

PS1
17

Jakarta

UJI VALIDASI DIAGNOSTIK MOLEKULER *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP)-TB BERDASARKAN DATA KARAKTERISASI STRAIN *Mycobacterium tuberculosis* di INDONESIA (TAHAP I)

DR. Vivi Lisdawati, MSi., Apt., dkk.



**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN, RI**

2011

PS1
17

UJI VALIDASI DIAGNOSTIK MOLEKULER *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP)-TB BERDASARKAN DATA KARAKTERISASI STRAIN *Mycobacterium tuberculosis* di INDONESIA (TAHAP I)

DR. Vivi Lisdawati, MSi., Apt., dkk.



**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN, RI**

2011

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan	
PERPUSTAKAAN	
Tanggal :	30-8-2012
No. Induk :	Ps 1-17/2012
No. Kelas :	Ps 1
	17



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

KEPUTUSAN

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
NOMOR: HK.03.05/III/962/2011

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2011

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

- MENIMBANG** :
- bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, perlu ditunjuk Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2011;
 - bahwa berdasarkan pertimbangan huruf a tersebut diatas, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2011 sejumlah tujuh belas penelitian;
- MENINGAT** :
- Undang-Undang Nomor 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 1992 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3495);
 - Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130);
 - Peraturan Pemerintah RI No. 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);
 - Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Alih Tehnologi Kekayaan Intelektual serta hasil Penelitian dan Pengembangan oleh Perguruan Tinggi dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara Tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4497);
 - Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
 - Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/Menkes/SK/X/1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
 - Peraturan Presiden Nomor. 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara.
 - Peraturan Menteri Kesehatan No. 1144/Menkes/Per/VIII/2010 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;
 - Keputusan Kementerian Kesehatan RI No.03.05/4/220/2001 tanggal 7 Januari 2011 tentang Penetapan Pejabat Kuasa Pengguna Anggaran, Pejabat yang melakukan Tindakan yang Mengakibatkan Pengeluaran Anggaran Belanja/Pembuat Komitmen, Pejabat Penguji SPP, Pejabat Penandatanganan SPM, Bendahara Penerima dan Pengeluaran pada Kantor Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Jakarta;
- MEMPERHATIKAN** :
- Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2011 dengan No.0683/024-11.1.01/00/2011, tanggal 20 Desember 2010;
 - Perjanjian Pelaksanaan Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan dengan No. PR.03.01/III/876/2011 sampai dengan Nomor: No. PR.03.01/III/912/2011, tanggal 14 Februari 2011.



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

MEMUTUSKAN

MENETAPKAN

KESATU

- : 1) Membentuk Tim Pelaksana Penelitian Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2011 sebagaimana tercantum dalam lampiran keputusan ini;
2) Kepada Tim Pelaksana Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Tahun Anggaran 2011, dapat diberikan honorarium sebagaimana tersebut dalam lampiran 2 Keputusan ini;

KEDUA

- : Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2011 mempunyai tugas sebagai berikut:
1) Melaksanakan Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2011, dengan susunan Tim seperti pada lampiran surat keputusan ini;
2) Menyerahkan Laporan Kemajuan Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian dan Laporan Akhir Penelitian kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

KETIGA

- : Dalam melaksanakan tugasnya, Tim bertanggungjawab kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan serta wajib menyampaikan laporan akhir penelitian sebagai pertanggungjawaban kegiatan;

KEEMPAT

- : Biaya pelaksanaan kegiatan serta honor Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2011 dibebankan pada anggaran DIPA Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2011;

KELIMA

- : Keputusan ini mulai berlaku sejak bulan Januari sampai dengan Desember 2011 dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini akan diadakan perbaikan dan perubahan sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Jakarta
Pada tanggal : 17 Februari 2011

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP. 19621119-198603 100 1

Tembusan Yth:

1. Sekretaris Jenderal Kemenkes RI;
2. Inspektur Jenderal Kemenkes RI;
3. Ketua Badan Pemeriksa Keuangan;
4. Kepala Badan Pengawasan Keuangan dan Pembangunan;
5. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
6. Sekretaris Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
7. Kanwil Ditjen Anggaran Kemenkeu RI DKI Jakarta;
8. Para Kepala Pusat di Lingkungan Badan Litbang Kesehatan;
9. Kepala Bagian Tata Usaha Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
10. Kepala Bidang Biomedis, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
11. Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
12. Bendaharawan Pengeluaran Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
13. Masing-masing yang bersangkutan untuk dilaksanakan.



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

Lampiran 1

Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar
Kesehatan

Nomor : HK.03.05/III/962/2011

Tanggal : 17 Februari 2011

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2011

UJI VALIDASI DIAGNOSTIK MOLEKULER Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP-TB)
BERDASARKAN DATA KARAKTERISASI STRAIN Mycobacterium tuberculosis di INDONESIA
(TAHAP I)

- | | |
|--|--|
| 1. Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si, Apt | : Koordinator Penelitian |
| 2. DR. Vivi Lisdawati, M.Si, Apt | : Peneliti Muda Ketua Pelaksana |
| 3. DR.dr. Trihono, M.Sc | : Peneliti Utama/ Konsultan |
| 4. Prof. Pratiwi Sudarmono, PhD., Sp.MK(K) | : Peneliti Utama/ Konsultan |
| 5. Dr.dr. Ida Parwati, Sp.PK(K), Ph.D | : Peneliti Utama/ Konsultan |
| 6. Dr. Elisna Syahrudin, Sp.P(K), Ph.D | : Peneliti Madya/ Konsultan |
| 7. Dr. Reynaldi, Sp.(MK) | : Peneliti Madya/ Konsultan |
| 8. Dr. Tjahjani Mirawati Sudiro., Ph.D | : Peneliti Madya/ Konsultan |
| 9. Dra. Retno Gitawati, M.S, Apt | : Peneliti Madya |
| 10. Dra. Daroham Mutiatikum, M.Si, Apt | : Peneliti Madya |
| 11. Dra. Pudji Lastari, Apt | : Peneliti Madya |
| 12. Drs. Andriansjah, Ph.D | : Peneliti Muda |
| 13. Dr. Fransisca, Ph.D | : Peneliti Muda |
| 14. Dra. Sukmayati Alegantina | : Peneliti Muda |
| 15. Indri Rooslamia, M.Sc,Apt | : Peneliti Muda |
| 16. Dr. Lutfah Rifati, Sp.Opth | : Peneliti Pertama |
| 17. Dr. Nelly Puspandari | : Peneliti Pertama |
| 18. Lina Rustanti, M.Sc, Apt | : Peneliti Pertama |
| 19. Holly Arif Wibowo, S.Si | : Peneliti Pertama |
| 20. Drs. Sunarno, M.Biomed | : Peneliti Pertama |
| 21. Kambang Sariaji, S.Si | : Peneliti Pertama |
| 22. Kindi Adam, S.Si | : Peneliti Pertama |
| 23. Izza R, S.Si, M.Biomed | : Peneliti Pertama |
| 24. Drs. Syahril Harun, M.Sc | : Peneliti Pertama |
| 25. Auia Rizki, S.Si | : Peneliti Non Fungsional |
| 26. Ni Wayan Ariani, S.Si | : Peneliti Non Fungsional |
| 27. Triyani Sukarso, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 28. Melatiwati, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 29. 29. Syamsidar, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 30. Dorkas Maria L, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 31. Sumarno | : Pembantu Peneliti |
| 32. Yudi Hartoyo | : Pembantu Peneliti |
| 33. Lies Ratnasari | : Pembantu Peneliti |



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

34. Kusniah, SAP	: Pembantu Peneliti/Adm
35. Kelik Muhammad Arifin	: Pembantu Peneliti/Adm
36. Desniwati	: Pembantu Peneliti/Adm
37. Suparmi, S.Si., M.Stat	: Pengolah Data
38. Novi Amalia	: Pembantu Peneliti
39. Sundari Nur Sofiah, AMAK	: Pembantu Peneliti
40. Tresnawati, AMAK	: Pembantu Lapangan
41. Susantio	: Pembantu Lapangan
42. Darmayanti	: Pembantu Lapangan
43. Taufik	: Pembantu Lapangan

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIR 196211191988031001
REPUBLIK INDONESIA

Kata Pengantar

Alhamdulillah Rabbil 'Aalamiin...

Puji dan syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang karena berkat rahmat Nya lah maka penyusunan Laporan Hasil Penelitian dengan judul: UJI VALIDASI DIAGNOSTIK MOLEKULER *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP)-TB BERDASARKAN DATA KARAKTERISASI STRAIN *Mycobacterium tuberculosis* di INDONESIA (TAHAP I), dapat kami selesaikan.

Laporan Hasil Penelitian ini disusun sebagai salah satu luaran penelitian yang bertujuan untuk mengembangkan metode uji diagnostik molekuler untuk deteksi cepat bakteri *Mtb* di Indonesia berdasarkan data surveilans epidemiologi molekuler.

Kami menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna tetapi semoga hasil yang kami tuliskan ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak yang memerlukan.

Jakarta, Januari 2012

Penulis

Dr. Vivi Lisdawati, MSi., Apt.

NIP. 196811181996032001

RINGKASAN EKSEKUTIF

Data Badan Kesehatan Dunia (WHO) tahun 2009 masih menempatkan Indonesia pada urutan ketiga sebagai negara dengan pengidap Tuberkulosis Paru (TB) terbanyak sesudah India dan Cina. Hal ini menyebabkan intervensi program penanggulangan penyakit TB di Indonesia menjadi salah satu indikator keberhasilan pencapaian target *Millenium Development Goals* (MDG's) di bidang kesehatan pada tahun 2010. Salah satu intervensi pengendalian TB yang direkomendasikan oleh WHO adalah penelitian untuk pengembangan diagnostik molekuler yang dapat menjadi metode alternatif diagnostik konvensional. Penelitian berjudul: Uji Validitas Diagnostik LAMP-TB Berdasarkan Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* di Indonesia (Tahap I), merupakan salah satu penelitian yang dimaksudkan untuk menjawab tantangan tersebut di atas.

Penelitian ini termasuk penelitian aplikasi dari hasil penelitian sebelumnya (Uji Karakteristik bakteri *Mtb* dari tahun 2008-2010). Data dari penelitian sebelumnya dimanfaatkan untuk pengembangan diagnostik molekuler TB metode LAMP di Indonesia yang masih memerlukan uji validasi untuk primer yang diperoleh, agar dapat diaplikasikan dan terintegrasi dalam pelayanan fasilitas kesehatan di masyarakat. Penelitian bertujuan untuk memperoleh data spesifisitas dan sensitivitas primer diagnostik molekuler *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP) yang dikembangkan dari hasil karakteristik bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) di Indonesia, dengan melakukan uji validasi di sejumlah fasilitas kesehatan masyarakat untuk pemeriksaan TB. Selain uji validasi primer, modifikasi terhadap formula reagen diagnostik LAMP-TB juga perlu dilakukan agar dapat menjadi nilai tambah bagi terjaganya kesinambungan uji dan sekaligus bagi persiapan kemandirian bangsa untuk memenuhi swasembada diagnostik molekuler TB. Data karakteristik dan pola resistensi kuman *Mtb* yang telah diperoleh pada penelitian sebelumnya dapat pula dikembangkan ke arah desain primer untuk uji resistensi metoda LAMP.

Uji validasi diagnostik LAMP-TB tahun 2011 dilaksanakan pada dua rumah sakit di wilayah kota Jakarta dan Bandung. Sebelum pelaksanaan uji dilakukan, terlebih dulu diadakan diseminasi dari hasil penelitian tahun 2008-2010. Diseminasi ditujukan pada seluruh fasilitas kesehatan masyarakat yang terlibat dalam penelitian sebelumnya, yaitu wakil dari dinas kesehatan dari 16 ibu kota provinsi di Indonesia (Padang, Pekanbaru, Lampung, Palembang, Medan, Serang, Jakarta, Bandung, Surabaya, Mataram, Banjarmasin, Pontianak, Ambon, Manado, Makassar dan Sorong). Diseminasi juga mengundang institusi yang nantinya akan menggunakan hasil-hasil dari penelitian yang telah dilakukan. Diseminasi hasil sekaligus dimaksudkan untuk mempermudah kerja sama yang akan dilakukan pada tahun-tahun selanjutnya terkait penelitian yang sama. Setelah diseminasi, maka tahap uji coba lapangan didahului dengan pelatihan teknik diagnostik LAMP-TB bagi tenaga laboratorium dari fasilitas kesehatan masyarakat yang terlibat pada tahap pertama. Pelatihan dilakukan secara bertahap, yaitu di laboratorium Bakteriologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (BTDK) yang dilanjutkan dengan bimbingan teknis di lapangan saat uji coba dilaksanakan. Selain itu, dilakukan pula survey lapangan ke wilayah penelitian yang akan terlibat pada tahap selanjutnya, untuk mengidentifikasi tempat uji coba yang memenuhi persyaratan pelaksanaan validasi diagnostik LAMP sesuai standard penelitian. Sementara itu, dilakukan pula pengembangan formulasi reagen diagnostik LAMP secara paralel oleh tim formulasi penelitian pada laboratorium Farmasi, Pusat BTDK berkolaborasi dengan Departemen Mikrobiologi, Fakultas

Kedokteran Universitas Indonesia.. Dan pada saat yang sama, tim penelitian juga melakukan pengembangan desain primer resistensi yang akan diformatkan untuk diagnostik LAMP di laboratorium Biomolekuler, Pusat BTDK.

Dari beberapa kegiatan yang dilaksanakan pada studi ini kemudian diperoleh hasil berupa:

- a. Jejaring kerja sama yang lebih kuat antar pihak peneliti dari Pusat BTDK, institusi pemerintah daerah dan personal yang mewakili fasilitas kesehatan masyarakat di enam belas ibu kota provinsi yang telah terlibat pada penelitian dari tahun 2008-2010, institusi program di Kementerian Kesehatan dan juga institusi industri yang diharapkan dapat mewadahi kesinambungan produk hasil dari penelitian dan memproduksinya nanti secara massal ke masyarakat.

Institusi pemerintah daerah yang hadir pada saat diseminasi adalah:.....(Dinkes Kota Padang, Dinkes Kota Banjarmasin, Dinkes Palembang, Dinkes Kota Jakarta, Dinkes Kota Bandung, Dinkes Kota Makassar, Dinkes Kota Surabaya, Dinkes Kota Mataram, Dinkes Kota Ambon, Dinkes Kota Manado, Dinkes Kota Pontianak, dan Dinkes Kota Serang Banten)

Institusi Program yang hadir adalah: Program Pengendalian Penyakit dan Lingkungan (P2PL), Kementerian Kesehatan.

Institusi / Lembaga Litbang lintas sektor yang hadir adalah: LIPI, Kementerian Ristek

Institusi dari pihak Bisnis / Industri adalah: PT Bio Farma.

- b. Peningkatan kemampuan pekerja laboratorium yang terlibat dalam penelitian untuk melaksanakan uji diagnostik LAMP-TB menggunakan primer LAMP yang telah dipatenkan dan dikembangkan oleh Badan Litbangkes dari hasil penelitian sebelumnya. Peningkatan kemampuan dinilai dari hasil pre-test dan post-test yang dilakukan pada saat pelatihan dilaksanakan. Dimana rata-rata peningkatan berkisar antara 20-40%. Peserta yang mencapai peningkatan paling tinggi sejumlah 1 orang peserta.
- c. Nilai sensitifitas dan spesifisitas primer LAMP TB paten Balitbangkes berdasarkan hasil uji coba lapangan di faskesmas menunjukkan bahwa sensitifitas dari primer adalah 96,8% dan 90,2% (lebih kurang) setelah konfirmasi dengan hasil kultur;
- d. Gambaran secara komprehensif mengenai kemampuan sarana dan prasarana fasilitas kesehatan masyarakat di tiga ibu kota provinsi di Indonesia yang akan dilibatkan pada uji validasi primer LAMP (Badan Litbangkes) di tahap selanjutnya. Dari hasil survey terlihat bahwa hanya satu fasilitas kesehatan masyarakat di daerah yang dikunjungi memenuhi syarat untuk dapat menjadi lokasi uji coba pada tahap selanjutnya. Hasil survey juga menunjukkan bahwa seluruh lokasi yang menjadi tempat uji coba merupakan laboratorium yang telah termasuk ke dalam jejaring Laboratorium Influenza (*AI networking laboratories*) milik Kementerian Kesehatan yang dikoordinasi oleh Badan Litbangkes, yaitu Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) kota Makassar; BBLK kota Surabaya dan RS M. Jamil kota Padang;
- e. Kandidat formula untuk reagen diagnostik LAMP-TB yang lebih mudah diperoleh di pasaran dan dapat diaplikasikan di laboratorium yang sesuai standard laboratorium diagnostik di Indonesia, dimana kandidat formulasi juga menjadi kandidat paten dari produk penelitian ini;
- f. Data Studi bioinformatika kandidat primer LAMP TB untuk uji resistensi TB yang diharapkan dapat mempermudah diagnosis TB resisten di Indonesia. Kandidat primer nantinya juga merupakan kandidat paten pada produk penelitian.

ABSTRAK

Diagnostik molekuler untuk kasus Tuberkulosis Paru (TB) merupakan salah satu alternatif mengatasi keterbatasan metode konvensional berupa uji mikroskopik BTA dan uji kultur bakteri. Metode *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) termasuk metode diagnostik molekuler yang telah direkomendasikan WHO untuk diagnostik TB. Penelitian berjudul: Uji Validitas Diagnostik LAMP-TB Berdasarkan Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* di Indonesia yang bertujuan untuk menentukan spesifisitas dan sensitivitas primer LAMP-TB paten Litbangkes adalah dimaksudkan untuk menjawab keperluan swasembada diagnostik molekuler TB di Indonesia dimana primer dikembangkan dari hasil karakteristik bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) yang bersirkulasi di Indonesia. Uji validasi primer LAMP-TB paten Litbangkes diperlukan agar nantinya primer dapat diaplikasikan dan terintegrasi dalam pelayanan fasilitas kesehatan masyarakat di Indonesia. Selain uji validasi, penelitian juga melakukan modifikasi formulasi diagnostik LAMP untuk memenuhi keperluan akan swasembada diagnostik molekuler TB di Indonesia. Bersamaan dengan itu maka dilakukan pula secara paralel pengembangan desain primer resistensi LAMP-TB melalui studi bioinformatika pada penelitian ini.

Uji Validasi dilaksanakan di dua rumah sakit di kota Jakarta dan Bandung, yaitu RS Hasan Sadikin dan RS Persahabatan dengan menggunakan sampel pasien TB yang terintegrasi dalam program DOTs dan pasien non-TB. Sebelum pelaksanaan uji dilakukan, terlebih dahulu dilakukan pelatihan LAMP bagi tenaga laboratorium yang terlibat dan dilanjutkan dengan bimbingan teknis di lapangan selama uji coba dilaksanakan. Hasil validasi menunjukkan nilai sensitivitas dan spesifisitas primer LAMP paten Balitbangkes berkisar 96,8% dan 90,2% (lebih kurang) setelah konfirmasi dengan hasil kultur. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa primer memiliki sensitifitas dan spesifitas yang tinggi terhadap kuman TB yang beredar di Indonesia.

Pengembangan formulasi menunjukkan kandidat formulasi dapat dikembangkan dengan memanfaatkan teknik Boom sementara desain primer resistensi LAMP-TB difokuskan pada gen *gyrA* dan *gyrB* pada genome *Mtb* H37Rv.

Kata Kunci: *Mycobacterium tuberculosis*, *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), *gyrA*, *gyrB*, genome *Mtb* H37Rv.

DAFTAR SUSUNAN TIM PENELITIAN

Koordinator Peneliti : Drs. Ondri Dwi Sampurno, MSi., Apt.

Ketua Pelaksana : Dr. Vivi Lisdawati, MSi., Apt.

Konsultan Penelitian:

1. Dr. dr. Trihono, MSc.
2. Prof. Pratiwi Sudarmono, Sp.MK.(K), Ph.D.
3. Dr. dr. Ida Parwati, Sp.PK.(K), PhD.
4. dr. Tjahjani Mirawati Sudiro, PhD.
5. Andriansjah, PhD.
6. dr. Elisna Syahrudin, Sp.P(K)., Ph.D.
7. dr. Reynaldi, Sp.MK

Anggota Tim:

1. Dra. Retno Gitawati, MS., Apt.
2. Dra. Daroham M, MSi, Apt.
3. dr. Fransisca, PhD.
4. Dra. Pudji Lastari, Apt.
5. Dra. Sukmayanti Alegantina
6. dr. Lutfah Rif'ati, Sp.Opt
7. dr. Nelly Puspandari
8. Indri Roslamiati, MSc., Apt
9. Lina Rustanti, M.Sc., Apt
10. Holy Arif Wibowo, S.Si
11. Drs. Sunarno, M.Biomed
12. Kambang Sariadji, S.Si
13. Kindi Adam, S.Si
14. Ni Wayan Ariani, S.Si
15. Aulia Rizki, S.Si

16. Izza R, S.Si., M. Biomed
17. Drs. Syahrial Harun, M.Sc
18. Triyani Sukarso, MAK
19. Melatiwati, MAK
20. Syamsidar, MAK
21. Dorkas Maria L, MAK
22. Sumarno
23. Yudi Hartoyo
24. Lies Ratnasari, MAK
25. Kelik M. Arifin
26. Kusniah, SAP
27. Desniwati
28. Suparmi, S.Si., M. Stat
29. Novi Amalia, MAK
30. Sundari Nur Sofiah, MAK
31. Tresnawati, MAK
32. Susantio
33. Darmayanti
34. Taufik

DAFTAR ISI

	SK PENELITIAN	I
	KATA PENGANTAR	V
	RINGKASAN EKSEKUTIF	VI
	ABSTRAK	VIII
	SUSUNAN TIM PENELITI	IX
	DAFTAR ISI	XI
	DAFTAR TABEL	XIII
	DAFTAR GAMBAR	XIII
	DAFTAR LAMPIRAN	XIV
BAB I.	PENDAHULUAN	1
	1. Latar Belakang	1
	2. Tujuan dan Manfaat	6
	3. Luaran	7
BAB II.	METODOLOGI PENELITIAN	8
	1. a. Kerangka konsep penelitian	8
	b. Alur penelitian	8
	2. Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian	11
	3. Desain Penelitian	11
	4. Langkah Penelitian	11
	5. Populasi dan Sampel	11
	6. Variabel	15
	7. Cara pengumpulan data	16
	8. Bahan dan Prosedur Kerja	16
	9. Analisis Data	23
	10. Definisi Operasional	23
	11. Pertimbangan Etik	23
BAB III.	HASIL DAN PEMBAHASAN	24
BAB IV.	KESIMPULAN DAN SARAN	44

UCAPAN TERIMA KASIH	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Sejumlah 149 galur <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>Mtb</i>) yang terdapat pada sampel dari 16 ibu kota provinsi di Indonesia	5
Tabel3.1	Hasil Pre-Test dan Post-Test Peserta Pelatihan Diagnostik LAMP	28
Tabel3.2.A	Hasil Uji Validasi primer <i>gyrB</i> (Paten Badan Litbangkes) pada sampel pasien TB	32
Tabel3.2.B	Hasil Uji Validasi primer <i>gyrB</i> (Paten Badan Litbangkes) pada sampel pasien TB	33
Tabel3.2.C	Hasil Uji Validasi primer <i>gyrB</i> (Paten Badan Litbangkes) pada sampel pasien TB	34
Tabel3.3	Hasil Uji Kelaikan Laboratorium di Kota Makassar, Padang dan Surabaya untuk Uji Validasi Primer LAMP (Badan Litbangkes)	37
Tabel3.4	Hasil Pengembangan Reagen Formulasi	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Dendrogram <i>Mtb</i> dari wilayah Sumatera-Kalimantan, Jawa dan wilayah Timur Indonesia yang disusun berdasarkan genotipe bakteri secara <i>spoligotyping</i> menggunakan sekuens DR genome <i>Mtb</i> H37Rv	4
Gambar2.1	Kerangka konsep penelitian Uji Validasi Diagnostik Molekular LAMP-TB Berdasarkan Hasil Karakterisasi Strain <i>Mycobacterium tuberculosis</i> di Indonesia	8
Gambar2.2	Kerangka Alur Penelitian Uji Validasi Diagnostik Molekular LAMP-TB Berdasarkan Hasil Karakterisasi Strain <i>Mycobacterium tuberculosis</i> di Indonesia	10
Gambar2.3	Algoritma Uji Validasi Diagnostik Molekular LAMP-TB	14
Gambar3.1	Hasil deteksi DNA <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dari kultur bakteri menggunakan teknik LAMP dengan metode deteksi secara fluoresensi pada waktu pelatihan tenaga laboratorium	30
Gambar3.2	Karakteristik Responden Penelitian Berdasarkan Kelompok Umur	31
Gambar3.3	Karakteristik Responden Penelitian Berdasarkan Jenis Kelamin	31
Gambar3.4	Hasil visual uji LAMP-TB dengan primer LAMP paten Balitbangkes (Lisdawati, <i>et.al.</i>), indikator <i>fluorescent detection reagen</i> serta instrument penangas air. Tube PC adalah Kontrol Positif berisi DNA <i>Mtb</i> H37RV dan Tube DW adalah Kontrol negatif kontrol	35
Gambar3.5	Hasil Uji Validasi LAMP-TB	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Inform Consent</i> Penelitian	50
Lampiran 2.	Kuisiner Survei Kelaikan Laboratorium untuk Uji Coba LAMP-TB	52
Lampiran 3A.	Identifikasi & Karakterisasi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dari Spesimen Dahak Pasien TB di Indonesia (Penelitian 2008-2010)	56
Lampiran 3B.	Studi Pemetaan Awal DNA <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex Secara <i>Spoligotyping</i> pada Hasil Isolasi Dahak Pasien Tuberculosis Paru dari 10 Ibukota Provinsi	57
Lampiran 3C.	Gambaran Hasil Pemeriksaan Mikroskopik, <i>Lowenstein Jensen</i> (LI), dan BACTEC <i>Mycobacterium Growth Indicator Tube</i> (MGIT) pada Pasien Suspek Tuberculosis (TB) Paru	58
Lampiran 3D.	Evaluating the use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Detection of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in Indonesia Clinical Isolates	59
Lampiran 3E.	Uji Resistensi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Terhadap Obat Anti Tuberculosis (OAT) Lini I Pada Spesimen Klinis Pasien TB Paru di Indonesia	60
Lampiran 3F.	Identifikasi & Karakterisasi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dari Spesimen Dahak Pasien TB di Indonesia (Penelitian tahun 2008-2010)	61
Lampiran 3G.	First Insight of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex in Indonesia	62
Lampiran 3H.	Kemampuan Laboratorium Riset Tuberkulosis	63
Lampiran 3I.	Diagnostik Molekular Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) untuk Deteksi Cepat Tuberculosis	64
Lampiran 3J.	Genotyping Bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Menggunakan Teknik <i>Spoligotyping</i>	65
Lampiran 3K.	Sekuensing DNA dan Desain Primer <i>gyrB</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV	66

BAB I PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Badan Kesehatan Dunia (*World Health Organization/ WHO*) pada laporan *WHO Global Tuberculosis Control Report 2009* masih menetapkan Indonesia pada urutan ketiga sebagai negara dengan pengindap TB terbanyak sesudah India dan Cina. Disebutkan juga estimasi kasus baru di Indonesia tahun 2007 adalah sebesar 528,063 kasus dengan *incidence rate* 102 kasus sputum baru dengan smear-positive (SS+) per 100,000 populasi.^{1,2} Dari hasil survei prevalensi pada SKRT 2004 terlihat adanya perbedaan yang bermakna antara Jawa-Bali (82 kasus/100.000 penduduk per tahun) dan luar Jawa-Bali (258 kasus/100.000 penduduk per tahun). Kawasan Timur Indonesia memberikan angka yang lebih tinggi, yaitu 343 kasus/100.000 penduduk per tahun, dibandingkan Sumatera–Kalimantan sebesar 217 kasus/ 100.000 penduduk per tahun.³

Data Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit & Penyehatan Lingkungan (P2&PL) menunjukkan bahwa untuk deteksi kasus baru, Indonesia telah mencapai angka penemuan kasus sebesar 69.8% tahun 2007 dan 72.8% tahun 2008. Meski jumlah kasus TB yang ditemukan (*case detection rate*) meningkat dalam beberapa tahun terakhir, tetapi berdasarkan laporan TB Indonesia 2009 terjadi penurunan dari 73% pada tahun 2006 menjadi sekitar 69% pada tahun 2007.⁴ Hal ini bisa disebabkan keberhasilan dari segi implementasi program DOTS (*Direct Observed Treatment – Short Course*) atau dapat juga disebabkan karena semakin dibutuhkannya metode diagnostik dini yang lebih efektif dan efisien dibandingkan metode mikroskopik sputum BTA yang digunakan saat ini.

Laporan Riskesdas 2010 yang dilaksanakan oleh Badan Litbangkes bahkan menggambarkan angka Prevalensi Nasional TB di Indonesia dalam 12 bulan terakhir jauh di atas angka Prevalensi Nasional hasil estimasi WHO untuk tahun 2010, yaitu sebesar 0,7% dibanding angka estimasi WHO masih sebesar 0.2%. Data Prevalensi Nasional TB pada Riskesdas 2010 yang diperoleh dari hasil analisis kuisioner merupakan data gabungan antara penderita TB yang didiagnosis tenaga kesehatan melalui hasil pemeriksaan BTA dan atau hasil rontgen. Data ini mendukung kenyataan bahwa kasus

TB di Indonesia masih sangat mengkhawatirkan dan oleh karenanya metode diagnosis untuk penyakit berperan penting dalam pengontrolan sirkulasi bakteri di masyarakat.^{5,6}

Uji diagnosis kasus TB sejak 125 tahun yang lalu sudah menggunakan teknik mikroskopik dengan apusan BTA pada pewarnaan di laboratorium. Hal ini karena bakteri *Mtb* tidak bisa dicuci dengan larutan asam atau alkohol sehingga sering juga disebut basil tahan asam (BTA). Kelemahan dari metode adalah diperlukannya sampel dahak yang mengandung sekitar 10^4 bakteri per ml spesimen untuk menunjukkan hasil positif.^{7,8} Oleh karena hal ini maka sensitivitas uji mikroskopis BTA masih berkisar antara 45-87%, meski spesifisitas bisa 100%. Salah diagnosis terhadap kasus akan menyebabkan hasil *false-positive* dan *false negative* yang akan berpengaruh terhadap pasien. Bila *false-positive* maka pasien akan memperoleh obat anti TB (OAT) lini pertama (*rifampicin, isoniazid, pyrazinamid, ethambutol* atau *streptomycin*) yang biasa diberikan pada program DOTS sementara sebagian besar NTM (*Non Tuberculous Mycobacterium*) resisten dengan OAT DOTs lini pertama. Bila *false negative* maka penyebaran TB aktif di masyarakat akan menimbulkan efek berantai. Kesalahan diagnosis akan berdampak terhadap waktu penyembuhan yang lebih lama karena ketiadaan efek terapi dalam jangka pendek atau berkembangnya kasus MDR (*multi drugs resistance*) maupun XDR (*extensively drugs resistance*) TB di kemudian hari.^{9,10,11}

Kelemahan lain dari metode mikroskopik adalah dengan timbulnya epidemi AIDS maka sensitivitas uji semakin berkurang dan hasil *false-negative* sering muncul karena adanya HIV menyebabkan kemampuan makrofag pasien berkurang dalam menangkap kuman sehingga kuman semakin sulit dideteksi. Berdasarkan pertumbuhan lebih dari 20% populasi terinfeksi oleh HIV, maka kasus AIDS juga akan menjadi dampak utama masalah TB di dunia pada tahun-tahun mendatang.^{12,13}

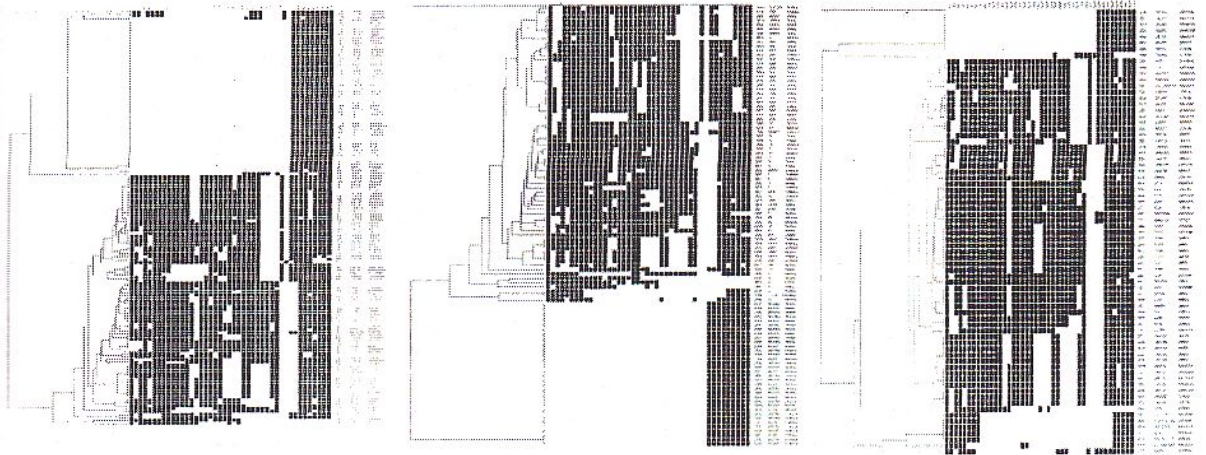
Kebutuhan metode dan akurasi teknik deteksi dini yang baik di berbagai fasilitas kesehatan masyarakat untuk mendiagnosis penyakit TB sangat penting dalam mengontrol penyebaran penyakit secara global.^{14,15} Pengembangan diagnostik molekuler TB termasuk kedalam salah satu rekomendasi intervensi pengendalian TB yang telah dicanangkan oleh WHO.¹⁶ Diagnostik TB baru yang diharapkan adalah yang dapat menjadi alternatif untuk sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan mikroskopik BTA dan pertumbuhan kultur yang sampai saat ini masih ditetapkan sebagai baku emas (*gold standard*) diagnostik TB di lapangan.¹⁷

Metode LAMP termasuk metode amplifikasi DNA sehingga memiliki spesifisitas yang tinggi karena dapat mendeteksi DNA bakteri dalam jumlah yang sangat sedikit (10 pg CFU/ μ l). Kelebihan lain adalah metode ini melakukan amplifikasi DNA pada suhu tetap tanpa memerlukan alat *thermocycler* mahal, yang biasanya diperlukan untuk metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional. Karena alasan ini maka metode merupakan kandidat potensial untuk dikembangkan menjadi diagnostik baru TB di wilayah dengan sumber daya terbatas. Sejak tahun 2007, WHO telah merekomendasikan metode LAMP sebagai metode diagnosis TB di laboratorium rujukan TB di negara-negara maju berdampingan dengan uji konvensional.^{18,19} Metode LAMP meski secara ilmiah sangat sensitif tetapi tetap memiliki kemungkinan untuk terjadi kontaminasi pada saat proses kerja ekstraksi DNA, sehingga panduan Prosedur Operasional Baku (POB) pada petugas laboratorium sebaiknya menggunakan POB ekstraksi DNA yang telah teruji secara ilmiah. Pada penelitian ini metode ekstraksi DNA yang digunakan adalah metode ekstraksi DNA, *Qiamp DNA mini kit Qiagen* yang memang umum digunakan untuk ekstraksi DNA di sebagian besar laboratorium rujukan biomolekuler.²⁰

Penelitian Uji Diagnostik LAMP-TB dari Hasil Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* di Indonesia tahun 2011 (Tahap I) merupakan penelitian aplikasi terhadap hasil penelitian sebelumnya yang telah mulai dilaksanakan dari tahun 2008 sampai dengan tahun 2010. Penelitian awal merupakan bagian dari optimasi metode yang dilakukan menggunakan sampel dahak pasien TB yang dikumpulkan dari 16 ibu kota provinsi di Indonesia (Padang, Pekanbaru, Bandar Lampung, Palembang, Medan, Serang, Jakarta, Bandung, Surabaya, Mataram, Banjarmasin, Pontianak, Ambon, Manado, Makassar dan Sorong). Lokasi 16 kota yang menjadi target pengumpulan spesimen dahak dipilih berdasarkan data angka *Case Detection Rate* (CDR) per provinsi dari Ditjen P2MPL Depkes RI tahun 2006 yang kemudian dikompilasi dengan pembagian wilayah berdasarkan garis *Weber* dan *Wallace* (Wilayah Indonesia Barat, Wilayah Indonesia Tengah dan Wilayah Indonesia Timur). Penelitian ini merupakan salah satu penelitian yang termasuk ke dalam jejaring *road map* penelitian TB yang telah disusun oleh Badan Litbang Kesehatan pada tahun 2009.¹⁷

Hasil penelitian yang diperoleh dari penelitian terdahulu adalah:

- a. Peta awal dendrogram / filogenetik *Mtb* di Indonesia yang berasal dari spesimen dahak pasien TB di 16 ibu kota provinsi di Indonesia.



Gambar1.1. Dendrogram *Mtb* dari wilayah Sumatera-Kalimantan, Jawa dan wilayah Timur Indonesia yang disusun berdasarkan genotipe bakteri secara *spoligotyping* menggunakan sekuens DR genome *Mtb* H37Rv.

- b. Galur *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) pada sampel yang berasal dari 16 ibu kota provinsi di Indonesia (Padang, Pekanbaru, Lampung, Palembang, Medan, Serang, Jakarta, Bandung, Surabaya, Mataram, Banjarmasin, Pontianak, Ambon, Manado, Makassar dan Sorong), yang merupakan materi biologik berharga sebagai bagian dari koleksi data bank gen *Mtb* di Indonesia.

Tabel 1.1.
 Sejumlah 149 galur *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* yang terdapat pada sampel dari 16 ibu kota provinsi di Indonesia.

Genotipe SPOLDB4	Pembagian kelompok famili spoligo												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Others	Orphan	Isolat	Pola
Beijing									93			93	2
CAS										1		1	1
CAS 1										2		2	2
EAI 1						10						10	4
EAI 2						23						23	9
EAI3_IND						1						1	1
EAI 4						2						2	2
EAI 5						37						37	12
EAI 6						13						13	3
H1					7							7	6
H3	15				5							20	13
H4	3				3							6	3
LAM 1				5								5	3
LAM 4				1								1	1
LAM 5				1								1	1
LAM 6				2								2	2
LAM 7				1								1	1
LAM 8				1								1	1
LAM 9				7								7	4
LAM 10				1								1	1
LAM 11				31								31	5
MANU 1										6		6	2
MANU 2										4		4	3
T1		19	1	4	3							27	9
T2		1										1	1
T3		1										1	1
T4		2										2	2
T5										1		1	1
U		12		2		6	6					26	16
U like S							4					4	1
U like LAM							1					1	1
X1		2								4		6	4
PINI										1		1	1
AFRICANUM										1		1	1
H37Rv										1		1	1
ORPHAN											57	57	28
TOTAL	18	37	1	56	18	92	11	-	93	21	57	404	149

- c. Protokol kerja diagnostik LAMP-TB yang sudah teroptimasi sesuai sarana dan prasarana laboratorium diagnostik di Indonesia (Standard Laboratorium menurut Permenkes).
- d. Diagnostik LAMP-TB menggunakan primer LAMP karakteristik *Mtb* di Indonesia dengan sensitifitas uji terhadap sampel dahak BTA positif atau *positivity rate* lebih kurang 96,4%; yang mampu mengenali seluruh genotipe *Mtb* yang bersirkulasi di wilayah Indonesia.

Parameter Set

GC rich

Length	Tm		Basic Setting		Distances			
F1c/B1c	<input type="text" value="120"/>	<input type="text" value="122"/>	F1c/B1c	<input type="text" value="164"/>	<input type="text" value="166"/>	(F2-B2)	<input type="text" value="120"/>	<input type="text" value="180"/>
F2/B2	<input type="text" value="181"/>	<input type="text" value="201"/>	F2/B2	<input type="text" value="591"/>	<input type="text" value="611"/>	Loop(F1c-F2)	<input type="text" value="401"/>	<input type="text" value="601"/>
F3/B3	<input type="text" value="181"/>	<input type="text" value="201"/>	F3/B3	<input type="text" value="591"/>	<input type="text" value="611"/>	F2-F3	<input type="text" value="101"/>	<input type="text" value="201"/>
						F1c-B1c	<input type="text" value="101"/>	<input type="text" value="100"/>

- e. Sekuens *highly conserved* pada *gyrB* genome *Mtb* H37Rv terhadap seluruh tipe *Mtb* di wilayah Indonesia
- f. Pola resistensi kuman *Mtb* pada lokasi penelitian yang berada di 16 ibu kota provinsi di Indonesia.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dijelaskan di atas maka terbukti bahwa diagnostik LAMP menggunakan primer Indonesia merupakan metode diagnostik molekuler yang menjanjikan untuk digunakan di laboratorium fasilitas kesehatan masyarakat di Indonesia guna mengatasi keterbatasan dari uji diagnostik konvensional.

1.2. TUJUAN dan MANFAAT

1.2.1. TUJUAN

UMUM

Mengembangkan metode uji diagnostik molekuler untuk deteksi cepat bakteri *Mtb* di Indonesia berdasarkan data surveilans epidemiologi molekuler.

KHUSUS:

- a. Memperoleh data sensitifitas dan spesifisitas uji LAMP menggunakan primer Indonesia berdasarkan hasil uji pada sampel klinis pasien di fasilitas kesehatan masyarakat (*hospital base*);
- b. Memperoleh protokol kerja LAMP-TB sesuai sarana laboratorium di fasilitas kesehatan masyarakat di Indonesia;
- c. Memperoleh kandidat formula reagen LAMP-TB (reagen ekstraksi dan amplifikasi);
- d. Mendapatkan kandidat primer LAMP Indonesia untuk uji resistensi *Mtb*.

1.2.2. MANFAAT

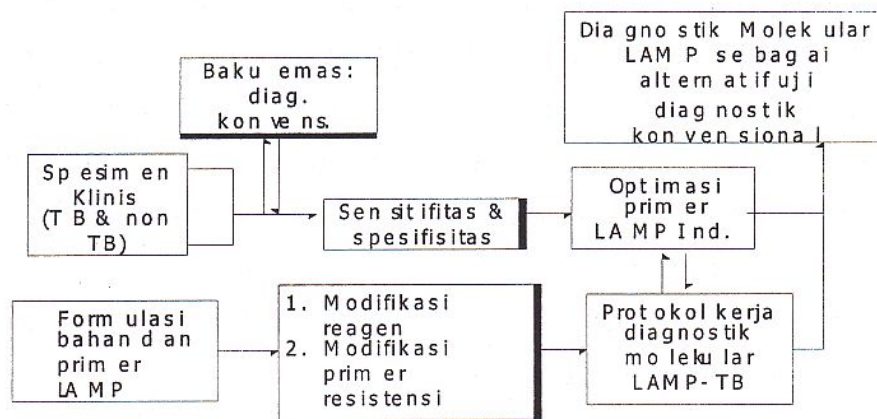
- a. Memperoleh tenaga laboratorium yang memiliki keterampilan uji molekuler LAMP di sejumlah fasilitas kesmas di Indonesia;
- b. Memperoleh protokol diagnostik LAMP-TB yang sesuai sarana & parasarana lab kesehatan di Indonesia, dalam rangka kemandirian bangsa;
- c. Memperoleh diagnostik molekuler LAMP dengan primer Indonesia yang telah teroptimasi, sebagai langkah alternatif untuk meningkatkan angka penemuan kasus TB;
- d. Memperoleh kandidat formula reagen LAMP-TB untuk menjamin kesinambungan uji molekuler LAMP di Indonesia;
- e. Memperoleh kandidat primer LAMP untuk uji resistensi *Mtb*
- f. Memantapkan jejaring kerja sama Balitbangkes dengan lintas sektor.

1.3. LUARAN

- a. Sensitifitas dan spesifisitas primer LAMP paten Balitbangkes (Lisdawati, *et.al*);
- b. Protokol kerja LAMP sesuai laboratorium diagnostik di Indonesia;
- c. Kandidat (modifikasi) formula reagen LAMP ;
- d. Kandidat primer LAMP Indonesia untuk uji resistensi *Mtb*.

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1. KERANGKA KONSEP



Gambar 2.1. Kerangka Konsep penelitian Uji Validasi Diagnostik Molekuler LAMP-TB berdasarkan Hasil Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* di Indonesia.

Penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Sampel berasal dari spesimen dahak pasien suspek TB dan non suspek di dua fasilitas kesehatan masyarakat untuk pemeriksaan TB yang berada di kota Jakarta dan Bandung, yaitu: RS. Persahabatan dan RS. Hasan Sadikin, Bandung.

2.2 ALUR PENELITIAN

Alur kegiatan penelitian adalah sebagai berikut:

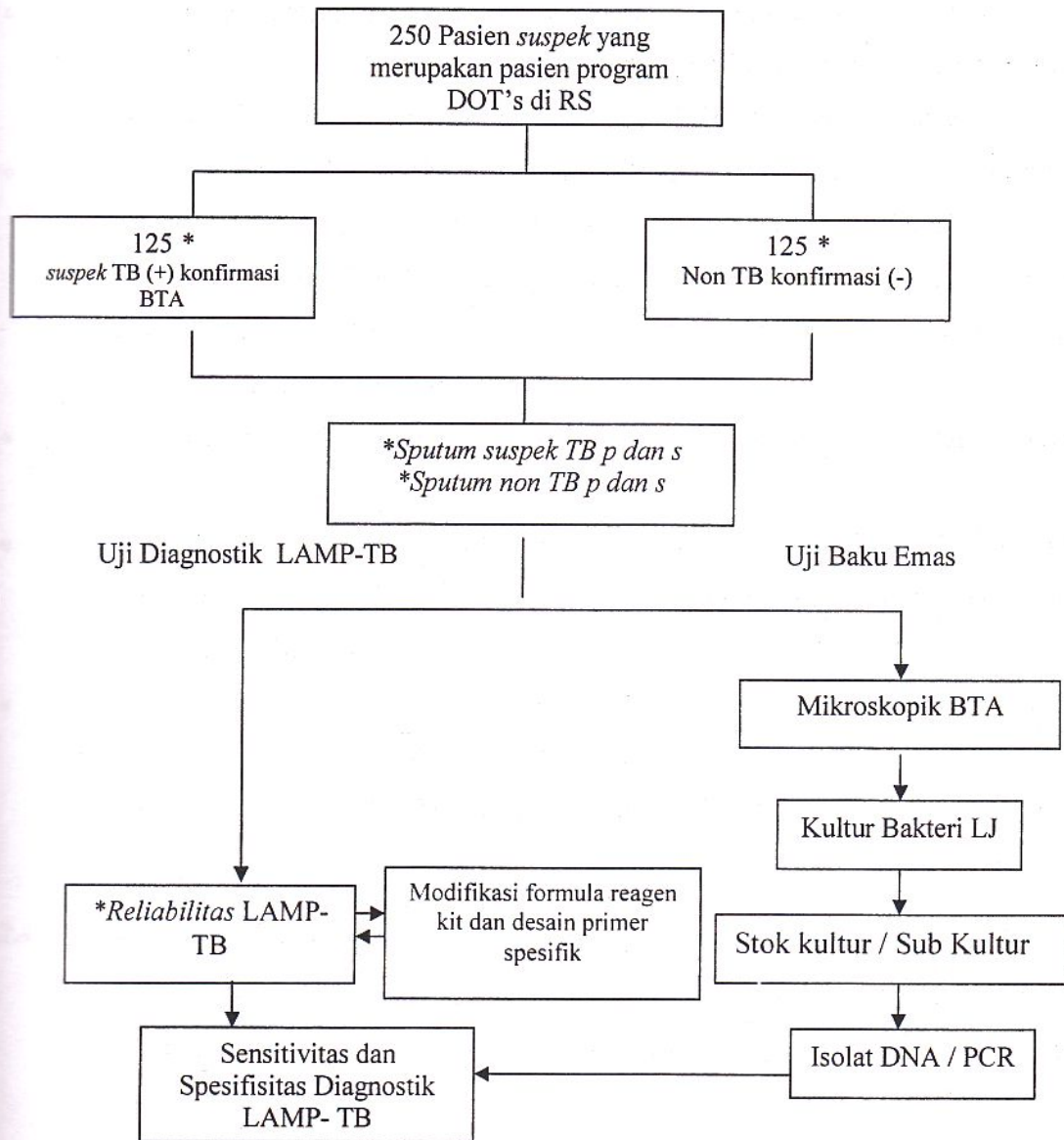
- i. Identifikasi kelaikan sarana dan prasarana laboratorium di fasilitas kesehatan masyarakat yang terlibat pada penelitian sebelumnya, untuk memperoleh data kelaikan laboratorium bagi pelaksanaan uji diagnostik LAMP-TB di fasilitas kesehatan masyarakat pada lokasi penelitian sebelumnya (16 ibu kota provinsi), secara bertahap;

- ii. Menyusun standard prosedur kerja untuk pelatihan uji diagnostik LAMP-TB bagi tenaga pelaksana laboratorium di fasilitas kesehatan masyarakat yang terlibat dalam penelitian sebelumnya, secara bertahap.
- iii. Uji validasi diagnostik LAMP-TB pada sejumlah pasien TB dan non TB di fasilitas kesehatan masyarakat untuk pemeriksaan TB, guna memperoleh data sensitivitas dan spesifisitas primer spesifik Indonesia. Seluruh responden yang terlibat dalam penelitian akan dijaga kerahasiaannya dengan menyimpan data pasien pada file data yang hanya bisa diakses secara terbatas oleh *Principal Investigator* (PI) dan petugas Manajemen Data (Mandat) dari tim penelitian. Akses data menggunakan kode tertentu sesuai kesepakatan PI dan tim Mandat.
- iv. Modifikasi alat dan bahan uji diagnostik LAMP-TB, untuk upaya kesinambungan uji diagnostik di lapangan serta persiapan kemandirian bangsa.
- v. Pengembangan desain *primer* LAMP untuk uji resistensi berdasarkan data pola resistensi sampel dahak pasien TB dari 16 ibu kota provinsi yang sudah ada.

Adapun langkah kegiatan pada saat penelitian adalah sebagai berikut:

- a. Identifikasi kelaikan laboratorium dilakukan dengan melakukan survei ke laboratorium fasilitas kesehatan masyarakat untuk pemeriksaan TB di 16 ibu kota provinsi di Indonesia, secara bertahap.
- b. Identifikasi kemudahan aplikasi teknik LAMP TB dilakukan dengan melaksanakan pelatihan LAMP TB bagi tenaga laboratorium dari fasilitas kesehatan masyarakat yang akan melaksanakan uji coba LAMP-TB, secara bertahap.
- c. Validasi uji diagnostik molekuler LAMP-TB dikerjakan di 2 laboratorium pemeriksaan TB di Rumah Sakit di Jakarta dan Bandung menggunakan Protokol Kerja LAMP-TB teroptimasi, dengan kontrol mutu eksternal dilakukan oleh laboratorium Biomolekuler, Pusat BTDK-Balitbangkes.
- d. Pengembangan formulasi reagen diagnostik molekuler LAMP-TB dikerjakan berdasarkan baku standard reagen kit amplifikasi (EIKEN, chemical co.Ltd.) di laboratorium Biomolekuler dan Kimia, Pusat BTDK-Balitbangkes.
- e. Desain primer LAMP untuk uji resistensi *Mtb* dilaksanakan di laboratorium Biomolekuler dan Kimia, Pusat BTDK-Balitbangkes.

SKEMA UJI COBA VALIDASI



Gambar 2.2. Kerangka Alur penelitian Uji Validasi Diagnostik Molekular LAMP-TB berdasarkan Hasil Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* di Indonesia

Keterangan:

LAMP = *Loop-mediated Isothermal Amplification*

PCR = *Polymerase Chain Reaction*

LJ = *Lowenstein Jensen*

2.3. TEMPAT DAN WAKTU PELAKSANAAN

- Survey kelaikan laboratorium fasilitas kesehatan masyarakat untuk pemeriksaan TB dilaksanakan di 16 ibu kota provinsi yang merupakan mitra kolaborasi pada penelitian Karakterisasi *Mtb* di Indonesia pada penelitian sebelumnya, secara bertahap.
- Uji validasi diagnostik molekuler LAMP-TB dilaksanakan di dua laboratorium fasilitas kesehatan masyarakat untuk pemeriksaan TB (Rumah Sakit Persahabatan dan Rumah Sakit Hasan Sadikin), dengan kontrol eksternal mutu dilakukan di laboratorium Biomolekuler dan Bakteriologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (BTDK), Balitbangkes
- Pelatihan Teknik LAMP-TB dilakukan di laboratorium Biomolekuler, Pusat BTDK-Balitbangkes.
- Pengembangan primer LAMP untuk uji resistensi *Mtb* dilakukan di laboratorium Biomolekuler, Pusat BTDK-Balitbangkes dan di laboratorium Molekuler Departemen Mikrobiologi, FKUI.
- Pengembangan formulasi reagen kit diagnostik LAMP-TB dilakukan di laboratorium Kimia dan Biomolekuler, Pusat BTDK-Balitbangkes.

Waktu pelaksanaan: Maret 2011 - Desember 2011 (10 bulan)

2.4. DESAIN PENELITIAN

Penelitian merupakan penelitian potong lintang (*cross sectional*), baik terhadap sampel klinis pasien baru maupun terhadap sampel yang telah dikumpulkan pada penelitian sebelumnya.

2.5. Populasi dan sampel

Jumlah Sampel:

Untuk diagnostik test yang bertujuan untuk memperoleh data sensitifitas serta spesifisitas yang masih merupakan estimasi (sesuai penelitian terdahulu) dan belum bertujuan sebagai studi epidemiologi, maka besaran sampel sesuai Lemeshow (1990) dan Joseph (1995), dapat menggunakan rumus binomial proporsi.²¹ Penentuan

besaran sampel fokus kepada range dari *confidence interval* yang dikehendaki, sebagai berikut:

$$S_n \pm Z_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{S_n(1-S_n)}{n_a}}$$

$$S_p \pm Z_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{S_p(1-S_p)}{n_n}}$$

Bila sampel untuk uji validasi diagnostik LAMP-TB terdiri dari sampel dahak yang berasal dari pasien TB (sample sakit) dan pasien non TB (non sakit) di masing-masing Rumah Sakit dihitung dengan rumus:

$$N = Z\alpha^2 pq/d^2 * DEFF$$

p = estimasi kesalahan sesuai metode diagnosis BTA = 20%

q = 1-p (100%-p)

Z α = tingkat kemaknaan, $\alpha = 0.05$; Z $\alpha = 1.96$

d = presisi = 90%

Design Effect = 2

$$\begin{aligned} N &= \frac{(1.96)^2 pq \times 2}{(0.1)^2} \\ &= \frac{(1.96)^2 0.2(1-0.2) \times 2}{(0.1)^2} \\ &= 122,93 \sim 125 \end{aligned}$$

Hal ini akan memberikan hasil:

Bila estimasi sensitifitas 95%, maka interval CI 95% $\pm 0,38$

Bila estimasi spesifisitas 90%, maka interval CI 95% $\pm 0,016$

Jadi sampel untuk validasi metode LAMP diperoleh secara metode *proporsional*, yaitu:

- Menggunakan 125 sampel dahak pagi (p) dan 125 sampel dahak sewaktu (s) dari pasien TB yang telah memenuhi kriteria inklusi dan bersedia terlibat penelitian dengan menandatangani *informed consent* terlebih dulu;
- Menggunakan 125 sampel dahak pagi (p) dan 125 sampel dahak sewaktu (s) dari pasien bukan TB yang telah memenuhi kriteria inklusi dan

bersedia terlibat penelitian dengan menandatangani *informed consent* terlebih dulu.

Pasien merupakan pasien suspek TB yang termasuk program DOTs di rumah sakit yang akan bekerja sama dalam penelitian

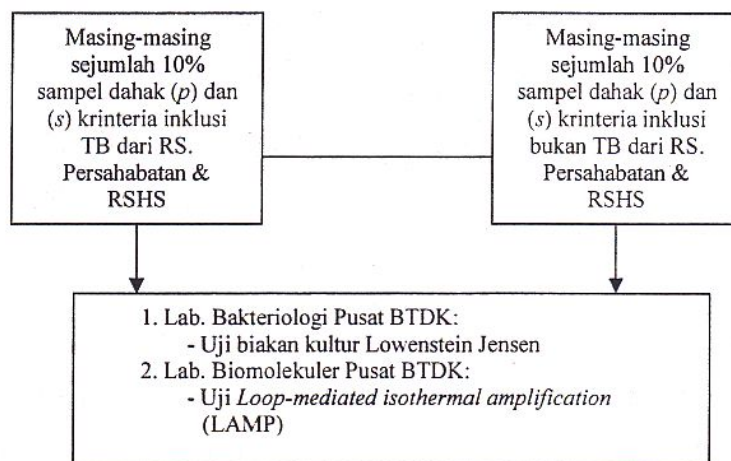
- Kriteria inklusi suspek yang terbukti TB
 - Pasien TB kasus baru atau minimal dalam masa pengobatan 4 minggu
 - Berusia ≥ 15 tahun
 - Bersedia menandatangani *informed consent* penelitian
- Kriteria eksklusi suspek yang terbukti TB
 - Dahak terlalu sedikit / tidak berhasil mendahak
 - Terganggu kesehatan jiwa
- Kriteria inklusi suspek bukan TB
 - Pasien dengan konfirmasi foto toraks dan pertimbangan dokter sesuai algoritma DOTs
 - Berusia ≥ 15 tahun
 - Bersedia menandatangani *informed consent* penelitian
- Kriteria eksklusi suspek bukan TB
 - Dahak terlalu sedikit / tidak berhasil mendahak
 - Terganggu kesehatan jiwa

Prosedur penentuan sampel yang termasuk kriteria inklusi TB adalah berdasarkan algoritma pasien TB program DOT's yang dilaksanakan di RS Persahabatan dan RS Hasan Sadikin, yang merupakan RS rujukan pemeriksaan TB. Algoritma diagnosis pasien TB yang ada merujuk pada buku pedoman Standard Internasional untuk Pelayanan Tuberkulosis yang dikeluarkan oleh Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan (Ditjen P2PL) & Global Fund (GF) tahun 2007. Seluruh pasien yang sudah dikonfirmasi TB sesuai pedoman RS yang berlaku kemudian juga dilakukan uji konfirmasi menggunakan media biakan kultur Lowenstein Jensen terhadap dahak *pagi (p)* atau *sewaktu (s)* dari responden.

Prosedur penentuan sampel yang termasuk kriteria inklusi suspek bukan TB adalah berdasarkan algoritma diagnosis pasien suspek TB yang terbukti bukan TB di RS

Persahabatan dan RS Hasan Sadikin, yang merupakan RS rujukan pemeriksaan TB. Algoritma diagnosis pasien suspek yang bukan TB merujuk pada buku pedoman Standard Internasional untuk Pelayanan Tuberkulosis yang dikeluarkan oleh Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan (Ditjen P2PL) & Global Fund (GF) tahun 2007. Seluruh pasien yang sudah dikonfirmasi bukan TB sesuai pedoman program DOT's kemudian dilakukan uji konfirmasi menggunakan media agar untuk pemeriksaan *Non Tuberculosis Mycobacteria* (NTM) terhadap dahak (*p*) atau (*s*) dari responden.

Proses eksternal mutu untuk uji LAMP dilakukan terhadap 10% dari masing-masing sampel dahak (*p*) atau (*s*) dari responden dengan kriteria inklusi TB dan bukan TB di RS Persahabatan dan RS Hasan Sadikin, dimana dilakukan uji biakan kultur LJ dan PCR serta konfirmasi sekuensing dengan algoritma berikut:



Gambar 2.3. Algoritma Uji Validasi Diagnostik Molekular LAMP-TB

Sensitivitas dan spesifisitas hasil uji LAMP menggunakan primer set komersial kemudian dihitung sesuai dengan perhitungan tabel baku berikut:

	Dis Pos	Dis Neg
Test Pos	TP	FP
Test Neg	FN	TN

Keterangan:

Dis Pos = Disease Positive: Kontrol positif = kultur positif

Dis Neg = Disease Negative: Kontrol negatif = kultur LJ negatif atau media agar positif
NTM

TP = True Positive = Positif Benar; **FP** = False Positive = Positif Salah

FN = False Negative = Positif Benar; **TN** = True Negative = Positif Salah

- a. Sensitifitas = Kemungkinan penderita positif TB diuji dengan hasil positif

$$\text{Rumus: } TP/(TP + FN)$$

- b. Spesifisitas = Kemungkinan bukan penderita TB diuji dengan hasil negatif

$$\text{Rumus} = TN/(TN + FP)$$

- c. **PPV** = Positive Predict Value = Kemungkinan pasien dengan hasil uji positif merupakan penderita

$$\text{Rumus} = TP/(TP + FP)$$

- d. **NPV** = Negative Predict Value = Kemungkinan pasien dengan hasil uji negatif bukan merupakan penderita

$$\text{Rumus} = TN/(TN + FN)$$

2.6. VARIABEL

Variabel *independent* : primer LAMP; apusan BTA, kultur LJ, kultur NTM

Variabel *dependent* : etnis, tingkat keparahan penyakit, adanya kapitasi dan kualitas spesimen klinis (dahak)

2.7. CARA PENGUMPULAN DATA

- Data uji diagnostik LAMP-TB diperoleh dari sampel dahak pasien TB dan non TB di Rumah Sakit terpilih.

Cara mendapatkan Persetujuan Sebelum Penelitian (PSP) dari pasien/responden:

Prosedur kerja:

1. Pasien diminta kesediaannya untuk berpartisipasi dalam penelitian yang dilakukan.
 2. Isi Naskah Penjelasan dibacakan oleh petugas laboratorium RS Persahabatan dan RSHS, yang merupakan petugas lapangan dari tim penelitian, dan pasien kemudian diminta mengisi *informed consent* (PSP) setelah setelah isi Naskah Penjelasan dimengerti oleh pasien.
 3. Pasien dilatih metode dan cara pengeluaran dahak serta diberi pengarahannya cara mengeluarkan dahak pada pot yang telah disediakan oleh petugas lapangan.
 4. Pasien diminta pulang dan bila perlu dibekali tablet GG untuk diminum pada malam hari sebelum tidur dan pot dahak untuk menampung dahak *pagi hari* setelah pasien bangun tidur.
 5. Pengambilan dahak *sewaktu (s)* kedua dilakukan setelah pasien menyerahkan pot dahak *pagi hari* dengan didampingi oleh petugas lapangan.
- Data kandidat primer LAMP untuk uji resistensi diperoleh berdasarkan hasil analisis data pola resistensi dan karakteristik *Mtb* pada penelitian terdahulu.
 - Data pengembangan formulasi diperoleh dari hasil validasi reagen amplifikasi DNA-kit komersial (EIKEN, chemical co.Ltd.).

2.8. BAHAN DAN PROSEDUR KERJA

a. Uji mikroskopik BTA

Metode: Pewarnaan Ziehl Neelsen (Zn)

Sampel: Dahak (*Sputum*)

ALAT:

Biosafety Cabinet (BSC) Type IIA; pot dahak standard; tabung falcon bertutup ukuran 50 mL; Vortex mixer; Sentrifuse; *Bactincinerator* atau *fireboy*; Incubator; *paper work* BSC; tang penjepit; *marker* pencil; stik lidi; wadah berisi pasir-alkohol 70%; wadah berisi disinfektan; lampu spiritus; slide *double cover* dan rak slide; APD: Jas Lab, Tutup kepala, Masker N95 (BSL-3), Masker operasi (BSL-2), Kaca mata Lab, pelindung kaki; sarung tangan (*double*).

BAHAN:

Mycoprep™ (Becton Dickinson, Spark-MD); Buffer fosfat steril pH 6,8; Kit TB Ziehl Nielsen (Becton Dickinson, Spark-MD); Basic Fuchsin (Merck); Methylene blue (Merck); Larutan asam-alkohol (HCl-Alkohol 3%) (Merck); Cairan disinfektan (Lysol/Alkohol 70%)

PROSEDUR KERJA:

1. *Preparasi Slide*

Pekerjaan dilakukan di BSC type IIA menggunakan Alat Pelindung Diri (APD) untuk *Biosafety Level* (BSL)-3.

Prosedur:

Stik lidi disterilkan menggunakan *bactincinerator* atau *fireboy* sampai terlihat merah, biarkan dingin sejenak. Pot dahak dibuka secara hati-hati untuk menghindari droplet (percikan dahak). Sampel dahak diambil pada bagian kental menggunakan stik lidi steril, lalu dioleskan merata dengan gerakan spiral kecil dari dalam keluar (*coiling*), dengan tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis. Pembuatan *coiling* dilakukan pada permukaan slide dengan ukuran 2 x 3 cm pada 1/3 bagian tengah slide seperti tampak pada gambar. Slide lalu diletakkan pada rak untuk megeringkannya sekitar 15 – 30 menit sebelum difiksasi. Stik lidi yang sudah digunakan dimasukkan ke dalam botol yang berisi pasir-alkohol 70%, goyangkan untuk melepaskan partikel yang melekat, lalu sterilkan kembali stik lidi menggunakan *bactincinerator* atau *fireboy*.

2. *Fiksasi*

Pekerjaan dilakukan di BSC type IIA menggunakan Alat Pelindung Diri (APD) untuk *Biosafety Level* (BSL) -2.

Prosedur:

Slide yang sudah kering diambil menggunakan pinset pada sisi yang berlabel dengan hapusan menghadap keatas. Slide kemudian dilewatkan di atas *fireboy* atau lampu spiritus sebanyak 3-4 kali (memerlukan waktu hanya sekitar 3 – 5 detik), tidak boleh terlalu lama agar bentuk kuman/sediaan apus tidak pecah. Bila menggunakan *electric plate*: fiksasi pada suhu 80°C selama 15 menit atau pada suhu 65-70°C selama 2 jam (Forbes, 2007). (Gambar 3: dibuat baru, slide dilewatkan di atas lampu spiritus dalam BSC).

3. Pewarnaan Ziehl Nielsen (ZN):

Pekerjaan dilakukan di *bench* terbuka secara aseptis, menggunakan Alat Pelindung Diri (APD) untuk *Biosafety Level* (BSL) -2.

Prosedur:

Slide dahak yang telah difiksasi diletakkan pada rak dengan hapusan dahak menghadap ke atas serta memiliki jarak satu sama lain untuk mencegah kontaminasi antar sediaan. Larutan Carbol Fuchsin 0,3% diteteskan menutupi seluruh permukaan slide. Slide lalu dipanaskan dengan nyala api spiritus dibawah kaca sediaan sampai keluar uap dan uap dipertahankan selama 3-5 menit dengan cara melewatkan api spiritus beberapa kali. Slide kemudian didiamkan selama sekurang-kurangnya 5 menit. Slide dibilas dengan air mengalir pelan sampai zat warna merah terbuang. Sisa air yang ada diatas kaca sediaan dibuang dengan cara memiringkan slide selama beberapa saat. Seluruh permukaan kaca sediaan lalu digenangi asam alkohol (HCL alkohol 3 %), didiamkan sampai 3 menit, lalu larutan asam dibuang dengan cara memiringkan slide. Pemberian asam alkohol diteruskan sampai warna merah pada slide tidak lagi tampak. Slide lalu dibilas dengan air mengalir dan sisa air yang ada diatas kaca slide dibuang. Seluruh permukaan slide kemudian digenangi larutan Metylen Blue 0.3%. Slide didiamkan 10 – 20 detik, lalu dibilas dengan air mengalir pelan. Sisa air yang ada diatas kaca slide dibuang dengan cara memiringkan slide selama beberapa saat. Slide kemudian dikeringkan di atas rak pengering.

Sebelum melakukan pembacaan sediaan apus BTA yang telah diwarnai, perhatikan apakah sediaan apus yang telah dibuat telah memenuhi kriteria:

- a) Ukuran sediaan (2 X 3 cm)
- b) Kerataan sediaan apus

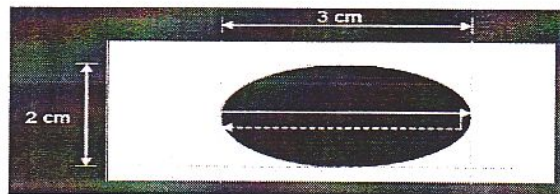
- c) Ketebalan
- d) Pewarnaan sediaan apus
- e) Kebersihan sediaan apus

4. Pembacaan Mikrokopis BTA

Pekerjaan dilakukan di *bench* terbuka pada ruang dengan pencahayaan matahari yang cukup, menggunakan Alat Pelindung Diri (APD) untuk Biosafety Level (BSL)-1.

Prosedur:

Slide disusun sesuai nomor identitas di atas meja mikroskop (Gambar 1. Ruang mikroskop Lab Bakteriologi BMF). Mikroskop disiapkan untuk identifikasi BTA. Disesuaikan lebih dahulu lapang pandang dengan objektif 10X. Teteskan satu tetes minyak imersi di atas hapusan dahak tanpa menyentuh kaca slide. Periksa dengan menggunakan lensa okuler 10X dan objek 100X. Cari Basil Tahan Asam (BTA) yang berbentuk batang warna merah. Periksa paling sedikit 100 lapang pandang dengan cara menggeserkan sediaan menurut arah seperti gambar dibawah ini (WHO, 2007).



Pembacaan hasil pemeriksaan dahak dilakukan dengan menggunakan skala *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* (IUATLD) sebagai berikut ;

- i. Tidak ditemukan BTA dalam 100 lapang pandang, disebut negatif
- ii. Ditemukan 1 – 9 BTA dalam 100 lapang pandang, ditulis jumlah kuman yang ditemukan
- iii. Ditemukan 10 – 99 BTA dalam 100 lapang pandang, disebut positif (1+)
- iv. Ditemukan 1 – 10 BTA dalam 1 lapang pandang, disebut ++ atau (2+) minimal dibaca 50 lapang pandang
- v. Ditemukan >10 BTA dalam 1 lapang pandang, disebut +++ atau (3+) minimal dibaca 20 lapang pandang

b. Inokulasi Bakteri pada media Lowenstein Jensen

A. Dekontaminasi Sputum dengan Mycoprep® (NALC/NaOH) (Forbes, 2007)

Pekerjaan dilakukan di dalam *Biosafety Cabinet* (BSC) Tipe IIA menggunakan Alat Pelindung Diri (APD) untuk *Biosafety Level* (BSL) -3.

Sampel dahak sejumlah 1,0 mL dipindahkan ke dalam tabung falcon bertutup ukuran 50 mL, kemudian ditambahkan MYCOPREP (Becton Dickinson, Spark, MD) berisi campuran *N-acetylsystein*(NALC)/ NaOH) segar dalam jumlah sama. Tabung ditutup rapat, lalu sampel dihomogenkan dengan *vortex mixer* selama 5-20 detik. Tabung dibalik, tunggu \pm 15-20 menit. Sampel kemudian ditambahkan 45 ml buffer fosfat steril pH 6,8 lalu tabung dikocok manual. Tunggu beberapa saat sampai aerosol hilang. Sampel lalu disentrifuge dengan kecepatan 3000xg selama 15 menit, diamkan sentrifuse selama \pm 15-20 menit sebelum tutup dibuka. Supernatan dalam tabung lalu dibuang dan endapan di-resuspensi dengan buffer fosfat memakai pipet *pasteur* steril untuk memperoleh volume 1-3 mL. Simpan tabung di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 15 menit dan siap untuk digunakan kemudian.

Catatan: Tabung dan tutupnya selalu didekon terlebih dulu dengan disinfektan tuberkulosidal sebelum keluar dari BSC.

B. Kultur

Sejumlah 0,1 ml dahak yang sudah diolah dimasukkan dengan disebar merata dalam 2 buah tabung kultur yang telah berisi media LJ (Becton Dickinson, Spark, MD). Tutup tabung, jangan terlalu rapat (dikendorkan) dan tabung-tabung diletakkan pada rak miring. Simpan pembedihan yang sudah ditanam pada inkubator 37°C selama 2 – 3 hari. Bila permukaan media sudah kering, tutup tabung dengan kencang dan lanjutkan inkubasi minimal 4 minggu. Koloni *Mtb* akan tampak dalam waktu 3 – 4 minggu. Jika terlihat adanya koloni pada setiap pembedihan, buat sediaan yang diwarnai Ziehl Neelsen untuk melihat adanya BTA (JAMA, 1999; Nester, 2007).

c. Uji Sensitivitas dan Spesifisitas LAMP-TB pada isolat suspek dan non TB

I. Prepararasi DNA Sampel Suspek TB (Ekstraksi DNA; Qiamp DNA mini kit Qiagen)

- i. Siapkan tabung eppendorf 1500 μ L, lalu masukkan sputum 200 μ L dan 400 μ L PBS, campur sampai sempurna dengan vortex.

- ii. Inkubasi 37 °C selama 1 jam.
- iii. Siapkan tabung eppendorf 1,5 mL yang baru. Masukkan 180 µL ATL dan 150 µL campuran sputum – PBS. Tambahkan 20 µL proteinase K, campur lalu spin, Inkubasi selama 60 menit suhu 56 °C. Tambahkan 200 µL AL, vortex dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 70 °C. Tambahkan 200 µL alkohol absolut, vortex dan spin beberapa saat. Sediakan spin column, pindahkan larutan dalam eppendorf tube ke dalam spin column.
- iv. Centrifuge selama 1 menit pada 8000 rpm, ganti tabung penampung bawah. Tambahkan larutan AW1 sejumlah 500 µL , sentrifuge 8000 rpm selama 1 menit. Ganti tabung penampung bawah. Tambahkan larutan AW2 sejumlah 500 µL , sentrifuge 14000 rpm selama 3 menit. Ganti tabung penampung bawah dengan tabung eppendorf 1,5 ml.
- v. Tambahkan 100 µL AL, inkubasi pada suhu kamar selama 1 menit. Sentrifuge 8000 rpm selama 5menit. Buang tabung spin dan larutan supernatan adalah DNA. Uji kemurnian hasil menggunakan kontrol DNA *Mtb* H37Rv pada gel agarose 1%.
- vi. Simpan DNA pada suhu -80 °C sebelum digunakan untuk LAMP.

2. Preparasi Sistem LAMP-TB menggunakan DNA sampel suspek TB

- i. Preparasi primer sekuens Beijing TB di laboratorium RS berdasarkan SOP Lab. Bakteriologi, BMF dan Lab. Biomolekuler, Dept. Mikrobiologi – FKUI. Penggunaan primer Beijing berdasarkan hasil karakteristik *Mtb* pada penelitian sebelumnya yang memberikan hasil sekuens primer di wilayah DKI Jakarta:

- Siapkan Master Mix:

○ Larutan 2xReaksi Mix (RM)	=	12,5 ul	
○ Primer: FIP	=	40 pmol	; BIP = 40 pmol
Loop-F	=	20 pmol	; Loop-B = 20 pmol
F3	=	5 pmol	; B3 = 5 pmol
○ Bst DNA polymerase	=	1,0 ul	
○ Larutan Fluoresence Detection	=	1,0 ul	
○ Distilled Water (DW)	=	x ul (ad qs)	
Total larutan	=	23,0 ul / well	

- Tambahkan template DNA: 2,0 uL isolat DNA sampel
- Lakukan amplifikasi: 63°C (60 mnt); Inaktivasi : 80 °C (2 mnt)

- Kontrol negatif (larutan 2xRM+PM DNA+ Bst DNA polymerase+DW+FD) dan kontrol positif (larutan + DNA H37Rv) disertakan dalam setiap tahap reaksi.

3. Preparasi Uji Sampel Non TB

AGAR BASE, IMPROVED (7268)

Bahan:

Media agar disiapkan berdasarkan prosedur standard *Enzymatic Digest* dari Formulasi *Casein and Enzymatic Digest of Animal Tissue in Blood Agar Base* (BD) yang terdiri dari:

Formula / Liter

Enzymatic Digest of Casein.....	15 g
Enzymatic Digest of Animal Tissue.....	4 g
Yeast Extract.....	2 g
Corn Starch.....	1 g
Sodium Chloride.....	5 g
Agar.....	14 g

Final pH: 7.0 ± 0.2 at 25°C

Prosedur Kerja

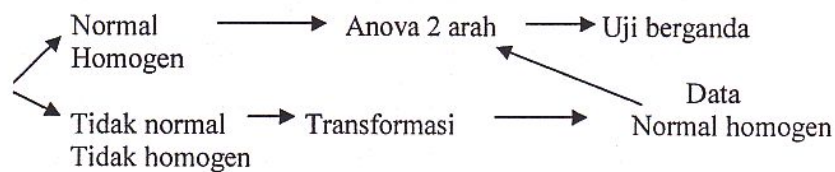
1. Suspensikan 42 g media ke dalam 1 liter *purified water*.
2. Panaskan dengan sekali-sekali diaduk dan biarkan mendidih selama 1 menit agar media terlarut sempurna; lalu autoclave pada suhu 121°C selama 15 minutes.
4. Siapkan 5 - 10% media darah dan tambahkan ke dalam media agar steril untuk mencairkannya sejumlah volume terukur, lalu dinginkan pada suhu 45 - 50°C.

Reaksi Kultur: Cultural response on Blood Agar Base, Improved with 5% sheep blood at 35°C after 18 - 24 hours incubation. Microorganism	Response	Reactions
Mycobacteria Non TB	growth	-----

2.9. ANALISIS DATA

Data kuantitatif dan kualitatif yang diperoleh dari pengukuran variabel dependent dianalisis secara statistik SPSS 15,0.

1. Uji kenormalan menggunakan metoda Distribusi Chi. Apabila data diperoleh berdistribusi normal dan varian homogen, dilakukan Analisis Sidik Ragam (ANOVA).
2. Apabila data yang diperoleh tidak normal dan atau varian tidak homogen, maka data dianalisis secara statistik non parametrik yaitu dengan metoda Friedman dan dilanjutkan dengan Uji berganda Friedman.



2.10. DEFINISI OPERASIONAL

Fasilitas Kesehatan Untuk Uji Coba LAMP: Fasilitas Kesehatan yang memiliki sarana dan prasarana laboratorium diagnostik sesuai standard Laboratorium Klinik di Indonesia berdasarkan Permenkes. Nomor 411/Menkes/Per/III/2010.

2.11. PERTIMBANGAN ETIK

Etik penelitian diajukan ke Komisi Etik badan Litbang Kesehatan karena penelitian akan menggunakan sampel spesimen yang berasal dari manusia. Nomor Etik KE.01.06/EC/376/2011

BAB III

HASIL dan PEMBAHASAN

3.1. Diseminasi Hasil

Diseminasi TB dilaksanakan pada tanggal 19 – 20 Agustus 2011 yang bertempat di Jawa Barat, kegiatan ini dihadiri oleh seluruh tim yang terlibat dalam penelitian TB, pejabat Pusat BTDK, perwakilan dari Dinas Kesehatan yang terlibat dalam penelitian TB 2008-2010, perwakilan Program TB, P2PL sebagai pemanfaat hasil penelitian, para pakar yang dapat berkolaborasi dalam penelitian kedepan dan kalangan industri sebagai kalangan yang akan memproduksi produk penelitian ke masyarakat. Pertemuan diseminasi ini sudah memenuhi prasyarat A (Akademisi) – B (Bisnis / Industri) – G (Government/ Pemerintah: Program dan Pemda).

Kegiatan diseminasi ini bertujuan untuk memperoleh masukan demi kelancaran kerja sama penyelenggaraan penelitian tahun 2011 antara Badan Litbangkes dengan institusi kesehatan di daerah dan berbagai lintas sektor di pusat dan daerah untuk pengembangan Riset Tuberkulosis di Laboratorium Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

Adapun kegiatan diseminasi terbagi dalam bentuk presentasi poster dan presentasi oral (makalah), sebagai berikut:

- A. Poster Penelitian TB di Balitbangkes
 - a. Kemampuan Laboratorium Riset Tuberkulosis, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes
 - b. Genotyping Bakteri Mycobacterium tuberculosis Menggunakan Teknik Spoligotyping
 - c. Sekuensing DNA dan Desain Primer gyrB Mycobacterium tuberculosis H37RV
 - d. Diagnostik Molekuler Loop-Mediated isothermal amplification (LAMP) untuk Deteksi Cepat Tuberkulosis
 - e. Uji Sensitifitas Obat Anti Tuberkulosis Lini I dengan Metode Proporsional
 - f. Pemeriksaan Mikroskopis BTA dengan metode Ziehl Nielsen
 - g. Kultur Bakteri Filogenetik Media Padat Lowenstein Jensen dan Media Cair MGIT Bactec 960

- h. Peta Awal Filogenetik Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* di 16 kota Provinsi di Indonesia
- i. Optimasi Diagnostik Molekuler LAMP Menggunakan Spesimen Klinis Pasien Tuberkulosis di Indonesia
- j. Desain Primer *gyrB* pada Diagnostik Molekuler LAMP berdasarkan Hasil Karakteristik *Mycobacterium tuberculosis* di Indonesia
- k. Peta Awal Sensitifitas Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* Terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) Lini I di Indonesia

B. Presentasi Makalah

Presentasi makalah ini dilakukan dalam dua sesi, dengan masing-masing sesi terdiri dari 3 Narasumber dan 1 moderator. Narasumber dan materi yang disampaikan dalam presentasi oral adalah sebagai berikut :

1. Direktur Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Kementrian Kesehatan RI yang diwakili oleh Dr. Asik Surya, MPPM (Subdit P2 TB Ditjen P2PL) dengan materi Implementasi Hasil Riset pada Program Nasional Pengendalian Tuberkulosis di Indonesia.

Materi membahas: ranking Indonesia berdasarkan jumlah kasus TB per 100 ribu penduduk yang menurun dari tadinya no. 3 (2007/2009) menjadi no.5 (2008/2010); pengembangan strategi DOTS, TB OR group/TORG dan optimalisasi *public private mix*; pencegahan dan pengelolaan MDR-TB; promkes; optimasi pengelolaan TB anak; dan pemanfaatan hasil penelitian kohort.

2. Peneliti TB Dr. Vivi Lisdawati, M.Si, Apt (Balitbangkes) dengan materi Identifikasi dan Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) dari Isolat Spesimen Dahak Pasien Tuberkulosis Paru di Indonesia (2008-2010).

Materi membahas : monitoring molekuler MANDAT, hasil penelitian 2008-2010 (*capacity building*, mapping awal genotipe dan strain subtype Mtb, mapping awal suseptibilitias, pemilihan spoligotyping sebagai metode identifikasi Mtb) isu diagnosis TB yang berkembang dan bergeser dari konvensional menuju molekuler, primer LAMP khas Indonesia yang

memberikan nilai sensitifitas uji yang lebih tinggi dibanding primer komersial.

3. Kepala Departemen Patologi Klinik RSUP Hasan Sadikin oleh Dr. dr. Ida Parwati, Sp.PK (K), PhD (RSHS-UNPAD) dengan materi Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Indonesia.

Materi membahas: tiga fokus TB-WG yaitu diagnostik (mikroskop flouresen sensitivitas 10% dibanding ZN, teknik kultur MODS), patofisiologi, *TB-care & treatment* (KIE uji coba di papua, tipe Beijing menyulitkan pengobatan), tujuan dari genotyping yaitu untuk konfirmasi kontaminasi, evaluasi TB-rekuren, transmisi strain resisten obat, dan meningkatkan case finding.

4. Kepala Poli DOTs RSPI SS Dr. Adria Rusli, Sp.P (RSPI SS) dengan materi Koinfeksi TB-HIV Diagnosis dan Tatalaksana.

Materi membahas: keberhasilan program DOTS di rumah sakit, TB mempercepat progresi HIV, skala masalah HIV-TB *underestimated* (BTA umumnya (-), mortalitas terjadi sebelum diagnosis, pengobatan pasien TB.

5. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Cibinong Dr. Adi Santoso, PhD (LIPI Cibinong) dengan materi Pengembangan Obat Molekuler Farming and Biothechnology.

Materi membahas: pemanfaatan teknologi biomolekuler dalam pengembangan alat diagnostik.

6. Direktur Utama PT Biofarma Drs. Iskandar, MM, Apt dengan materi Prospek Implementasi Penelitian TB pada Industri di Indonesia.

Materi membahas: pengembangan site vaksin develop East 6 dan E85C.

3.2. Pelatihan Ekstraksi dan Uji Diagnostik LAMP-TB

Pelatihan dilaksanakan pada tanggal 26 September sampai 01 Oktober 2011. Pelatihan ini diikuti oleh peserta yang berasal dari internal Badan Litbang Pusat BTDK. Pelatihan di bimbing oleh konsultan molekuler yaitu bapak Syahrial Harun dan beberapa mentor lainnya adalah tim yang ikut serta dalam penelitian TB yang sudah mendapatkan pelatihan sebelumnya.

Tujuan pelatihan

Umum:

Menyediakan tenaga laboratorium yang memiliki kemampuan melaksanakan uji diagnostik molekuler LAMP-TB di sejumlah fasilitas kesehatan masyarakat dalam rangka kerja sama penelitian antara Badan Litbangkes dengan institusi kesehatan lintas sektor lainnya.

Khusus:

1. Untuk memperoleh tenaga laboratorium yang memahami prinsip LAMP pada saat melaksanakan uji diagnostik TB secara molekuler;
2. Untuk memperoleh tenaga laboratorium yang mampu melaksanakan prinsip LAMP pada saat melaksanakan uji validasi primer LAMP spesifik Indonesia di fasilitas kesehatan masyarakat.

Luaran pelatihan

Pencapaian Tujuan Pembelajaran Umum /TPU :

Dengan telah selesainya pelatihan, maka akan diperoleh tenaga laboratorium yang terlatih dan mampu memahami seluruh materi pada Pelatihan Teknik LAMP untuk Diagnostik TB.

Pencapaian Tujuan Pembelajaran Khusus/TPK:

Dengan telah selesainya pelatihan, maka akan diperoleh tenaga laboratorium yang terlatih melaksanakan teknik LAMP untuk diagnostik TB.

Materi pelatihan meliputi teori dan teknik isolasi material genetik DNA dari *Mycobacterium tuberculosis*, kemudian dilanjutkan dengan proses amplifikasi menggunakan teknik LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) serta metode deteksi hasil dengan teknik pengendapan dan fluoresensi. Pelatihan juga mendapatkan teori dan praktek mengenai tindakan keamanan bekerja di laboratorium (*Biosafety dan Biosecurity*).

Peserta pelatihan sebelum melakukan pelatihan harus melewati ujian pretest, hal ini penting dilakukan agar para mentor dapat mengetahui secara singkat tentang gambaran pengetahuan yang dimiliki oleh peserta yang bertujuan untuk mengetahui posisi awal menjelaskan teori. Setelah mendapatkan pelatihan dilakukan post test dengan tujuan untuk evaluasi hasil pelatihan dan seberapa banyak teori yang dapat diterima oleh para

peserta pelatihan. Hasil pre test dan post test para peserta pelatihan dapat dilihat pada tabel.

Tabel 3.1
Hasil Pre-Test dan Post-Test Peserta Pelatihan Diagnostik LAMP

No	NamaPeserta	Pre-Test	Post-Test	Keterangan
1	Daroham Mutiatikum	70	90	
2	Nelly Puspandari	80	100	
3	Pudji Lestari	70	90	
4	LinaRustanti	70	100	
5	Indri Rooslamati	70	100	
6	Fransisca Sriotami	90	100	
7	Sukmayati Alegantina	60	100	**
8	Melawati	60	100	**
9	Dorkas	60	80	
10	Kambang Sariadji	70	90	
11	Sunarno	80	100	
12	Kelik M Arifin	70	90	
13	Herni Asih Setyorini	70	100	
14	Intan Sari Oktoberia	70	100	
15	Kurniati	90	100	
16	Hoeruman Indra	60	90	
17	Novi Amalia	60	90	
18	Sun dari Nur Sofiah	60	80	
	Rata-rata	70	94,44	

Keterangan :

** Kenaikan yang paling tinggi

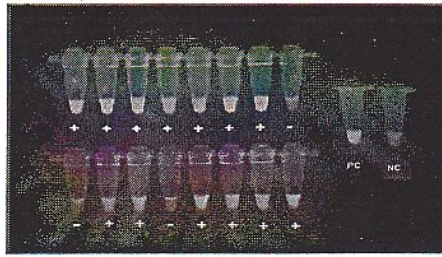
Tabel hasil diatas memberikan informasi bahwa terdapat peningkatan pengetahuan peserta sebelum pelatihan dengan sesudah mendapatkan pelatihan. Hal ini dapat dilihat dari naiknya rata-rata nilai dari hasil pre test dan post test. Kenaikan tertinggi sebesar 40 point yang didapatkan oleh Sukmayanti Alegantina dan Melatiwati. Kenaikan rata-rata kelas pelatihan 24,44 point dengan 5 orang peserta mendapatkan nilai yang sempurna, dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa transfer ilmu pengetahuan baik teori maupun

praktek dari para mentor berlangsung dengan kondusif sehingga peserta dapat memahami materi yang diberikan.

Teknik isolasi material genetik DNA mengadopsi teknik Boom dengan menggunakan QiAmp DNA Mini Kit (Cat.No. 51306), teknik isolasi ini menggunakan metode vacum dan silica. Isolasi DNA dilakukan dalam kabinet keselamatan hayati (*Biosafety Cabinet*) class IIA. Proses isolasi DNA merupakan salah satu titik kritis dalam teknik LAMP, hal tersebut dikarenakan teknik LAMP merupakan suatu teknik deteksi cepat TB yang berbasis molekuler sehingga dalam proses pemeriksaannya membutuhkan material genetik DNA (*Deoksiribulosa Acid*). Setelah pelatihan isolasi ini diharapkan peserta dapat memisahkan antara material genetik DNA dengan material genetik lainnya sehingga pada tahapan selanjutnya yaitu amplifikasi tidak ditemukan faktor penghambat.

Teknik amplifikasi LAMP adalah teknik deteksi cepat bakteri TB dengan adaptasi dari teknik amplifikasi lainnya yang menggunakan primer spesifik untuk LAMP. Teknik ini hanya menggunakan satu suhu saja meliputi suhu denaturasi, annealing dan elongasi. Keuntungan lainnya dari teknik ini adalah waktu amplifikasi yang relatif lebih cepat dari teknik lainnya. Pada pelatihan ini peserta diberi informasi tentang mekanisme mixture reagen sampai dengan amplifikasi dengan menggunakan waterbath dan mesin *thermocycler*. Proses mixture reagen adalah titik kritis lainnya dalam teknik LAMP, peserta diharapkan mampu melaksanakan sesuai dengan aturan operasional yang sudah diberikan. Hal ini dikarenakan komposisi reagen pada pelatihan telah dioptimasi, proses optimasi meliputi konsentrasi primer yang digunakan dan pemilihan suhu amplifikasi. Teknik LAMP menggunakan primer spesifik yang telah diuji oleh Dr. Vivi Lisdawati, dkk. Primer tersebut dibuat hanya spesifik untuk *Mycobacterium tuberculosis* strain Indonesia sehingga spesifitasnya dapat diunggulkan.

Hasil amplifikasi dari teknik LAMP dideteksi dengan menggunakan metode pengendapan dan fluoresensi. Pada pelatihan peserta diharapkan mampu membaca hasil dari teknik LAMP. Proses pembacaan hasil dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu metode pengendapan dan metode fluorescence. Hasil amplifikasi positif dari metode pengendapan dapat dilihat dengan adanya gumpalan (koagulasi) berwarna putih di dasar tube, sedangkan hasil dari metode fluorescence dilihat dibawah UV lamp, hasil positif terlihat pendaran warna hijau. Analisis hasil teknik LAMP hanya memerlukan pengamatan visual.



Gambar 3.1. Hasil deteksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* dari kultur bakteri menggunakan teknik LAMP dengan metode deteksi secara fluoresensi pada waktu pelatihan tenaga laboratorium.

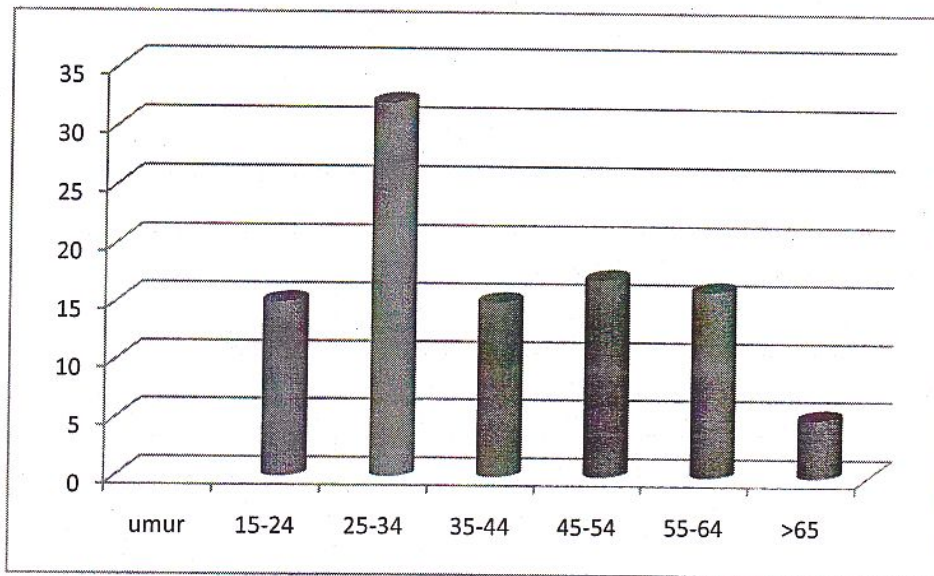
3.3. Uji Validasi Diagnostik LAMP-TB

Uji validasi diagnostik LAMP-TB bertujuan untuk menentukan spesifitas dan sensitivitas diagnostik molekuler *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP) menggunakan primer yang diperoleh dari hasil karakterisasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) di Indonesia. Uji validasi diagnostik LAMP-TB direncanakan akan dilaksanakan pada sejumlah fasilitas kesehatan masyarakat untuk pemeriksaan TB. Validasi primer dan metode LAMP-TB diperlukan agar nantinya metode diagnostik dapat diaplikasikan dan terintegrasi dalam pelayanan fasilitas kesehatan di masyarakat.

Uji validasi diagnostik LAMP-TB pada tahun 2011 dilaksanakan serentak di 2 rumah sakit di kota Jakarta dan Bandung. Untuk kota Jakarta diwakili oleh Rumah Sakit Persahabatan, sedangkan untuk kota Bandung diwakili oleh RSUP dr. Hasan Sadikin.

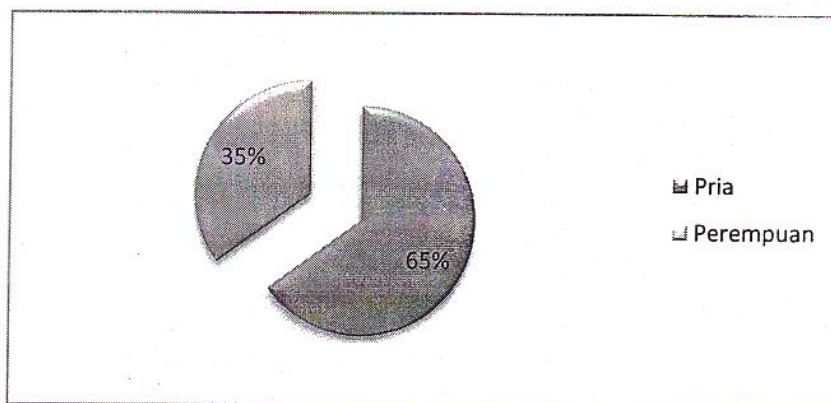
Uji validasi diagnostik LAMP-TB dilakukan pada sejumlah pasien TB dan non TB di fasilitas kesehatan masyarakat untuk pemeriksaan TB, guna memperoleh data sensitivitas dan spesifitas primer strain Indonesia. Adapun karakteristik dari pasien yang terlibat dalam penelitian dapat dilihat pada yang hasil berikut ini:

Data formulir pendamping seluruh responden diolah menggunakan Windows SPSS versi 15.0. dan karakteristik responden penelitian dianalisis berdasarkan Kelompok Umur dan Jenis Kelamin. Data karakteristik responden sampel berdasarkan kelompok umur dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Karakteristik Responden Penelitian Berdasarkan Kelompok Umur

Data karakteristik responden sampel berdasarkan jenis kelamin dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3. Karakteristik Responden Penelitian Berdasarkan Jenis Kelamin

Sejumlah sampel DNA *Mtb* yang berasal dari pasien yang telah memenuhi kriteria inklusi diuji dengan primer LAMP paten Litbangkes untuk mengetahui sensitifitas dan spesifisitas yang ada. Rekap hasil uji dapat dilihat pada tabel 3.2 A s/d. 3.2.C.

Tabel 3.2. A
 Hasil Uji Validasi primer *gyrB* (Paten Balitbangkes) pada sampel pasien TB

No	ID Sampel	Hasil LAMP			
		Indonesia	Kontrol H37Rv	Kontrol Negatif	Iwamoto
1	L-01	positif	positif	negatif	-
2	L-02	positif	positif	negatif	-
3	L-03	negatif	positif	negatif	-
4	L-04	positif	positif	negatif	-
5	L-05	positif	positif	negatif	positif
6	L-06	positif	positif	negatif	-
7	L-07	positif	positif	negatif	-
8	L-08	positif	positif	negatif	-
9	L-09	negatif	positif	negatif	-
10	L-10	negatif	positif	negatif	-
11	L-11	positif	positif	negatif	-
12	L-12	positif	positif	negatif	-
13	L-13	positif	positif	negatif	-
14	L-14	positif	positif	negatif	-
15	L-15	positif	positif	negatif	-
16	L-16	positif	positif	negatif	-
17	L-17	positif	positif	negatif	-
18	L-18	positif	positif	negatif	-
19	L-19	negatif	positif	negatif	-
20	L-20	positif	positif	negatif	positif
21	L-21	negatif	positif	negatif	-
22	L-22	negatif	positif	negatif	-
23	L-23	negatif	positif	negatif	-
24	L-24	negatif	positif	negatif	-
25	L-25	positif	positif	negatif	-
26	L-26	negatif	positif	negatif	-
27	L-27	negatif	positif	negatif	-
28	L-28	positif	positif	negatif	-
29	L-29	negatif	positif	negatif	-
30	L-30	negatif	positif	negatif	-
31	L-31	negatif	positif	negatif	-
32	L-32	negatif	positif	negatif	-
33	L-33	negatif	positif	negatif	-

Tabel 3.2. B
 Hasil Uji Validasi primer *gyrB* (Paten Balitbangkes) pada sampel pasien TB

No	ID Sampel	Hasil LAMP			
		Indonesia	Kontrol H37Rv	Kontrol Negatif	Iwamoto
34	L-34	negatif	positif	negatif	-
35	L-35	positif	positif	negatif	-
36	L-36	negatif	positif	negatif	-
37	L-37	negatif	positif	negatif	-
38	L-38	positif	positif	negatif	-
39	L-39	positif	positif	negatif	-
40	L-40	negatif	positif	negatif	negatif
41	L-41	positif	positif	negatif	-
42	L-42	positif	positif	negatif	-
43	L-43	positif	positif	negatif	-
44	L-44	positif	positif	negatif	-
45	L-45	positif	positif	negatif	-
46	L-46	positif	positif	negatif	-
47	L-47	negatif	positif	negatif	-
48	L-48	positif	positif	negatif	-
49	L-49	positif	positif	negatif	-
50	L-50	positif	positif	negatif	-
51	L-51	positif	positif	negatif	-
52	L-52	positif	positif	negatif	-
53	L-53	negatif	positif	negatif	-
54	L-54	negatif	positif	negatif	-
55	L-55	negatif	positif	negatif	-
56	L-56	positif	positif	negatif	-
57	L-57	negatif	positif	negatif	-
58	L-58	positif	positif	negatif	-
59	L-59	positif	positif	negatif	-
60	L-60	positif	positif	negatif	-
61	L-61	negatif	positif	negatif	-
62	L-62	negatif	positif	negatif	-
63	L-63	positif	positif	negatif	-
64	L-64	positif	positif	negatif	-
65	L-65	negatif	positif	negatif	-
66	L-66	negatif	positif	negatif	-

Tabel 3.2. C
 Hasil Uji Validasi primer *gyrB* (Paten Balitbangkes) pada sampel pasien TB

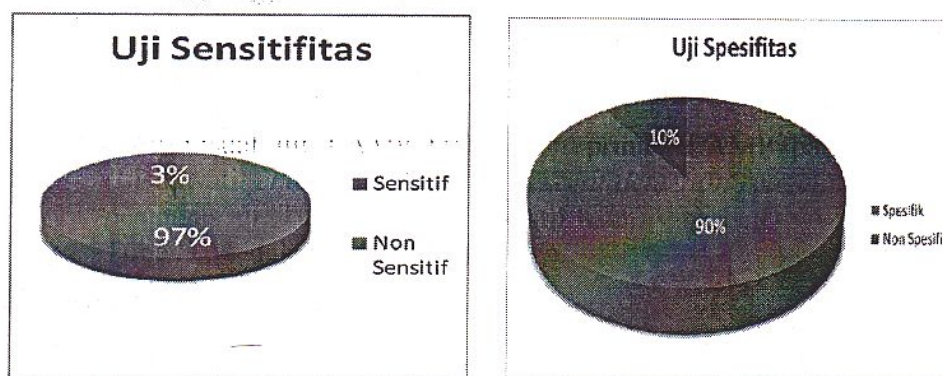
No	ID Sampel	Hasil LAMP			
		Indonesia	Kontrol H37Rv	Kontrol Negatif	Iwamoto
67	L-67	positif	positif	negatif	-
68	L-68	positif	positif	negatif	-
69	L-69	negatif	positif	negatif	-
70	L-70	negatif	positif	negatif	-
71	L-71	positif	positif	negatif	-
72	L-72	negatif	positif	negatif	-
73	L-73	positif	positif	negatif	-
74	L-74	positif	positif	negatif	-
75	L-75	negatif	positif	negatif	Negatif
76	L-76	positif	positif	negatif	-
77	L-77	positif	positif	negatif	-
78	L-78	positif	positif	negatif	-
79	L-79	positif	positif	negatif	-
80	L-80	positif	positif	negatif	-
81	L-81	negatif	positif	negatif	-
82	L-82	positif	positif	negatif	-
83	L-83	negatif	positif	negatif	-
84	L-84	positif	positif	negatif	-
85	L-85	positif	positif	negatif	-
86	L-86	positif	positif	negatif	-
87	L-87	negatif	positif	negatif	-
88	L-88	positif	positif	negatif	-
89	L-89	positif	positif	negatif	-
90	L-90	positif	positif	negatif	-
91	L-91	positif	positif	negatif	-
92	L-92	positif	positif	negatif	-
93	L-93	positif	positif	negatif	-
94	L-94	positif	positif	negatif	-
95	L-95	positif	positif	negatif	-
96	L-96	negatif	positif	negatif	-

Uji LAMP dilakukan pada sampel pasien TB Indonesia menggunakan penangas air sebagai instrumen amplifikasi dan lampu UV untuk deteksi hasil. Tube reaksi yang menunjukkan hasil positif akan memberikan pendar hijau di bawah sinar UV, sementara tube reaksi dengan hasil negatif tidak akan berpendar. Hasil uji dapat dilihat pada gambar 3.4., yaitu positif pada isolat yang berpendar hijau, sementara isolat yang tidak berpendar menunjukkan reaksi negatif.



Gambar 3.4. Hasil visual uji LAMP-TB dengan primer LAMP paten Balitbangkes (Lisdawati, *et.al.*), indikator *fluorescent detection reagent* serta instrumen penangas air. Tube PC adalah Positif Kontrol berisi DNA *Mtb* H37Rv dan Tube DW adalah negatif kontrol.

Hasil dari uji validasi LAMP-TB menunjukkan bahwa uji sensitivitas dari sampel pasien menunjukkan nilai sensitivitas 96,8% dan 90,2% (lebih kurang) setelah konfirmasi dengan hasil kultur. Untuk itu dapat dikatakan bahwa metode LAMP-TB dengan primer Indonesia memiliki nilai sensitivitas dan spesifitas yang tinggi.



Gambar 3.5. Hasil uji validasi LAMP-TB

3.4 Survei Kelaikan Laboratorium untuk Uji Coba Diagnostik LAMP-TB

Survei kelaikan laboratorium direncanakan nantinya akan dilaksanakan pada seluruh fasilitas kesehatan masyarakat di 14 lokasi lain selain Jakarta dan Bandung yang telah melaksanakan uji validasi pada tahun ini, yang merupakan lokasi yang telah berkontribusi sebagai tempat pengumpulan sampel pada penelitian tahun 2008 – 2010. Lokasi tersebut berada di 14 ibu kota provinsi di Indonesia, yaitu: Padang, Pekanbaru, Lampung, Palembang, Medan, Serang, Surabaya, Mataram, Banjarmasin, Pontianak, Ambon, Manado, Makassar dan Sorong. Survei bertujuan untuk mengidentifikasi laboratorium yang memenuhi persyaratan kriteria laboratorium yang diinginkan pada saat uji validasi.

Survei kelaikan laboratorium tahun 2011 berhasil dilaksanakan di tiga kota yaitu: Makassar, Padang dan Surabaya, dari tanggal 28 November sampai tanggal 10 Desember 2011.

Tujuan survei kelaikan laboratorium ini adalah untuk memperoleh lokasi fasilitas kesehatan masyarakat yang memiliki laboratorium dengan pemeriksaan TB paru dan sekaligus telah melaksanakan pemeriksaan biomolekuler di sejumlah ibu kota provinsi tempat pengumpulan sampel pada penelitian TB tahun 2008-2010. Dari survei ini diharapkan dapat diperoleh lokasi dari fasilitas kesehatan yang memiliki laboratorium dengan kriteria yang ditetapkan di sejumlah kota tersebut.

Kriteria laboratorium yang disyaratkan untuk uji coba diagnostic LAMP-TB adalah :

1. Laboratorium klinis yang pernah/telah melakukan pemeriksaan TB
2. Memiliki BSC class II A yang akan digunakan untuk isolasi material genetic
3. Bersedia melaksanakan penelitian sesuai metode yang diterapkan di Balitbangkes
4. Memiliki SDM yang mampu melakukan pemeriksaan molekular.

Adapun hasil dari survey kelaikan laboratorium di tiga kota dari 14 lokasi yang ditentukan yaitu :

Tabel 3.3
 Hasil Uji Kelayakan Laboratorium di Kota Makassar, Padang dan Surabaya untuk Uji Validasi Primer LAMP (Badan Litbangkes)

o	Nama	Nama Fasilitas	Jenis Laboratorium	Lokasi (Disektor Pemukiman/Tidak)	Status Kepemilikan	Kerjasama Penelitian	Kriteria									
							Kemampuan Lab. (Pemeriksaan)		Sarana dan Prasarana					Penanganan Limbah		
							Molekuler	TB	Jenis	BSC type I/IIA	Waterbath	Freezer	Refrigerator	Limbah Akhir	Incenerator	
1	Makassar	a. RS. Bhayangkara	Lab. Mikrobiologi	Ya	POLRI	Tidak Pernah	Tidak	Ya	BTA	Tidak	Tidak	Ada	Ada	Tidak	Ada	
		b. RS. Pelamonia	Lab. TB	Ya	TNI AD	Tidak Pernah	Tidak	Ya	BTA	Tidak	Tidak	Tidak	Ada	Ada	Ada	
		c. Puskesmas Makassar	Ruang Pemeriksaan	Ya	Pemda Tk II	Ya (Balitbangkes, UNHAS)	Tidak	Ya	BTA	Tidak	Tidak	Tidak	Ada	Ada	Ada	
		d. RS. Labuang Baji	Lab. Mikrobiologi	Ya	Pemda Tk I	Ya (UIT, UNHAS)	Tidak	Ya	BTA	Tidak	Tidak	Tidak	Ada	Ada	Ada	
		e. BBKPM	Lab. Mikrobiologi	Ya	Pem. Pusat	Ya (UNHAS, NECHRI)	Tidak	Ya	BTA, Kultur, sensitivitas	Ada	Tidak	Tidak	Ada	Ada	Ada	
		f. BBLK	Lab. Mikrobiologi	Tidak	Pem. Pusat	Tidak Pernah	Ya	BTA, Kultur, sensitivitas	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	
2	Padang	g. RS. Wahidin Sudro Husodo	Lab. Mikrobiologi	Ya	Pemda Tk I	Ya (UNHAS, NECHRI)	Ya	BTA, Kultur	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	
		a. BLK Kota Padang	Lab. Mikrobiologi	Tidak	Pemda Tk I	Ya (Balitbangkes)	Tidak	Ya	BTA	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	
		b. RS. M Djamil	Lab. Mikrobiologi	Ya	Pemda Tk I	Ya (Balitbangkes)	Ya	BTA	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	
		c. Puskesmas Lubuk Begalung	Ruang Pemeriksaan	Ya	Pemda Tk II	Ya (Balitbangkes)	Tidak	Ya	BTA	Tidak	Ada	Ada	Ada	Ada	Tidak	Ada
3	Surabaya	d. RS. Yos Sudarso	Lab. Mikrobiologi	Ya	Yayasan	Ya (Australia)	Tidak	Ya	BTA, Kultur	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	
		e. BP4	Lab. TB	Tidak	Pemda Tk I	Ya (UIMP)	Tidak	Ya	BTA, Kultur	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Tidak	Ada
		a. BBLK Surabaya	Lab. Mikrobiologi	Tidak	Pem. Pusat	Ya (Balitbangkes)	Tidak	Ya	BTA, Kultur, sensitivitas	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada	
		b. BP4	Lab. TB	Ya	Pemda Tk I	Ya (Balitbangkes)	Tidak	Ya	Direks	Ada	Tidak	Ada	Ada	Ada		

3.5. Pengembangan Reagen Formulasi

Pengembangan reagen formulasi bertujuan untuk memperoleh kandidat formula untuk reagen diagnostik LAMP-TB yang lebih mudah dan ekonomis dibandingkan kit komersial. Pengembangan formulasi reagen kit diagnostik LAMP-TB dilakukan di laboratorium Farmasi dan Biomolekuler, Pusat BTDK-Balitbangkes. Pengembangan formulasi reagen diagnostik molekuler LAMP-TB dikerjakan mengikuti acuan reagen amplifikasi DNA-kit komersial (EIKEN, chemical co.Ltd.)

Reagen formulasi yang dikembangkan dalam penelitian ini adalah reagen untuk isolasi material genetik DNA (ekstraksi DNA), reagen amplifikasi LAMP-Tb dan reagen deteksi LAMP. Dari pengembangan formulasi ini diharapkan dapat pula diaplikasikan ke berbagai fasilitas kesehatan masyarakat.

Hasil formulasi berupa:

1. Reagen ekstraksi DNA yang meliputi:
 - a. Buffer Tris HCL 1M
 - b. Buffer Lysis
 - c. Buffer pencuci
 - d. Buffer TE
 - e. Suspensi diatom
2. Reagen Loopamp: Mix reaction reagensia dalam botol 10 ml
3. Larutan SYBR untuk deteksi

Pelaksanaan modifikasi reagen formulasi memerlukan beberapa uji optimasi untuk mengetahui stabilitas dan efektifitas dari setiap formulasi yang dikembangkan. Tahap optimasi meliputi:

- a. Uji stabilitas
- b. Uji realibilitas
- c. Uji disolusi

Tahap optimasi dilakukan pada beberapa suhu dan beberapa periode waktu tertentu untuk memperoleh skla ketahanan dari formulasi yang terpilih.

Tabel 3.4
Hasil Pengembangan Reagen Formulasi

No	Pengembangan Reagen	Reagensia yang diperlukan	Alat yang digunakan	Prosedur Kerja	SOP
1	Ekstraksi DNA	Guanidin tiosianat , EDTA pH 8, NaOH, Triton-X, Tris-HCL 0,1M dan 10mM pH 6,4, H ₂ O (steril water), 32% w/v HCL, Analytical grade high purity celite	Rotary shaker, sentrifuge, inkubator, spektrofotometer, mikropipet set, dan botol reagen, autoklaf, waterbath, dll (lampiran), BSC class IIA	Persiapan reagensia, pembuatan buffer lysis ekstraksi, ekstraksi DNA	SOP ekstraksi DNA
2	Amplifikasi LAMP-TB	40mM Tris-HCl pH 8,8; 20mM KCl; 16mM MgSO ₄ ; 20mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,2% Tween 20; 1,6 M Betaine; 2,8 mM dNTPs; <i>Bst DNA polymerase</i> (1uL/tube); Primer Lamp TB: F3 (0,05uL), B3 (0,05uL), FIP(0,3uL), BIP(0,3uL), Loop F(0,15uL), Loop B (0,15uL); Nuclease free H ₂ O (7,7uL/tube); FD (0,8uL)	Laminar air flow, BSC type IIA, vortex, waterbath, lampu UV (gel documentation)	Preparasi sampel, preparasi reagensia, pembuatan mixture reagen, amplifikasi dan deteksi hasil	SOP uji LAMP

Ekstraksi DNA dilakukan dengan reagen yang disiapkan segera, setelah disterilkan dengan autoklaf maupun difilter. Sebagai pembanding, dilakukan juga ekstraksi DNA dari sampel yang sama dengan menggunakan reagen kit dari Q-Amp. Hasil uji kualitas DNA menggunakan spektrofotometri tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antara ekstraksi DNA menggunakan kit dan menggunakan reagen yang disiapkan segar.

Untuk mengetahui stabilitas reagen yang dibuat, perlu dilakukan uji stabilitas dipercepat dengan peningkatan suhu. Selain itu, faktor kondisi penyimpanan yang meliputi suhu dan cahaya juga perlu diperhatikan. Lebih jauh lagi, perlu dilakukan pengembangan formulasi dengan penambahan penstabil jika reagen akan disimpan dalam jangka waktu lama.

Hasil reagen mix Loopamp setelah dicobakan pada sampel dengan dibandingkan reagen Loopamp kit bervariasi. Untuk mengetahui sensitifitasnya, masih perlu dilakukan uji lagi dengan variasi konsentrasi DNA MTB yang diketahui.

Deteksi warna dengan menggunakan SYBR dan FD kit menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda. Akan tetapi, perlu dilakukan optimasi lebih jauh untuk menentukan minimal konsentrasi SYBR yang dibutuhkan untuk deteksi

3.6. Desain Primer Diagnostik LAMP-TB dan Resistensi

Prinsip utama pada metode uji diagnostik molekuler, termasuk metode LAMP, yaitu pemilihan gen penyandi yang akan digunakan sebagai primer kandidat diagnostik. Gen penyandi yang dipilih harus memiliki daerah *highly conserved* pada genom spesies, terutama spesies yang memiliki sub-tipe yang beragam.

Pengembangan desain primer untuk diagnostik dan resistensi berasal dari analisis data pola resistensi dan karakteristik *Mtb* pada penelitian terdahulu. Desain primer diagnostic dan uji resistensi *Mtb* dilaksanakan di laboratorium Biomolekuler dan Bakteriologi, Pusat BTDK-Balitbangkes. Dalam penelitian ini gen yang terpilih adalah gen *Gyr A* dan *Gyr B*, hal ini disebabkan pada dua gen tersebut terdapat informasi karakteristik *mapping* dan informasi tingkat resistensi dari suatu obat. Mutasi pada gen *Gyr A* dan *Gyr B* diketahui berperan dalam peningkatan resistensi terhadap antibiotik fluoroquinolone yang merupakan antibiotik lini kedua pada MDR-TB (WHO, 2001). Hasil positif pada amplifikasi *GyrA* dan *Gyr B* menunjukkan bahwa spesimen resistensi terhadap fluoroquinolone.

Gen *GyrA* pada *mtb* berada dalam kromosom 1 lokus Rv0006 pada urutan basa 7302-9818. Gen *GyrA* yang disekuensi dari isolat *M. Tuberculosis* H37Rv. Gen ini terdiri dari 2517 basa nukleotida yang mengkode 838 asam amino. Posisi mutasi yang berhubungan dengan resistensi *mtb* terhadap fluoroquinolone ada pada asam amino 90-94 (QRDR *mtb* ada pada asam amino 83-94). Urutan basa nukleotida berwarna kuning pada gambar dibawah menandakan basa yang mengkode asam amino 91-94 (basa 267-282). Pada *mtb* tipe liar (wt), posisi asam amino 91-94 adalah ASIYD. Sedangkan *mtb* mutan yang resisten terhadap fluoroquinolone adalah VPIY dengan asam amino 94 berupa D, N, A, H atau Y

Sekuen basa gen gyrA:

ATGACAGACACGACGTTGCCGCTGACGACTCGCTCGACCGGATCGAACCGGTTGACATC
GAGCAGGAGATGCAGCGCAGCTACATCGACTATGCGATGAGCGTGATCGTCGGCCGCGCG
CTGCCGGAGGTGCGCGACGGGCTCAAGCCCGTGCATCGCCGGGTGCTCTATGCAATGTTT
GATTCCGGCTTCCGCCCCGACCGCAGCCACGCCAAGTCGGCCCGGTCGGTTGCCGAGACC
ATGGGCAACTACCACCCGACGGCGACGGCTCGATCTACGACAGCCTGGTGCGCATGGCC
CAGCCCTGGTTCGCTGCGCTACCCGCTGGTGGACGGCCAGGGCAACTTCGGCTCGCCAGGC
AATGACCCACCGCGCGGATGAGGTACACCGAAGCCCGGCTGACCCCGTTGGCGATGGAG
ATGCTGAGGAAAATCGACGAGGAGACAGTCGATTTACCCCTAACTACGACGCGCCGGTG
CAAGAGCCGACGGTGTACCCAGCCGGTTCCCAACCTGTGGCCAACGGGTCAGGGCGC
ATCGCGGTCCGGATGGCAACCAATATCCCGCCGCACAACCTGCGTGAGCTGGCCGACCGG
GTGTTCTGGGCGCTGGAGAATCAGCAGCCGACGAAGAGGAGACCCTGGCCGCGGTCATG
GGCCGGGTTAAAGGCCCGGACTTCCCGACCGCCGGACTGATCGTCGGATCCCAAGGACCC
GCTGATGCCTACAAAATGGCCGCGGCTCCATTCGAATGCGCGGAGTTGTTGAGGTAGAA
GAGGATTCGCGCGTCTGACCTCGCTGGTGTACCCGAGTTGCCGTATCAGGTCAACCAC
GACAATTCATCACTTCGATCGCCGAACAGGTCCGAGACGGCAAGCTGGCCGGCATTTC
AACATTGAGGACCAGTCTAGCGATCGGGTTCGGTTTACGCATCGTCATCGAGATCAAGCC
GATGCGGTGGCCAAGGTGGTGTCAATAACCTTTACAAGCACACCCAGCTGCAGACCAGC
TTTGGCGCCAAACATGCTAGCGATCGTCGACGGGGTGGCCGCGACGCTGCGGCTGGACCAG
CTGATCGCTATTACGTTGACCACTCGACGTCATTGTGCGGCGCACCACTACCGG
CTGCGCAAGGCAAAACGAGCGAGCCCACTTCTGCGCGGCTGGTTAAAGCGCTCGACCGG
CTGGACGAGGTGATGCACTGATCCGGGCGTCGGAGACCGTCGATATCGCCCGGGCCGGA
CTGATCGAGCTGCTCGACATCGACGAGATCCAGGCCAGGCAATCCTGGACATGCAAGTTG
CGCGCCTGGCCGCACTGGAACGCCAGCGCATCATCGACGACCTGGCCAAAATCGAGGCC
GAGATCGCCGATCTGGAAGACATCCTGGCAAAAACCGAGCGGCAAGCTGGGATCGTGCGC
GACGAACTCGCCGAAATCGTGGACAGGCACGGCGACGACCGGCGTACCCGGATCATCGCG
GCCGACGGAGACGTCAGCGACGAGGATTTGATCGCCCGGAGGACGTCGTTGTCACTATC
ACGAAACCGGATACGCCAAGCGCACCAAGACCGATCTGTATCGCAGCCAGAAACCGCGC
GGCAAGGGCGTGCAGGGTGGGGGTTGAAGCAGGACGACATCGTCGCGCACTTCTTCGTT
TGCTCCACCCAGATTTGATCCTGTTCTTACCACCCAGGGACGGGTTTATCGGGCCAAG
GCCTACGACTTGCCCGAGGCTCCCGGACGGCGCGCGGCGAGCACGTGGCCAACTGTGTA
GCCTCCAGCCGAGGAACGCATCGCCAGGTATCCAGATTTCGGGCTACACCCAGCC
CCGTACCTGGTGTGGCCACTCGCAACGGGCTGGTGAAGAAAGTCCAAGCTGACCGACTTC
GACTCCAATCGCTCGGGCGGAAATCGTGGCGGTC AACCTGCGCGACAACGACGAGCTGGTC
GGTGGCGTGTGTTGCGCCGGCGACGACCTGCTGCTGGTCTCGGCCAACGGGACGTC
ATCAGGTTCTCGGCGACCGACGAGGCGCTGCGGCCAATGGGTCTGTCACCTCGGGTGTG
CAGGGCATGCGGTTCAATATCGACGACCGGCTGCTGCTGCTGAACGTCGTGCGTGAAGGC
ACCTATCTGCTGGTGGCGACGTCAGGGGGCTATGCGAAACGTACCGCATCGAGGAATAC
CCGGTACAGGGCCGCGGGGTAAGGTTGTGCTGACGGTCAATGACGACCGCCGGCGGGC
AGGTTGGTTGGGGCGTTGATTGTCGACGACGACGAGCGAGCTGTATGCCGTCACTTCCGGC
GGTGGCGTGTCCGACCGCGGCACGCCAGGTTTCGCAAGGCGGGACGGCAGACCAAGGGT
GTTCCGGTTGATGAATCTGGGCGAGGGCGACACTGTTGGCCATCGCGCGCAACGCCGAA
GAAAGTGGCGACGATAATGCCGTGGACGCCAACGGCGCAGACCAGACGGGCAATTA

Sekuen protein gyrA:

1- MTDITLPPDDSLDRIEVDIEQEMQRSYIDYAMSIVVGRALPEVRDGLKPVHRRVLYAMF -60
61- DSGFRPDRSHAKSARSVAETMGNYHPHGDAIYDSLVRMAQPWSLRYPLVDGQGNFGSPG -180
181- NDPPAAMRYTEARLTPLAMEMLREIDEETVDFIPNYDGRVQEPVLPSPRFPNLLANGSGG -240
241- IAVGMATNIPPHNRELADAVFWALENHDADEEETLAAVMGRVKGPDFPTAGLIVGSQGT -300
301- ADAYKTGRGSIRMGRVVEVEEDSRGRTSLVITELPYQVNHDFITSIAEQVRDGLKLAGIS -360
361- NIEDQSSDRVGLRIVIEIKRDAVAKVVINNLKHTQLQTSFGANMLAIVDGVPRTLRLDQ -420
421- LIRYYVDHQLDVIVRRTTYRLRKANERAHILRGLVKALDALDEVIALIRASETVDIARAG -480
481- LIELLDIDEIQAQAILDMQLRRLAALERQRIIDDLAKIEAEIADLEDILAKPERQRGIVR -540
541- DELAEIVDRHGDDRRTRIIAADGDVSDLEDIAREDDVVVITETGYAKRKTLDLYRSQKRG -600
601- GKGVQAGLQDDIVAHFFVCSHTDLILFFTTQGRVYRAKAYDLPEASRTARGQHVANLL

Mutasi pada gen *gyr A* yang meningkatkan resistensi *Mycobacterium tuberculosis* ada pada posisi:

1. Asp 87 Asn (GAC → AAC) resisten terhadap ciprofloxacin, ofloxacin (Alangaden et al, 1995)
2. Ala 83 Val (GCG → GTG) resisten terhadap sparfloxacin (Alangaden et al, 1995)
3. Ala 90 Val meningkatkan resistensi hingga 16X
4. Ser 91 Pro meningkatkan resistensi terhadap fluoroquinolone
5. Asp 94 His, Asn, Gly, Tyr, Ala (Takiff et al, 1995) meningkatkan resistensi hingga 30-60X

Gen *GyrB* didesain dari genome Mtb H37RV (NCBI) dengan mengunduh 200bp didepan dan di belakang daerah nukleotida 5123-7267 pada *GyrB*. Desain primer menggunakan program software Primer3 secara online dan diperoleh rekomendasi primer yang berada pada daerah nt 6220-6421 di gen *GyrB*, yaitu sekuens *Forward Primer* dan *Reverse Primer*.

Sekuens gen gyraseB menggunakan sekuens DNA daerah 5123 – 7267 (Fasta) dengan software Primer3 :

```
GAGCCTCGAGGACGAAGCGGATCCGTATGCCGGACGTCGGGACGCACCAGGAAGAAAGATGTCGGACGCA
CGGCGCGGTTAGATGGGTAAAAACGAGGCCAGAAGATCGGCCCTGGCGCCCGATCACGGTACAGTGGTGT
GCGACCCCCTCGGGCGACTCAACCGCATGCACGCAACCCCTGAGGAGAGTATTCGGATCGTGGCTGCCCA
GAAAAAGAAGGCCAAGACGAATACGGCGCTGCGTCTATCACCATTCTCGAAGGGCTGGAGGCCGTCCGC
AAACGTCGCCGATGTACATTGGCTCGACCGGTGAGCGCGGTTTACACCATCTCATTGGGAGGTGGTGC
ACAACGCGGTGACGAGGGCGATGGCCGGTTATGCAACCACAGTGAACGTAGTGCTGCTTGAGGATGGCGG
TGTCGAGGTGCGCGACGACGGCCGCGGATTCCGGTCGCCACCCACGCTCCGGCATAACCGACCGTGCAC
GTGGTGATGACACAACACTACATGCCGGCGGCAAGTTCGACTCGGACGCGTATGCGATATCTGGTGGTCTGC
ACGGCGTCCGGTGTTCGGTGGTTAACGCGCTATCCACCCGGCTCGAAGTCGAGATCAAGCGCGACGGGTA
CGAGTGGTCTCAGGTTTATGAGAAGTCGGAACCCCTGGGCCCTCAAGCAAGGGGCGCCGACCAAGAAGACG
GGTCAACGGTGCAGTTCTGGGCCGACCCCGCTGTTTTCGAAACCACGGAATACGACTTCGAAACCGTGC
CCCGCCGGCTGCAAGAGATGGCGTTCCTCAACAAGGGGCTGACCATCAACCTGACCGCAGAGAGGGTGAC
CCAAGACGAGGTGTCGACGAAGTGGTCAGCGACGTCGCCGAGGCGCCGAAGTCGGCAAGTGAACGCGCA
GCCGAATCCACTGCACCGCACAAAGTTAAGAGCCGCACCTTCACTATCCGGGTGGCCTGGTGGACTTCG
TGAAACACATCAACCGCACCAAGAACGCGATTATAGCAGCATCGTGGACTTTTCCGGCAAGGGCACC GG
GCACGAGGTGGAGATCGCGATGCAATGGAACGCCGGGTATTCGGAGTCGGTGCACACCTTCGCCAACACC
ATCAACACCCACGAGGGCGGCACCCACGAAGAGGGCTTCCGCAGCGCGCTGACGTCGGTGGTGAACAAGT
ACGCCAAGGACCGCAAGCTACTGAAGGACAAGGACCCCAACCTCACCGGTGACGATATCCGGGAAGGCCT
GGCCGCTGTGATCTCGGTGAAGGTGAGCAACCGCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAGTTGGGCAAC
ACCGAGGTCAAATCGTTTGTGAGAAGGTCTGTAAACGACAGCTGACCCACTGGTTTGAAGCCAACCCCA
CCGACGCGAAAGTCGTTGTGAACAAGGCTGTGTCTCGGCGCAAGCCCGTATCGCGGCACGTAAGGCACG
AGAGTTGGTGGCGGTAAGAGCGCCACCGACATCGGTGGATTGCCCGCAAGCTGGCCGATTGCCGTTCC
ACGGATCCGCGCAAGTCCGAACGTATGTCTGTAAGGTGACTCGGCCGGCGGTTCTGCAAAAAGCGGTC
GCGATTGATGTTCCAGGCCGATACTCCGCTGCGCGGCAAGATCATCAATGTGGAGAAAGCGCGCATCGA
```

CCGGGTGCTAAAGAACACCGAAGTTCAGGCGATCATCACGGCGCTGGGCACCGGGATCCACGACGAGTTC
GATATCGGCAAGCTGCGCTACCACAAGATCGTGCTGATGGCCGACGCCGATGTTGACGGCCAACATATTT
CCACGCTGTTGTTGACGTTGTTGTTCCGGTTCATGCGGCCGCTCATCGAGAACGGGCATGTGTTTTTGGC
ACAACCGCCGCTGTACAAACTCAAGTGGCAGCGCAGTGACCCGGAATTCGCATACTCCGACCGCGAGCGC
GACGGTCTGCTGGAGGCGGGGCTGAAGCCCGGAAGAAGATCAACAAGGAAGACGGCATTTCAGCGGTACA
AGGGTCTAGGTGAAATGGACGCTAAGGAGTTGTGGGAGACCACCATGGATCCCTCGGTTTCGTGTGTTGCG
TCAAGTGACGCTGGACGACGCCGCCGCCGACGAGTTGTTCTCCATCCTGATGGGCGAGGACGTCGAC
GCGCGGCGCAGCTTTATCACCCGCAACGCCAAGGATGTTTCGGTTCCTGGATGTCTAACGCAACCCTGCGT

Mutasi pada gen *gyr B* yang meningkatkan resistensi *Mycobacterium tuberculosis*. perubahan akibat mutasi pada gen *gyr B* adalah menurunkan konsentrasi quinolone intraselular. Aktivitas resistensi akibat mutasi pada gen *gyr B* lebih rendah dari pada resistensi akibat mutasi pada gen *gyr A*. mutasi yang menyebabkan resistensi quinolone pada gen *gyr B* adalah pada daerah Quinolone resistance-determining region (QRDR) yang terletak pada urutan antara basa

1. Asn 533 thr resisten terhadap moxi dan gatifloxacin (von groll et al, 2009)
2. Arg 485 Cys resisten terhadap ofloxacin (Feuerriegel et al, 2009)
3. Ala 543 ala + Thr (Feuerriegel et al, 2009)
4. N 510 D (veziris et al, 2007)
5. 447 arg (Guillemin et al, 1998)
6. 464 Asn (Guillemin et al, 1998)
7. A515V atau T (Mokrousov et al, 2008)
8. Q549H diluar QRDR (Mokrousov et al, 2008)

BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN

4.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Jejaring kerja sama yang lebih kuat antar pihak peneliti dari Pusat BTDK, institusi pemerintah daerah dan personal yang mewakili fasilitas kesehatan masyarakat di enam belas ibu kota provinsi yang telah terlibat pada penelitian dari tahun 2008-2010, institusi program di Kementerian Kesehatan dan juga institusi industri yang diharapkan dapat memwadahi kesinambungan produk hasil dari penelitian dan memproduksinya nanti secara massal ke masyarakat telah terlaksana pada saat dilaksanakan diseminasi hasil penelitian. Perwakilan daerah berasal dari dinas kesehatan kota Padang, Palembang, Medan, Surabaya, Mataram, Banjarmasin, Pontianak, Ambon, Manado dan Makassar; Institusi Program diwakili oleh Subdit TB, Ditjen Program Pengendalian Penyakit dan Lingkungan (P2PL), Kementerian Kesehatan; Institusi / Lembaga Litbang lintas sektor diwakili oleh pakar dari LIPI, Kementerian Ristek; sementara pihak Bisnis / Industri diwakili oleh direktur utama PT Bio Farma.
2. Peningkatan kemampuan pekerja laboratorium yang terlibat dalam penelitian untuk melaksanakan uji diagnostik LAMP-TB menggunakan primer LAMP yang telah dipatenkan dan dikembangkan oleh Badan Litbangkes dari hasil penelitian sebelumnya. Peningkatan kemampuan dinilai dari hasil pre-test dan post-test yang dilakukan pada saat pelatihan dilaksanakan. Dimana rata-rata peningkatan berkisar antara 20-40%. Peserta yang mencapai peningkatan paling tinggi sejumlah 1 orang peserta.
3. Nilai sensitifitas dan spesifisitas primer LAMP TB paten Balitbangkes berdasarkan hasil uji coba lapangan di faskesmas menunjukkan bahwa sensitifitas dari primer adalah 96,8% dan 90,2% (lebih kurang) setelah konfirmasi dengan hasil kultur;
4. Gambaran secara komprehensif mengenai kemampuan sarana dan prasarana fasilitas kesehatan masyarakat di tiga ibu kota provinsi di Indonesia yang akan dilibatkan pada uji validasi primer LAMP (Badan Litbangkes) di tahap selanjutnya. Dari hasil survey terlihat bahwa hanya satu fasilitas kesehatan masyarakat di daerah yang dikunjungi memenuhi

syarat untuk dapat menjadi lokasi uji coba pada tahap selanjutnya. Hasil survey juga menunjukkan bahwa seluruh lokasi yang menjadi tempat uji coba merupakan laboratorium yang telah termasuk ke dalam jejaring Laboratorium Influenza (*AI networking laboratories*) milik Kementerian Kesehatan yang dikoordinasi oleh Badan Litbangkes, yaitu Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) kota Makassar; BBLK kota Surabaya dan RS M. Jamil kota Padang;

5. Kandidat formula untuk reagen diagnostik LAMP-TB yang lebih mudah diperoleh di pasaran dan dapat diaplikasikan di laboratorium yang sesuai standard laboratorium diagnostik di Indonesia, dimana kandidat formulasi juga menjadi kandidat paten dari produk penelitian ini;
6. Data Studi bioinformatika kandidat primer LAMP TB untuk uji resistensi TB yang diharapkan dapat mempermudah diagnosis TB resisten di Indonesia. Kandidat primer nantinya juga merupakan kandidat paten pada produk penelitian.

4.2. Saran

Berdasarkan keterbatasan penelitian dan kesimpulan hasil di atas, maka saran pada penelitian adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan upaya memperluas dan memperkuat jejaring secara terus menerus untuk lebih menjamin kemanfaatan produk penelitian di pasar nasional;
2. Hasil pelatihan yang menunjukkan bahwa teknik LAMP merupakan metode diagnostik molekuler TB yang sangat sederhana menunjukkan prospek yang menguntungkan dari pemanfaatan teknik ini di sarana fasilitas kesehatan masyarakat di Indonesia;
3. Perlu dilakukan uji validasi lebih lanjut menggunakan primer LAMP paten Litbangkes terhadap spesimen klinis pasien suspek TB dan pasien non suspek TB di fasilitas kesehatan masyarakat (*hospital base*) pada seluruh kota yang terlibat pada penelitian sebelumnya, sehingga primer LAMP desain Indonesia memiliki data sensitifitas dan spesifitas uji yang lengkap.
4. Harus dilakukan optimasi mencakup formulasi reagen ekstraksi dan reagen amplifikasi untuk diagnostik LAMP agar dapat menunjang kemandirian serta kesinambungan proses

kerja diagnostik molekular LAMP-TB di Indonesia, terutama pencapaian swasembada diagnostik molekular TB;

5. Harus dilakukan optimasi terkait pengembangan primer resistensi untuk diagnostik LAMP yang sesuai karakteristik sampel *Mtb* di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Keseluruhan penelitian dibiayai oleh dana DIPA 2011, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan - Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI. Secara khusus, ucapan terimakasih kami sampaikan kepada dr. Endang R. Sedyaningsih, MPH, Dr. PH., selaku Koordinator Penelitian Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri *Mtb* di Puslitbang BMF tahun 2008, yang menjadi awal penelitian TB ini hingga menemukan primer LAMP-TB yang dapat dipatenkan atas nama Badan Litbangkes (Lisdawati, *et.al.*) dan berlanjut hingga penelitian tahun 2011 ini. Ucapan terimakasih juga kami sampaikan kepada Dr.dr. Trihono, MSc selaku Kepala Badan Litbangkes yang sekaligus merupakan salah satu Konsultan dalam penelitian ini serta Drs. Ondri Dwi Sampurno, MSi, Apt selaku Koordinator Penelitian. Dan kepada seluruh anggota Tim Penelitian 2011, para Konsultan Penelitian, Para Peneliti baik dari Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan ataupun dari institusi Luar (RS Hasan Sadikin, Departemen Mikrobiologi, FKUI dan RS Persahabatan), Para Pembantu Peneliti beserta Staf Administrasi Penelitian. Terimakasih juga kami sampaikan kepada seluruh pihak yang telah menyumbangkan bantuan moril dan materil untuk terlaksananya penelitian ini yang tidak dapat kami tuliskan satu demi satu.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO Report. 2006. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing.
2. Subdit TB. 2007. Laporan Akhir Tahun. Ditjen. Pemberantasan Penyakit Menular – Penyehatan Lingkungan (P2MPL), Depkes RI. Jakarta.
3. WHO Report. 2009. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing.
4. Badan Litbangkes. 2007. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) Nasional 2007. Balitbangkes, Depkes RI. Jakarta.
5. Tim Surkesnas. Survei Prevalensi Tuberkulosis Indonesia tahun 2004. Dirjen. Pemberantasan Penyakit Menular – Penyehatan Lingkungan (P2PL) Badan Litbangkes. Departemen Kesehatan. Jakarta. 2005: 1-3, 49-52.
6. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2010. Laporan Riskesdas.
7. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. 2005. Medical Microbiology: *Mycobacterium*. Fifth ed. Elsevier MOSBY. Philadelphia USA. 297-310.
8. Zink, AR., Sola, C., Reischl, U., Grabner, W., Rastogi, N., Wolf, H., Nerlich, AG. 2003. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 359-367.
9. van Soolingen, D. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J.Intern.Med*. 249:1-26.
10. van der Zanden, A. 2002. Spoligotyping, a tool in epidemiology, diagnosis and control of tuberculosis. Thesis. Medical Microbiology and Infectious Disease, Iocation Lukas, Gelre Hospitals, Apeldoorn, Bilthoven, The Netherlands.
11. Oelemann, MC., Diel, R., Vatin, V., Haas, W., Rusch-Gerder, S., Locht, C., Niemann, S., Supply, P. 2007. Assessment of an Optimized *Mycobacterium* Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing System Combined with Spoligotyping for Population-Based Molecular Epidemiology Studies of Tuberculosis. *J. Clin. Microbiology*. 45: 691-697.
12. Subdit TB. 2009. Laporan Akhir Tahun. Ditjen. Pemberantasan Penyakit Menular – Penyehatan Lingkungan (P2MPL), Depkes RI. Jakarta.
13. Al-hajoj, S., et.al. 2007. First Insight into Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia. *J. Clin. Microbiology*. 45: 2467 – 2473.
14. Boehme, dkk. *Operational Feasibility of Using Loop-Mediated Isothermal Amplification for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Microscopy Centers of Developing Countries*. *J. Clin. Microbiology*. 2007; 45: 1936 – 1940
15. World Health Organization (WHO), *New Technologies for Tuberculosis Control: A framework for their adoption, introduction and implementation*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. France. 2007.
16. Iwamoto, T., dkk. *Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M. avium, and M. intracellulare in Dahak Sampels*. USA.; *J. Clin. Mikrobiology*. 2003; 41: 2616 – 2622.
17. Notomi, T., dkk. *Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA Nucleic Acids Res*. 2007. 28:e63.
18. Garrigo, M. et.al. 2007. Multicenter Laboratory Evaluation of the MB/BacT *Mycobacterium* Detection System and the BACTEC MGIT 960 System in Comparison with the BACTEC 460TB System in Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiology*. 45: 1766 – 1770.
19. Nester, E.W., Anderson, D.G., Roberts, Jr., C.E. 2007. *Microbiology: A Human Perspective*. 5th ed. New York: Mc Graw Hill. 245-263.
20. Pandey, B.D., et.al. 2008. Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum sampels of Nepalese patients. *Journal of Medical Microbiology*. 57: 439-443.
21. Journal American Medical Association, 2000. Update: Nucleic Acid Amplification Tests for Tuberculosis. 284 (7). (Reprinted). 826. *MMWR*. 2000;49:593-594. Downloaded from <http://www.jama.com>. online September 9, 2010.
22. Dendukuri, N, et.al. 2004. Bayesian Sample Size Determination for Prevalence and Diagnostic Test Studies in the Absence of Gold Standard Test. *Biometrics*. 60: 388-397.

LAMPIRAN

PUSAT BIOMEDIS dan TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN dan PENGEMBANGAN KESEHATAN
DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
Jalan Percetakan Negara 29
Jakarta 10560

PENELITIAN UJI VALIDASI DIAGNOSTIK MOLEKULER *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP-TB) BERDASARKAN DATA KARAKTERISASI STRAIN *Mycobacterium tuberculosis* di INDONESIA (TAHUN 2011)

NASKAH PENJELASAN

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI mulai bulan Maret s/d Desember 2011 akan melakukan Penelitian dengan judul Uji Validasi Diagnostik Molekuler *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) Berdasarkan Data Karakteristik Strain *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) di Indonesia (Tahap I). Pengumpulan sampel untuk uji kesahihan diagnostik LAMP akan diadakan di Provinsi DKI Jakarta dan Provinsi Jawa Barat mencakup pengumpulan spesimen dahak dari pasien Tuberkulosis dan pasien non Tuberkulosis di Rumah Sakit Persahabatan Jakarta dan di Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung. Penelitian bertujuan untuk mengembangkan metode uji diagnosis cara cepat molekuler untuk infeksi Tuberkulosis. Sasaran penelitian adalah pasien yang diduga terinfeksi kuman tuberkulosis dan pasien yang diduga terinfeksi tetapi terbukti bukan penderita tuberkulosis, berusia ≥ 15 tahun, merupakan pasien di dua rumah sakit yang telah ditentukan.

Badan Litbang kesehatan mengajak Bapak/Ibu/Sdr/Sdri berpartisipasi dalam penelitian ini. Bapak/Ibu/Sdr/Sdri akan diambil dahaknya. Pemeriksaan dahak adalah kegiatan rutin bagi pasien Tuberkulosis di RS. Persahabatan dan RS. Hasan Sadikin. Dahak yang dikumpulkan adalah: dahak *pagi hari* serta dahak *sewaktu saat akan diperiksa*, dari pasien dengan gejala tuberkulosis maupun pasien dengan gejala tetapi terbukti bukan tuberkulosis, yang telah bersedia ikut penelitian dan telah mendapat pelatihan cara mengeluarkan dahak sebelumnya. Pengumpulan dahak *pagi* dan *sewaktu* dilakukan oleh petugas laboratorium di RS. Persahabatan dan RS. Hasan Sadikin.

Keuntungan partisipasi Bapak/Ibu/Sdr/Sdri adalah Bapak/Ibu/Sdr/Sdri akan memperoleh hasil pemeriksaan dahak (apusan BTA) secara *cuma-cuma* dan secara tidak langsung ikut berperan serta dalam pengembangan alat diagnostik baru TB yang akan digunakan di masyarakat.

Semua informasi dan hasil pemeriksaan yang berkaitan dengan keadaan kesehatan Bapak/Ibu/Sdr/Sdri dirahasiakan dan disimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Depkes RI, Jakarta dan hanya digunakan untuk pengembangan kebijakan program kesehatan dan pengembangan ilmu pengetahuan. Partisipasi Bapak/Ibu/Sdr/Sdri adalah sukarela dan bila tidak berkenan sewaktu-waktu dapat mengundurkan diri tanpa dikenakan sanksi apapun.

Bila Bapak/Ibu/Sdr/Sdri memerlukan penjelasan lebih lanjut mengenai penelitian ini, dapat menghubungi Ketua Pelaksana penelitian Dr. Vivi Lisdawati, MSi., Apt. di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan – Depkes RI, Jalan Percetakan Negara 29, Jakarta 10560; Telp. (021) 4261088 ext. 530; Fax. (021) 4245386; e-mail: vivi_l@litbang.depkes.go.id; viandrashakti@yahoo.co.id atau penanggungjawab di RS Persahabatan adalah dr. Elisna Syahrudin, Sp.P(K), PhD. dan penanggungjawab di RS Hasan Sadikin adalah Dr.dr. Ida Parwati, SpPK(K), PhD.

**PERSETUJUAN SETELAH PENJELASAN (PSP)*
(INFORMED CONSENT)**

Saya telah mendapatkan penjelasan secara rinci dan mengerti mengenai Penelitian Uji Validasi Diagnostik Molekuler *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP-TB) Berdasarkan Data Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* di Indonesia (Tahun 2011).

Uji Validasi Diagnostik Molekuler *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP-TB) Berdasarkan Data Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* di Indonesia dilakukan oleh Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Depkes RI. Saya mengerti bahwa partisipasi saya dilakukan secara sukarela dan saya dapat menolak atau mengundurkan diri sewaktu-waktu tanpa sanksi apapun.

Pernyataan bersedia diambil dahak

Nama Responden	Nomor Identitas	Tgl/bln/thn	Tanda tangan / Cap jempol diri

Nama Saksi**	Tgl/bln/thn	Tanda Tangan

Keterangan :

- * PSP dibuat 3 rangkap :
Responden 1 lb; Pertinggal di Laboratorium RS. Persahabatan atau RS. Hasan Sadikin 1lb;
Pusat Biomedis dan Teknologi dasar Kesehatan – dikirim bersama sampel *dahak* 1lb (uji kualitas mutu dan baku emas diagnostik TB).
- ** Di luar tim medis, bisa orang yang mempunyai hubungan keluarga, tetangga atau kepala Bagian/Laboratorium RS. Persahabatan atau RS. Hasan Sadikin

LAMPIRAN 2.
Kuisisioner Survei Kelaikan Laboratorium untuk Uji Coba LAMP-TB

**KUISIONER SURVEY KELAIKAN LABORATORIUM UNTUK UJI COBA DIAGNOSTIK MOLEKULER
LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) TB BERDASARKAN DATA KARAKTERISTIK
STRAIN *Mycobacterium tuberculosis* di INDONESIA**

Hari / Tanggal Survei :

Tempat :

PENGENALAN LOKASI			
Provinsi			
Wabupaten / Kota			
Nama Laboratorium			
Alamat			
Lokasi:			
Di sekitar Pemukiman Penduduk	a. Ya	b. Tidak	
Nomor Telepon/Fax			
Alamat Email/Website			
Jenis Laboratorium		a. Puskesmas b. Rumah Sakit	c. BBLK/BBKPM
kelas Laboratorium	a. Pratama c. Utama		b. Madya
Nomor Ijin Laboratorium			
Tanggal Berakhir Ijin			
Tanggal Berdirinya Laboratorium			
Status Kepemilikan :	a. Pemerintah Pusat c. Pemda Tk II e. BUMD/BUMN g. Yayasan		b. Pemda Tk I d. TNI/Polri f. Swasta
Pernah terlibat dalam kerja sama penelitian	a. Ya	b. Tidak	
Jenis Penelitian, sebutkan			
Instansi Penelitian, sebutkan			

IDENTIFIKASI KEMAMPUAN LAB

Penanganan Bahan Infeksius	a. Ya	b. Tidak
Pemeriksaan Molekuler	a. Ya	b. Tidak
Melaksanakan pemeriksaan TB	a. Ya	b. Tidak
Sebutkan (jenis pemeriksaan)		1 2 3
<p>Pemeriksaan Lainnya :</p> <p>a. Pernah Melakukan Ekstraksi DNA/RNA</p> <p>b. Lainnya, sebutkan:</p> <p>Program Khusus TB Paru</p> <p>a. Apakah Laboratorium Saudara ikut terlibat program DOTS?</p> <p>b. Apakah ada tenaga yang sudah dilatih untuk melakukan pemeriksaan sputum BTA</p> <p>c. Apakah Melakukan pemeriksaan spesimen sewaktu-pagi-sewaktu</p> <p>d. Apakah membuat laporan untuk program TB Paru</p> <p>e. Jumlah Rata-rata spesimen BTA positif perbulan berdasarkan laporan</p> <p>f. Apakah ada supervisi dari Dinas Kesehatan setempat ?</p>	<p>a. Ya</p> <p>a. Ya</p> <p>a. Ya</p> <p>a. Ya</p> <p>.....specimen</p> <p>a. Ya</p>	<p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p>
Pencatatan dan Pelaporan	<p>Bagaimana Sistem Pengarsipan Hasil Pemeriksaan</p> <p>a. Manual (buku registrasi)</p> <p>b. Komputerisasi</p> <p>c. Keduanya / kombinasi</p>	

IDENTIFIKASI SARANA DAN PRASARANA	
Jumlah SDM Total	
Jumlah Tenaga Laboratorium	orang
a. dokter	
b. Lulus S2 (bidang kesehatan)	orang
c. Lulus S1 (bidang kesehatan)	orang
d. Analis / Diploma (bidang kesehatan)	orang
e. SMU / Sederajat	orang
Pemimpin Laboratorium ini adalah:	orang
	<ul style="list-style-type: none"> a. Dokter Spesialis Patologi Klinik b. Dokter Spesialis Lain c. Dokter Umum d. Lain -Lain
Penanggung jawab laboratorium ini adalah:	<ul style="list-style-type: none"> a. Dokter Spesialis Patologi Klinik b. Dokter Spesialis Lain c. Dokter Umum d. Lain -Lain
Alat Yang Dimiliki	
a. Biosafety Cabinet Class II Type A	a. Ada b. Tidak
b. Laminar Air Flow	a. Ada b. Tidak
c. Waterbath	a. Ada b. Tidak
d. Heatblock	a. Ada b. Tidak
e. Gel Documentation	a. Ada b. Tidak
f. UV Lamp	a. Ada b. Tidak
g. Mikropipet Set	a. Ada b. Tidak
h. Camera digital	a. Ada b. Tidak
i. Freezer	a. Ada b. Tidak
j. Refrigerator (Kulkas)	a. Ada b. Tidak
k. Autoklaf	a. Ada b. Tidak
l. Sentrifuge	a. Ada b. Tidak

<p>Ruangan</p> <p>Jumlah Ruangan</p> <p>Jenis Ruangan:</p> <p>a. Pemeriksaan</p> <p>b. Pengumpulan Spesimen</p> <p>c. Ruang Steril</p> <p>d. Ruang Deteksi</p> <p>Pencahayaan</p> <p>Ventilasi/sirkulasi udara</p>	<p>Ruang</p> <p>a. Ada</p> <p>a. Ada</p> <p>a. Ada</p> <p>a. Ada</p> <p>a. Cukup</p> <p>a. Ada</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p>
<p>Penanganan Limbah</p> <p>a. Sarana Penampungan Limbah</p> <p>b. Pemisahan limbah medis dan non medis</p> <p>c. Sarana Penanganan Limbah Akhir</p> <p>d. Incenerator</p> <p>e. Pernah Mendapat Pemantapan Mutu Eksternal (PME)</p>	<p>a. Ada</p> <p>a. Ada</p> <p>a. Ada</p> <p>a. Ada</p> <p>a. Pernah</p> <p>Sebutkan</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p> <p>Ket:</p>
<p>BIOSAFETY DAN BIOSECURITY</p>	
<p>a. Apakah Staff pernah ikut training biosafety biosecurity</p> <p>b. Jumlah staff yang ikut training</p> <p>b. Tempat Training</p> <p>c. Instansi yang Mengadakan</p> <p>d. Supervisor Lab</p> <p>e. Pernah Mendapat Pemantapan Mutu Eksternal (PME)</p> <p>a. Nilai PME</p> <p>b. Instansi yang melaksanakan PME</p>	<p>a. Pernah</p> <p>b. Tidak</p> <p>Orang</p> <p>a. Ada</p> <p>a. Ya</p> <p>b. Tidak</p> <p>b. Tidak</p>

Nama Responden :

No. Tlp/HP :

Nama Surveyor :

Identifikasi & Karakterisasi *Mycobacterium tuberculosis* dari Spesimen Dahak Pasien TB di Indonesia (Penelitian 2008-2010)

Identifikasi & Karakterisasi *Mycobacterium tuberculosis* dari Spesimen Dahak Pasien TB di Indonesia (Penelitian tahun 2008-2010)

Vivi Lisdawati¹, Lutfah Rifati¹, Nelly Puspariani¹, Ririn Ramadhany¹, Holy Arif¹, Aulia R.¹, Ni Wayan Arlani¹, Sukmayanti A¹, Ida Parwati², T. Mirawati S³, Tedjo S.⁴, D. Mutiatikum¹, Noerendah P¹, Kambang S¹, Alnur R¹, Eko Rahardjo¹, Syahril H¹, Melatiwati¹, Triyani S¹, Syamsidar¹, Dorkas¹, Sri S¹, Nur Izza², Lies R.² Iefandari¹, Retno Gitawati¹, Retno

¹ Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes ² Bagian Patologi Klinik, RSUP dr. Hasan Sadikin - ³ Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia - ⁴ Lembaga Biologi Molekuler Eijkman

Abstrak

Permasalahan Tuberkulosis Paru (TB) di Indonesia antara lain karena belum lengkapnya peta karakteristik kuman *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) yang bersirkulasi di seluruh wilayah, mencakup peta genotipe dan peta pola resistensi kuman terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) lini I yang terintegrasi dalam program DOTS (Direct Observed Treatment - Short Course). Data karakteristik *Mtb* dapat digunakan untuk pengembangan diagnostik TB yang efektif dan efisien mendeteksi berbagai tipe *Mtb* di seluruh wilayah. Pengembangan deteksi cepat TB saat ini sudah mengarah pada metode biomolekuler. Pengumpulan sejumlah isolat spesimen klinis pasien TB dari berbagai kota yang memiliki angka CDR (Case Detection Rate) tinggi di Indonesia dapat digunakan untuk mengkaraktirisasi bakteri *Mtb* yang ada. Terdapat specimen klinis dapat pula dilakukan uji sensitifitas secara metoda proporsional. Informasi sekuen DNA *Mtb* dari isolat yang dikumpulkan sekaligus dapat dikembangkan menjadi primer spesifik yang dapat diaplikasikan pada metode diagnostik molekuler teknik LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification), yang memungkinkan untuk diaplikasikan di seluruh wilayah di Indonesia.

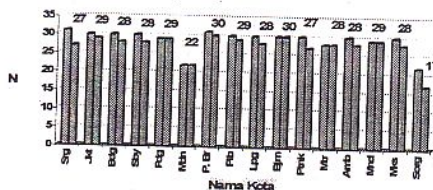
Karakteristik responden sampel

Sampel penelitian adalah spesimen dahak sps (*sewaktu, pagi dan sewaktu*), dari pasien Tuberkulosis Paru dengan hasil pemeriksaan mikroskopis BTA (Bakteri Tahan Asam) positif, yang telah dikumpulkan oleh Badan Litbangkes dari 16 ibu kota provinsi di Indonesia pada tahun 2008.



Gambar 1. Lokasi pengambilan spesimen dahak pasien TB untuk karakterisasi *Mycobacterium tuberculosis* di Indonesia

Lokasi pengumpulan sampel penelitian mencakup wilayah Sumatera (5 kota), Jawa (4 kota), Kalimantan (2 kota), Sulawesi (2 kota), Nusa Tenggara Barat (1 kota), Kepulauan Maluku (1 kota), dan Papua (1 kota).



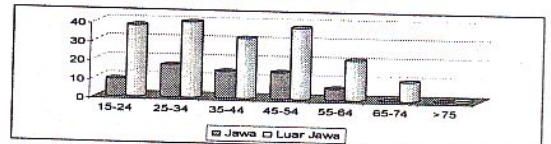
Gambar 2. Jumlah responden penelitian dan jumlah sampel inklusi yang berhasil dikumpulkan dari masing-masing lokasi penelitian

Gambar 2. Menunjukkan total responden yang berpartisipasi dalam penelitian sejumlah 462 responden. Dari total responden tersebut jumlah yang memenuhi kriteria inklusi hanya 437 responden (94,6%), dimana 25 sampel drop karena alasan: usia responden <15 tahun, data kuesioner tidak dilengkapi lembar formulir pendamping, atau sampel dahak tidak ada/ruak.



Gambar 3. Karakteristik Responden Penelitian Berdasarkan Jenis Kelamin

Karakteristik responden pada gambar 3. menunjukkan populasi sampel berdasarkan jenis kelamin, menempatkan laki-laki dalam proporsi yang lebih besar (64,1%) dibanding perempuan (35,9%).

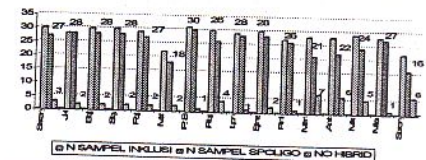


Gambar 4. Karakteristik Responden Penelitian Berdasarkan Kelompok Umur di Wilayah Jawa dan Luar Jawa

Karakteristik responden pada populasi sampel menurut kelompok umur pada gambar 4. menunjukkan kelompok usia produktif (15-54 tahun) merupakan kelompok mayoritas.

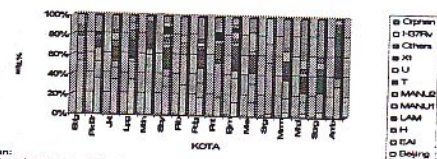
Karakteristik *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)

Karakterisasi bakteri *Mtb* dalam penelitian mencakup identifikasi genotipe bakteri yang dilakukan secara *spoligotyping* dan pohon filogenetik disusun menggunakan software BioNumerics v6.0.



Gambar 5. Jumlah sampel DNA *Mtb* pada sampel penelitian yang diuji genotipenya secara *spoligotyping*

Hasil DNA *Mtb* yang diuji genotipe secara *spoligotyping* pada gambar 5. menunjukkan bahwa menunjukkan dari 437 sampel (n sampel inklusi) telah berhasil diperoleh 404 data spoligo *Mtb* (n sampel spoligo), yaitu mencakup 92,5% dari total sampel DNA bakteri.



Legenda:
CAS = Central Asia Strain (Others)
EAI = East African-Indian
H = Hainan
LAM = Latin American-Mediterranean
U = Undefined

Gambar 6. Genotipe bakteri *Mtb* hasil *spoligotyping* dari 404 DNA sampel *Mtb* yang menunjukkan persentase tipe Beijing pada setiap kota

Gambar 6. Menggambarkan keragaman genotipe *Mtb* di Indonesia yang dipengaruhi oleh faktor geografis. Dimana tipe galur Beijing yang merupakan tipe *Mtb* mayoritas (23,0%) dari keseluruhan total sampel, terutama terdapat mayoritas di wilayah Jawa dengan persentase 30,6% (34/111) dan di wilayah Sumatera dan Kalimantan dengan persentase 28,4% (52/183). Untuk isolat sampel dari wilayah Timur Indonesia, tipe tipe mayoritas dengan persentase 19,1% (21/110) dan 16,4% (18/110), sementara tipe galur Beijing hanya 6,4% (7/110).



Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kementerian Kesehatan R.I

LAMPIRAN 3C

Gambaran Hasil Pemeriksaan Mikroskopik, *Lowenstein Jensen* (LJ), dan BACTEC *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT) pada Pasien Suspek Tuberculosis (TB) Paru

Gambaran Hasil Pemeriksaan Mikroskopik, *Lowenstein Jensen* (LJ), dan BACTEC *Mycobacterial Growth Indicator Tube* (MGIT) pada Pasien Suspek Tuberculosis (TB) Paru

Abstrak

TB Paru merupakan salah satu prioritas nasional dalam program pengendalian penyakit karena berdampak luas terhadap kualitas hidup dan ekonomi masyarakat serta sering mengakibatkan kematian. Pemeriksaan dengan kultur *Lowenstein Jensen* (LJ) dan mikroskopik basil tahan asam (BTA) merupakan *gold standard* dalam pemeriksaan TB. Namun demikian, pemeriksaan kultur LJ memerlukan waktu yang cukup lama (1-2 bulan) dan laboratorium yang mampu mengerjakannya sangat terbatas karena harus memiliki tenaga dan sarana yang memadai. Sementara itu, meskipun pemeriksaan mikroskopik dapat dikerjakan di hampir setiap laboratorium, tetapi mempunyai sensitifitas yang cukup rendah, di mana hasil positif (+) baru akan terlihat ketika terdapat 5.000 – 10.000 kuman dalam 1 ml spesimen (sputum). Saat ini dikembangkan metode BACTEC MGIT yang dapat menyingkat waktu pengerjaan sehingga hasil bisa dinilai dalam hitungan minggu. Bagaimanapun juga setiap metode pemeriksaan mempunyai kelebihan dan kekurangan masing-masing. Penelitian bertujuan memberikan gambaran hasil pemeriksaan tuberculosis paru secara mikroskopik (2 laboratorium), LJ dan BACTEC MGIT.

Hasil

Tabel 1. Perbandingan hasil pemeriksaan Mikroskopik PRM, Mikroskopik BMF, LJ dan MGIT

	Mikroskopik BMF	LJ	MGIT
Positif	85,4 %	94,2 %	81,3 %
Negatif	14,6 %	5,8 %	18,7 %

Tabel 2. Perbandingan hasil pemeriksaan Mikroskopik PRM dan Mikroskopik BMF berdasarkan kriteria IUATLD

	Mikroskopik PRM	Mikroskopik BMF
Negatif	14,6 %	5,8 %
Scanty	8,7 %	0,6 %
1 +	24,4 %	40,6 %
2 +	26,9 %	26,3 %
3 +	25,4 %	26,7 %

Tabel 3. Kesesuaian hasil Pemeriksaan Mikroskopik PRM dan Mikroskopik BMF

	Mikroskopik BMF (+)	Mikroskopik BMF (-)
Mikroskopik PRM (+)	81,7 %	3,7 %
Mikroskopik PRM (-)	12,5 %	2,1 %

Tabel 4. Perbandingan hasil pemeriksaan Mikroskopik PRM dan Mikroskopik BMF berdasarkan waktu pengambilan spesimen (sputum)

	Positif	Negatif
Mikroskopik PRM:		
- Sewaktu	85,2 %	14,8 %
- Pagi	86,4 %	13,6 %
- Sewaktu	84,7 %	15,3 %
Mikroskopik BMF:		
- Sewaktu	94,4 %	5,6 %
- Pagi	97,3 %	2,7 %
- Sewaktu	82,2 %	17,8 %

Tabel 5. Kesesuaian hasil pemeriksaan Mikroskopik PRM dibandingkan LJ

	LJ (+)	LJ (-)
Mikroskopik PRM (+)	75,0 %	12,7 %
Mikroskopik PRM (-)	10,4 %	2,1 %

Total hasil pemeriksaan yang sesuai adalah $75,0 + 2,1 = 77,1\%$

Tabel 6. Kesesuaian hasil pemeriksaan Mikroskopik PRM dibandingkan MGIT

	MGIT (+)	MGIT (-)
Mikroskopik PRM (+)	72,6 %	16,1 %
Mikroskopik PRM (-)	8,7 %	2,6 %

Total hasil pemeriksaan yang sesuai adalah $72,6 + 2,6 = 75,2\%$

Tabel 7. Kesesuaian hasil pemeriksaan Mikroskopik BMF dibandingkan LJ

	LJ (+)	LJ (-)
Mikroskopik BMF (+)	84,2 %	13,3 %
Mikroskopik BMF (-)	1,8 %	0,7 %

Total hasil pemeriksaan yang sesuai adalah $75,0 + 2,1 = 78,7\%$

Tabel 8. Kesesuaian hasil pemeriksaan MGIT dibandingkan LJ

	LJ (+)	LJ (-)
MGIT (+)	84,1 %	5,4 %
MGIT (-)	5,0 %	5,5 %

Total hasil pemeriksaan yang sesuai adalah $84,1 + 5,5 = 89,6\%$

Kesimpulan

Hasil pemeriksaan mikroskopik BTA cukup bervariasi dari masing-masing laboratorium terutama dalam menentukan *grade*-nya. Hal ini tergantung pada kemampuan dan pengalaman tenaga laboratorium serta sarana yang tersedia. Kesesuaian hasil pemeriksaan dengan berbagai macam metode cukup tinggi (di atas 75%)

Ucapan Terima Kasih

Keseluruhan penelitian dibiayai oleh dana DIPA 2008-2009, DIPA 2009-2010, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI. Secara khusus, ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Dr. Endang R. Sedyaningsih, MPH, Dr.PH., selaku Koordinator Penelitian Tim TB Puslitbang BMF tahun 2008. Ucapan terimakasih juga kami sampaikan kepada dr. Triono Soendoro, Ph.D. dan Dr.dr. Trihono, MSc selaku konsultan pada penelitian TB 2008 dan TB 2009. Terimakasih juga kami sampaikan kepada seluruh pihak yang telah menyumbangkan segala bantuan moril dan materil untuk terlaksananya penelitian ini.



Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kementerian Kesehatan R.I

Evaluating the use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Indonesia Clinical Isolates

LAMPIRAN 3D

Evaluating the use of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Indonesian Clinical Isolates

Vivi Lisdwati¹, Triyani Sukarso¹, Myrna Adiant², Ririn Ramadhany¹, Holy AriP, Pratiwi Sudarmono³, Tomohiro Oshibe⁴, Hidetaka Tsuji⁴, Tjahjani Mirawati Sudiro², Hak Hotta²

¹Center for Biomedical and Basic Technology of Health (CBBTB), NIHRD, MoH - Indonesia - ²Department of Microbiology, Kobe University Graduate School of Medicine - ³Department of Microbiology, Medicine Faculty, University of Indonesia - ⁴Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Science, Public Health Science Research Center

Abstract
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method is already claimed as a simple technique to amplify DNA/RNA of species. All aspects to support the method were investigated and taken as the validation procedures to analyze the applicability of LAMP-TB assay in the field, i.e. the sensitivity of amplification reagents, the sensitivity and specificity of four LAMP-TB primer sets that had been used previously and the sensitivity of several equipments for LAMP-TB assay. These evaluations were conducted at Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Science, Public Health Science Research Center, Kobe - Japan, in December 2009. After the validation test, LAMP method was undertaken in 122 clinical specimens of TB patients with AFB smears positive which were collected at 2008 in Center for Biomedical and Basic Technology of Health (CBBTB), NIHRD Indonesia. This assay was conducted at the Bacteriology and Biomolecular Laboratories of CBBTB, NIHRD Indonesia, from March to October 2010. The study had been used six set primers on *gyrB* gene of *Mtb* H37RV (Iwamoto, et al), water bath equipment for amplification of *Mtb* DNA and fluorescence detector as detection system. The results were compared to culture growth and sequencing test for confirmation. The sensitivity of MTB-LAMP test (positivity rate) was 94.2% (114/121), respectively.

Introduction
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology is another modified technique from Nucleic Acid Amplification Assay (NAA) which can be used for the direct detection of *Mtb* in clinical specimens. LAMP has increasingly been used and 2007, WHO has been using the first-generation of LAMP as their platform for new TB diagnostic technologies and has also recommended its use in peripheral laboratory. technology can be recommended for diagnosing TB in limited sources areas, such as most areas in Indonesia.

Methods
All sputum samples for LAMP test were decontaminated using *N*-acetylcysteine-NaOH treatment and after subsequent centrifugation, samples were split prior to testing and the remaining cultured on LJ media. The DNA was extracted from tissues kit, QIAamp Diagnostics Qiagen) and was stored at -70 °C before used. For containing LJ media (Becton Dickinson, Sparks, MD) and incubated at 37 °C. The observations. Sequencing test and PCR were performed and became gold standards, if there is disagreement between LAMP and culture growth results.

Application
The Loopamp DNA-amplification kit (Eiken Chemical Co Ltd.) was amplified in a 25µL reaction mixture containing the primer sets on *gyrB* gene developed by Iwamoto, et al., 2x Reaction Mix (40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM KCl, 18 mM MgSO₄, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween20, 1.6 M Betaine, 2.8 mM dNTPs), 1.0 µL template DNA, Template DNA's samples were prepared by QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Furthermore, the mixture was incubated at 63°C for 60 minutes using water bath.

Primers set:
F3: GCGATATCTGGTGGTCTG (5 pmol); B3: CCGTGGTTTCGAAACAGC (5 pmol);
FIP: AGACCACTCGTACCCGTCGCCGCTGTTAAGCCCTAT (40 pmol)
BIP: ATGAGAAGTCGGAACCCCTGGGACCGTTGACCCCGCTTTC (40 pmol)
Loop F: AACTAGACTGAAAGCTCGG (20 pmol)
Loop B: CCTCAAGCAAGGGCGG (20 pmol)

DNA's samples of *Mtb* with LAMP test positive or may had discrepancy with cultured results were amplified using primer sets, which had been designed by Primer3 sequencing analyzer. The similarity of DNA sequence products were compared to *gyrB* sequence of *Mtb* H37RV reference genome using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program from NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast/>).

Results

Primers	Dilution of purified DNA concentration <i>Mtb</i> H37RV					
	10 ng	1 ng	100 pg	10 pg	1 pg	100 fg
IWAMOTO - <i>Mtb</i>	+	+	+	+	+	+
YAMAGUCHI - <i>Mtb</i>	+	+	+	+	+	+
PANDEY - <i>Mtb</i>	+	+	+	+	+	+
ZHU - <i>Mtb</i>	-	-	-	-	-	-
IWAMOTO - <i>M. magerit</i>	+	+	+	+	+	+

Note: The assays were done using LAMP real time turbidimeter (LA-320C, Teramecs).

Discussions
This study clarified that DNA amplification was also depended on the skill of the working persons to yield high concentration of copies of DNA. Previous study showed that LAMP reaction time can be even less than half of that for the original LAMP method by using loop primers (FLP and BLP primers), so the differences of amplification by primer sets which using different primers summed in this study were might be caused by this principle. The validation of the specificity of four primers sets which had been using previously were showed that LAMP reaction time was the most specific compared to others primers. The LAMP-TB assay using three different instruments can make the application of LAMP method in developing countries more applicable. There were 114 isolates positively tested by LAMP, while 11 of those isolates are culture growth negative. Additionally, 8 isolates were negative by LAMP test and three of those came from positive LJ reference genome, indicated that those DNA's from 10 isolates with LAMP positive results but negative LJ culture, showed positive band in electrophoresis gel (Figure 2) and those DNA sequences were also had 97-100% similarity to *gyrB* sequence of *Mtb* H37RV reference genome on BLAST database. The results indicated that those DNA's of the isolates were also the DNA's of *Mtb*.

Acknowledgment
We gratefully thank to Director General of NIHRD - Indonesian MoH for his support and guidance. We are also thankful to Director and staff of the Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Science, Public Health Science Research Center for providing the laboratory facility. We would also like to thank the Dean and all staff at Department of Microbiology, Kobe University Graduate School of Medicine for their technical support. This work was supported in part by DIPA 2009 and DIPA 2010 at National Institute of Health Research and Development, Indonesia Ministry of Health.

Table 1. Specificity of LAMP primers sets using Loopamp kit EIKEN for identified 12 strain of *Mycobacteria* sp.

Sample	Origin	Iwamoto Primers	Atb	Yamaguchi <i>Mtb</i> primer	Pandey <i>Mtb</i> primer	Iwamoto <i>M. magerit</i> primer
<i>Mtb</i> H37RV	ATCC25818	+	-	-	-	-
<i>M. avium</i>	JATA51-01	-	-	-	-	+
<i>M. intracellulare</i>	JATA52-01	-	-	-	-	+
<i>M. kansasii</i>	JATA21-01	-	-	-	-	+
<i>M. fortuitum</i>	JATA81-01	-	-	-	-	+
<i>M. goodii</i>	JATA33-01	-	-	-	-	+
<i>M. terrae</i>	JATA46-01	-	-	-	-	+
<i>M. szulgai</i>	JATA32-01	-	-	-	-	+
<i>M. abscessus</i>	JATA63-01	-	-	-	-	+
<i>M. marinum</i>	JATA22-01	-	-	-	-	+
<i>M. lentiflavum</i>	JATA29-01	-	-	-	-	+
<i>M. celatum</i>	JATA91-01	-	-	-	-	+

Note: The assays were done using LAMP real time turbidimeter (LA-320C, Teramecs)

Table 2. Sensitivity of MTB-LAMP test by water bath instrument using *gyrB* primers set (Iwamoto et al., 2003) for one hundred twenty two of Indonesian TB sputum isolates

Assay	Sample						Control +	Control -
	DNA H37RV 10 ⁷ Cells	DNA H37RV 10 ⁶ Cells	DNA H37RV 10 ⁵ Cells	DNA H37RV 10 ⁴ Cells	DNA H37RV 10 ³ Cells	DNA H37RV 10 ² Cells		
LAMP	+	+	+	+	+	+	-	
Machione	+	+	+	+	+	+	-	
Water	+	+	+	+	+	+	-	
Heating block	+	+	+	+	+	+	-	
Thermo Cycler	+	+	+	+	+	+	-	

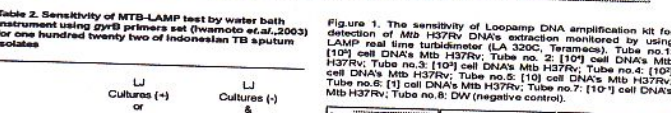
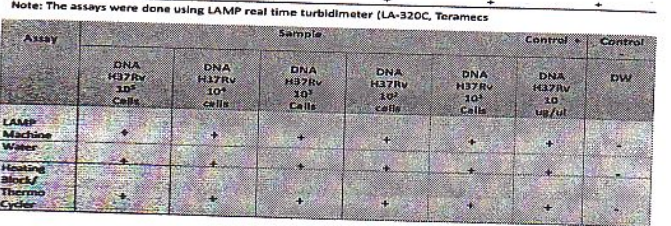


Fig 2 A. Visual detection of *gyrB* LAMP reaction using fluorescent indicator and water bath equipment under UV light. Tube no. 1: Tube no. 10. [DNA] isolates; Tube no. 11: [100] PFU *Mtb* H37RV; Tube no. 12: DW (negative control). B. Agarose gel electrophoresis results for *gyrB* LAMP reaction of DNA isolates (lane 1 - 10) and positive control and M. 100 pb marker.

Uji Resistensi *Mycobacterium tuberculosis* Terhadap Obat Anti Tuberculosis (OAT) Lini I Pada Spesimen Klinis Pasien TB Paru di Indonesia

LAMPIRAN 3E

Uji Resistensi *Mycobacterium tuberculosis* Terhadap Obat Anti Tuberculosis (OAT) Lini I Pada Spesimen Klinis Pasien TB Paru di Indonesia

NELLY PUSPANDARI¹, MELATIWATI¹, SYAMSIDAR¹, DORKAS¹, SUKMAYANTI A¹, KAMBANG S¹, D. MUTIATIKUM¹, LUTFAH RIFATI¹, VIVI LISDAWATI¹
¹ Puslitbang. Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes., KEMENKES. RI

Abstrak

Resistensi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* terhadap Obat Anti Tuberculosis (OAT) Lini I merupakan salah satu permasalahan dalam penanggulangan kasus TB di seluruh dunia. WHO mengestimasi kasus *Multi Drug Resistant* (MDR) di Indonesia sebanyak 2% pada kasus baru dan 20% pada kasus yang sudah pernah diobati (*relaps*). Telah dilakukan uji kepekaan OAT lini I terhadap 325 isolat *Mtb*, yang merupakan koleksi Badan Litbangkes, yang berasal dari spesimen klinis pasien TB Paru dengan BTA positif dari 16 ibukota provinsi di Indonesia pada tahun 2008, menggunakan metoda proporsional. Hasil uji kepekaan menunjukkan bahwa sebanyak 202 sampel (62,3%) sensitif terhadap OAT lini I, 108 sampel (30,1%) resisten terhadap OAT yang bukan INH dan Rifampisin, dan 15 sampel (4,6%) resisten terhadap INH dan Rifampisin atau disebut kasus MDR TB. Uji kesesuaian (*Kappa*) dilakukan di laboratorium TB BBLK Surabaya, yang merupakan Laboratorium Rujukan Nasional TB di Indonesia, dan memberikan nilai *Kappa* sebesar 89,02%.

Pendahuluan

Badan Kesehatan Dunia (*World Health Organization*) dalam *Annual Report on Global TB Control 2006* masih menetapkan Indonesia, diantara 22 negara lain (*the 22 high-burden countries*), pada urutan ketiga sebagai negara dengan pengidap TB terbanyak sesudah BIndia dan Cina.¹ Penelitian ini bertujuan untuk melakukan pemetaan (*preliminary mapping*) distribusi bakteri *Mtb* complex di Indonesia menggunakan metode *spoligotyping*.^{2,3} Penelitian bersifat *cross sectional study* dan dilaksanakan dari tahun 2008 - 2009. Identifikasi ditujukan pada isolat spesimen dahak pasien TB yang dikumpulkan dari 10 ibu kota propinsi dengan 5 kota lokasi penelitian berada di 5 propinsi yang menyangkut angka prevalensi TB di atas angka prevalensi TB Nasional data Riskesdas 2007, yaitu: Jakarta (DKI Jakarta), Serang (Banten), Banjarmasin (Kalimantan Selatan), Pontianak (Kalimantan Barat), dan Makassar (Sulawesi Selatan).^{4,5}

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di fasilitas *Biosafety Laboratory Level 2* (BSL-2), Laboratorium Bakteriologi, Puslitbang Biomedis dan Farmasi Balitbangkes dari bulan November 2008 - Desember 2009.

Sampel

Sejumlah 325 isolat bakteri *Mtb*, yang merupakan koleksi Laboratorium Bakteriologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (BTDK)-Balitbangkes, dan telah menunjukkan hasil positif *Mtb* melalui uji biokimia. Terhadap seluruh galur *Mtb* yang berhasil dibiakkan kemudian dilakukan uji kepekaan Obat Anti Tuberculosis (OAT) lini I (*Streptomycin*, *INH*, *Rifampicin* dan *Ethambutol*).

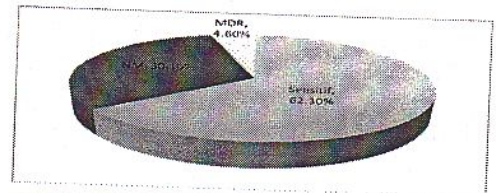
Cara Kerja

DST dilakukan menurut metode Proporsional sesuai prosedur penelitian baku, merujuk kepada Prosedur Baku metode Proporsional Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya. Interpretasi hasil dilakukan secara manual.

Hasil

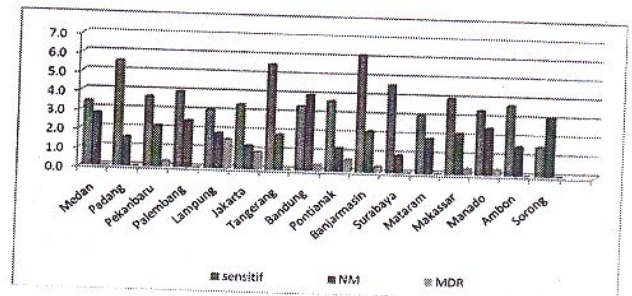


Gambar 1. Karakteristik Responden Penelitian Berdasarkan Jenis Kelamin
 Karakteristik responden pada populasi sampel berdasarkan jenis kelamin, menempatkan laki-laki dalam proporsi yang lebih besar (64,1%) dibanding perempuan (35,9%).



Gambar 2. Hasil uji kepekaan OAT lini I pada biakan *Mtb* sampel

Gambar 2. Menunjukkan hasil uji kepekaan OAT lini I pada sejumlah 325 biakan kultur dari 338 total biakan sampel (96,1%). Sejumlah 202 sampel menunjukkan tipe *Mtb* yang masih sensitif terhadap OAT lini I (62,3%), sementara sejumlah 108 sampel (30,1%) menunjukkan resisten terhadap OAT yang bukan INH atau Rifampisin dan 15 sampel (4,6%) menunjukkan resisten terhadap INH sekaligus Rifampisin atau biasa disebut *Mtb* tipe *Multi Drug Resistance* (MDR).



Keterangan: NM = Non MDR

Gambar 3. Hasil uji kepekaan OAT lini I pada biakan kultur dari sampel di 16 ibukota provinsi di Indonesia

Gambar 3. Menggambarkan bahwa sampel yang berasal dari kota Medan, Padang, Palembang, Tangerang, Surabaya, Mataram, Ambon, dan Sorong tidak ditemukan *Mtb* tipe MDR. Sampel *Mtb* dengan tipe MDR didapatkan pada sampel yang berasal dari kota Pekanbaru, Lampung, DKI Jakarta, Bandung, Pontianak, Banjarmasin, Makassar, dan Manado. Grafik juga menunjukkan bahwa pada semua sampel dari setiap kota terdapat *Mtb* tipe yang sudah resisten terhadap salah satu maupun lebih OAT lini I. Uji *Kappa* dilakukan dengan mengirimkan 20% isolat *Mtb* ke BBLK Surabaya untuk dilakukan resistensi, dan diperoleh nilai *Kappa* sebesar 89,02%.

Ucapan Terima Kasih

Keseluruhan penelitian dibiayai oleh dana DIPA 2008-2009, DIPA 2009-2010. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI. Secara khusus, ucapan terimakasih kami sampaikan kepada dr. Endang R. Sedyaningih, MPH, Dr.PH., selaku Koordinator Penelitian Tim TB Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2008. Ucapan terimakasih juga kami sampaikan kepada dr. Triono Soendoro, Ph.D. dan Dr.dr. Trihono, MSc selaku konsultan pada penelitian TB 2008 dan TB 2009. Terimakasih juga kami sampaikan kepada seluruh pihak yang telah menyumbangkan segala bantuan moral dan materiil untuk terlaksananya penelitian ini.



Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
 Kementerian Kesehatan R.I

Identifikasi & Karakterisasi *Mycobacterium tuberculosis* dari Spesimen Dahak Pasien TB di Indonesia (Penelitian tahun 2008-2010)

Identifikasi & Karakterisasi *Mycobacterium tuberculosis* dari Spesimen Dahak Pasien TB di Indonesia (Penelitian tahun 2008-2010)

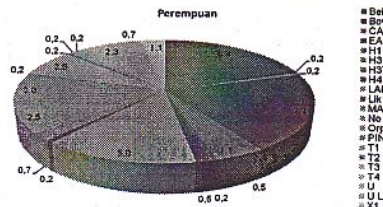
Vivi Lisdawati¹, Lutfah Rifati¹, Nelly Puspandari¹, Ririn Ramadhany¹, Holy Arif¹, Aulia R.¹, Ni Wayan Ariani¹, Sukmayanti A¹, Ida Parwati², T. Mirawati³, Tedjo S.⁴, D. Mutiatikum¹, Noerendah P¹, Kambang S¹, Ainur R¹, Eko Rahardjo¹, Syahrial H¹, Melatiwati¹, Triyani S¹, Syamsidar¹, Dorkas¹, Sri S¹, Nur Izza², Lies R.² Isfandan¹, Retno Gitawali¹, Retno Kadarsih¹, Andriansjah³, MA. Kelik¹, Khusniah¹, Yudi H¹

¹ Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes ² Bagian Patologi Klinik, RSUP dr. Hasan Sadikin - ³ Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia - ⁴ Lembaga Biologi Molekuler Eijkman

Abstrak

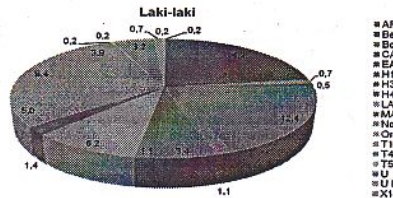
Permasalahan Tuberkulosis Paru (TB) di Indonesia antara lain karena belum lengkapnya peta karakteristik kuman *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) yang bersirkulasi di seluruh wilayah, mencakup peta genotipe dan peta pola resistensi kuman terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) lini I yang terintegrasi dalam program DOTS (Direct Observed Treatment - Short Course). Data karakteristik *Mtb* dapat digunakan antara lain untuk pengembangan diagnostik TB yang efektif dan efisien mendeteksi berbagai tipe *Mtb* di seluruh wilayah. Pengembangan deteksi cepat TB saat ini sudah mengarah pada metode biomolekuler. Pengumpulan sejumlah isolat spesimen klinis pasien TB dari berbagai kota yang memiliki angka CDR (*Case Detection Rate*) tinggi di Indonesia dapat digunakan untuk mengkaraktisasi bakteri *Mtb* yang ada. Terhadap spesimen klinis dapat pula dilakukan uji sensitifitas secara metode proporsional. Informasi sekuensa DNA *Mtb* dari isolat yang dikumpulkan sekaligus dapat dikembangkan menjadi primer spesifik yang dapat diaplikasikan pada metode diagnostik molekuler teknik LAMP (*Loop-mediated Isothermal Amplification*), yang memungkinkan untuk diaplikasikan di seluruh wilayah di Indonesia.

Karakteristik *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)



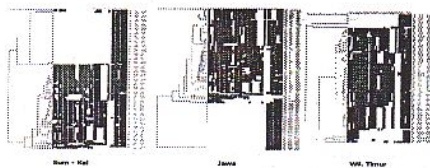
Gambar 7. Genotipe bakteri *Mtb* pada populasi sampel perempuan

Gambar 7. Menunjukkan genotipe bakteri *Mtb* yang dipilah sesuai gender dan menggambarkan tipe East African-Indian EAI (7,3%) merupakan bakteri *Mtb* yang mayoritas terdapat pada populasi gender perempuan.



Gambar 8. Genotipe bakteri *Mtb* pada populasi sampel laki-laki

Gambar 8. Menunjukkan genotipe bakteri *Mtb* yang dipilah sesuai jenis kelamin dan menggambarkan bahwa tipe Beijing merupakan bakteri *Mtb* yang mayoritas terdapat pada populasi gender laki-laki (14,2%).

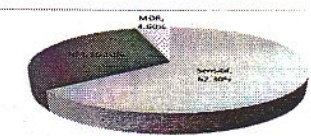
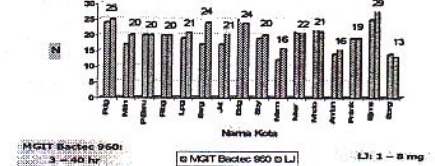


Gambar 9. Peta filogenetik *Mtb* sampel di tujuh kota di wilayah Sumatera & Kalimantan (Padang, Medan, Pekanbaru, Palembang, Lampung, Banjarmasin dan Pontianak); di empat kota di wilayah Jawa (Jakarta, Bandung, Serang dan Surabaya); dan di lima kota di wilayah Timur Indonesia (Mataram, Makassar, Manado, Ambon dan Sorong), disusun menggunakan software BioNumerics v6.

Peta filogenetik pada Gambar 9. memperjelas faktor geografik yang mempengaruhi genotipe bakteri per wilayah.

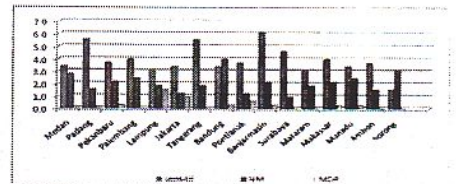
Pola Resistensi

Gambar 10. Isolat bakteri *Mtb* dari sampel penelitian diinokulasi pada media cair MGIT Bactec 960 dan media padat Lowenstein Jensen (LJ).



Gambar 11. Hasil uji kepekaan OAT lini I pada biakan *Mtb* sampel

Gambar 11. Menunjukkan hasil uji kepekaan OAT lini I pada sejumlah 325 biakan kultur dari 338 total biakan sampel (96,1%). Sejumlah 202 sampel menunjukkan tipe *Mtb* yang masih sensitif terhadap OAT lini I (62,3%), sementara sejumlah 108 sampel (30,1%) menunjukkan resisten terhadap INH sekaligus Rifampicin atau biasa disebut *Mtb* tipe Multi Drug Resistance (MDR)



Gambar 12 Hasil uji kepekaan OAT lini I pada biakan kultur dari sampel di 16 ibukota provinsi di Indonesia

Gambar 12 Menggambarkan bahwa sampel yang berasal dari kota Medan, Padang, Palembang, Tangerang, Surabaya, Mataram, Ambon, dan Sorong tidak ditemukan *Mtb* tipe MDR. Sampel *Mtb* dengan tipe MDR didapatkan pada sampel yang berasal dari kota Pekanbaru, Lampung, Jakarta, Bandung, Pontianak, Banjarmasin, Makassar, dan Manado. Grafik juga menunjukkan bahwa pada semua sampel dari setiap kota terdapat *Mtb* tipe yang sudah resisten terhadap salah satu maupun lebih OAT lini I. Uji Kappa dilakukan dengan mengiriskan 20% isolat *Mtb* ke BBLK Surabaya untuk dilakukan resistensi, dan diperoleh nilai kappa sebesar 69,02%.

Pengembangan primer diagnostik molekuler TB metode Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Diagnostik molekuler *Mtb* yang dikembangkan pada penelitian ini adalah metode Nucleic Acid Amplification Technique (NAAT), yaitu teknik Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). Uji sekuensing pada keseluruhan isolat DNA *Mtb* sampel pada gen *gyrB* *Mtb* H37Rv berhasil memberikan desain primer LAMP yang sesuai karakteristik *Mtb* yang ada di Indonesia. Primer yang dikembangkan berdasarkan karakteristik bakteri *Mtb* di Indonesia ini mampu menunjukkan *positivity rate* yang lebih tinggi dibanding primer LAMP komersial yang telah ada. Uji validasi untuk menentukan sensitifitas dan spesifitas primer masih terus dilakukan.

Ucapan Terimakasih

Keseluruhan penelitian dibiayai oleh dana DIPA 2008-2010 Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI. Secara khusus, ucapan terimakasih kami sampaikan kepada dr. Endang R. Sedyaningih, MPH, Dr.PH., selaku Koordinator Penelitian Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri *Mtb* di Puslitbang Biomedis dan Farmasi tahun 2008. Ucapan terimakasih juga kami sampaikan kepada dr. Triyono Soendoro, Ph.D. dan Dr.dr. Trihono, MSc selaku konsultan dalam penelitian TB 2008. Kami juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr.dr. Agus Puwardianto, SH, MSI, Sp.F(K) selaku Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan periode 2009-2010. Drs. Ondri Dwi Sampurno, Msi., Apt., selaku Koordinator penelitian tahun 2010. Terimakasih juga kami sampaikan kepada seluruh pihak yang telah menyumbangkan segala bantuan moril dan materil untuk terlaksananya penelitian ini.

LAMPIRAN 3G

First Insight of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Indonesia

First insight of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Indonesia

VIVI LISDAWATI¹, NELLY PUSPANDARI¹, LUTFAH RIFATI¹, IDA PARWATI², RIRIN RAMADHANY², TRIYANI S.³, LIES R.⁴, T. MIRAWATI SUDIRO², PRATIWI SUDARMONO¹, MELATIWIATI¹, SYAMSIDAR¹

¹ Center for Biomedical and Basic Technology of Health (CBSTH), NIHRD, MoH-RI - ² Department of Clinical Pathology, Hasan Sadikin Hospital - ³ Department of Microbiology, Medicine Faculty, Univ of Indonesia

Abstrak

Spoligotyping assay of 404 DNAs of *Mycobacterium tuberculosis* complex was performed and led to worthy molecular epidemiology of MTB mapping in Indonesia. Those DNA's isolates were obtained from archived samples of 2-years study periods (July 2008 to December 2010) which were clinical specimens of TB patients with AFB smears positive from 16 urban areas at 16 different provinces in Indonesia. Those pattern results were converted into octal format within Words & Excel spreadsheets and compared to International Spoligotype-database (SpolDB4) manually. A total of 146 different spoligotype patterns were identified among the 404 of *M. tuberculosis* isolates. Fifty-two (13%) isolates were gave spoligotype patterns which had not been previously reported (orphan types), while 352 were belonging to the Beijing genotype. The characterization of all *M. tuberculosis* by spoligotyping method shows that ubiquitous patterns were common, but there also several specific patterns were found. Significant associations between genotype families and age was detected, and also between gender and geographic. As conclusion, this study constituted a first attempt to describe the preliminary mapping of genetic population structure of the tubercle bacilli circulated in Indonesian TB patients, where Beijing family strain was the major cluster found in samples came from Java, Sumatera, and Kalimantan islands (30%), while the F family (EAI/East African-Indian type) of *Mtb* was the major cluster in samples came from East Islands of Indonesia (about 18%). The results of this study were confirmed significantly with the previous study published by Parwati, et al., which described the differences among *Mtb* population structure in two Indonesian islands at 2009.

Introduction

In 2008 - 2010, spoligotyping study had been conducted in National Institute of Health Research and Development (NIHRD), MoH Indonesia to determine the characterizations of *Mycobacterium tuberculosis* complex (*Mtb* complex) in archived isolates from clinical specimens of TB patients at 16 urban areas in 16 different Indonesian provinces. The locations of the collecting collections were chosen based on 2006's TB Case Detection Rate (CDR) data from Indonesia Directorate General of Communicable Disease Control and at Sumatera & Kalimantan islands (Padang, Medan, Pekanbaru, Jakarta, Bandung, Surabaya), seven cities Pontianak), and five cities at the East Islands of Indonesia (Mataram, Manado, Makassar, Ambon dan Sorong). These archived samples were collected from clinical specimens of TB patients with sputum-smear positive (SS+) and age 2 - 15 years old in year 2008. The procedure collection during the study was accordance to Indonesia ODTs guidelines and all samples were transported from the field to Bacteriology Laboratory at CBSTH, NIHRD. Sputum was taken for culture by using liquid media (MGIT Bactec 960 and solid media Lowenstein Jensen. The DNAs from *Mtb* positive cultured, which had been confirmed as *Mtb* by culture growth (MGIT Bactec 960 liquid media or Lowenstein Jensen solid media) and biochemical test, were analyzed further by spoligotyping.

Method

This cross sectional study has 404 DNAs of positive *Mtb* culture (MGIT Bactec 960 liquid media or Lowenstein Jensen solid media), which had been confirmed by biochemical tests. All specimens were centrifugation at 6.500g for 1 min and the supernatant was collected. Bacterial DNAs were extracted from 100 µl of the supernatant by using QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and had been done as manufactured ordered. The extracted DNA was eluted from QIAspin columns in a final volume of 200 µl AE buffer and stored at -70 °C until further use.

Spoligo Procedure

The DNAs of *Mtb* were prepared for 20 µl before added by 150 µl buffer 2xSSPE/0.1% SDS (Isogen Biosolution, BV) and put in mini blotter MN45 which were covered by spoligotyping membrane kit (IM9702, Isogen Biosolution, BV) with 43 probe of specific spacer of *Mtb* complex and were hybridized at 60°C for one hour. The hybrid product was detected using Enhanced Chemiluminescence system (Amersham Bioscience, UK) and then printed on ECL hyper film. Primers employed were DRa primer: 5'-GCT TTT GGG TCT GAC-3', which has biotin label at the end of 5'; and DRb primer: 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3' to identify the spoligo pattern. Furthermore, the spoligo patterns were converted into octal format within Words & Excel spreadsheets and compared to International Spoligotype-database (SpolDB4) to determine the specific of *Mtb* complex strain in the samples.

Results and Discussions:

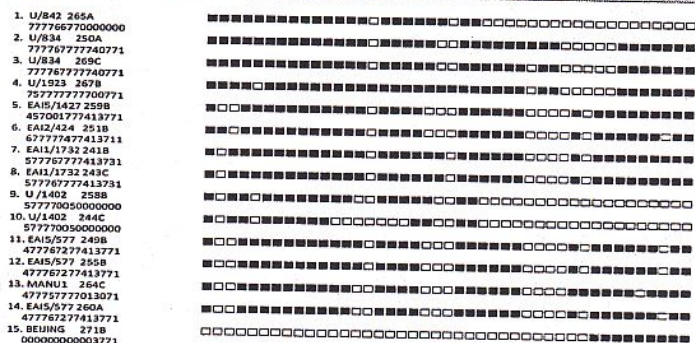


Figure 2. Examples of spoligo patterns with octal description of 15 DNAs of *Mtb* isolates collected from Serang city.

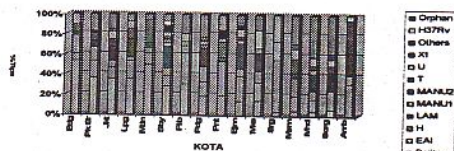


Figure 3. Spoligotype patterns of *Mtb* strain distributed at 16 urban areas in 16 provinces of Indonesia.

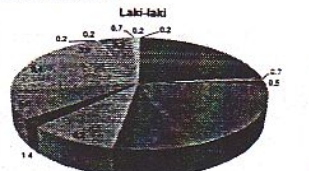


Figure 4. Genotype of *Mtb* in male population samples

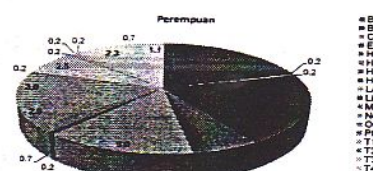


Figure 5. Genotype of *Mtb* in female population samples

Conclusions:

This study constituted a first attempt to describe the preliminary mapping of genetic structure population of the tubercle bacilli circulated in Indonesian TB patients, and Beijing family strain was the major cluster found in samples came from Java, Sumatera, and Kalimantan islands (30%), while the F family (EAI/East African-Indian type) of *Mtb* was the major cluster in samples came from East Islands of Indonesia (about 18%). This study results confirm there was differences between majority of *Mtb* family strain distributed at Java, Sumatera, and Kalimantan islands samples compared to strain at East Islands of Indonesia samples. The majority population of *Mtb* complex circulated in isolates from Java is Beijing strain family (I family) around 30,63 % (34 isolates). Similarly, the majority population of *Mtb* which circulated in isolates came from Sumatera and Kalimantan were also Beijing strain family (I family) around 28,42% (52 isolates), followed by *Mtb* of F family (EAI/East African-Indian type) around 21,85% (40 isolates) and *Mtb* of D family (LAM/Latin American-Mediterranean type) around 12,02% (22 isolates). The majority population of *Mtb* which circulated in isolate samples from East Islands of Indonesia is extremely different from those come from other islands. Mostly, there were *Mtb* of F family (EAI/East African-Indian type) around 18,18% (20 isolates) and *Mtb* of D family (LAM/Latin American-Mediterranean type) around 16,36% (18 isolates), and *Mtb* of C family (T type) around 9,73% (11 isolates). There were four *M. bovis* strain found in the isolate samples, which one pattern were found more than 20% in samples which meant that there were some opportunities for those isolates to determine as the specific *Mtb* from Indonesia by further confirmation with another tests (RFLP and MIRU-VNTR). Statistical analysis with *chi square* test using SPSS 15.0 showed a significant correlation between genotype and two demographic variables, i.e. gender ($p = 0.09$) and ethnicity ($p = 0.000$) and also geographic diversity ($p = 0.015$).

Acknowledgments

We gratefully thank to Director General of NIHRD - Indonesian MoH for his support and guidance. We are also thankful to Director and staff of the Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Science, Public Health Science Research Center for providing the laboratory facility. We would also like to thank the Dean and all staff at Department of Microbiology, Kobe University Graduate School of Medicine for their technical support. This work was supported in part by DIPA 2009 and DIPA 2010 at National Institute of Health Research and Development, Indonesia Ministry of Health.



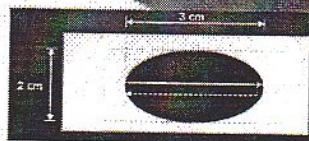
Center for Biomedical and Basic Technology of Health
National Institute of Health Research and Development
Ministry of Health, Republic of Indonesia

Kemampuan Laboratorium Riset Tuberkulosis

PEMERIKSAAN MIKROSKOPIS DAHAK (PEWARNAAN BAKTERI TAHAN ASAM)



Mikroskop binokuler, pemeriksaan slide dengan lensa okuler 10 x dan obyektif 100 x



Teknik pembacaan metode IUATLD - WHO



Basil Tahan Asam (BTA) berbentuk batang warna merah

KULTUR MEDIA PADAT DAN MEDIA CAIR



BACTEC MicroMGIT Reader

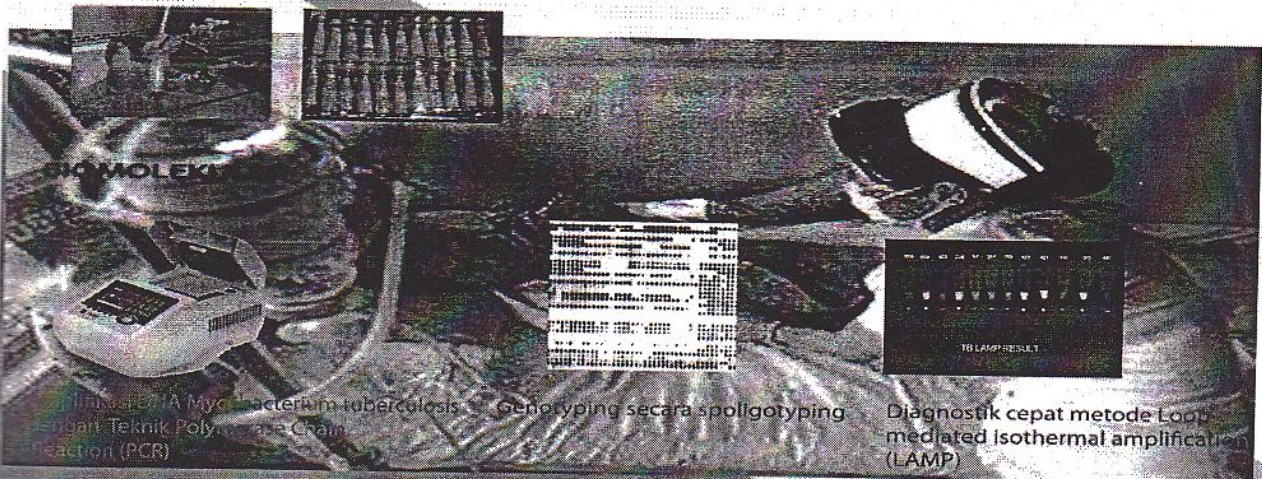


Media padat Lowenstein Jensen



Kultur positif

UJI RESISTENSI METODE PROPORSIONAL



Identifikasi Mycobacterium tuberculosis dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR)

Genotyping secara spollogotyping

Diagnostik cepat metode Loop mediated isothermal amplification (LAMP)



Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kementerian Kesehatan R.I

Diagnostik Molekular Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) untuk deteksi cepat Tuberculosis

Deteksi cepat Tuberculosis dengan menggunakan diagnostik molekular LAMP



SPESIMEN
sampel yang digunakan dalam
sampel dahak
(sewaktu, pagi, sewaktu)



ISOLASI
dilakukan dengan menggunakan
QIAamp DNA mini kit



AMPLIFIKASI (WATERBATH)
DNA isolat diampifikasi dengan
menggunakan
suhu tetap 62 C



DETEKSI
Hasil amplifikasi dilihat dengan
menggunakan
UV Light / gel doc



Pusat Biomedis dan Teknologi Kesehatan Dasar
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kementerian Kesehatan R.I

Genotyping Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* Menggunakan Teknik Spoligotyping

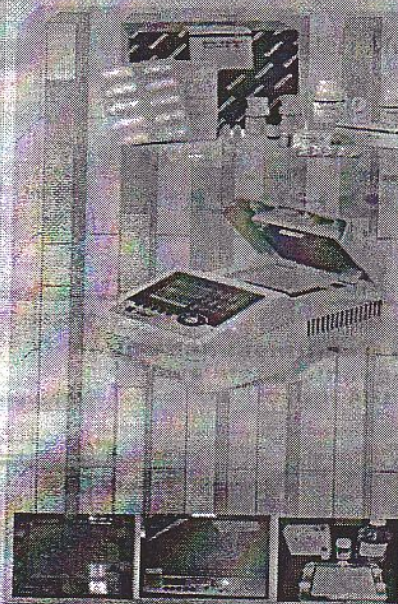
Melakukan genotipe dan identifikasi strain *Mycobacterium tuberculosis*

Genotipe dan identifikasi strain galur *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan 43 spacers spesifik di daerah Direct Repeat (DR) pada lokus kromosom Mtb H37Rv.



SPESIMEN

Sampel dalam bentuk sputum atau kultur bakteri



ISOLASI DAN PREPARASI AMPLIFIKASI

Isolasi DNA *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) dilakukan dengan teknik ekstraksi yang dilanjutkan dengan preparasi sediaan mix solution untuk spoligotyping

AMPLIFIKASI

Amplifikasi DNA Mtb dengan prinsip Polymerase Chain Reaction (PCR) menggunakan thermal cycler

HIBRIDISASI PRODUK PCR PADA MEMBRAN SPOLIGO

Hibridisasi dilakukan menggunakan shaker waterbath terhadap produk PCR yang diletakkan pada alat mini blotter MN45 yang telah dipasang membran spoligotyping berlabel 43 DNA spacer Mtb complex (IM9702, Isogen Biosolution, BV).

SISTEM DETEKSI

Deteksi hasil pada membran menggunakan larutan ECL (Amersham Bioscience, UK) yang dipaparkan pada hyper film.



Pusat Biomedis dan Teknologi Kesehatan Dasar
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kementerian Kesehatan R.I

Sekuensing DNA dan Desain Primer gyrB *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Desain primer berdasarkan hasil sekuensing fragmen gyrB DNA Mtb.

ISOLASI DNA



Isolasi DNA sampel dengan teknik ekstraksi, sentrifugasi dan dilanjutkan dengan preparasi DNA dalam reagen mix solution untuk PCR.

AMPLIFIKASI DNA



Amplifikasi DNA sampel dalam mix solution menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan alat thermal cycler

ELEKTROFORESIS



Produk PCR dielektroforesis pada gel agarose 2% dan hasil diamati menggunakan Gel.doc-XR dan dibandingkan dengan kontrol positif DNA Mtb H37Rv.



SEKUENSING



Amplifikasi sampel DNA positif secara PCR dan dilanjutkan dengan purifikasi produk PCR sebelum sampel disekuens pada plate sekuenser 3130xl Genetic analyzer.



Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kementerian Kesehatan R.I