

Pemeriksaan Molekular *Treponema pallidum*

Ida Effendi

Staf Pengajar Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti
Alamat korespondensi: idaeffendi@trisakti.ac.id

Abstrak

Treponema pallidum adalah bakteri penyebab sifilis. Sifilis ditemukan pada abad ke XV di dataran Eropa, menyebar ke seluruh dunia dan menjadi isu global sampai saat ini. Sifilis dikenal dengan sebutan raja singa merupakan salah satu penyakit infeksi menular seksual yang penularannya tidak hanya melalui hubungan seksual. Infeksi lokal yang disebabkan oleh masuknya *Treponema pallidum* akan berkembang cepat menjadi sistemik dan bahkan dapat mengancam nyawa. *Treponema pallidum* tidak dapat dikultur secara *in vitro*. Pemeriksaan penunjang untuk menegakkan diagnosis mengandalkan uji serologi. Saat ini, pemeriksaan standar untuk sifilis menggunakan mikroskop lapangan gelap sulit dilakukan. Pemeriksaan baru untuk mendeteksi *Treponema pallidum* menggunakan uji molekuler sudah mulai dikembangkan sejak abad XX. Penulisan ini mengambil ulasan dari beberapa jurnal penelitian yang menggunakan PCR sebagai alat diagnostik *Treponema pallidum* untuk membandingkan metode-metode pemeriksaan molekuler PCR *Treponema pallidum*. Spesifisitas PCR *Treponema pallidum* mencapai 100%. Sensitivitas PCR bervariasi untuk setiap gen target dan jenis spesimen yang digunakan. Metode *multiplex* PCR banyak digunakan karena dapat mendeteksi *Treponema pallidum* dan patogen lain secara bersamaan. Pemeriksaan molekuler PCR *Treponema pallidum* masih perlu dikembangkan lebih lanjut di Indonesia.

Kata kunci : *Treponema pallidum*, sifilis, uji serologi, mikroskop, pemeriksaan molekular

Molecular Tests for Treponema pallidum

Abstract

Treponema pallidum is bacteria that causes syphilis. Syphilis was discovered in the XV century in Europe, spreading throughout the world and becoming a global issue to date. Syphilis known as Raja singa is one of the sexual transmitted disease that is transmitted through sexual contact. Local infections caused by *T.pallidum* rapidly spread into systemic and become life-threatening. *T.pallidum* cannot be cultured *in vitro*. Laboratory test for diagnosing syphilis relies on serological tests. The standard test for syphilis using dark field microscopy is difficult nowadays. New innovations to detect *T.pallidum* using molecular tests have been developed since the twentieth century. This study aimed to compare different reported PCR methods in the detection of *T. pallidum*. Specificity of PCR *T.pallidum* reaches 100%. The sensitivity of PCR varies for each target gene and the type of specimen used. The multiplex PCR is widely used because it can detect *T. pallidum* and other pathogens simultaneously. Molecular examination of *T. pallidum* using PCR method still needs to be further developed in Indonesia.

Keywords : *Treponema pallidum*, syphilis, serology test, microscop, molecular test

Pendahuluan

Sifilis merupakan salah satu penyakit infeksi menular seksual yang disebabkan oleh bakteri *Treponema pallidum*. Sifilis pertama kali ditemukan di benua Eropa pada abad XV. Penyakit sifilis telah menyebar ke seluruh negara di dunia. Pada abad XX, insiden dan prevalensi sifilis telah menurun, namun sejak tahun 2000 beberapa negara di Amerika, Eropa, dan Inggris melaporkan peningkatan kasus sifilis primer dan sekunder.¹ Di Indonesia, berdasarkan survei yang dilakukan oleh Surveilans Terpadu Biologis dan Perilaku (STBP) pada tahun 2007 dan 2011 terhadap populasi paling beresiko didapatkan peningkatan prevalensi sifilis.² Pada kelompok pengguna napza suntik/penasun didapatkan peningkatan prevalensi sebesar 2% (1% menjadi 3%), kelompok waria 1% (27% menjadi 28%), dan kelompok laki-laki yang berhubungan seks dengan laki-laki/LSL 9% (4% menjadi 13%). Dari survei yang dilakukan di 23 kota besar di Indonesia didapatkan prevalensi sifilis tertinggi pada waria (25%), kemudian diikuti wanita penaja seks langsung/WPSL (10%), LSL (9%), warga binaan pemasyarakatan/WBP (5%), pria potensial risti (4%), wanita penaja seks tidak langsung/ WPSTL (3%), dan penasun (2%).⁽²⁾ Begitu pula di Jakarta, prevalensi tertinggi terdapat pada waria (31.2%).²

Treponema pallidum merupakan patogen penyebab sifilis. Invasi *Treponema pallidum* akan menimbulkan infeksi local dan berkembang cepat menjadi sistemik serta dapat mengancam jiwa. Dalam menegakkan diagnosis sifilis sangat diperlukan pemeriksaan penunjang laboratorium karena manifestasi klinis sifilis sangat bervariasi dan menyerupai banyak penyakit lain. *Treponema pallidum* tidak dapat dikultur secara *in vitro*. Pemeriksaan penunjang untuk menegakkan diagnosis sifilis sampai saat ini mengandalkan uji serologi. Uji serologi dapat menunjukkan hasil positif palsu dan negatif palsu. Pemeriksaan molekuler *Treponema pallidum* bersifat sangat spesifik dan diharapkan menjadi alat diagnostik baru untuk sifilis.

Oleh karena itu, penulis akan membandingkan beberapa metode pemeriksaan molekuler *Treponema pallidum* sebagai alat diagnostik sifilis yang masih perlu dikembangkan lebih lanjut. Sumber utama tulisan ini berasal dari beberapa jurnal

penelitian yang menggunakan PCR sebagai alat diagnostik *Treponema pallidum*.

Treponema pallidum

Treponema pallidum merupakan Spirochaeta motil berbentuk spiral yang ramping dengan ukuran panjang 5-15 μm dan diameter 0.16-0.2 μm .^{1,3,4} *Treponema pallidum* ini kecil dari segi ukuran dibandingkan bakteri lain pada umumnya. Pada setiap bakteri *Treponema pallidum* terdapat 6-14 lengkung spiral dengan bagian ujung yang meruncing.^{1,4} Struktur dinding bakteri ini terdiri atas membran luar, ruang sitoplasma, lapisan peptidoglikan yang tipis yang berfungsi sebagai penopang struktur sel, dan membran sitoplasma.¹ Membran luar *Treponema pallidum* tidak mengandung lipopolisakarida (LPS) karena tidak ditemukan gen yang mengkode biosintesis LPS pada genom bakteri.⁵ Jumlah protein transmembran pada membran luar *Treponema pallidum* 100x lebih sedikit dibandingkan dengan Spirochaeta lain.⁽¹⁾ Membran sitoplasma mengandung banyak lipoprotein dengan konsentrasi yang tinggi dan bersifat imunogenik.¹ Terdapat endoflagel pada ruang periplasma yang memungkinkan gerakan seperti alat pembuka sumbat botol (*corkscrew motility*) yang merupakan karakteristik *Treponema pallidum*.^{1,3,6} Struktur genetik *Treponema pallidum* tersusun dari satu untai DNA rantai ganda berbentuk sirkuler.⁶ Genom *Treponema pallidum* sepanjang 1,14 ribu bp berhasil di sekuens secara lengkap pada tahun 1998.⁵ Analisis sekuens genom *Treponema pallidum* membuktikan bahwa bakteri ini tidak memiliki elemen genetic *transposable* maupun elemen ekstrakromosom, misalnya plasmid, bakteriofaga dan transposon yang dapat melakukan transfer gen horizontal yang berperan pada penyebaran resistensi.^{1,7} Komponen basa DNA pada genom bersifat stabil.¹ *Treponema pallidum* bersifat mikroaerofilik, kemoautotrof, mempunyai waktu generasi yang panjang (30-33 jam) dan kemampuan metabolisme yang minimal dan sangat bergantung pada pejamu.^{3,6} Oleh karena itu, mikroorganisme ini tidak bisa hidup di luar tubuh manusia dan kemampuan infeksi akan hilang dalam beberapa jam secara *in vitro*.^{3,8}

Virulensi *Treponema pallidum*

Treponema pallidum hanya menginfeksi manusia.^{1,9} Penularan sifilis dapat terjadi melalui beberapa cara yaitu hubungan seksual, penggunaan jarum suntik, transfusi darah, kontak dengan lesi infeksius dan secara transplasenta dari ibu hamil ke janinnya.^{1,3,4,10} Faktor virulensi pada *Treponema pallidum* tidak diketahui dengan jelas.^{6,10} Motilitas merupakan salah satu faktor virulensi *Treponema pallidum*. *Treponema pallidum* bergerak dengan cara rotasi pada aksis longitudinal dan mampu bergerak cepat pada daerah yang mengandung mukus. Mikroorganisme ini mampu melewati membran mukosa yang utuh, menyebar ke seluruh tubuh, serta menginfeksi sistem organ.¹¹ Pada membran sitoplasma terdapat sejumlah lipoprotein, tetapi tidak diekspresikan ke membran luar sehingga sulit dapat dikenali sistem imun pejamu.¹² Lipoprotein ini dapat menginduksi ekspresi mediator inflamasi melalui pengenalan *toll-like receptor 2* (TLR2).⁶ Apabila kontak dengan pejamu, *Treponema pallidum* dapat menempel pada sel epitel, sel *fibroblastlike*, dan sel endotel karena adanya molekul adhesin bakteri yang berinteraksi dengan intergrin pejamu (*adhesion-ligand interaction*).^{3,6} Studi pada sukarelawan yang diinokulasi dengan bakteri ini menunjukkan bahwa 10 organisme sudah dapat menyebabkan infeksi sifilis.¹ *Treponema pallidum* sangat invasif dan dengan cepat masuk ke jaringan yang lebih dalam, menembus membran mukosa dan mencapai darah dan sistem limfatikus.¹ Kerusakan jaringan dan lesi kulit akibat infeksi *Treponema pallidum* disebabkan oleh respons inflamasi

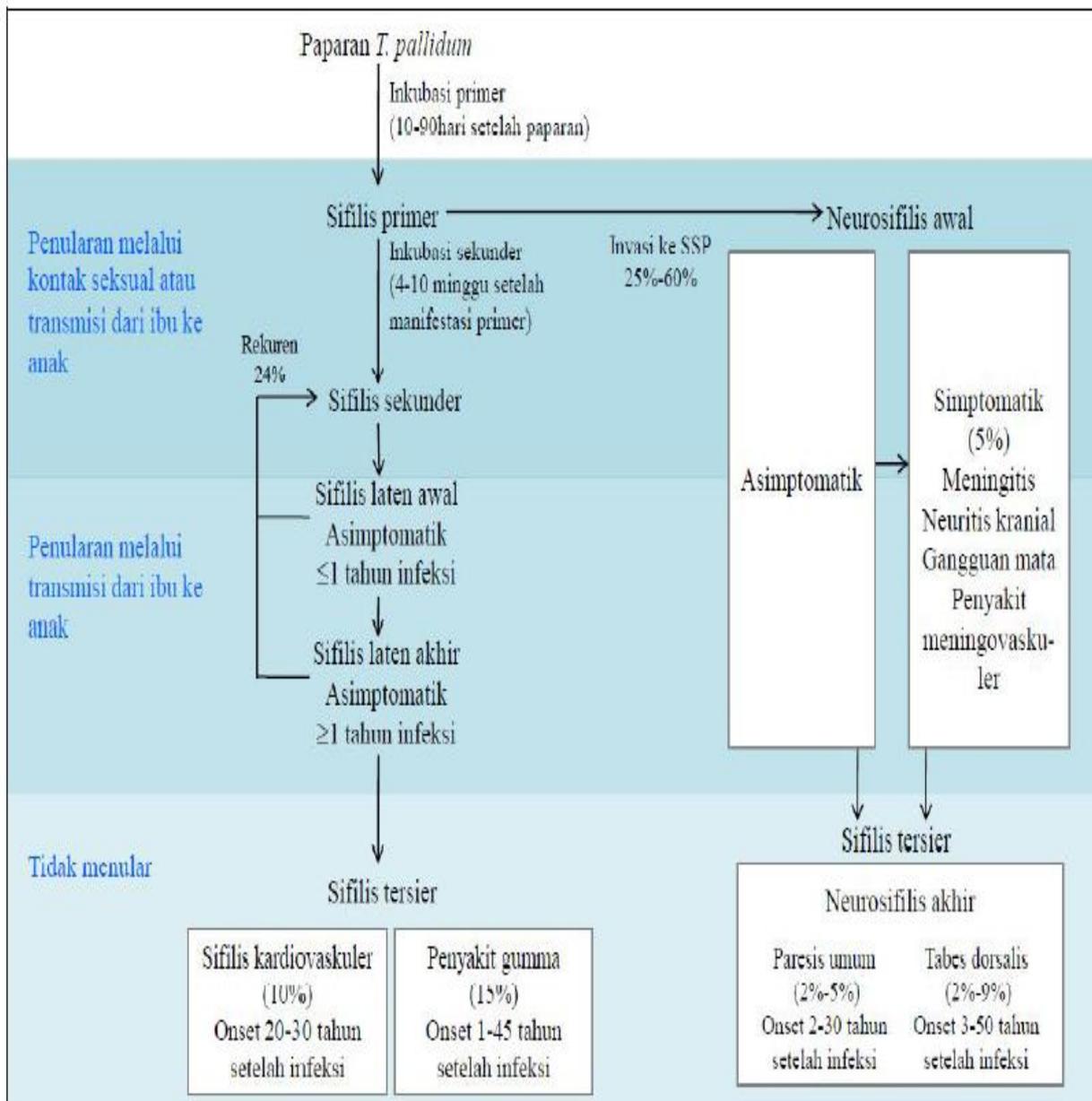
dan respons imun adaptif dari tubuh pejamu.^(6,12) Perjalanan penyakit sifilis dibagi menjadi 2 (dua) tahap, yaitu sifilis awal dan sifilis lanjut.^(1,13) Yang termasuk sifilis awal yaitu sifilis stadium primer, sekunder dan laten awal. Sedangkan yang termasuk sifilis lanjut yaitu sifilis stadium laten akhir dan tersier.¹

Sifilis

Sifilis merupakan penyakit multistadium. Manifestasi klinis sifilis sangat beragam dan menyerupai penyakit kulit yang lain. Perkembangan penyakit sifilis tergantung pada sistem imun dan kecepatan pengobatan yang adekuat.

Sifilis Stadium Primer

Treponema pallidum dapat masuk dengan cepat ke tubuh manusia melalui kulit atau mukosa yang intak.³ Masa inkubasi bervariasi antara 30-90 hari, dengan rata-rata 3 minggu. Lesi primer akan muncul 10-90 hari setelah inokulasi. Multiplikasi *Treponema pallidum* di tempat infeksi akan menimbulkan lesi primer dan pembesaran kelenjar getah bening regional.^{1,10} Reaksi inflamasi menimbulkan papul kemudian mengalami erosi menjadi lesi ulseratif. Lesi ini disebut 'chancre'.¹⁰ Pada lesi primer ditemukan banyak *Treponema pallidum* dan bersifat sangat infeksius. Lesi primer akan sembuh spontan, namun 25%-30% pasien yang tidak diobati atau dengan pengobatan yang tidak adekuat akan berkembang ke stadium sekunder.⁹ Perjalanan penyakit alamiah sifilis dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1

Perjalanan Penyakit Sifilis pada Pasien Imunokompeten yang Tidak Diobati

Dikutip dan diterjemahkan dari Ho EL, Lukehart SA. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. J Clin Invest 2011;121:4584-92 20

Tabel 1. Manifestasi Klinis Sifilis Sekunder dan Persentase Kejadian Manifestasi Kasus

Manifestasi	Kasus (%)
Kulit	90
Kemerahan*	
Makular, Makulopapular, Papular, Pustular	
Kondiloma lata	
Limfadenopati generalisata	
Mulut dan tenggorokan	35
<i>Mucous patches</i>	
Erosi	
Ulkus	
Lesi genital	20
Chancre	
Kondiloma lata	
<i>Mucous patches</i>	
Gejala penyerta	70
Demam	
Malaise	
Faringitis, laryngitis	
Anorexia	
Artralgia	
Sistem saraf pusat	
Asintomatik	8-40
Simtomatik	1-2
Sakit kepala	
Meningismus	
Meningitis	
Diplopia	
Gangguan penglihatan	
Tinnitus	
Vertigo	
Ginjal	Jarang
Glomerulonefritis	
Sindrom nefrotik	
Saluran pencernaan	Jarang
Hepatitis	Jarang
Invasi dinding intestinal	Jarang
Arthritis, osteitis dan periostitis	Jarang

*umumnya pada telapak tangan dan kaki

Dikutip dan diterjemahkan dari Tramont EC. *Treponema pallidum* (syphilis). In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015:3035-55. 6

Sifilis Stadium Sekunder

Sifilis stadium sekunder dimulai dari minggu ke-2 sampai minggu ke-12 setelah lesi primer sembuh. *Treponema pallidum* masuk ke jaringan yang lebih dalam, menembus membran mukosa, masuk dalam sirkulasi darah dan sistem limfatikus. Gambaran klinis stadium sekunder sangat bervariasi dan menyerupai kelainan kulit yang lain. Gejala sifilis sekunder dapat sembuh spontan.¹ Manifestasi klinis sifilis stadium sekunder dapat dilihat pada tabel 2.1

Sifilis Stadium Laten

Setelah lesi dan gejala sistemik pada stadium sekunder hilang, penyakit sifilis masuk ke stadium laten. Pada stadium ini penyakit berkembang menjadi subklinis, namun pemeriksaan serologi masih menunjukkan nilai reaktif. Berdasarkan waktu, stadium laten dibagi menjadi 2, stadium laten awal (< 1 tahun dari awal terinfeksi) dan stadium laten akhir (> 1 tahun dari awal terinfeksi). Pada stadium laten awal dan laten akhir dapat terjadi relaps dan gejala klinis rekuren. Pasien bersifat infeksius dan berisiko menularkan penyakit. Sebesar 90% rekurensi terjadi pada satu tahun pertama, 94% terjadi dalam 2 tahun. Pada stadium laten akhir, penyakit sifilis hanya dapat terdeteksi dengan pemeriksaan serologi.¹

Sifilis Stadium Tersier

Diperkirakan sepertiga dari pasien yang tidak diobati atau diobati namun tidak adekuat akan memasuki stadium tersier dalam periode waktu yang bervariasi.^{1,14} Gejala yang timbul pada stadium ini berupa gumma (15%) yaitu lesi granuloma pada kulit, tulang, hati atau jaringan tubuh lain. Komplikasi sifilis pada system saraf pusat (neurosifilis; 10%) dan kardiovaskular (kardiosifilis; 10%) dapat terjadi di stadium ini.¹

Sifilis Kongenital

Transmisi *Treponema pallidum* secara transplasenta dapat menyebabkan kelainan kongenital, kematian janin intrauterin, atau bayi lahir mati. Bayi yang lahir hidup dapat mengalami malformasi multiorgan, misalnya deformasi tibia (*saber shins*) dan deformasi gigi (*mulberry molars*), kebutaan, tuli, serta kelainan pada jantung.²⁰ Manifestasi pada bayi

tergantung pada stadium sifilis dan stadium kehamilan ibu. Perjalanan penyakit pada infeksi sifilis kongenital dibagi menjadi tahap sifilis kongenital awal dan sifilis kongenital akhir.¹

Pemeriksaan Konvensional *Treponema pallidum*

Manifestasi klinis yang sangat beragam dan membingungkan terutama pada sifilis stadium sekunder, menyebabkan sifilis sulit didiagnosis tanpa pemeriksaan laboratorium. Walaupun *Treponema pallidum* tidak dapat dikultur *in vitro*, ada beberapa tes yang dapat secara langsung maupun tidak langsung dapat mendeteksi *Treponema pallidum*. Deteksi langsung *Treponema pallidum* dari eksudat atau cairan lesi dapat dilakukan dengan pemeriksaan mikroskop. Deteksi langsung juga dapat dilakukan dengan teknik imunofluoresen (*fluorescent antibody test*), potongan jaringan dan pewarnaan histopatologis. Uji deteksi *Treponema pallidum* secara langsung sangat bermanfaat pada sifilis stadium primer karena antibodi belum dapat dideteksi dengan uji serologi pada stadium ini.^{1,15}

Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik merupakan pemeriksaan baku emas untuk menunjang diagnosis sifilis. Untuk melihat *Treponema pallidum* yang berukuran sangat kecil (5-15 µm) dibandingkan bakteri lain dan bentuknya yang tipis diperlukan mikroskop khusus dan pewarnaan tertentu. Pemeriksaan dapat dilakukan dengan mikroskop lapangan gelap, mikroskop imunofluoresens, atau mikroskop elektron dengan pewarnaan perak atau pewarnaan negatif. Spesimen yang dapat digunakan untuk pemeriksaan mikroskopik yaitu eksudat dari lesi sifilis. Pemeriksaan mikroskopik dapat mendeteksi *Treponema pallidum* berdasarkan karakteristik morfologi dengan cepat.¹ Keterbatasan pemeriksaan mikroskopik yaitu tidak bisa membedakan spesies *Treponema*.^{1,6} Pemeriksaan mikroskopik untuk deteksi *Treponema pallidum* di Indonesia jarang dilakukan. Hal ini disebabkan karena fasilitas pemeriksaan mikroskopik sifilis di laboratorium sangat terbatas dan kurangnya teknisi laboratorium yang kompeten.

Pemeriksaan Serologi

Deteksi *Treponema pallidum* secara tidak langsung dilakukan dengan pemeriksaan serologi. Pemeriksaan serologi dapat mendeteksi antibodi pada semua stadium sifilis, sehingga digunakan untuk berbagai tujuan. Tujuan pemeriksaan serologi antara lain untuk skrining pada populasi berisiko rendah (ibu hamil, darah donor), skrining pada populasi berisiko tinggi (SIDA, LSL), dan uji diagnostik pada pasien dengan gejala dan manifestasi sifilis untuk mengetahui stadium penyakit dan memantau respons terapi.¹ Spesimen yang digunakan untuk pemeriksaan serologi yaitu komponen serum atau plasma dari darah pasien yang diambil melalui pembuluh darah vena. Saat ini terdapat 2 jenis pemeriksaan serologi yaitu uji nontreponema dan uji konfirmasi treponema.¹⁷

Uji nontreponema bertujuan mencari adanya antibodi pada penderita yang timbul sebagai respons terhadap komponen lipid dan protein kuman atau karena kerusakan jaringan (kardiolidipin). Antibodi IgG dan IgM dapat dideteksi dengan uji nontreponema setelah 3-5 minggu infeksi.^{1,17} Yang termasuk uji nontreponema yaitu *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL) dan *Rapid Plasma Reagin* (RPR). Uji nontreponema mudah dan cepat dilakukan dan tidak mahal. Hasil uji nontreponema menunjukkan penyakit yang aktif.⁴ Sensitivitas uji nontreponema mencapai 100% pada sifilis stadium sekunder. Kelemahan uji nontreponema yaitu sensitivitas yang kurang baik pada sifilis stadium primer dan laten. Hal tersebut kemungkinan negatif palsu karena titer antibodi yang sangat tinggi (*prozone phenomenon*) tidak dapat dideteksi dan hasil positif palsu pada pasien yang mengalami infeksi akut atau kronis, keadaan imunodefisiensi, serta kehamilan (*biological false positive reaction*).^{1,17} Untuk mengetahui stadium sifilis dan memantau respons terapi diperlukan uji nontreponema secara kuantitatif. Uji nontreponema yang lazim digunakan yaitu uji flokulasi RPR (*Rapid Plasma Reagin*). Uji RPR memberikan nilai positif 80% pada pasien sifilis primer dengan titer yang relatif masih rendah sifilis sekunder, RPR selalu memberikan hasil positif dengan titer $\geq 1:16$.¹⁸ Uji RPR memberikan hasil positif dengan titer rendah pada sifilis laten, namun pada sifilis tersier titer RPR akan kembali tinggi.¹⁸

Uji *Treponema* mengukur kadar antibodi spesifik yang timbul sebagai respons terhadap komponen antigenik *Treponema pallidum*. Uji ini memiliki spesifitas dan sensitifitas yang lebih baik daripada uji nontreponema. Uji *Treponema* jarang memberikan hasil negatif palsu. Hasil positif palsu ditemukan pada infeksi oleh *Treponema* lainnya, misalnya *Treponema pallidum* subspecies *pertenue*, *Treponema pallidum* subspecies *carateum*, *Treponema pallidum* subspecies *endemicum*.⁴ Oleh karena itu uji *Treponema* digunakan sebagai uji konfirmasi bila uji nontreponema menunjukkan hasil reaktif. Pemeriksaan yang termasuk uji *Treponema* di antaranya yaitu *Treponema pallidum hemagglutination* assay (TPHA) dan *Treponema pallidum particle agglutination* (TPPA). Uji TPHA memberikan nilai positif 90% pada pasien sifilis primer. Pada pasien sifilis sekunder, TPHA selalu memberikan hasil positif. Uji TPHA dengan titer yang sangat tinggi disertai manifestasi kemerahan pada kulit sangat mendukung diagnosis sifilis sekunder.¹⁸

Pemeriksaan Molekular PCR

Reaksi berantai polimerase atau dikenal sebagai PCR (*polymerase chain reaction*) merupakan proses sintesis enzimatis untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro* tanpa menggunakan organisme. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1983.^{19,20} Penggunaan berbagai metode molekuler berbasis PCR untuk mendeteksi *Treponema pallidum* pada spesimen klinis telah dikembangkan oleh para ilmuwan sejak 1990.¹⁷ Dasar pemeriksaan PCR *Treponema pallidum* adalah mengamplifikasi sekuens tertentu sebagai gen target yang spesifik genom *Treponema pallidum*. Uji PCR dapat mendeteksi *Treponema pallidum* menggunakan beberapa gen target, misalnya *tmpA* (protein membran 45 kDa), *bmp* (protein membran 39 kDa), *tpp47* (protein membran 47 kDa), *PolA* (DNA polymerase I), *tmpC* (protein membran 35 kDa) dan 16S rRNA *Treponema pallidum*.¹⁷ Studi uji PCR *Treponema pallidum* yang telah dipublikasi antara lain dengan PCR konvensional, *Real-time* PCR, *Reverse transcriptase* PCR, *nested* PCR dan *multiplex* PCR.¹⁷ Uji PCR *Treponema pallidum* dapat menggunakan berbagai jenis spesimen klinis pasien yang disesuaikan dengan perjalanan penyakit sifilis, misalnya eksudat lesi yang

diambil dengan kapas usap pada sifilis stadium *primer* dan sekunder, darah atau komponen darah untuk sifilis semua stadium, cairan serebrospinal dan cairan sendi. Uji PCR memiliki sensitivitas dan spesifisitas >95% untuk deteksi *Treponema pallidum* pada ulkus genital sifilis *primer* menggunakan spesimen dari apusan lesi.¹⁴ Pada sifilis sekunder uji PCR menggunakan spesimen darah memiliki sensitivitas yang lebih baik dari pada serum.²¹

Prinsip Dasar PCR

PCR merupakan suatu metode *in vitro* yang digunakan untuk mensintesis sekuens tertentu DNA menggunakan dua *primer* oligonukleotida yang menghibridisasi pita yang berlawanan dan mengapit dua target DNA.²² Prinsip PCR didasarkan pada amplifikasi enzimatis fragmen DNA menggunakan dua oligonukleotida *primer* yaitu oligonukleotida yang dari dua untaian sekuens target. Oligonukleotida ini digunakan sebagai *primer* PCR untuk memungkinkan cetakan DNA dikopi oleh DNA polimerase. Proses PCR dilakukan menggunakan suatu alat yang disebut *thermocycler*. Setiap DNA dalam rangkaian proses PCR mengalami tiga tahapan, yaitu: denaturasi DNA *template*, penempelan (*annealing*) *primer*, dan polimerisasi (*extension*) rantai DNA.²⁰ Dasar reaksi PCR merupakan tiruan dari proses replikasi DNA *in vivo*, yaitu dengan pembukaan rantai DNA (denaturasi) untai ganda, penempelan *primer* (*annealing*) dan perpanjangan rantai DNA baru (*extension*) oleh DNA polimerase dari arah mencampurkan sampel DNA dengan *primer* oligonukleotida, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), enzim termostabil Taq DNA polimerase dalam larutan DNA yang sesuai, kemudian menaikkan dan menurunkan suhu campuran secara berulang dalam beberapa puluh siklus sampai diperoleh jumlah sekuens DNA yang diinginkan. Pada amplifikasi sekuens DNA, jumlah DNA target bertambah secara eksponensial sejumlah siklus yang dilakukan.²³

Macam–Macam Metode PCR

PCR Konvensional

Kary Mullis pada tahun 1983 mengembangkan teknik PCR konvensional dan berhasil mendapatkan hadiah nobel pada

tahun 1993.^{20,22} Metode ini memungkinkan sejumlah kecil molekul DNA untuk diamplifikasi beberapa kali secara eksponensial dan telah banyak digunakan dalam penelitian di bidang medis dalam uji diagnostik untuk mengidentifikasi mikroorganisme patogen.²² Produk PCR yang diperoleh dengan metode PCR konvensional dapat diidentifikasi ukurannya menggunakan gel elektroforesis yang dilanjutkan dengan pewarnaan. Selama proses elektroforesis, DNA yang diamplifikasi akan dipisahkan berdasarkan ukuran molekul DNA (untai DNA yang berukuran lebih kecil akan bergerak lebih cepat pada gel dibandingkan yang berukuran lebih besar). Sesudah selesai dilakukan gel elektroforesis, gel dicuci dalam *buffer* yang mengandung zat warna yang secara spesifik mewarnai DNA, sehingga bila dilihat dengan sinar ultraviolet akan menunjukkan fluoresensi. Ukuran dari produk PCR dapat ditentukan dengan membandingkan terhadap DNA *ladder* yang mengandung fragmen DNA yang sudah diketahui ukurannya.²²

Real-time PCR

Real-time PCR dikenal juga dengan *quantitative* PCR (qPCR) atau *kinetic* PCR. Metode ini merupakan pengembangan PCR konvensional untuk dapat mengamplifikasi dan secara bersamaan menghitung (kuantifikasi) jumlah target molekul DNA hasil amplifikasi pada setiap siklus reaksi. *Real-time* PCR mengamplifikasi sekuens DNA target dengan menggunakan teknik fluoresensi. Ada 2 (dua) metode *real-time* PCR, yaitu yang menggunakan probe (penanda) dan tidak menggunakan probe. Metode *real-time* PCR yang tidak menggunakan probe, menggunakan zat pewarna fluoresensi *SYBR green* untuk mendeteksi DNA. Sedangkan metode *real-time* PCR yang menggunakan probe salah satunya adalah dengan menggunakan probe berlabel fluoresen (probe FRET Hibridisasi dan probe *TaqMan*). Probe akan berfluoresens ketika terhibridisasi dengan DNA komplemen. Dalam setiap pengamatan proses PCR, sinyal fluoresensi yang dipancarkan akan meningkat secara proporsional pada setiap siklus PCR sejalan dengan bertambahnya produk DNA hasil amplifikasi. Pada PCR konvensional, deteksi keberadaan DNA dilakukan pada akhir reaksi dan DNA hasil amplifikasi divisualisasi menggunakan gel elektroforesis. Berbeda

dengan *real-time* PCR yang memungkinkan pengamatan langsung DNA yang diamplifikasi saat reaksi PCR pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi dari probe.²³ Penggunaan *real-time* PCR untuk mendeteksi *Treponema pallidum* dilakukan oleh Gayet-Ageron dkk.²⁴ menggunakan gen target 47 kDa pada spesimen apusan lesi, darah, serum dan urin pasien sifilis sekunder. Sensitivitas uji PCR yang diperoleh berturut-turut 20%, 36%, 47% dan 44%. Metode dan gen target yang sama digunakan oleh Tipple dkk.¹⁴ untuk mendeteksi *Treponema pallidum* pada spesimen darah pasien sifilis sekunder dan mendapatkan nilai kepositivan uji PCR sebesar 58%. Studi oleh Cruz dkk.²⁵ menggunakan gen target *poIA* untuk mendapatkan *spirochetal load* *Treponema pallidum* pasien sifilis sekunder.

Nested PCR

Prinsip dasar reaksi *Nested* PCR menyerupai PCR konvensional. Pada *Nested* PCR terjadi 2 kali reaksi amplifikasi DNA. Mekanisme reaksi ini berguna untuk meningkatkan spesifitas produk, karena dapat mengurangi amplifikasi ikatan *primer* yang tidak diharapkan.^{23c} Dua set *primer* digunakan pada 2 proses PCR secara berurutan. PCR reaksi pertama dengan satu pasang *primer* mampu mengamplifikasi sekuens DNA yang lebih panjang namun mungkin saja fragmen DNA yang dihasilkan ini tidak terlalu spesifik. Sejumlah kecil produk PCR tahap pertama digunakan sebagai *template* untuk PCR tahap kedua dengan menggunakan campuran reagen baru. Amplifikasi pada tahap kedua diharapkan dapat mengatasi uji PCR yang tidak optimal pada tahap pertama, sehingga dapat meningkatkan efisiensi dan kemampuan deteksi PCR. Kelebihan dari metode ini yaitu reamplifikasi produk nonspesifik PCR tahap pertama dapat diminimalisasi karena penggunaan *primer* yang berbeda pada PCR tahap kedua. Penggunaan *nested* PCR sangat baik, namun membutuhkan pengetahuan dan pengalaman terhadap sekuens DNA yang ingin diamplifikasi.²³ Penggunaan *nested* PCR dengan gen target *tpp47* untuk mendeteksi *Treponema pallidum* telah di publikasi tahun 2005 oleh Koutznetsov dkk.²⁶ dan berhasil mendeteksi *Treponema pallidum* sebesar 80% dari *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) dan 83% dari serum pasien sifilis

sekunder.^{17,26} Studi yang dilakukan oleh Grange dkk.¹¹ pada tahun 2011 menggunakan gen target *tpp47* pada spesimen apusan lesi sifilis primer dan sekunder, berhasil mendeteksi *Treponema pallidum* sebesar 82%. Pada uji *nested* PCR spesimen darah, Grange dkk. berhasil mendapatkan nilai kepositivan yang bervariasi untuk masing-masing komponen darah, yaitu berturut-turut 38%, 29%, 15% dan 31% untuk darah utuh, plasma, serum dan PBMC pada pasien sifilis stadium sekunder. Martin dkk.¹⁶ menggunakan metode *nested* PCR untuk mendeteksi *Treponema pallidum* dengan gen target *bmp* dan *tpp47*. Dari studi tersebut, penggunaan gen target *bmp* dan *tpp47* menunjukkan kesesuaian hasil uji PCR pada berbagai spesimen klinis pasien sifilis primer dan sekunder.

Multiplex PCR

Multiplex PCR merupakan metode PCR yang dapat mendeteksi beberapa gen target secara bersamaan dalam satu kali reaksi PCR menggunakan lebih dari satu pasang *primer* (*forward-reverse*). Uji *multiplex* PCR akan menghasilkan produk dengan berbagai ukuran sesuai dengan sekuens cetakan DNA spesifik yang digunakan. *Multiplex* PCR dapat dilakukan untuk deteksi dan identifikasi patogen penyebab infeksi campuran.²³ Uji mudah digunakan, sangat efisien biaya dan waktu karena deteksi dan identifikasi terhadap beberapa patogen dilakukan bersamaan. Untuk melakukan optimasi *multiplex* PCR diperlukan waktu dan biaya yang lebih banyak. Mendesain *primer* untuk *multiplex* PCR lebih kompleks, karena *primer* yang digunakan harus mempunyai suhu *melting* yang sama dan spesifik terhadap target masing-masing. Dengan menggunakan lebih dari satu pasang *primer*, uji *multiplex* PCR memberikan nilai sensitivitas dan spesifitas yang lebih rendah daripada jenis PCR lain.²² *Multiplex* PCR dapat digunakan untuk mendeteksi *Treponema pallidum* sekaligus mendeteksi patogen lain. Palmer dkk.²⁷ menggunakan metode *multiplex* PCR dengan gen target *tpp47* untuk mendeteksi *Treponema pallidum*. Metode *multiplex* PCR yang digunakan sekaligus mendeteksi *Haemophilus ducreyi* dan virus *Herpes Simplex* (HSV). Sensitivitas PCR yang diperoleh sebesar 80% dan spesifitas 98,6% pada spesimen apusan lesi pasien sifilis sekunder. Berdasarkan studi meta analisis oleh Gayet-

Ageron dkk.⁽²⁸⁾ *multiplex* PCR merupakan metode PCR yang paling banyak digunakan untuk mendeteksi *Treponema pallidum*.

Multiplex Nested PCR

Multiplex nested PCR merupakan penggabungan *nested* PCR dengan *multiplex* PCR. Metode PCR konvensional maupun kuantitatif dapat digunakan untuk *multiplex nested* PCR. Pada *multiplex nested* PCR diamplifikasi lebih dari satu sekuens DNA dengan menggunakan gen target yang berbeda atau gen target sama namun pada lokasi yang berbeda secara bersamaan dengan dua kali reaksi PCR. Sensitivitas dan spesifisitas yang lebih rendah pada *multiplex* PCR dapat ditingkatkan dengan *nested* PCR. Brustain dkk.²⁹ pada 2001 menggunakan metode *multiplex nested* PCR untuk mendeteksi *Treponema pallidum* dan *Haemophilus ducreyi* pada spesimen apusan lesi ulkus genital. Sensitivitas yang diperoleh Brustain dkk. mencapai 75% dengan spesifisitas 100% dengan gen target *bmp*. Gultom dkk.³⁰ mengembangkan *multiplex nested* PCR untuk deteksi sekaligus identifikasi *Treponema pallidum* resisten azitromisin dengan gen target 23S rRNA.

Penutup

Treponema pallidum adalah bakteri patogen yang sangat infeksius. Penyebaran sifilis sangat cepat pada populasi berisiko. Pemeriksaan serologis sifilis dapat dengan cepat dan mudah dilakukan untuk membantu menegakkan diagnosis dan juga untuk keperluan skrining. Deteksi bakteri menggunakan pemeriksaan molekular dapat dipertimbangkan untuk menggantikan pemeriksaan mikroskopik lapangan gelap. Pada penggunaan PCR *Treponema pallidum* didapatkan spesifisitas sangat baik (100%). Sensitivitas PCR bervariasi untuk setiap gen target dan jenis spesimen yang digunakan. Sensitivitas 83% didapatkan dari metode *nested* PCR dengan spesimen serum dan 82% dari spesimen apusan lesi. Dari beberapa metode PCR yang telah dikembangkan, *multiplex* PCR banyak digunakan karena dapat mendeteksi *Treponema pallidum* dan patogen lain secara bersamaan. Pemeriksaan molekular PCR yang masih perlu dikembangkan lebih lanjut di Indonesia.

Daftar Pustaka

1. Turner AJL. Treponemes. In: Gillespie SH, Hawkey PM, editors. Principles and practice of clinical bacteriology 2ed. UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2006. p. 503-10.
2. STBP 2011 : Surveilans terpadu biologi perilaku. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia Dirjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan; 2011.
3. Lukehart SA. Biology of treponemes. United State of America: Mc Graw Hill 2008.
4. Sanchez MR. Sexually transmitted diseases. In: wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Pallen AS, Leffell DJ, editors. Fitzpatrick's : Dermatology in General Medicine. Syphilis. 2. 7 ed. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2008. p. 1955-77.
5. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science. 1998;281(375):375-88.
6. LaFond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):29-49.
7. Stamm LV. Global challenge of antibiotic-resistant *Treponema pallidum*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(2):583-9.
8. Zobaníkova M, Mikolka P, Čejková D, Pospíšilová P, Chen L, Strouhal M, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum* strain DAL-1. Standards in Genomic Sciences. 2012;7:12-21.
9. Ho EL, Lukehart SA. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. J Clin Invest 2011;121(12):4584-92.
10. Tramont EC. *Treponema pallidum* (syphilis). In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 2. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. p. 3035-55.
11. Grange PA, Gressier L, Dion PL, Farhi D, Benhaddou N, Gerhardt P, et al. Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. J Clin Microbiol. 2012;50(3):546-52.
12. Casal CAD, Silva M Od, Costa IB, Araújo EdC, Corvelo TCdO. Molecular detection of *Treponema pallidum* sp. *pallidum* in

- blood samples of VDRL-seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: A retrospective observational study in northern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2011;44(4):451-6.
13. Mattei PL, Beachkofsky TM, Gilson RT, Wisco OJ. Syphilis: A reemerging infection. *Am Fam Physician* 2012;86(5):433-40.
 14. Tipple C, Hanna MOF, Hill S, Daniel J, Goldmeier D, McClure MO, et al. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. *Sex Transm Infect.* 2011;87(479):e485.
 15. Workowski KA, Bolan GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2015;34-51.
 16. Martin IE, Tsang RSW, Sutherland K, Read PTR, Anderson B, Roy C, et al. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1668-73.
 17. Sato NS. Laboratorial diagnosis of syphilis. *Syphilis - recognition, description and diagnosis.* Croatia: INTECH; 2011. p. 87-108.
 18. Sparling PF, Swartz MN, Musher DM, Healy BP. *Clinical Manifestations of Syphilis.* Holmes KK, Sparling PF, Stamm WE, Piot P, Wasserheit JN, Corey L, et al., editors: McGraw-Hill Companies, Inc; 2008.
 19. Uprety S, Vinay K, De D, Handa S, Saikia U. Hypopigmented patches on a young man. *Clinical and Experimental Dermatology.* 2016;41(1):100-2.
 20. Valones MAA, Guimarães RL, Brandão LAC, Souza PRED, Carvalho AdAT, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields : a review *Brazilian Journal of Microbiology.* 2009;40:1-11.
 21. Effendi I, Rosana Y, Yasmon A, Indriatmi W. Multiplex nested polymerase chain reaction for *Treponema pallidum* using blood is more sensitive than using serum. *Universa Medicina.* 2018;37(1):75.
 22. Joshi M, Deshpande J. Polymerase chain reaction : methods, principles and application *IJBR.* 2010;1(5):81-97.
 23. Rahman M, Uddin M, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase Chain Reaction (PCR): A short review. *AKKMMC J.* 2013;4(1):30-6.
 24. Gayet-Agaron, Ninet B, Toutus-Trellu L, Lautenschlager S, Furrer H, Pigué V, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Infect.* 2009;85(4):264-9.
 25. Cruz AR, Pillay A, Zuluaga AV, Ramirez LG, Duque JE, Aristizabal GE, et al. Secondary syphilis in Cali, Colombia: new concepts in disease pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(5):e690.
 26. Kouznetsov AV, Weisenseel P, Trommler P, Multhaup S, Prinz JC. Detection of the 47-kilodalton membrane immunogen gene of *Treponema pallidum* in various tissue sources of patients with syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;51(2):143-5.
 27. Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, Kingston MA. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect.* 2003;79:479-83.
 28. Gayet-Ageron A, Combescure C, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV. Comparison of the diagnostic accuracy of polymerase chain reaction targeting the 47kDa protein membrane gene of *Treponema pallidum* or the DNA polymerase I gene: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol Accepted Manuscript Posted Online.* 2015.
 29. Burstain JM, Grimprel E, Lukehart SA, Norgard MV, Radolf JD. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29(1):26-9.
 30. Gultom D.A. RY, Efendi I., Indriatmi W., Yasmon A. Detection and identification of azithromycin resistance mutations on *Treponema pallidum* 23S rRNA gene by nested multiplex polymerase chain reaction. *Med J Indones.* 2017;26:90-6.