



LAPORAN PENELITIAN

IDENTIFIKASI dan KARAKTERISASI STRAIN  
*Mycobacterium tuberculosis* dari ISOLAT DAHAK PASIEN  
TUBERKULOSIS PARU di INDONESIA  
(TAHAP III)

Vivi Lisdawati, *dkk.*



PUSLITBANG BIOMEDIS DAN FARMASI  
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN  
DEPARTEMEN KESEHATAN

2010

100

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan  
**PERPUSTAKAAN**  
Tanggal : 10 - 3 - 2013  
No. Induk : \_\_\_\_\_  
No. Klass : 65 A  
BMF

LAPORAN PENELITIAN

*IDENTIFIKASI dan KARAKTERISASI STRAIN*  
*Mycobacterium tuberculosis* dari ISOLAT DAHAK PASIEN  
TUBERKULOSIS PARU di INDONESIA  
(TAHAP III)

Vivi Lisdawati, *dkk.*



PUSLITBANG BIOMEDIS DAN FARMASI  
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN  
DEPARTEMEN KESEHATAN

2010



**KEMENTERIAN KESEHATAN RI**  
**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
**PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN FARMASI**

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560  
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 4244375, 4259860, 42444  
Fax (021) 4245386, 4244693

**KEPUTUSAN**

**KEPALA PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN FARMASI**  
NOMOR: HK.03.05/III/1223/2010

**TENTANG**

**PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2010**

**KEPALA PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN FARMASI**

**MENIMBANG**

- a. bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi (Puslitbang Biomedis dan Farmasi), perlu ditunjuk Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2010;
- b. bahwa berdasarkan pertimbangan huruf a tersebut diatas, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Puslitbang Biomedis dan Farmasi tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2010 sejumlah 7 (tujuh) penelitian;

**MENGINGAT**

- 1. Undang-Undang Nomor 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 1992 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3495);
- 2. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130);
- 3. Peraturan Pemerintah RI No. 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);
- 4. 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);
- 5. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- 6. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/Menkes/SK/X/1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- 7. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 1575/Menkes/Per/XI/2005 tentang Organisasi dan Tata Kerja Departemen Kesehatan sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 439/Menkes/Per/VI/2010 tentang Perubahan Kedua Atas Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 1575/Menkes/Per/XI/2005 tentang Organisasi dan Tata Kerja Departemen Kesehatan;
- 8. Peraturan Presiden Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara.

**MEMPERHATIKAN**

- 1. Perjanjian Pelaksanaan Penelitian pada Puslitbang Biomedis dan Farmasi, Nomor HK.03.05/III/11951/2010 sampai dengan Nomor: HK.03.05/III/1201 2010 Tanggal 1 Maret 2010.



**KEMENTERIAN KESEHATAN RI**  
**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
**PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN FARMASI**


Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560  
Kantor Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 4244375, 4259860, 424  
Fax (021) 4245386, 4244693

**M E M U T U S K A N**

- DIKENAL** :
- PERTAMA** : Membentuk Tim Pelaksana Penelitian bidang biomedis dan farmasi Tahun 2010 sebagaimana tercantum dalam lampiran keputusan ini;
- KEDUA** : Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2010 mempunyai tugas sebagai berikut:
- 1) Melaksanakan kegiatan Penelitian pada Puslitbang Biomedis dan Farmasi Tahun 2010, dengan susunan Tim seperti pada lampiran surat keputusan ini;
  - 2) Menyerahkan Laporan Kemajuan Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian dan Laporan Akhir Penelitian kepada Kepala Puslitbang Biomedis dan Farmasi.
- KETIGA** : Dalam melaksanakan tugasnya, Tim bertanggungjawab kepada Kepala Puslitbang Biomedis dan Farmasi serta wajib menyampaikan laporan akhir penelitian sebagai pertanggungjawaban kegiatan;
- KEEMPAT** : Biaya pelaksanaan kegiatan serta honor Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2010 dibebankan pada anggaran DIPA Puslitbang Biomedis Tahun 2010;
- KELIMA** : Keputusan ini mulai berlaku sejak bulan Maret 2010 sampai dengan Desember 2010 dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini akan diadakan perbaikan dan perubahan sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Jakarta  
Pada tanggal : 2 Maret 2010

Kepala,  
  
Drs. Qndri Dwi Sampurno, M.Si., Apt  
NIP. 19621119-198803 100 1

**Sehubungan Yth:**

1. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
2. Ketua Badan Pemeriksa Keuangan;
3. Kepala Badan Pengawasan Keuangan dan Pembangunan;
4. Sekretaris Jenderal Kemenkes RI;
5. Inspektur Jenderal Kemenkes RI;
6. Sekretaris Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
7. Kanwil Ditjen Anggaran Kemenkeu RI DKI Jakarta;
8. Kepala Biro Keuangan dan Perlengkapan Setjen Kemenkes RI;
9. Kepala Bagian Tata Usaha;
10. Kepala Bidang Program dan Kerja Sama;
11. Kepala Bidang Pelayanan Penelitian;
12. Bendaharawan Pengeluaran Puslitbang Biomedis dan Farmasi;
13. Masing-masing yang bersangkutan untuk dilaksanakan.



**KEMENTERIAN KESEHATAN RI.**  
**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
**PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN FARMASI**

Jalan Percetakan Negara 29 Jakarta 10560  
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon. (021) 4244375, 4259860  
Fax. (021) 4245386, 4244693

Lampiran I  
Keputusan Kepala Puslitbang Biomedis dan Farmasi  
Nomor : HK.03.05/III/1223/2010  
Tanggal : 2 Maret 2010

**SUSUNAN TIM PELAKSANAAN PENELITIAN TAHUN 2010**  
**IDENTIFIKASI KARAKTERISTIK STRAIN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DI INDONESIA**  
**BERDASARKAN ISOLAT DAHAK PASIEN TB.**

- |                               |   |  |
|-------------------------------|---|--|
| <b>Koordinator Penelitian</b> | : | 1. Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si, Apt  |
| <b>Ketua Pelaksana</b>        | : | 2. Dr. Vivi Lisdawati, M.Si, Apt   |
| <b>Peneliti</b>               | : | 3. Dr. Tjahjani Mirawati Sudiro<br>4. Drs. Syahrial Harun, MS<br>5. Retno Gitawati, MS, Apt<br>6. Dr. Andriansyah<br>7. Retno Kadarsih, M.Biomed<br>8. Dr. Lutfah Rif'ati, Sp.Opth<br>9. Dra. Sukmayati Alegantina<br>10. Dr. Nelly Puspandari<br>11. Dr. Tedjo Sasmono<br>12. Holly Arif Wibowo, S.Si |
| <b>Pembantu Peneliti</b>      | : | 13. Triyani Sukarso, AMAK<br>14. Melatiwati, AMAK<br>15. Syamsidar<br>16. Dorkas Maria LG<br>17. Kambang Sariaji, S.Si<br>18. Yudi Hartoyo<br>19. Kusniah, SAP<br>20. Kelik Muhammad Arifin  |
| <b>Pembantu Lapangan</b>      | : | 21. Yuli Setianingsih, S.Si<br>22. M Taufik<br>23. Nur Izzatun   |
| <b>Narasumber/Konsultan</b>   | : | 24. Prof. Pratiwi Sudarmono, Ph.D., Sp.MK (K)<br>25. Prof. Agus Sjahrurahman, Ph.D., Sp.MK<br>26. Dr.dr. Ida Parwati, PhD., Sp.PK(K)   |



Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si, Apt.  
NIP. 19621119198803 1 001

## Kata Pengantar

*Alhamdulillah Rabbil 'Aalamiin...*

Puji dan syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang dengan selesainya penyusunan Laporan Hasil Penelitian dengan judul: Identifikasi dan Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* dari Isolat Pasien Tuberkulosis Paru di Indonesia (Tahap III).

Laporan Hasil Penelitian ini disusun sebagai salah satu luaran penelitian yang bertujuan untuk memberi gambaran mengenai pengembangan diagnostik cepat TB Paru hasil karakterisasi bakteri *Mtb* yang bersirkulasi di Indonesia dengan harapan diagnostik dapat diterapkan pada pelayanan kesehatan formal yang ada.

Laporan ini masih jauh dari sempurna tetapi semoga hasil yang dituliskan ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak.

Jakarta, Desember 2010

Penulis  
**Dr. Vivi Lisdawati, MSi., Apt.**  
NIP. 196811181996032001

## RINGKASAN EKSEKUTIF

Telah dilakukan penelitian Identifikasi dan Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) dari Isolat Dahak Pasien Tuberkulosis Paru di Indonesia (Tahap III). Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari tahap I dan tahap II yang telah dilaksanakan pada tahun 2008-2009. Penelitian bertujuan untuk memperoleh data surveilans epidemiologi molekular *Mtb* yang sekaligus dapat digunakan untuk pengembangan diagnostik molekular. Pada tahap III ini penelitian mencakup tiga kegiatan, yaitu: pertama melengkapi data genotipe *Mtb* di Indonesia dengan teknik *spoligotyping* dan *Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat* (MIRU-VNTR) terhadap seluruh sampel penelitian TB yang telah dikumpulkan pada tahun 2008 dan dari data yang diperoleh kemudian disusun filogenetik *Mtb* di Indonesia; kedua adalah memperoleh data peta resistensi *Mtb* di Indonesia secara metode proporsional berikut optimasi primer gen *rpoB* untuk diagnostik molekular resistensi TB secara *PolymeraseChain Reaction* (PCR); dan yang ketiga untuk melengkapi data validasi uji diagnostik molekular *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP)-TB dan sekaligus memperoleh data optimasi primer LAMP-TB hasil karakterisasi *Mtb* di Indonesia.

Kegiatan pertama meliputi analisis data genotipe dari seluruh isolat DNA *Mtb* yang terdapat pada sampel pasien TB dari 16 ibu kota provinsi, yaitu Padang, Medan, Pekanbaru, Palembang, Tanjung Karang, Serang, Jakarta, Bandung, Surabaya, Banjarmasin, Pontianak, Mataram, Ambon, Makassar, Manado dan Sorong. Uji genotipe secara *spoligotyping* dilakukan menggunakan primer DRa: 5'-GCT TTT GGG TCT GAC GAC-3', berlabel biotin pada ujung 5'; dan primer DRb: 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3', membran *spoligotyping* kit (IM9702, Isogen Biosolution, BV) yang telah berisi 43 probe dari spacer spesifik galur *Mtb* complex berikut alat Mini blotter MN45. Uji genotipe dengan teknik MIRU-VNTR dilakukan menggunakan primer yang mengandung 21 probe spesifik untuk mengenali 41 lokus pada daerah *Direct Tandem Repeat* di genome *Mtb* H37Rv. Pola spoligo dan data genotipe MIRU-VNTR kemudian dibandingkan dengan data *the fourth international spoligotyping database* (SpolDB4).

Hasil genotipe yang diperoleh lalu dianalisis dan disusun konstruksi filogenetiknya menggunakan *software* Bionumeric v.6.

Kegiatan kedua mencakup identifikasi terhadap pola resistensi dari sampel *Mtb*, yang sudah teridentifikasi secara spoligotyping maupun MIRU-VNTR dan sekaligus berhasil tumbuh di media kultur, terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) lini I (streptomycin, INH, rifampicin dan ethambutol) menggunakan metode proporsional. Secara paralel dilakukan pula uji optimasi menggunakan primer dari gen *rpoB* untuk diagnostik molekular resistensi TB dengan metode PCR dan analisis hasil secara *reverse blot hybridization*.

Kegiatan ketiga meliputi: a. Uji optimasi diagnostik LAMP terhadap sejumlah lysat DNA *Mtb* dari sampel penelitian. Baku emas uji diagnostik adalah mikroskopis BTA dan hasil inokulasi bakteri di media cair Bactec MGIT 960 dan media padat Lowenstein Jensen (LJ). Ekstraksi DNA *Mtb* dilakukan terhadap sampel yang menunjukkan biakan positif, baik di media cair Bactec MGIT 960 maupun di media LJ. Uji diagnostik juga menggunakan analisis sekuensing sebagai konfirmasi akhir dimana uji dilakukan dengan primer *gyrB Mtb* H37Rv. Selain untuk konfirmasi akhir maka sekuensing juga bertujuan untuk mengidentifikasi sekuens *highly conserved* pada *gyrB Mtb* H37Rv; b. Mendesain primer LAMP-TB menggunakan sekuens hasil sekuensing DNA *Mtb* sampel yang merupakan sampel dengan tipe Beijing, sebagai tipe *Mtb* mayoritas di Indonesia; c. Optimasi primer LAMP-TB desain Indonesia dilakukan dengan memanfaatkan sarana dan prasarana laboratorium diagnostik di Indonesia.

Pada kegiatan pertama, hasil analisis genotipe pada seluruh sampel penelitian menunjukkan hanya 437 spesimen responden yang memenuhi kriteria inklusi. Dari sampel inklusi ini berhasil diperoleh 404 spesimen yang memberikan pola genotipe yang menggambarkan bahwa mayoritas galur *Mtb* di wilayah Jawa adalah galur tipe Beijing yang terdiri dari 34 sampel (30,6%), diikuti oleh famili F (tipe EAI/*East African-Indian*) sejumlah 22 sampel (19,8%) serta famili G dan H (tipe U/*Undefine*) sejumlah 13 sampel (11,7%). Mayoritas galur *Mtb* yang terdapat pada sampel dari wilayah Sumatera dan Kalimantan adalah famili I (tipe galur famili W-Beijing) sejumlah 52 sampel (28,4%), diikuti oleh famili F (tipe EAI) dengan 40 sampel (21,9%) dan famili D (tipe LAM/*Latin American-Mediterranean*) sejumlah 21 sampel (11,5%). Mayoritas galur *Mtb* yang terdapat pada sampel dari wilayah Timur Indonesia didominasi oleh famili F (tipe EAI) sejumlah 21 sampel (19,1%), kemudian famili D (tipe LAM) sejumlah 18 sampel

(16,4%) dan famili C (tipe T) dan famili G dan H (tipe U) yang masing-masing sejumlah 12 dan 11 sampel (10,9% dan 10%).

Pada kegiatan kedua, pola resistensi kuman *Mtb* dari 340 kultur bakteri yang berasal dari 16 ibu kota provinsi (77,8%) menunjukkan hanya 71% isolat suseptibel terhadap OAT lini I; sementara 29% isolat menunjukkan resistensi minimal terhadap 1 SIRE. Dari jumlah yang resisten minimal 1 SIRE maka sejumlah 16% menunjukkan pola *Multi Drug Resistance* (MDR) dan sisanya resisten terutama terhadap OAT jenis streptomycin dan INH dan Ethambutol. Uji optimasi primer resistensi menggunakan gen *rpoB* dan *katG* berhasil memperoleh kondisi dan suhu yang optimal untuk proses amplifikasi, dimana produk amplifikasi menunjukkan hasil bahwa primer TR8 dan primer TR9 akan mengamplifikasi gen *rpoB Mycobacterium spp*, baik yang termutasi maupun yang tidak. Selanjutnya, untuk mendeteksi mutasi gen *rpoB* maka dilakukan hibridisasi dot blot pada hasil amplifikasi. Membran nitroselulosa diberi label probe *rpoB531 wt*, *rpoB531mu*, *rpoB 533 wt*, *rpoB 526 wt*, *rpoB 516 wt* sesuai protocol Victor dan Helden.

Pada kegiatan ketiga, hasil uji optimasi primer gen *gyrB* (Iwamoto, *et.al.*, 2003) menunjukkan sensitifitas uji terhadap 122 lysat DNA pasien TB dengan BTA positif atau *positivity rate* adalah 94,2% (114/121). Hasil sekuensing lysat DNA sampel menunjukkan terdapat fragmen sekuens *highly conserved* pada daerah nt 1098-1394 gen *gyrB* di seluruh *Mtb* sampel; dan dari daerah sekuens kemudian didesain primer yang dipilih dari sampel *Mtb* tipe Beijing di daerah nt 1097-1298 *gyrB Mtb H37Rv*. Sampel berasal dari wilayah Jakarta dengan alasan merupakan wilayah dengan prevalensi nasional TB nomor lima (Riskesmas, 2010) serta tingkat kepadatan dan mobilitas paling tinggi di Indonesia; sementara protokol LAMP TB kemudian disusun menggunakan primer hasil desain penelitian dengan instrumen amplifikasi adalah penangas air serta sistem deteksi lampu UV.

Berdasarkan kegiatan penelitian 1, 2 dan 3 maka dapat disimpulkan hasil sebagai berikut: (i) pola genotipe *Mtb* di Indonesia menunjukkan keragaman yang sangat tinggi dimana galur *Mtb* tipe Beijing merupakan galur *Mtb* yang mayoritas terdapat pada isolat sampel dari bagian Barat Indonesia (wilayah Jawa, Sumatera dan Kalimantan) sementara galur *Mtb* tipe EAI (*East African-Indian*) dan LAM (*Latin American-Mediterranean*) merupakan galur *Mtb* yang mayoritas terdapat pada isolat sampel dari bagian Timur

Indonesia (wilayah Nusa Tenggara Barat, Sulawesi, Ambon dan Papua); (ii) Pola resistensi *Mtb* di sampel penelitian menunjukkan bahwa lebih kurang 70% sampel *Mtb* masih suseptibel terhadap OAT lini I sementara dari persentase sisa menunjukkan 9,5% *Mtb* dalam sampel menunjukkan tipe MDR (resisten INH dan Rifampicin). Uji molekular untuk resistensi menunjukkan bahwa proses amplifikasi menggunakan primer *rpoB* (TR-8 dan TR-9) serta deteksi secara hibridisasi dot blot menggunakan probe yang telah ditentukan dapat dilakukan pada seluruh sampel *Mtb* yang ada; (iii) Gen *gyrB* memiliki sekuens *highly conserved* pada seluruh tipe *Mtb* yang terdapat dalam sampel penelitian dan berada di daerah nt 1098-1394 *gyrB Mtb H37Rv*, sementara primer LAMP Indonesia diperoleh di daerah nt 1097-1298 *gyrB Mtb H37Rv* dengan sensitifitas yang lebih tinggi dibanding primer komersial yang sudah ada; (iv) LAMP terbukti merupakan metode diagnostik molekular yang dapat dikerjakan pada laboratorium kesehatan di Indonesia karena teknik kerjanya sederhana, hasil dapat diperoleh dalam waktu singkat serta mudah diinterpretasi.

## ABSTRAK

Identifikasi dan karakterisasi *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) di Indonesia merupakan salah satu upaya untuk mengoptimalkan sensitivitas dan spesifitas diagnostik molekular TB di Indonesia. Uji *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) dan deteksi mutasi di gen *rpoB* termasuk metode diagnostik molekular yang telah direkomendasikan WHO sebagai alternatif diagnostik TB konvensional. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan primer diagnostik LAMP dari gen *gyrB* *Mtb* H37Rv dan primer diagnostik resistensi dari gen *rpoB* *Mtb* spp. dengan menggunakan data epidemiologi molekular *Mtb* di Indonesia. Penelitian merupakan penelitian laboratorium eksperimental dengan desain potong lintang. Empat ratus tiga puluh tujuh DNA *Mtb* yang berasal dari spesimen dahak pasien suspek TB dengan BTA positif dari 16 ibu kota provinsi di Indonesia, diuji *spoligotyping* di laboratorium Bakteriologi dan Biomolekular, Pusat 1-Balitbangkes dan MIRU-VNTR di laboratorium TB Lembaga Biologi Molekuler Eijkman. Hasil kemudian dibandingkan dengan *the fourth international spoligotyping database* (SpolDB4). Kontrol mutu eksternal dilakukan di Departemen Patologi Klinik, RSHS-Bandung. Dendrogram *Mtb* disusun di Lembaga Biologi Molekular Eijkman (BioNumerics v6.0). Uji resistensi dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi, Pusat 1-Balitbangkes dengan kontrol mutu di Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK)-Surabaya, sementara pengembangan primer diagnostik resistensi dari gen *rpoB* *Mycobacteria* spp. dilakukan di Laboratorium Biomolekular, RSHS-Bandung. Uji optimasi LAMP dan sekuensing untuk mengidentifikasi daerah *highly conserved* pada *gyrB* *Mtb* sampel dan desain primer LAMP (Primer Explorer V3.EIKEN-Genome site) dilakukan di Laboratorium Biomolekular, Pusat 1 Balitbangkes, yang dilanjutkan dengan optimasi primer LAMP Indonesia pada serial larutan DNA *Mtb* H37Rv dan DNA sampel *Mtb*. Studi epidemiologi molekular menunjukkan bahwa tipe galur Beijing merupakan mayoritas tipe *Mtb* di wilayah Jawa, Sumatera dan Kalimantan sementara tipe *Mtb* famili EAI dan LAM mayoritas di wilayah Timur Indonesia. Pola resistensi *Mtb* menunjukkan lebih kurang 70% kuman masih suseptibel dengan Obat Anti Tuberkulosis (OAT) lini I dimana primer TR8 dan primer TR9 dari gen *rpoB* *Mycobacterium* spp. dapat mengamplifikasi *Mtb* sampel baik yang mutasi maupun yang tidak serta berhasil diperoleh protokol kerja teroptimasi. Terdapat sekuens *highly conserved* di daerah nt 1098-1394 gen *gyrB* *Mtb* dalam sampel penelitian dengan prototipe primer LAMP Indonesia yang berasal dari salah satu sekuens DNA sampel berada di daerah nt 1097-1298 *gyrB* *Mtb*. Uji optimasi menunjukkan primer Indonesia mampu mengamplifikasi hingga [100] fg/ $\mu$ l DNA *Mtb* H37Rv dan sensitivitas uji pada sampel pasien TB dengan BTA positif (*positivity rate*) adalah 97,6% (82/84). Hasil membuktikan tingginya diversitas genotipe *Mtb* di Indonesia dengan mayoritas galur *Mtb* berbeda di Sumatera, Kalimantan dan Jawa dibanding di wilayah Timur Indonesia. Adanya pola resistensi MDR yang cukup tinggi terhadap *Mtb* yang bersirkulasi meski sebagian besar masih sseptibel serta berhasil dikembangkan Primer LAMP desain Indonesia yang terbukti memiliki sensitivitas uji lebih tinggi dibanding primer set komersial dan mampu mengenali seluruh genotipe *Mtb* yang ada.

**Kata kunci:** *Mycobacterium tuberculosis*, *spoligotyping*, dendrogram, filogenetik, filogeografik, *Multi Drug Resistance*, MDR, resistensi, *Loop-mediated isothermal amplification*, LAMP, *gyrB*, *rpoB*.

## DAFTAR SUSUNAN TIM PENELITI

Koordinator Penelitian : Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si, Apt

Ketua Pelaksana : Dra. Vivi Lisdawati, M.Si, Apt

### Konsultan :

1. Prof. Pratiwi Sudarmono, Ph.D, Sp.MK (K)
2. Prof. Agus Syahrurahman, Ph.D, Sp.MK (K)
3. Dr.dr. Ida Parwati, Sp.PK(K)

### Peneliti :

4. Dra. Retno Gitawati, MS, Apt
5. Dra. Sukmayati Alegantina
6. dr. Tjahjani Mirawati, Sudiro, PhD
7. dr. Andriyansjah, Ph.D
8. Dr. Tedjo Sasmono, Ph.D
9. dr. Retno Kadarsih, M.Biomed
10. dr. Nelly Puspandari
11. dr. Lutfah Rifati, Sp.Opth
12. Holly Arif Wibowo, S.Si
13. Drs. Syahrial Harun, MSc

### Pembantu Peneliti :

14. Tryani Sukarso, AMAK
15. Melatiwati, AMAK
16. Kambang Sariaji, AMAK
17. Dorkas
18. Syamsidar
19. Yudi Hartoyo
20. Kusniah, SAP
21. Kelik Muhammad Arifin, S.Sos

### Pembantu Lapangan :

22. Yuli Setianingsih, S.Si
23. M Taufik
24. Nur Izzatun

## DAFTAR ISI

	SK PENELITIAN	ii
	KATA PENGANTAR	iii
	RINGKASAN EKSEKUTIF	1
	ABSTRAK	5
	DAFTAR SUSUNAN TIM PENELITI	6
	DAFTAR ISI	7
	DAFTAR GAMBAR & TABEL	8
	DAFTAR SINGKATAN	9
<b>BAB I</b>	PENDAHULUAN	10
	1. Latar Belakang	10
	2. Rumusan Masalah	15
	3. Hipotesis Penelitian	16
	4. Tujuan	16
	5. Manfaat Penelitian	17
<b>BAB II</b>	METODOLOGI PENELITIAN	18
	1. Kerangka konsep penelitian	18
	2. Alur penelitian	19
	3. Tempat dan Waktu Pelaksanaan	20
	4. Desain Penelitian	20
	5. Populasi dan Sampel	21
	6. Variabel	22
	7. Cara pengumpulan data	22
	8. Bahan dan Prosedur Kerja	23
	9. Analisis Data	32
	10. Definisi Operasional	32
	11. Pertimbangan Etik	32
<b>BAB III</b>	HASIL DAN DISKUSI	33
	1. Hasil kultur <i>Mtb</i> sampel pada media cair MGIT Bactec 960 dan media padat Lowenstein Jenessens	34
	2. Hasil uji biokimia	37
	3. Hasil uji <i>spoligotyping</i>	38
	4. Hasil uji resistensi	49
	5. Hasil uji sekuensing	51
	6. Hasil uji LAMP ( <i>Loop-mediated Isothermal Amplification</i> )	58
<b>BAB IV</b>	KESIMPULAN & SARAN	67
<b>BABV</b>	DAFTAR PUSTAKA	70
	LAMPIRAN	71

## DAFTAR GAMBAR DAN TABEL

### GAMBAR

- Gambar 2.1 Kerangka Konsep Penelitian  
Gambar 2.2 Alur Penelitian  
Gambar 3.1 Contoh gambar positif kultur MGIT Bactec 960  
Gambar 3.2 Contoh gambar negatif kultur MGIT Bactec 960  
Gambar 3.3 Contoh sampel positif kultur Lowenstein Jensen  
Gambar 3.4 Contoh sampel positif MOTT  
Gambar 3.5 Hasil Uji biokimia bakteri di media LJ dan MGIT Bactec 960  
Gambar 3.6 Contoh hasil sampel dengan positif *Mtb* secara uji biokimia  
Gambar 3.7 Total jumlah pola spoligo per kota dari 16 lokasi penelitian  
Gambar 3.8 Total pola spoligo sampel dari 4 kota di wilayah Jawa  
Gambar 3.9 Persentase pola spoligo tipe Beijing dari 16 lokasi penelitian  
Gambar 3.10 Dendrogram pola spoligotipe *Mtb* di empat kota di wilayah Jawa  
Gambar 3.11 Dendrogram *Mtb* di wilayah Sumatera dan Kalimantan  
Gambar 3.12 Dendrogram *Mtb* di wilayah Timur Indonesia  
Gambar 3.13 Contoh uji PNB pada metode DST proporsional  
Gambar 3.14 Hasil elektroforesis produk PCR DNA *Mtb* sampel  
Gambar 3.15 Hasil elektroforesis produk PCR dengan primer *gyrB* Indo-A  
Gambar 3.16 Daerah *highly conserved gyrB Mtb* di wilayah Jawa  
Gambar 3.17 Daerah *highly conserved gyrB* di wilayah Jawa, Sumatera – Kalimantan dan Kawasan Timur Indonesia  
Gambar 3.18 Hasil visualisasi LAMP-TB dengan primer *gyrB* Iwamoto  
Gambar 3.19 Hasil visualisasi LAMP-TB dengan primer *gyrB* Indo-C

### TABEL

- Tabel 3.1 Total responden penelitian dan jumlah sampel inklusi  
Tabel 3.2 Hasil inokulasi bakteri *Mtb* dari sampel penelitian pada media MGIT Bactec 960 dan media Lowenstein Jensen (LJ)  
Tabel 3.3 Struktur bangun hubungan antara pola genotipe SPOLDB4 dengan famili *Mtb* complex dari 404 DNA *Mtb* dalam sampel penelitian  
Tabel 3.4 Keragaman genotipe *Mtb* kota di wilayah Jawa  
Tabel 3.5 Keragaman genotipe *Mtb* di wilayah Sumatera – Kalimantan  
Tabel 3.6 Keragaman genotipe *Mtb* kota di wilayah Timur Indonesia  
Tabel 3.7 Hasil uji suseptibilitas *Mtb* terhadap OAT Lini I (SIRE)  
Tabel 3.8 Hasil uji LAMP-TB menggunakan primer *gyrB* (Iwamoto, *et.al.*) terhadap sampel pasien TB di Indonesia  
Tabel 3.9 Sensitifitas primer *gyrB* Iwamoto terhadap pertumbuhan kultur  
Tabel 3.10 Hasil konfirmasi LAMP-TB primer Iwamoto dengan PCR  
Tabel 3.11 Nilai sensitifitas primer *gyrB* Iwamoto pada sampel pasien TB Indonesia  
Tabel 3.12 Nilai sensitifitas primer *gyrB* Indo-C pada larutan DNA *Mtb* H37Rv  
Tabel 3.13 Hasil uji LAMP-TB menggunakan primer *gyrB* Indo-C terhadap sampel pasien TB di Indonesia  
Tabel 3.14 Nilai sensitifitas primer *gyrB* Indo-C pada sampel pasien TB Indonesia

## DAFTAR SINGKATAN

APD	: Alat Pelindung Diri
BLAST	: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
BSL2	: <i>Biosafety Laboratory Level -2</i>
BSL3	: <i>Biosafety Laboratory Level -3</i>
BTA	: Bakteri Tahan Asam
CAS	: <i>Cental Asia Strain</i>
CDR	: <i>Case Detection Rate</i>
DNA/RNA	: <i>Deoxy nucleic acid/ Ribo nucleic acid</i>
DOTS	: <i>Directly Observed Short Course Treatment</i>
EAI	: <i>East African-Indian</i>
FIP	: <i>Forward Inner Primer</i>
<i>gyrB</i>	: <i>gyraseB</i>
H	: <i>Haarlem</i>
ISTC	: <i>International Standard for Tuberculosis Care</i>
IGRAs	: <i>Interferon Gamma Release Assays</i>
IUATLD	: <i>International Union Against Tuberculosis and Lung Disease</i>
LAM	: <i>Latin American-Mediterranean</i>
LAMP	: <i>Loop Mediated Isothermal Amplification</i>
LJ	: Lowenstein Jensen
Loop B	: <i>stem-loops B</i>
Loop-F	: <i>stem-loops F</i>
MDR	: <i>Multi Drug Resistance</i>
MGIT	: <i>Mycobacterial growth indicator tubes</i>
MIRU-VNTR	: <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat</i>
MOTT	: <i>Mycobacterium Other Than Tuberculosis</i>
<i>Mtb</i>	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAA	: <i>Nucleic Acid Amplification</i>
NTM	: <i>Non Tuberculosis Mycobacterium</i>
OAT	: Obat Anti Tuberkulosis
PCR	: <i>PolymeraseChain Reaction</i>
PFGE	: <i>Pulsed-field electrophoresis</i>
PLF	: <i>polymerase large fragment</i>
PPTI	: Perkumpulan Pemberantasan Tuberkulosis Indonesia
PPV	: <i>positive predictive value</i>
PRM	: Puskesmas Rujukan Mikroskopik
RFLP	: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SpolDB4	: <i>the fourth international spoligotyping database</i>
<i>spoligotyping</i>	: <i>spacer-oligo-typing</i>
<i>sps</i>	: <i>sewaktu, pagi, sewaktu</i>
TB	: Tuberkulosis Paru
TMA	: <i>Transcription Mediated Amplification</i>
U	: <i>Undefine</i>
XDR	: <i>Extensively Drug Resistance</i>
ZN	: Ziehl Neelsen

## BAB I PENDAHULUAN

### I. LATAR BELAKANG

Tuberkulosis Paru (TB) adalah penyakit infeksi kronis menular dan termasuk ke dalam *re-emerging diseases*. Indonesia saat ini menempati urutan kelima dari 22 negara yang dikategorikan *high-burden countries* TB dari sebelumnya di urutan ketiga. Meskipun angka prevalensi menurun tetapi angka deteksi kasus di Indonesia disebutkan masih perlu ditingkatkan.<sup>1,2</sup> Laporan *WHO Global Tuberculosis Control Report 2009* memuliskan estimasi kasus TB baru di dunia sebesar 528,063 kasus dimana *incidence rate* adalah 102 kasus sputum baru dengan smear-positive (SS+) per 100,000 populasi, yang diambil dari data tahun 2007. Sementara hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Badan Litbangkes Depkes RI tahun 2007, yang hanya menggambarkan angka Prevalensi Nasional Tuberkulosis Paru (berdasarkan diagnosis tenaga kesehatan dan keluhan responden), adalah sebesar 0,99%.<sup>3</sup> Survei prevalensi TB yang lebih luas di Indonesia pada tahun 2004 menggambarkan adanya perbedaan bermakna antara prevalensi TB di 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.<sup>4</sup> Sejumlah penelitian menunjukkan kemungkinan adanya korelasi antara genotipe bakteri yang berbeda antara wilayah Timur dan wilayah Barat maupun Tengah Indonesia terkait angka prevalensi yang ada.

Penyakit TB adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Secara umum, *Mycobacterium* yang saat ini menunjukkan kemiripan dari segi spesimen klinik adalah kelompok *Mtb* complex (compl.), yang terdiri dari galur *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG), *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.*, dan *M. Pinnipedii*.<sup>5,6</sup> Karakteristik dari setiap spesies unik dan terdapat beberapa yang memiliki resistensi alamiah terhadap sejumlah OAT. Contohnya adalah *M. africanum* yang berdasarkan analisis karakteristik biokimia spesies subtype I lebih mendekati *M. bovis*, sedangkan subtype II lebih mendekati *M. tuberculosis*. Diketahui bahwa *M. bovis* subsp. *bovis*

resisten terhadap pyrazinamide sementara *M. bovis* subsp. *caprae* masih suseptibel terhadap pyrazinamide.<sup>7,8</sup> Selain kemiripan dalam bentuk spesimen klinik dengan *Mtb* compl., *Mtb* sendiri terdiri atas berbagai sub tipe yang pada sejumlah literature disebutkan dipengaruhi oleh faktor geografis wilayah.<sup>9</sup>

Salah satu permasalahan dari sekian banyak permasalahan TB yang ada adalah keterbatasan dari diagnostik konvensional. Untuk uji apusan BTA maka tingginya keragaman tingkat kemampuan teknisi laboratorium dalam melakukan preparasi dan deteksi hasil menyebabkan sensitifitas uji berkisar 67-87%. Selain itu disebutkan pula bahwa diperlukan sekitar  $10^4$  bakteri per ml dahak agar uji dapat menunjukkan hasil positif. Epidemio HIV/AIDS juga mengurangi sensitifitas pemeriksaan mikroskopik BTA dimana hasil negatif palsu sering ditemukan. Dengan pertumbuhan lebih dari 20% populasi terinfeksi oleh HIV di dunia maka kesalahan interpretasi mikroskopik BTA akan menjadi dampak utama masalah TB di tahun-tahun mendatang.<sup>10,11</sup> Sementara itu, untuk uji kultur maka keterbatasan mencakup lamanya waktu koloni tumbuh yang berkisar 2-8 minggu sampai dengan tingginya tingkat keamanan bagi sarana dan prasarana laboratorium untuk pengerjaan kultur yang menyebabkan hanya sejumlah laboratorium kesehatan yang boleh melakukan uji kultur di Indonesia.<sup>12</sup>

Sehubungan intervensi penelitian yang dapat dilakukan terhadap target Program Pengendalian TB Nasional, terutama yang mencakup target peningkatan angka penemuan kasus TB menjadi 50% dari angka Nasional yang sudah ada, maka penelitian TB dapat dikembangkan ke arah uji diagnostik molekular sebagai salah satu upaya mengatasi keterbatasan diagnostik konvensional. Prinsip untuk meningkatkan sensitifitas dan spesifisitas suatu uji diagnostik molekular adalah pemilihan primer spesifik yang berasal dari gen *highly conserved* pada genome spesies. Terutama untuk spesies yang memiliki keragaman tinggi dan bersifat filogeografik (peta kekerabatan terkait dengan faktor geografis).<sup>13</sup> Terkait diagnostik molekular TB maka sangat penting untuk mengetahui karakteristik kuman *Mtb* yang bersirkulasi di Indonesia sehingga optimalisasi diagnostik molekular yang akan dikembangkan dapat menjadi maksimal.

Metode penelitian genotipe yang paling efisien saat ini adalah metode *spoligotyping* karena selain dapat mengidentifikasi genotipe bakteri juga sekaligus dapat mengetahui galur *Mtb* yang ada dalam isolat sampel. Uji *spoligotyping* dilanjutkan dengan uji

*Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing System* (MIRU-VNTR) untuk menentukan pola dendrogram dan menyusun pohon filogenetik bakteri.<sup>14,15</sup> Karakterisasi dari *Mtb* yang ada kemudian dapat dilanjutkan dengan mendeteksi pola resistensi kuman. Meski laju MDR-TB di Indonesia masih relatif rendah (kurang dari 3%), tetapi jumlah keseluruhan dari kasus MDR TB dibandingkan besarnya jumlah penderita TB di Indonesia cukup mengkhawatirkan. Laporan WHO menyebutkan estimasi kasus sebesar 6,427 pasien baru dengan SS+ MDR-TB pada tahun 2007, atau sekitar 2 persen dari keseluruhan kasus baru. Dan juga ditambahkan bahwa 20 persen kasus MDR-TB diprediksi akan teridentifikasi pada kasus terapi ulang (*re-treated cases*).<sup>16</sup> Untuk uji resistensi, WHO menetapkan baku emas yang berlaku adalah metode proporsional untuk media padat dan metode fluoresensi MGIT Bactec 960 untuk media cair.<sup>17</sup> Dari data pola resistensi *Mtb* di Indonesia maka dapat pula dikembangkan diagnostik molekular resistensi menggunakan primer komersial yang sudah ada untuk disusun suatu protokol kerja yang optimal.

Sementara itu, diagnostik molekular untuk skrining TB yang menjadi rekomendasi WHO sebagai alternatif diagnostik konvensional di lapangan adalah metode *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). Metode ini termasuk metode diagnostik TB cara langsung terhadap asam nukleat *Mtb* dengan sensitifitas dan spesifisitas yang relatif di atas 95%. Kelebihan lain adalah metode ini melakukan amplifikasi asam nukleat pada suhu tetap tanpa memerlukan alat *thermocycler* yang mahal yang umum diperlukan untuk amplifikasi asam nukleat konvensional. Oleh karena itu merupakan kandidat potensial untuk dikembangkan menjadi diagnostik molekular TB di wilayah dengan sumber daya terbatas.<sup>18,19</sup>

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas maka kemudian dilakukan penelitian ***Identifikasi dan Karakterisasi Strain Mycobacterium tuberculosis dari Isolat Dahak Pasien Tuberkulosis Paru di Indonesia*** (Tahap III). Penelitian ini merupakan penelitian bertahap untuk penyakit TB yang telah mulai dilaksanakan dari tahun 2008. Penelitian diujikan pada isolat dahak pasien TB yang dikumpulkan dari 16 ibu kota provinsi di Indonesia (Padang, Pekanbaru, 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 *Cade Detection Rate* (CDR) per provinsi dari Ditjen P2MPL Depkes RI tahun 2006 yang kemudian dikompilasi dengan pembagian wilayah di Indonesia berdasarkan garis *Weber* dan *Wallace* (Wilayah Indonesia Barat, Wilayah Indonesia Tengah dan Wilayah Indonesia Timur).

Hasil penelitian tahap I pada tahun 2008 adalah:

- a. Inventaris 437 isolat DNA *Mtb* (sampel inklusi) yang berasal dari 462 spesimen dahak pasien TB dari 16 ibu kota provinsi di Indonesia, yaitu Padang, Pekanbaru, Lampung, Palembang, Medan, Banten, Jakarta, Bandung, Surabaya, Mataram, Banjarmasin, Makassar, Pontianak, Manado, Ambon dan Sorong.
- b. Pola spoligotipe kuman *Mtb* dari 268 isolat inventaris yang berasal dari 10 ibu kota provinsi (Lampung, Palembang, Banten, Jakarta, Bandung, Surabaya, Banjarmasin, Makassar, Pontianak dan Ambon), yang menunjukkan famili EAI sebanyak 25% (22 strain); strain *genotype* W-Beijing 23,88%; famili LAM 14,18% (11 strain); famili U 10,48% (14 strain); famili T 9,32% (12 strain); famili H 7,5% (12 strain); dan famili MANU, X serta famili CAS masing-masing kurang dari 5%. Terdapat pula 16 isolat dengan pola *orphan*. Uji *spoligotyping* baru dapat dilakukan terhadap isolat dahak dari 10 kota disesuaikan kapasitas laboratorium dan keterbatasan waktu penelitian.
- c. Uji PCR teroptimasi untuk amplifikasi asam nukleat isolat sampel dengan hasil elektroforesis pada membran gel agarose 2% menggunakan kontrol positif kuman *Mtb* H37Rv; yang siap diaplikasikan pada uji sekuensing.

Hasil penelitian tahap II pada tahun 2009 adalah:

- a. Data analisis terhadap 385 isolat DNA *Mtb* dari total 437 inventaris isolat spesimen yang telah dikumpulkan pada tahun 2008, menunjukkan terdapat 129 galur bakteri *Mtb* dan sejumlah 16 isolat yang tidak berhasil menunjukkan pola hibridisasi pada membran spoligo. Seluruh isolat yang diperoleh dapat dikembangkan menjadi *site* vaksin ataupun *cell line* (*in vitro new drug*) untuk berbagai aplikasi penelitian TB.
- b. Pola spoligo *Mtb* dari 385 isolat dahak pasien yang diidentifikasi secara *spoligotyping* menunjukkan berbagai galur *Mtb* yang ada dalam sampel dari seluruh lokasi penelitian, yaitu: galur famili Beijing 22,85% (2 galur); famili EAI/(family F) 22,34% (39 galur); famili LAM/ (family D) 11,69% (17 galur); famili T 9,09% (18 galur); famili U 8,31% (20 galur); famili H 7,79% (21 galur); famili MANU 2,34% (5 galu);

family X 1,04% (4 galur); famili CAS 0,78% (3 galur); dan 1 isolat tipe *Mtb* H37Rv dan sebanyak 2 isolat dari speies *M.bovis*; terdapat pula 46 isolat tipe *orphan* (belum tercantum dalam *database spoligotyping* SPOLDB4).

- c. Pola resistensi kuman *Mtb* dari 226 kultur bakteri yang berhasil tumbuh yang berasal dari isolat spesimen dahak di 10 ibu kota provinsi menunjukkan 89% isolat masih suseptibel terhadap OAT lini I dan hanya 5,1% isolat yang resisten, terutama terhadap OAT jenis streptomycin dan INH. Efisiensi dan efektivitas hasil uji resistensi dibandingkan antara metode proporsional dan metode MGIT Bactec 960 SIRE adalah sama. Uji resistensi baru dapat dilakukan terhadap isolat dahak dari 10 kota karena disesuaikan dengan kapasitas laboratorium dan keterbatasan waktu penelitian. Data uji suseptibilitas *Mtb* secara molekular juga dilakukan berkolaborasi dengan Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung (Bagian Patologi Klinik).

Berdasarkan hasil penelitian tahap I dan II di atas dan guna menuntaskan seluruh permasalahan penelitian maka kemudian dilakukan penelitian IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI STRAIN *Mycobacterium tuberculosis* DARI ISOLAT DAHAK PASIEN TUBERKULOSIS PARU DI INDONESIA (Tahap III).

Penelitian tahap III dilaksanakan tahun 2010 meliputi:

- a. Pengayaan sub kultur dan stok galur bakteri dari 437 isolat spesimen pasien TB dari 16 ibu kota provinsi di Indonesia (tahap I-II), yang merupakan material biologik berharga untuk berbagai penelitian TB.
- b. Analisis konfirmasi hasil genotipe dari 385 isolat DNA *Mtb* yang telah diuji *spoligotyping* (hasil tahap I & II) sekaligus melengkapi uji genotipe terhadap 53 isolat DNA *Mtb* menggunakan metode *spoligotyping* & MIRU-VNTR, guna memperoleh data dendogram *Mtb* dalam sampel penelitian yang mewakili peta filogenetik *Mtb* di Indonesia.
- c. Penuntasan pemetaan awal pola resistensi kuman *Mtb* di Indonesia terhadap seluruh kultur yang berasal dari isolat dahak pasien TB di 16 lokasi penelitian (lanjutan tahap I & II) menggunakan metode proporsional.
- d. Optimasi primer set dari data sekuens DNA *Mtb* isolat spesimen dahak yang diperoleh menggunakan *software* Primer Explorer V3 *software* (Eiken Chemical;

<https://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>) untuk mendapatkan nilai sensitifitas primer LAMP spesifik Indonesia. Hasil optimasi kemudian disusun menjadi protokol kerja LAMP-TB sesuai prasarana dan sarana laboratorium diagnostik yang ada di Indonesia.

## II. RUMUSAN MASALAH

Permasalahan pada penelitian berdasarkan latar belakang tersebut adalah:

- a. Apakah seluruh genotipe bakteri *Mtb* dalam sampel yang dikumpulkan memiliki diversitas tinggi dengan sebaran antar tipe dipengaruhi oleh faktor geografis?
- b. Apakah berdasarkan genotipe *Mtb* dalam sampel spesimen pasien TB di 16 kota provinsi dapat disusun dendrogram atau filogenetik *Mtb* yang mewakili Indonesia?
- c. Apakah dapat disusun pola resistensi *Mtb* menggunakan teknik proporsional terhadap seluruh spesimen sampel yang akan menggambarkan peta resistensi *Mtb* di Indonesia?
- d. Apakah sekuens nukleotida primer diagnostik resistensi TR-8 dan TR-9 dari gen *rpoB* *highly conserved* terhadap *Mtb* pada sampel pasien TB di Indonesia?
- e. Apakah dapat dilakukan optimasi diagnostik LAMP terhadap sampel dahak pasien TB menggunakan sarana dan prasarana laboratorium diagnostik di Indonesia?
- f. Apakah sekuens nukleotida primer diagnostik LAMP-TB yang telah ada *highly conserved* terhadap *Mtb* pada sampel pasien TB di Indonesia?
- g. Apakah berdasarkan data karakteristik *Mtb* yang diperoleh dapat didesain primer diagnostik LAMP yang baru dengan sensitifitas dan spesifisitas lebih tinggi dibanding uji diagnostik konvensional?
- h. Apakah dapat disusun protokol LAMP-TB menggunakan prototipe primer Indonesia yang aplikatif dan sesuai sarana dan prasarana laboratorium diagnostik di Indonesia?

## 3. HIPOTESIS PENELITIAN

- a. Genotipe bakteri *Mtb* di Indonesia yang diwakili sampel penelitian memiliki keragaman tinggi dan dapat diidentifikasi secara *spoligotyping* – MIRU – VNTR.
- b. Berdasarkan data genotipe dapat disusun dendrogram atau filogenetik *Mtb* di Indonesia dengan *software* Bionumeric v.6.0;

- c. Pola resistensi *Mtb* menggunakan teknik proporsional terhadap seluruh spesimen sampel yang berasal dari spesimen pasien TB di 16 ibu kota provinsi di Indonesia, dapat menggambarkan peta resistensi *Mtb* di Indonesia dengan membandingkan hasil terhadap penelitian resistensi terdahulu;
- d. Sekuens nukleotida primer diagnostik resistensi TR-8 dan TR-9 dari gen *rpoB highly conserved* terhadap *Mtb* dalam sampel penelitian;
- e. Validasi diagnostik LAMP dapat dilakukan pada spesimen klinis pasien suspek TB menggunakan sarana dan prasarana laboratorium diagnostik di Indonesia;
- f. Sekuens *gyrB* bersifat *highly conserved* terhadap semua tipe *Mtb* dalam sampel penelitian dan dapat dibuktikan dengan uji sekuensing serta analisis bioinformatika.
- g. Prototipe primer LAMP dari sekuens DNA hasil karakterisasi *Mtb* sampel memiliki kemampuan mengamplifikasi DNA *Mtb* lebih optimal dibanding primer komersial.
- h. Protokol uji LAMP-TB yang disusun berdasarkan hasil optimasi primer LAMP Indonesia dapat diaplikasikan pada laboratorium diagnostik di Indonesia.

#### 4. TUJUAN

##### TUJUAN UMUM

Mengembangkan diagnostik molekular bakteri *Mtb* di Indonesia berdasarkan data surveilans epidemiologi molekular.

##### TUJUAN KHUSUS (Tahun III) :

1. Menginventarisasi materi biologik *Mtb* yang berasal dari 16 ibu kota provinsi (hasil tahap I dan II) yang dapat digunakan sebagai data dasar bagi berbagai penelitian TB di Indonesia.
2. Memperoleh dendogram atau peta filogenetik *Mtb* yang bersirkulasi di Indonesia yang diwakili oleh sampel dari 16 ibu kota provinsi.
3. Mengidentifikasi suseptibilitas galur *Mtb* dari kultur bakteri hasil inventaris isolat dari 16 kota provinsi di Indonesia terhadap OAT lini 1 menggunakan metode proporsional (sisa Tahap II). Analisis akhir akan menggambarkan peta resistensi *Mtb* di Indonesia yang diwakili oleh sampel penelitian berkaitan dengan data genotipe bakteri *Mtb* yang ada.

4. Memperoleh data optimasi primer diagnostik molekular resistensi untuk OAT rifampicin menggunakan gen *rpoB*.
5. Memperoleh protipe primer uji diagnostik molekular LAMP dari gen *gyrB* hasil karakteristik bakteri *Mtb* di Indonesia, yang memiliki kemampuan amplifikasi lebih optimal dibanding primer LAMP komersial.
6. Memperoleh protokol LAMP-TB yang memenuhi persyaratan diagnostik molekular dari WHO, yaitu: instrumen diagnostik dengan teknik kerja sederhana, dapat memberikan hasil dalam waktu singkat (1x24 jam) serta hasil mudah diinterpretasi oleh tenaga laboratorium.
7. Memantapkan jejaring penelitian *multi center* terhadap inventaris isolat dari 16 kota di Indonesia, yang telah dikumpulkan di Puslitbang BMF.

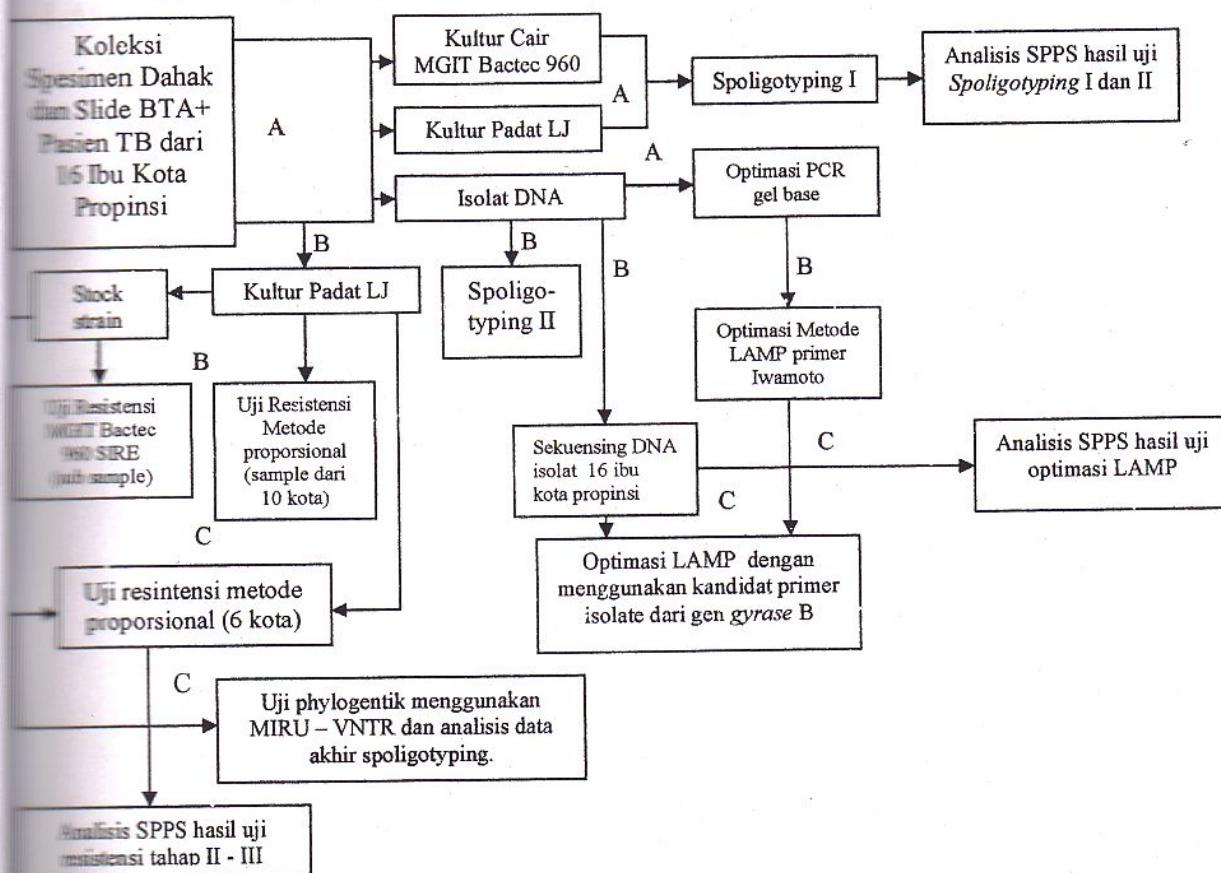
#### 5. MANFAAT PENELITIAN

1. Memperoleh data awal pohon filogenetik atau dendrogram *Mtb* complex di Indonesia yang berguna untuk surveilans penyakit TB.
2. Pemetaan awal data suseptibilitas isolat *Mtb* di lokasi penelitian pada 16 ibu kota provinsi di Indonesia terhadap OAT lini pertama dan protokol optimasi uji diagnostik molekular resistensi OAT Rifampisin dengan primer gen *rpoB*, untuk menghadapi laju pertumbuhan kasus *MDR* dan *XDR* TB.
3. Memperoleh sekuens DNA *highly conserved* bakteri *Mtb* di Indonesia, yang dapat dimanfaatkan untuk pengembangan primer diagnostik molekular TB lainnya.
4. Metode uji diagnostik molekular TB yang memiliki primer spesifik hasil karakteristik tipe mayoritas *Mtb* di lokasi penelitian pada 16 ibu kota provinsi di Indonesia, guna meningkatkan *CDR* TB.
5. Memperoleh protokol uji diagnostik molekular LAMP yang sesuai dengan sarana dan prasarana laboratorium diagnostik di Indonesia, sebagai langkah awal kemandirian bangsa dalam mempersiapkan diagnostik molekular TB.

Bab II  
METODOLOGI PENELITIAN

I. Kerangka konsep penelitian

a. Kerangka Konsep (Tahap I, II dan III)



Gambar 1. Kerangka Konsep penelitian Identifikasi dan Karakteristik Strain *Mycobacterium tuberculosis* dari Isolat Dahak Pasien Tuberkulosis Paru di Indonesia

Keterangan:

BTA = Bakteri Tahan Asam

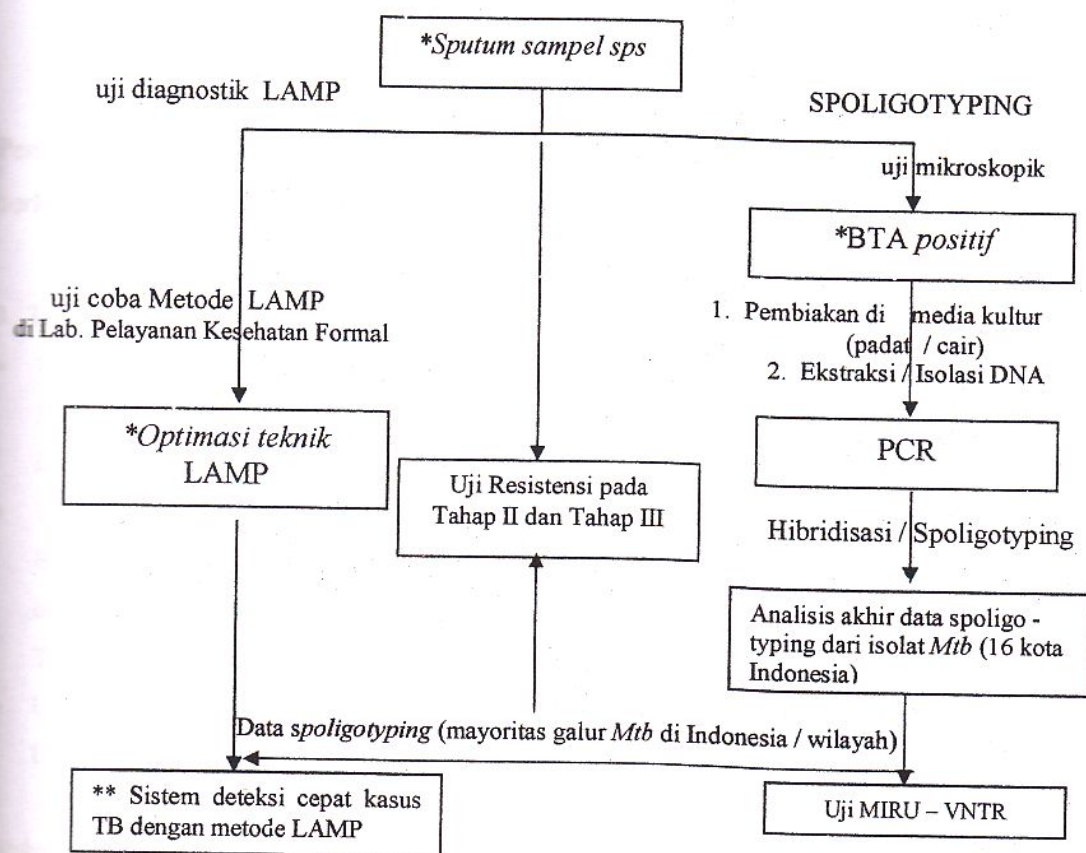
A = Pekerjaan dilaksanakan pada Tahap I; berkolaborasi dengan 16 Puskesmas Rujukan Mikroskopik (PRM)/ Persatuan Perkumpulan Tuberkulosis Indonesia (PPTI)/ Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat (BBKPM) di 16 ibu kota propinsi; Lab. Biomolekular Dept. Patologi Klinik, RSHS – Bandung.

B = Pekerjaan dilaksanakan pada Tahap II; berkolaborasi dengan Lab. Biomolekular Dept. Patologi Klinik, RSHS – Bandung; Lab. Balai Besar Laboratorium

Kesehatan – Surabaya; Lab. Tuberkulosis Dept. Mikrobiologi, FKUI; Lab. Hyogo Prefectural Institute of Health, Kobe – Japan; National Tuberculosis Reference Laboratory, Bangkok.

C = Pekerjaan dilaksanakan pada Tahap III; berkolaborasi dengan Lab. Biomolekular Dept. Patologi Klinik, RSHS – Bandung; Lab. Biomolekular Dept. Mikrobiologi, FKUI; Balai Besar Laboratorium Kesehatan – Surabaya; Lab. Tuberkulosis Lembaga Penelitian Eijkman; Lab. Mikrobiologi Klinik, Dept. Mikrobiologi - FKUI.

## 2. Alur kegiatan penelitian



Gambar 2. Kerangka Alur penelitian Identifikasi dan Karakteristik Strain *Mycobacterium tuberculosis* dari Isolat Dahak Pasien Tuberkulosis Paru di Indonesia

Keterangan:

LAMP = Loop-mediated Isothermal Amplification

Spoligotyping = Spacer oligo typing

PCR = Polymerase Chain Reaction

MIRU-VNTR = Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing System

#### Langkah penelitian:

- a. Identifikasi dan karakteristik bakteri dilakukan dengan metode *spoligotyping* dan dilanjutkan dengan uji MIRU-VNTR untuk memperoleh data *phylogenetic*. Hasil diinterpretasikan berdasarkan data SPOLDB4 dan dendogram genome *Mtb*.
- b. Uji resistensi secara proporsional dilakukan berdasarkan SOP resistensi BBLK Surabaya sesuai SOP resistensi program DRS (*Drug Resistance Surveillance*) WHO.
- c. Uji coba kandidat *primer* spesifik galur *Mtb* hasil sekuens dari isolate menggunakan gen *gyrase B* terhadap teknik LAMP di lab. Biomolekular Puslitbang BMF dan di Lab. Biomolekular Dept. Mikrobiologi, FKUI terhadap sejumlah sampel sakah pasien TB di LMK, FKUI.

Penelitian ini merupakan suatu penelitian terbuka yang dapat terus berkembang dan berkelanjutan menjawab berbagai permasalahan TB di Indonesia.

#### 3. Tempat dan Waktu Pelaksanaan

- Uji *spoligotyping* dan MIRU-VNTR dilaksanakan di laboratorium Biomolekular BSL2, Puslitbang Biomedis dan Farmasi / BMF (menggunakan SOP BSL3) dan di Laboratorium TB Lembaga Biologi Molekuler Eijkman.
- Uji Resistensi dengan metode proporsional dilakukan di laboratorium BSL2, Puslitbang Biomedis dan Farmasi (menggunakan SOP BSL3), berkolaborasi dengan lab. referensi TB nasional BBLK Surabaya (sesuai sertifikasi yang diperoleh dari laboratorium supra nasional TBC IMVS-Adelaide, Australia Selatan).
- Uji coba metode LAMP dilakukan di Lab. BSL2 Biomolekular BMF dan Lab. Molekular Departemen Mikrobiologi FKUI dengan sampel berasal dari LMK, FKUI.

Waktu pelaksanaan: Maret 2010 - Desember 2010 (10 bulan)

#### 4. Desain Penelitian

Penelitian merupakan penelitian eksperimental dengan desain *cross sectional* terhadap sejumlah sampel dahak yang telah dikumpulkan pada penelitian tahun 2008.

## 5. Populasi dan sampel

Sampel *spoligotyping* dan MIRU-VNTR merupakan isolate DNA dahak yang berasal dari pasien TB di masing-masing PRM/ BBKPM/ PPTI di 16 kota di wilayah Indonesia, yaitu Padang, Pekanbaru, Lampung, Jakarta, Serang, Bandung, Surabaya, Makassar, Banjarmasin, Pontianak, dan Ambon yang telah dikumpulkan pada penelitian tahap I (2008).

Jumlah Sampel:

### A. Uji *spoligotyping* / MIRU - VNTR (Tahap I - II - III)

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

p = estimasi kesalahan angka suspect TB Indonesia = 50%

q = 1-p (100%-p)

Z $\alpha$  = tingkat kemaknaan,  $\alpha = 0,05$  ; Z $\alpha = 1.96$

d = presisi = 10%

Design Effect = 2

$$\begin{aligned} N &= \frac{(1.96)^2 pq}{(0.1)^2} \\ &= \frac{(1.96)^2 0.5(1-0.5) \times 2}{(0.1)^2} \\ &= 200 \end{aligned}$$

Berdasarkan perkiraan tingkat pertumbuhan kultur bakteri sebesar 50% maka ukuran sample pada penelitian dinaikkan sebesar 2x menjadi  $\pm 400$  sampel. Jadi dari 16 kota, tiap daerah rencananya:  $n = (400/16) \approx 30$  pasien (dahak *sps*); yaitu = 480 isolat *Mtb*.

### B. LAMP (Tahap III)

Rumus:  $N = Z^2 pq/d^2 * DEFF$

p = estimasi kesalahan metode diagnosis BTA paling rendah = 20%

q = 1-p (100%-p)

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

d = presisi = 10%

Design Effect = 2

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

Jadi uji coba metode LAMP dilakukan terhadap 122 isolat sampel dahak pasien TB yang dipilih secara random acak ganda (125 pasien LMK yang termasuk kriteria inklusi dan bersedia terlibat penelitian setelah menandatangani *informed consent* terlebih dulu saat uji coba akan dilakukan).

- Kriteria inklusi
  - Pasien TB LMK kasus baru berusia  $\geq 15$  tahun
  - Bersedia menandatangani *informed consent* penelitian
- Kriteria eksklusi
  - Dahak terlalu sedikit / tidak berhasil mendahak

### C. Uji Resistensi

Seluruh isolat sampel yang telah dikumpulkan dan berhasil dikultur pada media padat Lowenstein Jensen (LJ) akan diuji suseptibilitasnya terhadap OAT lini I.

- Kriteria inklusi resistensi
  - Kultur LJ dengan pertumbuhan *Mtb* +
  - Jumlah koloni cukup dijadikan 1 Mc. Farland
- Kriteria eksklusi resistensi
  - Kultur rusak
  - Positif MOTT

### E. Variabel

Variabel independent : OAT sesuai dosis terukur, Kultur LJ

Variabel dependent : genome, galur *Mtb* dan kadar suseptibilitas kultur isolat spesimen

### F. Cara Pengumpulan Data

- Data filogenetik dan pola dendogram diperoleh dari hasil uji MIRU-VNTR seluruh isolat yang telah diuji *spoligotyping* (hasil tahap I dan II).
- Data suseptibilitas *Mtb* terhadap OAT lini I diperoleh dari seluruh isolat *Mtb* hasil inventaris kultur media LJ pada penelitian tahap I dan II, yang belum berhasil diuji resistensi.
- Data sensitivitas dan spesifisitas teknik LAMP menggunakan desain primer spesifik *Mtb* hasil karakterisasi tahap II, diperoleh berdasarkan hasil uji *crosssectional* terhadap isolat sampel pasien tahun 2008 dan isolat sampel pasien TB LMK yang dipilih secara random acak ganda.

## ii Bahan dan Prosedur kerja

### a. Bahan

#### Ⓒ Bahan Uji Spoligotyping / MIRU – VNTR (tahap III)

Ekstrak DNA bakteri dari kultur padat LJ dan kultur cair MGIT Bactec 960 yang telah positif menunjukkan pertumbuhan koloni *Mtb* dengan uji konfirmasi BTA dan biokimia.

#### Ⓓ Bahan Uji Resistensi

Inventaris kultur LJ isolat dahak pasien TB dari hasil tahap I dan sisa tahap II.

#### Ⓔ Bahan Uji LAMP dan Sekuensing *Mtb*

Ekstrak DNA bakteri hasil isolasi dari sampel dahak pasien yang dipilih secara metode random acak, menggunakan kontrol DNA *Mtb* H37Rv.

### b. Prosedur Kerja

#### i. Penyiapan bahan

Dilakukan persiapan penanaman bakteri pada kultur media padat Lowenstein Jenson.

#### ii. Pembuatan kultur media Lowenstein Jenson/LJ (Metode BD)

Pengerjaan dilakukan di dalam Biosafety Cabinet Type IIA Lab. Biosafety Laboratory (BSL) Level 2 – Lab. Bakteriologi BMF, menggunakan Standar Operating Prosedur (SOP) dan Alat Pelindung Diri (APD) BSL level 3.

#### 1. Lakukan Inokulasi kultur sebagai berikut (Metode Manufaktur BD):

- a. Pipet 0,1 ml persediaan dahak yang sudah diolah pada 2 buah tabung kultur yang berisi media LJ, sebarkan secara merata. Tutup tabung, jangan terlalu rapat (dikendorkan).
- b. Letakan tabung-tabung pada rak miring. Diamkan 24 jam.

catatan:

- a) Jika air kondensat dalam media terlalu banyak, buang terlebih dahulu sebelum inkubasi.
- b) Jangan melakukan inkubasi lebih dari 0.1 ml dahak untuk menjaga kekentalan media.

#### 2. Inkubasi dengan cara sebagai berikut:

- a. Simpan pembedihan yang sudah ditanam pada inkubator 37°C selama 2 – 3 hari
- b. Bila permukaan media sudah kering (sudah 24 jam), tutup tabung dengan kencang dan lanjutkan inkubasi minimal 4 minggu.

CATATAN: Mikobakteria TBC termasuk golongan aerob, maka untuk pertumbuhannya diperlukan cukup udara, oleh karena itu tutup tabung dikendorkan

#### iii. Pengamatan dan pembacaan kultur media LJ

1. Tanda khas koloni Mycobacterium TBC adalah;
  - a. Akan tampak dalam waktu 3 – 4 minggu

- b. Koloni berwarna kuning, permukaan kering dan rapuh dengan sudut-sudut yang tidak rata (disebut EUGONIC)
- 2. Periksa/amati koloni yang tampak pada media pada hari ke-7 untuk golongan yang tumbuhnya cepat dan pada minggu ke-4 untuk golongan yang tumbuhnya lambat
- 3. Jika terlihat adanya koloni pada setiap pembenihan, buat sediaan yang diwarnai Ziehl Neelsen untuk melihat adanya bakteri tahan asam
- 4. Jika sesudah minggu ke-4 tidak terlihat adanya koloni, lanjutkan inkubasi sampai minggu ke-8 sebelum hasilnya dinyatakan negatif.
- 5. Catat dan laporkan hasil pengamatan;
  - (-) tidak ada pertumbuhan
  - (+) Ada pertumbuhan
 Tulis pertumbuhan pada minggu ke berapa. Bila terjadi kontaminasi, laporkan sebagai kontaminasi.

**ix. Isolasi DNA bakteri dari kultur LJ**

- a. Suspensikan 1-2 oese koloni ke dalam 100  $\mu$ L milliQ eppendorf tube.
- b. Matikan sel-sel dengan inkubasi pada 96°C - 100°C selama 20 atau 30 menit di atas waterbath. Centrifuge pada mikrosentrifuge 13.000 rpm selama 10 menit.
- c. Supernatan mengandung DNA, masukkan ke dalam tube eppendorf yang baru, buang endapan.

**x. Uji spoligotyping**

- a. Siapkan PCR mix (Qiagen minikit) untuk amplifikasi DNA.
- b. Masukkan 50  $\mu$ L PCR mix ke dalam tabung PCR.
- c. Tambahkan 5  $\mu$ L DNA sampel ke dalam PCR mix. No 3

Primer yang ditambahkan:

DRa: 5'-GCT TTT GGG TCT GAC GAC-3', berlabel biotin pada ujung 5'

DRb: 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'

- d. Gunakan 10  $\mu$ L milliQ sebagai kontrol negatif ke dalam tabung PCR mix no. 1.
- e. Gunakan 10  $\mu$ L H37Rv sebagai kontrol positif ke dalam tabung PCR mix no. 2.
- f. Simpan semua tabung dalam thermocycler dengan program:

3 min 96°C

1 min 96°C

1 min 55°C

30 sec 72°C

5 min 72°C

} 20x

- g. Produk PCR dapat langsung digunakan atau simpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$ .
  - h. Tambahkan  $150\ \mu\text{L}$  buffer  $2\times\text{SSPE}/0,1\%$  SDS yang sudah dihangatkan ke tabung PCR.
  - i. Tambahkan  $20\ \mu\text{L}$  produk PCR, lalu denaturasikan di thermocycler selama 10 menit pada suhu  $99,9^{\circ}\text{C}$ . Segera masukkan ke dalam kristal es untuk menjaga DNA tetap single stranded dan siap dimasukkan ke dalam blotter.
- v. Persiapan Hibridisasi / MIRU - VNTR
- a. Siapkan membran dari boks berisi EDTA berlabel biotin dengan primer:
  - b. Cuci membran 10' dalam boks berisi buffer  $2\times\ \text{SSPE}/0,1\%$  SDS pada suhu hibridisasi ( $60^{\circ}\text{C}$ ) dalam oven.
  - c. Buang buffer; Siapkan mini blotter MN45, letakkan membran di dalam blotter.
  - d. Tuangkan produk PCR (*single stranded*) ke dalam blotter.
  - e. Lakukan hibridisasi selama 1jam pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ .
  - f. Deteksi menggunakan ECL dan cetak pada film.
  - g. Interpretasi hasil berdasarkan data SPOLDB4/ Dendogram MIRU-VNTR
- vi. Pemeriksaan DST Metode proporsional DRS (Lab. Referensi BBLK-Surabaya)  
Pengerjaan dilakukan Biosafety Laboratory (BSL) Level 3 – Balibangkes. Depkes.
- Membuat inokulum*
- A. PENIMBANGAN
- 1. Siapkan botol berisi glassbead + 0.1% tween 80% dan aquadest steril
  - 2. Siapkan strain yang berumur 3 - 4 minggu
  - 3. Timbang botol (misal M1), ambil 1 koloni penuh strain yang berumur 3-4 minggu, masukkan dalam botol tsb; timbang kembali botol (misal M2)
  - 4. Berat bakteri merupakan selisih berat ( $M2 - M1$ ), catat.
  - 5. Vortex selama 1-2 menit; diamkan selama 10 menit
  - 6. Secara aseptik, tambahkan aquadest steril sehingga didapat suspensi dengan konsentrasi 1 mg/ml; Vorteks selama 1-2 menit; diamkan selama 10 menit. Siap untuk diinokulasikan
- B. STANDAR MC FARLAND
- 1. Siapkan botol berisi glassbead + 0.1% tween 80% dan aquadest steril
  - 2. Siapkan strain yang berumur 3 - 4 minggu
  - 3. Siapkan suspensi 0.25; 0.5 dan 1.0 Mc Farland
  - 4. Ambil 1 koloni penuh strain yang berumur 3-4 minggu, masukkan dalam botol tsb

5. Vortex selama 1-2 menit; diamkan selama 10 menit. Secara aseptik, tambahkan aquadest steril sehingga mencapai kekeruhan 0.5 – 1 Mc Farland .
6. Vorteks selama 1-2 menit; diamkan selama 10 menit; Siap untuk diinokulasikan

#### *Membuat pengenceran inokulum*

1. Siapkan 5 tabung berisi 4.5 ml aquadest steril untuk 1 isolat *M. tuberculosis*
2. Ambil masing-masing 500 µl supernatant dari suspensi kuman (konsentrasi 1 mg/ml atau Mc Farland 0.5 – 1.0 ) yang telah disiapkan sebelumnya, masukkan kedalam tabung 4.5 ml ke 1, campur hingga homogen dengan pipet ( $= 10^{-1}$ ) → T1
3. Ambil masing-masing 500 µl dari suspensi tabung ke 1, masukkan ke dalam tabung 4.5 ml ke 2, campur hingga homogen dengan pipet ( $= 10^{-2}$ ) → T2
4. Ambil masing-masing 500 µl dari suspensi tabung ke 2, masukkan ke dalam tabung 4.5 ml ke 3, campur hingga homogen dengan pipet ( $= 10^{-3}$ ) → T3
5. Ambil masing-masing 500 µl dari suspensi tabung ke 3, masukkan ke dalam tabung 4.5 ml ke 4, campur hingga homogen dengan pipet ( $= 10^{-4}$ ) → T4
6. Ambil masing-masing 500 µl dari suspensi tabung ke 4, masukkan ke dalam tabung 4.5 ml ke 5, campur hingga homogen dengan pipet ( $= 10^{-5}$ ) → T5

#### *Inokulasi*

1. Siapkan 4 botol LJ bebas OAT, masing-masing 2 botol LJ-S, 2 botol LJ-I, 2 botol LJ-R, 2 botol LJ-E dan 2 botol LJ-PNB untuk masing-masing isolate
2. Ambil masing-masing 100 µl suspensi bakteri dari T3 (kocok dahulu), inokulasi pada 2 botol LJ bebas OAT, tutup rapat dan sebarkan merata dengan memutar botol → C3
3. Ambil masing-masing 100 µl suspensi bakteri dari T5 (kocok dahulu), inokulasi pada 2 botol LJ bebas OAT, tutup rapat dan sebarkan merata dengan memutar botol → C5
4. Ambil masing-masing 100 µl suspensi bakteri dari T3 (kocok dahulu), inokulasikan masing-masing pada LJ dengan OAT (SIRE) → total 4 botol →  
Tulis S3, I3, R3 dan E3
5. Ambil masing-masing 100 µl suspensi bakteri dari T5 (kocok dahulu), inokulasikan masing-masing pada LJ dengan OAT (SIRE) → total 4 botol  
Tulis S5, I5, R5 dan E5
6. Tutup botol setengah rapat, masukkan pada incubator dengan posisi miring 30° pada temperature 37 °C
7. Setelah inkubasi 24 jam, kencangkan tutup dan tegakkan botol semua LJ.
8. Beri label tanda mingguan pada setiap rak botol yang diinkubasi.
9. Teruskan inkubasi. Pembacaan hasil dilakukan pada hari ke 28 (minggu ke 4) dan hari ke 42 (minggu ke 6) dengan mengamati ada/tidaknya pertumbuhan koloni
10. Bila ditemukan pertumbuhan, konfirmasi dengan pewarnaan ZN dan pembacaan mikroskopik BTA (akan terlihat pembentukan serpentine cord yang khas)

*Interpretasi hasil uji kepekaan OAT*

1. Hasil dibaca pertama kali pada minggu ke 28.
2. Jumlah koloni harus dihitung dengan tepat. Idealnya jumlah koloni 50 – 100 terdapat pada salah satu pengenceran dari  $10^{-3}$  dan  $10^{-5}$  yang ditanam pada media tanpa obat. Hindari penghitungan jml koloni dengan KIRA-KIRA, kecuali bila koloni sangat padat.
3. Catat pada laporan dengan criteria skala sbb:

JUMLAH KOLONI	PENCATATAN
a. > 500 koloni	(4+) / konfluen
b. 200 – 500 koloni	(3+) / hamper konfluen
c. 100 – 200 koloni	(2+)
d. 20 – 100 koloni	Tulis jumlah koloni
e. 1 – 19 koloni	Tulis jumlah koloni
Tidak terlihat pertumbuhan	SENSITIF

4. Jika pada pengenceran  $10^{-5}$  jumlah koloni > 100, maka uji harus diulang.
5. Hasil perhitungan koloni layak dikonversi menjadi sensitive atau resisten bila:
  - a. Jumlah koloni pada media tanpa obat pada pengenceran  $10^{-3}$  dan  $10^{-5}$  adalah logis
  - b. Adanya permukaan media dengan jumlah koloni yang dapat dihitung dengan tepat
  - c. Jumlah koloni minimal pada media tanpa obat adalah 5. Jika jumlahnya kurang dari itu, hasil tidak boleh disimpulkan. Untuk media bebas obat, pilih jumlah koloni berdasarkan prioritas sbb :
    - i. 20 – 100 koloni. Jika tidak ada, pilih yang ke ii
    - ii. 5 – 19 koloni
  - d. Untuk perhitungan, pakai jumlah koloni tertinggi
6. Koloni yang sangat kecil (PIN POIT) pada media LJ+Ethambutol dan LJ+Streptomisin jangan diperhitungkan
7. Hasil uji kepekaan OAT tidak selalu dapat dibaca sekali. Kadang-kadang perlu pengulangan pengujian, yaitu pada keadaan :
  - a. Hasil pengujian pada kuman control tidak sesuai
  - b. Criteria pada pembacaan/interpretasi pertumbuhan pada LJ+OAT dan LJ bebas OAT belum tercapai
  - c. Jika terjadi perbedaan jumlah koloni yang terlalu besar pada duplo control (missal lebih dari 10x); Terjadi kontradiksi interpretasi hasil
8. Perhitungan penetapan resistensi

$$\text{Proportion (\%)} = c/d \times 100\%$$

- Proporsi (%): Jumlah koloni yang terdapat pada LJ+OAT menandakan jumlah kuman resisten yang terdapat pada inokulum
- c : Jumlah koloni pada LJ + OAT
- d : Jumlah koloni pada LJ bebas OAT

9. Interpretasi hasil :

- a. RESISTEN : isolate dengan resistensi minimal 1 %
- b. SENSITIF ; isolate dengan resistensi < 1%

10. Jika pembacaan pada hari ke 28 menunjukkan hasil RESISTEN, tidak perlu diadakan pembacaan ulang pada obat tersebut. Tulis hasil uji kepekaan OAT sebagai RESISTEN
11. Jika pada hari ke 28 menunjukkan hasil SENSITIF, perlu diadakan pembacaan ulang pada hari ke 42 untuk meyakinkan hasil pembacaan hari ke 28. Pembacaan hari ke 42 dinyatakan sebagai hasil pembacaan DEFINITIF.

vii. Uji Biokimia

Uji PNB (uji kepekaan)

Cara Kerja;

Mempersiapkan media LJ yang mengandung PNB 500mg/L. Inokulasikan suspensi bakteri pada media LJ yang sudah mengandung PNB, inkubasi pada suhu 37°C, amati setelah 28 hari.  
Hasil: Mycobacterium tidak tumbuh pada media LJ + PNB

viii. Ekstraksi DNA (Metode Qiagen)

- Siapkan tabung eppendorf 1500  $\mu$ L
- Masukkan sputum 200  $\mu$ L dan 400  $\mu$ L PBS, campur sampai sempurna dengan vortex.
- Inkubasi 37 °C selama 1 jam.
- Siapkan tabung eppendorf 1,5 mL yang baru. Masukkan 180  $\mu$ L ATL dan 150  $\mu$ L campuran sputum – PBS. Tambahkan 20  $\mu$ L proteinase K, campur lalu spin, Inkubasi selama 60 menit suhu 56 °C. Tambahkan 200  $\mu$ L AL, vortex dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 70 °C. Tambahkan 200  $\mu$ L alkohol absolut, vortex dan spin beberapa saat. Sediakan spin column, pindahkan larutan dalam eppendorf tube ke dalam spin column.
- Centrifuge selama 1 menit pada 8000 rpm, ganti tabung penampung bawah. Tambahkan larutan AW1 sejumlah 500  $\mu$ L , sentrifuge 8000 rpm selama 1 menit. Ganti tabung

- penampung bawah. Tambahkan larutan AW2 sejumlah 500  $\mu\text{L}$ , sentrifuge 14000 rpm selama 3 menit. Ganti tabung penampung bawah dengan tabung eppendorf 1,5 ml.
- f. Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  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%.
  - g. Simpan DNA pada suhu  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  sebelum digunakan untuk LAMP.

#### ix Loop-Mediated Isothermal Amplification /LAMP - TB (Eiken, 2007)

1. Optimasi sistem LAMP menggunakan DNA Amplification Kit (LAMP EIKEN)
2. Optimasi sekuens primer (Iwamoto-MTB primers dan Iwamoto-Muniv primers )

- 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:  $63^{\circ}\text{C}$  (60 mnt); Inaktivasi :  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (2 mnt)
- Kontrol negatif (larutan 2xRM+PM DNA+ Bst DNA polymerase+DW+FD) dan kontrol positif (larutan + DNA H37Rv) disertakan dalam setiap tahap reaksi.

#### x Uji Sekuensing DNA *Mtb*

##### A. Pembuatan *Reagen Mix* PCR

###### Prosedur kerja:

Tabung PCR yang berisi larutan PCR Mix yang terdiri dari Platinum<sup>®</sup> *Taq* DNA Polymerase 1,0  $\mu\text{L}$  [10X PCR Buffer, minus Mg 12,5  $\mu\text{L}$ ; 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 mM NaCl, 2 mM Sodium Phosphate, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, stabilizers, 50% (v/v) glycerol; 50 mM Magnesium Chloride 1,5  $\mu\text{L}$ ], disiapkan. Kedalam tabung kemudian ditambahkan primer Forward dan primer Reverse *gyrB Mtb* H37Rv masing-masing sejumlah 0,5  $\mu\text{L}$ ; *Nuclease free water* hingga volume 20  $\mu\text{L}$ ; dan 5  $\mu\text{L}$  isolat DNA sampel. Larutan mix kemudian divortex selama 5 detik dan dilanjutkan dengan *spindown* selama 45 detik. Kontrol positif yang digunakan adalah

DNA *Mtb* H37Rv sedangkan kontrol negatif adalah larutan 10xPCR Buffer+Primer FR+ enzim *taq* DNA Polymerase + *NfreeW* yang disertakan dalam setiap tahap reaksi. Setelah semua larutan siap lalu dimasukkan ke dalam mesin *thermo cycler* dengan kondisi sebagai berikut :

Pre denaturasi	96 °C	2 Menit	} 30
Denaturasi	96 °C	1 Menit	
<i>Annealing</i>	87 °C	30 detik	
Elongasi	72 °C	2 Menit	
Hold	4 °C		

Setelah reaksi PCR selesai, dilakukan *spindown* sampel selama 2 menit kemudian dilanjutkan dengan proses elektroforesis.

#### B. Elektroforesis hasil PCR

Prosedur kerja:

Proses elektroforesis produk PCR dapat menggunakan gel agarose 2 % dikarenakan *size produk* berkisar 200-300 bp. Serbuk agarose disiapkan sejumlah 2 gram yang dilarutkan dalam buffer TBE dengan konsentrasi pengenceran 1x [ $10^{-1}$ ] sebanyak 100 ml. Kemudian setelah larut, dimasukkan ke dalam microwave selama 3 menit sampai semua agarose homogen. Dinginkan larutan homogen selama 5 menit, kemudian ditambahkan *syber safe* DNA gel stain sebanyak 10% kedalam larutan. Larutan dihomogenkan kembali, lalu dituangkan kedalam cetakan dan dibiarkan mengering sampai membentuk agar yang diinginkan (selama 30 menit). Setelah agarose terbentuk, *chamber* disiapkan dengan memberikan larutan buffer TBE sesuai dengan volume *chamber* yang tersedia. Kemudian agarose yang sudah terbentuk dalam cetakan dimasukkan ke dalam *chamber*. Larutan *Blue juice* disiapkan sebanyak kurang lebih 1 µl, kemudian dicampurkan dengan produk PCR hingga 10 µl dan dihomogenkan. Larutan kemudian dimasukkan kedalam sumuran gel agarose. Kedalam sumuran lain dimasukkan larutan marker DNA, yaitu DNA ladder (Invitrogen, 15628-019) sebanyak 10 µl, untuk mengetahui ukuran dari produk PCR. Elektroforesis (*Advance*, mupid EXU) dilakukan pada 100 volt selama 40 menit. Hasil elektroforesis dilihat dengan *Gel.Doc-XR* (Biorad Dignostic System Instrument). Hasil elektroforesis produk PCR isolat dibandingkan dengan kontrol positif *Mtb* H37Rv. Kemudian proses dilanjutkan ke tahap preparasi sekuensing untuk DNA sampel yang menunjukkan hasil positif *Mtb* pada gel agarose.

#### C. Amplifikasi DNA sampel untuk sekuensing

Prosedur kerja:

Tubung PCR berisi larutan PCR Mix yang terdiri dari larutan *Buffer Sequencing* (ABI, 4339843) 40 µl; BDDT v3.1 (ABI, 4337455) 2,0 µl; Primer *gyrB* (F atau R) 2,0 µl dan *Nuclease free water* hingga volume 10,0 µl disiapkan. Larutan mix dihomogenkan dengan cara *dispindown* beberapa detik. Kedalam tabung kemudian ditambahkan 2 µl isolat DNA sampel yang telah terbukti positif *Mtb* berdasarkan hasil elektroforesis. Larutan kembali divortex dan *dispindown* selama beberapa detik. Sampel kemudian dimasukkan kedalam *thermo cycler* untuk dilakukan proses amplifikasi dengan kondisi sebagai berikut :

Pre Denaturasi	96 °C	2 menit
Denaturasi	96 °C	10 detik
<i>Annealing</i>	55 °C	30 detik
Elongasi	60 °C	4 menit
Hold	4 °C	Forever

Setelah proses amplifikasi selesai, produk PCR dikeluarkan dan *dispindown* beberapa detik lagi lalu dilakukan proses purifikasi dengan metode presipitasi.

#### D. Purifikasi produk amplifikasi sekuensing

Prosedur kerja:

Produk PCR sekuensing ditambahkan isopropanol 75 % sejumlah 60 µl. Sampel lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 4°C. Sentrifuse selama 15 menit, kemudian supernatan dibuang dengan menggunakan tissue bebas serat. Kedalam sampel lalu ditambahkan alkohol 70 % sebanyak 60 µl lalu larutan disentrifuse kembali selama 15 menit. Setelah selesai, supernatan dibuang dengan menggunakan tissue bebas serat. Pencucian menggunakan alkohol 70% diulang dua kali untuk memperoleh hasil yang lebih bersih. Sampel lalu dikeringkan dengan *thermocycler* pada suhu 60°C selama 15 menit sampai kering dan bau alkohol hilang.

#### E. Sekuensing DNA sampel

Prosedur kerja:

Setelah alkohol kering maka kedalam sampel ditambahkan *Hi-Di formamide/nuclease free water* sebanyak 10 µl, lalu tube divortex dan disentrifuse ulang. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam *plate* sekuenser mesin *3130xl Genetic analyzer (Applied Biosystems Diagnostic Instrument/ABI)* sesuai prosedur, dan kemudian mesin sekuensing dijalankan. Hasil sekuensing dianalisis secara bioinformatika menggunakan program BLAST (NCBI) atau dianalisis dengan *software SeqScape V2.5* dari ABI.

#### E. Analisis fragmen sekuens hasil sekuensing

Prosedur kerja:

Sekuens DNA sampel dibandingkan homologinya dengan *database* sekuens DNA gen *gyrB* genome *Mtb* H37Rv (NCBI) untuk mencocokkan hasil dengan sekuens referensi.

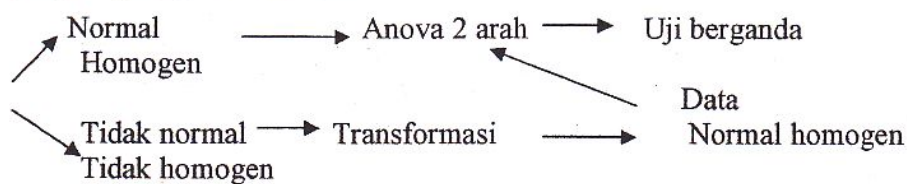
Prosedur kerja:

Pertama kali, ditentukan homologi DNA sekuens secara bioinformatika terhadap genome *Mtb* H37Rv menggunakan program BLAST (*Basic Local Aligment Search Tools*) pada situs [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) dengan cara melihat *alignment* dan nilai E-value setiap fragmen DNA sekuens. Bila hasil homolog maka terhadap fragmen DNA sekuens analisis lanjut dapat dilakukan. Data sekuens nukleotida dari setiap isolat kemudian dianalisis bersama dengan data sekuens gen *gyrB* dari genom *Mtb* H37Rv yang tersedia di *database* NCBI. Analisis homologi antar sekuens dilakukan menggunakan program *software* ABI *SeqScape* V2.5.

#### 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



#### 10. DEFINISI OPERASIONAL

---

#### 11. PERTIMBANGAN ETIK

(Uraian singkat mengenai perlu atau tidaknya mendapatkan Persetujuan Etik)

Etik penelitian dari Komisi Etik Badan Litbangkes. No. LB.03.02/KE/3386/2010

### BAB III HASIL DAN DISKUSI

Jumlah responden yang berhasil dikumpulkan sampel dahak *sps*-nya oleh laboratorium kesehatan daerah yang berpartisipasi dalam penelitian adalah 462 responden (96,3%), dari total awal yang diharapkan sejumlah 480 responden. Dari total sampel yang ada hanya 437 sampel yang memenuhi kriteria inklusi (94,6%), dimana 25 sampel drop karena alasan: usia responden <15 tahun, data kuesioner tidak dilengkapi lembar formulir pendamping, atau sampel dahak tidak ada/rusak. Total pengelolaan sampel per kota dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Total responden penelitian dan jumlah sampel inklusi yang berhasil dikumpulkan dari masing-masing lokasi penelitian

No.	Kota	$\Sigma$ responden penelitian	$\Sigma$ sampel drop/rusak	$\Sigma$ sampel inklusi
1.	Serang	31	4	27
2.	DKI Jakarta	30	1	29
3.	Bandung	30	2	28
4.	Surabaya	30	2	28
5.	Padang	29	-	29
6.	Medan	22	-	22
7.	Pekan Baru	31	1	30
8.	Palembang	30	1	29
9.	Lampung	30	2	28
10.	Banjarmasin	30	-	30
11.	Pontianak	30	3	27
12.	Ambon	30	2	28
13.	Mataram	28	-	28
14.	Menado	29	-	29
15.	Makassar	30	2	28
16.	Sorong	22	5	17
Total		462	25	437

Seluruh sampel dahak yang telah memenuhi kriteria inklusi kemudian didekontaminasi dan diinokulasikan ke media cair MGIT Bactec 960 dan media padat Lowenstein Jensen (LJ) agar diperoleh koloni bakteri *Mtb* yang dapat diuji genotipenya secara *spoligotyping*.

### 3.1. Hasil kultur *Mtb* pada media cair MGIT-Bactec 960 dan media padat LJ

Tidak semua sampel *sps* yang memenuhi syarat kelengkapan kuisioner tersebut dapat dikategorikan baik. Sehingga dari 437 sampel hanya sekitar 335 sampel (77%) yang berhasil tumbuh, yang merupakan gabungan pertumbuhan koloni baik di media padat maupun di media cair. Isolat yang tidak dapat tumbuh menunjukkan faktor kontaminasi pada kondisi awal sampel menjadi faktor utama penyebab gagalnya koloni tumbuh. Kultur yang sudah berhasil tumbuh sebagian ada yang dilakukan pengayaan atau sub kultur untuk menambah jumlah koloni dan ada yang langsung distock. Stock strain menjadi sangat penting untuk persediaan *site vaccin* maupun *cell line*. Berikut hasil pertumbuhan kultur per kota seperti dapat dilihat pada tabel 3.2:

Tabel 3.2. Hasil inokulasi bakteri *Mtb* dari sampel penelitian di media MGIT Bactec 960 dan media Lowenstein Jensen

NO	NAMA KOTA	Media MGIT-Bactec 960			Media Lowenstein Jensen		
		(+)	(-)	Waktu tumbuh (hr)	(+)	(-)	Waktu tumbuh (mg)
1.	Padang	24	5	5-14	25	4	2-5
2.	Medan	17	5	4-40	20	2	2-8
3.	Pekan Baru	20	10	4-30	20	10	1-8
4.	Palembang	20	9	5-25	20	9	1-5
5.	Lampung	19	9	6-20	21	7	2-5
6.	Serang	17	10	3-33	24	3	2-8
7.	DKI Jakarta	17	12	4-26	21	8	2-8
8.	Bandung	25	3	4-20	24	4	2-7
9.	Surabaya	19	9	3-30	20	8	2-5
10.	Mataram	12	16	4-30	16	12	2-8
11.	Makassar	21	7	5-37	22	6	2-8
12.	Menado	22	7	3-30	21	8	1-8
13.	Ambon	14	14	4-30	16	12	2-8
14.	Pontianak	19	8	5-30	19	8	2-7
15.	Banjarmasin	25	5	3-31	29	1	2-7
16.	Sorong	14	3	3-25	13	4	1-8
TOTAL		305	132		331	106	

Pertumbuhan koloni bakteri di media cair MGIT Bactec 960 membutuhkan waktu lebih pendek dibandingkan dengan koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media padat LJ, sebagaimana telah dinyatakan dalam berbagai jurnal penelitian sebelumnya.

Kultur bakteri pada media cair MGIT Bactec 960 tumbuh dalam waktu sangat cepat, dimana waktu pengamatan dapat dimulai pada hari ketiga sampai koloni cukup untuk dideteksi menggunakan alat Bactec MicroMGIT *reader*. Alat akan menunjukkan perbedaan nyata antara sample yang mengalami bakat positif (sampel positif) seperti dapat dilihat pada gambar 3.1. dan sample yang tidak mengalami pertumbuhan bakteri (sampel negatif) seperti dapat dilihat pada gambar 3.2.

Setelah 7 hari maka pada umumnya seluruh isolat bakteri sudah memiliki koloni yang cukup untuk diidentifikasi dengan alat Bactec MicroMGIT dan dapat diuji secara mikroskopis BTA menggunakan pewarnaan ZN untuk uji spesifisitas bakteri. Seluruh isolate yang menunjukkan hasil positif pada MicroMGIT *reader* dan juga positif setelah diuji secara mikroskopis BTA akan langsung diekstraksi DNANYa dari kultur media cair MGIT Bactec 960 untuk diuji genotipe secara *spoligotyping*.



Gambar 3.1. A. Contoh sampel yang positif mengalami pertumbuhan kultur bakteri *Mtb* pada media cair Bactec MGIT 960. B. LED pada alat Bactec MicroMGIT *reader* bergerak ke area positif di sebelah daerah kanan.



Gambar 3.2. A. Contoh sampel yang negatif mengalami pertumbuhan kultur bakteri *Mtb* pada media cair Bactec MGIT 960. B. LED pada alat Bactec MicroMGIT *reader* bergerak ke area negatif di daerah sebelah kiri.

Sementara itu, koloni bakteri pada media Lowenstein Jensen tumbuh dalam waktu yang lebih lambat. Waktu pengamatan pertumbuhan baru dimulai pada hari ketujuh sampai dengan 6–8 minggu kemudian hingga jumlah koloni cukup untuk diamati dan dilakukan uji biokimia guna spesifisitas bakteri. Beberapa sample

menunjukkan perbedaan jelas pada jumlah koloni yang tumbuh, dimana hal ini sekaligus memiliki hubungan erat dengan manifestasi penyakit dari masing-masing responden. Perbedaan jumlah koloni dapat dilihat pada gambar 3.3.



Gambar 3.3. A. Contoh beberapa sampel yang memiliki jumlah bakteri pada pengamatan mikroskopis BTA dengan nilai (1+); (2+); (3+) untuk pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) pada media padat LJ. B. Contoh sampel yang (1+) dan (3+) untuk pertumbuhan bakteri *Mtb* pada media padat LJ.

Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri di media LJ juga menunjukkan data bahwa meski berasal dari sample dahak pada responden yang sama tetapi bakteri yang tumbuh dapat menunjukkan beberapa fenotipe berbeda sebagaimana gambar 3.4.

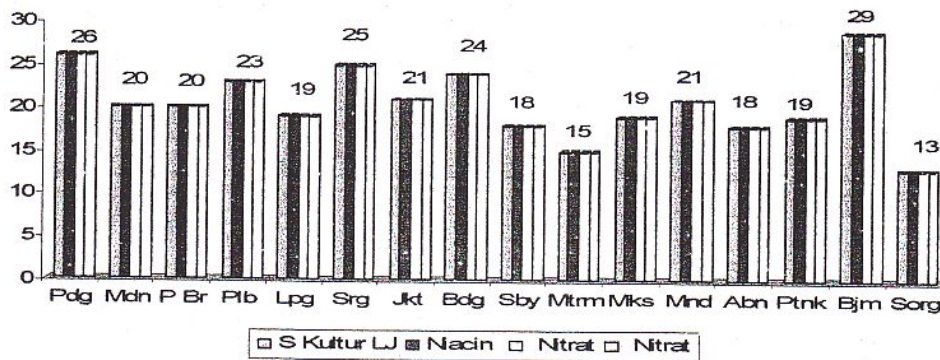


Gambar 3.4. Contoh sampel dari responden yang sama tetapi memiliki pertumbuhan koloni yang berbeda. A. Sampel yang menunjukkan koloni *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) pada media padat LJ. B. Sampel yang menunjukkan koloni *Mycobacterium Others Than Tuberculosis* (MOTT) atau disebut juga dengan *Non Tuberculous Mycobacterium* (NTM).

Untuk memastikan koloni adalah *Mtb*, maka dari koloni dengan fenotipe *Mtb* kemudian diuji secara biokimia untuk memastikan spesifisitas bakteri. Sebagian sampel kultur harus mengalami pengayaan atau sub kultur guna menambah jumlah koloninya dan sebagian lagi dapat langsung diinventaris bila jumlah koloni memang

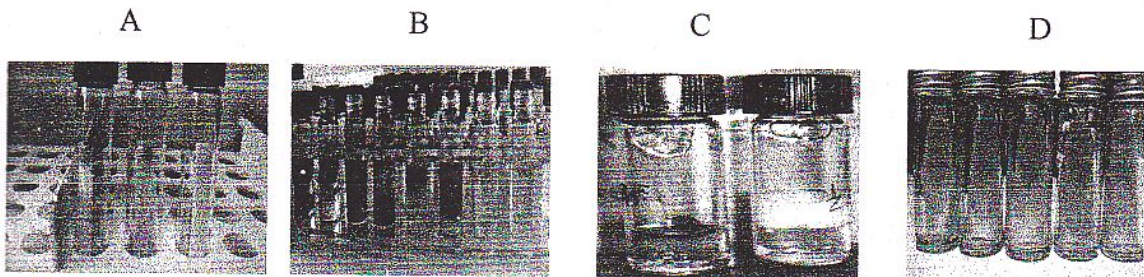
### 3.2. Hasil Uji Biokimia Kultur Bakteri di Media LJ

Koloni dari kultur media LJ diambil sespora untuk uji Niacin, Nitrat, Katalase dan PNB yang merupakan uji standard untuk golongan *Mtb*. Hasil uji akan menentukan golongan koloni yang tumbuh termasuk kelompok kuman *Mtb* atau *Mycobacterium Others Than Tuberculosis* (MOTT). Hasil total pertumbuhan koloni dan uji biokimia terhadap kultur LJ dari isolat di tiap kota dapat dilihat pada gambar 3.5. berikut:



Gambar 3.5. Hasil uji biokimia koloni bakteri pada media LJ dari sampel responden di masing-masing lokasi penelitian

Berikut beberapa gambar hasil uji biokimia positif yang telah dilakukan:



Gambar 3.6. Contoh hasil uji biokimia beberapa sampel. A. Sampel yang menunjukkan reaksi positif untuk uji Niacin. B. Sampel yang menunjukkan hasil positif untuk uji nitrat. C. Sampel yang menunjukkan hasil positif untuk uji Katalase. D. Sampel dengan PNB negatif dibanding kontrol positif H37Rv.

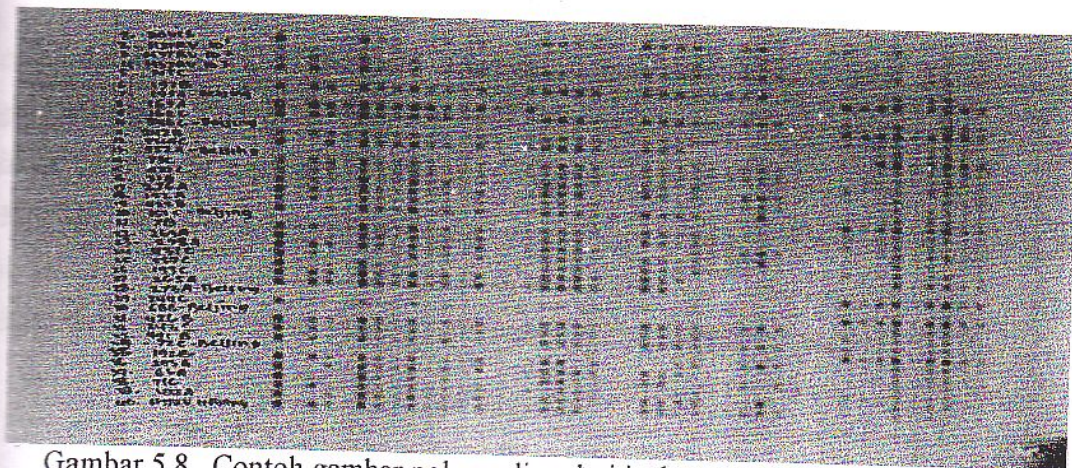
### 3.3. HASIL UJI SPOLIGOTYPING – MIRU/VNTR

Spoligotyping (*spacer-oligo-typing*) adalah metode yang sering digunakan untuk mengidentifikasi genotipe dan sekaligus galur *Mtb.* complex di suatu negara. Prinsip kerjanya adalah PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan hibridisasi dengan menggunakan primer DRa : 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3', berlabel biotin pada ujung 5' dan DRb : 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3' untuk mengidentifikasi 43 *spacers* spesifik pada daerah *Direct Repeat* (DR) di lokus kromosom genome *Mtb.*

Miru-VNTR merupakan metode yang memiliki kemampuan lebih sensitif dalam membedakan sub-tipe dari genotipe *Mtb* yang dideteksi dibanding metode *spoligotyping*. Tetapi dengan menggunakan probe yang cukup banyak maka metode genotype ini menjadi sangat mahal.

Data genotipe hasil *spoligotyping* – MIRU – VNTR dapat menggambarkan peta transmisi *Mtb* di 16 ibu kota provinsi di Indonesia yang dapat digunakan sebagai data awal pemetaan karakteristik kuman *Mtb*.

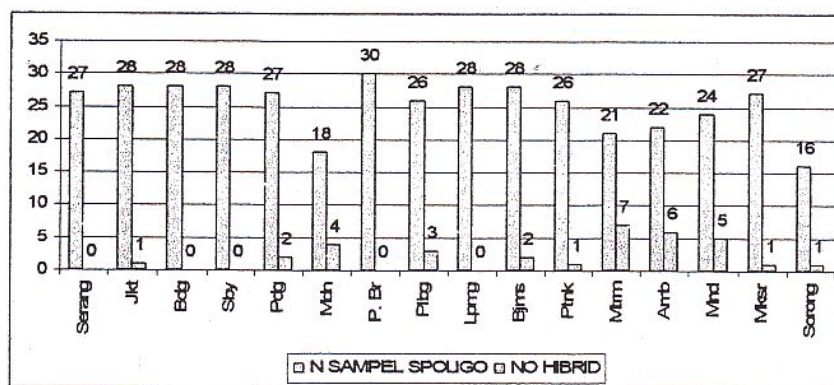
DNA bakteri dari kultur MGIT Bactec 960 atau kultur LJ yang telah menunjukkan uji BTA positif kemudian diekstraksi menggunakan prosedur standard baku. Ekstraksi DNA juga dilakukan dari spesimen dahak bila koloni gagal tumbuh pada media kultur. Berikut contoh pola spoligo isolat dari galur *Mtb* complex pada membrane spoligo (IM9702, Isogen Biosolution, BV) yang telah dikonfirmasi dengan *database* SPOLDB4.



Gambar 5.8. Contoh gambar pola spoligo dari isolat spesimen dahak pasien TB

### 3.3.1. Pola spoligotipe *Mtb* sampel per wilayah di Indonesia

Hasil spoligo kemudian dipindahkan ke *worksheet* Microsoft Excel dan Words 2003 secara manual, lalu disamakan dengan pola di *database* SPOLDB4 berikut deskripsi *oktal* dari setiap isolat. Jumlah pola spoligotipe yang berhasil diperoleh dari isolat sampel adalah sejumlah 404 pola dimana terdapat 33 isolat tidak memberikan pola hibridisasi. Gambar rincian per kota dapat dilihat pada Gambar 3.7. dimana jumlah yang ditampilkan adalah pola spoligo yang diperoleh dari isolat per kota:



Gambar 3.7. Total jumlah pola spoligotipe *Mtb* dari sampel di 16 ibu kota provinsi di Indonesia.

Berdasarkan pola genotipe *Mtb* complex yang diperoleh dari isolat sampel, maka dapat ditentukan mayoritas pola distribusi kuman per wilayah. Hal ini merupakan gambaran galur mayoritas yang bersirkulasi di daerah setempat sekaligus menunjukkan faktor filogeografik yang mempengaruhi distribusi tersebut. Data spoligotipe kemudian dianalisis untuk melihat diversitas dan struktur rancang hubungan famili antara sub spesies *Mtb* dari setiap kota. Analisis pola *spoligo* dilakukan mengikuti aturan yang telah dilakukan pada penelitian terdahulu (Parwati, 2009) sebagai berikut:

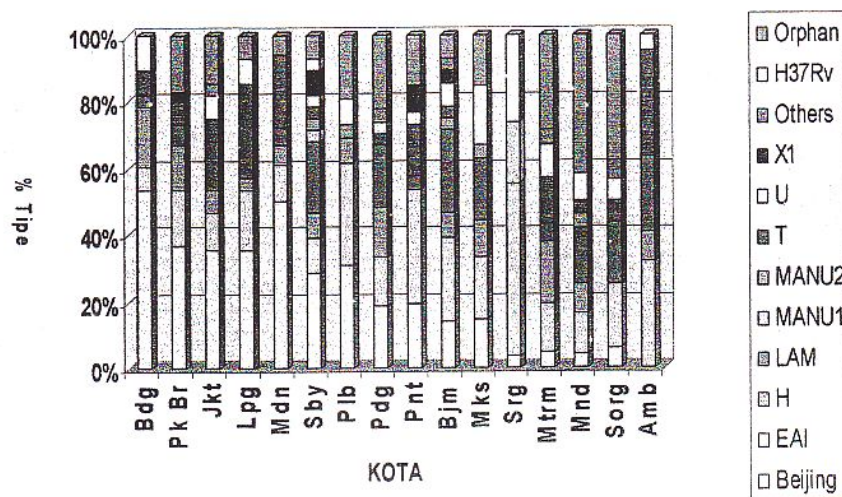


**Tabel 3.3.** Struktur bangun hubungan antara pola genotipe SPOLDB4 dengan kelompok famili *Mtb* complex dari 404 DNA bakteri sampel pasien TB di wilayah Jawa (Serang, Jakarta, Bandung dan Surabaya ), Sumatera (Padang, Medan, Pekanbaru, Palembang, Lampung), Kalimantan (Banjarmasin dan Pontianak), dan Wilayah Timur Indonesia (Mataram, Manado, Makassar, Ambon dan Sorong).

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

**Keterangan:**  
CAS = Cental Asia Strain  
EAI = East African-Indian  
H = Haarlem  
LAM = Latin American-Mediterranean  
U = Undefined

Secara keseluruhan, Tabel 4.3. menggambarkan bahwa pola genotipe sampel menunjukkan kelompok famili mayoritas yang ada adalah galur Beijing (23,0%), famili *East African-Indian/EAI* (21,3%) dan famili *Latin American-Mediterranean/LAM* (12,4%). Sementara famili *Haarlem/H*, T dan U memiliki persentase yang hampir sama, yaitu sekitar 8,0%. Tipe famili lain yang cukup banyak terdapat pada isolat sampel adalah tipe famili MANU (2,5%), diikuti oleh tipe famili X (1,5%) dan *Central Asia Strain/CAS* (0,7%). Tipe dengan persentase lebih kecil dari CAS adalah tipe famili PINI, *Africanum* serta diperoleh satu isolat tipe *Mtb* H37Rv. Bila seluruh data pola spoligotipe disusun per kota berdasarkan urutan kota yang memiliki sampel dari famili galur Beijing terbanyak, maka akan terlihat keragaman yang tinggi dari bakteri *Mtb* yang bersirkulasi di Indonesia seperti ditunjukkan oleh gambar 3.9.



Gambar 3.9. Persentase jumlah pola spoligotipe *Mtb* dari sampel di 16 ibu kota provinsi di Indonesia diurutkan berdasarkan persentase tipe Beijing terbanyak di setiap kota.

### 3.3.2. Genotipe *Mtb* di Wilayah Jawa, Sumatera-Kalimantan dan wilayah Timur Indonesia

Data pada Tabel 3.3. kemudian dipisahkan menjadi per wilayah untuk mempermudah pengamatan hasil genotipe yang diperoleh. Peta keragaman genotipe *Mtb* yang bersirkulasi di lokasi penelitian pada wilayah Jawa, Sumatera-Kalimantan dan wilayah Timur Indonesia dapat dilihat pada Tabel 3.4. sampai dengan Tabel 3.6.

Tabel 3.4. Keragaman genotipe *Mtb* pada kota-kota di lokasi penelitian wilayah Jawa

Genotipe <i>Mtb</i>	Serang	DKI	Bandung	Surabaya	Total	%
Galur Beijing (fam. I)	1	10	15	8	34	30,6
Genotipe H (fam. A)	-	2	5	2	9	8,1
Genotipe LAM (fam. D)	-	4	1	6	11	10
Genotipe EAI (fam. F)	14	3	2	3	22	19,8
Genotipe T (fam. C)	-	2	2	1	5	4,5
Genotipe U (fam. G dan H)	7	2	3	1	13	11,7
Genotipe MANU1 (fam. Others)	5	-	-	1	6	5,4
Genotipe MANU2 (fam. Others)	-	-	-	1	1	0,9
Genotipe X1 (fam. B)	-	-	-	2	2	1,8
Genotipe CAS (fam. Others)	-	1	-	-	1	0,9
Orphan	-	4	-	2	6	5,4
H37Rv	-	-	-	1	1	0,9
TOTAL	27	28	28	28	111	100

Tabel 3.5. Keragaman genotipe *Mtb* pada kota-kota di lokasi penelitian wilayah Sumatera dan Kalimantan

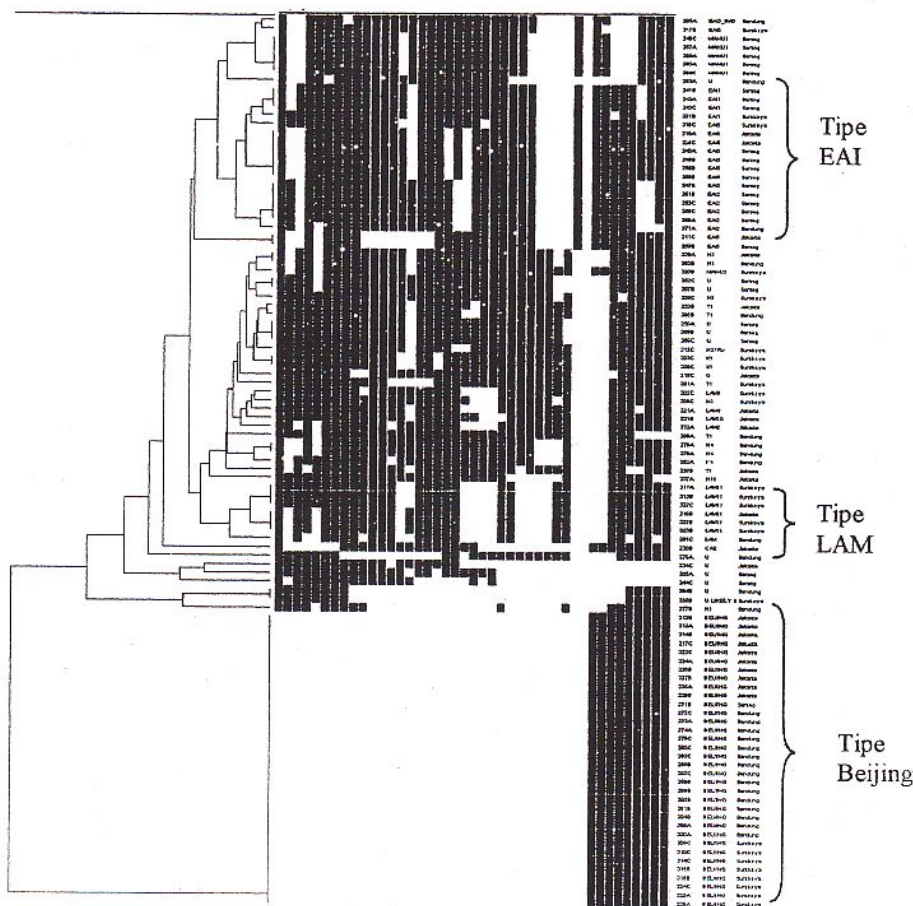
Genotipe <i>Mtb</i>	Palembang	Lampung	Padang	P. Baru	Medan	Bjrnasin	Potianak	TOTAL	%
Galur Beijing (fam. I)	8	10	5	11	9	4	5	52	28,4
Genotipe H (fam. A)	2	1	4	4	1	2	-	14	7,7
Genotipe LAM (fam. D)	-	5	5	2	1	7	1	21	11,5
Genotipe EAI (fam. F)	8	5	4	5	2	7	9	40	21,9
Genotipe T (fam. C)	-	3	1	2	4	1	4	15	8,2
Genotipe U (fam. G dan H)	2	2	1	-	-	2	1	8	4,4
Genotipe MANU2 (fam. Others)	1	-	-	-	-	1	-	2	1,0
Genotipe XI (fam. B)	-	-	-	1	-	1	2	4	2,2
Genotipe CAS (fam. Others)	-	-	1	-	-	1	-	2	1,0
ORPHAN	5	2	6	5	1	2	4	25	13,7
TOTAL	26	28	27	30	18	28	26	183	100

Tabel 3.6. Keragaman genotipe *Mtb* pada kota-kota di lokasi penelitian wilayah Timur Indonesia

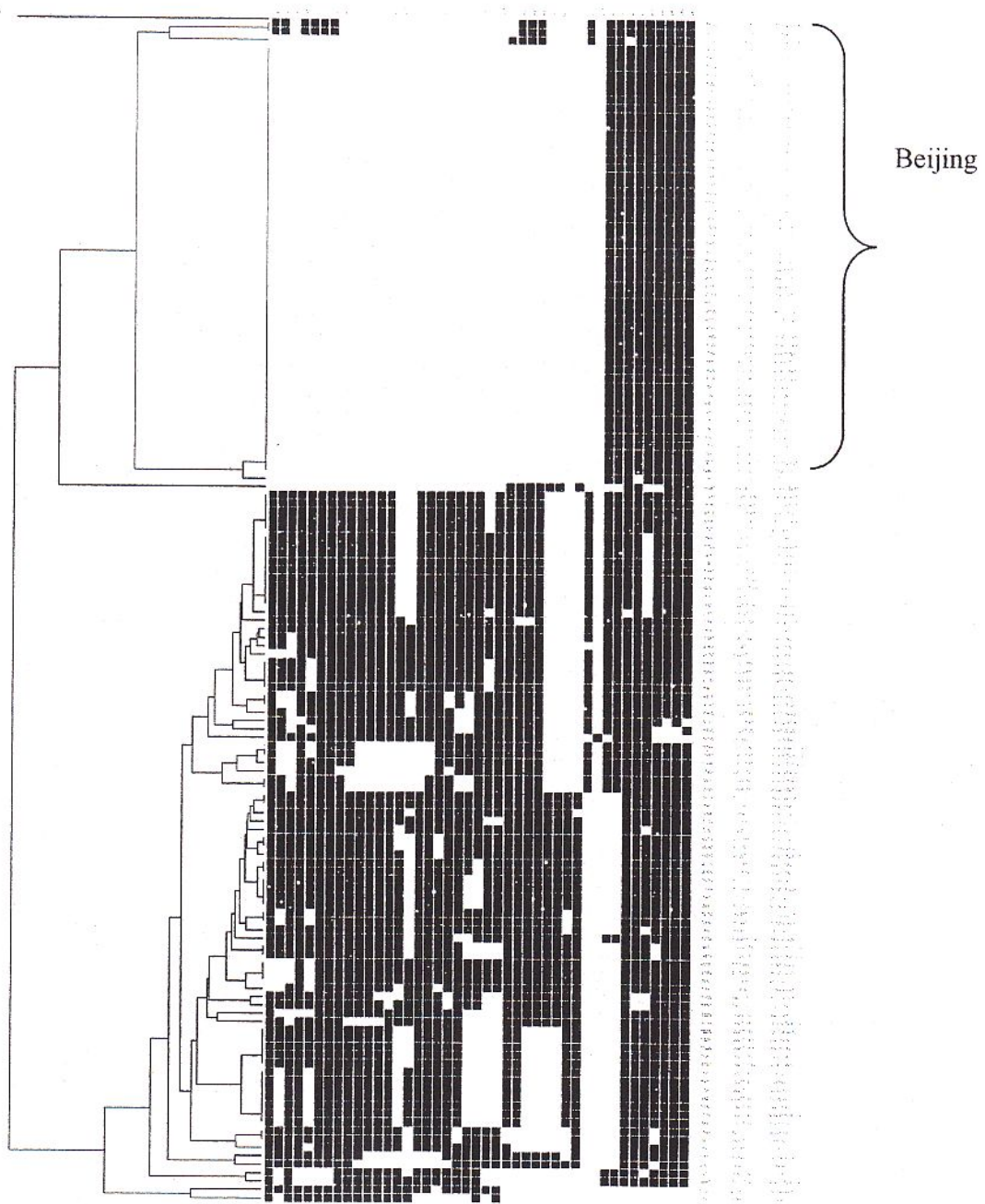
	Menado	Makassar	Mataram	Ambon	SORONG	TOTAL	%
Genotipe Beijing (fam. I)	1	4	1	-	1	7	6,4
Genotipe H (fam. A)	2	3	4	2	-	11	10
Genotipe LAM (fam. D)	4	5	1	5	3	18	16,4
Genotipe EAI (fam. F)	3	5	3	7	3	21	19,1
Genotipe T (fam. C)	1	-	3	7	1	12	10,9
Genotipe U (fam. G dan H)	2	5	2	1	1	11	10
Genotipe MANU2 (fam. Others)	1	1	-	-	-	2	1,8
PNI (fam. Others)			-	-	1	1	0,9
Africanum (fam. Others)			1	-	-	1	0,9
ORPHAN	10	4	6	-	6	26	23,6
TOTAL	24	27	21	22	16	110	100

3.3.3. Konstruksi dendrogram *Mtb* dari sampel di 16 ibu kota provinsi di wilayah Jawa, Sumatera-Kalimantan dan wilayah Timur

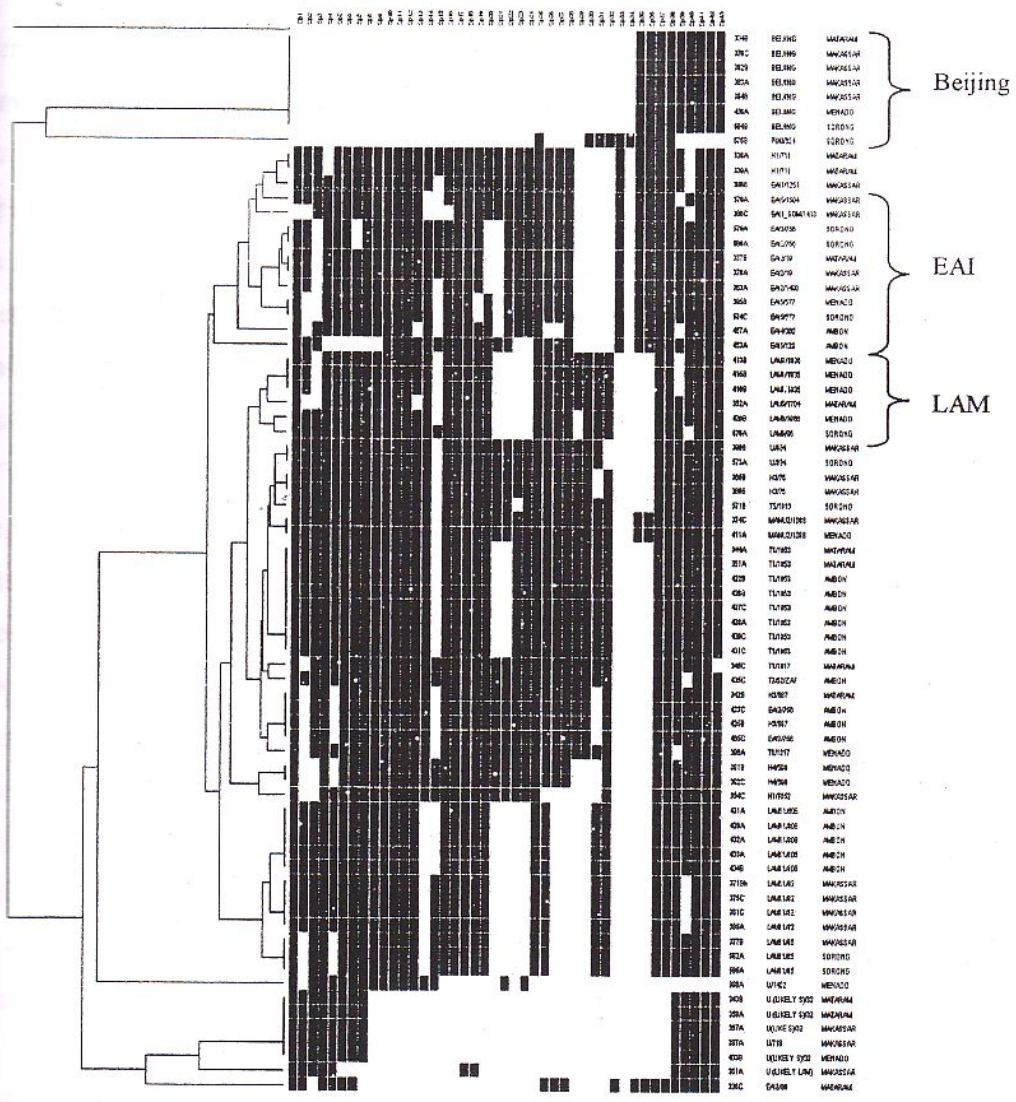
Berdasarkan pola genotipe sampel dari uji *spoligotyping*, maka disusun struktur dendrogram untuk melihat hubungan kekerabatan antar spesies per wilayah, seperti terlihat pada Gambar 4.9 sampai dengan 4.11. Konstruksi filogenetik menunjukkan bahwa seluruh sampel memiliki gen nenek moyang yang sama, dimana tipe Beijing terlihat memiliki waktu evolusi paling panjang.



Gambar 3.10. Dendrogram pola spoligotipe *Mtb* dari sampel di empat kota di wilayah Jawa (Jakarta, Bandung, Serang dan Surabaya). Dendrogram disusun menggunakan software BioNumerics v6.0.



Gambar 3.11. Dendrogram pola spoligotipe *Mtb* dari sampel di tujuh kota di wilayah Sumatera & Kalimantan (Padang, Medan, Pekanbaru, Palembang, Lampung, Banjarmasin dan Pontianak). Dendrogram disusun menggunakan software BioNumerics v6.0.



Gambar 3.12. Dendrogram pola spoligotipe *Mtb* dari sampel di lima kota di wilayah Timur Indonesia (Mataram, Makassar, Manado, Ambon dan Sorong). Dendrogram disusun menggunakan software BioNumerics v6.0.

Hasil genotipe dan penyusunan dendrogram berdasarkan data yang diperoleh memperjelas keragaman genotipe *Mtb* di Indonesia, dimana dari 437 DNA sampel (1 sampel MOTT), diperoleh 404 galur *Mtb* (92,5%) dengan 149 pola spoligo berdasarkan *data base* spoligotipe (SPOLDB4). Terdapat 32 sampel yang tidak menunjukkan hibridisasi pada membran spoligo. Pada umumnya, DNA sampel yang tidak berhasil mengeluarkan pola spoligo berasal dari lysat DNA hasil ekstraksi langsung terhadap spesimen dahak. Ekstraksi dilakukan karena bakteri tidak dapat tumbuh atau memerlukan waktu yang sangat lama untuk tumbuh di media kultur. Waktu ekstraksi dilakukan rata-rata terhadap spesimen dahak yang telah didekontaminasi dan disimpan di refco (suhu -80°C) selama 8 minggu. Beberapa rujukan menunjukkan bahwa metode *spoligotyping* memang sering gagal memberikan pola hibridisasi bila sampel DNA berasal dari spesimen dahak, meskipun dengan modifikasi teknik ekstraksi yang memadai hal ini kemudian dapat diatasi (van der Zanden, 2002; Parwati, *et.al.*, 2009). Kegagalan hibridisasi berhubungan dengan jumlah bakteri yang sangat sedikit terdapat di dalam sampel dan sekaligus diikuti kemungkinan bahwa bakteri sudah mati sehingga tidak mungkin ada replikasi. Hal ini terbukti dari hasil evaluasi, dimana 21 sampel (66%) yang tidak menunjukkan pola hibridisasi juga tidak berhasil menunjukkan pertumbuhan koloni pada media kultur, sementara 11 sampel (35%) akhirnya berhasil tumbuh di kultur. Untuk 11 sampel yang telah memiliki koloni pada media kultur maka dilakukan penyimpanan galur (*stock strain*).

Keragaman tipe *Mtb* yang bersirkulasi di Indonesia dibuktikan dengan jumlah pola spoligo yang tinggi. Sebagaimana disebutkan sebelumnya, tipe famili galur Beijing mendominasi genotipe *Mtb* di wilayah Jawa, Sumatera dan Kalimantan. Galur ini merupakan minoritas di wilayah Timur Indonesia. Penjelasan yang dapat diberikan adalah sesuai teori peta distribusi *Mtb*, terutama tipe galur Beijing, yang dikatakan mengikuti arus migrasi etnis Cina. Penularan pun terkait langsung dengan tipe populasi atau berkorelasi dengan etnis di suatu wilayah (Hanekom, *et.al.*, 2007). Pergerakan tipe galur Beijing diketahui dimulai saat migrasi penduduk dari wilayah daratan Cina ke Utara menuju Rusia, sementara sebagian lain menuju Selatan ke wilayah Asia Tenggara sebelum bergerak ke Barat menuju Afrika Selatan. Tipe Beijing menjadi dominan sepanjang jalur migrasi yang dilalui populasi tadi. (Mokrousov, *et.al.*; 2005).

#### 3.4. HASIL UJI RESISTENSI PADA KULTUR MEDIA PADAT LJ MENGGUNAKAN METODE PROPORSIONAL

Uji resistensi merupakan uji tahap lanjut terhadap isolat spesimen dahak yang berhasil dikumpulkan dari 16 ibu kota propinsi di Indonesia. Data hasil uji biokimia sebelumnya dapat menjadi tolak ukur efisiensi pengerjaan sebelum melanjutkan ke uji resistensi. Uji resistensi *Mtb* dilakukan terhadap OAT lini I, yaitu Streptomycin (S), Isoniazid (I), Rifampicin (R) dan Ethambutol (E). Uji hanya ditujukan pada sampel dari 16 ibu kota propinsi yang berhasil tumbuh di media kultur serta menunjukkan hasil positif *Mtb* pada uji biokimia.

Data spoligotyping menunjukkan bahwa 80% isolat yang berhasil diidentifikasi pada umumnya termasuk kedalam galur *Mtb* sehingga probabilitas suseptibilitas terhadap OAT lini I masih tinggi.

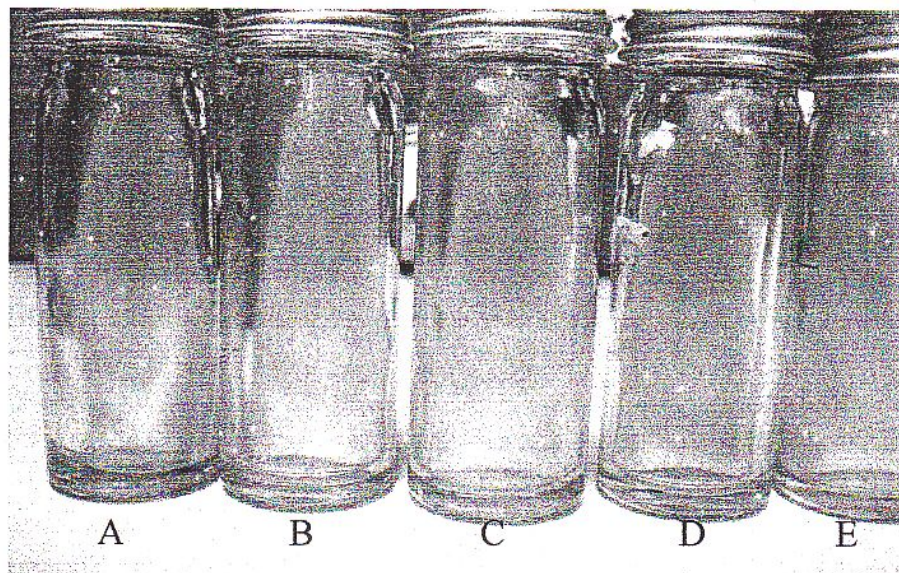
Berikut data uji resistensi untuk sampel dari 16 ibu kota provinsi di Indonesia yang dapat dilihat pada Tabel 3.7.

Tabel 3.7. Hasil uji suseptibilitas bakteri *Mtb* terhadap OAT lini I (SIRE) dari sampel penelitian di 16 ibu kota provinsi menggunakan metode proporsional

NO	NAMA KOTA	Sensitif	Resisten	MDR/ MOTT	OAT LINI I				Total
					S	I	R	E	
1.	Padang	16	7	2	4	2	2	1	25
2.	Medan	9	10	1	5	2	3	1	20
3.	Pekan Baru	11	8	1	4	2	1	1	20
4.	Palembang	16	5	-	2	2	-	1	21
5.	Lampung	10	6	5	1	2	5	2	21
6.	Serang	21	3	-	1	1	-	1	24
7.	DKI Jakarta	11	6	4	2	3	4	1	21
8.	Bandung	19	5	1	1	1	1	3	25
9.	Surabaya	18	2	-	-	1	-	1	20
10.	Mataram	11	5	-	-	5	-	-	16
11.	Makassar	20	2	-	-	2	-	-	22
12.	Menado	18	3	1	1	1	1	1	22
13.	Ambon	12	4	-	1	2	-	1	16
14.	Pontianak	15	3	1	-	2	1	1	819
15.	Banjarmasin	24	5	-	1	2	-	2	29
16.	Sorong	9	6	-	2	1	-	3	15
	TOTAL	240	80	16					336

Uji resistensi terhadap sampel dari 16 ibu kota propinsi di Indonesia telah dilakukan. Hasil menunjukkan bahwa 71% sampel menunjukkan sensitifitas atau masih suseptibel terhadap OAT lini I. Resistensi ditunjukkan oleh tidak saja famili galur Beijing, tetapi juga oleh *Mtb* galur EAI, U, T maupun LAM. Sampel juga menunjukkan adanya strain yang multi resitensi (resisten minimal INH dan Rif) sehingga perlu analisis lanjut.

Dari hasil uji juga terlihat bahwa mayoritas galur *Mtb* yang menunjukkan MDR kebanyakan terdapat pada sampel dari kota Lampung dan Jakarta, dimana genotipe yang menunjukkan resistensi adalah galur Beijing di kota Jakarta (4 dari 6 sampel) dan galur Beijing dan EAI di kota Lampung ( 3 dari 5 sampel).



Gambar.3.13. Beberapa hasil uji resistensi OAT – SIRE (metode proporsional) dari galur *Mtb* pada media LJ; dimana untuk botol A terlihat adanya koloni yang tumbuh (NTM); sementara untuk botol B – E galur terbukti *Mtb*

### 3.5. HASIL UJI SEKUENSING

#### 3.5.1. Desain primer uji sekuensing DNA isolat sampel

Setelah memperoleh data keragaman tipe *Mtb* di wilayah Indonesia dan dari literatur ditemukan bahwa gen penyandi *gyrB* merupakan gen penyandi dengan spesifisitas paling baik berdasarkan hasil optimasi metode LAMP sebelumnya (tahap II), maka langkah berikutnya adalah melakukan uji sekuensing terhadap sejumlah DNA isolat dengan primer dari *gyraseB*. Tujuan sekuensing untuk melihat tingkat konservatif gen penyandi terhadap keseluruhan isolat *Mtb* sampel yang memiliki keragaman tipe yang sangat tinggi dan sekaligus memeriksa hasil uji LAMP-TB, terutama bila LAMP-TB positif tetapi pertumbuhan koloni di media kultur negatif, atau LAMP-TB negatif tetapi terdapat pertumbuhan koloni di media kultur, serta terhadap isolat dengan hasil LAMP-TB negatif dan pertumbuhan koloni pada kultur juga negatif.

Desain primer mengambil sekuens gen *gyraseB* dari genome *Mtb* H37Rv yang memang spesifik untuk identifikasi *Mtb complex* (Kasai, 2000; Nieman, 2000; Chimara, 2004). Sekuens spesifik ditentukan di daerah promoter, dimana pada prokariotik daerah promotor (daerah spesifik) diambil di daerah sekitar gen yang dituju dari keseluruhan genome. Pada gen *gyrB* *Mtb* maka diambil sepanjang 200 bp di depan dan di belakang dari daerah 5123...7267 bp pada genome. Desain primer untuk gen *gyrB* pada penelitian ini menggunakan sekuens DNA daerah 4923...7467 bp (Fasta) dengan *software* Primer3 secara *on-line*. Sekuens pada genome yang diunduh adalah sebagai berikut:

```
GAGCCTCGAGGACGAAGCGGATCCGTATGCCGGACGTCGGGACGCACCAGGAAGAAAGATGTCCGACGCA
CGGCGCGGTTAGATGGGTAAAAACGAGGCCAGAAGATCGGCCCTGGCGCCCGATCACGGTACAGTGGTGT
ECGACCCCTGCGGCGACTCAACCGCATGCACGCAACCCCTGAGGAGAGTATTTCGGATCGTGGCTGCCCA
GAAAAAGAAGGCCCAAGACGAATACGGCGCTGCGTCTATCACCATTCTCGAAGGGCTGGAGGCCGTCCGC
AAACGTCCC CGCATGTACATTGGCTCGACCGGTGAGCGCGGTTTACACCATCTCATTTGGGAGGTGGTCCG
ACAACGCGGTTCGACGAGGCGATGGCCGGTTATGCAACCACAGTGAACGTAGTGCTGCTTGAGGATGGCGG
TGTCGAGGTGCGCCGACGACGGCCGCGCATTCCGGTTCGCCACCCACGCCTCCGGCATAACCGACCGTTCGAC
GTGGTGATGACACA ACTACATGCCGGCGGCAAGTTCGACTCGGACGCGTATGCGATATCTGGTGGTCTGC
ACGGCGTTCGGCGTGTCCGGTGGTTAACGCGCTATCCACCCGGCTCGAAGTCGAGATCAAGCGCGACGGGTA
CGAGTGGTCTCAGGTTTATGAGAAGTCGGAACCCCTGGGCCTCAAGCAAGGGGCGCCGACCAAGAAGACG
GGTCAACGGTTCGGTTCGGGCCGACCCCGCTGTTTTCGAAACCACGGAATACGACTTCGAAACCGTTCG
CCCGCCGGCTGCAAGAGATGGCGTTCCTCAACAAGGGGCTGACCATCAACCTGACCGACGAGAGGGTTCGAC
CCAAGACGAGGTTCGTCGACGAAGTGGTTCAGCGACGTCGCGGAGGCGCCGAAGTTCGGCAAGTGAACGCGCA
ECCGAATCCACTGCACCGCACAAAGTTAAGAGCGGCACCTTTCATATCCGGGTGGCCTGGTGGACTTCG
TGAAACACATCAACCGCACCAAGAACGCGATTTCATAGCAGCATCGTGGACTTTTCGGCAAGGGCACCGG
ECACGAGGTGGAGATCGCGATGCAATGGAACGCCGGGTATTTCGGAGTCGGTGCACACCTTCGCCAACACC
```

ATCAACACCCACGAGGGCGGCACCCACGAAGAGGGCTTCCGCGAGCGCGCTGACGTCGGTGGTGAACAAGT  
 ACGCCAAGGACCGCAAGCTACTGAAGGACAAGGACCCCAACCTCACCGGTGACGATATCCGGGAAGGCCCT  
 GGCCGCTGTGATCTCGGTGAAGGTGAGCGAACCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAGTTGGGCAAC  
 ACCGAGGTCAAATCGTTTGTGCAGAAGGTCTGTAACGAACAGCTGACCCACTGGTTTGAAGCCAACCCCA  
 CCGACGCGAAAGTCGTTGTGAACAAGGCTGTGTCTCGGCGCAAGCCCGTATCGCGGCACGTAAGGCACG  
 AAGTTGGTGCGGCGTAAGAGCGCCACCGACATCGGTGGATGCCCCGGCAAGCTGGCCGATTGCCGTTCC  
 ACGGATCCGCGCAAGTCCGAAGTGTATGTCTAGTAAGGTGACTCGGCCGGCGGTTCTGCAAAAAGCGGTC  
 GCGATTGATGTTCCAGGCGATACTTCCGCTGCGCGGCAAGATCATCAATGTGGAGAAAGCGCGCATCGA  
 CCGGTTGCTAAAGAACACCGAAGTTCAGGCGATCATCACGGCGCTGGGCACCGGGATCCACGACGAGTTC  
 GATATCGGCAAGCTGCGCTACCACAAGATCGTGTGATGGCCGACGCCGATGTTGACGGCCAACATATTT  
 CCACGCTGTTGTTGACGTTGTTGTTCCGGTTTCATCGGGCCGCTCATCGAGAACGGGCATGTGTTTTGGC  
 ACAACCGCCGCTGTACAACTCAAGTGGCAGCGCAGTGACCCGGAATTCGCATACTCCGACCGGAGCGC  
 GACGGTCTGCTGGAGGCGGGGCTGAAGGCCGGGAAGAAGATCAACAAGGAAGACGGCATTACGCGGTACA  
 AGGGTCTAGGTGAAATGGACGCTAAGGAGTTGTGGGAGACCACCATGGATCCCTCGGTTCTGTGTTGCG  
 TCAAGTGACGCTGGACGACGCCGCCGCCGACGAGTTGTTCTCCATCCTGATGGGCGAGGACGTCGAC  
 GCGCGGCGCAGCTTTATCACCCGCAACGCCAAGGATGTTCCGTTCTTGATGTCTAACGCAACCCTGCGT

Hasil pencarian memberikan rekomendasi primer terletak di daerah 1165 dan 1466 bp sepanjang 321 bp.

Analisis terhadap primer yang direkomendasikan dilakukan menggunakan *software* Perl Primer dan menunjukkan hasil sebagai berikut:

Forward PRIMER GCGCTGACGTCGGTGGTGAA  
 Tm: 70.22 °C Length: 20 bases GC: 65%  
 ds°: -448.13 eu dH°: -164.40 kcal/mol dG°: -25.41 kcal/mol

Reverse PRIMER ACGCCGCACCAACTCTCGTG  
 Tm: 70.25 °C Length: 20 bases GC: 65%  
 ds°: -446.93 eu dH°: -164.00 kcal/mol dG°: -25.38 kcal/mol

Most stable 3' extensible primer-dimers (at 37°C), if any:  
 Reverse vs. Reverse: -1.25 kcal/mol

5' ACGCCGCACCAACTCTCGTG 3'  
 |||.....|||  
 3' GTGCTCTCAACCACGCCGCA 5'

More stable non-extensible primer-dimers (at 37°C), if any:  
 Forward vs. Forward: -4.78 kcal/mol

5' GCGCTGACGTCGGTGGTGAA 3'  
 ....|||||.....  
 3' AAGTGGTGGCTGCAGTCGCG 5'

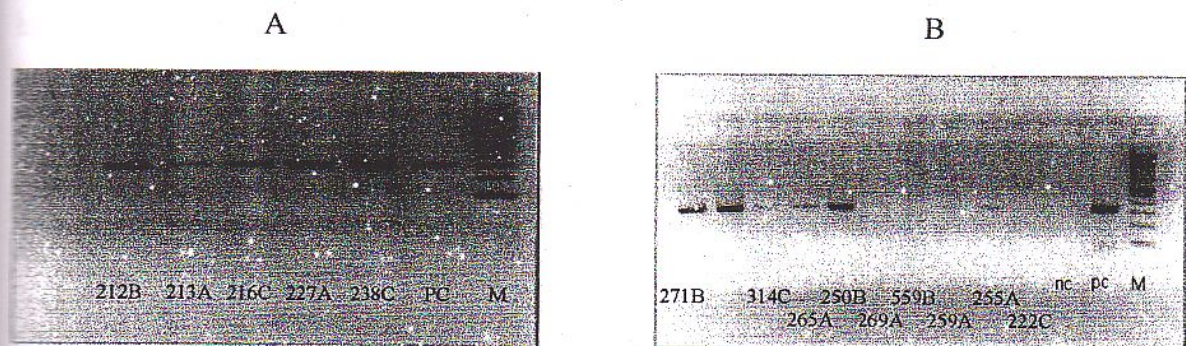
Forward vs. Reverse: -3.42 kcal/mol  
 5' GCGCTGACGTCGGTGGTGAA 3'  
 .....|||||..-  
 3' GTGCTCTCAACCACGCCGCA 5'

Reverse vs. Reverse: -2.77 kcal/mol  
 5' ACGCCGCACCAACTCTCGTG 3'  
 |||.....|||  
 3' GTGCTCTCAACCACGCCGCA 5'

### 3.5.2. Uji Sekuensing Isolat DNA Sampel

#### Purifikasi Produk PCR

Proses purifikasi dilakukan untuk memastikan hasil sekuensing nantinya dapat memberikan *electropherograms* yang jelas. Purifikasi dilakukan terhadap produk PCR dengan hasil positif *Mtb* pada membrane gel agarose 2% TAE setelah dilakukan proses elektroforesis dan diamati menggunakan Gel.Doc-XR (Biorad Diagnostic System Instrument). Hasil elektroforesis dari sejumlah isolate dapat dilihat pada gambar 3.14.



Gambar 3.14. Hasil elektroforesis produk purifikasi PCR pada gel agarose dari beberapa isolate DNA sample.

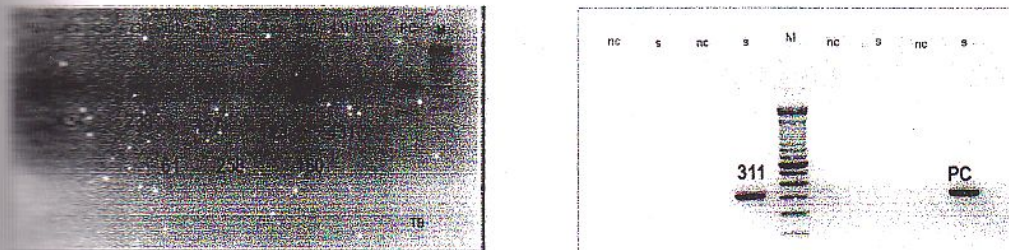
Tujuan sekuensing adalah untuk melihat tingkat konservatif gen penyandi *gyrB* pada isolate sampel, uji konfirmasi LAMP-TB serta untuk mengidentifikasi mutasi-mutasi yang mungkin ada pada galur *Mtb* dari isolate sampel.

### 3.5.3. Sekuensing isolat LAMP-TB

Uji sekuensing menggunakan mesin sekuenser 3130xl-Genetic Analyzer (Applied Biosystems Diagnostic Instrument) selain melihat tingkat konservatif gen *gyrB* terhadap seluruh isolat, juga ditujukan sebagai uji konfirmasi terhadap isolate dengan hasil LAMP-TB yang meragukan, yaitu isolate yang memberikan hasil LAMP-TB positif tetapi tidak terlihat pertumbuhan koloni di kultur media (contoh: isolate DNA no. 322) dan isolat dengan LAMP-TB negatif tetapi terlihat pertumbuhan koloni di kultur LJ (isolate DNA no. 61, 258, dan 367). Uji sekuensing menggunakan set primer hasil desain *software* Primer3

gen *gyrB* pada genome *Mtb* H37Rv, yaitu sekuens GCGCTGACGTCGGTGGTGAA untuk *Forward Primer*; dan sekuens ACGCCGCACCAACTCTCGTG untuk *Reverse Primer*.

Hasil elektroforesis produk PCR dari tiga isolat dengan uji LAMP-TB negatif dan hasil koloni kultur positif menunjukkan adanya pita pada membran elektroforesis (no.061, 367 dan 258); demikian pula isolate dengan hasil LAMP-TB positive sementara koloni tidak tampak tumbuh di kultur LJ tetap memberikan pita pada hasil elektroforesis (contoh: 311) sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 3.15. Juga terdapat hasil negatif untuk LAMP negatif (no. 455, 559). Isolat no.123 memberikan pita yang sangat tipis.



Gambar 3.15. Hasil elektroforesis gel agarose produk PCR LAMP-TB dengan primer *gyrB* gen dari sejumlah isolate DNA (baris 1 – 10) dan positive control serta M, 100 bp marker.

Hasil sekuens sampel yang meragukan kemudian dianalisis menggunakan program BLAST (NCBI).

Gambr:

Sequences 61R:

```

CGCTGACTCATCTCAGTAGTAATGGAGCAGCTTCTCCCGGTCACGATATCCGGGAAGGCCTGGCCGCTGTGAT
CTGTAAGGTCAGCGAACCGCAGTTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAGTTGGGCAACACCGAGGTCAAATCGT
TGTGAGAGGTCAGCGAACCGCAGTTTCGAGGGCCAGACCAAGTTTCGAGGGCCAGACCAAGTTGGGCAACACCGAGGTCAAATCGT
CGCTGACTCATCTCAGTAGTAATGGAGCAGCTTCTCCCGGTCACGATATCCGGGAAGGCCTGGCCGCTGTGAT

```

[NC\_01736.1] Mycobacterium tuberculosis strain ATCC 27294 DNA gyrase subunit B (*gyrB*) gene, partial cds; Length=1259

Score = 448 bits (243); Expect = 3e-123; Identities = 252/256 (99%); Gaps = 1/256 (0%); Strand=Plus/Plus

Query 35 CTC-CCGGTCACGATATCCGGGAAGGCCTGGCCGCTGTGATCTCCGTGAAGGTCAGCGAA 94

|||||

Ref 731 CTCACCGGTGACGATATCCGGGAAGGCCTGGCCGCTGTGATCTCGGTGAAGGTCAGCGAA 767

Query 35 CGGCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGTTGGGCAACACCGAGGTCAAATCGTTGTG 154

|||||

Sbjct 768 CCGCAGTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAGTTGGGCAACACCGAGGTCAAATCGTTTGTG 827

Query 155 CAGAAGGTCTGTAACGAACAGCTGACCCACTGGTTTGAAGCCAACCCACCGACGCGAAA 214  
 |||

Sbjct 828 CAGAAGGTCTGTAACGAACAGCTGACCCACTGGTTTGAAGCCAACCCACCGACGCGAAA 887

Query 215 GTCGTTGTGAACAAGGCTGTGTCCTCGGCGCAAGCCCGTATCGCGGCACGTAAGGCACGA 274  
 |||

Sbjct 888 GTCGTTGTGAACAAGGCTGTGTCCTCGGCGCAAGCCCGTATCGCGGCACGTAAGGCACGA 947

Query 275 GAGATGGTGCGGCGTA 290  
 |||

Sbjct 948 GAGTGGTGCGGCGTA 963

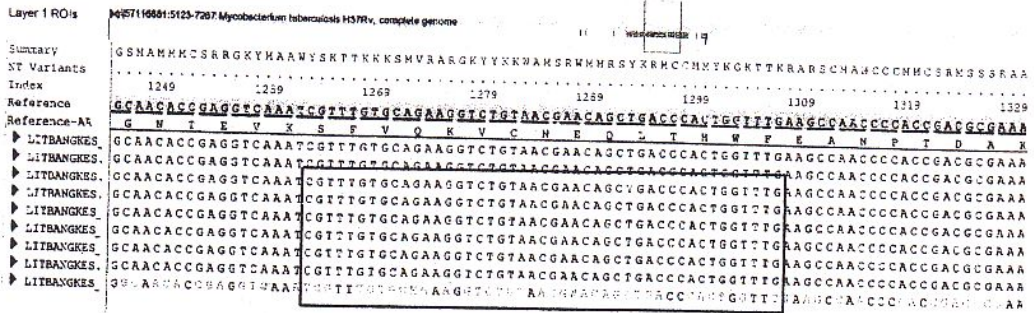
Similiritas atau kemiripan sekuens isolat dengan sekuens gen *gyrB* referensi adalah 99% dan 98%, dimana dengan nilai ini maka dikonfirmasi bahwa isolat adalah positif *Mtb*. Seluruh hasil uji konfirmasi terhadap isolat yang meragukan kemudian menunjukkan similiritas atau kemiripan sekuens berkisar antara 97% – 100% terhadap galur *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294 dari DNA gen *gyrase subunit B* (*gyrB*) serta memastikan bahwa seluruh isolat adalah spesies *Mtb*.

#### 3.5.4. Analisis sekuens genotipe *Mtb* dari isolate sampel

Uji sekuensing menggunakan mesin sekuenser 3130xl-Genetic Analyzer (Applied Biosystems Diagnostic Instrument) dilakukan terhadap sejumlah isolat sampel yang telah dipurifikasi. Pemilihan sampel terutama ditujukan pada galur-galur mayoritas di wilayah Indonesia, terutama galur Beijing di wilayah Jawa, Sumatera dan Kalimantan, serta galur famili EAI dan LAM. Seluruh galur kemudian dianalisis menggunakan program Secscape V5 untuk memastikan homologi spesies per wilayah, yaitu tipe spesies di kota-kota di pulau Jawa, Sumatera-Kalimantan, dan di wilayah Timur Indonesia. Kemudian seluruh spesies dengan tipe yang sama dilihat homologinya antar wilayah.

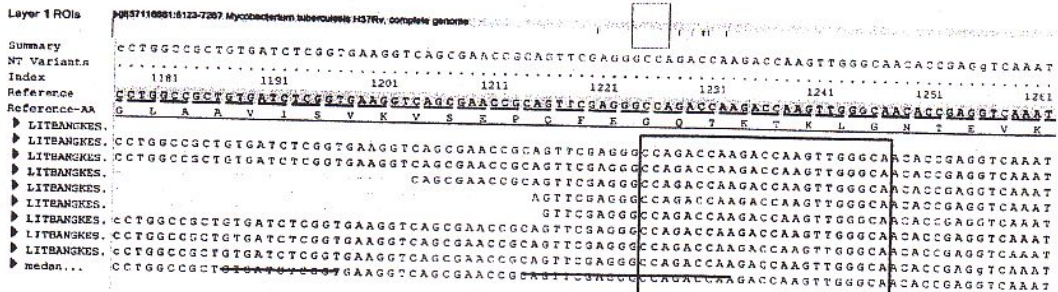
Hasil analisis terhadap seluruh sekuens spesies *Mtb* sampel menunjukkan kenyataan bahwa terdapat daerah homolog di sekuens gen *gyrB*, yaitu pada daerah 1098-1394 bp dari genome. Beberapa gambaran homologi sekuens setiap sub-tipe per wilayah dapat dilihat pada gambar 3.16 dan 3.17:

Project: Beijing\_Jawa (Expanded NT)



Gambar 3.16. Daerah homolog pada sekuens *gyrB* galur famili Beijing dari isolat *Mtb* wilayah Jawa

Project: MTB\_LAM (Expanded NT)



Gambar 3.17. Daerah homolog pada sekuens *gyrB* genotipe famili LAM dari isolat *Mtb* wilayah Jawa, Sumatera – Kalimantan dan Kawasan Timur Indonesia

### 3.5.5. Analisis mutasi pada fragmen sekuens

Analisis mutasi terhadap fragmen sekuens isolat dilakukan dengan menggunakan program SeqScape V2.5 ditujukan untuk mengidentifikasi *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) atau mutasi lain yang terdapat pada masing-masing isolat. Analisis dilakukan setelah memastikan konsensus sekuens berdasarkan data *electropherogram* isolat. Contoh analisis mutasi yang dilakukan dapat dilihat terhadap beberapa isolat famili Beijing berikut:

Isolat 212:

Setelah dilakukan analisis data *electropherogram*, sekuens memiliki 4 mutasi, yaitu:

- a) Posisi 1140: G>A; substitusi dengan QV (Avg) 18; sifat tidak diketahui; efek *silent*.
- b) Posisi 1142: A>G; substitusi dengan QV (Avg) 17; sifat tidak diketahui; efek *missence*; perubahan Asam amino: D381G.

Homologi terhadap sekuen *gyrB* reference: 276/278 bp (%) = 99,28%

Isolat 227 dan 238:

Setelah dilakukan analisis data *electropherogram*, maka notasi pada basa yang meragukan terlihat jelas sehingga perubahan basa kemudian dilakukan secara manual dan menunjukkan perubahan dimana *tidak terlihat lagi mutasi pada sekuens*. Homologi terhadap sekuen *gyrB* reference: 285/285 bp (%) = 100%. Terdapat pula beberapa fragmen sekuens yang tidak menunjukkan mutasi apapun pada susunan basa yang ada dibanding sekuens referensi, seperti fragmen sekuens isolat 217.

### 3.6. Uji LAMP

#### 3.6.1. Optimasi LAMP pada sampel dahak pasien TB Indonesia

Uji LAMP dengan menggunakan primer *gyrB* (Iwamoto, *et.al.*) dilakukan terhadap DNA 122 sampel pasien TB di Indonesia yang berasal dari 14 kota, yaitu kota: Padang, Pekanbaru, Lampung, Palembang, Medan, Serang, Jakarta, Bandung, Surabaya, Pontianak, Banjarmasin, Makassar, Ambon, dan Sorong, yang telah dipilih secara random acak ganda, diuji DNA hasil ekstraksinya secara LAMP. Rekap hasil uji dapat dilihat pada tabel 3.8:

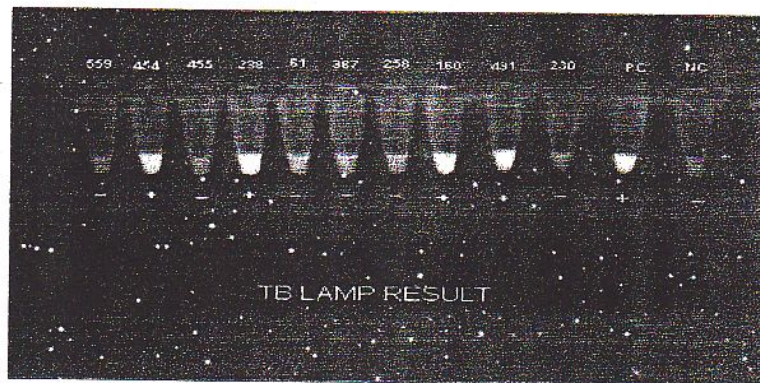
Tabel 3.8. Hasil Uji LAMP dengan primer *gyrB* (Iwamoto *et.al.*) pada 122 sampel pasien TB di Indonesia

NO	NO SAMPEL	HASIL LAMP	HASIL KULTUR	GENO TIPE	NO	NO SAMPEL	HASIL LAMP	HASIL KULTUR	GENO TIPE
1	01/01/001	+	+	LAM	31	07/09/251B	+	+	EAI
2	01/02/037	+	+	NH	32	07/09/255B	+	+	EAI
3	02/03/061**	-	+	H	33	07/09/258B**	-	+	EAI
4	02/03/062	+	+	Beijing	34	07/09/259B	+	+	EAI
5	02/03/066	+	+	T	35	07/09/260B	+	+	EAI
6	02/03/068	+	+	Beijing	36	15/18/511A	+	+	LAM
7	02/03/069	+	+	EAI	37	15/19/544A	+	+	CAS
8	02/03/071	+	+	EAI	38	15/19/546B	+	+	Beijing
9	02/03/072	+	+	Beijing	39	15/19/549C	+	+	X1
10	02/03/073	+	+	T	40	15/19/553A	+	+	LAM
11	02/03/074	+	+	T	41	15/19/558B	+	+	EAI
12	02/03/075	+	+	T	42	15/19/557A	+	+	Orphan
13	02/03/077	+	+	Beijing	43	15/19/559C*	-	-	NH
14	07/09/241	+	+	EAI	44	01/02/031B	+	+	LAM
15	07/09/243	+	+	EAI	45	01/02/032B	+	+	H
16	07/09/244	+	+	U	46	04/06/151B	+	+	Beijing
17	02/03/081B	+	+	Beijing	47	04/06/152B	+	+	Orphan
18	02/03/082B	+	+	Beijing	48	04/06/160B	+	+	Beijing
19	02/03/083B	+	+	NH	49	04/06/162B	+	+	EAI
20	02/03/084C***	+	-	NH	50	04/06/164B	+	+	EAI
21	02/03/090B***	+	-	NH	51	04/06/165C	+	+	U
22	05/07/181B	+	+	T	52	05/07/184B***	+	-	H
23	05/07/182B	+	+	LAM	53	05/07/189B	+	+	Beijing
24	05/07/185B	+	+	Beijing	54	05/07/191B	+	+	Beijing
25	05/07/186B	+	+	EAI	55	05/07/193B	+	+	LAM
26	11/13/363B	+	+	EAI	56	05/07/195C	+	+	Beijing
27	11/13/364B	+	+	H	57	05/07/196B	+	+	Beijing
28	11/13/367B**	-	+	U/S	58	09/11/311A	+	+	LAM
29	11/13/368B	+	+	Orphan	59	09/11/312B	+	+	H37Rv
30	07/09/250B	+	+	U	60	09/11/313B***	+	-	LAM

NO	NO SAMPEL	HASIL LAMP	HASIL KULTUR	GENO TIPE	NO	NO SAMPEL	HASIL LAMP	HASIL KULTUR	GENO TIPE
61	09/11/314B	+	+	Beijing	94	08/10/282	+	+	H
62	09/11/319B	+	+	EAI	95	08/10/287	+	+	Beijing
63	09/11/320B	+	+	MANU	96	08/10/290	+	+	Beijing
64	09/11/321B	+	+	EAI	97	08/10/293	+	+	EAI
65	09/11/322B***	+	-	LAM	98	06/08/212	+	+	Beijing
66	09/11/326B	+	+	Orphan	99	06/08/213	+	+	Beijing
67	09/11/328B	+	+	Beijing	100	06/08/215	+	+	EAI
68	13/15/423B	+	+	EAI	101	06/08/216***	+	-	NH
69	13/15/425B	+	+	H	102	06/08/218	+	+	U
70	13/15/426B	+	+	T	103	06/08/219	+	+	LAM
71	13/15/427B	+	+	T	104	06/08/221*	-	-	LAM
72	13/15/428B	+	+	T	105	06/08/222*	-	-	Beijing
73	13/15/430B	+	+	T	106	06/08/230*	-	-	CAS
74	13/15/431B	+	+	T	107	06/08/238	+	+	Beijing
75	13/15/453A***	+	-	U	108	11/13/374	+	+	MANU
76	13/15/454C***	+	-	EAI	109	11/13/375	+	+	LAM
77	13/15/455B**	-	-	NH	110	11/13/381	+	+	LAM
78	14/17/483	+	+	Beijing	111	11/13/385	+	+	LAM
79	14/17/490	+	+	EAI	112	11/13/390	+	+	U
80	14/17/491	+	+	X1	113	14/17/492	+	+	EAI
81	14/17/493	+	+	X1	114	14/17/497	+	+	T
82	14/17/498	+	+	T	115	14/17/505	+	+	T
83	16/20/571	+	+	T	116	03/04/92***	+	-	Beijing
84	16/20/573	+	+	U	117	03/04/97***	+	-	Orphan
85	16/20/576	+	+	LAM	118	03/04/123***	+	-	Beijing
86	16/20/577	+	+	Orphan	119	03/04/129	+	+	Beijing
87	16/20/579	+	+	EAI	120	03/04/137	+	+	T
88	16/20/580	+	+	Orphan	121	05/07/198***	+	-	Orphan
89	16/20/582***	+	-	EAI	122	09/11/300B***	+	-	Beijing
90	08/10/273	+	+	Beijing					
91	08/10/275	+	+	Beijing					
92	08/10/276	+	+	H					
93	08/10/278	+	+	H					

- Keterangan: Tanda \* = untuk sampel dengan LAMP negatif; kultur tidak tumbuh  
Tanda \*\* = untuk sampel dengan LAMP negatif; kultur tumbuh  
Tanda \*\*\* = untuk sampel dengan LAMP positif; kultur tidak tumbuh  
NH = No Hibrid  
EAI = *East African-Indian*  
LAM = *Latin American-Mediterranean*  
H = *Haarlem*  
U = *Undefined*  
CAS = *Central Asia Strain*

Uji LAMP dilakukan pada 122 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 3.18, yaitu positif pada isolat no 454, 138, 160 dan 431. Sementara isolat no. 559, 455, 61, 367 dan 258 menunjukkan reaksi negatif.



Gambar 3.18. Hasil visual uji LAMP-TB dengan primer *gyrB* Iwamoto, *et.al.*, indikator *fluorescent detection reagent* serta instrumen penangas air. Tube no.1 - Tube no.10: [DNA] sampel; Tube no.11: [100] PFU *Mtb* H37Rv; Tube no.12: DW (negatif kontrol).

Hasil uji LAMP pada sampel pasien TB Indonesia dengan menggunakan pertumbuhan kultur bakteri sebagai baku emas (Tabel 3.9.), memberikan hasil yaitu: 100 sampel dengan LAMP positif dimana sampel juga menunjukkan pertumbuhan koloni pada media kultur (positif uji biokimia), serta 5 sampel dengan LAMP negatif dimana sampel juga tidak menunjukkan pertumbuhan koloni pada media kultur. Sementara itu, terdapat sejumlah sampel dengan hasil meragukan, yaitu 14 sampel dengan hasil uji LAMP positif tetapi sampel tidak menunjukkan pertumbuhan koloni pada media kultur dan 3 sampel dengan hasil uji LAMP negatif tetapi sampel menunjukkan pertumbuhan koloni pada media kultur (uji biokimia positif).

Tabel 3.9. Hasil uji LAMP-TB menggunakan primer *gyrB* Iwamoto, *et.al.* pada 122 sampel pasien TB Indonesia dibandingkan dengan pertumbuhan kultur bakteri

	Kultur (+)	Kultur (-)
LAMP Test (+)	100	14
LAMP Test (-)	3	5

Terhadap hasil yang meragukan, yaitu hasil LAMP positif tetapi tidak terjadi pertumbuhan koloni pada media kultur serta hasil LAMP negatif tetapi terdapat pertumbuhan koloni pada media kultur, maka dilakukan konfirmasi dengan uji sekuensing atau merujuk pada hasil *spoligotyping*. Konfirmasi juga dilakukan untuk hasil uji LAMP negatif dan pertumbuhan kultur juga negative.

Setelah memperoleh hasil analisis terhadap sekuens DNA hasil sekuensing dari sejumlah sampel dengan uji LAMP yang meragukan, maka dilakukan analisis hasil sebagai konfirmasi akhir untuk menghitung nilai sensitifitas primer uji. Analisis dilakukan dengan membandingkan hasil uji LAMP dengan kultur, sekuensing dan spoligotipe (Tabel 3.10).

Tabel 3.10. Hasil konfirmasi uji LAMP dibandingkan dengan kultur, hasil analisis sekuensing dan pola spoligotipe sampel

NO	NO SAMPEL	HASIL LAMP	HASIL KULTUR	HASIL SEQ	GENO TIPE	NO	NO SAMPEL	HASIL LAMP	HASIL KULTUR	HASIL SEQ	GENO TIPE
1	02/03/061	-	+	+	H	12	13/15/455	-	-	-	NH
2	02/03/084	+	-	+	NH	13	16/20/582	+	-	+	EAI
3	02/03/090	+	-	+	NH	14	06/08/216	+	-	+	NH
4	11/13/367	-	+	+	U	15	06/08/221	-	-	TD	LAM
5	07/09/258	-	+	+	EAI	16	06/08/222	-	-	TD	Beijing
6	16/19/559	-	-	+	NH	17	06/08/230	-	-	TD	CAS
7	05/07/184	+	-	+	H	18	03/04/092	+	-	+	Beijing
8	09/11/313	+	-	+	LAM	19	03/04/097	+	-	+	Orphan
9	09/11/322	+	-	+	LAM	20	03/04/123	+	-	+	Beijing
10	13/15/453	+	-	+	U	21	05/07/198	+	-	TD	Orphan
11	13/15/454	+	-	+	EAI	22	09/11/300	+	-	+	Beijing

D = tidak dilakukan ; NH= No Hibrid

Berdasarkan hasil konfirmasi akhir maka sensitivitas primer *gyrB* (Iwamoto, *et.al.*) untuk uji LAMP-TB pada 122 sampel pasien TB di Indonesia dengan BTA positif atau disebut juga *positivity rate* adalah 94,2% (114/121), dapat dilihat pada Tabel 3.11.

Tabel 3.11. Hasil uji LAMP-TB menggunakan primer *gyrB* Iwamoto, *et.al.* terhadap 122 sampel pasien TB di Indonesia setelah konfirmasi dengan uji sekuensing dan data spoligotipe

	Kultur (+) dan / atau PCR (+)	Kultur (-) dan PCR (-)
LAMP Test (+)	114	-
LAMP Test (-)	7	1

### 3.6.2. Uji Sensitifitas Primer LAMP Indonesia

Desain primer LAMP dikerjakan menggunakan *software* Primer Explorer V3 dari Eiken Genome *site* setelah melihat tingkat konsaervatif gen *gyrB* yang sangat tinggi terhadap sampel. Desain primer ditujukan pada sampel yang berasal dari kota Jakarta, yang merupakan kota dengan angka prevalensi nasional Tuberkulosis Paru cukup tinggi di Indonesia. Prototipe primer dipilih dari isolat yang menunjukkan mutasi pada pasangan basa hasil sekuensing, yaitu isolat 212 dari kota Jakarta. Hasil pengunduhan dari *software* LAMP adalah sebagai berikut:

Generating...DesignID = 101110204457

Number of Primer Candidates:

F1=113, F2=91, F3=110, B1=99, B2=89, B3=116, FIP=172, BIP=180

1000 Primer set(s) were generated:

Dari 1000 set primer hasil pengunduhan kemudian dipilih beberapa kandidat set primer dengan dG terkecil, yaitu 12 set primer yang dapat dilihat pada Lampiran 9. Dari seluruh kandidat primer set terdapat dua primer set yang hanya memiliki 1 pasangan serta memiliki DG terkecil, yaitu pasangan set primer ID:27 dengan ID:63; dan ID:47 dengan ID:59. Posisi seluruh primer set *gyrB* pada genome H37Rv adalah sebagai berikut:

- a. ID:27 berada pada daerah 6220...6422 bp
- b. ID:63 berada pada daerah 6220...6421 bp
- c. ID:47 berada pada daerah 6247...6479 bp
- d. ID:59 berada pada daerah 6247...6479 bp

Optimasi primer dilakukan untuk dapat memperoleh prosedur kerja baku yang akan memberikan hasil reaksi yang optimal. Prosedur kerja baku yang disusun diharapkan dapat memberikan nilai sensitifitas yang tinggi pada saat dilakukan uji LAMP pada isolat sampel. Indikator-indikator yang dianalisis pada saat proses optimasi primer adalah: suhu proses amplifikasi, jumlah konsentrasi primer dan isolat serta jumlah konsentrasi sistem deteksi (reagen fluoresensi).

Uji sensitifitas primer *gyrB* LAMP Indo.C dilakukan menggunakan sampel serial larutan DNA *Mtb* H37Rv. Konsentrasi awal larutan DNA diukur menggunakan DNA-meter (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) dan konsentrasi serial larutan dibuat melalui pengenceran sepersepuluh kali atau  $10^{-1}$ , yaitu: [10 ng/ $\mu$ l]; [1 ng/ $\mu$ l]; [100 pg/ $\mu$ l]; [10 pg/ $\mu$ l]; [1 pg/ $\mu$ l]; [100 fg/ $\mu$ l]; [10 fg/ $\mu$ l]; [1 fg/ $\mu$ l]. Hasil uji dapat dilihat pada Tabel 3.12 yang menggambarkan bahwa primer *gyrB* desain Indonesia untuk LAMP –TB mampu mengamplifikasi DNA sampai dengan konsentrasi [100 fg/ $\mu$ l].

Tabel 3.12. Sensitivitas primer *gyrB* LAMP Indo.C

Primers	Dilution of purified DNA concentration <i>Mtb. H37Rv</i>							
	10 ng/ $\mu$ l	1 ng/ $\mu$ l	100 pg/ $\mu$ l	10 pg/ $\mu$ l	1 pg/ $\mu$ l	100 fg/ $\mu$ l	10 fg/ $\mu$ l	1 fg/ $\mu$ l
<i>gyrB</i> Indo.C	+	+	+	+	+	+	-	-

Sensitivitas primer *gyrB* LAMP Indo.C yang diuji pada sejumlah serial konsentrasi larutan DNA *Mtb H37Rv* menunjukkan bahwa primer set mampu mengidentifikasi hingga 100 fg/ $\mu$ l DNA *Mtb H37Rv* setelah inkubasi selama 60 menit. Sensitivitas primer *gyrB* LAMP Indo.C terbukti lebih tinggi dibanding primer *gyrB* Iwamoto, *et.al.* yang hanya mampu mengidentifikasi hingga 1 pg/ $\mu$ l DNA *Mtb H37Rv* berdasarkan hasil uji validasi LAMP yang dilakukan pada penelitian ini. Hasil uji LAMP menggunakan primer *gyrB* spesifik Indonesia terhadap 85 isolat sampel pasien TB dapat dilihat pada Tabel 3.13. berikut:

Tabel 3.13. Hasil Uji LAMP dengan primer *gyrB* Indonesia pada 85 isolat sampel

NO	NO SAMPEL	HASIL LAMP	HASIL KULTUR	GENO TIPE	NO	NO SAMPEL	HASIL LAMP	HASIL KULTUR	GENO TIPE
1	01/01/001	+	+	LAM	44	01/02/031B	+	+	LAM
2	01/02/037	+	+	NH	45	01/02/032B	+	+	H
3	02/03/061	+	+	H	46	04/06/151B	+	+	Beijing
4	02/03/062	+	+	Beijing	47	04/06/152B	+	+	Orphan
5	02/03/066	+	+	T	48	04/06/160B	-	-	Beijing
6	02/03/068	+	+	Beijing	49	04/06/162B	+	+	EAI
7	02/03/069	+	+	EAI	50	04/06/164B	+	+	EAI
8	02/03/071	+	+	EAI	51	04/06/165C	+	+	U
9	02/03/072	+	+	Beijing	52	05/07/184B	+	-	H
10	02/03/073	+	+	T	53	05/07/189B	+	+	Beijing
11	02/03/074	+	+	T	54	05/07/191B	+	+	Beijing
12	02/03/075	+	+	T	55	05/07/193B	+	+	LAM
13	02/03/077	-	-	Beijing	56	05/07/195C	+	+	Beijing
14	07/09/241	+	+	EAI	57	05/07/196B	+	+	Beijing
15	07/09/243	+	+	EAI	58	09/11/311A	+	+	LAM
16	07/09/244	+	+	U	59	09/11/312B	+	+	H37Rv
17	02/03/081B	+	+	Beijing	60	09/11/313B	+	-	LAM
18	02/03/082B	+	+	Beijing	61	09/11/314B	+	+	Beijing
19	02/03/083B	+	+	NH	62	09/11/319B	+	+	EAI
20	02/03/084C	+	-	NH	63	09/11/320B	+	+	MANU
21	02/03/090B	+	-	NH	64	09/11/321B	+	+	EAI
22	05/07/181B	+	+	T	65	09/11/322B	+	-	LAM
23	05/07/182B	+	+	LAM	66	09/11/326B	+	+	Orphan
24	05/07/185B	+	+	Beijing	67	09/11/328B	+	+	Beijing
25	05/07/186B	+	+	EAI	68	13/15/423B	+	+	EAI
26	11/13/363B	+	+	EAI	69	13/15/425B	+	+	H
27	11/13/364B	+	+	H	70	13/15/426B	+	+	T
28	11/13/367B	+	+	U/S	71	13/15/427B	+	+	T
29	11/13/368B	+	+	Orphan	72	13/15/428B	+	+	T
30	07/09/250B	+	+	U	73	13/15/430B	+	+	T
31	07/09/251B	+	+	EAI	74	13/15/431B	+	+	T
32	07/09/255B	+	+	EAI	75	13/15/453A	+	-	U
33	07/09/258B	+	+	EAI	76	13/15/454C	+	-	EAI
34	07/09/259B	+	+	EAI	77	13/15/455B	-	-	NH
35	07/09/260B	+	+	EAI	78	14/17/483	+	+	Beijing
36	15/18/511A	+	+	LAM	79	14/17/490	+	+	EAI
37	15/19/544A	+	+	CAS	80	14/17/491	-	-	X1
38	15/19/546B	+	+	Beijing	81	14/17/493	+	+	X1
39	15/19/549C	+	+	X1	82	14/17/498	+	+	T
40	15/19/553A	+	+	LAM	83	16/20/571	+	+	T
41	15/19/558B	+	+	EAI	84	16/20/573	+	+	U
42	15/19/557A	+	+	Orphan	85	06/08/217	+	+	Beijing
43	15/19/559C	-	-	NH					

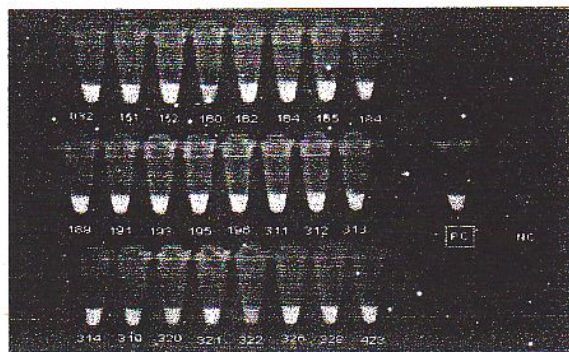
Keterangan: Warna merah = untuk isolat dengan hasil LAMP negatif; kultur negatif  
 Warna ungu = untuk isolat dengan hasil LAMP negatif; kultur positif  
 Warna biru = untuk isolat dengan hasil LAMP positif; kultur negatif

Berdasarkan hasil pertumbuhan koloni pada media kultur dan hasil PCR/analisis sekuensing atau data spoligotipe sebagai uji baku emas, maka sensitivitas primer *gyrB* LAMP Indo.C terhadap 85 sampel lysat DNA pasien TB dengan BTA positif atau *positivity rate* adalah 97,6% (82/84). Hasil dapat dilihat pada Tabel 3.14.

Tabel 3.14. Hasil uji primer *gyrB* LAMP Indo.C pada 85 sampel lysat DNA pasien TB dibandingkan dengan kultur bakteri dan uji PCR serta sekuensing

	Kultur (+) atau PCR (+)	Kultur (-) dan/ atau PCR (-)
LAMP Test (+)	82	-
LAMP Test (-)	2	1

Deteksi hasil akhir LAMP dari sebagian hasil uji dapat dilihat pada gambar 3.19.



Gambar 3.19. Hasil visualisasi uji LAMP-TB pada sejumlah isolat pasien TB menggunakan primer *gyrB* Indonesia, indikator *fluorescent detection reagent* serta instrument penangas air.

Dari optimasi uji LAMP maka dapat dinyatakan bahwa metode ini merupakan metoda yang sederhana untuk mengamplifikasi DNA *Mtb* pada suhu tetap menggunakan 6 *primers* set yang berasal dari sekuens *highly conserved gene gyrB* pada *Mtb* H37Rv.

## BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN

### 4.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Uji *spoligotyping* pada 437 spesimen dahak pasien TB memperjelas keragaman genotipe *Mtb* di Indonesia, dimana dari hasil uji diperoleh 404 galur *Mtb* dengan 149 pola spoligo berdasarkan *database* pola spoligotipe terakhir yaitu *the fourth international spoligotyping database* (SpolDB4), dan dari data ini dapat disusun pohon filogenetik atau dendrogram *Mtb* di Indonesia.
2. Mayoritas galur *Mtb* yang terdapat pada sampel dari wilayah Jawa adalah galur tipe Beijing yang terdiri dari 34 sampel (30,6%), diikuti oleh famili F (tipe EAI/*East African-Indian*) sejumlah 22 sampel (19,8%) serta famili G dan H (tipe U/*Undefined*) sejumlah 13 sampel (11,7%).
3. Mayoritas galur *Mtb* yang terdapat pada sampel dari wilayah Sumatera dan Kalimantan adalah famili I (tipe galur famili W-Beijing) sejumlah 52 sampel (28,4%), diikuti oleh famili F (tipe EAI/*East African-Indian*) dengan 40 sampel (21,9%) dan famili D (tipe LAM/*Latin American-Mediterranean*) sejumlah 21 sampel (11,5%).
4. Mayoritas galur *Mtb* yang terdapat pada sampel dari wilayah Timur Indonesia didominasi oleh famili F (tipe EAI) sejumlah 21 sampel (19,1%), kemudian famili D (tipe LAM) sejumlah 18 sampel (16,4%) dan famili C (tipe T) dan famili G serta H (tipe U) yang masing-masing sejumlah 12 dan 11 sampel (10,9%) dan (10%).
5. Uji resistensi menunjukkan bahwa bahwa 71% sampel masih menunjukkan sensitifitas atau masih suseptibel terhadap OAT lini I. Resistensi ditunjukkan oleh tidak saja famili galur Beijing, tetapi juga oleh *Mtb* galur EAI, U, T maupun LAM.

6. Sampel yang menunjukkan MDR (resisten minimal INH dan Rif) kebanyakan terdapat pada sampel dari kota Lampung dan Jakarta, dimana genotipe yang menunjukkan resistensi adalah galur Beijing di kota Jakarta (4 dari 6 sampel) dan galur Beijing dan EAI di kota Lampung ( 3 dari 5 sampel).
7. Uji sekuensing menggunakan primer *gyrB* (**primer Indo.A**) terhadap sejumlah DNA *Mtb* dalam sampel penelitian menunjukkan terdapat daerah sekuens *highly conserved* pada nt 1098-1394 di *gyrB* genome *Mtb* H37Rv (**daerah fragmen sekuens Indo.B**).
8. Desain primer LAMP berdasarkan sekuens *highly conserved* memberikan prototipe primer LAMP Indonesia pada nt 1097-1298 *gyr B Mtb* H37Rv (**primer LAMP Indo.C**).
9. Uji optimasi primer *gyrB* LAMP Indo.C pada serial larutan DNA *Mtb* H37Rv menunjukkan bahwa primer set dapat mengamplifikasi sampai dengan [100 fg/ $\mu$ l] DNA *Mtb* H37Rv.
10. Uji optimasi primer *gyrB* LAMP Indo.C pada 85 sampel spesimen dahak pasien TB Indonesia, yang merupakan bagian dari sampel uji validasi LAMP, serta dengan menggunakan peralatan laboratorium sederhana; yaitu instrumen amplifikasi penangas air dan sistem deteksi lampu uv fluoresensi, memberikan hasil sensitifitas atau *positivity rate* lebih kurang 97,6% (82/84), dimana hasil ini sekaligus membuktikan bahwa primer set LAMP Indo.C mampu mengenali seluruh tipe dan sub-tipe *Mtb* di Indonesia dan lebih sensitif dibanding primer *gyrB* LAMP (Iwamoto, *et.al.*) yang dengan jumlah sampel sama memberikan nilai sensitifitas atau *positivity rate* lebih kurang 95,2% (80/84) pada uji validasi sebelumnya.
11. Protokol LAMP untuk diagnosis TB di Indonesia (**Protokol Indo.D**), yang disusun menggunakan primer set *gyrB* hasil karakteristik *Mtb* di Indonesia, dengan peralatan kerja sederhana, yaitu penangas air untuk instrumen amplifikasi dan lampu UV fluoresensi untuk sistem deteksi, dapat diaplikasikan pada laboratorium diagnostik standard di Indonesia.

#### 4.2. Saran

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

1. Perlu dilakukan uji genotipe per wilayah dengan sampel yang lebih besar untuk dapat mewakili epidemiologi filogenetik *Mtb* per populasi di Indonesia.
2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sekuens *highly conserved* pada *gyrB* genome *Mtb* H37Rv merupakan sekuens yang dapat mengenali seluruh tipe *Mtb* di Indonesia sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap sekuens gen untuk memperoleh primer diagnostik molekular lain, seperti primer resistensi.
3. Perlu dilakukan uji LAMP menggunakan primer *gyrB* desain Indonesia terhadap spesimen klinis pasien suspek TB dan pasien non suspek TB di fasilitas kesehatan masyarakat (*hospital base*), sehingga primer LAMP desain Indonesia memiliki data sensitifitas dan spesifitas uji yang lengkap.
4. Harus dilakukan pengembangan formulasi reagen ekstraksi dan reagen amplifikasi untuk diagnostik LAMP agar dapat menunjang kemandirian serta kesinambungan proses kerja diagnostik molekular LAMP-TB di Indonesia.

BAB 5  
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. 2008. 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. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. 2005. Medical Microbiology: *Mycobacterium*. Fifth ed. Elsevier MOSBY. Philadelphia USA. 297-310.
7. 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.
8. van Soolingen, D. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J.Intern.Med*. 249:1-26.
9. Al-hajoj, S., et.al. 2007. First Insight into Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia. *J. Clin. Microbiology*. 45: 2467 – 2473.
10. 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
11. Achkar, J.M., Jenny-Avital, E., Yu, X., Burger, S., Leibert, E., Bilder, P.W., Almo, S.C., Casadevall, A. and Laal, S. 2010. Antibodies against Immunodominant Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in Subjects with Suspected Tuberculosis in the United States Compared by HIV Status. *Clinical And Vaccine Immunology*. 17 (3): 384–392.
12. 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.
13. Chimara, E. , Ferrazoli, L. and *Leão*, S.C. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* Complex Differentiation Using *gyrB* Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 99 (7): 745-748.

14. van der Zanden, A. 2002. Spoligotyping, a tool in epidemiology, diagnosis and control of tuberculosis. Thesis. Medical Microbiology and Infecious Disease, Iocation Lukas, Gelre Hospitals, Apeldoorn, Bilthoven, The Netherlands.
15. 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.
16. Subdit TB. 2009. Laporan Akhir Tahun. Ditjen. Pemberantasan Penyakit Menular – Penyehatan Lingkungan (P2MPL), Depkes RI. Jakarta.
17. World Health Organisation (WHO), *New Technologies for Tuberculosis Control: A framework for their adoption, introduction and implementation*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. France. 2007.
18. Iwamoto, T., dkk. *Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M. avium, and M. intracellulare in Dahak Samples*. USA.; *J. Clin. Mikrobiology*. 2003; 41: 2616 – 2622.
19. Notomi, T., dkk. *Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA Nucleic Acids Res*. 2007. 28:e63.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Keseluruhan penelitian dibiayai oleh dana DIPA 2010, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan - 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 Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri *Mtb* di Puslitbang BMF tahun 2008, yang menjadi awal penelitian TB ini hingga tahun 2010. Ucapan terimakasih juga kami sampaikan kepada dr. Triono Soendoro, Ph.D. dan Dr.dr. Trihono, MSc selaku konsultan dan Drs. Ondri Dwi Sampurno, MSi, Apt selaku Koordinator dalam penelitian TB 2010. Dan seluruh anggota Tim Penelitian 2010, para peneliti dan para pembantu peneliti beserta staf administrasi penelitian. Terimakasih juga kami sampaikan kepada seluruh pihak yang telah menyumbangkan segala bantuan moril dan materil untuk terlaksananya penelitian ini.

X. SURAT PERSETUJUAN ATASAN YANG BERWENANG

Jakarta, 23 Januari 2010

Protokol Penelitian dengan Judul :

IDENTIFIKASI KARAKTERISTIK STRAIN *Mycobacterium tuberculosis* di INDONESIA  
BERDASARKAN ISOLAT SPESIMEN DAHAK PASIEN TB  
( TAHAP III )

Ketua Pelaksana,



( Dra. Vivi Lisdawati, M.Si., Apt. )  
NIP. 19681118 199603 2001

Disetujui untuk diajukan pada anggaran DIPA Puslitbang Biomedis dan Farmasi tahun 2010

Kepala Puslitbang Biomedis dan Farmasi



( Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt )  
NIP. 19621119 198803 1001

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

PENELITIAN IDENTIFIKASI dan KARAKTERISASI STRAIN  
*Mycobacterium tuberculosis* dari ISOLAT DAHAK PASIEN TUBERKULOSIS  
PARU di INDONESIA (2010)

NASKAH PENJELASAN

---

Puslitbang Biomedis dan Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI mulai bulan Maret s/d Desember 2010 akan melakukan Penelitian Identifikasi dan Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) dan Pengembangan Alat Diagnostik Molekular. Pengumpulan sampel untuk uji coba metode diagnostik molekular sistem *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) akan diadakan di Provinsi DKI Jakarta dan mencakup pengumpulan spesimen dahak dari pasien suspek Tuberkulosis di Laboratorium Mikrobiologi Klinik (LMK), Departemen Mikrobiologi – Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI). Penelitian bertujuan untuk mengembangkan metode uji diagnosis cara cepat baru untuk infeksi Tuberkulosis. Sasaran penelitian adalah pasien yang diduga terinfeksi kuman tuberkulosis yang berusia  $\geq 15$  tahun di LMK- FKUI.

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 LMK-FKUI. Dahak diambil yaitu: dahak *pagi hari* pada hari kedua kedatangan dan dahak *sewaktu saat akan diperiksa* pada hari ke dua kedatangan. Pengumpulan dahak *pagi* dan *sewaktu* dilakukan oleh petugas LMK-FKUI.

Keuntungan partisipasi Bapak/Ibu/Sdr/Sdri adalah Bapak/Ibu/Sdr/Sdri akan memperoleh hasil pemeriksaan mikroskopik 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 Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi, 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 menolak tanpa dikenakan sanksi apapun.

Bila Bapak/Ibu/Sdr/Sdri memerlukan penjelasan lebih lanjut mengenai penelitian ini, dapat menghubungi Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi, 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](mailto:vivi_l@litbang.depkes.go.id).

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

Saya telah mendapatkan penjelasan secara rinci dan mengerti mengenai Penelitian Identifikasi dan Karakterisasi Strain *Mycobacterium tuberculosis* dari Isolat Dahak Pasien Tubekulosis Paru di Indonesia yang dilakukan oleh Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi, 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; Pertiinggal di LMK-FKUI 1lb; Puslitbang. Biomedis dan Farmasi – dikirim bersama sampel *dahak* 1lb.
- \*\* Di luar tim medis, bisa orang yang mempunyai hubungan keluarga, tetangga atau kepala LMK-FKUI



No Identifikasi Pasien:

Lampiran 3

### INFORMASI RESPONDEN

Tgl lahir

Jenis kelamin

1. Laki-laki

2. Perempuan

ATAU Umur  Tahun

Kota tempat tinggal 1 tahun terakhir:

### ETNIS

Pihak Ibu:

1. Kakek

2. Nenek

Pihak Ayah:

1. Kakek

2. Nenek

### INFORMASI RAWAT JALAN

Pernah didiagnosis TB sebelumnya?

Ya  Tidak

Riwayat pengobatan

1. Lengkap
2. Tdk Ingk
3. Tidak berobat

### RIWAYAT VAKSINASI

Tidak ada

BCG

Scar BCG

### RIWAYAT KONTAK

Tidak ada

Apa pekerjaan responden?

Tenaga kesehatan

Petugas apotek

Petugas laboratorium / Peneliti

Lainnya, sebutkan:

Karyawan pabrik tekstil

.....

Apakah responden ada riwayat kontak dengan orang yang memiliki gejala dan atau tanda serupa?

anggota keluarga lain

tenaga kesehatan

Lainnya, sebutkan: .....

tetangga

responden yang dirawat