

**LAPORAN AKHIR TAHUN/ TAHUN TERAKHIR\*  
PENELITIAN BAGI PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR  
UNTUK SARJANA UNGGUL**



**GENOTYPING SEKUENS NUKLEOTIDA GEN *esxA Mycobacterium tuberculosis* DARI PASIEN TB PARU DAN PENGEMBANGAN METODE AMPLIFIKASI ASAM NUKLEAT UNTUK PENEGAKKAN DIAGNOSIS TB**

**TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN**

<b>Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp. MK (K)</b>	<b>0007035703</b>
<b>Dr. Soedarsono, dr., Sp. P. (K)</b>	<b>195511231984101001</b>
<b>Prof. Dr. Wayan T. Artama, DVM</b>	<b>0018085308</b>
<b>Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi</b>	<b>011614253006</b>

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

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

KKA  
KK  
LP 07/19  
Gen

**LAPORAN AKHIR TAHUN/ TAHUN TERAKHIR\*  
PENELITIAN BAGI PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU  
DOKTOR UNTUK SARJANA UNGGUL**



**GENOTYPING SEKUENS NUKLEOTIDA GEN *esx4*  
*Mycobacterium tuberculosis* DARI PASIEN TB PARU DAN  
PENGEMBANGAN METODE AMPLIFIKASI ASAM NUKLEAT  
UNTUK PENEGAKKAN DIAGNOSIS TB**

**TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN**

**Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp. MK (K) 0007035703**  
**Dr. Soedarsono, dr., Sp. P. (K) 195511231984101001**  
**Prof. Dr. Wayan T. Artama, DVM 0018085308**  
**Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi 011614253006**

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

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**



**HALAMAN PENGESAHAN**

Judul : GENOTYPING SEKUENS NUKLEOTIDA GEN *esxA* Mycobacterium tuberculosis DARI PASIEN TB PARU DAN PENGEMBANGAN METODE AMPLIFIKASI ASAM NUKLEAT UNTUK PENEGAKKAN DIAGNOSIS TB

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

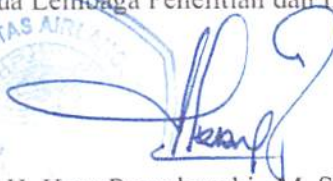
**Anggota (1)**  
 Nama Lengkap : drh. WAYAN TUNAS ARTAMA  
 NIDN : 0018085308  
 Perguruan Tinggi : Universitas Gadjah Mada

**Anggota (2)**  
 Nama Lengkap : Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi, S.Si., M.  
 : Ked.Trop  
 NIDN :  
 Perguruan Tinggi :  
**Institusi Mitra (jika ada)**  
 Nama Institusi Mitra : Niigata University, Japan  
 Alamat : Asahimachi-Dori 1-757, Chuo-ku, Niigata, Niigata 951-8510, Japan  
 Penanggung Jawab : Matsumoto Sohkiichi  
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun  
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000  
 Biaya Keseluruhan : Rp 170,000,000

Mengetahui,  
 Dekan Fakultas Kedokteran  
  
 (Prof. Dr. dr. Soetojo, Sp. U (K))  
 NIP/NIK 195606081986121001

Kota Surabaya, 7 - 11 - 2018  
 Ketua,

  
 ( NI MADE MERTANIASIH, )  
 NIP/NIK 195703071984032001

Menyetujui,  
 Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi  
  
 (Prof. H. Hery Purnobasuki, M. Si., Ph.D)  
 NIP/NIK 196705071991021001





## RINGKASAN

Tuberkulosis masih menjadi penyakit infeksi menular dengan tingkat beban penyakit yang tinggi. Indonesia termasuk dalam *High Burden Countries* dan pada tahun 2015, Indonesia menduduki peringkat kedua. Pengendalian penyakit Tuberkulosis (TB) secara efektif-efisien dapat dicapai dengan usaha strategis seperti peningkatan temuan kasus TB, penegakan diagnosis TB yang akurat dan cepat, pemberian pengobatan adekuat dengan segera.

Peran diagnostik dan pengembangan terapi target kerja obat menggunakan gen *esxA* pada *Mycobacterium tuberculosis* sangat penting pada pengendalian kasus TB. Penegakan diagnosis TB sampai saat ini belum akurat, antara lain dipersulit dengan adanya tingkat berat-ringan penyakit, beberapa teknik tidak mudah, harga produk luar negeri tidak terjangkau masyarakat luas dan penentuan target kerja obat pada genome *esxA* yang masih belum teridentifikasi dengan jelas membuat penelitian studi *genotyping* sekuens gen *esxA* pada *Mycobacterium tuberculosis* dari pasien tuberkulosis paru sebagai dasar pengembangan diagnostik dan target terapi penting untuk dilakukan.

**Tujuan penelitian:** Tahun III bertujuan untuk analisis profil respon imun pasien TB paru di Surabaya terhadap antigen seperti ESAT-6 dan Ag85B serta *purified protein derivate* (PPD), Acr, CFP-10, MPT-70, dan Thioredoxin sebagai perbandingan dari *Mycobacterium tuberculosis*.

**Metode penelitian:** Tahun III: (1) Transformasi plasmid yang membawa gen *esxA* pada bakteri *E.coli* BL21;(2) Produksi dan purifikasi protein;(3) Pengumpulan sampel serum dari pasien TB dari Rumah Sakit Dr. Soetomo dan orang yang didiagnosis belum pernah terjangkit TB sebagai control (*healthy control*); (4) Analisis profil respon imun pada pasien TB dengan menggunakan metode ELISA.

Pada tahun pertama semua sampel TB-MDR yang diuji dengan metode PCR menunjukkan hasil positif. Pada tahun kedua, hasil sekuensing menunjukkan bahwa semua sampel MDR-TB 100% homologi dengan gen *esxA* *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil PCR pada sampel TB, baik MDR-TB maupun sensitif antibiotik dengan gen target *esxA* menunjukkan hasil yang bervariasi. Pada tahun kedua dan ketiga, hasil penelitian menunjukkan bahwa protein Ag85B memiliki potensi untuk menjadi target biomarker kit diagnostik TB, bila dibandingkan dengan protein ESAT-6. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai genotype *esxA* dan pengembangan kit diagnostik metode asam nukleat dan serodiagnostik yang bermanfaat bagi masyarakat luas melalui publikasi jurnal nasional atau internasional bereputasi dan paten sederhana.

**Keywords:** Tuberkulosis, AAN-isothermal, *esxA*, ESAT-6, ELISA, *Mycobacterium tuberculosis*

## PRAKATA

Puji syukur mari kita panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan inayahnya sehingga penulis dapat menyusun laporan akhir yang berjudul “Genotyping Sekuens Nukleotida Gen *esxA* Mycobacterium tuberculosis Dari Pasien TB Paru Dan Pengembangan Metode Amplifikasi Asam Nukleat Untuk Penegakkan Diagnosis TB”. Laporan akhir ini diharapkan dapat menjawab tujuan penelitian tahun III, yaitu: untuk analisis profil respon imun pasien TB paru di Surabaya terhadap antigen seperti ESAT-6 dan Ag85B serta purified protein derivate (PPD), Acr, CFP-10, MPT-70, dan Thioredoxin sebagai pembanding dari Mycobacterium tuberculosis.

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

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

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





## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah Penelitian .....	3
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Epidemiologi Penyakit TB .....	5
2.2 Karakteristik Gen <i>esxA</i> Pada <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
2.3 Patogenesis .....	7
2.4 MDR-TB ( <i>Multidrug Resistance Tuberculosis</i> )/RR-TB ( <i>Rifampicin Resistant Tuberculosis</i> ) .....	8
2.5 ELISA .....	8
2.6 Skor TB Bandim .....	9
2.7 Metode Diagnostik Amplifikasi Asam Nukleat .....	10
2.8 <i>Technology Road Map</i> .....	11
<b>BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....</b>	<b>12</b>
3.1 Tujuan .....	12
3.1.1 Tujuan umum .....	12
3.2.2 Tujuan khusus .....	12
3.2 Manfaat Penelitian .....	12

<b>BAB 4 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>13</b>
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	13
4.2 Sampel Penelitian .....	13
4.3 Variabel Penelitian .....	13
4.4 Prosedur dan Alur Penelitian.....	13
4.5 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian.....	14
4.6 Analisa Data .....	14
4.7 Alur Penelitian.....	14
<b>BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI .....</b>	<b>16</b>
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>16</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>17</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>22</b>

**DAFTAR TABEL**

	<b>Halaman</b>
<b>Tabel 5.1</b> Tabel indikator dan luaran capaian 2017-2018. ....	<b>15</b>



**DAFTAR GAMBAR**

	<b>Halaman</b>
<b>Gambar 2.1.</b> Skema regio RD-1 .....	<b>6</b>
<b>Gambar 2.2.</b> Road map penelitian .....	<b>11</b>
<b>Gambar 4.1.</b> Alur penelitian tahun ketiga .....	<b>14</b>

**DAFTAR LAMPIRAN**

	<b>Halaman</b>
<b>Lampiran 1.</b> Instrumen.....	22
<b>Lampiran 2.</b> Personalia Tenaga Pelaksana Beserta Kualifikasinya .....	23
<b>Lampiran 3.</b> Tabel Kegiatan Penelitian.....	25
<b>Lampiran 4.</b> Abstrak Jurnal Status <i>Published</i> .....	42
<b>Lampiran 5.</b> Abstrak Jurnal <i>Under Review</i> dan Abstrak Draf Jurnal.....	45
<b>Lampiran 6.</b> Sertifikat Sebagai Oral Presenter.....	50
<b>Lampiran 7.</b> Hasil DNA Sekuensing.....	53
<b>Lampiran 8.</b> Prototype Desain Primer <i>esxA</i> .....	57

## BAB 1 PENDAHULUAN



### 1.1 Latar belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) dan termasuk *air borne disease* dimana penyebarannya melalui udara. Penyakit ini umumnya bermanifestasi kronik dan berat pada usia produktif kerja, erat kaitannya dengan kemiskinan dan tingkat *mortality* yang tinggi. Masalah penyakit TB diperberat dengan peningkatan TB ko-infeksi HIV, TB ko-infeksi diabetes, dan terjadinya resistensi obat. Penyakit TB masih menjadi masalah global pada penyebab mortalitas dan morbiditas pada manusia.

Berdasarkan data WHO (2014), diperkirakan terdapat 9 juta kasus baru TB dan 1,5 juta kematian akibat TB pada tahun 2013 sedangkan pada tahun 2014 terdapat 9,6 juta kasus TB baru dengan angka kematian sebesar 1,5 juta (WHO, 2015a). India, Indonesia, dan Cina merupakan tiga negara yang memiliki jumlah kasus terbesar di seluruh dunia dengan persentase sebesar 23% untuk India dan 10% untuk Indonesia dan Cina. Persentase jumlah kasus baru TB secara global pada tahun 2013 di daerah Asia Tenggara merupakan yang terbesar dibanding benua lainnya, yaitu sebesar 38% dan dengan persentase tingkat kematian akibat TB sebanyak 39% (WHO, 2015b).

Indonesia, yang merupakan bagian dari daerah Asia Tenggara, termasuk sebagai salah satu negara dengan beban TB yang tinggi (*high burden TB countries*). Data menunjukkan bahwa pada tahun 2014 Indonesia memiliki laju insidensi sebesar 399 per 100.000 populasi, laju prevalensi sebesar 647 per 100.00 populasi, dan laju kematian sebesar sebesar 41 per 100.000 populasi dengan total populasi sebesar 254 juta (WHO, 2015a).

Pada tahun 2014, diperkirakan persentase kasus baru *Multidrug-resistance tuberculosis* (MDR-TB) secara global adalah 3.3% dan jumlah kematian akibat MDR-TB sebanyak 190.000 kematian. Persentase kasus MDR-TB di Indonesia di tahun 2014 diketahui sebesar 1,9 % dengan jumlah kasus baru MDR-TB diantara kasus *pulmonary* TB sebesar 5.600 kasus (WHO, 2015a). Data mengenai



persentase kasus baru MDR-TB didapatkan dari beberapa daerah di Indonesia, hanya bersifat data subnational, dapat diartikan bahwa penegakan diagnosis MDR-TB belum merata terlaksana secara nasional yang kemungkinan dikarenakan fasilitas diagnostik TB belum merata atau belum akurat.

WHO mulai mencanangkan era baru pada akhir 2015 yang disebut dengan *Sustainable Development Goals* (SDGs) untuk pelaksanaan strategi tahun 2016-2030 dimana *End TB Strategy* merupakan salah satu bagian dari program SDGs. Tiga pilar utama dan komponen dari *End TB Strategy* adalah (1) *integrated, patient-centred care, and prevention*; (2) kebijakan yang tepat dan sistem yang mendukung; (3) Peningkatan penelitian dan inovasi (WHO, 2015a).

Pertumbuhan kultur (metode *gold standard*) spesimen klinik yang memakan waktu sekitar beberapa minggu bahkan hingga 2 atau 3 bulan menjadi kendala uji diagnostik secara konvensional. Selain itu pada pemeriksaan mikroskopis pewarnaan BTA juga dilaporkan adanya keterbatasan sensitivitas maupun spesifisitas. Pengembangan metode diagnostik yang cepat dan akurat sangat dibutuhkan dalam penegakkan diagnosa TB sebagai pendamping metode kultur konvensional.

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan metode amplifikasi asam nukleat *isothermal* (AAN-*Isothermal*) merupakan salah satu metode diagnostik yang dapat digunakan untuk mendeteksi MTB dalam waktu yang cepat. Perkembangan teknologi yang semakin maju saat ini juga memungkinkan metode asam nukleat seperti PCR dapat mendeteksi *extrapulmonary* tuberkulosis seperti pada sampel cairan pleural dengan sensitivitas yang bervariasi antara 11 hingga 81% (Mertaniasih *et al.*, 2014; Pourhajibagher dan Nasrollahi, 2013; Fukushima *et al.*, 2003; Bi *et al.*, 2012).

Metode LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) juga diketahui merupakan salah satu metode AAN-*Isothermal* baru yang sederhana, efisien, cepat, dan murah dan dapat digunakan di puskesmas, rumah sakit berskala kecil, dan laboratorium di negara-negara yang sedang berkembang (Bi *et al.*, 2012; Iwamoto *et al.*, 2003). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penggunaan metode LAMP dapat mengidentifikasi *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, dan *M. intracellulare* secara cepat dan akurat. Metode AAN-*Isothermal* dengan target

gen *gyrB* dan *esxA* diketahui dapat digunakan untuk uji diagnostik penyakit TB namun sejauh ini penelitian mengenai perbandingan keduanya belum diketahui, pengembangan AAN-*Isothermal* sendiri di Indonesia juga belum dilakukan secara intensif, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut (Kumar *et al.*, 2014; Iwamoto *et al.*, 2003).

Serodiagnostik juga berpotensi dalam mendeteksi penyakit TB aktif. respons imun dari pasien TB berkorelasi dengan beban bakteri *M. tuberculosis*. Respon imun juga memiliki potensi untuk melacak perkembangan proses penyakit TB dari *asymptomatic* (tidak menunjukkan gejala) hingga menjadi *symptomatic*. Kit diagnostik seperti IGRA dan TST masih belum dapat digunakan untuk mendeteksi TB aktif sehingga pengembangan kit diagnostik yang akurat dan cepat dengan melihat respon imun pasien TB paru penting dilakukan (Osada-Oka *et al.*, 2013; WHO, 2015a).

Gen *esxA* adalah gen yang mengkode 6kDa early secretory antigenic target *esxA* (ESAT-6) yang merupakan salah satu faktor virulensi yang penting dari *Mycobacterium tuberculosis*. Gen *esxA* termasuk dalam *region of difference 1* (RD-1) dimana RD-1 merupakan regio yang dihilangkan pada vaksin BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) (Callahan *et al.*, 2010; Ganguly *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan gen *esxA* terhadap sampel pasien TB paru *Rifampicin* sensitif dan *Rifampicin* resisten untuk melihat adanya pengaruh dari gen *esxA* yang merupakan faktor virulensi terhadap pasien TB *Rifampicin* sensitif dan resisten dengan derajat penyakit berat dan ringan serta diharapkan dapat memberikan informasi dalam pengembangan rapid diagnostik yang cepat, akurat dan juga untuk marka pemantauan obat hasil perbaikan proses patogenesis penyakit. Penelitian pada tahun kedua dan ketiga kemudian melihat potensi protein ESAT-6 beserta keenam protein lainnya, yaitu PPD, Acr, MPT-59 atau Ag85B, CFP-10, MPT-70 dan thioredoxin (sebagai kontrol) sebagai target biomarker diagnostik TB.

## 1.2 Perumusan Masalah Penelitian

Pada penelitian ini berdasar latar belakang dan berkaitan dengan masalah pelaksanaan program pengendalian TB meliputi:

1. Apakah ada perbedaan *genotype* (sekuens *conserved* dan spesifik) gen *esxA* *M. tuberculosis* antara kelompok sampel pasien TB paru *Rifampicin* resisten dengan gen MTB *wild type* pada gene bank?
2. Bagaimana profil respon imun pasien TB paru di Surabaya terhadap antigen pada *M. tuberculosis*?





## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Epidemiologi Penyakit TB

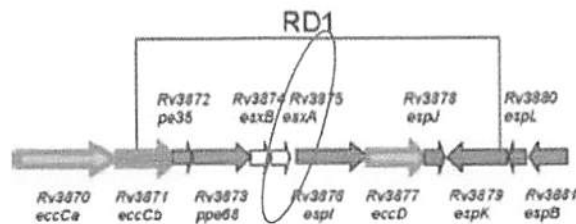
WHO melaporkan terdapat sekitar 9 juta kasus baru TB dan 1,5 juta kematian akibat TB pada tahun 2013 sedangkan pada tahun 2014 terdapat 9,6 juta kasus TB baru dengan angka kematian sebesar 1,5 juta (WHO, 2015a; WHO, 2014). India, Indonesia, dan Cina memiliki jumlah kasus terbesar di seluruh dunia dengan persentase sebesar 23% untuk India dan 10% untuk Indonesia dan Cina. Persentase jumlah kasus baru TB secara global pada tahun 2013 di daerah Asia Tenggara merupakan yang terbesar dibanding benua lainnya, yaitu sebesar 38% dan dengan persentase tingkat kematian akibat TB sebanyak 39% (WHO, 2015b).

Indonesia yang termasuk sebagai salah satu negara dengan beban TB yang tinggi memiliki jumlah insidensi sebesar 1.000.000, prevalensi sebesar 1.600.000, dan jumlah kematian sebesar 100.000 dengan total populasi sebesar 254 juta pada tahun 2014 (WHO, 2015a). Kasus insidensi TB di Indonesia diketahui mengalami peningkatan. Data dari WHO (2014) menunjukkan bahwa laju insidensi di Indonesia pada tahun 2013 sebesar 183 per 100.000 populasi dan Indonesia menduduki peringkat 5 sebagai *high burden TB countries*, sedangkan pada tahun 2014 Indonesia menduduki peringkat kedua dengan peningkatan laju insidensi sebesar 399 per 100.000 populasi.

Dinas kesehatan Jawa Timur melaporkan bahwa angka CDR di Jawa Timur pada tahun 2012 sebesar 63.03% dengan jumlah kasus baru (positif dan negatif) sebanyak 41.472 penderita dan BTA Positif baru sebanyak 25.618 kasus. Angka penemuan kasus baru BTA Positif (*Case Detection Rate*) merupakan proporsi penemuan kasus TB BTA positif dibanding dengan perkiraan kasus dalam persen. Kondisi tersebut masih jauh dari target CDR yang ditetapkan yaitu 70% (Dinas Kesehatan Jawa Timur, 2013). Kementerian Kesehatan RI (2015) juga melaporkan bahwa jumlah seluruh pasien TB yang ditemukan dan tercatat per 100.000 penduduk (*Case Notification Rate*) di Jawa Timur pada tahun 2014 masih tergolong cukup tinggi, yaitu sebesar 112 per 100.000 penduduk.

## 2.2 Karakteristik Gen *esxA* Pada *Mycobacterium tuberculosis*

Gen *esxA* merupakan gen penyandi 6 kDa *early secretory antigenic target esxA* (ESAT-6). Region *esxA* terletak setelah gen *esxB* yang mengkode gen CFP-10 (10 kDa culture filtrate antigen *esxB*) dan sebelum gen *espl* yang terletak di lokus Rv3876 (Gambar 2.2.). Gen *esxA* termasuk ke dalam *Region of Difference 1* (RD-1) yang merupakan region yang dihilangkan pada *attenuated vaccine Mycobacterium bovis BCG (Bacille Calmette Guérin)* (Forrellad et al., 2013; Yu and Xie, 2012; Teutschbein et al., 2009).



**Gambar 2.1.** Skema dari regio RD-1 yang menunjukkan letak gen *esxA*. Gen *esxA* ditunjukkan oleh lingkaran merah (Forrellad et al., 2013).

ESAT-6 yang dikode oleh *esxA* merupakan salah satu faktor virulensi dari *M. tuberculosis*. ESAT-6 berperan dalam mengganggu aktivasi dari makrofag host, menginduksi terjadinya apoptosis, dan dapat mengganggu imunitas dari host (Yu and Xie, 2012). ESAT-6 bersama dengan CFP -10 merupakan dua protein sekresi kecil (antigen) yang dominan dikenali oleh *T-cells*. ESAT-6 dan CFP-10 sangat diperlukan dalam memberikan efek virulensi yang penuh dari spesies *M. tuberculosis complex* (Uplekar et al., 2011; Forrellad et al., 2013; Solans et al., 2014).

Menurut Guinn et al. (2004), ESAT-6 juga berperan dalam penyebaran *M. tuberculosis* dari sel makrofag satu ke sel makrofag lainnya. Penghilangan ESAT-6 dari *M. tuberculosis* tidak mempengaruhi multiplikasi bakteri tersebut di dalam sel makrofag THP-1 namun tidak mampu menyebarkan dirinya ke makrofag lain yang belum terinfeksi. ESAT-6 dan CFP-10 juga diketahui memfasilitasi translokasi *M. tuberculosis* dari fagosom ke sitoplasma host pada tahap infeksi lanjut (Forrellad et al., 2013). Pathak et al. (2007) juga menyatakan bahwa ESAT-6 juga berperan dalam mencegah fungsi antigen-presenting cell

(APC) dengan menghambat jalur signaling TLR sehingga produksi IL-12 oleh makrofag THP-1 menurun.

ESAT-6 yang dikode oleh *esxA* berpotensi sebagai kandidat vaksin dan digunakan sebagai antigen dalam uji diagnosis tuberkulosis. Uplekar *et al.* (2011) melaporkan bahwa gen *esxA* beserta gen *esxH* diantara 108 isolat yang diteliti memiliki variasi gen yang sedikit. Hasil tersebut juga didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Davila *et al.* (2010) yang mengungkapkan bahwa tidak ada variasi keragaman genetik pada gen *EsxA* dan *EsxH* diantara 88 isolat klinis.

### 2.3 Patogenensis

Sumber penularan tuberkulosis BTA positif adalah pada waktu batuk, bersin, maupun saat bicara. Penyebaran ini dapat melalui udara dalam bentuk *droplet nuclei* (percikan dahak). *Droplet nuclei* yang mengandung kuman berukuran sangat kecil, yaitu 2-10  $\mu\text{m}$  sehingga mudah tercampur dengan udara dan masuk ke dalam saluran pernapasan menuju bronchus hingga sampai ke dalam alveoli dan tertelan makrofag alveoli. *Droplet nuclei* dapat bertahan di udara pada suhu kamar selama beberapa jam (Carroll *et al.* 2016; Mertaniasih *et al.*, 2013).

Ketika berada di dalam alveoli, sistem imun *host* akan merespon dengan mengeluarkan sitokin dan limfokin yang menstimuli monosit dan makrofag. Makrofag dan sel dendrit yang menelan *M. tuberculosis* tidak dapat menghancurkan bakteri ini sehingga dapat berkembang biak dalam makrofag. Beberapa makrofag yang terinfeksi akan tetap berada di dalam jaringan paru-paru sedangkan beberapa sel dendrit yang terinfeksi akan bergerak menuju kelenjar getah bening. T cell di dalam kelenjar getah bening akan aktif dan mengenali mycobacterial di dalam paru-paru. Lesi *granulomatous* akan terbentuk dan menahan bakteri untuk berkembang menjadi aktif. Lesi patogenik di paru akan terbentuk setelah 1-2 bulan paparan terjadi. Terdapat dua tipe lesi yang terjadi, yaitu: tipe eksudatif dan tipe produktif (Kaufmann, 2004).



## 2.4 MDR-TB (*Multidrug Resistance Tuberculosis*)/RR-TB (*Rifampicin Resistant Tuberculosis*)

*M. tuberculosis* yang telah resisten paling tidak terhadap *Isoniazid* dan *Rifampicin* sebagai obat anti tuberkulosis (TB) lini pertama yang paling kuat disebut sebagai *multidrug-resistance tuberculosis* (MDR-TB) (Sharma and Mohan, 2004; NIAID, 2007; Mahboub and Vats, 2013). Kasus *Multidrug-resistant tuberculosis* (MDR-TB) juga merupakan masalah global yang memerlukan penanganan dengan strategi yang tepat dan akurat.

Pada tahun 2014 diperkirakan terdapat 480.000 kasus MDR-TB dan terdapat 123.000 pasien dengan MDR-TB atau rifampisin resistan tuberkulosis (RR-TB) disamping itu, diperkirakan sebesar 9.7% orang dengan MDR-TB mengidap XDR-TB (WHO, 2015a). Di Indonesia sendiri, pada tahun 2014 kasus baru MDR-TB sebesar 1.9% dan kasus baru MDR-TB diantara kasus *pulmonary TB* yang diketahui adalah 5.600 kasus (WHO, 2015a). Menurut WHO (2010) MDR-TB dapat terjadi karena adanya infeksi primer dengan bakteri resisten dan juga disebabkan pemberian antibiotik yang tidak tepat.

Resistensi dapat terjadi karena beberapa faktor, salah satunya adalah peranan pemberian antibiotik yang tidak tepat. Akumulasi mutasi pada gen target obat individu menyebabkan terjadinya MDR-TB terhadap OAT. Gen yang berperan dalam resistensi terhadap obat RIF adalah gen *rpoB*. Mutasi pada regio 81-bp (kodon 507-533 dengan 27 asam amino) dari *rpoB* merupakan penyebab terjadinya resistensi *Rifampicin*. Resistensi *Rifampicin* dapat penanda pengganti deteksi MDR-TB dikarenakan 96% strain resistensi *Rifampicin* juga resisten terhadap *Isoniazid* (INH) (Jacob, 1994; Bhunia *et al.*, 2015; Thirumurugan *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2010).

## 2.5 ELISA

*Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) merupakan suatu uji yang menggunakan *plate* berbahan *polystyrene* yang didesain untuk mendeteksi dan menghitung kandungan peptide, protein, antibodi, dan hormon. Teknik ELISA terdiri dari tahap proses *immobilize* antigen pada permukaan padat dan

penambahan antibodi yang berikatan dengan enzim (Wakabayashi, 2010; Idexx, 2013).

Teknik ini telah banyak digunakan sebagai salah satu metode diagnostik terutama dalam bidang medis dan juga sebagai pengukuran *quality control* di berbagai industri. Metode ini juga digunakan sebagai alat analisis dalam penelitian biomedis untuk mendeteksi antigen atau antibodi spesifik pada sampel (Gan and Patel, 2013).

Sebelum teknik ELISA dikembangkan, teknik radioimmunoassay (RIA) yang ditemukan oleh Berson dan Yalow pada tahun 1960 dikembangkan terlebih dahulu, namun karena penggunaan radioaktif yang cukup berbahaya maka metode tersebut dimodifikasi dengan mengganti radioisotope dengan enzim dan terbentuk metode EIA dan ELISA yang saat ini banyak digunakan (Wakabayashi, 2010; Gan and Patel, 2013).

ELISA menggunakan antigen dan antibodi berlabel enzim untuk mendeteksi molekul biologis. Enzim yang banyak digunakan adalah *alkaline phosphatase* dan *glucose oxidase*. Antigen di-*immobilize* pada *microtiter plate* yang memiliki 96 wells. Antigen mampu berikatan dengan spesifik antibodi yang kemudian dideteksi dengan antibodi sekunder yang juga dilabeli oleh enzim. Antigen-antigen yang akan digunakan dalam penelitian ini terdiri dari; *purified protein derivative* (PPD), Acr, MPT59, CFP10, ESAT-6, MPT70, dan *thioredoxin* (Idexx, 2013; Gan and Patel, 2013).

## 2.6 Skor TB Bandim

Skor TB Bandim merupakan metode yang didasari oleh skor pada investigasi klinis dengan melihat *sign* dan *symptoms* yang mengacu pada kriteria WHO. Skor TB Bandim dikembangkan untuk penggunaan pada wilayah dengan sumber daya kurang. Skor TB Bandim ditemukan oleh Wejse C pada tahun 2008 silam dan metode skor ini telah dipelajari pada pasien TB Paru di Ethiopia, validitas teknik ini juga telah diuji serta dinilai dengan metode kohort pada TB paru di Bissau (Kusumaningrum, 2015; Rudolf *et al.*, 2013).

Parameter Skor TB Bandim terdiri dari lima *symptoms*; yaitu: batuk, *hemoptysis*, *dyspnea*, nyeri pada dada, dan berkeringat pada malam hari; dan

enam *sign*, yaitu: anemia (*pale inferior conjunctiva*), nadi > 90 per menit, positif ditemukan kelainan pada auskultasi dada, suhu badan >37°, *body mass index* (BMI) <18/ <16 kg/m<sup>2</sup>, dan lingkaran lengan atas (LILA) <220 mm/ <200 mm. Setiap variable bernilai satu poin sementara BMI dan LILA akan mendapatkan tambahan satu poin bila BMI <16 kg/m<sup>2</sup> dan LILA <200 mm sehingga skor maksimum adalah 13. Skor TB Bandim terbagi dalam tiga derajat keparahan atau *severity classes* (SC), yaitu: SC I bila skor sebesar 0-5; SC II bila skor sebesar 6-7, dan SC III bila skor sebesar 8-13 (Rudolf *et al.*, 2013; Rudolf, 2014).

## 2.7 Metode Diagnostik Amplifikasi Asam Nukleat

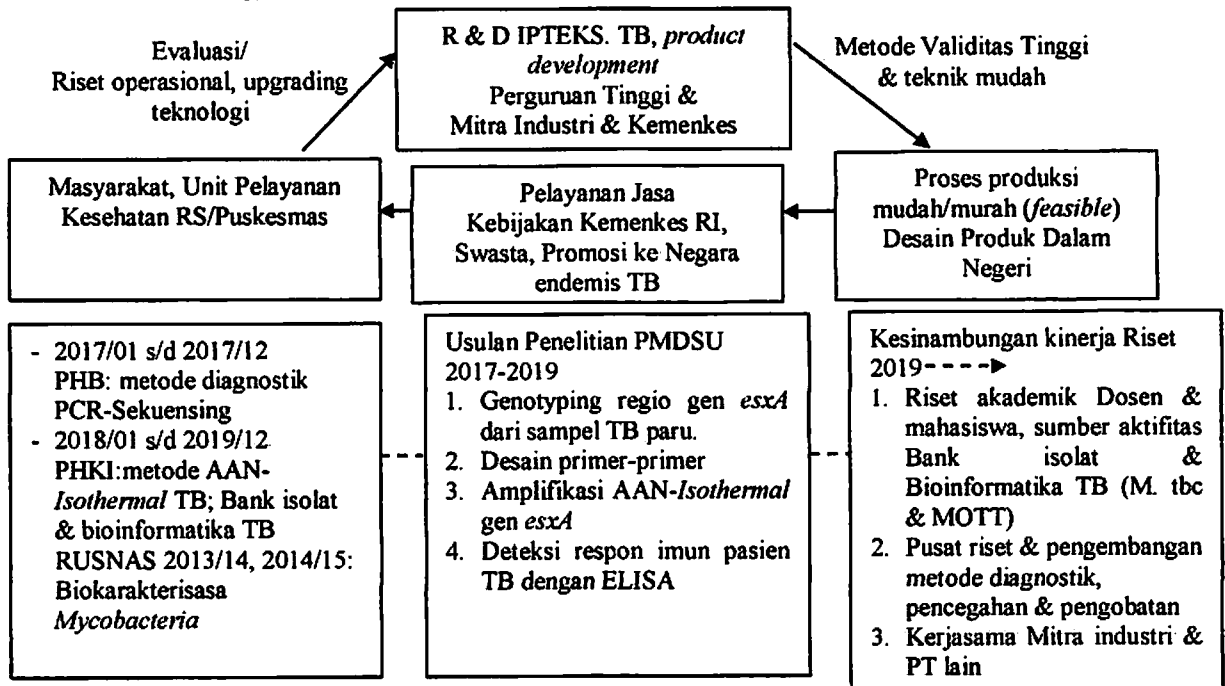
Metode amplifikasi asam nukleat merupakan metode untuk memperbanyak DNA suatu organisme sehingga dapat menjadi metode diagnostik untuk mendeteksi adanya suatu organisme di dalam sampel. *Polymerase chain reaction* atau PCR merupakan metode amplifikasi asam nukleat yang menggunakan perbedaan suhu dalam prosesnya untuk menggandakan DNA yang menjadi target. PCR digunakan sebagai alat yang digunakan untuk aplikasi non medis dan juga medis. Dalam aplikasi medis mikrobiologi, PCR digunakan sebagai diagnostik untuk mendeteksi atau mengkarakterisasi penyakit dari sampel spesimen pasien (Schuller *et al.*, 2010).

Reagen yang ditambahkan bersama dengan DNA target atau *template*, antara lain: DNA *polymerase*, 2 jenis primer, 4 tipe *deoxyribonucleosida triphosphate*, dan buffer yang mengandung  $Mg^{2+}$ . Sekuens yang diamplifikasi dinamakan ampikon. Dalam replikasi di dalam thermal cycler terdapat tiga tahap setiap satu siklus, yaitu: denaturasi, *annealing* (penempelan), dan *extension* (perpanjangan) (Singleton, 2000; Brown, 2010).

Metode amplifikasi asam nukleat konvensional (PCR) kemudian mengalami perkembangan serta memunculkan berbagai macam metode alternatif dan salah satu metode alternatif tersebut adalah metode amplifikasi asam nukleat *isothermal* (AAN-*Isothermal*). Metode AAN-*Isothermal* merupakan metode amplifikasi asam nukleat yang sederhana, cepat serta efisien yang dilakukan dalam temperatur yang konstan (Zhao *et al.*, 2015).

Metode AAN-*Isothermal* memiliki berbagai macam tipe, seperti metode *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA), E-SDA, HRCA, *primer-generation rolling circle* (PG-RCA), *helicase-dependent amplification* (HDA), *recombinase polymerase amplification* (RPA), exponential amplification reaction (EXPAR), *whole genome amplification* (WGA), dan *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) (Zhao *et al.*, 2015; Gill and Ghaemi, 2008).

**2.8 Technology Road Map**



**Gambar 2.2. Road map penelitian**

## BAB 3

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1 Tujuan

##### 3.1.1 Tujuan umum

Penentuan *genotype* sekuens nukleotida *esxA* pada *Mycobacterium tuberculosis* dari sampel pasien TB paru sebagai dasar pengembangan diagnostik metode amplifikasi asam nukleat *isothermal*.

##### 3.1.2 Tujuan khusus

Tahun III:

1. Analisis profil respon imun pasien TB paru di Surabaya terhadap antigen seperti ESAT-6 dan Ag85B serta *purified protein derivat* (PPD), Acr, CFP-10, MPT-70, dan Thioredoxin sebagai pembanding.

#### 3.2 Manfaat Penelitian

1. Manfaat akademis hasil penelitian ini nantinya diharapkan dapat memberikan informasi IPTEK mengenai *genotype* sekuens nukleotida pada genome *esxA* dari sampel *Rifampicin* sensitif dan *Rifampicin* resisten dan juga informasi mengenai profil respon imun dari pasien TB paru di Surabaya.
2. Manfaat praktis, implementasi pada pasien TB di masyarakat pada penelitian ini diharapkan menjadi suatu temuan *prototype* dasar pengembangan kit diagnostik yang unggul (akurat, cepat, dan murah) dan dapat digunakan sampai ke tingkat pelayanan kesehatan primer.
3. HKI paten sederhana dan publikasi jurnal internasional.







## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini merupakan studi observasional analitik dengan pendekatan *case control*.

#### 4.2 Sampel Penelitian

Tahun III: Sampel serum dari pasien TB paru dan sampel serum *healthy control* dengan besar masing-masing sampel sebanyak sebanyak 32 sampel

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah sampel sputum pasien suspek TB baik pasien sensitif antibiotik ataupun pasien sampel TB-MDR paru, variabel terikat adalah analisis hasil *sequencing* gen *exxA* pada sampel suspek TB dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*), sampel serum pasien TB paru dan *healthy control*; variabel kontrol yang digunakan pada penelitian ini yaitu pengaturan suhu pada mesin PCR, suhu inkubator, konsentrasi reagen yang digunakan, konsentrasi serum, volume serum, volume reagen, volume pada campuran reaksi PCR, dan konsentrasi sampel pasien TB.

#### 4.4 Prosedur dan Alur Penelitian

##### Tahun III

1. Transformasi plasmid yang membawa gen *exxA* pada bakteri *E.coli* BL21
2. Produksi dan purifikasi protein
3. Pengumpulan sampel serum dari pasien TB dari Rumah Sakit Dr. Soetomo dan orang yang didiagnosis belum pernah terjangkit TB sebagai control (*healthy control*)
4. Analisis profil respon imun pada pasien TB dengan menggunakan metode ELISA.

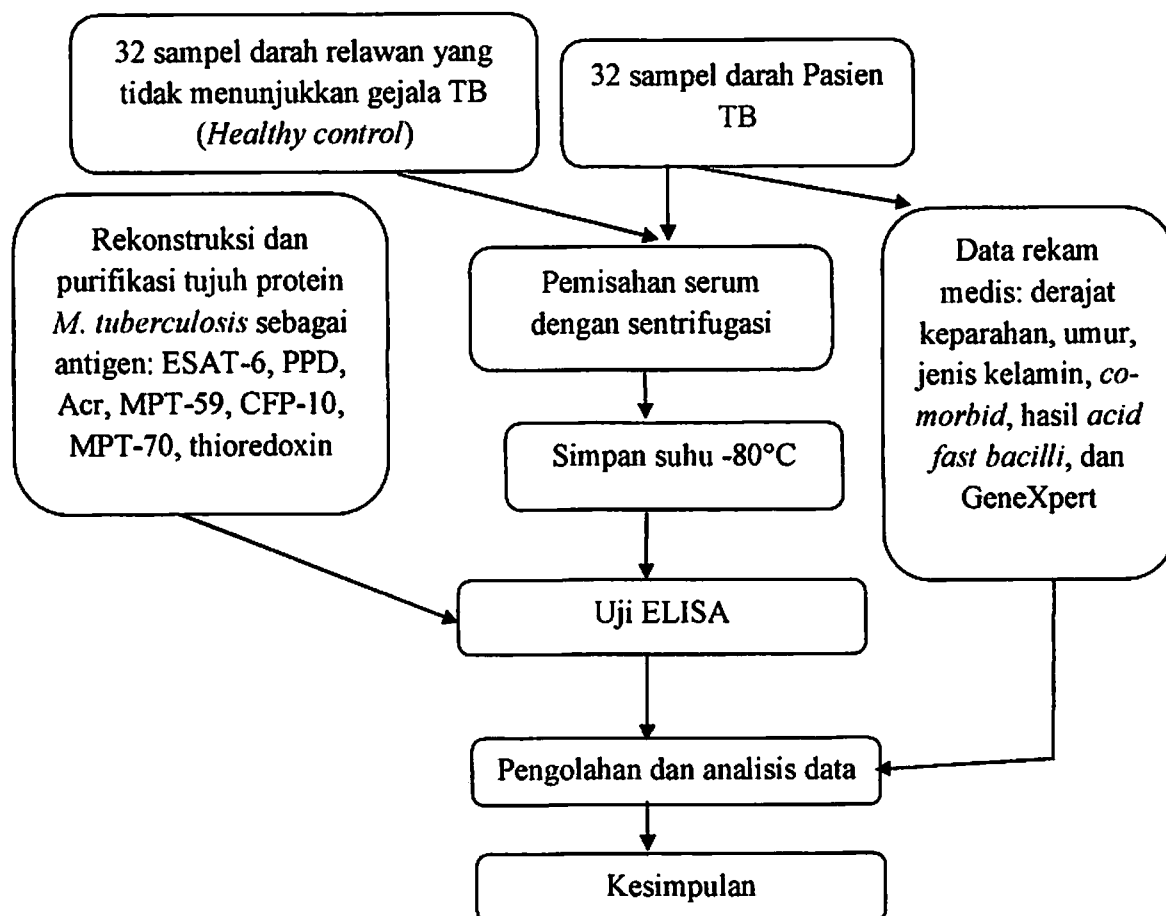
#### 4.5 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di ITD (*Institute of Tropical Disease*) Universitas Airlangga, Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine. Pengambilan sampel dilakukan di RSUD Dr. Soetomo, Surabaya. Waktu penelitian pada tahun III dilaksanakan bulan Januari-Desember 2018.

#### 4.6 Analisis Data

Data dianalisis dengan Microsoft Excel dan IBM SPSS version 21. Data analisis *sequencing* dianalisis menggunakan program GENETYX Ver.10, BCEPRED, dan BLAST NCBI. Analisis validitas dengan tabel 2x2.

#### 4.7 Alur Penelitian



Gambar 4.1. Alur penelitian tahun ketiga

**BAB 5**  
**HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI**

Tabel 5.1. Tabel indikator dan luaran target capaian 2017-2018

No	Aktivitas Penelitian	Indikator & Luaran Target Capaian 2017-2018	
		Target	Capaian
1.	Biokarakteristik <i>Mycobacterium tuberculosis</i> /NTM & sistem Bank Isolat TB	1. Biokarakteristik fenotip dan genotype M.tbc 2. Preparasi Bank Isolat TB	1. Validasi gen <i>exxA</i> 2. Koleksi isolat MTBC dan NTM
2.	Studi metode dan diagnostik TB - Optimasi metode molekuler dengan gen target gen <i>exxA</i> - Optimasi metode kultur padat Middlebrook 7H10.	3. Jurnal ilmiah & seminar Nasional/Internasional 4. Pembicara di Seminar Nasional/Internasional	3. <i>Oral presenter</i> di seminar internasional: 3 seminar 4. Published jurnal: 3 topik 5. Submitted jurnal: 2 topik 6. Draft jurnal : 1 topik 7. Hasil diagnostik dengan PCR
3.	Analisis regio gen spesifik <i>exxA</i> - Analisis sekuensing regio gen spesifik pada <i>exxA</i>		8. DNA <i>sequencing exxA</i> 9. Penentuan target biomarker untuk pengembangan diagnostik TB
4.	Analisis respon imun - Menganalisis pengaruh antigen dari <i>M. tuberculosis</i> terhadap respon imun pasien TB dan <i>healthy control</i> sebagai calon target kit diagnostik		10. Profil respon imun pasien TB Paru

## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### Kesimpulan

1. Hasil sekuensing gen target *esxA* pada semua sampel yang diteliti menunjukkan 100% identik dengan *M. tuberculosis* H37Rv. Tidak ada perbedaan sekuens diantara sampel-sampel yang diteliti sehingga semakin mempertegas pernyataan bahwa gen *esxA* merupakan gen *conserved*. Target gen *esxA* yang merupakan gen virulensi berpotensi menjadi salah satu target untuk metode diagnostik TB seperti LAMP dan imunodiagnostik.
2. Antigen MPT-59 atau Ag85B dan PPD menunjukkan hasil konsentrasi IgG yang signifikan diantara tujuh antigen yang diuji terhadap serum pasien TB dibanding kontrol sehat

#### Saran

1. Dilakukan uji spesifitas dan sensitivitas dari metode diagnostik lain seperti imunodiagnostik terhadap sampel TB baik yang sensitif terhadap anti-TB maupun yang resisten (MDR-TB).
2. Perlu dilanjutkan analisis antigen terhadap serum TB dan kontrol sehat pada jumlah sampel serum yang lebih banyak lagi untuk didapatkan analisis data yang lebih baik
3. Perlu dilakukan kloning target gen lain seperti *espD* yang termasuk bagian dari ESX-1 *cluster gene* untuk melihat potensi gen-gen virulensi selain ESAT-6 sebagai target biomarker diagnostik TB yang lebih spesifik dan sensitif.





## DAFTAR PUSTAKA

Bhunias, SK, Sarkar, M, Banerjee, A, & Giri, B 2015, An update on pathogenesis and management of tuberculosis with special reference to drug resistant, *Asian Pacific Journal Tropical Diseases*, vol. 5, no. 9, pp. 673-686.

Bi, A, Nakajima, C, Fukushima, Y, Tamaru, A, Sugawara, I, Kimura, A, Kawahara, R, Hu, Z, & Suzuki, Y 2012, A rapid loop-mediated isothermal amplification assay targeting hspx for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Japan Journal Infectious Diseases*, vol. 65, pp. 247-251.

Brown, TA 2010, *Gene Cloning and DNA Analysis An Introduction Sixth Edition*, John Wiley & Sons Ltd, UK.

Callahan, B, Nguyen, K, Collins, A, Valdes, K, Caplo, M, Crossman, DK, Steyn, AJ, Eisele, L & Derbyshire, M 2010, Conservation of structure and protein-protein interactions mediated by the secreted mycobacterial proteins esxA, esxB, and espA, *Journal of Bacteriology*, vol. 192, no. 1, pp. 326-335.

Carroll, KC, Hobden, JA, Miller, S, Morse, SA, Mietzner, TA, Detrick, B, Mitchell, TG, McKerrrow, JH, & Sakanari, JA 2016, *Jawetz, melnick & adelberg's medical microbiology 27<sup>th</sup> edition*, McGraw-Hill Companies Inc, USA.

Chen, J, Chen, Z, Lia, Y, Xia, W, Chen, X, Chen, T, Zhou, L, Xua, B, Xua, S 2012, Characterization of gyrA and gyrB mutations and fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Hubei Province, China, *Brazilian Journal of Infectious Disease*, vol. 16, no. 2, pp. 136-141.

Chimara, E, Ferrazoli, L, Leao, SC 2004, *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using gyrB restriction fragment length polymorphism analysis, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 99, no.7, pp. 745-748.

Cui, Z, Wang, J, Lu, J, Huang, X & Hu Z 2011, Association of mutation patterns in gyrA/B genes and ofloxacin resistance levels in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East China in 2009, *BMC Infectious Disease*, vol. 11, no. 78, pp. 1-5.

Davila, J, Zhang, L, Marrs, CF, Durmaz, R, & Yang, Z 2010, Assessment of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* esxA, esxH, and fbpB genes among clinical isolates and its implication for the future immunization by new tuberculosis subunit vaccines Ag85B-ESAT-6 and Ag85B-TB10.4. *J Biomedicine and Biotechnology*; vol. 2010, pp. 1-6, diakses 11 April 2016, <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/208371/abs/>

Dinas Dinas Kesehatan Jawa Timur 2013, *Profil kesehatan provinsi jawa timur tahun 2012*, Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, Surabaya.



Forrellad, MA, Klepp, LI, Gioffré, A, García, JSy, Morbidoni, HR, Santangelo, MdIP, Cataldi, AA & Bigi, F 2013, Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex, *Virulence*, vol. 4, no. 1, pp. 3-66.

Fukushima, M, Kakinuma, K, Hayashi, H, Nagai, H, Ito, K, Kawaguchi, R 2003, Detection and identification of mycobacterium species isolates by dna microarray, *Journal Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 6, pp. 2605-2615.

Gan, SD and Patel, KR 2013, Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay, *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 133, pp. e12, doi:10.1038/jid.2013.287.

Ganguly, N, Siddiqui, I, & Sharma, P 2008 Role of M. tuberculosis RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence, *Tuberculosis*, vol. 88, pp. 510-517.

Gil, P & Ghaemi, A 2008, Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies—A Review, *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, vol. 27, no. 3, pp. 224-243.

Guinn, KM, Hickey, MJ, Mathur, SK, Zakel, KL, Grotzke, JE, Lewinsohn, DM, Smith, S & Sherman, DR 2004, Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, *Molecular Microbiology*, vol. 51, no. 2, pp. 359-370.

Idexx, 2013, ELISA technical guide, Idexx Laboratories, Inc, USA, diakses 1 Desember 2017, [https://www.idexx.com/pdf/en\\_us/livestock-poultry/elisa-technical-guide.pdf](https://www.idexx.com/pdf/en_us/livestock-poultry/elisa-technical-guide.pdf).

Iwamoto, T, Sonobe, T, & Hayashi, K 2003, Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 6, pp. 2616-2622.

Jacob, RF 1994, Multiple-drug-resistant tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 19, pp. 1-10.

Kaufmann, SHE 2004, New issues in tuberculosis, *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 63, no. 2, pp. 50-56

Kementerian Kesehatan RI (InfoDATIN: Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan) 2015, *Tuberkulosis Temukan, Obati Sampai Sembuh*, PUSDATIN, Indonesia, diakses 14 November 2015, [http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/infodatin\\_tb.pdf](http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/infodatin_tb.pdf)

Kumar, P, Pandya, D, Singh, N, Behera, D, Aggarwal, P, Singh, S 2014, Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive diagnosis of tuberculosis, *Journal of Infection*, vol. 69, pp. 607-615.

Kusumaningrum, D, 2015, Asosiasi positività *Nontuberculous Mycobacteria* dengan derajat keparahan pasien tuberkulosis paru, *Tesis*, Program Pendidikan Dokter Spesialis (PPDS), Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya.

Mahboub, BH & Vats, MG 2013 *Tuberculosis-current issues in diagnosis and management*, InTech, Croatia, diakses 14 Maret 2016, <http://www.intechopen.com/books/tuberculosis-current-issues-in-diagnosis-and-management>.

Mertaniasih, NM, Wiqoyah, N, Kusumaningrum, D, Soedarsono, Perwitasari, ADS, Artama, WT 2014, Specific gyrB sequence of mycobacterium tuberculosis clinical isolated from sputum of pulmonary tuberculosis patients in Indonesia, *Bali Medical Journal*, vol. 3, no. 3, pp. 143-153.

Mertaniasih, NM, Koendhori, EB, Kusumaningrum, D 2013, *Tuberkulosis diagnostik mikrobiologis*, Airlangga University Press (AUP), Surabaya.

Nagaraja, V 2004, Regulation of DNA topology in mycobacteria, *Current Science*, vol. 86, no. 1, pp. 135-140.

NIAID 2007, *Research agenda multidrug resistant and extensively drug-resistant tuberculosis*, NIAID Tuberculosis Working Group, diakses 14 Maret 2016, <http://www.niaid.nih.gov/topics/tuberculosis/research/documents/mdrxdrresearchagenda.pdf>.

Osada-Oka, M, Tateishi, Y, Hirayama, Y, Ozeki, Y, Niki, M, Kitada, S, Maekura R, Tsujimura, K, Koide, Y, Ohara, N, Yamamoto, T, Kobayashi, K, Matsumoto, S, 2013, Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis, *Microbiology Immunology*, vol. 57, pp. 30-37.

Pathak, SK, Basu, S, Basu, KK, Banerjee, A, Pathak, S, Bhattacharyya, A, Kaisho, T, Kundu, M & Basu, J 2007, Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages, *Nature Immunology*, vol. 8, no. 6, pp. 610-618.

Potdar, P, & Thakur, P 2013, Development of sequence based molecular diagnostic test to evaluate MDR and XDR in *M. tuberculosis* patients from Western India, *American Journal of Infectious Disease and Microbiology*, vol. 1, no. 3, pp. 50-58.

Pourhajibagher, M & Nasrollahi, M 2013, An appropriate method for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in the clinical laboratories: Staining or polymerase chain reaction (PCR)?, *African J. Microbiology Research*, vol. 7, no. 6, pp. 440-443.

Rudolf, F, Joaquim, LC, Vieira C, Bjerregaard-Andersen, M, Andersen, A, Erlandsen, M, Sodemann, M, Andersen, PL, Wejse, C, 2013, The Bandim tuberculosis score: reliability and comparison with the Karnofsky performance score, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, vol. 45, pp. 256-264.

Rudolf, F, 2014, The Bandim TBscore - reliability, further development, and evaluation of potential uses, *Global Health Action*, vol. 7, pp. 24303.

Schuller, M, Sloots, TP, James, GS, Halliday, CL, Carter IWJ 2010, *PCR for clinical microbiology an australian and international perspective*, Springer Science+Business Media, New York.

Sharma, SK & Mohan, A 2004, Multidrug-resistant tuberculosis, *Indian Journal Medical Research*, vol. 120, pp. 354-376.

Singh, P, Jain, A, Dixit, P, Prakash, S, Jaiswal, I, Venkatesh, V, & Singh, M 2015, Prevalence of gyrA and B gene mutations in fluoroquinolone-resistant and -sensitive clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and their relationship with MIC of ofloxacin, *Journal of Antibiotics*, vol. 68, pp. 63-66.

Singleton, P 2000, *DNA methods in clinical microbiology*, Springer Science+Business Media, Dordrecht.

Solans, L, Aguiló, N, Samper, S, Pawlik, A, Frigui, W, Martín, C, Brosch, R, Gonzalo-Asensio, J 2014, A specific polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv causes differential ESAT-6 expression and identifies WhiB6 as a novel ESX-1 component. *Journal Infection and Immunity*, vol. 82, no. 8, pp. 3446-3456.

Teutschbein, J, Schumann, G, Möllmann, U, Grabley, S, Cole, ST & Munder, T 2009, A protein linkage map of the ESAT-6 secretion system 1(ESX-1) of *Mycobacterium tuberculosis*, *Microbiological Research*, vol. 164, pp. 253-259.

Thirumurugan, R, Kathirvel, M, Vallayyachari, K, Surendar, K, Samrot, AV, & Muthaiah, M 2015, Molecular analysis of *rpoB* gene mutations in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by multiple allele specific polymerase chain reaction in Puducherry, South India, *Journal of Infection and Public Health*, vol. 8, pp. 619-625.

Uplekar, S, Heym, B, Friocourt, V, Rougemont, J, & Cole, ST 2011, Comparative genomics of *esx* genes from clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* provides evidence for gene conversion and epitope variation, *Journal Infection and Immunity*, vol. 79, no. 10, pp. 4042-4049.

Wakabayashi, K, 2010, ELISA-a to z from introduction to practice, Shibayagi Co., Ltd, Japan.

Wang, JY, Lee, LN, Lai, HC, Wang, SK, Jan, IS, Yu, CJ, Hsueh PR & Yang PC 2007, Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure, *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 59, pp. 860-865.

WHO 2015a, *Global tuberculosis report 2015*, World Health Organization, Geneva, diakses 1 Desember 2015, [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1).

WHO 2015b, *Tuberculosis control in the South-East Asia Region*, World Health Organization, Geneva, diakses 1 Desember 2015, <http://www.searo.who.int/tb/annual-tb-report-2015.pdf>.

WHO, 2014, *Global Tuberculosis Report 2014*, World Health Organization, Geneva, diakses 14 Januari 2016, <http://www.who.int/tb/country/en/>.

WHO, 2010, *Multidrug and extensively drug-resistant tb (m/xdr-tb) 2010 global report on surveillance and response*, World Health Organization, Geneva, diakses tanggal 14 Maret 2016, [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44286/1/9789241599191\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44286/1/9789241599191_eng.pdf)

Yao, C, Zhu, T, Li, Y, Zhang, L, Zhang, B, Huang, J, & Fu, W 2010, Detection of rpoB, katG and inhA gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Chongqing as determined by microarray, *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 16, no. 11, pp. 1639-1643.

Yu, X & Xie, J 2012, Roles and underlying mechanisms of ESAT-6 in the context of *Mycobacterium tuberculosis*-host interaction from a systems biology perspective, *Cellular Signalling*, vol. 24, pp. 1841-1846.

Zhao, Y, Chen, F, Li, Q, Wang, L, & Fan, C 2015, Isothermal Amplification of Nucleic Acids, *Chemical Reviews*, vol. 115, no. 22, pp. 12491-12545, diakses 25 April 2016, <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.5b00428?journalCode=chcreay>.

### Lampiran 1. Instrumen

Instrumen penting yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu:

1. *Thermal cycler* atau *polymerase chain reaction (PCR) machine* digunakan untuk mengamplifikasi DNA target diinginkan, yaitu gen *esx4*.



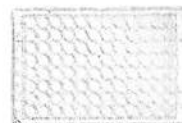
2. Vacutainer digunakan untuk sampling darah pasien TB dan kontrol sehat



3. Microplate washer digunakan untuk mencuci plate pada proses ELISA



4. ELISA *microplate* digunakan untuk proses melihat titer IgG sampel pasien TB dan kontrol sehat



5. pH meter untuk mengukur pH dari buffer yang digunakan



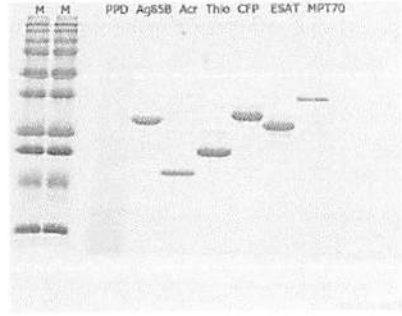


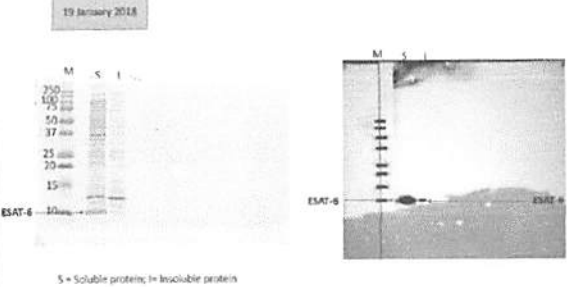
**Lampiran 2. Personalia Tenaga Pelaksana Beserta Kualifikasinya**

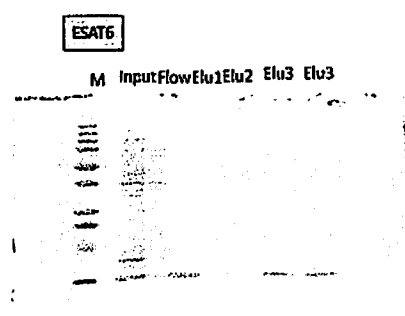
No	Nama/NIDN/NIK/NIM/NIP	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi Waktu (Jam/Minggu)	Uraian Tugas
1.	Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK(K)/0007035703	Dept. Mikrobiologi Kedokteran FK Universitas Airlangga	- Mikrobiologi (TB) - Imunologi	14 jam/minggu	- Manajemen kegiatan, - Riset karakteristik gen <i>esx4</i> sebagai dasar diagnostik - Riset AAN- <i>Isothermal</i>
2.	Dr. Soedarsono, dr., Sp. P. (K)/195511231984101001	Dept. Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi Universitas Airlangga	- Pulmonologi - Klinisi	10 jam/minggu	- Riset karakteristik <i>esx4</i> sebagai dasar diagnostik - Riset AAN- <i>Isothermal</i>
3	Prof. Dr. Wayan T. Artama, DVM/0018085308	Departemen Biokimia FKH, Universitas Gadjah	- Biokimia - Biologi Molekuler - Imunologi	12 jam/minggu	- Riset karakteristik <i>esx4</i> sebagai dasar diagnostik - Riset AAN- <i>Isothermal</i>

4.	Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi, S.Si., M.Ked.Trop/01151425300 6	S3 Fakultas Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga	- Mikrobiologi - Biologi molekuler	15 jam/minggu	- Pendataan sampel - Pengerjaan PCR - Kultur bakteri TB - Riset genomik <i>esx1</i> - Riset AAN- <i>Isothermal</i>
7.	Agnes Dwi Sis Perwitasari/139101094	ITD- Universitas Airlangga	Bioteknologi	10 jam/minggu	- Pengerjaan PCR - Kultur bakteri TB - Pengerjaan AAN- <i>Isothermal</i>
8.	Sugeng Harijono/19671118200112 1001	FK Universitas Airlangga	Mikrobiologi	10 jam/minggu	- Pengumpulan sampel - Kultur bakteri TB
9.	Virginia Ayu Ferandra/19920920206015 201	ITD- Universitas Airlangga	Bioteknologi	8 jam/minggu	- Pengumpulan sampel darah
10.	Dwi Nastiti/196809121991032 009	RSUD Dr. Soetomo	- Pulmonologi - Klinisi	8 jam/minggu	- Pengumpulan sampel darah
11.	Dwi Maryuni/19710303199103 2006	RSUD Dr. Soetomo	- Pulmonologi - Klinisi	8 jam/minggu	- Pengumpulan sampel darah

Lampiran 3. Tabel Kegiatan Penelitian

No.	Tanggal	Kegiatan
1.	5 Januari 2018	Membuat gel SDS-PAGE
2.	6 Januari 2018	Melakukan SDS-PAGE pada 7 protein dari <i>M. tuberculosis</i> 
3.	11 Januari 2018	Melakukan <i>electroporation</i>
4.	12 Januari 2018	Melanjutkan proses <i>electroporation</i> ke dalam <i>clear coli</i>
5.	16 Januari 2018	1. Membuat gel SDS-PAGE 2. Menyiapkan sampel untuk SDS-PAGE dan <i>Western Blot</i>
6.	17 Januari 2018	Melakukan SDS-PAGE (10µl/lane) untuk melihat berat protein dan <i>western blot</i> Melakukan <i>Western Blotting</i>

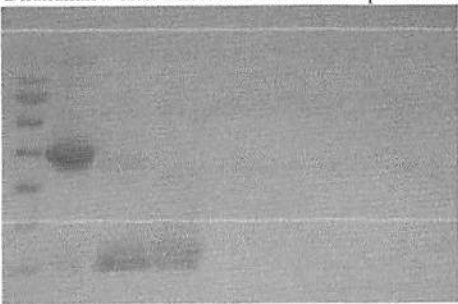
7.	18 Januari 2018	Melihat pelet <i>clear coli</i> apakah merupakan protein <i>soluble</i> atau <i>insoluble</i> dan juga melakukan perhitungan konsentrasi protein dengan BCA assay.
8.	19 Januari 2018	<p>Melakukan SDS-PAGE untuk diwarnai <i>Coomassie Brilliant Blue (CBB)</i> dan <i>Western Blot</i></p> 
9.	22 Januari 2018	Purifikasi protein <i>soluble</i> dengan kolom His GraviTrap
10.	23 Januari 2018	<p>Melanjutkan proses pemurnian protein. Setelah protein direndam dalam New Dialysis Buffer 4°C selama over night, protein dipindah ke centrifuge tube 15 ml, kemudian protein diambil dari <i>Snake Skin</i> yang sebelumnya dimasukkan ke dalam <i>Snake Skin</i> yang direndam dalam <i>Dialysis Buffer</i>.</p> <p>Melakukan BCA Assay untuk mengetahui konsentrasi protein.</p> <p>Mempersiapkan media untuk SDS-PAGE dan mempersiapkan bahan sampel SDS-PAGE</p> <p>Immobilize antigen untuk melihat apakah antigen dapat melekat pada plate yang</p>

		digunakan untuk ELISA
11.	24 Januari 2018	<p>Melakukan SDS-PAGE untuk CBB</p>  <p>Blocking plate ELISA dengan 5% <i>skim milk</i>, dilanjutkan dengan penambahan anti-His-tag-mAb-IRP-Direct. Penambahan substrat TMB dan reaksi dihentikan dengan HCL. Dilakukan pembacaan absorbansi 450 nm.</p>
12.	19 Februari 2018	Pengambilan sampel serum darah Pasien TB sebanyak 6 sampel. Dilakukan proses pemisahan serum dengan cara sentrifugasi (Px33-Px38)
13.	20 Februari 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 1 sampel darah pasien TB (Px39)
14.	21 Februari 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 4 sampel darah pasien TB (Px 39-Px42)
15.	26 Februari 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 6 sampel darah pasien TB (Px 43-Px48)

16.	28 Februari 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 3 sampel darah <i>healthy control</i> (HC33-HC35)
17.	2 Maret 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 3 sampel darah pasien TB (Px49-Px51)
18.	20 Maret 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 5 sampel darah pasien TB (Px52-Px56)
19.	26 Maret 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 4 sampel darah pasien TB (Px57-60)
20.	27 Maret 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 3 sampel darah pasien TB (Px61-Px62 dan Px60)
21.	29 Maret 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 2 sampel darah pasien TB (Px63-Px64)
22.	2 April 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 3 sampel darah pasien TB (Px65-Px67)
23.	3 April 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 2 sampel darah pasien TB (Px67-68). Sampel Px67 dilakukan pengambilan kembali
24.	9 April 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 3 sampel darah <i>healthy control</i> (HC36-HC38)
25.	10 April 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 6 sampel darah <i>healthy control</i> (HC39-HC44)
26.	11 April 2018	Pengambilan sampel darah pasien TB sebanyak 5 sampel (Px69-Px73)

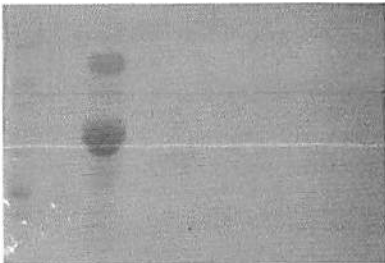


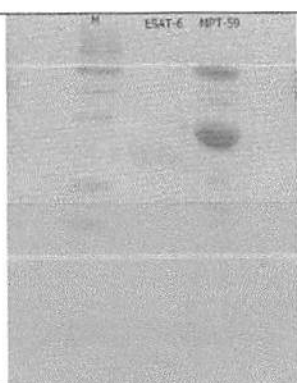
27.	12 April 2018	Pengambilan sampel darah pasien TB sebanyak 1 sampel (Px74) Pemisahan serum sampel darah pasien TB sebanyak 6 sampel (Px69-Px74)
28.	19 April 2018	Pengambilan sampel darah pasien TB sebanyak 6 sampel (Px75-Px80)
29.	20 April 2018	Pemisahan serum sampel pasien TB yang diambil pada tanggal 19 April 2018 sebanyak 6 sampel (Px75-Px80)
30.	27 April 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 3 sampel darah <i>healthy control</i>
31.	3 Mei 2018	Produksi protein ESAT-6 dari <i>E. coli</i> BL21 yang telah disisipi plasmid pET SUMO yang mengandung gen pengkode ESAT-6 ( <i>exxA</i> ). Bakteri yang dikultur pada media LB sebanyak 2 ml kemudian dipindah ke 50 ml media LB yang telah mengandung <i>kanamycin</i> .
32.	4 Mei 2018	10 ml hasil kultur pada tanggal 3 Mei 2018 dipindah ke dalam 200 ml media LB yang telah ditambahkan <i>kanamycin</i> 2 ml. Di- <i>shaker</i> pada suhu 37°C selama kurang lebih 1,5 hingga 2 jam.  Dilakukan pengukuran OD=0,6 pada $\lambda$ 600nm dan di- <i>shaker</i> selama 30 menit. Kemudian ditambahkan IPTG 1 ml dan di- <i>shaker</i> selama 4 jam pada suhu 37°C  Dilakukan sentrifugasi pada media hingga didapatkan pelet yang dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan pada pencucian terakhir, supernatant dibuang dan ditambahkan 4 ml PBS di resuspen dan disimpan dalam -4 hingga -20°C
33.	5 Mei 2018	Dilakukan proses sonikasi dan purifikasi protein ESAT-6 menggunakan kit purifikasi Ni-NTA Purification System Novex

34.	6 Mei 2018	Dilakukan <i>Western Blot</i> dan SDS-PAGE pada hasil purifikasi 
35.	11 Mei 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 3 sampel darah pasien TB (Px81-Px83)
36.	14 Mei 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 1 sampel darah pasien TB (Px84)
37.	16 Mei 2018	Melakukan pencatatan data rekam medis pasien Pengukuran protein dengan metode Bradford Assay
38.	17 Mei 2018	Pengambilan 4 sampel darah pasien TB (Px85-Px88) Pengambilan 18 sampel darah <i>healthy control</i> (HC48-HC65)
39.	18 Mei 2018	Pemisahan serum 4 sampel darah pasien TB dan 18 sampel darah <i>healthy control</i>
40.	21 Mei 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 1 sampel darah pasien TB (Px89)
41.	23 Mei 2018	Pengambilan sampel dan pemisahan serum 1 sampel darah pasien TB (Px90)

42.	24 Mei 2018	Pengambilan 1 sampel darah pasien TB (Px91) Pengambilan 12 sampel darah <i>healthy control</i> (HC66-HC77)
43.	25 Mei 2018	Pengambilan 7 sampel darah pasien TB (Px87, Px92-Px97) Pemisahan serum sampel pasien TB Px87, Px91-Px97 dan HC 66-HC77
44.	26 Mei 2018	Pengambilan darah <i>healthy control</i> sebanyak 12 sampel (HC78-HC89)
45.	27 Mei 2018	Pengambilan darah <i>healthy control</i> sebanyak 13 sampel (HC90-HC102)
46.	28 Mei 2018	Pemisahan serum sampel <i>healthy control</i> sebanyak 25 sampel (HC78-HC102)
47.	30 Mei 2018	Pengambilan dan pemisahan serum 1 sampel darah pasien TB (Px98)
48.	4 Juni 2018	Pengambilan 1 sampel darah pasien TB (Px99)
49.	5 Juni 2018	Pemisahan serum sampel Px99
50.	6 Juni 2018	Pengambilan dan pemisahan serum 4 sampel darah pasien TB (Px93, Px100-Px102)
51.	7 Juni 2018	Pengambilan dan pemisahan serum 1 sampel darah pasien TB (Px103)
52.	2 Juli 2018	Pengambilan dan pemisahan serum 2 sampel darah <i>healthy control</i> (HC103-HC104)
53.	6 Juli 2018	Pengambilan dan pemisahan serum 1 sampel darah <i>healthy control</i> (HC105)
54.	8 Juli 2018	Pengambilan 9 darah sampel <i>healthy control</i> (HC106-HC114)

55.	9 Juli 2018	Pemisahan serum darah HC106-HC114
56.	11 Juli 2018	Membuat PBS 10x untuk uji ELISA
57.	12 Juli 2018	Dilakukan <i>immobilize</i> atau <i>coating</i> antigen ESAT-6 dan Ag85B/MPT-59 untuk checkboard ELISA
58.	13 Juli 2018	Dilakukan blocking dengan 5% Skim Milk dan penambahan serum, <i>secondary antibody</i> dan TMB substrat Pembacaan hasil pada $\lambda$ 450 nm. Hasil checkboard tidak terlalu bagus
59	31 Juli 2018	Membuat running buffer 10x sebanyak 100 ml untuk SDS-PAGE
60.	1 Agustus 2018	Dilakukan coating antigen ESAT-6 dan Ag85B dengan menggunakan <i>coating buffer</i> dan PBS1x Membuat gel SDS-PAGE 12% Memperiapkan sampel untuk running SDS-PAGE kemudian diwarnai CBB

61.	2 Agustus 2018	Melanjutkan proses ELISA, dilakukan blocking dengan 5% Skim Milk Melakukan SDS-PAGE untuk diwarnai CBB 
62.	3 Agustus 2018	Penambahan 1 sampel serum pasien TB dan 1 sampel <i>healthy control</i> , penambahan <i>secondary antibody</i> , dan TMB substrat. Pembacaan hasil pada $\lambda$ 450 nm. Hasil ELISA. Hasil masih checkboard tidak terlalu bagus. Ada masalah dengan TMB substrat
63.	10 Agustus 2018	Membuat media LB untuk persiapan produk protein ESAT-6 dan kemudian dilanjutkan dengan autoklaf
64.	13 Agustus 2018	Melakukan penanaman bakteri <i>E.coli</i> BL21 pada media 5 ml LB. I hingga tanggal 16 Agustus 2018 belum tumbuh.
65.	28 Agustus 2018	Membuat gel SDS-PAGE untuk analisis protein Ag85B dan ESAT-6
66.	29 Agustus 2018	Running sampel Ag85B dan ESAT-6



67.	31 Agustus 2018	Purifikasi protein ESAT-6 kembali	
68.	12 September 2018	Preparasi protein ESAT-6 dengan berbagai elusi untuk SDS-PAGE Menumbuhkan plasmid pET 30A Top 10 di media LB 5 ml sebanyak 2 tabung Membuat gel SDS-PAGE 15% dan 10%	
69.	13 September 2018	Membuat gel SDS kembali dengan konsentrasi 15% karena gel kemarin kurang bagus. Sentrifugasi biakan pET 30A di Top10 yang telah dibiakkan di media LB sebanyak 5 ml. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm, 1 menit hingga semua biakan habis. Supernatan dipindah ke centrifuge tube 1,5 ml. Pelet disimpan di -20 °C. Running sampel protein ESAT-6 dengan urutan ESAT L P1 (1); ESAT L P1 (2);	




		ESAT L P2 (1); ESAT L P2 (1); ESAT L P2 (2); ESAT B P1 (1); ESAT B P2 (1); ESAT B P1 (2); ESAT B P2 (2). Gel kemudian di staining dengan CBB dan destaining selama semalam
70.	14 September 2018	Isolasi plasmid menggunakan Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit
71.	17 September 2018	PCR gen target <i>espD</i> untuk penelitian lanjutan nantinya Ekstraksi produk PCR menggunakan QIAquick Gel Ekstraction Kit Melakukan proses restriksi dan ligasi. Untuk proses ligasi, dilakukan inkubasi pada suhu 22 °C selama ± 16 jam.
72.	18 September 2018	Membuat media LB padat sebanyak 2 erlenmeyer dengan volume masing-masing sebanyak 100 ml Melakukan proses transformasi Membuat gel untuk SDS-PAGE 15%
73.	19 September 2018	Running sampel SDS protein Ag85B dan ESAT-6 Buat media LB untuk replating hasil transformasi
74.	20 September 2018	Ambil koloni yang kemarin di- <i>replating</i> dari inkubator. Pindahkan 1 ose koloni bakteri ke 5 ml media LB yang telah ditambah kanamycin. Inkubasi selama semalam pada suhu 37 °C.
75.	21 September 2018	Isolasi plasmid seperti tanggal 14 September 2018, kemudian <i>electrophoresis</i> .
76.	22 September 2018	Restriksi single digest dan kontrol pET30a untuk mengecek hasil transformasi. Setelah mencampurkan reagen untuk <i>single digest</i> , maka inkubasi di <i>waterbath</i>

		pada suhu 37 °C selama 30 menit. Hasil menunjukkan band terfragmentasi. Kemungkinan transformasi belum berhasil.
77.	25 September 2018	Membuat gel <i>electrophoresis</i> 1% <i>Electrophoresis</i> (ELP) hasil transformasi gen <i>espD</i> . Hasil ELP menunjukkan bisa lanjut restriksi Dilakukan proses single restriksi dan double restriksi. Inkubasi di water bath suhu 37 °C selama 20 menit. ELP hasil transformasi. Namun, hasil ELP tidak bagus. pET 30 tidak ada band.
78.	27 September 2018	Dilakukan proses restriksi kembali dengan metode double digest. Inkubasi pada suhu 37 °C di waterbath selama 30 menit. Sampel disimpan pada suhu -20 °C. Rencana besok baru di ELP. Membuat TAE 1x dari stock 50x Membuat gel agarose 1% sebanyak 40 ml
79.	28 September 2018	ELP hasil <i>double digest</i> kemarin. Hasil yang didapatkan kurang bagus, sepertinya tidak ada <i>insert</i> .

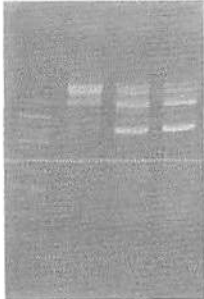


Hasil transformasi kemudian dicoba di lakukan PCR dengan racikan total volume sebesar 10 ml dan 15 ml.

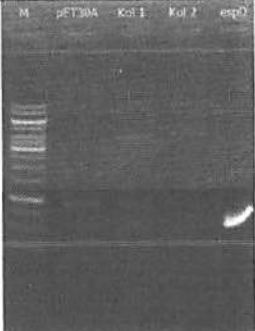
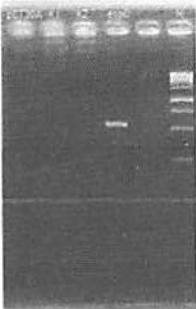
Untuk hari ini mencoba ligase dengan metode rasio molar, menggunakan perbandingan 1:1. Inkubasi pada suhu 4 °C hingga hari Senin tanggal 1 Oktober 2018.

80.	1 Oktober 2018	<p>ELP hasil transformasi kemarin. Hasil ELP menunjukkan tidak ada insert. Tidak ada band pada ukuran 555 bp.</p>  <p>Menyiapkan Top10 di media LB cair yang telah ditambahkan kanamycin 2.5 µl. Inkubasi di shaker selama semalam pada suhu 37 °C</p> <p>Hasil ligase dipindah ke kulas -20 °C untuk ditransformasi pada tanggal 2 Oktober 2018</p>
81.	2 Oktober 2018	<p>Autoklaf endorf, <i>L-shaped</i> untuk spreading bakteri dan media LB sebanyak 100 ml</p> <p>Melakukan uji bradeford pada sampel protein ESAT-6, yaitu: ESAT P1 (2); ESAT P2 (2); ESAT ELU 1 (1); ESAT ELU 2 (1); ESAT ELU 1 (2); ESAT ELU 2 (2). Hasil bradeford ada keanehan, karena konsentrasi protein yang dibaca kecil</p>

		<p>sekali. Kemungkinan besar reagensnya sudah tidak bagus. Coba dilakukan nanodrop.</p> <p>Melakukan tahap transformasi seperti pada tanggal 18 September 2018. Hasil transformasi ditanam pada LB padat + kanamycin. <i>Spread</i> dengan <i>L-shaped</i>, inkubasi selama <math>\pm</math> 16 jam atau <i>overnight</i> di inkubator dengan suhu 37 °C.</p>
82.	3 Oktober 2018	<p>Melakukan PCR koloni pada hasil transformasi, dengan total volume sebanyak 15 <math>\mu</math>l. Ambil 1 koloni dengan tusuk gigi steril dan kemudian dipindah ke dalam campuran reagen PCR.</p> <p>Uji konsentrasi protein ESAT-6 dengan nanodrop. Konsentrasi protein tertinggi adalah ESAT P1 (2) dengan konsentrasi sebesar 0.52 mg/ml.</p> <p>Hasil ELP PCR koloni menunjukkan bahwa koloni transformasi 1 dan 2 tidak ada band hanya ada <i>excess primer</i>. Kontrol yang merupakan gen <i>espD</i> dari ekstraksi DNA, muncul.</p>
83.	4 Oktober 2018	<p>Melapisi sampel serum dengan parafilm</p> <p>Dua koloni dari hasil transformasi kemarin kemudian dipindah ke media LB padat + Kanamycin baru dan juga dipindah ke media LC cair 5 ml+ 2.5 kanamycin. Inkubasi selama semalam dengan suhu 37 °C</p>
84.	5 Oktober 2018	<p>Sentrifugasi biakan koloni 1 dan 2 hasil transformasi dengan cara yang sama pada tgl 13 September 2018, namun kecepatan sentrifugasi berbeda dengan tgl 13 September 2018. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit.</p>
85.	6 Oktober 2018	<p>Isolasi plasmid koloni 1, 2 dan juga koloni pET30a menggunakan Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit seperti pada tanggal 14 September 2018.</p>

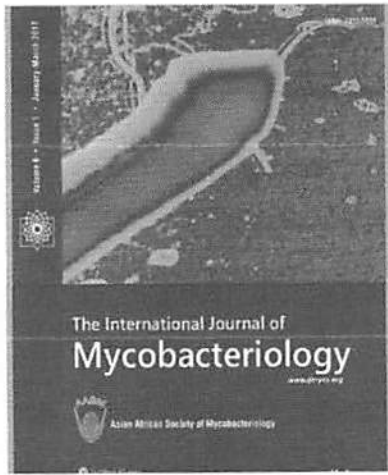
		<p>Membuat agarose gel 1% .</p> <p>Melakukan ELP pada sampel pET 30a, koloni espD 1, dan koloni espD 2</p>  <p>Terlihat adanya pita DNA, maka dilanjutkan tahap PCR untuk konfirmasi.</p>
86.	8 Oktober 2018	<p>PCR hasil transformasi koloni espD 1 dan 2 yang kemarin telah diisolasi plasmid dengan total volume sebanyak 15 µl</p> <p>Aliquot protein ESAT-6 ke cryotube untuk dibawa ke Jepang.</p> <p>Setelah proses PCR selesai, dilanjutkan proses ELP dan hasil ELP menunjukkan bahwa terdapat pita pada koloni 1 dan 2 di ukuran 500-an bp sama dengan pET 30a dan hasil juga menunjukkan terlalu banyak pita</p>



		
87.	9 Oktober 2018	<p>Dilakukan proses PCR kembali dengan total reaksi sebanyak 15 µl. Setelah proses PCR selesai, dilanjutkan dengan proses ELP. Hasil ELP menunjukkan tidak ada insert karena tidak ada pita dengan ukuran 555 bp</p> 
88.	11 Oktober 2018	<p>PCR gen espD untuk persiapan penelitian kloning kembali nantinya.</p>



Lampiran 4. Abstrak Jurnal Status *Published*

1)



2)

**ORIGINAL ARTICLE**  
 Bali Medical Journal (Bali Med J) 2017, Volume 6, Number 1, 150-155  
 P-ISSN 2089-1180, E-ISSN 2332-2914

**The specific DNA region of *esxA* gene for the target of PCR to determine *Mycobacterium tuberculosis* accurately**

Desak Nyoman Surya Suameitna Dewi,<sup>1,2</sup> Soedarsono,<sup>3</sup>  
 Anita Kurniati,<sup>1,4</sup> Ni Made Mertaniasih<sup>1,5\*</sup>

**ABSTRACT**

The *esxA* gene is a potent virulence gene and also known as conserved gene potential as a target to diagnose *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), especially *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). The aim of this study was to evaluate the specificity of specific DNA region of *esxA* gene as target for PCR to identify and determine MTC among *Mycobacterium* clinical isolates, compare with the culture method. Clinical isolate samples were collected randomly from January 2016 until July 2016 among *Mycobacterium* sputum isolates of respective pulmonary tuberculosis (PTB) patients in Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. Samples were detected and identified using BACTEC MGIT 960 system (2D) culture method, then isolated from culture method were amplified by using PCR based on *esxA* as gene target. Primer for *esxA* gene region was designed using Gene Manager 4, version 6.20. The amplification was confirmed as positive results DNA band appearing at 135bp. *M. tuberculosis* (Tb) strain was used as positive control, PCR mixture without DNA, and *Mycobacterium fortuitum* (Mf) *Mycobacterium* isolate as negative control. Total 27 clinical isolates from sputum specimens which had been analyzed using PCR revealed that all clinical isolates were positive and in concordance with the result of standard culture method, MGIT. The conserved and specific DNA region of *esxA* gene with size of 135 bp for PCR have high accuracy for identification of *M. tuberculosis* that is important in determining diagnosis of MTC infection.

**Keywords:** *esxA* gene, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, identification

**Cite this Article:** Dewi, DS, S, Soedarsono, Kurniati, A., Mertaniasih, NM. 2017. The specific DNA region of *esxA* gene for the target of PCR to determine *Mycobacterium tuberculosis* accurately. Bali Medical Journal 6(1): 150-155. DOI: 10.15405/bali.v6i1.1396

**INTRODUCTION**

Tuberculosis caused by intracellular pathogen MTC is one of the chronic diseases caused burden and adverse for productive people, therefore it is still a major health problem in almost all over the WHO also stated that estimation of TB patient living with HIV in 2014 was 1.2 million (12%) out of 9.6 million people with new TB cases. One of the strategies measures that recommended by WHO is

Institute of Tropical Disease,  
 Airlangga Health Science Institute,  
 Gadjah Mada University, Yogyakarta,  
 Indonesia  
<sup>2</sup>Magister of Tropical Medicine, Airlangga  
 University Surabaya, Indonesia  
<sup>3</sup>Department of Pulmonology,  
 Faculty of Medicine, Airlangga

3)

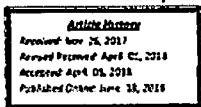
Dewi et al., Afr. J. Infect. Dis. (2018) 12 (2): 66-70  
https://doi.org/10.21010/ajid.v12i2.10

T CELL EPITOPES OF THE *ESAT-6* GENE OF *Mycobacterium tuberculosis* FROM SPUTUM OF MDR-TB PATIENTS

Dewi Nyoman Surya Saamitra Dew<sup>1,2</sup>, Soedarsono<sup>3</sup>, Ni Made Mertaniasih<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Student of Doctoral Program of Medical Science, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 47, Surabaya 60131, Indonesia. <sup>2</sup>Laboratory of Tuberculosis, Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga, Kampus C Jl. Mulyorejo Universitas Airlangga, Surabaya 60115, Indonesia. <sup>3</sup>Department of Pulmonology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga -Dr. Soetomo Hospital, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 47, Surabaya 60131, Indonesia. <sup>4</sup>Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga -Dr. Soetomo Hospital, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 47, Surabaya 60131, Indonesia.

\*Corresponding Author's E-mail: [nyasur@f103.mahz.unma.ac.id](mailto:nyasur@f103.mahz.unma.ac.id)



Abstract

**Background:** In 2015, World Health Organization (WHO) discovered 19.4 million tuberculosis (Tb) cases around the world. Multidrug resistant tuberculosis (MDR-Tb) became a threat because it has high mortality number. There were 469,000 new MDR-Tb cases in 2015. Based on these problems, diagnostic development to detect MDR tuberculosis rapidly and accurately is needed. The importance of detecting epitope expression of *esat-6* full gene because there was a potential of complexity over the protein structure that might affect the protein concentration. By knowing epitope production, there is an expectation that it can help the development of TB diagnostic. This research was aimed to determine the T cell epitope production of *esat-6* full gene from MDR-Tb patients.

**Material and Methods:** Total of 24 MDR-Tb sputum isolates from TB patients at Dr. Soetomo Hospital were collected from September to December 2016. Samples were confirmed as MDR-Tb using GeneXpert and Hainco MGIT 960. These samples tested using PCR targeted 580 bp of *esat-6* gene and sequencing. Gene sequence was aligned against wild type using Bioedit program version 7.2.5 and NCBI BLAST. T cell epitope prediction was analyzed by GENEPYX version 3.0.

**Results:** Epitope prediction that could be obtained were HFAAAS, ASARAF, VTSRHS, IKLAAA, VTGME A based IAD Pattern Position and TAAAS based Richard Taylor Pattern Position. These prediction epitopes can determine the severity of disease, therefore full gene of *esat-6* could be used as diagnostic target.

**Conclusion:** This research discovered five specific T cell epitope prediction based on IAD Pattern Position and one epitope prediction according to Richard Taylor Pattern Position.

**Keywords:** *esat-6* gene, ESAT-6, T cell epitope prediction, MDR-Tb

**Lampiran 5. Asbtrak Jurnal *Under Review* dan Abstrak Draf Jurnal*****Under review*****Association of disease severity with TLRs polymorphism and *esx4* gene sequence in MDR-TB patient****Abstract**

**Background:** Disease severity in pulmonary multidrugs resistant tuberculosis (MDR-TB) varies from mild to severe, which is determined by host and pathogen virulence factors. The aim of this research was to analyze association between disease severity degree of pulmonary MDR-TB patients with the SNPs found in TLRs gene and variation of *esx4* gene.

**Methods:** TLRs-encoding gene was obtained from PBMC of pulmonary MDR-TB patients in Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. PCR multiplex and target SNPs were genotyped using DigiTag2 assay. The *esx4* gene variant of MDR-TB isolates was determined using PCR and sequencing. Severity degree of pulmonary MDR-TB patients was determined by chest x-ray. Association level between SNP in TLRs gene degree of pulmonary MDR-TB was analyzed using Chi Square test with Bonferroni correction to anticipate genotyping error.

**Results:** Based on chest X-ray results, the tuberculosis lesions were scored according to their severity, with a score of  $\leq 2.5$  ranking as mild, 2.5-6 as moderate and  $\geq 6$  as severe. Total 22 out of 38 patients were classified into severe degree group, while 16 patients were moderate/mild degree. SNPs in encoding gene of TLRs were mostly found in intron and several in exon position, specifically in TLR-1, TLR-2, and TLR-6. SNPs from severe group was found to be significantly different from those found in moderate/mild group ( $p < 0.05$ ). Among MDR-TB isolates from patients with pulmonary MDR-TB of severe and moderate/mild degree, there was no variation in *esx4* gene expression in all of the group.

**Conclusion:** We concluded that SNPs in TLR-1, TLR-2 and TLR-6 of pulmonary MDR-TB patients was found to have an association with disease severity and there is no variation of *esx4* gene expression was detected in all of the group.

**Keywords:** TLRs polymorphism, SNPs, variation of *esx4* gene sequence, pulmonary MDR-TB Indonesia, severity degree of pulmonary MDR-TB

BMC Infectious Diseases Editorial Manager  
 HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS  
 Tools: Author | Username: p0022@publ01/23

Revisions Being Processed for Author Soedarsono Soedarsono, dr., Sp.P (K)

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed)

Display 10 results per page.

#	Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Request	Status Date	Current Status
	<a href="#">Action Links</a>	INFD- D-17-01402R1	Association of disease severity with Toll-like Receptors (TLRs) polymorphism and esxA gene sequence in MDR-TB patient	26 Mar 2018	10 Jun 2018	Editorial Assessment

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed)

Display 10 results per page.

**Under review****Severity TB class by modified TB Bandim scoring associate with the specific sequence of *esxA* gene on MDR-TB patients****Abstract**

**Background.** The severity pulmonary TB (PTB) and multidrug resistant (MDR-TB) strain detection as the potential causative agents could be the crucial consideration because of the determination of treatment success. Severity PTB class based on modified TB Bandim criteria by examining five symptoms and four signs of patients. Those data were taken from feasible medical record that routinely done in hospital. This study was aimed to analyze the association between the specific sequences of the *esxA* full gene from MDR-TB sputum isolates and the severity class of MDR-TB patients. **Methods.** Total 98 sputum samples that suspected as MDR-TB were collected from Dr. Soetomo Academic Hospital, Surabaya, Indonesia on September until December 2016. Total 24 isolates out of 98 patients were confirmed with positive rifampicin resistant (RR-TB) or MDR-TB based on GeneXpert test. MDR-TB isolates were tested using PCR targeted 580 bp of *esxA* full gene and resulting amplicon were sequenced. Gene sequence was aligned against wild type using Bioedit program version 7.2.5 and NCBI BLAST. The severity class of pulmonary TB patients was assessed using the modified TB Bandim scoring. **Results.** Result revealed that 24 MDR-TB patients were mostly from 51-60 years with percentage of 38%. Patients severity classification resulted in moderate and severe degree of 38% while mild degree 63%. Visualization of PCR result showed that all 24 of MDR-TB samples were found positive of 580 bp band and sequence result had 100% homology with virulent wild-type *M. tuberculosis* H37Rv (NC\_000962.3) and MTBC sequence. **Conclusions.** From current study, association between characteristic of the *esxA* full gene and the severity class of MDR-TB patients are yet to be found. However, the homolog sequence of all samples, with various degree of severity, possess 100% identities to *M. tuberculosis* H37Rv wild type.







**Manuscript Tracking System**

Hindawi Ni Made Mertaniasih Update Account Logout

Submit a Manuscript Author Activities

### Author Activities

MS Number	Title & Authors	Additional Files	Status
 8410571.v1 (Research Article)	 Severity TB class by modified TB Bandim scoring associate with the specific sequence of <i>esxA</i> gene on MDR-TB patients Desak Nyoman Surya Suarmitra Dewi, Ni Made Mertaniasih, and , Soedarsono	 Cover Letter	Under Review

Hindawi Search  

Browse Journals Authors Editors About Us

Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology

**Draft**

**Antibody responses to seven *Mycobacterium tuberculosis* proteins in pulmonary tuberculosis patients in Surabaya, Indonesia.**

**Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi<sup>1,2</sup>, Ni Made Mertaniasih<sup>3\*</sup>, Soedarsono<sup>4</sup>, Yuriko Ozeki<sup>5</sup>, and Sohkichi Matsumoto<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Student of Doctoral Program of Medical Science, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

<sup>2</sup>Laboratory of Tuberculosis, Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

<sup>3</sup>Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

<sup>4</sup>Department of Pulmonology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

<sup>5</sup>Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan

\*Correspondence Author: [nmademertaniasih@gmail.com](mailto:nmademertaniasih@gmail.com)

**Abstract**

Tuberculosis (TB) is one of the infectious disease that still become a major health problem in all over the world. Accurate and rapid diagnostic tools become one of important aspect to manage TB cases appropriately. However, the sensitivity and specificity value of diagnostic kit such as Tuberculin skin test (TST) and Interferon Gamma Release Assays (IGRA) are still debated. Thus, finding specific biomarker-targeted antibody for developing a rapid and accurate diagnostic tool for TB diagnosis is really needed. Total 32 serum samples of pulmonary TB patients (PTB) were collected from Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia and 32 serum samples of people without PTB symptoms as a healthy control also collected from September to October 2017. Antigen of purified protein derivate (PPD), MPT-59, recombinant protein of Acr, CFP-10, ESAT-6, MPT-70, and thioredoxin were prepared. Antibody response against those protein was evaluated using ELISA. The result was analyze statistically using Mann-Whitney's test. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis with 95% CI for each antigen was determine by SPSS version 21. Result showed that the TB patient had significantly higher concentration of IgG antibody response against MPT-59 and PPD than healthy control. In addition, ROC analysis showed that MPT-59 and PPD acceptable for diagnostic with AUCs of 0.775 (95% CI 0.650-0.901,  $P < 0.0001$ ) and 0.708 (95% CI 0.581-0.834,  $P < 0.0001$ ), respectively. However, all samples showed low concentration of IgA antibody against all antigen. MPT-59 has potential as biomarker target for measuring antibody response of PTB patients in Indonesia.

Lampiran 6. Sertifikat Sebagai Oral Presenter  
Seminar The 7<sup>th</sup> Annual Basic Science International Conference



**Seminar of 2<sup>nd</sup> Molecular and Cellular Life Sciences (MCLS)**



rijksuniversiteit  
 groningen

**CERTIFICATE OF ATTENDANCE**

This certificate is awarded to

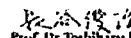
**Desak Nyoman Surya Suamoltria Dewi, S.Si, M.Red.Trop.**


in recognition of valuable contribution on the International Seminar 2<sup>nd</sup> MCLS 2017


**2<sup>nd</sup> MOLECULAR AND CELLULAR LIFE SCIENCES :**  
**Structural Biology, Bio-molecular modelling, Bio-molecular dynamics**  
**with applications in biotechnology & medicine**

as **Oral Presenter**

**Surabaya, July 17-18<sup>th</sup>, 2017**

  
**Prof. Dr. Toshihisa Hase**  
Director of European Center of  
Osaka University

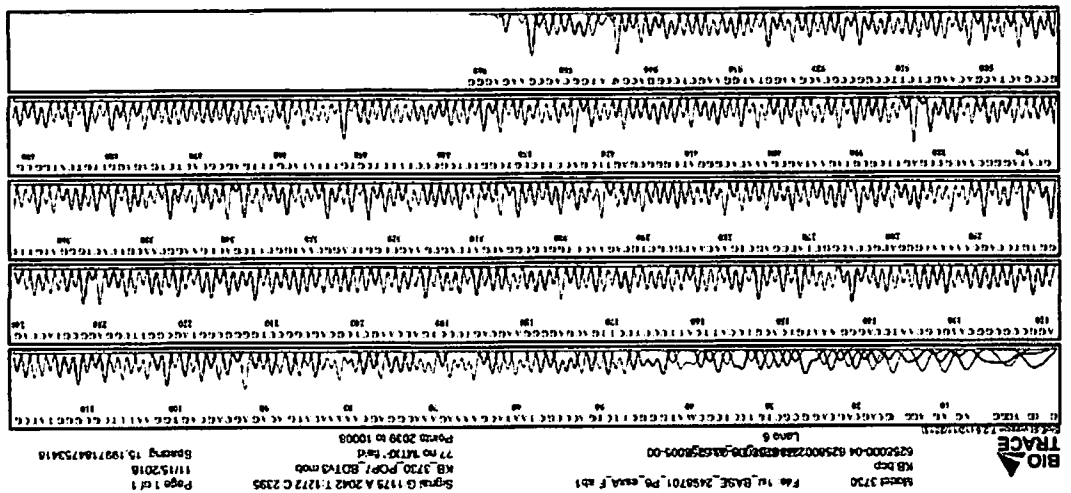
  
**Dr. Ali Hobman**  
Chairperson 2<sup>nd</sup> MCLS Committee  
Universitas Airlangga

  
**Dr. Andy-Mark W.H. Thunnissen**  
Protein Crystallography Group,  
University of Groningen

Seminar 52<sup>nd</sup> Mycobacteria Panel Meeting







```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
S22A111 CAGCACACCCCTGTCTCTCCAAATGGCTTTCTACCCCTAAATACGAAAGCAAGCGACCAAAACATACAGACCAACCTGGAAATTCGGGGTAT
S22A .....
F8 .....
F1 .....
F15 .....
F22 .....
F39 .....
F43 .....
F75 .....
F84 .....
F85 .....
F103 .....
Clinical Consensus .....

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
S22A111 CGACCCCGCCCAAGCCCAATCCAGCGAAATGTCACTCCATTCATTTCCCTCTCTGACGAGCGGAAACAGTCCCTGACCAAGCTCCAGCCCGCTGGCC
S22A .....
F8 .....
F1 .....
F15 .....
F22 .....
F39 .....
F43 .....
F75 .....
F84 .....
F85 .....
F103 .....
Clinical Consensus .....

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
S22A111 GGTATCCCTTCCAGCCCTACCAAGTGTCCAGCAAAAATGGACCCACCCCTACCGACTTAAACACCCCTCCAGAACTTCCCGCCAGATCAGCC
S22A .....
F8 .....
Clinical Consensus F8 .....
Clinical Consensus F13 .....
Clinical Consensus F22 .....
Clinical Consensus F39 .....
Clinical Consensus F43 .....
Clinical Consensus F75 .....
Clinical Consensus F84 .....
Clinical Consensus F85 .....
Clinical Consensus F103 .....
Clinical Consensus .....

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
S22A111 AAGCCCTTCCAGCCCTACCAAGTGTCCAGCAAAAATGGACCCACCCCTACCGACTTAAACACCCCTCCAGAACTTCCCGCCAGATCAGCC
S22A .....
F8 .....
F13 .....
F22 .....
F39 .....

```



```

P43 .....
P18 .....
P04 .....
P09 .....
Consensus PIG2 .....
Clinical Consensus .....
          610      410      430      440      450      460      672      480      499      500
-----
consensus .....
P43 .....
P18 .....
P04 .....
P09 .....
Consensus PIG2 .....
Clinical Consensus .....
          510      520      530      640
-----
consensus .....
P43 .....
P18 .....
P04 .....
P09 .....
Consensus PIG2 .....
Clinical Consensus .....

```

**Lampiran 8. Prototype Desain Primer esxA**

16 Aug 2016                      One Primer Report

Primer:                      F esxA full

- - Primer Information - - - - -

Sequence:                      5' GCAATATTCGTCAGGCCGGCGTCCAATACT 3'  
 Length: 30                      Meets criteria: Yes  
 Composition:                      A: 7 C: 9 G: 7 T: 7  
 Molar absorbance:                      32.2 ug/ml = 1 OD260  
 Linked molecule:                      No molecule association

- - Primer Evaluation and Criteria Settings - - - - -

Criteria =	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	53	Yes
Tm C	Range 55-80	73	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'and	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	6	Yes
Stability	>= 1.2 kcal/s 5'vs3'	3.9	Yes
Runs	< 3 base runs	2	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes
Hairpins	Annealing 55 C	none	Yes
Worst-case False Priming C		n/a	

- - Primer Notes - - - - -

16 Aug 2016 One Primer Report

Primer: R esxA full

-- Primer Information -----

Sequence: 5' CGCTGCCATATCGTCCGGAGCTTCAT 3'  
 Length: 27 Meets criteria: Yes  
 Composition: A: 4 C: 10 G: 6 T: 7  
 Molar absorbance: 33.7 ug/ml = 1 OD260  
 Linked molecule: No molecule association

-- Primer Evaluation and Criteria Settings -----

Criteria =	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	59	Yes
Tm C	Range 55-80	73	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	6	Yes
Stability	>= 1.2 kcals 5'vs3'	1.6	Yes
Runs	< 3 base runs	2	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes
Hairpins	Annealing 55 C	none	Yes
Worst-case False Priming C		n/a	

-- Primer Notes -----