ke dalam *cryovial free DNA* berisi 1 ml *molecular grade water*. Kemudian dikemas sesuai dengan standar pengiriman (*triple layer packaging*).
  - o Jika isolat berasal dari media cair, ambil 1 ml menggunakan tip berfilter ke dalam *cryovial free DNA*. Kemudian dikemas sesuai dengan standar pengiriman (*triple layer packaging*).
- 8) LRN molekuler akan menguji ulang 30 spesimen dari hasil *scan* yang dipilih untuk melihat *reproducibility* eksternal.
- 9) Laboratorium LPA akan menguji ulang 30 spesimen dari hasil *scan* yang dipilih oleh LRN molekuler untuk melihat *reproducibility* internal.



Gambar 15. Tahapan Proses Duplo untuk Uji Silang LPA Lini Dua pada Spesimen Sputum



Gambar 16. Tahapan Proses Duplo untuk Uji Silang LPA Lini Dua pada Spesimen Biakan

### **Kriteria Kelulusan Uji Silang**

Laboratorium LPA lini dua dinyatakan lulus/tersertifikasi jika semua kriteria di bawah ini terpenuhi:

- 1) Hasil LPA lini dua yang invalid <10%.  
Jika hasil invalid >10% maka harus dilakukan pengulangan semua panel tes.
- 2) Tidak ada kontaminasi pada semua tahapan.
- 3) Konkordansi internal >95%.  
Jika kriteria ini tidak terpenuhi maka didiskusikan bersama supervisor laboratorium dan diputuskan.
- 4) Konkordansi eksternal >95%.

#### **b. Uji Panel**

Uji panel dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a) Uji panel dilakukan 6 bulan setelah laboratorium dinyatakan tersertifikasi sebagai laboratorium LPA lini dua.
- b) LRN molekuler menyediakan 20 pelet dari biakan yang telah diketahui profil resistansinya baik secara LPA maupun biakan dan uji kepekaan.
- c) Dua puluh pelet dari biakan tersebut akan dikirimkan ke laboratorium pelaksana LPA untuk dilakukan proses ekstraksi sampai dengan pembacaan hasil.
- d) Strip hasil hibridisasi harus ditempel pada lembar interpretasi hasil kemudian di-scan dengan resolusi yang tinggi (> 300 dpi) dan dikirim via *email* ke [LRN.mikrobiologiui@yahoo.com](mailto:LRN.mikrobiologiui@yahoo.com) dan cc ke:

[lpab.indonesia@gmail.com](mailto:lpab.indonesia@gmail.com) maksimal 3 minggu sejak pellet diterima.

**Kriteria Kelulusan Uji Panel**

Laboratorium LPA lini dua dinyatakan lulus/tersertifikasi jika semua kriteria di bawah ini terpenuhi :

- a) Hasil LPA lini dua yang invalid <10%.  
Jika hasil invalid >10% maka harus dilakukan pengulangan semua panel tes.
- b) Tidak ada kontaminasi pada semua tahapan.
- c) Konkordansi eksternal >95%.

2. **PME Rutin Laboratorium LPA Lini Dua**

Setelah laboratorium dinyatakan lulus sertifikasi, pemantauan akan dilakukan melalui panel rutin sebanyak 20 pelet secara “*blind*” kepada setiap laboratorium secara tahunan.

Selain itu, masing-masing laboratorium LPA wajib memantau indikator kinerja utama (IKU) yang terdiri dari:

- a. Proporsi hasil LPA yang invalid < 5%
- b. Sampel yang dilaporkan dalam 7 hari (pemeriksaan pertama maupun pemeriksaan ulang) mencapai 90%

## BAB VII. PEMELIHARAAN DAN PENYELESAIAN MASALAH

### A. Pemeliharaan Alat LPA Lini Dua

Pemeliharaan alat LPA bertujuan untuk memastikan sistem berjalan dengan baik, menghindari terjadinya kerusakan alat, dan menjamin keakuratan hasil. Pemeliharaan berkala dilakukan oleh petugas laboratorium.

#### 1. Pembersihan dan Pemeliharaan Alat TwinCubator

##### a. Pembersihan TwinCubator

Disarankan bahwa setiap bulan atau sesuai kebutuhan, bagian luar alat dibersihkan dengan menggunakan kain bebas serat yang basah. Untuk melakukan ini, lepaskan alat dari catu daya. Pastikan tidak ada kelembaban di dalam alat. Jika cairan (larutan reagen atau bahan sampel) tumpah di blok hibridisasi, maka harus segera dibersihkan dengan kapas yang direndam dalam larutan sabun ringan dan kemudian dengan air suling atau air demineralisasi/air RO. Gunakan desinfektan beralkohol ringan untuk disinfeksi. Jangan gunakan agen pembersih agresif seperti bubuk penggosok untuk membersihkan.

##### b. Dekontaminasi TwinCubator

Jika alat harus dikirimkan misalnya untuk perbaikan, maka terlebih dahulu harus didekontaminasi. Bersihkan alat dengan hati-hati seperti yang dijelaskan di atas. Alat harus didekontaminasi lebih lanjut dengan larutan bakterisida. Pilih larutan dekontaminasi sesuai dengan jenis patogen pada sampel pasien yang diperiksa. Setelah dekontaminasi, bersihkan alat dengan air untuk mencegah kerusakan pada alat karena bahan kimia agresif. Isi Protokol Dekontaminasi dan lampirkan di bagian luar kemasan.

##### c. Pemeliharaan TwinCubator

Pemeriksaan suhu secara rutin (misalnya, setiap enam bulan) harus dilakukan. Pemeliharaan ini harus dilakukan oleh orang yang terlatih menggunakan TAS (*Temperature Acquisition System*). Untuk mengetahui terjadi eror pada alat atau tidak, maka bisa ditekan tombol berikut secara bersamaan.



Gambar 17. TwinCubator

Setelah tombol ditekan, maka pada layar akan muncul:



Kemudian tekan tombol (≡) untuk menampilkan eror yang mungkin muncul saat alat dinyalakan atau sejak eror terakhir kali dihilangkan (tekan “clear” (≡) untuk menghilangkan kode eror yang muncul). Jika eror berhasil dihilangkan akan muncul kode 0000. Tekan ■ untuk kembali ke menu awal.

## 2. Pembersihan dan Pemeliharaan Alat GT-Blot

Jangan gunakan agen pembersih agresif seperti natrium hipoklorit, bubuk gosok, atau pelarut organik untuk proses pembersihan.

### a. Pembersihan Tray GT-Blot

*Tray* harus dibersihkan setiap kali setelah digunakan. Jika *tray* tidak segera dicuci setelah digunakan, maka isi *tray* dengan air sampai pada saatnya dicuci. *Tray* berbahan plastik hitam harus dibersihkan sebagai berikut:

- 1) Setiap kali selesai digunakan, rendam *tray* dalam larutan pencuci yang sesuai (misalnya, 3-4% SDS atau air dengan agen pembersih) semalaman.
- 2) Bersihkan sumur dengan sikat.
- 3) Bersihkan *tray* dengan air panas.
- 4) Bilas setiap sumur dengan air yang terdemineralisasi/air RO.
- 5) Biarkan sampai *tray* mengering.
- 6) Periksa apakah masih terdapat endapan; jika perlu, ulangi langkah pembersihan atau buang *tray*.
- 7) Periksa apakah terdapat lubang terutama di sudut-sudut sumur. Setiap baris sumur dari *tray* plastik tidak boleh digunakan lebih dari dua kali. Pembersihan *tray* logam (model lama) mulai dari langkah 1 hingga 5.

### b. Pembersihan Pipa/Saluran GT-Blot

Saluran harus dibersihkan setiap hari untuk mencegah endapan kristal. Untuk siklus pembersihan yang terintegrasi dapat digunakan program “washing” yang sudah terdapat pada alat.

- 1) Tempatkan semua pipa/saluran dalam wadah yang sudah diisi dengan air panas atau air demineralisasi/air RO panas dan aktifkan siklus pembersihan A. Selama siklus, pesan-pesan berikut ini akan ditampilkan pada layar: **<Priming pump x / 6>**, **<Soaking 01>**, **<Reagent Save x / 6>**, **<Cycle A complete Press Start>**.
- 2) Setelah siklus pembersihan A telah berhenti, letakkan semua pipa/saluran dalam air yang terdemineralisasi/air RO.
- 3) Mulai siklus B dengan menekan tombol “**Start**” lagi. Pipa/saluran akan dipompa kosong pada akhir siklus pembersihan B.
- 4) Gantung pipa/saluran sampai kering.



Untuk menghindari penyumbatan pada unit *dispensing* oleh komponen reagen, maka unit *dispensing* dapat dibersihkan secara hati-hati dengan sikat yang lembut dan basah pada saat pembersihan siklus B. Tergantung pada penggunaan alat GT-Blot 48, pembersihan pipa/saluran dapat ditambahkan dengan larutan natrium hipoklorit (0,5-1,0%) yang baru dibuat (*fresh*) setiap **dua hingga empat minggu**.

Cara pembersihan menggunakan program “washing”:

- 1) Tempatkan semua pipa/saluran dalam wadah yang berisi dengan larutan natrium hipoklorit dan aktifkan pembersihan siklus A. Penyangga *tray (tray holder)* tidak boleh terkena larutan hipoklorit karena bisa merusak permukaannya.
- 2) Setelah siklus pembersihan A telah selesai, tempatkan semua pipa/saluran dalam air yang terdemineralisasi/air RO.
- 3) Mulai siklus B dengan menekan tombol “**Start**” lagi. Pipa/saluran akan dipompa kosong pada akhir pembersihan siklus B.
- 4) Jalankan program “**Washing**” lagi menggunakan air yang terdemineralisasi/air RO untuk menghindari tertinggalnya residu natrium hipoklorit di dalam pipa/saluran.
- 5) Gantung pipa/saluran hingga kering.

c. **Pembersihan Bagian Luar Alat GT-Blot**

Disarankan bahwa **setiap bulan** atau sesuai kebutuhan, bagian luar alat dibersihkan menggunakan kain bebas serat yang basah. Putuskan sambungan catu daya dan tutup alat. Jangan sampai terdapat kelembapan di dalam alat. Penyangga *tray (tray holder)* harus diperiksa secara teratur apakah terdapat sedimentasi. Permukaan yang kotor sangat mungkin mempengaruhi perpindahan panas. Jika perlu, bersihkan dengan tisu yang sudah dibasahi.

d. **Dekontaminasi Alat GT-Blot**

Pada kondisi alat hibridisasi otomatis harus dikirimkan (misalnya untuk perbaikan), maka sebelum pengiriman alat hibridisasi harus didekontaminasi. Bersihkan alat dengan hati-hati seperti yang dijelaskan di atas. Alat harus didekontaminasi tambahan dengan larutan bakterisida. Pilih larutan dekontaminasi yang sesuai dengan jenis patogen dalam sampel pasien yang diperiksa. Hal ini penting untuk memastikan bahwa alat dapat ditangani tanpa menimbulkan bahaya kepada orang lain. Bersihkan alat dengan air setelah proses dekontaminasi selesai untuk mencegah kerusakan pada alat karena bahan kimia agresif. Isi Protokol Dekontaminasi (termasuk dalam pengiriman) dan pasang di luar kemasan.

e. **Pemeliharaan Alat GT-Blot**

Untuk menjaga agar alat hibridisasi otomatis tetap berfungsi dengan baik, dianjurkan untuk melakukan langkah-langkah berikut sebagai bagian dari program pemeliharaan rutin. Pemeriksaan berikut dapat dilakukan oleh personel laboratorium setiap **tiga bulan**:

- 1) Periksa apakah pipa aspirat dalam kondisi bebas dan tidak terhalang. Ini dapat diperiksa secara visual dan dengan menjalankan alat menggunakan air. Kemudian pastikan bahwa rongga kosong selama aspirasi.
- 2) Periksa apakah jarum *dispensing* sudah mengeluarkan larutan dengan benar. Jika salah satu jarum gagal mengeluarkan, pastikan bahwa pompa yang terkait menyala, dan tidak terlihat adanya penyumbatan.

Pemeriksaan berikut ini dilakukan setiap **6 bulan** sekali dan hanya boleh dilakukan oleh petugas servis yang terlatih.

- 1) Melaksanakan pemeriksaan 3 bulanan yang diuraikan di atas.
- 2) Pada kondisi alat dimatikan, pastikan *probe* aspiratif bergerak naik dan turun dengan bebas. Tambahkan setetes (tidak lebih) minyak mesin ringan ke *slide* linier.
- 3) Pada kondisi alat dimatikan, pastikan bahwa lengan bergerak bebas dari kanan ke kiri. Tambahkan setetes (tidak lebih) minyak mesin ringan ke *slide* linier.
- 4) Pastikan komponen klem *tray* dalam keadaan baik.
- 5) Pindahkan semua pompa reagen ke pipa/saluran atas botol.
- 6) Jalankan alat dengan menggunakan air dan lakukan pemeriksaan berikut:
  - Pastikan lengan bergerak ke posisi yang benar, dan reagen dikeluarkan ke bagian tengah dari sumur *tray*.
  - Buka penutup untuk memastikan bahwa bel peringatan berfungsi dengan baik.
  - Pastikan bahwa suhu mencapai *set point*, dan lakukan pemeriksaan acak pada sumur menggunakan alat pengukur suhu bersertifikat. Pembacaan harus  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  dari *set point*. Pengukuran ini harus diambil antara 10 hingga 15 menit setelah suhu *set point* telah tercapai.
  - 1) Periksa tanda-tanda kerusakan yang nyata pada alat.
  - 2) Bersihkan jendela alat dan bagian luarnya.

**Catatan:**

- Semua perbaikan hanya dapat dilakukan oleh orang yang terlatih dan berwenang.
- Hanya suku cadang asli yang bisa digunakan.
- Alat hanya boleh dibuka oleh orang yang terlatih dan berwenang.
- Untuk menghindari terjadinya sengatan listrik, catu daya harus diputuskan; tunggu setidaknya satu menit sebelum menangani alat.

### 3. Pemeliharaan GenoScan

#### a. Kalibrasi GenoScan

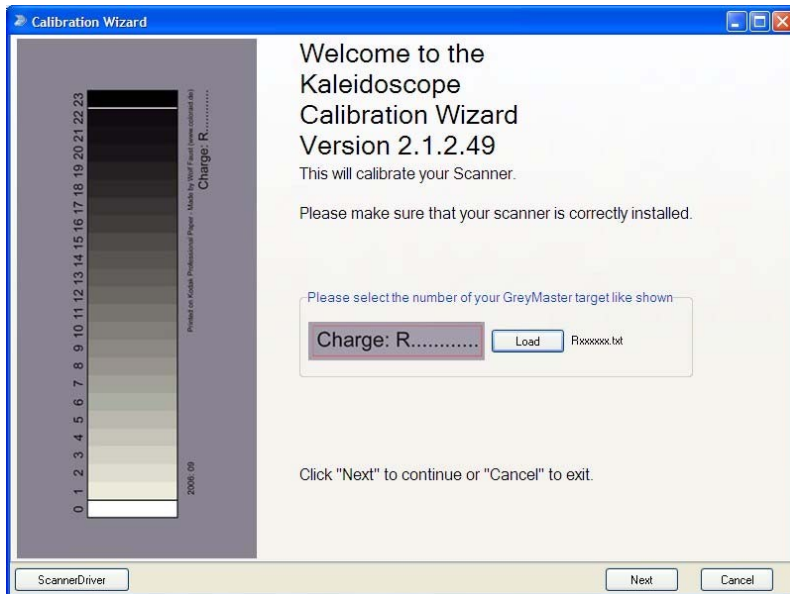
Ketika GenoScan telah diinstal dengan benar, maka perlu dilakukan kalibrasi menggunakan standar skala abu-abu (20 skala abu-abu). Keberhasilan kalibrasi juga menunjukkan bahwa semua instalasi telah

dilakukan dengan benar. Petugas laboratorium harus mengulangi kalibrasi ini setiap tiga hingga enam bulan.

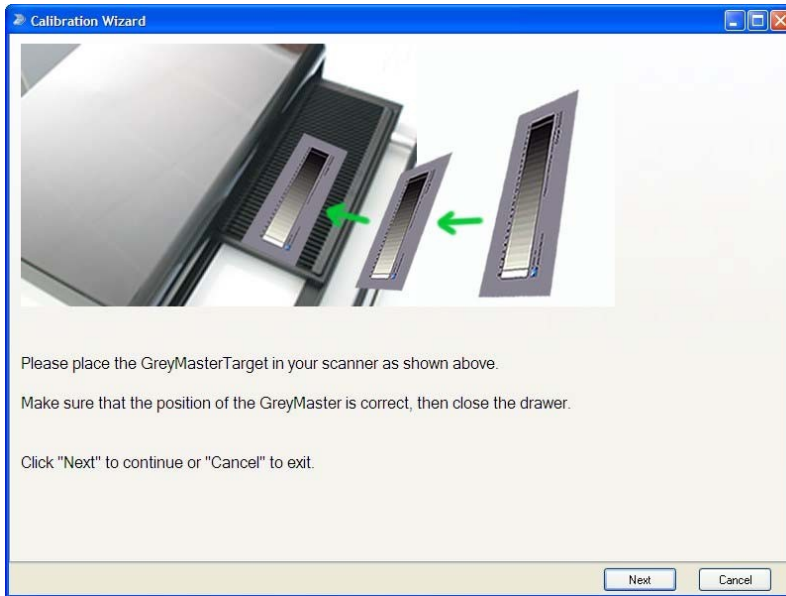
Standar skala abu-abu tersebut harus disimpan di tempat yang kering dan gelap serta jauhkan dari cahaya. Jika disimpan dengan benar, standar skala abu-abu dapat digunakan hingga tanggal kedaluwarsa atau sampai standar skala sudah dalam kondisi yang tidak baik. Ketika labortaorium membutuhkan standar skala abu-abu yang baru, maka dapat menghubungi produsen untuk dilakukan pembelian seharga 70 Euro.

Berikut ini adalah langkah-langkah dalam kalibrasi GenoScan:

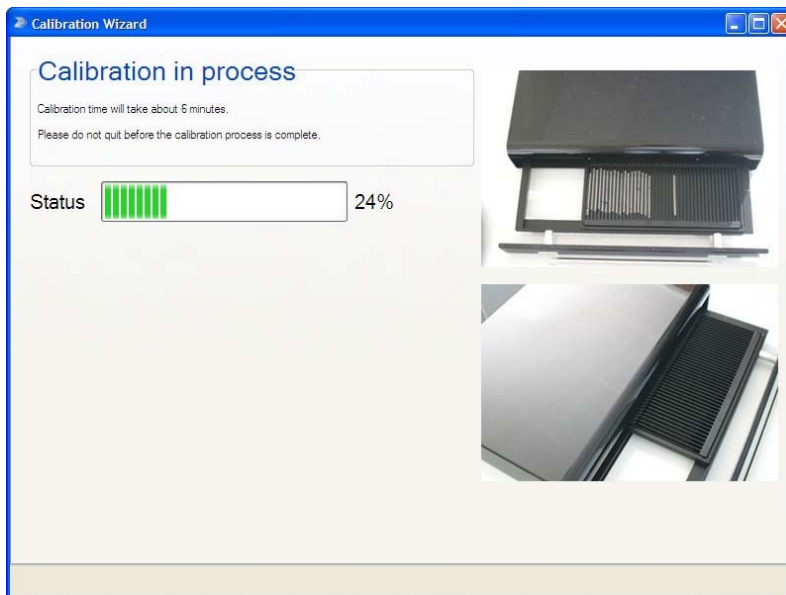
- 1) Pastikan bahwa GenoScan terhubung ke slot USB komputer. Masuk ke Windows **Start – Programs – Hain Lifescience - GenoScan** dan pilih **“Calibration Wizard”**. Pada monitor akan terlihat tampilan sebagai berikut:



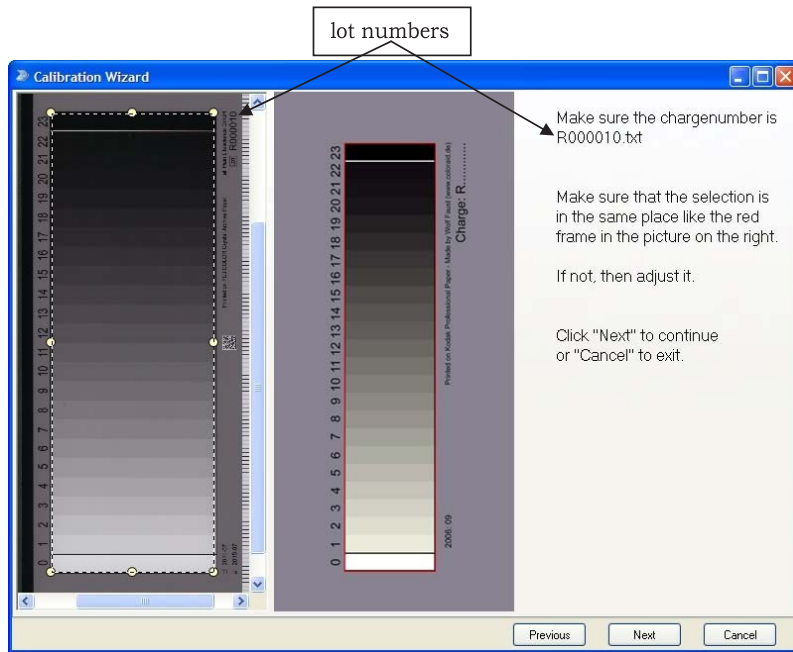
- 2) Klik **“Load”** dan buka .txt.file, kemudian pilih kode sesuai dengan kode pada skala abu-abu. Klik **“Next”** untuk memulai konfigurasi.
- 3) Ikuti instruksi dari Wizard. Saat menggunakan papan skala abu-abu, keluarkan tempat tray dan masukan papan skala abu-abu. Posisikan papan skala sesuai tampilan berikut.



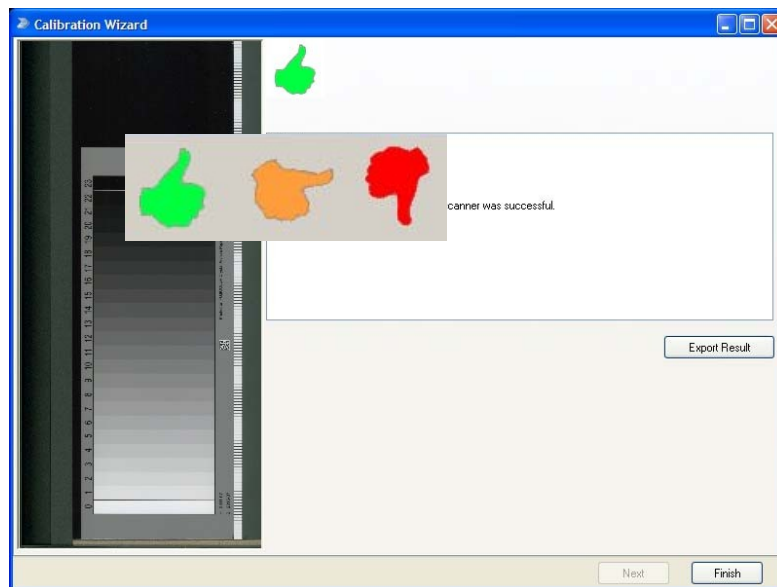
4) Proses kalibrasi akan berlangsung.



5) Monitor akan menunjukkan area yang discan. Pastikan bahwa persegi panjang putih di sebelah kiri menangkap 20 skala abu-abu dari strip kalibrasi seperti yang ditunjukkan dengan kotak merah di sebelah kanan. Jika perlu, ubah ukuran persegi panjang. Pindahkan kursor *mouse* ke salah satu titik dari persegi panjang, klik dan tahan tombol kiri *mouse* dan pindahkan titik ke posisi yang benar.



- 6) Kalibrasi akan berhasil jika posisi persegi panjang telah sesuai. Jika proses scan standar skala abu-abu miring, maka ulangi proses ini.
- 7) Monitor akan menampilkan hasil kalibrasi. Gambar jempol berwarna hijau menandakan bahwa kalibrasi telah berjalan sukses.



Jempol berwarna *orange* menunjukkan bahwa kalibrasi masih dalam parameter yang dapat ditoleransi, jempol merah menunjukkan kalibrasi yang tidak berhasil. Dalam hal ini, silakan berkonsultasi dengan produsen.

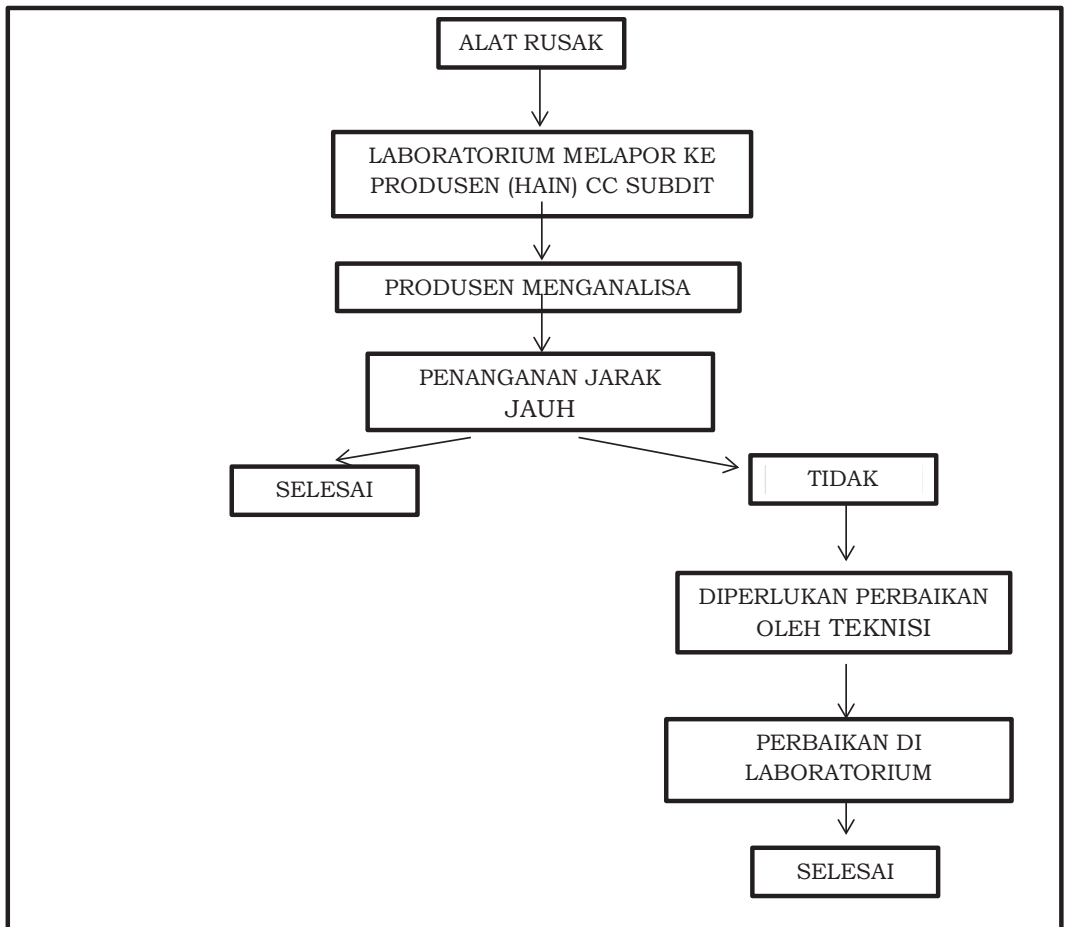
Jika ingin mencetak atau menyimpan hasil kalibrasi Anda, klik "**Export Result**" di jendela hasil. Pilih folder dan nama file; laporan hasil disimpan sebagai file .pdf dan dapat dicetak.

b. *Backup Data Hasil Pembacaan GenoScan*

Pembacaan hasil GenoScan dapat disimpan di komputer/mesin GenoScan dalam bentuk pdf. Petugas laboratorium wajib memback up data tersebut dengan cara memindahkan file hasil pembacaan ke dalam CD dan kemudian diarsipkan. *Back up* data dilakukan secara rutin per triwulan.

**B. Penyelesaian Masalah**

Alat LPA yang meliputi Twinkubator, GT Blot, dan GenoScan memiliki garansi selama 1 (satu) tahun. Apabila terjadi eror/kerusakan pada alat LPA, maka laboratorium dapat melaporkannya dengan mengikuti alur di bawah ini.



Gambar 18. Alur Pelaporan Error dan Kerusakan Alat LPA

**Keterangan:**

- 1) Laboratorium yang mempunyai keluhan atau menemukan adanya kerusakan pada alat LPA melaporkan keluhan/kerusakan tersebut ke produsen ([support@hain-lifescience.de](mailto:support@hain-lifescience.de)) cc Subdit TBC ([lpab.indonesia@gmail.com](mailto:lpab.indonesia@gmail.com)). Selain itu, laboratorium juga membuat laporan tertulis yang ditujukan untuk Subdit TBC cc Dinkesprov dan LRN Molekuler TBC Departemen Mikrobiologi FK UI.
- 2) Produsen akan menganalisa laporan yang masuk dan akan mencoba melakukan penanganan jarak jauh. Adapun penanganan jarak jauh yang dimaksud antara lain penyelesaian melalui telepon ataupun pemberian rekomendasi perbaikan secara mandiri oleh masing-masing laboratorium yang diketahui oleh Subdit TBC, Dinkesprov, dan LRN Molekuler TBC Departemen Mikrobiologi FK UI.
- 3) Apabila penanganan oleh produsen berhasil menyelesaikan keluhan/kerusakan yang terjadi, maka laboratorium menginformasikan hasilnya ke Subdit TBC, Dinkesprov, dan LRN Molekuler TBC Departemen Mikrobiologi FK UI.
- 4) Apabila keluhan/kerusakan tidak dapat ditangani dengan panduan jarak jauh, maka perlu dilakukan perbaikan oleh teknisi.
- 5) Apabila pembiayaan perbaikan, perjalanan dan akomodasi teknisi disetujui oleh Subdit TBC/Dinkesprov/Laboratorium, maka teknisi akan langsung melakukan perbaikan langsung ke laboratorium yang bermasalah.

## BAB VIII. PENCATATAN DAN PELAPORAN

Pencatatan kegiatan pemeriksaan laboratorium TBC sangat penting karena digunakan sebagai sumber data pengelolaan pasien dan penilaian terhadap keberhasilan Program Penanggulangan TBC. Pemeriksaan LPA lini dua dicatat dan dilaporkan menggunakan format standar yang berlaku. Semua strip hasil pemeriksaan LPA lini dua yang telah ditempel pada lembar hasil interpretasi harus di-scan sebelum disimpan untuk diarsipkan. Hasil pemeriksaan LPA lini dua ini harus ditanda tangani oleh penanggung jawab laboratorium atau supervisor.

Berikut ini adalah jenis formulir yang terkait dengan pemeriksaan LPA lini dua:

1. **Formulir TBC-06** merupakan daftar terduga TBC yang berada di poli (Lampiran 5). Terdapat 2 (dua) jenis formulir TBC-06 yaitu TBC-06 untuk mencatat terduga TBC SO dan TBC-06 untuk mencatat terduga TBC RO. Formulir tersebut berisi data terduga dan diisi oleh petugas poli.
2. **Formulir TBC-05** merupakan formulir permohonan pemeriksaan bakteriologis TBC (Lampiran 6). Formulir ini merupakan formulir pengantar yang diisi oleh petugas poli apabila ingin memeriksakan spesimen terduga/pasien TBC ke laboratorium. Setelah didapatkan hasil pemeriksaan, maka petugas laboratorium harus mengisi hasil di TBC-05 dan mengirimkan kembali formulir TBC-05 ke poli/fasyankes perujuk.

Hasil pemeriksaan LPA lini dua pada formulir TBC-05 saat ini belum mengakomodir pembacaan individual obat. Oleh karena itu, hasil LPA lini dua dicatat secara manual atau menggunakan stiker di bagian bawah TBC-05 sesuai format berikut:

	Invalid	MTB	Lfx	Mfx	Mfx DT	Km	Amk	Cm
<b>Hasil LPA Lini Dua</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<u>Contoh uji</u> <input type="checkbox"/> Sewaktu/Pagi	<u>Tgl hasil dilaporkan</u>		<u>Saran untuk implikasi klinis:</u>					
Keterangan: <b>D</b> = Detected; <b>ND</b> = Not Detected; <b>RD</b> = Resistance detected; <b>RND</b> = Resistance Not Detected <b>RI</b> = Resistance Inferred; <b>IDT</b> = Indeterminate								

Terdapat beberapa informasi yang dicatat yaitu:

- a) Jenis contoh uji yang diperiksa (Sewaktu atau Pagi)
- b) Tanggal hasil dilaporkan
- c) Hasil pemeriksaan LPA, terdiri dari beberapa kolom yaitu:
  - i. Invalid : diberi tanda centang (√) jika hasil Invalid
  - ii. MTB : hasil *Mycobacterium tuberculosis*, diisi dengan D (detected) atau ND (Not Detected)
  - iii. Hasil resistansi obat yang diperiksa, diisi dengan RD (Resistance Detected), RND (Resistance Not Detected), RI (Resistance Inferred),



atau IDT (Indeterminate). Obat yang dapat diperiksa dengan LPA lini dua terdiri dari

- Lfx : hasil Levofloksasin,
- Mfx : hasil Moxifloksasin,
- Mfx DT : hasil Moxifloksain dosis tinggi,
- Km : hasil Kanamisin,
- Amk : hasil Amikasin,
- Cm : hasil Kapreomisin.

iv. Saran implikasi klinis, merupakan saran implikasi klinis dari laboratorium.

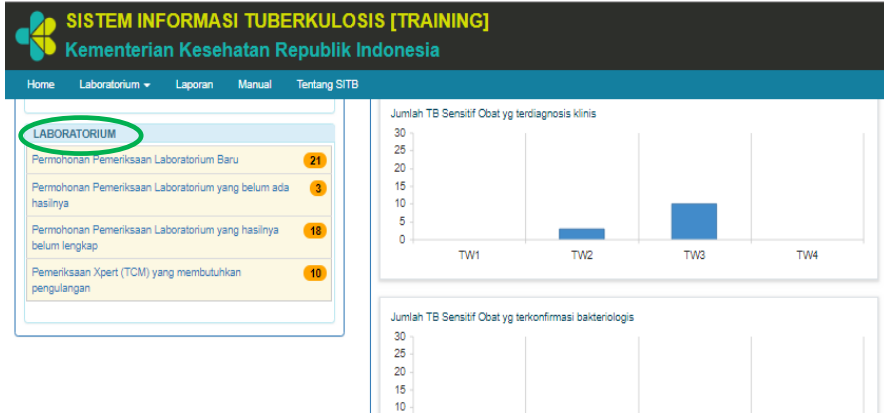
3. **Formulir TBC-04** untuk laboratorium rujukan biakan dan uji kepekaan yang memiliki kemampuan melakukan pemeriksaan mikroskopis, tes cepat, biakan dan uji kepekaan (Lampiran 7). Formulir TBC-04 berada di laboratorium dan berisi hasil dari setiap pemeriksaan TBC yang dikerjakan di laboratorium. Formulir ini diisi oleh petugas laboratorium. Pengisian hasil LPA lini dua di TB 04 dapat dilakukan dengan menambahkan kolom obat yang diperiksa dalam file TB 04 versi excel.
4. **Laporan pola resistansi dan Indikator Kinerja Utama (IKU) laboratorium LPA lini dua**, adalah *tools* pelaporan sekaligus analisis data pemeriksaan LPA Lini dua yang berbasis excel (Lampiran 8). Pelaporan dilakukan per triwulan dan dikirimkan ke email LRN Molekuler [LRN.mikrobiologiui@yahoo.com](mailto:LRN.mikrobiologiui@yahoo.com) cc [lpatb.indonesia@gmail.com](mailto:lpatb.indonesia@gmail.com) pada minggu terakhir/keempat di bulan berikutnya. Contoh: sampel pemeriksaan LPA pada bulan Jan-Mar akan dilaporkan pada minggu terakhir/keempat bulan April.
5. Pencatatan dan pelaporan Program Tuberkulosis untuk pemeriksaan LPA lini dua sebelumnya menggunakan e-TB Manager, yang digunakan untuk pencatatan manajemen pasien TB MDR secara online. Namun pada tahun 2020, semua pencatatan dan pelaporan Program Tuberkulosis dilakukan secara terpadu melalui Sistem Informasi Tuberkulosis (SITB). Pemeriksaan LPA lini dua wajib tercatat dalam software ini.

Langkah-langkah pengisian hasil pemeriksaan LPA lini dua pada SITB adalah sebagai berikut :

- Petugas laboratorium hanya dapat menginput hasil pemeriksaan LPA lini dua, jika ada permohonan pemeriksaan laboratorium. Sebelumnya fasyankes pengirim harus melakukan input data terduga / pasien dalam SITB dan telah memiliki hasil Rif Res dari TCM. Secara rinci cara penginputan data hasil pemeriksaan laboratorium (LPA lini dua) dapat dilihat pada Petunjuk Teknis SITB.
- Pastikan petugas laboratorium melakukan konfirmasi terhadap data detail hasil pemeriksaan lab terduga / pasien khususnya untuk hasil akhir TCM Rif Res. Jika terduga / pasien yang dilakukan pemeriksaan LPA lini dua tidak mempunyai hasil Rif Res dari TCM, maka pemeriksaan LPA lini dua yang dilakukan tidak dapat dilakukan klaim kepada Global Fund Program TB. Pemeriksaan LPA lini dua hanya dapat dilakukan pada pasien yang

telah terkonfirmasi Rif Res dari TCM, sesuai algoritma dalam Permenkes 67 tahun 2016.

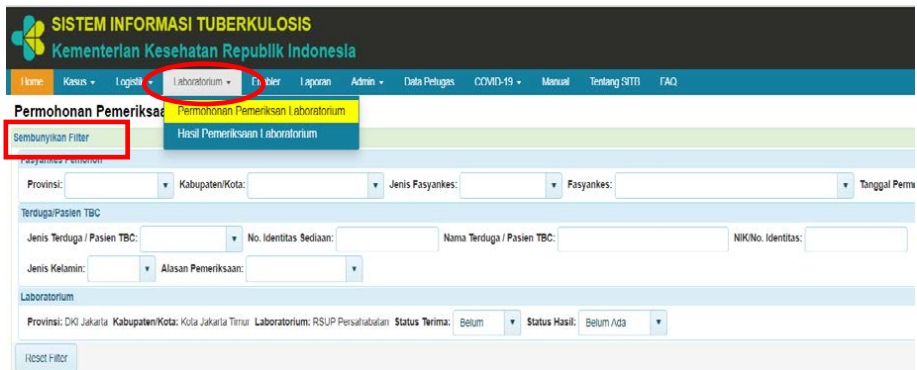
- Penginputan hasil pemeriksaan LPA lini dua, dapat dilakukan dengan 2 (dua) cara yaitu melalui:
  1. Notifikasi / alert & remainder bagian laboratorium



Pada bagian notifikasi / alert & reminder laboratorium ada beberapa notifikasi yang digunakan untuk melakukan input pemeriksaan laboratorium (LPA Lini Dua) yaitu:

- a. Permohonan pemeriksaan laboratorium baru
- b. Permohonan pemeriksaan laboratorium yang belum ada hasilnya
- c. Permohonan pemeriksaan laboratorium yang hasilnya belum lengkap

2. Menu hasil pemeriksaan lab di bagian Modul Laboratorium



Menu Permohonan Lab digunakan untuk mencari dan mengisi hasil pemeriksaan laboratorium dari permohonan lab baru, sedangkan menu hasil pemeriksaan laboratorium digunakan untuk mencari dan mengisi permohonan laboratorium yang sudah dilakukan konfirmasi penerimaan contoh uji. Pencarian data permohonan laboratorium yang ingin diinput hasil pemeriksaannya dapat dilakukan dengan menggunakan “tampilan filter”

Pilih filter yang ingin digunakan untuk pencarian permohonan lab maupun informasi terduga / pasien yang ingin dimasukkan/diinput hasil pemeriksaan LPA lini dua.

- Pilih permohonan laboratorium yang akan dilakukan input hasil pemeriksaan LPA lini dua.

No	Fayakes	No Identitas Sediaan	Tanggal Permohonan	Nama Terduga / Pasien TBC	umur	Jenis Kelamin	Alamat	Alasan Pemeriksaan	Status Pengobatan	Jenis Pemeriksaan	Status Tes	Tanggal Contoh Uji Diterima / Konfirmasi Persema	Konfirmasi Penerimaan Contoh Uji	Informasi Pemeriksaan	Notifkasi	Status Hasil	
1	RSUP Peshahabatan	20217201	21/04/2020	Pangeran Rayhan Rashal	22 th 3 ta	L	J. MATRAMAN LUAR NO 10 RT. 03	Diagnosis TB RO	Belum Mulai Pengobatan	- LPA lini 2 - Paket standar - Keparatan	Rekan						Rekan Adis
2	RSUP Peshahabatan	20217201	02/04/2020	DWI RIYANTO	62 th 11 ta	L	J. CIKUNIR BUI-AK RT.43	Diagnosis TB SO	Belum Mulai Pengobatan	- Mikroskopis - Xpert (TCM)	Sudah	04/04/2020	Dobor	Pemeriksaan Sifat Biakan			Dokter Adis

- Pada bagian input hasil laboratorium, sebelumnya dilakukan konfirmasi kondisi penerimaan contoh uji / spesimen di laboratorium. Jika pemeriksaan dapat dilakukan maka dapat dilanjutkan untuk melakukan input hasil pemeriksaan LPA lini dua atau hasil lab lainnya.

**Informasi Detil Permohonan Pemeriksaan Bakteriologis TBC**

**Edit Hasil Pemeriksaan Laboratorium**

Tanggal Contoh Uji Diterima / Konfirmasi Penerimaan \* 28/02/2020

Jenis Contoh Uji Darah

Konfirmasi Penerimaan Contoh Uji \* Baik

Informasi Pemeriksaan \* Pemeriksaan dapat dilakukan

Penerima / Pemeriksa Contoh Uji

Tanggal Register \* 28/02/2020

Dokter Pj Pemeriksa Lab \* dr. Budi Haryanto Sp. IAK

Keterangan

Pemeriksaan Visual Dahak di Laboratorium

	Manah lendir	Bercak darah	Air liur
Sewaktu	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

• Hasil Pemeriksaan Mikroskopis (Baktamnya)

• Hasil Pemeriksaan Xpert (TCM)

• Hasil Pemeriksaan TCM XDR

• Hasil Pemeriksaan LPA lini satu

• Hasil Pemeriksaan LPA lini dua

Contoh Uji	No. Reg Lab	Tanggal Hasil	Jenis Contoh Uji	Item Uji	Hasil Uji	Catatan
			Darah	LPA lini dua		
				MTB		
				LA		

- Pada bagian hasil pemeriksaan laboratorium, otomatis jenis pemeriksaan akan terbuka sesuai dengan jenis pemeriksaan yang diminta pada permohonan laboratorium. Input hasil pemeriksaan LPA lini dua sesuai dengan data yang diminta dan klik simpan.

**Informasi tambahan:**

- Jika hasil pemeriksaan LPA lini dua adalah “invalid atau sesuai dengan ketentuan pengulangan”, maka lakukan pengulangan LPA dari spesimen isolat/DNA, kemudian input kembali hasil tersebut ke SITB tanpa harus melakukan permohonan lab baru.
- Penginputan pengulangan pemeriksaan LPA lini dua akan otomatis dapat diisi jika hasil pemeriksaan LPA lini ke-1 invalid atau sesuai dengan ketentuan pengulangan.

- Hasil pemeriksaan LPA lini dua yang telah diinput di SITB otomatis dapat dilihat oleh pihak / fasyankes pengirim secara *realtime*.

## BAB IX. PEMBIAYAAN

Pembiayaan pemeriksaan LPA lini dua sampai saat ini masih ditanggung oleh Program Nasional Penanggulangan TB dan mengacu pada peraturan yang berlaku.

### A. Biaya Transportasi Spesimen untuk Pemeriksaan LPA Lini Dua

Biaya pengiriman dahak dari fasyankes pelaksana layanan TBC RO ke laboratorium LPA lini dua (sesuai pembagian wilayah rujukan spesimen TBC) sesuai ketentuan sebagai berikut:

1. Jasa pengemasan dahak sebesar Rp 25.000,-/ terduga atau pasien dengan perhitungan biaya tersebut sudah termasuk dengan penggantian material yang dibutuhkan untuk melakukan pengemasan dahak
2. Biaya kurir atau transportasi dari fasyankes pelaksana layanan TBC RO ke laboratorium LPA lini dua: *real cost*, wajar atau Rp. 25.000 jika tidak ada *invoice* dengan menyertakan tanda terima.  
Jika pengiriman dahak tidak dilakukan oleh kurir, misalnya oleh petugas Dinkes atau RS, maka bisa dibuatkan justifikasi dan biaya transportasi dapat disesuaikan dengan *real cost*.
3. Dokumen yang harus disertakan untuk kelengkapan administrasi sesuai dengan Surat Edaran Direktur P2PML tentang Pemberitahuan Terkait Pembaharuan Petunjuk Pembayaran GF ATM Komponen TB dalam Kegiatan MPTRO (08 Mei 2020 dan selanjutnya menyesuaikan dengan SE Direktur P2PML terbaru) dengan rincian dokumen antara lain, adalah:
  - a. Fotokopi formulir TBC-05 masing-masing terduga/pasien TBC RO atau fotokopi formulir TBC-04 yang menunjukkan hasil “**TBC Resistan Rifampisin**” dari TCM
  - b. *Invoice* asli atau kuitansi dari kurir (*real cost*, wajar)
  - c. Surat tugas jika diantar oleh petugas Dinkes atau Fasyankes
  - d. Dana yang digunakan adalah “*Packing and transportation cost for specimen transportation*” (*budget line:86*)
4. Klaim dapat dilakukan per bulan atau maksimal penagihan 6 bulan sejak sampel diterima. Contoh: Sampel diterima pada bulan Januari 2018, maka maksimal penagihan pada bulan Juli 2018.
5. Tagihan klaim dilakukan ke Dinas Kesehatan Provinsi sesuai asal pasien

### B. Biaya Pemeriksaan LPA Lini Dua

1. Pengajuan klaim biaya pemeriksaan dilakukan oleh laboratorium LPA yang telah ditetapkan oleh Kementerian Kesehatan RI.
2. Biaya untuk pemeriksaan LPA lini 2 adalah Rp. 220.000 yang meliputi pemeriksaan BTA, penggantian Bahan Habis Pakai (BHP), jasa, pencatatan, dan pelaporan.
3. Dokumen yang harus dilampirkan pada saat pengajuan klaim pemeriksaan LPA lini 2 sesuai dengan ketentuan pada Surat Pemberitahuan Terkait Pembaharuan Petunjuk Pembayaran GF ATM Komponen TB dalam

Kegiatan MTPTRO tanggal 08 Mei 2020 dan akan menyesuaikan dengan Surat Edaran terbaru yang dikeluarkan oleh Direktur P2PML.

4. Pemeriksaan LPA lini dua dibayarkan untuk pasien Resistan Rifampisin apabila ada hasil pemeriksaan LPA lini dua (resistan atau sensitif). Hasil pemeriksaan yang invalid tidak dapat dilakukan klaim.
5. Klaim dapat dilakukan per bulan atau maksimal penagihan 6 bulan sejak sampel diperiksa. Contoh: Sampel diperiksa pada bulan Januari 2018, maka maksimal penagihan pada bulan Juli 2018.
6. Pemeriksaan LPA lini dua dapat diklaimkan kepada Dinas Kesehatan provinsi sesuai asal pasien.

**Catatan:**

Pada tahap awal pengembangan laboratorium LPA lini 2 penyediaan peralatan dan kit LPA lini dua didukung oleh Program Penanggulangan Tuberkulosis. Selanjutnya diharapkan masing-masing laboratorium menyediakan BHP yang diperlukan.

## REFERENSI

- FIND. 2012. *Molecular Detection of Drug-Resistant Tuberculosis By Line Probe Assay*. Laboratory Manual for Resource-Limited Settings. Geneva: FIND.
- FIND. 2016. GT BLOT 48 Use and Maintenance.
- Global Laboratory Initiative. 2018. *Line Probe Assay for Drug-Resistant Tuberculosis Detection: Interpretation and Reporting Guide for Laboratory Staff and Clinicians*
- Hain Lifescience. 2013. *TwinCubator Operator's Manual*. Jerman: Hain Lifescience GmbH.
- Hain Lifescience. 2013. *GenoScan Operator's Manual*. Jerman: Hain Lifescience GmbH.
- Hain Lifescience. 2014. *GT Blot Operator's Manual*. Jerman: Hain Lifescience GmbH.
- Hain Lifescience. 2016. *GenoType MTBCDRsl Ver 2.0. Instructions for Use*. Jerman: Hain Lifescience GmbH.
- Kementerian Kesehatan RI. 2012. Petunjuk Teknis Pemeriksaan Biakan, Identifikasi, dan Uji Kepekaan Mycobacterium tuberculosis pada Media Padat. Jakarta.
- Kementerian Kesehatan RI, 2016. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 67 tahun 2016 tentang Penanggulangan Tuberkulosis. Jakarta.
- Kementerian Kesehatan RI. 2016. Pengajuan Pembayaran Dana Global Fund dalam Kegiatan Manajemen Terpadu Pengendalian TBC Resistan Obat. Jakarta.
- Kementerian Kesehatan RI. 2017. Petunjuk Teknis Pengelolaan Logistik Tuberkulosis. Jakarta.
- Kementerian Kesehatan RI. 2019. Pedoman Manajemen Terpadu Pengendalian Tuberkulosis Resistan Obat (*draft*). Jakarta.
- WHO. 2016. *Tuberculosis Diagnostics. Molecular line-probe assay for the detection of resistance to Second-Line Anti-TBC Drugs (SL-LPA)*. WHO factsheet.

**LAMPIRAN**

Lampiran 1. Pembagian Wilayah Rujukan Pemeriksaan Tuberkulosis (TBC) Per 27 Oktober 2020

No.	Provinsi	Faskes / Rujukan TB RO	Lab Rujukan LPA Lini dua	Lab Rujukan Uji Kepekaan	Laboratorium Biakan <i>Follow up</i> *
1	Aceh	Faskes/Rujukan MPTRO di Provinsi	Mikrobiologi FKUI	Mikrobiologi FKUI	RS Adam Malik
2	Sumatera Utara	Faskes/Rujukan MPTRO di Provinsi	Mikrobiologi FKUI	Mikrobiologi FKUI	RS Adam Malik
3	Sumatera Barat	Faskes/Rujukan MPTRO di Provinsi	Mikrobiologi FKUI	Mikrobiologi FKUI	RSP Provinsi Sumatera Barat
4	Bengkulu	Faskes/Rujukan MPTRO di Provinsi	BBLK Palembang	BBLK Palembang	BBLK Palembang
5	Jambi	Faskes/Rujukan MPTRO di Provinsi	BBLK Palembang	BBLK Palembang	BBLK Palembang
6	Sumatera Selatan	Faskes/Rujukan MPTRO di Provinsi	BBLK Palembang	BBLK Palembang	BBLK Palembang
7	Lampung	Faskes/Rujukan MPTRO di Provinsi	BBLK Palembang	BBLK Palembang	BBLK Palembang
8	Riau	Faskes/Rujukan MPTRO di Provinsi	BBLK Palembang	BBLK Palembang	BBLK Palembang
9	Kep. Riau	Faskes/Rujukan MPTRO di Provinsi	Mikrobiologi FKUI	Mikrobiologi FKUI	Mikrobiologi FKUI
10	Bangka Belitung	Faskes/Rujukan MPTRO di Provinsi	BBLK Palembang	BBLK Palembang	BBLK Palembang
11	Banten	Faskes/Rujukan MPTRO di Provinsi	Mikrobiologi FKUI	Mikrobiologi FKUI	Mikrobiologi FKUI
12	Jawa Barat	Faskes/Rujukan MPTRO Region 1	Labkes Prov Jabar	Region 1 ke Labkes Provinsi Jawa Barat	Region 1 ke Labkes Provinsi Jawa Barat



No.	Provinsi	Faskes / Rujukan TB RO	Lab Rujukan LPA Lini dua	Lab Rujukan Uji Kepekaan	Laboratorium Biakan Follow up*
12	Jawa Barat	Faskes/Rujukan MTPTRO Region 2 Faskes Rujukan MTPTRO RSP Goenawan Cisarua Bogor	Labkes Prov. Jabar Mikrobiologi FKUI	Region 2 ke RS dr H.A Rotinsulu Mikrobiologi FKUI	Region 2 ke RSP Dr. H.A Rotinsulu RSP Gunawan Cisarua Bogor
13	Jakarta	Faskes Rujukan MTPTRO RSUP Persahabatan	RSUP Persahabatan	RSUP Persahabatan	RSUP Persahabatan
14	Jawa Tengah	Faskes/Rujukan MTPTRO lainnya di Provinsi Faskes/Rujukan MTPTRO di Provinsi	Mikrobiologi FKUI RSUP Dr. Kariadi	BBLK Jakarta BLK dan PAK Provinsi Jawa Tengah	BBLK Jakarta BLK dan PAK Provinsi Jawa Tengah / BP4 Tegal / RSUP Surakarta*
15	DIY	Faskes/Rujukan MTPTRO di Provinsi	RSUP Dr. Kariadi	BLK dan PAK Provinsi Jawa Tengah	Laboratorium TB Dep. Mikrobiologi FKMMK UGM
16	Jawa Timur	Faskes/Rujukan MTPTRO di Provinsi	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya / RSUD Dr. Saiful Anwar RSP Mangunharjo*
17	Bali	Faskes/Rujukan MTPTRO di Provinsi	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya	RSUP Sanglah
18	NTB	Faskes/Rujukan MTPTRO di Provinsi	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya	RSUP Sanglah
19	NTT	Faskes/Rujukan MTPTRO di Provinsi	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya	RSUP Sanglah
20	Kalimantan Barat	Faskes/Rujukan MTPTRO di Provinsi	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya
21	Kalimantan Tengah	Faskes/Rujukan MTPTRO di Provinsi	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya
22	Kalimantan Selatan	Faskes/Rujukan MTPTRO di Provinsi	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya

No.	Provinsi	Faskes / Rujukan TB RO	Lab Rujukan LPA Lini dua	Lab Rujukan Uji Kepekaan	Laboratorium Biakan Follow up*
23	Kalimantan Timur	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	BBLK Surabaya	UPTD Labkes Provinsi Kalimantan Timur	UPTD Labkes Provinsi Kalimantan Timur
24	Kalimantan Utara	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	BBLK Surabaya	UPTD Labkes Provinsi Kalimantan Timur	UPTD Labkes Provinsi Kalimantan Timur
25	Gorontalo	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	HUMRC Makassar	BLK Daerah Provinsi Sulawesi Utara	BLK Daerah Provinsi Sulawesi Utara
26	Sulawesi Utara	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	HUMRC Makassar	BLK Daerah Provinsi Sulawesi Utara	BLK Daerah Provinsi Sulawesi Utara
27	Sulawesi Barat	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	HUMRC Makassar	BBLK Makassar	BBLK Makassar
28	Sulawesi Tengah	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	HUMRC Makassar	BBLK Makassar	BBLK Makassar
29	Sulawesi Tenggara	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	HUMRC Makassar	BBLK Makassar	BBLK Makassar
30	Sulawesi Selatan	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	HUMRC Makassar	BBLK Makassar	HUMRC Makassar
31	Maluku Utara	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	HUMRC Makassar	BLK Daerah Provinsi Sulawesi Utara	BLK Daerah Provinsi Sulawesi Utara
32	Maluku	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	HUMRC Makassar	BBLK Makassar	BBLK Makassar
33	Papua	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya	BLK Daerah Papua
34	Papua Barat	Faskes/Rujukan MPTPRO di Provinsi	BBLK Surabaya	BBLK Surabaya	BLK Daerah Papua

**Catatan:**

- \*) Region 1 dan 2 untuk Provinsi Jawa Barat, pembagian rujukan pemeriksaan biakan dan uji kepekaan TBC menyesuaikan dengan jejaring yang telah diatur oleh Dinas Kesehatan Provinsi (untuk rujukan ke Labkes Prov Jabar dan RSP Rotinsulu).
- \*) Untuk Provinsi Jawa Tengah dan Jawa Timur yang memiliki lebih dari 1 (satu) laboratorium biakan maka untuk pemeriksaan follow up pasien TBC RO pembagian rujukan pemeriksaan diatur oleh Dinas Kesehatan Provinsi.

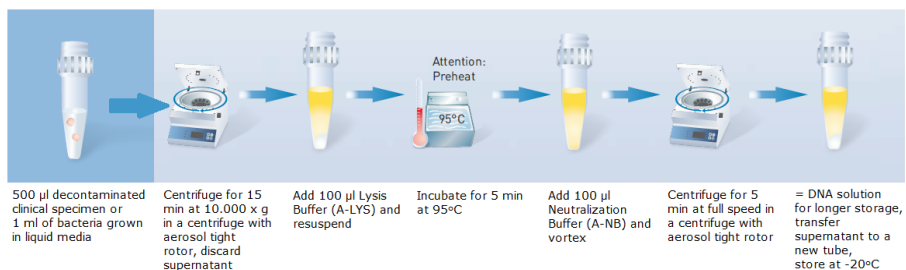
## Lampiran 2. Prosedur Ekstraksi DNA dari Sampel Biakan MGIT / Sputum

**A. ALAT:**

1. BSC tipe 2A
2. *Microsentrifuge*
3. *Waterbath*
4. Mikropipet
5. *Vortex*
6. Masker N95

**B. BAHAN**

1. Sodium Hipoklorit 1-1,5% (*fresh*)
2. Alkohol 70%
3. Tabung 1,5 ml dengan tutup ulir
4. Tips 1000 µl dengan filter
5. Tips 100 µl dengan filter
6. Kit Ekstraksi DNA
7. Plastik limbah

**C. PROSEDUR KERJA**

1. Nyalakan *waterbath* kurang lebih 2 jam sebelum memulai ekstraksi DNA agar tercapai suhu 95°C.
2. Bersihkan area kerja dan peralatan dengan menggunakan sodium hipoklorit 1-1,5%, bilas kembali dengan alkohol 70%.
3. *Aliquot buffer* A-LYS dan A-NB kedalam tabung yang lebih kecil.
4. Ambil 500 µl sampel hasil dekontaminasi dan pindahkan kedalam tabung tutup ulir. Jika menggunakan hasil biakan medium cair, ambil 1000 µl dan pindahkan ke dalam tabung tutup ulir.
5. Sentrifuge selama 15 menit pada 10.000 xg, diamkan 15 menit sebelum dibuka (buka dalam BSC) untuk menghindari aerosol lalu buang supernatan dengan hati-hati.
6. Menambahkan 100 µl A-Lys, campur kedalam pelet lalu homogenkan dengan *vortex*.
7. Jika menggunakan sampel biakan medium padat, ambil koloni menggunakan *loop* inokulasi dan larutkan ke dalam 100 µl A-Lys.
8. Inkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 95°C selama 5 menit, lalu *spin down*.

9. Menambahkan 100 µl A-NB dan homogenkan dengan *vortex* selama 5 detik.
10. Sentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan penuh (minimal 13.000 xg)
11. Mengambil 100 µl DNA pada permukaan atas dan pindahkan ke dalam tabung baru
12. Menyimpan DNA pada suhu -20°C.

**Catatan :**

- Untuk ekstraksi, kontrol negatif menggunakan ddH<sub>2</sub>O dan kontrol positif menggunakan koloni dari strain H37Rv.
- Penanganan spesimen infeksius harus dilakukan dalam BSC Tipe 2A.
- Sampel yang potensial infeksius harus disentrifus dalam BSC Tipe 2A atau dalam rotor kedap udara.
- Buka rotor kedap udara hanya dalam BSC Tipe 2A.
- Untuk sampel inaktivasi, rotor standar dapat digunakan untuk sentrifugasi di luar BSC.

Lampiran 3. Volume Reagen yang Harus Disiapkan dalam Tahapan Hibridisasi

Volume Reagen	Jumlah Produk PCR (n)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
HYB (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
STR (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
RIN (ml)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45
H <sub>2</sub> O (ml)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45
CON-C (µl)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
SUB-C (µl)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
CON-D (µl)	990	1980	2970	3960	4950	5940	6930	7920	8910	9900	10890	11880	12870	13860	14850
SUB-D (µl)	990	1980	2970	3960	4950	5940	6930	7920	8910	9900	10890	11880	12870	13860	14850

**Catatan:**

Untuk menghindari kekurangan volume reagen saat mengerjakan sampel (misal karena *error* pipet/adanya gelembung udara), lebihkan volume reagen sesuai ketentuan berikut:

- Jika menggunakan alat hibridisasi manual, volume reagen dilebihkan 1 kali dari jumlah produk PCR (n).
- Jika menggunakan alat hibridisasi otomatis, volume reagen dilebihkan 6-10 kali dari jumlah produk PCR (n).













Lampiran 6. Formulir TBC-05

PENANGGULANGAN TBC NASIONAL

TBC.05  
INDONESIA/0002

**FORMULIR PERMOHONAN PEMERIKSAAN BAKTERIOLOGIS TBC**

Nama Fasyankes : \_\_\_\_\_ Nama Dokter Pengirim : \_\_\_\_\_  
 Kode Fasyankes : \_\_\_\_\_  
 No. Rekam Medis : \_\_\_\_\_  
 Nama Terduga/Pasien TBC : \_\_\_\_\_ No. Telp. Pasien : \_\_\_\_\_  
 No. Induk Kependudukan : \_\_\_\_\_ No. BPJS : \_\_\_\_\_  
 Jenis Kelamin :  Laki-laki  Perempuan Umur : \_\_\_\_\_ tahun  
 Alamat lengkap : \_\_\_\_\_  
 Kabupaten/ Kota : \_\_\_\_\_  
 Provinsi : \_\_\_\_\_

Jenis Terduga/Pasien TBC

TBC SO  Anak  HIV  DM  
 TBC RO

**No. Identitas Sediaan**

Tanggal pengambilan contoh uji : \_\_\_\_\_  
 Tanggal pengiriman contoh uji : \_\_\_\_\_  
 Tanda tangan pengambil contoh uji : \_\_\_\_\_

**Alasan Pemeriksaan :**

Diagnosis TBC  Diagnosis TBC RO  
 Pemantauan kemajuan pengobatan :  
 Bulan ke : \_\_\_\_\_  
 Pemeriksaan ulang pasca pengobatan :  
 Bulan ke : \_\_\_\_\_

No.Reg.TBC/TBC RO Fasyankes : \_\_\_\_\_  
 No.Reg.TBC/TBC RO Kab/ Kota : \_\_\_\_\_

**Jenis Pemeriksaan**

Mikroskopis  
 Xpert (TCM)  
 LPA Lini 2  
 Biakan  
 Paket standar uji kepekaan

**Lokasi Anatomi**

Paru  
 Ekstraparu  
 Lokasi : \_\_\_\_\_

**Contoh Uji**

Dahak  
 Lainnya \_\_\_\_\_

**Secara visual dahak tampak (berilah v pada kotak)**

	Nanah lendir	Bercak darah	Air liur
Sewaktu / Pagi*)	□	□	□
Sewaktu / Pagi*)	□	□	□

\*) Tanggal yang sesuai

.....20.....  
 (.....)  
 Nama jelas dokter pengirim

---

**HASIL PEMERIKSAAN BAKTERIOLOGIS TBC**

No. Register Lab. (sesuai Buku Register Lab TBC.04) : \_\_\_\_\_

Contoh Uji*)	Tanggal Hasil	Hasil Pemeriksaan Mikroskopis (BTA/lainnya) <sup>*)</sup>				
<input type="checkbox"/> Sewaktu/Pagi		+++	++	+	1-9 <sup>MT</sup>	Neg
<input type="checkbox"/> Sewaktu/Pagi		□	□	□	□	□

Contoh uji*)	Tanggal Hasil	Hasil Pemeriksaan Xpert (TCM) <sup>*)</sup>						
<input type="checkbox"/> Sewaktu/Pagi		Neg	Rif Sen	Rif Res	Rif Indet	Invalid	Error	No result
		□	□	□	□	□	□	□

Disisi bila ada Ulangan bagi pasien low risk

Contoh uji*)	Tanggal Hasil	Hasil Pemeriksaan LPA Lini 2			
<input type="checkbox"/> Sewaktu/Pagi		MTB <sup>MT</sup>	FQ <sup>MT</sup>	SLID <sup>MT</sup>	Invalid <sup>MT</sup>
		□	□	□	□

Contoh Uji*)	Tanggal Hasil	Hasil Biakan <sup>*)</sup>						
<input type="checkbox"/> Sewaktu/Pagi		3+	2+	1+	1-9 <sup>MT</sup>	Neg	NTM	KTM
		□	□	□	□	□	□	□

Contoh Uji*)	Tanggal Hasil	Hasil Paket Standar Uji Kepekaan <sup>*)</sup>									
<input type="checkbox"/> Sewaktu/Pagi		H Dosis Tinggi	H	Km	Cm	Lfx	Mfx Dosis Tinggi	Mfx	..	..	..
		□	□	□	□	□	□	□	□	□	□

Tanda tangan pemeriksa

.....

Mengetahui  
Dokter PI pemeriksaan Lab

.....

\*) Dibil sesuai dengan kode huruf sesuai identitas sediaan/waktu pengambilan dahak.  
 \*\*) Hasil pemeriksaan mikroskopis, TCM, dan Biakan: Beri tanda rumput pada hasil pemeriksaan yang sesuai  
 Hasil LPA Lini 2 (biakan): Beri tanda rumput bila hasil tidak dapat diinterpretasi  
 \*\*\*) Isi dengan jumlah RT23 koloni yang ditemukan  
 \*\*\*\*) Dibil Pos jika positif, Neg jika negatif  
 Hasil uji kepekaan dan hasil LPA Lini 2 (Tq): H=H jika resisten, di= S jika sensitif  
 SLID: Lini H jika salah satu hasil berikut resisten (Isis/Km/Cm, Km/Cm/Isis, Km/Isis/Cm/Isis, Low Level Isis), di= S jika semuanya sensitif

Stiker Hasil LPA untuk Form TBC-05

Pemeriksaan LPA Lini Dua								
Centang Uji	Tgl Hasil Dilaporkan	MTB	Lfx	Mfx	Mfx DT	Km	Amk	Cm
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sewaktu/Pasi		<u>Saran Implikasi Klinis:</u>						

Pemeriksaan LPA Lini Dua								
Centang Uji	Tgl Hasil Dilaporkan	MTB	Lfx	Mfx	Mfx DT	Km	Amk	Cm
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sewaktu/Pasi		<u>Saran Implikasi Klinis:</u>						



Lampiran 8. Format Pola Resistansi dan IKU

a. Format Pola Resistansi

Lampiran ke: LRN.mikrobiologi@yahoo.com cc: ipatb.indonesia@gmail.com

DATA DASAR LABORATORIUM LPA LINI 2									
Nama	0								
provinsi	0								
Kab/kota	0								
Periode pelaporan	Triwulan 1	Tahun	2019						
POLA RESISTANSI PEMERIKSAAN LPA LINI 2									
No	No. Identitas Sediaan	Nama Lengkap Pasien	Jenis Kelamin	Umur (tahun)	Kabupaten/kota Asal Pasien	Provinsi Asal Pasien	Nama Fasyankes Pengirim	Kabupaten/Kota Fasyankes Pengirim	Provinsi Fasyankes Pengirim
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									

... Pola Resistansi TW1    Pola Resistansi TW2    Pola Resistansi TW3    Pola Resistansi TW4    IKU.TW







Hasil		Resistansi OAT Lini 2		Tanggal isolat tumbuh/diterima	Tanggal hasil dilaporkan di ETBM	TAT (Selisih hari)	Jenis Sampel	Hasil Pemeriksaan LPA Lini 2 (Pengulangan)						
Mfx DT	Km	Ank	Cm	(52)	(53)	(54)	(55)	CC	AC	TUB	gyrA	gyrA WT1	gyrA WT2	gyrA WT3
(47)	(48)	(49)	(50)	(51)	(52)	(53)	(54)	(57)	(58)	(59)	(60)	(61)	(62)	(63)
						0								
						0								
						0								
						0								
						0								
						0								
						0								
						0								
						0								

... Pola Resistansi TW1

... Pola Resistansi TW2

... Pola Resistansi TW3

... Pola Resistansi TW4

... IKU TW





**b. Format Indikator Kinerja Utama (IKU)**

Laporkan ke: LRT.mikrobiologi@yahoo.com cc: jpatb.indonesia@gmail.com

DATA DASAR LABORATORIUM LPA LINI 2		Nama		Provinsi		Kab/Kota		Periode pelaporan	
		0		0		Tahun		2019	
IKU LPA LINI 2		Deskripsi							
No	Indikator	Pembilang		Penyebut		Target	IKU		
		Jumlah sampel Rif Res + FQ Res	Jumlah sampel Rif Res + FQ Res dan SLID Res	Jumlah total sampel rifampisin resisten yang diuji	Jumlah total sampel rifampisin resisten yang diuji				
1	Jumlah dan proporsi sampel Rif Res + FQ Res	Jumlah sampel Rif Res + FQ Res	Jumlah sampel Rif Res + FQ Res dan SLID Res	Jumlah total sampel rifampisin resisten yang diuji	Jumlah total sampel rifampisin resisten yang diuji	Bergantung pada populasi yang diuji dan prevalensi serta pola resistensi obat di suatu negara	#DIV/0!		
2	Jumlah dan proporsi sampel Rif Res + SLID Res	Jumlah sampel Rif Res + SLID Res	Jumlah sampel Rif Res + FQ Res dan SLID Res	Jumlah total sampel rifampisin resisten yang diuji	Jumlah total sampel rifampisin resisten yang diuji	Bergantung pada populasi yang diuji dan prevalensi serta pola resistensi obat di suatu negara	#DIV/0!		
3	Jumlah dan proporsi sampel Rif Res + FQ Res dan SLID Res	Jumlah sampel Rif Res + FQ Res dan SLID Res	Jumlah sampel Rif Res + FQ Res dan SLID Res	Jumlah total sampel rifampisin resisten yang diuji	Jumlah total sampel rifampisin resisten yang diuji	Bergantung pada populasi yang diuji dan prevalensi serta pola resistensi obat di suatu negara	#DIV/0!		

← ▶ ... Pola Resistansi TW2 ▶ Pola Resistansi TW3 ▶ Pola Resistansi TW4 ▶ IKU TW1 ▶ IKU TW2 ▶ IKU TW3 ▶

4	Jumlah dan proporsi sampel dengan hasil invalid (pemeriksaan pertama)	Jumlah sampel dengan hasil invalid	0	Jumlah total sampel rifampisin resistan yang diuji	0	<5%	#DIV/0!				
5	Jumlah dan proporsi sampel dengan hasil invalid (pemeriksaan ulang)	Jumlah sampel dengan hasil invalid	0	Jumlah total sampel rifampisin resistan yang diuji	0	<5%	#DIV/0!				
6	<i>Turnaround time</i> (pemeriksaan pertama)	Sampel yang dilaporkan dalam 7 hari	0	Jumlah total sampel rifampisin resistan yang diuji	0	90%	#DIV/0!				
7	<i>Turnaround time</i> (pemeriksaan ulang)	Sampel yang dilaporkan dalam 7 hari	0	Jumlah total sampel rifampisin resistan yang diuji	0	90%	#DIV/0!				
8	Jumlah dan proporsi sampel Rif Res, tetapi TUB Neg	Jumlah sampel Rif Res, tetapi TUB Neg	0	Jumlah total sampel rifampisin resistan yang diuji	0		#DIV/0!				
9	Jumlah dan proporsi sampel BTA Pos dengan hasil LPA Valid	Jumlah hasil LPA Valid dari BTA Pos	0	Jumlah sampel dengan BTA Pos	0		#DIV/0!				
10	Jumlah dan proporsi sampel BTA Pos dengan hasil LPA Invalid	Jumlah hasil LPA Invalid dari BTA Pos	0	Jumlah sampel dengan BTA Pos	0		#DIV/0!				
11	Jumlah dan proporsi sampel BTA Neg dengan hasil LPA Valid	Jumlah hasil LPA Valid dari BTA Neg	0	Jumlah sampel dengan BTA Neg	0		#DIV/0!				
12	Jumlah dan proporsi sampel BTA Neg dengan hasil LPA Invalid	Jumlah hasil LPA Invalid dari BTA Neg	0	Jumlah sampel dengan BTA Neg	0		#DIV/0!				
NOTE											
FQ Res											

**Format IKU (lanjutan)**

11	Jumlah dan proporsi sampel BTA Neg dengan hasil LPA Valid	Jumlah hasil LPA Valid dari BTA Neg	0	Jumlah sampel dengan BTA Neg	0	#DIV/0!
12	Jumlah dan proporsi sampel BTA Neg dengan hasil LPA Invalid	Jumlah hasil LPA Invalid dari BTA Neg	0	Jumlah sampel dengan BTA Neg	0	#DIV/0!
NOTE						
FQ Res						
Jika salah satu obat atau lebih dari gol.FQ resistan						
Gol obat FQ : Lfx, Mix						
SLUD Res						
Jika salah satu obat atau lebih dari gol.SLUD resistan						
Gol obat SLUD : Km, Amk, Cm						

...
Pola Resistansi TW2
Pola Resistansi TW3
Pola Resistansi TW4
IKU TW1
IKU TW2
IKU TW3
IKU TW4





Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit  
Subdirektorat Tuberkulosis  
Kementerian Kesehatan  
Republik Indonesia

[www.tbindonesia.or.id](http://www.tbindonesia.or.id)

ISBN 978-623-301-030-6

ISBN 978-623-301-030-6

