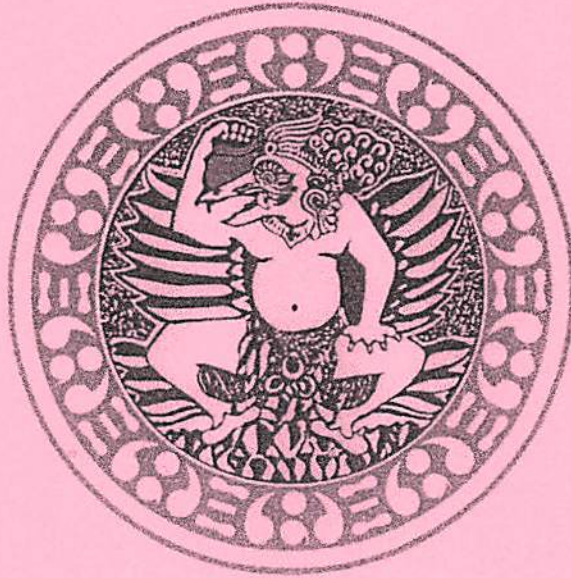


**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL (PMDSU)**



10

GENOTYPING SEKUENS NUKLEOTIDA GEN 16S rRNA *Mycobacterium tuberculosis* DARI PASIEN TB PARU DAN PENGEMBANGAN METODE MULTIPLEX PCR UNTUK IDENTIFIKASI *Mycobacterium tuberculosis* DAN MOTT

TAHUN KE - 3 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. Dr. NI MADE MERTANIASIH, dr., MS., Sp.MK(K) 0007035703
Dr. SOEDARSONO, dr., Sp.P (K) 195511231984101001
Prof. Dr. WAYANTUNAS ARTAMA, DVM 0018085308
NASTITI INTAN PERMATA SARI, S.Si, M.Ked.Trop 011617017346

DIBIYAI OLEH:

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL (PMDSU)**



GENOTYPING SEKUENS NUKLEOTIDA GEN 16S rRNA *Mycobacterium tuberculosis* DARI PASIEN TB PARU DAN PENGEMBANGAN METODE MULTIPLEX PCR UNTUK IDENTIFIKASI *Mycobacterium tuberculosis* DAN MOTT

TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. Dr. NI MADE MERTANIASIH, dr., MS., Sp.MK(K) 0007035703
Dr. SOEDARSONO, dr., Sp.P (K) 195511231984101001
Prof. Dr. WAYANTUNAS ARTAMA, DVM 0018085308
NASTITI INTAN PERMATA SARI, S.Si, M.Ked.Trop 011617017346

DIBIYAI OLEH:

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : GENOTYPING SEKUENS NUKLEOTIDA GEN 16S
rRNA Mycobacterium tuberculosis DARI PASIEN TB
PARU DAN PENGEMBANGAN METODE
MULTIPLEX PCR UNTUK IDENTIFIKASI
Mycobacterium tuberculosis DAN MOTT

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : NI MADE MERTANIASIH,
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0007035703
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Immunologi
Nomor HP : 081330511063
Alamat surel (e-mail) : m_niasih@yahoo.co.id; nmademertaniasih@gmail.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : drh. WAYAN TUNAS ARTAMA
NIDN : 0018085308
Perguruan Tinggi : Universitas Gadjah Mada


Anggota (2)
Nama Lengkap : Nastiti Intan Permata Sari, S.Si, M.Ked.Trop
NIDN :
Perguruan Tinggi :
Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : Kyoto University, Graduate School of Medicine
Alamat : Yoshidahonmachi, Sakyo Ward, Kyoto, Kyoto Prefecture
606-8501
Penanggung Jawab : Assc. Prof. Fumito Maruyama
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 170,000,000

Mengetahui,
Dekan

(Prof. Dr. dr. Soetojo, Sp.U (K))
NIP/NIK 195606081986121001

Kota Surabaya, 7 - 11 - 2018
Ketua,

(NI MADE MERTANIASIH,)
NIP/NIK 195703071984032001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi

(Prof. H. Hery Purnobasuki, M. Si., Ph.D)
NIP/NIK 196705071991021001

RINGKASAN

Genotyping Sekuens Nukleotida Gen 16S rRNA *Mycobacterium tuberculosis* dari Pasien TB Paru dan Pengembangan Metode Multiplex PCR untuk Identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* dan MOTT.

Indonesia merupakan negara dengan kasus tuberkulosis (TB) yang termasuk dalam high burden countries, dengan insiden dan prevalensi tinggi nomor 2 setelah India. Provinsi Jawa Timur tercatat 112 kasus TB / 100.000 penduduk. Penegakan diagnostis yang cepat, tepat, dan akurat diperlukan untuk penentuan pengobatan tepat, cepat, dan adekuat memutus rantai penularan merupakan langkah strategi pengendalian penyakit TB.

Metode diagnosis molekuler dengan target gen spesifik sangat diperlukan dalam upaya penegakan diagnosis infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Gen 16S rRNA merupakan gen *conserved* pada berbagai strain *Mycobacterium tuberculosis*, studi analisis *genotyping* dapat menentukan regio DNA *conserved* dan spesifik pada MTBC yang berbeda dengan MOTT, dapat menjadi gen spesifik untuk identifikasi dan diferensiasi dalam penegakan diagnosis infeksi penyakit TB paru.

Tujuan penelitian : tujuan umum yaitu untuk mengetahui *genotyping* sekuens nukleotida gen 16S rRNA pada *Mycobacterium tuberculosis* dari pasien TB paru sebagai pengembangan diagnosis. Tujuan khusus: Tahun III: Optimasi desain primer regio gen 16S rRNA (studi lanjutan tahun II), Uji validasi eksternal pada pasien suspek TB paru (sensitivitas, spesifitas, positif *predictive value*, negatif *predictive value*); dibandingkan dengan *Gold Standard* metode kultur standar.

Metode penelitian : Tahun III : uji validitas eksternal metode amplifikasi asam nukleat dengan metode Multiplex PCR.

Hasil yang dicapai (luaran hasil penelitian): Tahun III menghasilkan validasi gen-gen spesifik untuk identifikasi MTBC, koleksi isolat MTBC dan MOTT, Jurnal Internasional *Australian Journal of Medical Science* status *Accepted waiting for publish*, draft jurnal internasional yang lain 5 topik, *prototype* sekuens primer 16S rRNA (rencana HKI), DNA *sequencing*, primer spesifik multiplex PCR, analisis sekuens *genotype* gen 16S rRNA MTBC yang akan dilanjutkan dengan analisis *genotyping* sekuens dengan kelompok MOTT atau strain lain menggunakan multiplex PCR.

Kata Kunci : *Genotyping*, 16S rRNA, *Mycobacterium tuberculosis*, MOTT, Multiplex PCR



PRAKATA

Puji syukur mari kita panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan inayahnya sehingga penulis dapat menyusun laporan tahun terakhir yang berjudul “*Genotyping* Sekuens Nukleotida Gen 16S rRNA *Mycobacterium tuberculosis* dari Pasien TB Paru dan Pengembangan Metode Multiplex PCR untuk Identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* dan MOTT”.

Laporan tahun terakhir ini diharapkan dapat menjawab tujuan penelitian tahun III, yaitu: optimasi desain primer regio gen 16S rRNA (studi lanjutan tahun II), Uji validasi eksternal pada pasien suspek TB paru (sensitivitas, spesifitas, positif *predictive value*, negatif *predictive value*); dibandingkan dengan *Gold Standard* metode kultur standar.

Laporan tahun terakhir ini diharapkan dapat memberikan manfaat dalam kemajuan informasi IPTEK mengenai karakterisasi sekuens nukleotida pada genome 16S rRNA *Mycobacterium tuberculosis*, memberikan pengetahuan dasar mengenai proses molekuler dari patogenesis TB paru sebagai acuan pengembangan tata kelola pasien serta diharapkan menghasilkan temuan *prototype* dasar pengembangan kit diagnostik yang unggul (akurat, cepat, dan murah) dan dapat menata sistem bank isolat dan bioinformatika *Mycobacterium tuberculosis* dan MOTT.

Akhir kata, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang terlibat dalam penelitian ini, baik secara langsung maupun tidak langsung. Semoga segala usaha, dukungan, dan partisipasi yang diberikan dapat memberikan manfaat kepada masyarakat.

Prof. Dr Ni Made Mertaniasih, dr. MS. Sp. MK (K)
Ketua Penelitian
Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.	viii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.	1
1.2 Perumusan Masalah Penelitian.....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Epidemiologi Tuberculosis.....	4
2.2 Patogenesis Tuberkulosis.	5
2.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2.4 Struktur Gen 16S rRNA.....	7
2.5 <i>Multidrug-resistant tuberculosis</i> (MDR-TB).	8
2.6 <i>Mycobacterium Other Than Tuberculosis</i> (MOTT)	10
2.7 Metode Amplifikasi Asam Nukleat.	10
2.8 <i>Technology Road Map</i> Penelitian.....	12
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
3.1 Tujuan Penelitian.	13
3.1.1 Tujuan umum.....	13
3.1.2 Tujuan khusus.	13
3.2 Manfaat.....	13
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	14
4.2 Sampel Penelitian	14
4.3 Variabel Penelitian.....	14
4.4 Definisi Operasional.....	14
4.5 Prosedur Penelitian.....	15
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.	15
4.7 Analisis Data.....	15
4.8 Alur Penelitian.	16
BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	
5.1 Luaran Hasil Penelitian	17
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan.....	18
6.2 Saran.....	18
DAFTAR PUSTAKA	19
LAMPIRAN.	21

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Tabel Indikator dan luaran target capaian 3 tahun.....	17

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Pola penularan tuberculosis.....	5
Gambar 2.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pada pewarnaan Ziehl Neelsen.	6
Gambar 2.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strain H37Rv.	7
Gambar 2.4 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pada pewarnaan tahan asam.....	9
Gambar 2.5 Road map penelitian.....	12
Gambar 4.1 Alur penelitian.....	16

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Catatan Harian.	21
Lampiran 2. Personalia Tenaga Pelaksana beserta kualifikasinya.	27
Lampiran 3. <i>Oral Presenter</i>.	28
Lampiran 4. Abstrak Jurnal Internasional.....	32
Lampiran 5. Hasil DNA <i>Sequensing</i>.....	37
Lampiran 6. Rencana HKI <i>Protoype</i> desain primer 16S rRNA <i>Mycobacterium tuberculosis Complex</i> (MTBC).....	38
Lampiran 7. Primer Spesifik Multiplex PCR.....	40



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pengendalian penyakit tuberkulosis (TB) masih merupakan masalah dalam kesehatan secara global. Menurut *World Health Organization* (WHO), *Mycobacterium tuberculosis* merupakan agen penyebab terjadinya penyakit yang menginfeksi 1 dari 3 orang di tingkat populasi dunia. Penyakit TB ini dapat bertahan lama dalam kondisi laten saat menginfeksi seseorang untuk waktu 10 tahun. Semua kelompok bakteri *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) merupakan penyebab penyakit paru-paru, dan diperlukan diagnosis yang tepat untuk mengendalikan penyakit ini (Perez-Osorio, *et al.*, 2012).

Mycobacterium pada umumnya merupakan spesies bakteri yang tahan asam dan bersifat aerobik. *Mycobacterium* ini memiliki kelompok bakteri dengan pertumbuhan lambat maupun cepat, dan kelompok bakteri berpigmen maupun tidak berpigmen. Kelompok bakteri dengan pertumbuhan cepat (RGM) dalam waktu kurang dari 7 hari sudah dapat menghasilkan koloni pada media (Adekambi & Drancourt, 2004). Spesies dari genus *Mycobacterium* telah lebih dari 70 spesies yang berbeda, 30 spesies diantaranya telah menyebabkan penyakit pada manusia (Cloud, *et al.*, 2002).

Identifikasi pada kultur merupakan metode yang masih digunakan sebagai *Gold Standard* untuk diagnosis penyakit TB. Identifikasi kultur MTBC dan uji resisten antibiotik terhadap TB (DST) memberi hasil pemeriksaan dalam waktu 6 sampai 12 minggu, pertumbuhan bakteri tersebut tergolong lambat sehingga diperlukan uji molekuler yang diharapkan jauh lebih cepat. Uji molekuler menggunakan suatu target gen merupakan deteksi spesifik yang juga dapat dilakukan untuk MTBC (Perez-Osorio, *et al.*, 2012).

Salah satu target gen yang dapat digunakan untuk uji molekuler diagnosis *Mycobacterium tuberculosis* yaitu 16S rRNA. Pemilihan penggunaan gen 16S rRNA ini dikarenakan pada gen tersebut jika terjadi mutasi masih sering dapat

ditoleransi (Clarridge III, 2004). Gen 16S rRNA ini dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena memiliki fungsi yang identik pada seluruh organisme. Molekul 16S rRNA juga dapat berubah sesuai jarak evolusinya, sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi (Pangastuti, 2006).

Penelitian yang menggunakan *sequencing* gen 16S Ribosomal RNA (rRNA) diketahui cukup banyak, penelitian ini bertujuan untuk identifikasi bakteri di laboratorium mikrobiologi klinis. Penelitian lain yang juga dapat ditemui yaitu penelitian yang memfokuskan pada akurasi *sequencing* dibandingkan dengan metode spesifik pada fenotip seperti pada sistem Vitek 2 (bioMerieux, Durham, NC) dan identifikasi manual atau sistem kit, seperti API 20 NE (bioMerieux). Identifikasi pada sekuens nukleotida 16S rRNA sangat penting sehingga pada penelitian ini dilakukan *genotyping* sekuens nukleotida gen 16S rRNA untuk mengklarifikasi *sequence* bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan dengan spesies *Mycobacterium* yang lain, misalnya *Mycobacterium Other Than Tuberculosis* (MOTT). MOTT merupakan bakteri yang juga menyebabkan penyakit dengan gejala mirip tuberkulosis karena termasuk penyakit paru kronis (Kendall *et al*, 2011 dalam Kusumaningrum, 2015).

Penelitian ini menggunakan pemeriksaan gen 16S rRNA terhadap sampel pasien TB paru dengan kelompok sampel *Rifampicin* sensitif dan *Rifampicin* resisten untuk mengetahui adanya perbedaan sekuens gen antara sampel pasien TB paru akut dan kronis. Penderita TB paru kronis mendapat pengobatan obat anti TB (OAT) dengan jangka waktu yang cukup lama sehingga kemungkinan menjadi penderita MDR-TB dapat terjadi. Penderita MDR-TB resisten terhadap salah satu OAT lini pertama yaitu *Rifampicin* (Perez-Osorio, *et al.*, 2012).

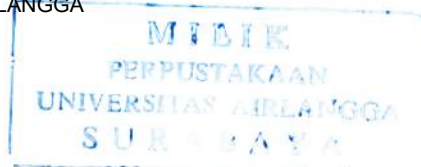
Penggunaan metode molekuler untuk deteksi gen tersebut sangat diperlukan terlebih untuk membedakan dengan spesies MOTT diperlukan metode diagnostik yang tepat dan efisien, sehingga diperlukan metode Multiplex PCR sebagai metode pengembangan diagnostik secara molekuler. Metode amplifikasi asam nukleat berdasarkan teknik multiplex PCR, mendeteksi regio DNA-DNA target pada gen 16S rRNA yang berdasar pada temuan analisis *genotyping* strain-

strain MTBC di daerah Indonesia dan penentuan regio DNA *conserved* dan spesifik, dengan demikian diharapkan dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi MTBC pada spesimen pasien.

1.2 Perumusan Masalah Penelitian

Berdasarkan latar belakang penelitian dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah ada perbedaan *genotype* (sekuens *conserved* dan spesifik) gen 16S rRNA *Mycobacterium tuberculosis* dari sampel pasien TB paru antara kelompok *Rifampicin* resisten dan *Rifampicin* sensitif?
2. Apakah metode Multiplex PCR berdasarkan target gen 16S rRNA memiliki validitas (sensitivitas, spesifitas, positif *predictive value*, negatif *predictive value*) tinggi?



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Epidemiologi Tuberculosis

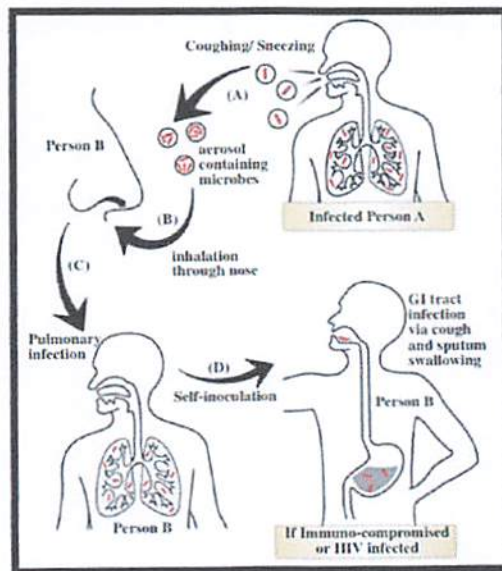
Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi menular yang terutama disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC), dimana dapat menyerang berbagai organ terutama paru-paru. Penyakit ini diperkirakan sudah ada di dunia sejak 5000 tahun sebelum Masehi, namun kemajuan dalam penemuan dan pengendalian penyakit TB baru terjadi dalam 2 abad terakhir (Pusadatin, 2015).

Data dari laporan WHO 2015 menyatakan bahwa pada tahun 2014 penyakit TB membunuh 1,5 juta orang dimana 1,1jt HIV negative dan 0,4 juta HIV positif. Jumlah kematian pada pria 890.000, wanita 480.000 dan pada anak-anak 140.000. Pada tahun 2014 diperkirakan terdapat 9,6 juta kasus baru dengan 5,4 juta pada pria, 3,2 juta pada wanita dan 1juta pada anak-anak. Kasus baru yang diperkirakan banyak ditemukan di Asia (58%) dan regio Afrika (28%), kemudian regio Mediterania Timur (8%), regio Eropa (3%) serta region Amerika (3%). Negara yang mempunyai angka insidensi tinggi adalah India, Indonesia, China, Nigeria, Pakistan dan Afrika Selatan (WHO, 2015).

Saat ini, Indonesia merupakan negara yang termasuk dalam high burden countries, dengan insiden dan prevalensi tinggi nomor 2 setelah India. Laporan dari pusat data dan informasi (2015) dinyatakan di Provinsi Jawa Timur tercatat 112 kasus TB / 100.000 penduduk dan terjadi peningkatan kasus TB seiring dengan peningkatan kasus HIV dan AIDS. Angka penemuan kasus baru BTA Positif (*Case Detection Rate*) merupakan proporsi penemuan kasus TB BTA positif dibanding dengan perkiraan kasus dalam persen. Tahun 2012, angka CDR sebesar 63.03% dengan jumlah kasus baru (positif dan negatif) sebanyak 41.472 penderita dan BTA Positif baru sebanyak 25.618 kasus. Kondisi tersebut masih jauh dari target CDR yang ditetapkan yaitu 70%.

2.2 Patogenesis Tuberkulosis

Sumber penularan tuberkulosis BTA positif adalah pada waktu batuk maupun saat bersin. Penyebaran ini dapat melalui udara dalam bentuk droplet (percikan dahak). Droplet yang mengandung kuman dapat bertahan di udara pada suhu kamar selama beberapa jam. Adapun patogenesisnya terangkum pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Pola penularan tuberkulosis yang disebabkan *Mycobacterium tuberculosis* (Bhunja *et al.*, 2015).

Jika ada individu menghirup droplet tersebut kemudian masuk ke dalam tubuh melalui pernafasan, droplet akan terdeposit ke dalam alveoli. Ketika berada di dalam alveoli, sistem imun *host* akan merespon dengan mengeluarkan sitokin dan limfokin yang menstimuli monosit dan makrofag. Makrofag tidak dapat menghancurkan bakteri ini sehingga dapat berkembang biak dalam makrofag (Gambar 2.1). Beberapa dari makrofag tersebut meningkatkan kemampuan untuk membunuh organisme, sedangkan yang lainnya dapat dibunuh oleh basil (Brooks *et al.*, 2013).

2.3 *Mycobacterium tuberculosis*

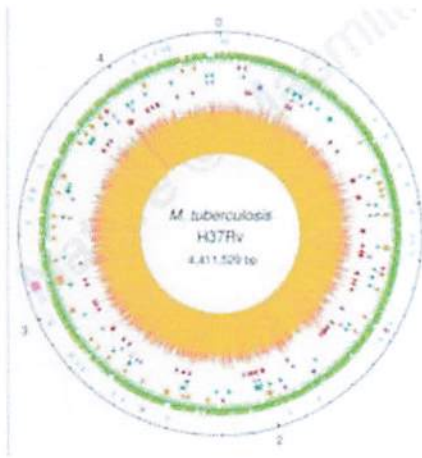
Mycobacterium tuberculosis menyebabkan penyakit tuberkulosis pada manusia, terutama di negara berkembang. Sekitar 17 miliar orang, atau 1 dari 3 orang di populasi dunia, telah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Menurut hasil pengamatan infeksi terhadap manusia, terdapat 8 juta kasus baru tuberkulosis and 2,9 juta meninggal setiap tahunnya. Tuberkulosis telah menjadi masalah kesehatan masyarakat di Amerika. Tuberkulosis juga meningkatkan kondisi *co-infection* terhadap penyakit *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). Keadaan ini banyak ditemui pada masyarakat miskin, pengguna *intravenous (IV) drug*, peminum alkohol, pada usia tua, atau pada populasi yang kurang terjaminnya pelayanan kesehatan. Patogenesis tuberkulosis disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis complex*. Penyakit tersebut biasanya muncul beberapa tahun setelah terjadi infeksi, ketika penderita dalam keadaan sistem imun yang turun (Bailey & Scott's, 2014).



Gambar 2.2 *Mycobacterium tuberculosis* pada pewarnaan Ziehl Neelsen (Datta, 2013).

Mycobacterium tuberculosis memiliki ukuran berbentuk batang kecil dengan ukuran $0,4 \times 3 \mu\text{m}$ (Gambar 2.2). Bakteri ini tidak dapat diklasifikasikan ke dalam kelompok bakteri gram positif maupun negatif. Ketika *Mycobacterium tuberculosis* diwarnai dengan pewarnaan gram, pewarna asam pada bakteri ini tidak luntur saat dekolonisasi dengan alkohol. Keadaan demikian yang menjadi karakteristik bakteri ini, yaitu dapat tahan asam atau disebut bakteri tahan asam

(BTA). Bakteri ini dapat diwarnai dengan pewarna Ziehl-Neelsen yaitu pewarnaan khusus untuk bakteri tahan asam (Brooks *et al.*, 2013).



Gambar 2.3 *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv (Cole, *et al.*, 1998).

Sekuens lengkap genom dari *Mycobacterium tuberculosis* dengan strain H37Rv telah dideterminasi dan dianalisis supaya dapat dimanfaatkan oleh ahli biologi sebagai patogen yang pertumbuhannya lambat dan dapat digunakan untuk konsep mencegah penyakit dan terapinya. Genom bakteri ini berukuran 4,411,529 base pairs, dengan 4000 gen yang terkandung di dalamnya, dan memiliki jumlah basa nitrogen guanin dan sitosin yang sangat tinggi (Cole *et al.*, 1998).

2.4 Struktur Gen 16S rRNA

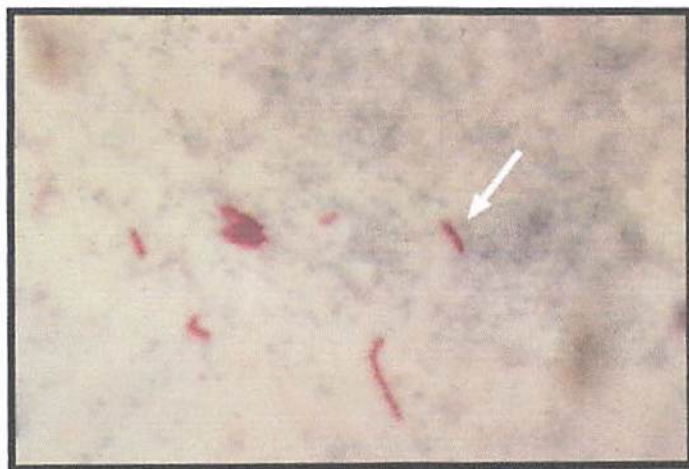
Diantara berbagai teknik analisis gen suatu mikroba, RNA ribosomal paling banyak digunakan sebagai penanda molekuler. Prokariota memiliki 3 jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Diantara ketiga jenis tersebut, 16S rRNA adalah molekul yang paling sering digunakan. Molekul 5S rRNA memiliki urutan basa yang terlalu pendek, sehingga tidak ideal menurut analisis statistika. Sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang lumayan panjang dan akan menyulitkan analisis (Pangastuti, 2006).

Di tingkat spesies, 16S rRNA diasumsikan menjadi stabil dan spesifik. Gen 16S rRNA spesies pada studi bakteri, sebagai contoh, 4 hingga 6 operon

(desain operon *rrn*) pada enterococci atau 7 operon pada *Escherichia coli*. 16S rRNA berbeda diantara spesies atau subspecies pada bakteri, tetapi ketika kelipatan gen 16S rRNA dari isolasi yang sama telah dilakukan *sequencing*, maka menjadi identik atau sedikit menunjukkan perbedaan. Pada genus *Mycobacterium*, *sequencing* 16S rRNA secara luas digunakan untuk identifikasi dan klasifikasi spesies karena metode tradisional yaitu kultur dan reaksi biokimia memberikan hasil yang ambigu. *Mycobacteria* dengan pertumbuhan cepat dan pertumbuhan lambat memiliki nomor operon *rrn* yang berbeda. Kelompok dengan pertumbuhan cepat seperti *Mycobacterium smegmatis* umumnya memiliki 2 operon *rrn*, berbeda dengan kelompok dengan pertumbuhan lambat, seperti *Mycobacterium tuberculosis* dan *Mycobacterium avium* yang memiliki 1 operon. Secara umum, 1 partikular sekuens rDNA diasosiasikan 1 spesies (Ninet, *et al.*, 1996).

2.5 *Multidrug-resistant tuberculosis* (MDR-TB)

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) merupakan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang berbentuk batang kecil dengan ukuran panjang 3-5 μm terkadang juga dan lebar 0.2 -0.6 μm (Gambar 2.4). Bakteri ini mempunyai struktur dinding sel yang terdiri dari *mycolic acids*, *cord factor* dan wax-D. Asam mikolat adalah asam lemak rantai panjang yang berhubungan dengan arabinogalaktan dan diikat oleh glikolipid dan dengan peptidoglikan oleh fosfodiester. Komponen lainnya yang terdapat pada dinding sel adalah polisakarida dan arabinomanan. Komponen dalam dinding sel bakteri inilah yang menyebabkan bakteri ini tidak dapat dilihat dengan menggunakan pewarnaan gram. Adapun pewarnaan yang digunakan adalah menggunakan pewarnaan Bakteri Tahan Asam (BTA) dengan metode Ziehl-Neelsen (Todar, 2008; Mertaniasih *et al.*, 2013).



Gambar 2.4 *Mycobacterium tuberculosis* pada pewarnaan tahan asam (CDC dalam Todar, 2008).

Mycobacterium tuberculosis (Gambar 2.4) yang telah resisten terhadap beberapa obat anti tuberkulosis (OAT) lini pertama yaitu isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ethambutol (EMB), pyrazinamide (PZA), dan streptomycin (SM) sehingga disebut sebagai MDR-TB (Mohan and Sharma, 2004; NIAID, 2007; Mahboub dan Vats, 2013). MDR-TB dapat berkembang menjadi *extensively drug-resistant tuberculosis* (XDR-TB) yang merupakan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap beberapa obat anti TB di lini pertama dan minimal satu obat anti TB di lini kedua. Adapun obat anti TB di lini kedua ini seperti: kanamycin, amikacin atau capreomycin (Mahboub dan Vats, 2013). Menurut WHO (2010) MDR-TB dapat terjadi karena adanya infeksi primer dengan bakteri resisten dan juga disebabkan pemberian antibiotik yang tidak tepat.

Terdapat dua tipe dari resistensi antibiotik dalam tuberkulosis, yaitu: *drug resistant-Primary* dan *drug resistant-Acquired*. Seseorang dikatakan termasuk dalam *primary drug resistant* ketika pasien tersebut belum pernah menerima obat anti-TB sedangkan seseorang pasien dapat dikategorikan *acquired drug resistant* ketika pasien tersebut pernah meminum obat anti TB sebelumnya. Ketika seseorang pasien tidak dapat dipastikan termasuk dalam *primary drug resistant* atau *acquired* dikarenakan sejarah pengobatan sebelumnya yang tidak terdata atau dikarenakan terapi pengobatan yang tidak diawasi maka pasien tersebut termasuk

dalam kelompok *primary* atau *initial drug resistant*. Resistensi kombinasi didefinisikan sebagai jumlah dari *primary* dan *acquired resistant* (Bhunias et al., 2015).

2.6 *Mycobacterium Other Than Tuberculosis* (MOTT)

Mycobacterium Other Than Tuberculosis (MOTT) terdiri atas spesies yang memiliki karakter oportunistis patogen, ditemukan di lingkungan, dapat ditransmisi dari lingkungan atau hewan ke manusia atau zoonosis. Penyakit infeksi oleh spesies MOTT terjadi terutama pada individu dengan supresi imun, seperti komorbid infeksi HIV-AIDS, diabetes mellitus, pengguna kortikosteroid, atau kemoterapi. Spesies yang sering menyebabkan tuberkulosis pada manusia yaitu *Mycobacterium avium-intracellulare complex* (MAIC), sering pada pasien dengan AIDS. Spesies lain yang juga sering menginfeksi manusia: *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium fortuitum-chelonae complex*, *Mycobacterium haemophilus*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium marinum* (Mertaniasih et al, 2013).

Identifikasi MOTT dapat dilakukan dengan melihat fenotip dan genotip. Metode fenotip diketahui dengan cara melihat karakteristik koloni yang tumbuh pada media kultur, sedangkan metode genotip dapat diketahui menggunakan metode molekuler dengan perlakuan sama seperti pada *Mycobacterium tuberculosis*, yaitu dengan menggunakan target gen 16S rRNA. Analisis gen penyandi 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk menentukan hubungan filogenetik dan menganalisis suatu ekosistem. Gen 16S rRNA terdiri dari 1500 nukleotida dan secara keseluruhan antara gen 16S rRNA berdasarkan identitas dan klinis, serta menunjukkan tingkat kesesuaian level spesies 96% dan tingkat kesesuaian level genus 87,5% (Srinivasan et al., 2015).

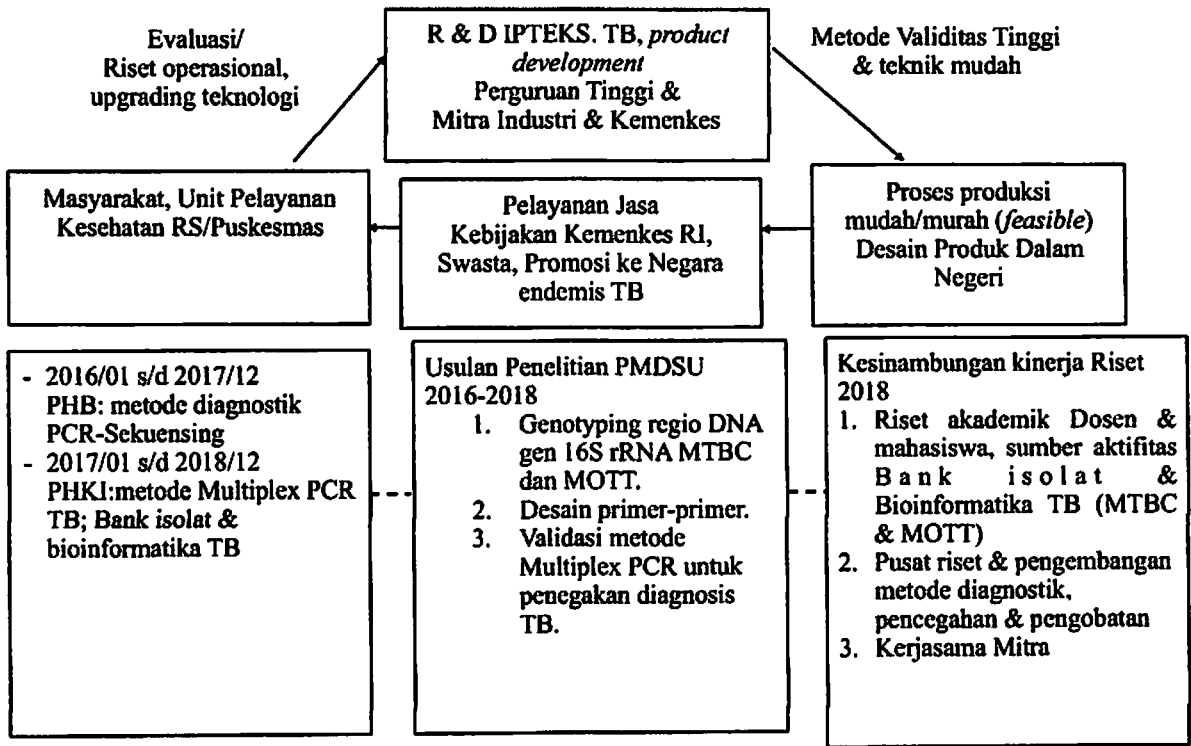
2.7 Metode Amplifikasi Asam Nukleat

Patogen dapat dideteksi menggunakan 2 tipe uji yaitu uji menggunakan probe pada pelabelan hibridisasi untuk mengidentifikasi sekuens target spesifik

pada asam nukleat patogen; dan uji menggunakan uji amplifikasi asam nukleat yang dapat dilakukan dengan beberapa metode amplifikasi untuk mendeteksi sekuens target gen. Beberapa metode menggunakan probe atau primer untuk mendeteksi DNA atau RNA patogen. Deteksi untuk 2 spesies atau lebih yang berbeda pada spesimen tunggal dapat menggunakan Multiplex PCR (Singleton, 2000).

Deteksi gen 16S rRNA bakteri MTBC dan MOTT dapat dilakukan pada metode multiplex PCR dengan beberapa tahap yang hampir sama dengan PCR konvensional. Pada prinsipnya, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) melibatkan tiga tahapan dengan temperatur yang berbeda, yaitu denaturasi, annealing, dan elongasi/ekstensi/sintesis DNA (Viljoen, Nel, dan Crowther, 2005; McPherson dan Møller, 2006). Hasil dari PCR diambil untuk dilanjutkan dengan proses *sequencing*. *Sequencing* dari gen 16S rRNA ini sering digunakan untuk mempelajari taksonomi bakteri dan identifikasi fenotip bakteri. (Mahlen & Clarridge III, 2011).

2.8 Technology Road Map Penelitian



Gambar 2.5 Road map penelitian



BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan umum

Penentuan *genotype* sekuen nukleotida gen 16S rRNA pada *Mycobacterium tuberculosis* dari isolat pasien TB paru sebagai dasar pengembangan metode diagnostik Multiplex PCR.

3.1.2 Tujuan khusus

Tahun III:

1. Optimasi desain primer regio gen 16S rRNA dan gen-gen spesifik lainnya untuk metode Multiplex PCR (studi lanjutan tahun II).
2. Uji validasi eksternal pada pasien suspek TB paru (sensitivitas, spesifitas, positif *predictive value*, negatif *predictive value*); dibandingkan dengan *Gold Standard* metode kultur standar.

3.2 Manfaat

1. Manfaat akademis dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi IPTEK mengenai *prototype genotype* sekuens nukleotida pada gen 16S rRNA dari sampel *rifampicin* sensitif dan *rifampicin* resisten di antara strain-strain MTBC di Indonesia.
2. Manfaat praktis metode diagnostik laboratorium mikrobiologis yaitu implementasi pada pasien TB paru di masyarakat pada penelitian ini diharapkan menjadi suatu temuan *prototype* dasar pengembangan kit diagnostik yang unggul (akurat, cepat, dan murah) dan dapat digunakan sampai ke tingkat pelayanan kesehatan primer.
3. HKI paten sederhana dan publikasi jurnal internasional.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorik tanpa pemberian perlakuan, dilakukan secara observasional deskriptif gen 16S rRNA pada *Mycobacterium tuberculosis Complex* (MTBC).

4.2 Sampel Penelitian

Pada tahun III: Besar sampel sebesar 110 sampel (termasuk strain *M. tuberculosis*, strain *Mycobacterium other than tuberculosis*, dan sampel pasien TB). Sampel dikoleksi pada tahun 2017-2018 dari RSUD Soetomo, Surabaya; RSUP Sanglah, Bali; dan Puskesmas Mataram, Lombok.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah sampel sputum pasien suspek TB paru, variabel terikat adalah *genotype* hasil *sequencing* gen 16S rRNA pada pasien TB paru dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*), variabel kontrol yang digunakan pada penelitian ini yaitu pengaturan suhu pada mesin PCR, konsentrasi reagen yang digunakan, volume pada campuran reaksi PCR, dan konsentrasi sampel pasien TB paru (sputum).

4.4 Definisi Operasional

1. Sampel pasien *Rifampicin* sensitif adalah sputum pasien TB paru yang tergolong masih sensitif terhadap pemberian antibiotik *Rifampicin* dengan dilakukan pemeriksaan menggunakan *Gene Xpert*.
2. Sampel pasien *Rifampicin* resisten adalah sputum pasien TB paru yang telah resisten terhadap pemberian antibiotik *Rifampicin* dengan dilakukan pemeriksaan menggunakan *Gene Xpert*.

3. *Genotype regio DNA gen 16S rRNA yaitu variasi sekuens asam nukleotida pada regio DNA gen 16S rRNA pada strain-strain sampel sputum pasien TB paru.*

4.5 Prosedur Penelitian

Tahun III:

1. Uji validitas eksternal metode amplifikasi asam nukleat dengan metode Multiplex PCR.
2. Analisis *genotyping* MTBC sebagai identifikasi epidemiologi molekular.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

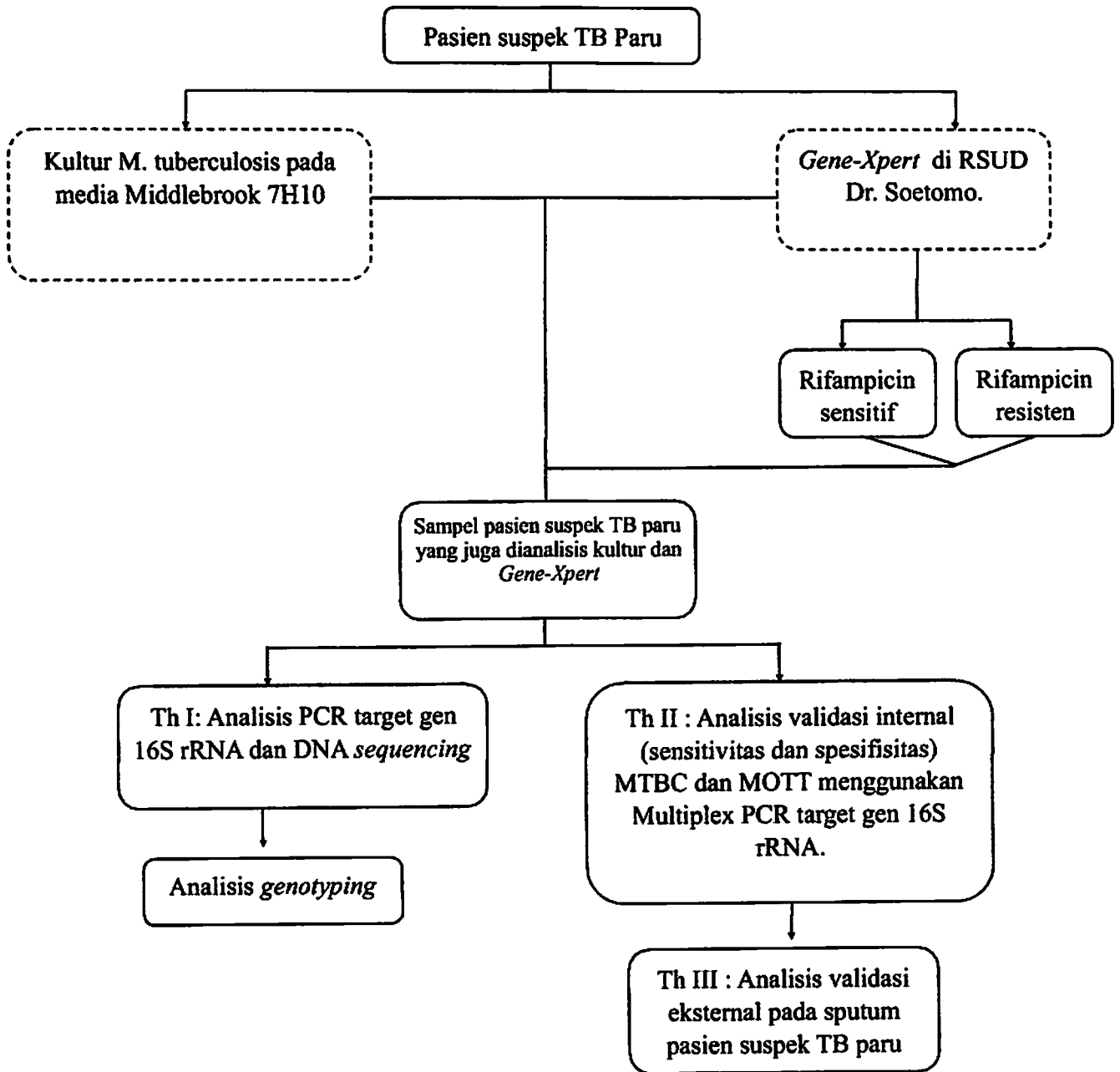
Penelitian ini dilakukan di *Institute of Tropical Diseases (ITD)* Universitas Airlangga, pengambilan sampel dilakukan di RSUD Dr. Soetomo, Surabaya; RSUP Sanglah, Bali; dan Puskesmas Mataram, Lombok.

Waktu penelitian pada tahun III dilaksanakan hingga Oktober 2018.

4.7 Analisis Data

Data *sequencing* dianalisis menggunakan program BLAST NCBI, *Clone Manager ver. 6.0*, *GENETYX ver. 10*, *BioEdit Sequence Aligment*, dan *Geneious ver. 10.0.7*. Uji validitas dengan metode *two fold*.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur penelitian

BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Luaran Hasil Penelitian

Tabel 5.1 Tabel Indikator dan luaran target capaian 3 tahun

No	Aktivitas Penelitian	Indikator dan luaran target capaian	
		Target	Capaian
1	Biokarakteristik <i>Mycobacterium tuberculosis Complex</i> dan MOTT; sistem bank isolat TB	1. Biokarakteristik fenotip dan genotype MTBC 2. Preparasi Bank Isolat TB 3. Jurnal ilmiah & seminar Nasional/ Internasional	1. Validasi gen-gen spesifik untuk identifikasi MTBC 2. Koleksi isolat MTBC dan MOTT 3. Jurnal Internasional Australian Journal of Medical Science status <i>Accepted waiting for publish</i>
2	Studi Metode Diagnosis TB Optimasi metode molekuler dengan target gen 16S rRNA Optimasi metode kultur padat Middlebrook 7H10	4. Pembicara di seminar Nasional/ Internasional	4. Oral presenter: 3 seminar dan Poster: 1 di seminar Internasional 5. Submit dan draft Jurnal Internasional: 5 topik
3	Genotyping & analisis regio gen spesifik pada gen 16S rRNA <i>Analisis sequencing</i> regio gen spesifik 16S rRNA Pemetaan molekuler epidemiologi		6. DNA sequencing target gen MTBC 7. Prototype sekuens spesifik primer (Rencana HKI) 8. Hasil analisis hubungan kekerabatan MTBC 9. Primer spesifik Multiplex PCR

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Analisis sekuens nukleotida pada regio DNA 1500 bp dari gen 16S rRNA *Mycobacterium tuberculosis Complex* pada penelitian ini di tahun terkahir ini dapat disimpulkan memiliki simpulan sebagai berikut:

1. *Genotype* gen 16S rRNA *Mycobacterium tuberculosis Complex* antara kelompok sampel pasien TB *Rifampicin* sensitif dengan *Rifampicin* resisten diketahui ada perbedaan ukuran dan susunan basa nukleotida gen, namun dibandingkan dengan sekuens kontrol yaitu DNA 16S rRNA *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv memiliki homologi antara 70-80%, sehingga masih berada dalam satu genus *Mycobacterium*.
2. Sekuens DNA *conserved* dan spesifik *Mycobacterium tuberculosis Complex* pada gen 16S rRNA pasien TB paru dapat dilihat pada homologi dengan spesies lain (MOTT) yaitu <70% (analisis menggunakan program BLAST NCBI dan *Clone Manager*).
3. Identifikasi spesies MTBC dan MOTT lebih memberikan hasil spesifik dengan menggunakan primer spesifik pada Multiplex PCR yang telah dioptimasi.
4. Hasil dari analisis *genotyping* MTBC dari pasien tuberkulosis di Jawa terdapat variasi strain *Beijing* yang dapat dilakukan penelitian selanjutnya.

6.2 Saran

Penelitian tahun III ini perlu dilanjutkan untuk penentuan diferensiasi spesies MTBC dan MOTT serta strain-strain baru dengan multi target gen spesifik menggunakan multiplex PCR yang juga akan didapatkan sensitivitas dan spesifisitas pengembangan metode diagnostik, hal ini perlu dilakukan karena pentingnya penentuan spesies untuk diagnosis pasien sebagai dasar penentuan kombinasi obat anti-TB.



DAFTAR PUSTAKA

- Adekambi, T. & Drancourt, M. 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA, and rpoB gene sequencing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol (54): 2095-2105.
- Bailey & Scott's, 2014. Diagnostic microbiology thirteenth edition. dalam: P. M. Tille, penyunt. *Elsevier Mosby*. China: Andrew Allen, p. 486.
- Bhunias S.K., Sarkar M., Banerjee A., Giri B. 2015. An update on pathogenesis and management of tuberculosis with special reference to drug resistant. *Asian Pac J. Trop Dis*. Vol 5(9): 673-686.
- Brooks G.F., Carroll K.C., Butel J.S., Morse S.A., Mietzner T.A. 2013. *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology 26th edition*. McGraw-Hill Companies Inc. USA.
- Clarridge III, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious disease. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol 17: 840-862.
- Cloud, J. L. *et al.* 2002. Identification of *Mycobacterium spp.* by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 40: 400-406.
- Cole, S. T. *et al.* 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 537-544.
- Datta, K. 2013. *Scilogs*. Online. www.scilogs.com. Diakses 05 December 2015.
- Kendall, B., Varley, C.D., and Choi D. 2011. Distinguishing tuberculosis from nontuberculous mycobacteria lung disease. Oregon. USA. *Emerg Infect Dis*. 17(3): 506-509.
- Kusumaningrum, Deby. 2015. Asosiasi positività nontuberculous Mycobacteria dengan derajat keparahan pasien tuberculosis paru. *Penelitian*. Universitas Airlangga.
- Mahboub B.H. dan Vats M.G. *Tuberculosis-Current Issues in Diagnosis and Management*, InTech, Croatia Diakses tanggal 14 November 2015.
- Mahlen, S. D. & Clarridge III, J. E. 2011. Evaluation of a selection strategy before use of 16S rRNA gene sequencing for the identification of clinically significant gram-negative Rods and Coccobacilli. *American Journal Clinical Pathology*, Vol 136: 381-388.
- McPherson, M.J. dan Møller, S.G. 2006. *PCR 2nd Edition*. Abingdon: Taylor & Francis Group.
- Mertaniasih, N. M, Koendhori, EB, & Kusumaningrum, D. 2013. *Tuberkulosis diagnostik mikrobiologis*. Airlangga University Press. Surabaya.

- NIAID. 2010. *Research Agenda Multidrug Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*. NIAID Tuberculosis Working Group. Diakses tanggal 14 November 2015.
- Ninet, B. et al. 1996. Two different 16S rRNA genes in a Mycobacterial strain. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 34: 2531-2536.
- Pangastuti, A. 2006. Species definition of procaryotes based on 16S rRNA and protein coding genes sequence. *Biodiversitas*. Vol 7: 292-296.
- Perez-Osorio, A. C. et al. 2012. Rapid identification of *Mycobacterium* and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of a single multiplex PCR and DNA sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 50: 326-336.
- Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI (InfoDATIN). 2015. *Tuberkulosis Temukan Obati Sampai Sembuh*. PUSDATIN.
- Sharma S.K. dan Mohan A. 2004. Multidrug-resistant tuberculosis. *Indian J. Med Res*. Vol 120: 354-376.
- Singleton, Paul. 2000. *DNA Methods in Clinical Microbiology*. Springer science business media, B. V.
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M. 2015. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS One*. 10(2): 1-22.
- Todar, Kenneth. 2008. Online. *textbook of bacteriology*. www.textbookbacteriology.net. Diakses tanggal 28 April 2016.
- Viljoen, G.T., Nel, L.H., dan Crowther, J.R. 2005. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Belanda: Springer.
- WHO. 2010. *Multidrug and Extensively Drug-Resistant TB (M/XDR-TB) 2010 Global Report On Surveillance and Response*. World Health Organization. Geneva. Diakses tanggal 14 November 2015.
- WHO. 2014. *Global Tuberculosis Report 2014*. World Health Organization. Geneva. Diakses tanggal 14 Januari 2016.
- WHO. 2015. *Global tuberculosis report 2015 20th edition*. WHO Press. Switzerland.

LAMPIRAN 1. Catatan Harian

No.	Tanggal	Kegiatan
1.	5 Januari 2018	Pengecekan isolat kultur tesis
2.	8 Januari 2018	Konfirmasi data pasien Lombok dan pengajuan tes tambahan untuk BTA
3.	10 Januari 2018	Sub kultur isolat yang masih baik
4.	12 Januari 2018	Optimasi PCR di Indonesia menggunakan protokol yang dioptimasi di Jepang
5.	17 Januari 2018	Optimasi PCR dengan protokol Multiplex PCR
6.	7 Februari 2018	Pengajuan ide riset pada ujian kualifikasi
7.	9 Februari 2018	Pengiriman sampel Lombok ke Surabaya
8.	14 Februari 2018	Ekstraksi sampel menggunakan Kit ekstraksi ISOPLANT (JAPAN) dengan metode sesuai dengan protokol
9.	15 Februari 2018	Pengajuan sampling RS NTB dan konfirmasi sampel lanjutan Puskesmas Lombok
10.	20 Februari 2018	Ekstraksi sampel dengan Kit Ekstraksi ISOPLANT dengan metode sesuai dengan sensei (Associate Prof. Fumito Maruyama, Ph. D)
11.	22 Februari 2018	Pengiriman berkas permohonan ijin penelitian ke RS NTB



12.	27 Februari 2018	Konfirmasi pengambilan sampel Bali
13.	7 Maret 2018	Pengajuan surat ijin ulang ke Bali
14.	10 Maret 2018	Internasional Konferensi di Niigata, Japan sebagai oral presenter
15.	11 Maret 2018	Diskusi dengan pembimbing di Japan, Associate Prof. Fumito Maruyama, Ph.D
16.	4 April 2018	Konfirmasi tentang perijinan sampel di Bali
17.	9 April 2018	Dekon sampel sputum dan dilanjutkan dengan kultur
18.	11 April 2018	Optimasi PCR dengan Kit Extaq Japan
19.	4 Mei 2018	Optimasi PCR gradien suhu dengan menggunakan Kit Extaq Japan
20.	7 Mei 2018	PCR menggunakan Kit Extaq Japan isolat GDC ditambah H37Rv (kontrol positif) and M. fortuitum (kontrol negatif)
21.	15 Mei 2018	PCR dengan Kit Extaq menggunakan isolat GDC
22.	15 Mei 2018	Cek kualitas DNA sampel isolat GDC menggunakan Nano drop
23.	16 Mei 2018	Ekstraksi dengan Kit Promega
24.	17 Mei 2018	PCR sampel sputum lama menggunakan kit Promega
25.	18 Mei 2018	Pengecekan hasil ekstraksi Promega dengan Nanodrop
26.	21 Mei 2018	PCR menggunakan Kit Promega

27.	22 Mei 2018	Ekstaksi dengan Kit Jena BioScience dan cek DNA kultur mandat
28.	23 Mei 2018	PCR dengan Kit Bioline (optimasi Kit)
29.	25 Juni 2018	Proposal Disertasi sekaligus untuk memulai penelitian
30.	3 Juli 2018	Konfirmasi hasil isolat dengan BTA sampel Lombok
31.	5 Juli 2018	Ekstraksi kultur dengan menggunakan Kit Promega
32.	5 Juli 2018	Revisi perijinan Bali
33.	9 Juli 2018	Ekstraksi dengan Kit Promega dan PCR dengan Kit Extaq
34.	11 Juli 2018	Ekstraksi isolat baru dengan Kit Qiagen
35.	12 Juli 2108	PCR sampel yang diekstraksi dengan Kit Bioline
36.	20 Juli 2018	Cek sampel isolat
37.	23 Juli 2108	Revisi MTA Bali
38.	26 Juli 2018	PCR isolat dengan menggunakan master mix Bioline (dengan target gen rpoB, Beijing strain, dan multiplex identifikasi)
39.	27 Juli 2018	Sekuensing sampel MTB, Beijing, Resistensi, dan K (-)
40.	27 Juli 2108	Persiapan PKPI (permohonan visa)
41.	27 Juli 2018	PCR isolat dengan menggunakan master mix Bioline (target gen rpoB)
42.	30 Juli 2018	Konfirmasi hasil sekuensing

43.	1 Agustus 2018	Permohonan RM isolat GDC yang belum
44.	2 Agustus 2018	PCR isolat melanjutkan sampel dengan multiplex identifikasi dan target resistensi
45.	2 Agustus 2018	Hasil sekuensing keluar
46.	3 Agustus 2018	PCR ulangan sampel isolat yang tidak teramplifikasi atau tampak tipis
47.	4 Agustus 2018	Pengajuan tes tambahan untuk BTA sampel Lombok
48.	8 Agustus 2018	PCR dan elektroforesis konfirmasi identifikasi isolat Jawa Timur
49.	9 Agustus 2018	Hasil sekuensing ralat (konfirmasi labeling)
50.	13 Agustus 2018	PCR dan elektroforesis ulang untuk konfirmasi hasil identifikasi
51.	14 Agustus 2018	Pengiriman sampel dari Jawa Barat
52.	14 Agustus 2018	Sekuensing untuk 5 sampel resistensi
53.	15 Agustus 2018	Permintaan data pasien sampel Jawa Barat
54.	16 Agustus 2018	Sampel Jawa Barat siap diisolasi
55.	20 Agustus 2018	Isolasi koloni sampel Jawa Barat ke media cair/ pbs
56.	21 Agustus 2018	Isolasi koloni sampel Jawa Barat lanjutan
57.	22 Agustus 2018	Input data pasien dari sampel Jawa Barat
58.	24 Agustus 2018	Pengecekan dan konfirmasi penomeran sampel Jawa Barat

59.	24 Agustus 2018	Sampling ke Jawa Tengah
60.	4 September 2018	Ekstraksi sampel Jawa Barat dengan metode ekstraksi kit Qiagen
61.	4 september 2018	Hasil sekuensing keluar siap untuk analisis resistensi
62.	5 September 2108	Menunggu konfirmasi waktu sampling isolat Bali
63.	5 September 2018	PCR sampel isolat hasil ekstraksi sebelumnya
64.	5 September 2018	Persiapan sampel lanjutan Jawa Barat
65.	6 September 2018	Analisis hasil sementara
66.	7 September 2108	Ekstraksi sampel lanjutan menggunakan metode ekstraksi kit
67.	7 September 2018	PCR dan elektroforesis hasil ekstraksi lanjutan
68.	8 September 2018	Input hasil raw data Jawa Barat
69.	9 September 2018	Pengajuan Etik penelitian dengan pengiriman berkas by email
70.	10 September 2018	Persiapan Media untuk sampling Jawa Tengah dan perijinan ke Komite Etik
71.	12 September 2018	Konsul penelitian dan pengurusan Ethical Clearance di Semarang
72.	13 September 2018	Revisi mengenai pengisian form Ethical Clearance
73.	17 September 2018	Pengurusan surat permohonan dari kampus untuk ke Komite Etik RSUP Kariadi Semarang
74.	1 Oktober 2018	Penerimaan sampel dari Jawa Barat

75.	2 Oktober 2018	Follow up ke Semarang mengenai sampel penelitian, namun sampel kultur masih banyak kontaminasi
76.	11 Oktober 2018	Pengurusan sampel Jawa Tengah ke Balai Laboratorium Kesehatan Semarang
77.	19 Oktober 2018	Pengiriman sampel dari Jawa Tengah ke Lab.Unair
78.	23 Oktober 2018	Pengurusan Ethical Clearance Semarang telah selesai
79.	25 Oktober 2018	Ekstraksi sampel Jateng dengan Kit Qiagen
80.	26 Oktober 2018	Ekstraksi sampel lanjutan Jawa Tengah dan 1 sampel Jawa Barat
81.	26 Oktober 2018	Pengiriman data pasien dari Jawa Tengah
82.	30 Oktober 2018	PKPI ke Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Japan
83.	12 November 2018	Progress report in NAIST, Japan

LAMPIRAN 2. Personalia Tenaga Pelaksana beserta kualifikasinya

No.	Nama/NIDN/NIM/NIP	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi Waktu (Jam/Minggu)	Uraian Tugas
1.	Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK (K)/ 0007035703	Dept. Mikrobiologi Kedokteran FK Universitas Airlangga	- Mikrobiologi - Imunologi	14 jam/minggu	- Manajemen kegiatan - Riset <i>genotyping</i> gen 16S rRNA MTB dan MOTT - Riset Multiplex PCR
2.	Dr. Soedarsono, dr., Sp. P (K)/ 195511231984101001	Dept. Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi Universitas Airlangga	- Pulmonologi - Klinisi	10 jam/minggu	- Sampling dan diagnosis klinis pasien TB paru
3.	Prof. Dr. Wayan T. Artama, DVM/ 0018085308	Dept. Biokimia FKH Universitas Gadjah Mada	- Biokimia - Biologi Molekuler - Imunologi	12 jam/minggu	- Riset <i>genotyping</i> gen 16S rRNA MTB dan MOTT - Riset Multiplex PCR
4.	Nastiti Intan Permata Sari, S.Si., M.Kcd.Trop/ 011617017346	Fakultas Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga	- Biologi molekuler - Zoologi - Mikrobiologi	15 jam/minggu	- Pendataan sampel - Pengerjaan PCR - Kultur bakteri TB - Riset <i>genotyping</i> gen 16S rRNA MTB dan MOTT - Riset Multiplex PCR
5.	Agnes Dwi Sis Perwitasari/ 139101094	Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga	- Biologi molekuler - Analisis Medis	10 jam/minggu	- Pengerjaan PCR - Kultur bakteri TB - Multiplex PCR
6.	Sugeng Harijono/ 196711182001121001	GDC RSUD Dr. Soetomo-FK Universitas Airlangga	- Mikrobiologi - Analisis Medis	10 jam/minggu	- Pengumpulan sampel - Kultur bakteri TB

LAMPIRAN 3. *Oral Presenter*

1. Seminar Internasional : The 7th Annual Basic Science International Conference



2. Seminar Internasional : The 2nd Molecular and Cellular Life Sciences Conference



3. Seminar Internasional : 52nd Mycobacteria Panel Meeting, Niigata, Japan



4. Seminar Internasional : 1st International Scientific Meeting on Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ISM-CMID)



LAMPIRAN 4. Abstrak Jurnal Internasional**1. *Australian Journal of Medical Science : Accepted*****A comparison of a biochemical test and gene amplification for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex from pulmonary TB isolates in Surabaya Indonesia****Nastiti Intan Permata Sari^{1,2}, Agnes Dwi Sis Perwitasari¹, Soedarsono^{3,4}, *Ni Made Mertaniasih^{1,4,5}**

1. Laboratory of Tuberculosis, Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga, Campus C Jl. Mulyorejo Universitas Airlangga, Surabaya 60115, Indonesia.
2. Study Program of Tropical Medicine, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47, Surabaya 60131, Indonesia.
3. Department of Pulmonology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47, Surabaya 60131, Indonesia.
4. Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia, Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47, Surabaya 60131, Indonesia.
5. Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47, Surabaya 60131, Indonesia.

*Correspondence author: Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK. (K)

Mailing address: Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine Universitas Airlangga-Dr. Soetomo Hospital, Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47, Surabaya 60131, Indonesia.

Email: nmademertaniasih@gmail.com; m_niasih@yahoo.com.

Abstract

Mycobacterium tuberculosis Complex (MTBC) is a primary cause of human pulmonary infection. The objective of this research was to study compatibility of the Polymerase chain reaction (PCR) method using specific DNA sequences in the 16S rRNA gene region for MTBC identification compared to conventional biochemical tests. Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* were collected from pulmonary tuberculosis specimens of patients in Dr. Soetomo Hospital Surabaya, Indonesia. Samples were collected randomly from January to July 2016. Samples were then assayed using a niacin accumulation test and PCR method in target region 1500 bp of the 16S rRNA gene. Eighty-seven *Mycobacterium* clinical isolates were identified by analyzing the 16S rRNA gene for MTBC diagnosis. Eighty-three isolates were positively identified as MTBC, indicated by 1500 bp band. Compared to conventional methods, PCR method was found to have 95.5% sensitivity and specificity. Specific DNA region at 1500 bp of 16S rRNA gene from *Mycobacterium tuberculosis* complex was found to be a rapid and accurately used identification method.

Key words: 16S rRNA gene, *Mycobacterium tuberculosis* Complex, identification, pulmonary tuberculosis isolates, Surabaya-Indonesia

2. *Infectious Diseases of Poverty* : Draft

Unique sequence of *Mycobacterium tuberculosis* complex 16S rRNA gene isolated from pulmonary tuberculosis patients in Surabaya, Indonesia

Nastiti Intan Permata Sari^{1,3}, Juniastuti^{2,3}, Fumito Maruyama⁴, *Ni Made Mertaniasih^{1,2}

1. Laboratory of Tuberculosis, Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia
2. Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga/ Dr. Soetomo General Hospital, Surabaya, Indonesia
3. Master Program of Tropical Medicine, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Indonesia
4. Department of Microbiology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Japan

*Corresponding author: Ni Made Mertaniasih

Mailing address: Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine Universitas Airlangga/ Dr. Soetomo General Hospital, on Mayjen. Prof. Dr. Moestopo street, no.47, Surabaya 60131, Indonesia.

Email: nmademertaniasih@gmail.com

+62 813 3051 1063

Abstract

Background: Sequence analysis of 16S rRNA is commonly used to determine phylogeny of bacteria species, especially focusing on variable region. The objective of this study was to analyze full sequence of 16S rRNA gene in *Mycobacterium tuberculosis* complex to identify isolates at the species level. *Mycobacterium tuberculosis* complex, especially *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, and *M. africanum* which many found in the world, are pathogenic bacteria in human pulmonary tuberculosis.

Methods: Ninety six of Sputum from pulmonary tuberculosis patients were collected in Dr. Soetomo Academic Hospital, Surabaya, Indonesia between September until December 2016 and cultured for phenotypic identification of colonies and biochemical characterization. The primers target 16S rRNA gene of *Mycobacterium tuberculosis* Complex around 1537 bp in length. Ninety six sputum samples were identified by microscopic observation with Acid Fast Bacilli staining, culture method, and PCR. Sputum with positive culture and PCR results, was examined by DNA sequencing.

Results: Eleven samples and 8 sequences of reference strains were analyzed with multiple alignment. Analyses of sequences revealed the similarity with *Mycobacterium tuberculosis* complex. Surprisingly, unique variation of variable region was found by the sequences determined.

Conclusion: Based on results of phylogenetic analysis, 16S rRNA gene could be used for detection and identification of MTBC but not used for species identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. The unique variation in the sequence will be useful for further detailed typing of MTBC for the epidemiology.

Keywords: 16S rRNA, variable region, *Mycobacterium tuberculosis* complex, pulmonary tuberculosis, unique sequences

3. *International Journal of Microbiology : Draft*

***Mycobacterium tuberculosis* Detection and Identification using Laboratory Serial Tests for Tuberculosis Epidemiology in Surabaya, Indonesia**

Nastiti Intan Permata Sari^{1,2*}, Ni Made Mertaniasih^{2,3} , Soedarsono⁴, Fumito Maruyama⁵

*1*Doctoral Program of Medical Science, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*2*Laboratory of Tuberculosis, Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*3*Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*4*Department of Pulmonology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*5*Department of Microbiology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Abstract

Introduction: Indonesia is part of Southeast Asia and has high burden disease of tuberculosis. In 2014, the incidence in Indonesia are around 1.000.000 cases and prevalence is around 1.600.000 cases with death rate around 100.000 in 254 million population. In 2016, WHO reported 10.4 million TB cases around the world. Indonesia is second highest TB burden country in the world, after India. Rapid detection and good diagnostic are very important for identification of tuberculosis in active tuberculosis patients. This is because prevention of the transmission to infect each others. Usually, in Indonesia government program, to detect tuberculosis is carried out by using Acid Fast Bacilli and Chest X-ray for screening. But, two steps is not enough because now, *Mycobacterium* is known to have many species variations that could be related to clinical outcome differences. The purpose of this study is to find molecular method that have high sensitivity and specificity of tuberculosis diagnostic in serial tests. This study was carried out by using Acid Fast Bacilli, culture method, Gene Xpert, and molecular detection based on PCR method using 16S rRNA gene for comparative analyses of the results. **Methods:** Total 96 sputum samples of pulmonary TB patients were collected from Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. The samples of pulmonary tuberculosis patients from Surabaya and surrounding place which have high tuberculosis incidence percentage in East Java, Surabaya (50%), Sidoarjo (23%), Madura (14%), and 14% is immigrant population in Surabaya. Most of them are men (58,33%) and woman (41,67%). The age around 30-60 years old is highest and have history of the tuberculosis treatment more than 6 months. The laboratory standard procedure were using the serial test of Acid Fast Bacilli microscopy (using Ziehl-Neelsen stain), Lowenstein-Jensen and Middlebrook culture method, Gene Xpert, in house PCR method for 16S rRNA gene region detection (around 1500 bp). **Results:** The results indicates that the molecular detection in house PCR showed highest sensitivity (83,1%), but the specificity still worse than those obtained by using the culture method it was 79,17%. **Conclusion:** This preliminary study to find out the molecular detection using PCR method for 16S rRNA gene region detection have the high sensitivity that could be used for detecting of active tuberculosis cases. Future expectations will be to develop molecular methods that are not only sensitive but also specific to manage tuberculosis cases, that it was included in serial tests.

Keywords: *Acid Fast Bacilli, Gene Xpert, Culture method, PCR method using 16S rRNA gene, pulmonary tuberculosis*

4. *Indian Journal of Tuberculosis : Draft***ACID FAST BACILLI MICROSCOPY MEANINGFUL FOR PULMONARY TUBERCULOSIS DIAGNOSIS IN TB BURDEN COUNTRY**

Soedarsono^{1,5}, Ni Made Mertaniasih^{2,3,5,*}, Rajesh Das⁴, Zakiyathun Nuha³, Nastiti Intan Permata Sari⁶

¹Department of Pulmonology and Respiratory Medicine, Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya 60131, Indonesia.

²Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya 60131, Indonesia.

³Laboratory of Tuberculosis, Institute of Tropical Disease, Airlangga University, Surabaya 60115, Indonesia.

⁴Department of Microbiology, Kathmandu College of Science and Technology, Tribhuvan University, Nepal.

⁵Dr. Soetomo Academic Hospital, Surabaya 60286, Indonesia.

⁶Doctoral Program of Medical Science, Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya 60131, Indonesia.

*Correspondence Author: ni-made-m@fk.unair.ac.id
nimademertaniasih@gmail.com

Abstract

Microscopic examination of sputum is a rapid, simple, practicable and inexpensive for the routine diagnosis of TB, effective and efficient for case finding method. Microscopic examination of Ziehl-Neelson (ZN) allows detection of most AFB in less than an hour and most extensively used procedure for detection of AFB in smear. Medical records collected consecutively start from January 2017 until July 2018 from PTB patients in Dr Soetomo Academic Hospital, Surabaya, East Java, Indonesia. Among 472 data conducted, 51.69% (244/472) was positive in working age category, 2.12% (10/472) was positive in elderly age category and 53.81% (254/472) in total number of patients with AFB positive, 9.11% (43/472) patients with no medical record of AFB examination, 9.11% (43/472) patient with scanty category result and 27.97% (132/472) of negative in total number of PTB patients which are 25.21% (119/472) included in working age category and 2.75% (13/472) included in elderly category. There are not complete recording of AFB sputum result for every time schedule of TB patient management program In monitoring AFB microscopy observation, month 0 (without data of AFB monitoring result) is 24.36%; month 1 (24.36%); month 2 (9.11%); month 3 (11.23%); month 4 (9,73%); month 5 (9.11%); month 6 (12.08%). Developing strategies to improve PTB diagnostic is the critical approach to prevent active spreading of TB disease. Systematic control system of AFB smear microscopy is important strategies to prevent and minimized spreading of disease especially at productive stage of age. High quality control of monitoring evaluation for TB patient care, intensive and commitment of all nurses and providers to attach responsibility for patient clinical outcome are the important role to increase capacity building of AFB microscopy method. Acid fast bacilli have important meaning in the initial determining diagnosis for new TB patients and in monitoring evaluation steps.

Keywords: Acid Fast Bacilli, Pulmonary Tuberculosis, Diagnosis

5. *African Journal of Infectious Disease : Draft*

Sequence Analysis of the specific DNA region of *Mycobacterium tuberculosis rpoB* Gene of Multidrug Resistant and non-Multidrug Resistant from sputum of pulmonary Tuberculosis Patients in Dr. Soetomo Hospital of Surabaya, Indonesia

Muhammad Hilman Fu'adil Amin¹, Fatimah¹, Sarwan Adi Kusumo¹, Santha¹, Ni Made Mertaniasih^{2,3*}, Nastiti Intan Permata Sari³

¹ Department of Biology , Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya.

² Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya.

³ Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga, Surabaya.

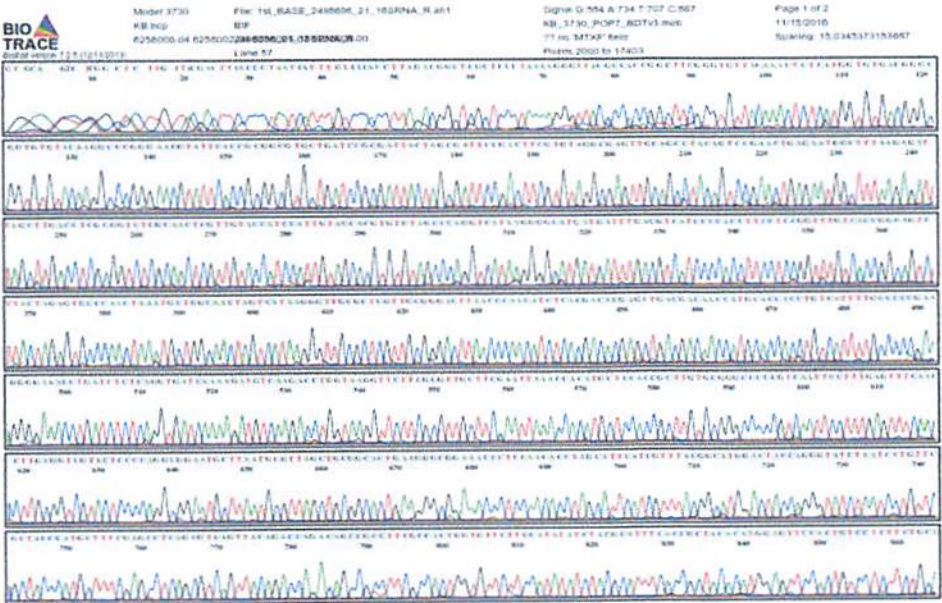
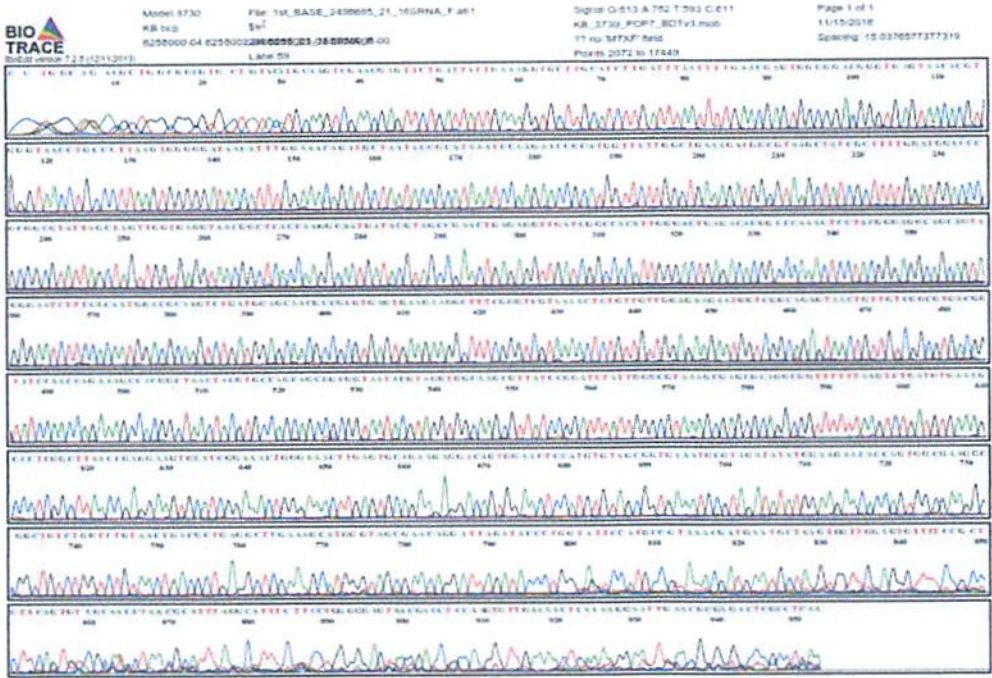
*corresponding author : ni-made-m@fk.unair.ac.id ; nmademertaniasih@gmail.com

ABSTRACT

This research aims to analyze nucleotide sequences of *M. tuberculosis rpoB* gene in multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) and non MDR-TB strain of pulmonary TB patients in Dr. Soetomo hospital of Surabaya, the difference between samples, and difference compared to *M. tuberculosis H37Rv rpoB* gene GenBank as reference sequence. Samples that were used in this research is confirmed as MDR-TB by GeneXpert. Sputum decontamination using Modified Alkali Petroff's method and the total DNA of the samples were extracted by Bacteria DNA Preparation Kit. The *rpoB* gene was amplified from the *M. tuberculosis* total DNA with primer Pol B-5A dan Pol B-5B and My Taq™ HS Red Mix. Amplified PCR product was electrophorized to verify the presence of 619 bp fragment. The result of cycle sequencing was analyzed using Geneious and BLAST. The post trimming sequence of *M. tuberculosis rpoB* gene has the size of 596-614 bp located in base number 1245-1840. All of the sequence of *M. tuberculosis rpoB* gene samples have 100% similarity within the samples. The consensus sequence of *M. tuberculosis rpoB* gene samples have the exact nucleotide base sequence and protein alignment compared to the *rpoB* gene sequence of *M. tuberculosis H37Rv*, complete genome (accession number AL123456) which is the virulent wild type strain.

Keywords: Multidrug Resistant, *Mycobacterium tuberculosis*, *rpoB* gene, Surabaya-Indonesia

LAMPIRAN 5. Hasil DNA Sekuensing



LAMPIRAN 6. Rencana HKI *Prototype* desain primer 16S rRNA *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC)

Primer Forward


Primer Definition:

Name: f
Description:
Notes:

Sequence: CGCGCTTTTGTGGAGAGTTTGATCCTGG
Length: 30

Composition: A: 3 C: 5 G: 10 T: 12
Molar absorbance: 33.7 $\mu\text{g/ml}$ = 1 OD260

Analysis criteria: PCR Primer


	%GC	Tm°C	Dimers	Stability	GC clamp	Runs	Hairpin	FP
	50	71	OK	2.0	OK	!!	OK	-

PCR Primer: f
One Primer Report

Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	50	Yes
Tm°C	Range 55-80	71	Yes
3' Dimers	< 3 matches at 3' end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	4	Yes
Stability	>= 1.2 kcal 5' vs 3'	2.0	Yes
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	2	Yes
Runs	< 4 base runs	4	No
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes
Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes
Worst-case False Priming °C		n/a	

Primer Reverse

Primer Definition:	
Name:	r
Description:	
Notes:	
Sequence:	GAGAAAGGAGGIGATCCAGCCGC
Length:	23
Composition:	A: 7 C: 5 G: 9 T: 2
Molar absorbance:	30.5 µg/ml = 1 OD260
Analysis criteria:	PCR Primer

	%GC	Tm°C	Dimers	Stability	GC clamp	Runs	Hairpin	FP
	60	69	OK	-1.9	OK	OK	OK	-

PCR Primer: r
One Primer Report

Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	60	Yes
Tm°C	Range 55-80	69	Yes
3' Dimers	< 3 matches at 3' end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	4	Yes
Stability	>= 1.2 kcal 5' vs 3'	-1.9	No
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	5	Yes
Runs	< 4 base runs	3	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes
Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes
Worst-case False Priming °C		n/a	

LAMPIRAN 7. Primer Spesifik Multiplex PCR

Primer	Sekuens	Size
16S rRNA	5- GAGATACTCGAGTGGCGAAC -3	506
	5- CAACGCGACAAACCACCTAC -3	
rv0577	5- ATGCCCAAGAGAAGCGAATACA -3	705
	5- AATGTCAGCCGGTTCCGCAA -3	
RD9	5- GTGTAGGTCAGCCCCATCC -3	369
	5- GTAAGCGCGTGGTGTGGA -3	
mtbk_20680	5- TTATGCCAGAAATACACCCGCG -3	231
	5- AATCGCGGGCTTGTGGCTAC -3	

