

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



GENOTYPING SEKUENS NUKLEOTIDA GEN *eccB5* Mycobacterium tuberculosis DARI PASIEN TB PARU DAN STUDI PENGEMBANGAN METODE DIAGNOSIS DINI PADA LATENT TUBERCULOSIS INFECTION (LTBI) DENGAN TARGET GEN *eccB5* PADA POPULASI BERISIKO ATAU NARAKONTAK

TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN

**Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., M.S., Sp.MK(K) 0007035703
Dr. Soedarsono, dr., Sp.P(K) 195511231984101001
Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES. 0003096004
Siti Kurniawati, drh., M.Ked., Trop 011514253011**

**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**

RINGKASAN

Tuberculosis (TB) sampai saat ini masih menjadi masalah dunia dengan tingkat *high burden* yang tinggi. Indonesia menjadi peringkat ke-2 pada tahun 2014 dengan angka prevalensi 1.6 juta. Penyebaran yang cepat dari infeksi *M.tuberculosis* serta tingkat virulensi yang tinggi menyebabkan banyaknya individu yang terinfeksi. Penegakan diagnosis yang tepat, cepat dan akurat serta murah dapat sebagai dasar penentuan pengobatan adekuat. Kesembuhan yang cepat merupakan suatu strategi potensial pada usaha penanggulangan TB paru.

Mycobacterium tuberculosis dapat menginfeksi individu melalui droplet nuklei yang masuk ke dalam tubuh dan dapat menyebabkan granuloma paru sehingga sulit dieliminasi. Hal ini dikarenakan disebabkan oleh faktor virulensi dari *M.tuberculosis* salah satunya adalah gen *eccB5*. Gen *eccB5* merupakan gen yang sangat penting dalam menyebabkan keparahan dari infeksi *M.tuberculosis*.

Pengembangan diagnostik dengan menggunakan gen target spesifik sangat dibutuhkan dan sangat penting dalam upaya pengendalian infeksi *M.tuberculosis*. Sekuens nukleotida region gen *eccB5* pada pasien infeksi *M.tuberculosis* di Indonesia belum diketahui apakah ada sekuens *conserved* dan spesifik. Regio DNA spesifik pada gen *eccB5* diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan diagnostik untuk diagnosis pada *M.tuberculosis*.

Penelitian ini bertujuan (tahun ke-3) untuk mengetahui validitas pada pasien suspek TB pada gen *eccB5* (sensitivitas, spesifisitas, *positive predictive value* dan *negative predictive value*); dibandingkan dengan metode kultur standar.

Metode penelitian: Tahun ke III Amplifikasi teknik PCR target gen *eccB5* pada sampel isolat klinik (1); amplifikasi asam nukleat DNA target gen *eccB5* dengan teknik PCR pasien sampel TB(2); analisis fungsi (3). Luaran penelitian adalah jurnal internasional dan draft HKI paten sederhana.

Keywords : *Tuberculosis*, *eccB5*, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR.



PRAKATA

Puji Syukur Mari Kita Panjatkan Kepada Tuhan Yang Maha Esa Yang Telah Melimpahkan Rahmat, Hidayah, Dan Inayahnya Sehingga Penulis Dapat Menyusun Laporan Tahun Terakhir Yang Berjudul “*Genotyping* Sekuens Nukleotida Gen *eccB5 Mycobacterium tuberculosis* Dari Pasien TB Paru Dan Studi Pengembangan Metode Diagnosis Dini Pada *Latent Tuberculosis Infection (LTBI)* Dengan Target Gen *eccB5* Pada Populasi Berisiko Atau Narakontak”. Laporan kemajuan ini diharapkan dapat menjawab tujuan penelitian tahun II, yaitu: desain primer-primer *eccB5* untuk LTBI (1); optimasi amplifikasi target gen *eccB5* (2); uji validitas internal (sensitivitas dan spesifisitas). Laporan kemajuan ini diharapkan dapat memberikan manfaat dalam kemajuan informasi IPTEK mengenai karakterisasi sekuens nukleotida pada genome *eccB5 Mycobacterium tuberculosis*, memberikan *prototype genotype* sekuens nukleotida pada gen *eccB5* pada *Mycobacterium tuberculosis* serta diharapkan sebagai dasar pengembangan diagnostik yang akurat, cepat dan dapat menata sistem bank isolat dan bioinformatika *Mycobacterium tuberculosis*.

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

Prof. Dr Ni Made Mertaniasih, dr. MS. Sp. MK (K)

Ketua Penelitian

Fakultas Kedokteran

Universitas Airlangga



DAFTAR ISI

HALAMAN Sampul.....	i
HALAMAN PENGESAHAN PENELITIAN PMDSU.....	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah Penelitian	2
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Distribusi TB	5
2.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2.2.1 <i>Type VII Secretion Systems (T7SS)</i>	6
2.2.2 Patogenesis <i>M.tuberculosis</i> dan LTBI.....	7
2.2.3 Diagnosis dini pada Infeksi <i>M.tuberculosis</i> atau LTBI.....	9
2.3 Metode PCR	10
2.3 <i>Technology Road Map</i>	11
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	12
3.1 Tujuan.....	12
3.1.1 Tujuan Umum.....	12
3.1.2 Tujuan khusus.....	12
3.2 Manfaat.....	12
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	13
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	13
4.2 Sampel Penelitian	13
4.3 Variabel Penelitian	13
4.4 Prosedur.....	13
4.5 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian	13
4.6 Analisis Data	14
4.7 Alur Penelitian.....	14

BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	15
5.1 Luaran Hasil Penelitian	15
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	17
6.1 Kesimpulan.....	17
6.2 Saran	17
DAFTAR PUSTAKA.....	18
LAMPIRAN.....	21

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1. Indikator dan luaran target capaian	14
Tabel 6.1 Rencana tahap berikutnya..	16

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Skema gen <i>eccB5</i> dari <i>Mycobacterium</i>	7
Gambar 2.2 Patogenesis <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
Gambar 2.3 Skema dari <i>technology road map</i>	11

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Catatan Harian (<i>Logbook</i>).	22
Lampiran 2 Seminar Internasional.	56
Lampiran 3 Jurnal.	57
Lampiran 4. Rencana HKI	58

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit *Tuberculosis* (TB) pada manusia dan hewan yang bersifat zoonosis. Penularan dapat melalui udara dengan terkontaminasi oleh *M. tuberculosis*. TB termasuk ke dalam tiga kategori penyakit yang berbahaya setelah penyakit kardiovaskuler dan penyakit saluran pernapasan (Smith, 2003; Carroll *et al.*, 2016).

Angka kematian yang disebabkan TB berkisar 3-4 juta setiap tahunnya. Di wilayah asia tenggara pada khususnya, hampir 200 juta penduduk terinfeksi TB. WHO melaporkan pada tahun 2009 Indonesia menempati posisi ke-5 dengan jumlah penderita TB sebesar 429 ribu orang. Lima negara dengan jumlah terbesar kasus insiden pada tahun 2009 adalah India, Cina, Afrika Selatan, Nigeria dan Indonesia. Tahun 2013 angka prevalensi sebesar 11 juta (WHO, 2014), sedangkan pada tahun 2014, angka terjadi TB meningkat, Indonesia menempati posisi ke-2 setelah India, dengan angka prevalensi TB sebesar 1.6 juta dan angka kematian *Multidrug-resistance tuberculosis* (MDR-TB) sebesar 190.000 dan 5.600 kasus baru MDR-TB di Indonesia (WHO, 2015). Tingginya angka kejadian TB ini, salah satunya dapat disebabkan oleh faktor virulensi dari *M. tuberculosis*.

Mycobacterium tuberculosis dapat menginfeksi individu melalui droplet nuklei yang masuk ke dalam tubuh dan dapat menginduksi granuloma paru. Faktor penting dari infeksi ini diperankan terutama oleh *agent* virulensi dan *M. tuberculosis* selain peran interaksi seluler imun respon (Owen *et al.*, 2013; O'Garra *et al.*, 2013). Salah satu agen virulensi *M. tuberculosis* yang berperan penting pada imunitas seluler yaitu protein *EccB5* pada dinding sel *M. tuberculosis*. Perubahan dari faktor sekresi protein ESX-5 mempunyai peranan dalam *slow growing Mycobacterium*, sebagai transport protein PPE, integritas dari dinding sel dan sebagai faktor virulensi.

ESX-5 ini terdiri dari beberapa urutan gen yang menyandi salah satunya *eccB5*. Gen *eccB5* ini diduga berperan sebagai transmembran protein yang menjadi salah satu faktor pada *slow growing Mycobacterium* (Di Luca *et al.*, 2012 ;

Simeone, *et al.*, 2015). ESX-5 juga dapat mempengaruhi sekresi dari sel *host* yaitu sitokin *pro-inflammatory* (TNF, IL-6 dan IL-12) pasca infeksi terhadap makrofag dan dapat memicu terbentuknya granuloma paru. Granuloma dapat berkembang menjadi *active disease* ketika kondisi tubuh mengalami penurunan sistem imun terutama pada individu HIV positif, diabetes melitus (DM) dan individu yang mengalami *immunocompromised* (Philips & Ernst, 2012; O'Garra *et al.*, 2013; Nunes-Alves *et al.*, 2014).

Kondisi ini dapat menyebabkan tingginya angka kasus kejadian TB baru dan dapat meningkatkan angka mortalitas jika tidak mendapatkan penanganan medis. Sampai saat ini beberapa upaya deteksi dini pada infeksi *M.tuberculosis* seperti LTBI dilakukan dengan menggunakan *tuberculin skin test* (TST) dan *IFN- γ release assays* (IGRAs), namun masih belum dapat mengendalikan penyebaran infeksi *M.tuberculosis* dan reaktivasi dari LTBI (Philips & Ernst, 2012; O'Garra *et al.*, 2013).

Diagnosis yang tepat dan cepat, sangat sulit dilakukan pada infeksi *M.tuberculosis* karena lamanya pemeriksaan, oleh karena itu diperlukan pengembangan metode diagnosis yang akurat dan cepat sebagai dasar untuk mengetahui infeksi *M.tuberculosis*. Gen *eccB₅* menjadi salah satu kandidat sebagai marka sebagai identifikasi tingkat spesies mikobakteria pada infeksi *M.tuberculosis*. Penelitian ini bertujuan analisis *genotyping* gen *eccB₅* pada *M.tuberculosis* dengan menggunakan isolat klinik dari pasien TB paru di Indonesia. Prototype genotype ini sebagai dasar pengembangan metode diagnosis pada populasi yang berisiko atau narakontak yang berbasis molekuler dan juga dapat digunakan pada pasien *suspect* TB.

1.2 Perumusan Masalah Penelitian

Pada penelitian ini berdasar latar belakang dan berkaitan dengan masalah diagnosa TB meliputi :

1. Apakah ada perbedaan *genotype* regio DNA gen *eccB₅* pada *M. tuberculosis* diantara dengan kelompok strain pasien TB di Indonesia?

2. Apakah metode amplifikasi asam nukleat pada target gen *eccB5* *M. tuberculosis* memiliki validitas tinggi (sensitivitas, spesifisitas, ppv dan npv) pada TB paru?

Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian		
			TS1)	TS+1	TS+2
1	Publikasi ilmiah	Internasional Bereputasi	<i>Submitted</i> (2)	<i>Accepted</i> (2)	<i>Published</i> (2)
		Nasional Terakreditasi	<i>Submitted</i> (2)	<i>Published</i> (2)	<i>Published</i> (2)
2	Pemakalah dalam temu ilmiah	Internasional	terdaftar	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan
		Nasional	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan
3	Pembicara utama (<i>Invited Speaker</i>) dalam temu ilmiah	Internasional	-	Terdaftar	Terdaftar
		Nasional	-	-	-
4	Hak Kekayaan Intelektual (HKI) ⁵⁾	Paten	-	-	-
		Paten sederhana	-	Terdaftar (2)	Terdaftar (2)
		Hak Cipta	-	-	-
		Merek dagang	-	-	-
		Rahasia dagang	-	-	-
		Desain Produk Industri	-	-	-
		Indikasi Geografis	-	-	-
		Perlindungan Varietas Tanaman	-	-	-
		Perlindungan Topografi Sirkuit Terpadu	-	-	-
5	Teknologi Tepat Guna ⁶⁾	-	-	Draft	
6	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/Rekayasa Sosial ⁷⁾	-	-	-	
7	Buku Ajar (ISBN) ⁸⁾	-	-	-	
8	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) ⁹⁾	3	3	4	

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Distribusi TB

Tuberculosis (TB) adalah penyakit menular berbahaya dan bersifat zoonosis yang disebabkan oleh *M. tuberculosis* dan *M. bovis*. TB dapat ditularkan melalui udara, sputum dan kontak dengan penderita. Penyebaran TB ini sangat berbahaya karena selain menular dari manusia ke manusia tetapi juga dapat menular dari manusia ke hewan dan sebaliknya. TB dikategorikan ke dalam urutan ketiga penyakit berbahaya mematikan dengan angka kematian berkisar 3-4 juta setiap tahunnya. Di wilayah asia tenggara, hampir 200 juta penduduk terinfeksi TB. Indonesia menduduki peringkat kelima dengan jumlah penderita TB sejumlah 430 ribu orang (WHO, 2010).

Tahun 2011 kasus TB baru di dunia sebanyak lebih dari 9 juta dengan kematian akibat TB sebanyak 1,4 juta orang. Tahun 2013 yaitu 11 juta untuk angka prevalensi dan 9 juta untuk angka insidensi (WHO, 2014). Tahun 2014 kejadian TB meningkat dibandingkan dengan tahun 2013 dengan angka prevalensi TB di dunia mencapai 13 juta dan angka insidensi sebesar 9.6 juta. Indonesia menempati posisi kedua setelah India. India dengan angka insidensi sebesar 2.2 juta, Indonesia sebesar 1 juta, China 9.3 juta, Nigeria 5.7 juta, Pakistan 5 juta, Afrika Selatan 4.5 juta, Bangladesh 3.6 juta, Filipina 2.9 juta, Congo 2.4 dan Ethiopia sebesar 2 juta (WHO, 2015).

Getahun *et al.*, (2015); menjelaskan bahwa saat ini tidak adanya alat yang memadai untuk mengukur prevalensi dari global LTBI. LTBI diperkirakan bahwa sekitar sepertiga dari populasi dunia (> 2 miliar orang) menderita LTBI yang disebabkan *M.tuberculosis*. LTBI dapat reaktivasi yang disebabkan karena terjadi penekanan sistem imun oleh *human immunodeficiency virus* (HIV), *tumor necrosis factor a inhibitors*, glukokortikoid, transplantasi organ, DM (O'Garra *et al.*, 2013; Philips & Ernst, 2012). Penderita HIV-positif lebih berisiko untuk terkena infeksi *M.tuberculosis*. WHO (2015) dalam *Global TB reports* melaporkan bahwa pada tahun 2014 terdapat 1,2 juta dari 9,6 juta orang yang terkena TB *co-morbid* HIV. Jumlah penderita HIV-positif TB sebanyak 2.355 pada tahun 2014 di Indonesia dengan kasus HIV adalah sebanyak 15.074.

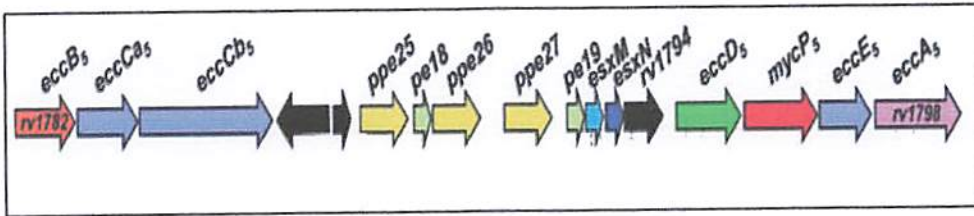
2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) merupakan bakteri penyebab TB pada manusia, *pet animals*, primata dan hewan liar lainnya. *M. tuberculosis* ini adalah bakteri berbentuk batang dengan ukuran 0.4 -3 μm (Rajni *et al.*, 2011; Carroll *et al.*, 2016). Pertumbuhan *M. tuberculosis* relatif lambat dibandingkan *Mycobacterium* lainnya. Bakteri ini mempunyai struktur dinding sel yang unik. Komponen dinding selnya adalah terdiri dari 60% lipid. Fraksi utama dinding sel tersebut adalah *mycolic acid* (MA), Cord Faktor, dan Wax-D. Dinding selnya terdiri dari dua segmen yaitu bagian luar dan inti. Inti dari dinding sel terdiri dari peptidoglikan (PG), kovalen dengan arabinogalaktan (AG) dan MA (Hett & Rubin, 2008; Rajni, *et al.*, 2011; Carroll *et al.*, 2016). Komponen dinding sel bakteri inilah yang menyebabkan tidak dapat dilihat dengan menggunakan pewarnaan gram tetapi dengan pewarnaan Bakteri Tahan Asam (BTA) dengan metode Ziehl-Neelsen. Bakteri juga memiliki kompleks antigen 85 yang berperan dalam melindungi bakteri dari sistem imun (Smith, 2003).

2.2.1 *Type VII Secretion Systems* (T7SS)

Type VII secretion systems (T7SS) adanya salah satu faktor virulensi yang berperan pada faktor sekresi. T7SS ini terdiri dari ESX-1, ESX-2, ESX-3, ESX-4 dan ESX-5. ESX-1 adalah *gene cluster* yang berperan dalam *early replication* dan bertanggung jawab sebagai faktor virulensi. Komponen *early secretory antigenic target* (ESAT-6) dan *culture filtrate protein* (CFP-10) dari ESX-1 yang sangat immunogenik sehingga dapat membantu proses *escape M. tuberculosis* dari fagosom (Forrellad, *et al.*, 2013). ESX-2 dan ESX-4 masih belum diketahui secara pasti peran dan fungsinya dari *M.tuberculosis*. ESX-3 merupakan salah satu komponen dari T7SS yang terdiri dari regio gen Rv0282-rv0292. ESX-3 ini mempunyai peranan terhadap *metal homeostasis* (Forrellad *et al.*, 2013; Tufariello *et al.*, 2016). *Metal homeostasis* ini diantaranya adalah besi dan zinc. Uptake besi dan zinc ini mempunyai peranan yang sangat penting dari *M.tuberculosis* karena mempengaruhi pertumbuhan dari *M.tuberculosis*.

ESX-5 (rv1782-rv1798) adalah salah satu komponen dari T7SS yang mempunyai peranan penting dalam pertumbuhan *M.tuberculosis* (Bottai, *et al.*, 2012; Di Luca *et al.*, 2012; Boradia *et al.*, 2014). Shah *et al.*, (2015) menjelaskan bahwa ESX-5 ini hanya ditemukan pada *slow growing Mycobacterium*. Urutan dari gen yang terdapat di ESX-5 terangkum pada Gambar 2.1.

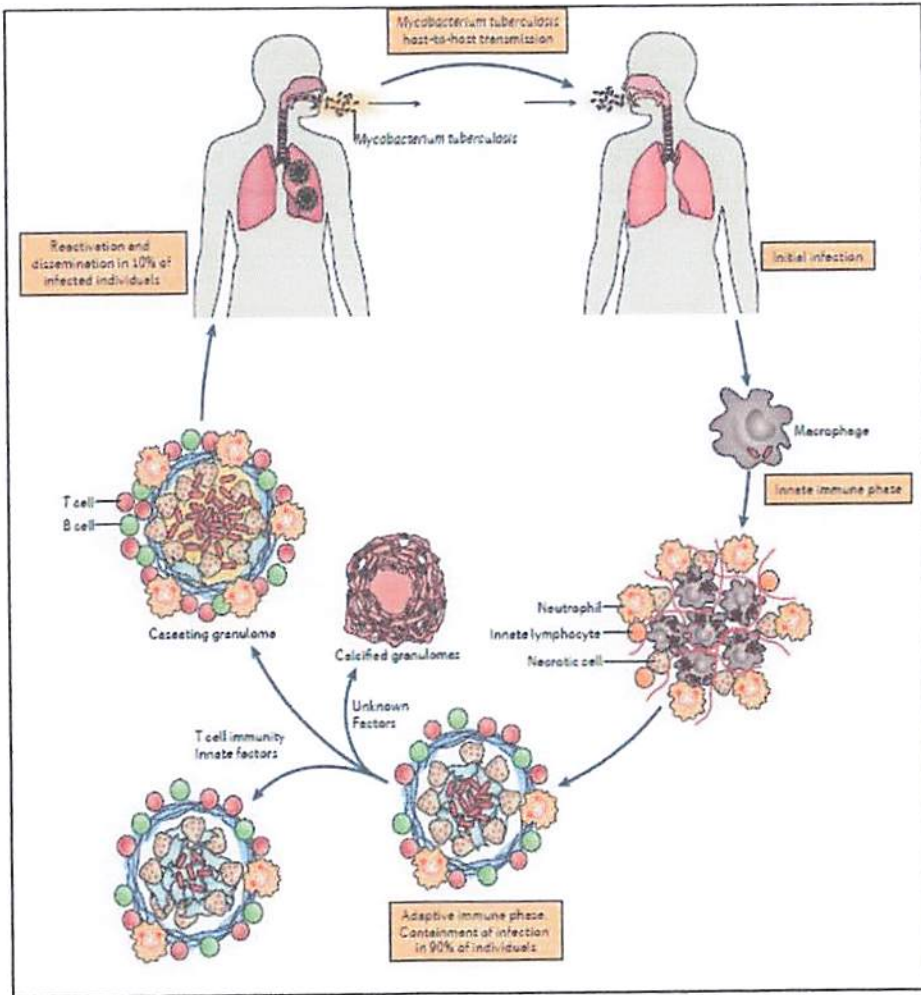


Gambar 2.1 Skema gen *eccB5* dari *Mycobacterium* (Bottai *et al.*, 2012).

ESX-5 ini dikode oleh beberapa gen, salah satunya adalah *eccB5* (Gambar 2.1). Gen *eccB5* berperan dalam transmembran pada *M. tuberculosis* dan dapat mempengaruhi kerusakan jaringan paru pada individu yang terinfeksi *M.tuberculosis*. ESX-5 khususnya *eccB5* mempengaruhi sekresi dari sel *host* yaitu sitokin *pro-infalamatory* (TNF, IL-6 dan IL-12) pasca infeksi terhadap makrofag. Manipulasi sistem imun yang terjadi pada infeksi *M. tuberculosis* dapat menyebabkan terbentuknya granuloma paru.

2.2.2 Patogenesis *M.tuberculosis* dan LTBI

Infeksi *M.tuberculosis* ini dapat ditularkan dari manusia ke manusia, maupun hewan ke manusia (zoonosis). Sumber penularan TB positif adalah melalui droplet nuklei (percikan dahak) yang dapat menyebar melalui bersin dan batuk (Philips & Ernst, 2012; Nunes-Alves *et al.*, 2014) Droplet yang terdapat *M.tuberculosis* dapat bertahan pada suhu kamar selama beberapa jam. Mekanisme patogenesisnya terangkum pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Patogenesis *M.tuberculosis* (Nunes-Alves *et al.*, 2014).

Individu yang terinfeksi *M.tuberculosis* akan menularkan pada individu lain melalui droplet nuklei. *M.tuberculosis* masuk ke dalam tubuh dan terdeposit ke dalam alveoli paru. Respon imun *host* akan merespon (*innate immunity*) ketika berada di dalam alveoli, dengan mengeluarkan sitokin yang menstimulasi makrofag. Makrofag tidak dapat mengeliminasi *M.tuberculosis* ini karena *M.tuberculosis* mampu mencegah proses fagolisosom yang terjadi di dalam makrofag.

M.tuberculosis ini akan menyebar ke limfonodul dan juga menyebabkan sel dendrit mempresentasikan antigen bakteri ke T-sel dan memicu ekspansi dari *antigen-specific T cells* yang akan menuju ke paru-paru. Sel T, sel B, sel dendrit, makrofag yang telah aktif serta leukosit akan menginduksi terjadinya granuloma yang terdapat *M.tuberculosis* (Philips & Ernst, 2012 ; O'Garra *et al.*, 2013; Nunes-Alves *et al.*, 2014).

Granuloma ini dapat berkembang menjadi *active disease* ketika kondisi tubuh mengalami penurunan sistem imun dan jika kondisi imun tubuh baik, *M.tuberculosis* tidak akan menunjukkan gejala infeksi. Kebanyakan individu yang terinfeksi akan dalam fase laten (*latent infection*). Infeksi laten ini tidak menunjukkan gejala-gejala yang terlihat. Individu yang berada pada fase laten ini dapat menularkan ke individu lain melalui batuk maupun bersin ketika terjadi reaktivasi (O'Garra *et al.*, 2013; Nunes-Alves *et al.*, 2014 ; Carroll *et al.*, 2016).

Individu yang terinfeksi oleh *M.tuberculosis* dan menunjukkan gejala klinis maka akan berpotensi menularkan ke individu lain. Penularan ke individu yang *immunocomprised*, HIV-positif, DM dan malnutrisi maka dapat menjadi TB aktif, sedangkan pada individu yang sehat, *M.tuberculosis* tidak akan menimbulkan *disease*. LTBI ini dapat menjadi aktif ketika kondisi imunitas host melemah, sehingga akan menjadi TB aktif. Pada kondisi LTBI, beberapa kelompok orang, terdapat 5-10% dapat berkembang menjadi TB aktif (Dooley & Chaisson, 2010; O'Garra *et al.*, 2013; ; Shekhawat *et al.*, 2015).

2.2.3 Diagnosis dini pada Infeksi *M.tuberculosis* atau LTBI

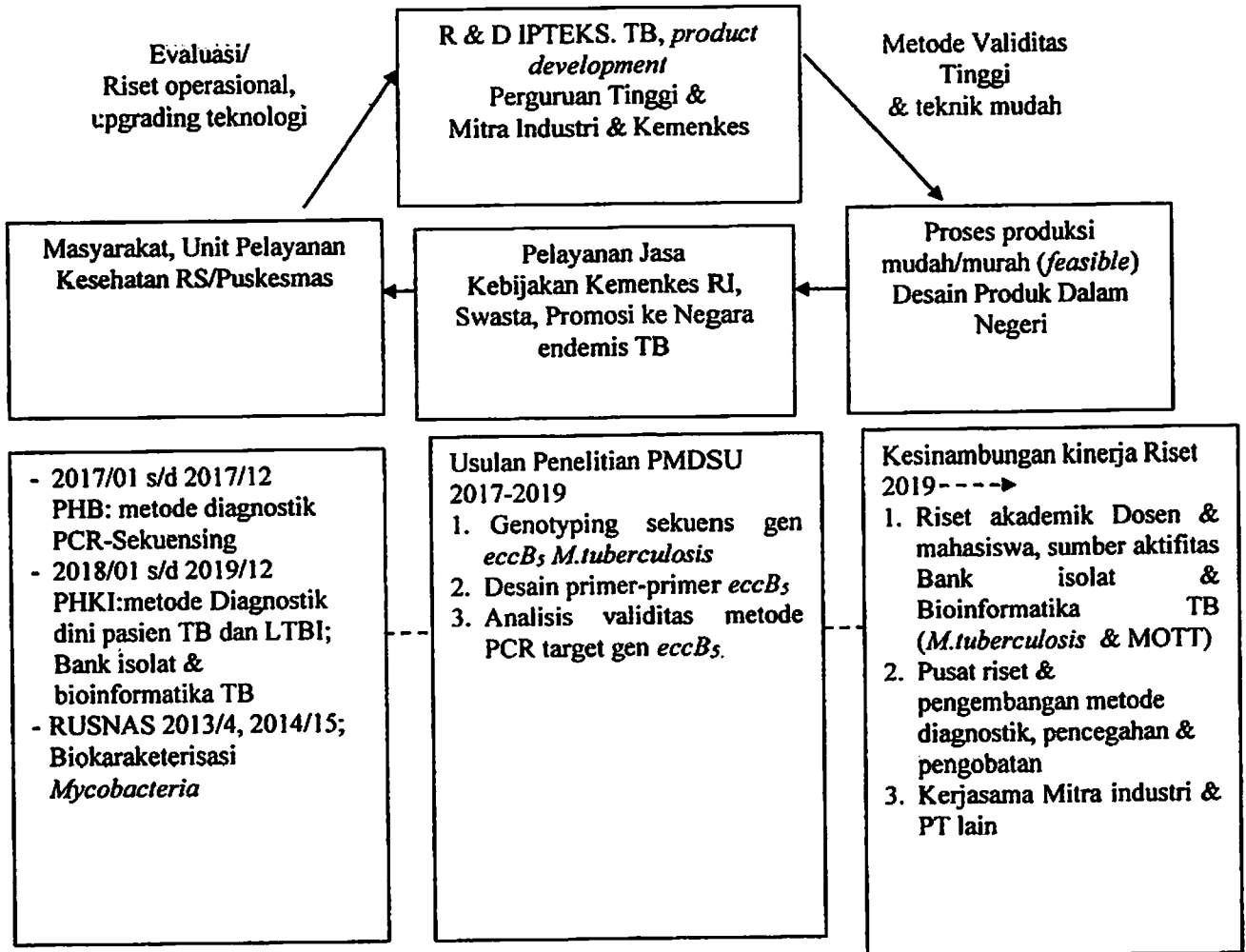
Diganosis dari *M.tuberculosis* ini dapat menggunakan metode konvensional yaitu dengan kultur pada media *Löwenstein-Jensen* (LJ). Kultur *M.tuberculosis* pada media LJ dapat dilihat morfologi koloninya yang khas yaitu seperti bunga kol dan terlihat kering. Pewarnaan *acid-fast staining* juga digunakan untuk memperkuat diganosis dari koloni *M.tuberculosis* ini (Forrellad *et al.*, 2013 ; Carroll, *et al.*, 2016). Identifikasi spesies dapat menggunakan metode konvensional, seperti melihat morfologi koloni pada media *Löwenstein-Jensen* (LJ), *acid-fast staining* (AFB), dan uji biokimia. Sampel sputum diproses dan dilakukan inokulasi pada slants media LJ dan isolasi DNA. Uji tersebut dapat menunjukkan perbedaan *M.tuberculosis* komplek dari mikrobakteria non tuberkulosis (NTM) pada spesimen klinis (Carroll *et al.*, 2016).

O'Garra *et al.*, (2013) menjelaskan bahwa diagnosis pada LTBI dapat menggunakan TST dan IGRAs. TST ini menggunakan *Purified Protein Derivative* (PPD) yang diinjeksikan secara intradermal dan hasil dapat diamati 2-3 hari setelah injeksi. Kekurangan dari TST ini adalah munculnya hasil *false positive* yang dikarekan adanya *cross reaction* antara antibodi yang dihasilkan saat pemberian BCG (Meikle *et al.*, 2009; Shekhawat *et al.*, 2015). IGRAs merupakan pemeriksaan LTBI dengan menggunakan sampel darah yang diukur kadar IFN- γ . IFN- γ ini diduga diinduksi oleh *M.tuberculosis*. Jumlah IFN- γ diukur dengan menggunakan *enzyme-linked immunoassay* (ELISA) setelah *whole blood* diinkubasi atau dengan *enzyme-linked immunospot technique* dengan menggunakan sampel *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) (O'Garra *et al.*, 2013; Shekhawat *et al.*, 2015).

2.3 Metode PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. Primer yang digunakan berfungsi sebagai pembatas daerah yang diperbanyak adalah DNA untai tunggal yang urutannya komplemen dengan DNA templatnya (Tomlinson *et al.*, 2005). Pada teknik PCR ini ada dua jenis primer yang digunakan yaitu primer *forward* dan primer *reverse*. Primer *forward* bergerak dengan arah 5'-3' untai DNA template, sedangkan primer *reverse* bergerak dengan arah 3'-5' untai DNA template. Teknik PCR ini meliputi beberapa tahapan yaitu, denaturasi, *annealing* dan ekstensi (Ajantha *et al.*, 2013; Purohit & Mustafa, 2015).

2.3 Technology Road Map



BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan

3.1.1 Tujuan Umum

Penentuan *genotyping* sekuens nukleotida gen *eccB5* *M.tuberculosis* dari pasien TB paru dengan target gen *eccB5* pada populasi berisiko atau narakontak.

3.1.2 Tujuan khusus

Tahun III :

- Uji validitas internal pada pasien suspek TB (sensitivitas, spesifisitas, *positive predictive value* dan *negative predictive value*) dibandingkan dengan kultur standar dan analisis fungsi gen *eccB5* pada MTBC.

3.2 Manfaat

1. Manfaat hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi IPTEK mengenai *prototype genotype* sekuens nukleotida pada gen *eccB5* pada *M.tuberculosis* serta diharapkan sebagai dasar pengembangan diagnostik yang akurat, cepat dan terjangkau bagi masyarakat luas.
2. Manfaat praktis, implementasi pada pasien TB di masyarakat pada penelitian ini diharapkan dapat menjadi menjadi temuan *prototype* dasar pengembangan diagnostik yang (cepat, akurat dan murah) serta 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 adalah *experimental laboratory* tanpa pemberian perlakuan secara *cross sectional*.

4.2 Sampel Penelitian

Tahun III sampel sputum pasien suspek TB ($n \geq 50$) untuk analisis validitas metode PCR target gen *eccB5* MTBC dan analisis fungsi gen target *eccB5*.

4.3 Variabel Penelitian

- Variabel bebas pada penelitian ini adalah sampel sputum pasien TB paru
- Variabel terikat adalah *genotype* hasil *sequencing* gen *eccB5* pada tiap-tiap kelompok dengan menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR)
- Variabel kontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah konsentrasi sampel sputum, konsentrasi reagen yang digunakan, volume pada campuran reaksi PCR dan pengaturan suhu pada mesin PCR.

4.4 Prosedur

Tahun ke III

1. Amplifikasi teknik PCR target gen *eccB5* pada MTBC (dengan beberapa pembagian grup kategori).
2. Amplifikasi asam nukleat DNA target gen *eccB5* dengan teknik PCR pasien sampel TB.
3. Studi rekombinan protein *EccB5*
4. Analisis validitas.

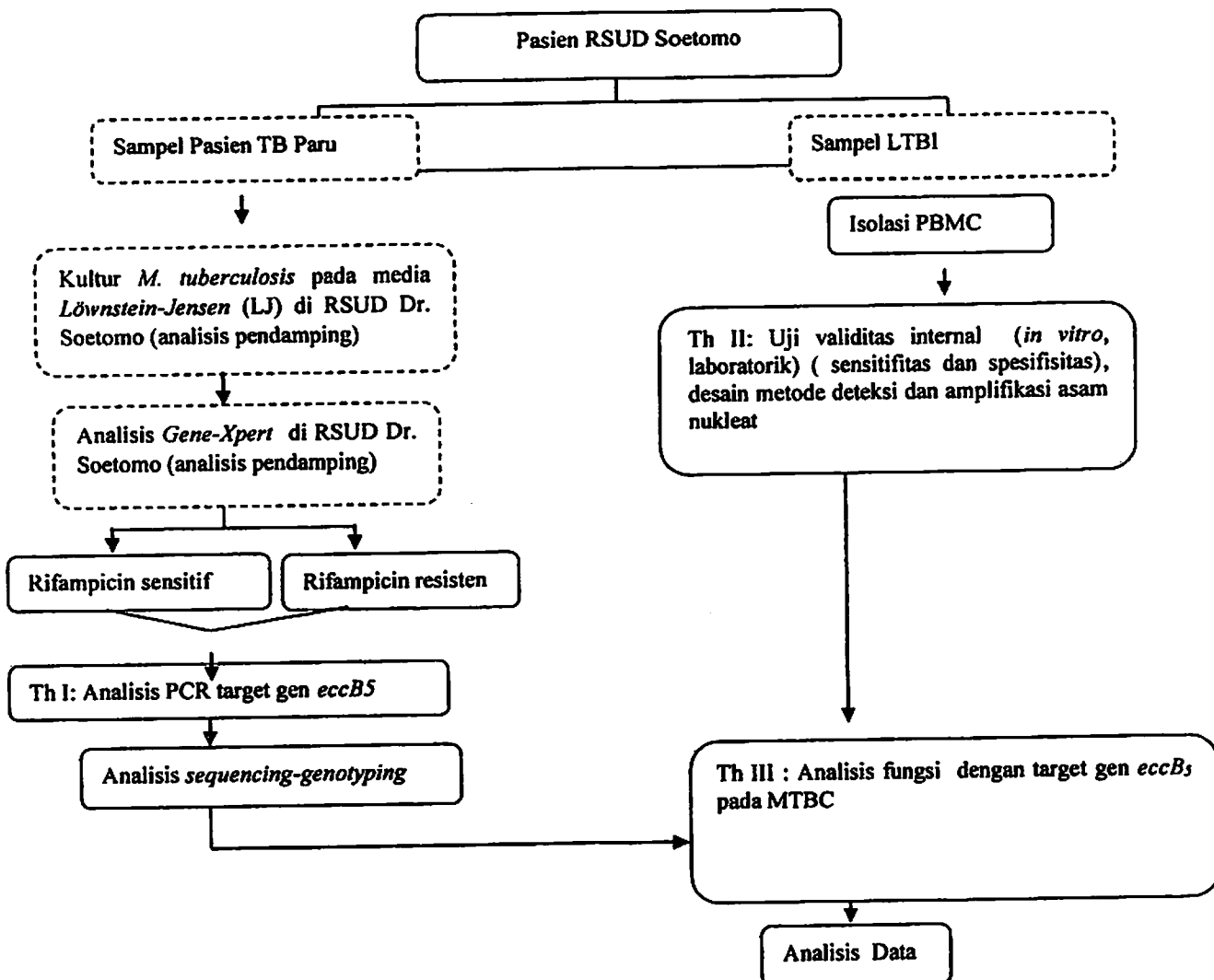
4.5 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

- Penelitian ini dilakukan di *Institute of Tropical Diseases* (ITD) Universitas Airlangga dan *National Institute of Infectious Diseases* (NIID), Japan.
- Pengambilan sampel dan koleksi dilakukan di RSUD Dr. Soetomo, Surabaya.
- Waktu penelitian pada tahun III dilakukan bulan Januari-Desember 2018.

4.6 Analisis Data

Data analisis sekuensing dianalisis dengan menggunakan program GENETYX Ver.10 dan program BLAST NCBI. Analisis validitas berdasarkan metode *twofold*.

4.7 Alur Penelitian



BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Luaran Hasil Penelitian

Tabel 5.1. Indikator dan luaran target capaian

No	Aktivitas Penelitian	Indikator dan luaran target capaian	
		Target	Capaian
1	Biokarakteristik <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dan sistem bank isolat	1. Biokarakteristik genotype <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1. Validasi gen <i>eccB5</i>
2	Genotyping & analisis regio gen spesifik pada gen <i>eccB5</i> - Analisis sekuensing regio gen spesifik <i>eccB5</i>	2. Jurnal ilmiah & seminar Nasional/ Internasional 3. Pembicara di jurnal Nasional/Internasional 4. Draft jurnal	2. Koleksi isolat MTBC 3. DNA sekuensing gen <i>eccB5</i> pada isolat MTBC 4. Draft karya tulis S3 : 1 topik. 5. Published jurnal 1 topik di African Journal of Infectious Disease <i>Afr J Infect Dis.</i> 2018 Jun 18;12(2):37-42. doi: 10.21010/ajid.v12i2.6. eCollection 2018. 6. Submit jurnal internasional (<i>Indian Journal of Tuberculosis</i>) dengan nomer registrasi IJTB_2016_257_R1 dengan status <i>Under Review R1</i> .
3	Studi rekombinan <i>EccB5</i> - Studi optimasi rekombinan <i>EccB5</i>		7. Oral presenter di <i>The 7th Annual Basic Science International Conference (Basic)</i> , Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia. 8. Peserta di <i>Conference participant in 1st International Conference on one health " one Health Approach in Zoonotic Disease Control Stratergy"</i> , Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia. 9. Peserta di <i>Symposium in TB UPDATE LX 2017 " Novel Management to End TB"</i> , Surabaya, Indonesia.

	<p>10. Oral presenter di <i>2nd Molecular and Cellular Life Science Structural Biology, Bio-Molecular modeling, Bio-molecular dynamics with application in biotechnology & medicine</i>, Surabaya, Indonesia.</p> <p>11. Peserta pelatihan <i>Turnitin for journal administrator</i> di Universitas Airlangga.</p> <p>12. Peserta <i>workshop mobile health technology, One Health/Eco Health, Resource Center</i>, Universitas Gadjah Mada.</p> <p>13. Submit sebagai oral presenter di ISM-CMID.</p> <p>14. Guest lecture prospective vaccine development from recombinant protein, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga</p> <p>15. <i>Workshop bioinformatic and the role in tracing evolution and Transmission of Mycobacteria</i></p>
--	---

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. *Genotype* gen MTBC antara kelompok isolat MTBC dan MOTT mempunyai perbedaan, yaitu gen *eccB5* teramplifikasi dengan baik pada MTBC sedangkan pada MOTT khususnya fast growing tidak teramplifikasi
2. Sekuens DNA *conserved* dan spesifik MTBC pada gen *eccB5* isolat MTBC TB paru dapat dilihat pada homologi 99%-100% (analisis menggunakan program BLAST NCBI dan Genetyx win version). Homologi 99% karena diketahui terdapat mutasi pada gen *eccB5*.
3. Struktur *EccB5* pada dengan full length sekuens mempunyai perbedaan dibandingkan dengan yang ditemukan SNP.
4. Gen *eccB5* dapat mendeteksi MTBC pada kondisi active disease.
5. Gen *eccB5* tidak dapat mendeteksi MTBC pada kondisi laten atau dormant stage.

6.2 Saran

1. Gen *eccB5* perlu diteliti lebih lanjut mengenai sekuens dan polimorfisme pada isolat MTBC agar dapat diketahui secara pasti peran dan fungsinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajantha, GS, Shetty, PC, Kulkarni, RD, Biradar, U 2013, PCR as a diagnostic tool for extra-pulmonary tuberculosis, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, vol.7, no. 6, pp. 1012-1015.
- Boradia, VM, Malhotra, H, Thakkar, JS, Tillu, VA, Vuppala, B, Patil, P, Sheokand, N, Sharma, P, Chauhan, AS, Raje, M & Raje, CI 2014, *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron by cell-surface sequestration and internalization of human holo-transferrin, *Nature Communications*, vol .4730., no. 5, pp. 1-12.
- Bottai, D, Di Luca, M, Majlessi, L, Frigui, W, Simeone, R, Sayes, F, Bitter, W, Brennan, MJ, Leclerc, C, Batoni, G, Campa, M, Brosch, R & Esin, S 2012, Disruption of the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation, *Molecular Microbiology*, vol. 83, no.6, pp.1195–1209.
- Carroll, KC, Hobden, JA, Miller, S, Morse, SA, Mietzner, TA, Detrick, B, Mitchell, TG, McKerrow, JH, & Sakanari, JA 2016, *Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology twenty-seventh edition*, McGraw-Hill Education, United States.
- Di Luca, M, Bottai, D, Batoni, G, Orgeur, M, Aulicino, A, Counoupas, C, Campa, M, Brosch, R, Esin, S 2012, The ESX-5 Associated eccB5-eccC5 Locus Is Essential for *Mycobacterium tuberculosis* Viability, *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, pp. e52059.
- Dooley, KE & Chaisson, RE 2010. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics, *Lancet Infectious Disease* , vol. 9, no.12, pp. 737–746.
- Forrellad, MA, Klepp, LI, Gioffré, A, García, JS, Morbidoni, HR, Santangelo, MdP, Cataldi, AA & Bigi, F 2013, Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Virulence*, vol.4, no.1, pp.3–66.
- Getahun, H, Matteelli, A, Chaisson, RE, & Ravignione, M 2015, Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection [review], *The New England Journal of Medicine*, vol. 372 no. 22, pp. 2127-2135.
- Herr, EC & Rubin, EJ 2008, Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective, *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, vol. 72, no.1, pp. 126-156.

- Meikle, V, Alito, A, Llera, A, Gioffre', A, Peralta, A, Buddle, B& Cataldi, A 2009. identification of novel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions, *Clinical And Vaccine Immunology*, vol. 16, no. 9, pp. 1352–1359
- Nunes-Alves, C, Booty, MG, Carpenter, SM, Jayaraman, P, Rothchild, AC, & Behar, SM 2014, In search of a new paradigm for protective immunity to TB, *Nature Reviews Microbiology*, vol. 12, pp. 289-299.
- O'Garra, A, Redford, PS, McNab, FW, Bloom, CI, Wilkinson, RJ, & Berry, MPR 2013, The immune response in tuberculosis, *The Annual Review of Immunology*, vol.31, pp. 475–527.
- Owen, JA, Punt, J, Stanford, SA, & Jones, PP 2013, *Kuby immunology 7th edition*. W. H. Freeman and Company, United States of America.
- Philips, JA, & Ernst, JD 2012, Tuberculosis pathogenesis and immunity, *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol. 7, pp. 353–384.
- Purohit, M, & Mustafa, T 2015, Laboratory diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis (EPTB) in resource-constrained setting: state of the art, challenges and the need, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, vol.9, no. 4, pp. EE01-EE06
- Rajni, Rao, N & Meena, LS 2011, Biosynthesis and virulent behavior of lipids produced by *Mycobacterium tuberculosis* : LAM and Cord Factor: An Overview, *Biotechnology Research International*, vol. 2011, pp. 1-7.
- Shah, S, Cannon, JR, Fenselau, C & Briken, V 2015, A duplicated ESAT-6 region of ESX-5 is involved in protein export and virulence of mycobacteria, *Infect. Immun* [Accepted Manuscript], vol. 83, no 11. pp. 4349-4361.
- Shekhawat, SD, Purohit, HJ, Taori, GM, Dagainawala, HF & Kashyap, RS 2015. Evaluation of heat shock proteins for discriminating between latent tuberculosis infection and active tuberculosis: A preliminary report. *J. Infect Public Health*, vol. 9, no. 2, pp.143-152.
- Simeone, R, Bottai, D, Frigui, W, Majlessi, L, & Brosch, R 2015, ESX/type VII secretion systems of Mycobacteria: Insights into Q3 evolution, pathogenicity and protection, *Tuberculosis*, vol. 95, Suppl. 1, pp. S150–S154.

Smith, I 2003, *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence, *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 6, no.3, pp.463-496.

Tomlinson, JA, Boonham, N, Hughes, KJD, Griffin, RL & Barker, I 2005, On-site DNA extraction and real-time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field, *Journal Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 11, pp 6702-6710

Tufariello, JM, Chapman, JR, Kerantzasa, CA, Wong, KW, Vilchèze, C, Jones, CM, Colca, LE, Tinaztepe, E, Thompson, V, Fenyöh, D, Niederweis, M, Ueberheide, B, Philips, JA, & Jacobs Jr, WR 2016, Separable roles for *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, 3, pp. E348–E357.

WHO 2010, *Global Tuberculosis Control 2010*, World Health Organization, Geneva, diakses tanggal 10 Januari 2016, http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/F530290AD0279399C12577D8003E9D65-Full_Report.pdf.

WHO 2014, *Global Tuberculosis Report 2014*, World Health Organization, Geneva, diakses 10 Januari 2016, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf.

WHO 2015, *Global tuberculosis report 2015*, World Health Organization, Geneva, diakses 10 Januari 2016, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1.

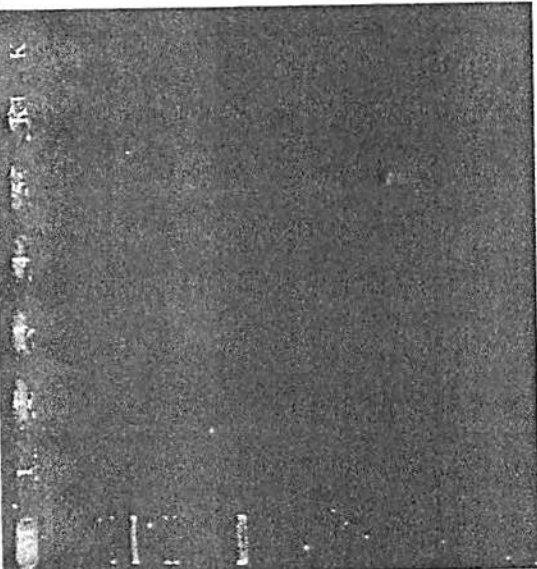
LAMPIRAN

Lampiran 1. Catatan Harian (*Logbook*)

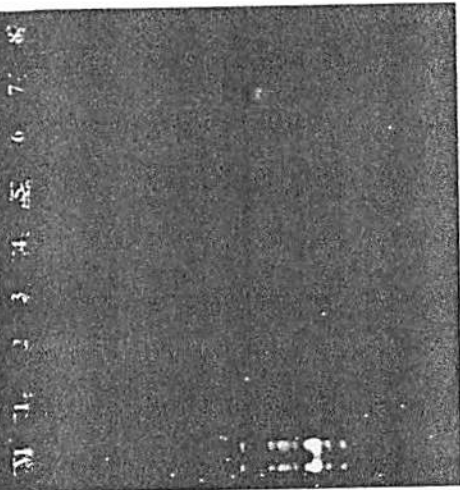
NO.	TANGGAL	KEGIATAN
1.	02/01/2018	Studi literatur eccB5
2.	03/01/2018	Studi literatur eccB5 protein
3.	04/01/2018	<ul style="list-style-type: none"> - Ekstraksi rProtein SMG dengan menggunakan Bugbuster - Purifikasi - SDS - WB
4.	05/01/2018	<ul style="list-style-type: none"> - Mengganti larutan dialisis - Menimbang berat kering - Sonikasi - Pemeriksaan sampel darah - Mengecek konsentrasi protein
5.	09/01/2018	<ul style="list-style-type: none"> - Mengecek konsentrasi protein
6.	10/01/2018	<ul style="list-style-type: none"> - Ekstraksi protein dengan sonikasi - SDS-PAGE - WB
7.	11/01/2018	<ul style="list-style-type: none"> - Ekstraksi protein dengan sonikasi - SDS-PAGE - WB

		- Studi literatur tentang <i>PER-PTB</i> , TAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA <i>eccB5</i>
8.	12/01/2018	- Studi literatur ATP - Tranformasi
9.	15/01/2018	- Studi <i>ATP activity assay + KCl</i> -
10.	16/01/2018	- <i>Measured OD</i>
11.	17/01/2018	- Menghitung OD pada kultur - Uji Resistensi
12.	18/01/2018	- <i>Measured OD from culture</i>
13.	19/01/2018	- Menghitung OD pada kultur - Harvest - Wet Weight
14.	22/01/2018	- Sonikasi - Ekstraksi - <i>SDS-PAGE</i>
15.	24/01/2018	- WB
16.	25/01/2018	Studi literatur dan persiapan presentasi
17.	22/02/2018	Ekstraksi kit

18.	22/02/2018	<p>- PCR sampel target gen <i>eccB5</i></p> <p>Target gen <i>eccB5</i> full Sampel ulangan</p> <p>Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR mix 25 µl - Primer F 1 µl - Primer R µl - DNA template 5 µl - NWF 18 µl <p>Suhu :</p> <ul style="list-style-type: none"> Predenaturasi 95°C-3' Denaturasi 95°C- 10" Annealing 53.8 °C- 15" Ekstensi 72 °C- 15" Final ekstensi 72 °C- 10' Elongasi 4 °C-∞ Siklus 35x <p>Keterangan ELP hasil PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> M : Marker 100bp DNA ladder 1-5 : negatif K+ : negatif K- : Negatif
-----	------------	--

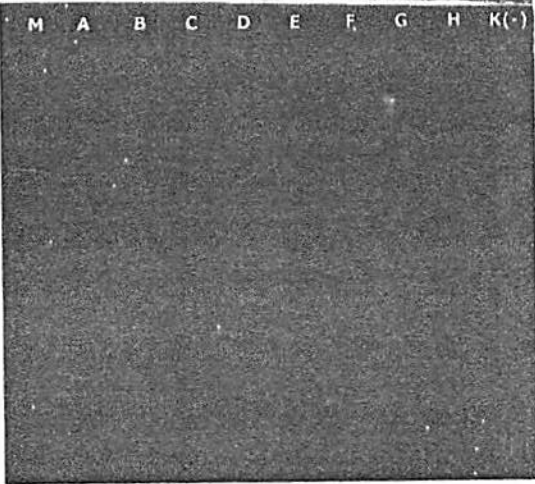


<p>19. 11/04/2018</p>	<p>- PCR optimasi kontrol positif dan sampel target gen <i>eccB5</i></p> <p>Target gen <i>eccB5</i> full Sampel ulangan Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR mix 25 μl - Primer F 1 μl - Primer R 1 μl - DNA template 5 μl - NWF 18 μl <p>Suhu :</p> <p>Pre-denaturasi 95°C-3' Denaturasi 95°C- 10" Annealing 53.8°C- 15" Ekstensi 72°C- 15" Final ekstensi 72°C- 10' Elongasi 4°C-∞ Siklus 35x</p> <p>Keterangan ELP hasil PCR: M : Marker 100bp DNA ladder 1-3 : Negatif</p>
-----------------------	--

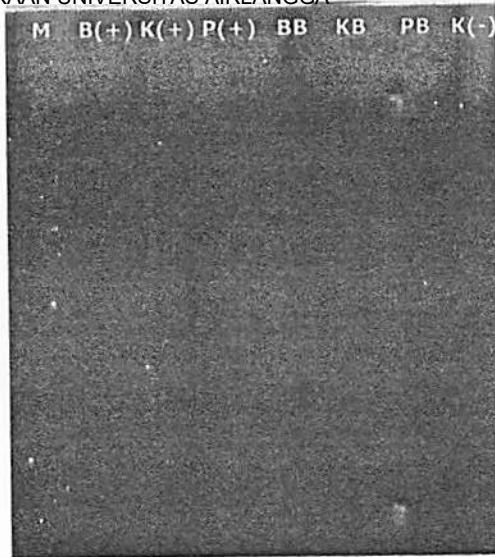
20.	04/05/2018	<p>- PCR optimasi kontrol positif gen <i>eccB5</i></p> <p>Target gen <i>eccB5</i> full Sampel ulangan</p> <p>Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR mix 25 µl - Primer F 1 µl - Primer R µl - DNA template 5 µl - NWF 18 µl <p>Suhu :</p> <ul style="list-style-type: none"> Predenaturasi 95°C-3' Denaturasi 95°C- 10" Annealing 53°C- 58°C 15" Ekstensi 72°C- 15" Final ekstensi 72°C- 10' Elongasi 4°C-∞ Siklus 35x <p>Keterangan ELP hasil PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> M : Marker 100bp DNA ladder - 1-8 : Negatif 	
-----	------------	--	---

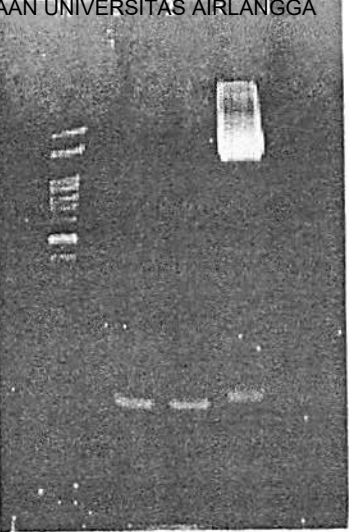
21.	07/05/2018	<p>PCR optimasi kontrol positif gen <i>eccB5</i></p> <p>Target gen <i>eccB5</i> full Sampel ulangan</p> <p>Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR mix 25 µl - Primer F 1 µl - Primer R 1 µl - DNA template 5 µl - NWF 18 µl <p>Suhu :</p> <ul style="list-style-type: none"> Predenaturasi 95°C-3' Denaturasi 95°C- 10" Annealing 55°C- 60°C 15" Ekstensi 72°C- 15" Final ekstensi 72°C- 10' Elongasi 4°C-∞ Siklus 35x <p>Keterangan ELP hasil PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> M : Marker 100bp DNA ladder - 1-7 : Negatif
22.	03/07/2018	<p>Analisis desain primer baru <i>eccB5</i></p>

23.	14/07/2018	Optimasi primer baru eccB5 _{IR} - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
		PCR mix, Primer R,F, DNA templet dan DW
		Marker : Sizer 100bp (Intron Biotechnology)
		Racikan :
		- PCR Mix: 10µl
		- Primer F : 1µl
		- Primer R: 1µl
		- DW : 6µl
		- DNA template : 3µl
		- Total : 20µl
		- Pre denaturasi : 95°C selama 1 menit
		- Denaturasi : 95°C selama 10''
		- Annealing : 53-58°C-15''
		- Siklus 35x
		- Extension : 72°C selama 15''
		- Final extension : 72°C – 3'
		- Elongation : 4°C – 5'
		Keterangan ELP hasil PCR:
		M : Marker 100bp DNA ladder
		A-H : Negatif → tidak sesuai dengan target
24.	11/07/2018	Pengajuan perizinana ke dinkes dan bakesbangpol
25.	12/07/2018	Pengajuan perizinana ke dinkes dan bakesbangpol
26.	16/07/2018	Pengajuan perizinana ke dinkes dan bakesbangpol

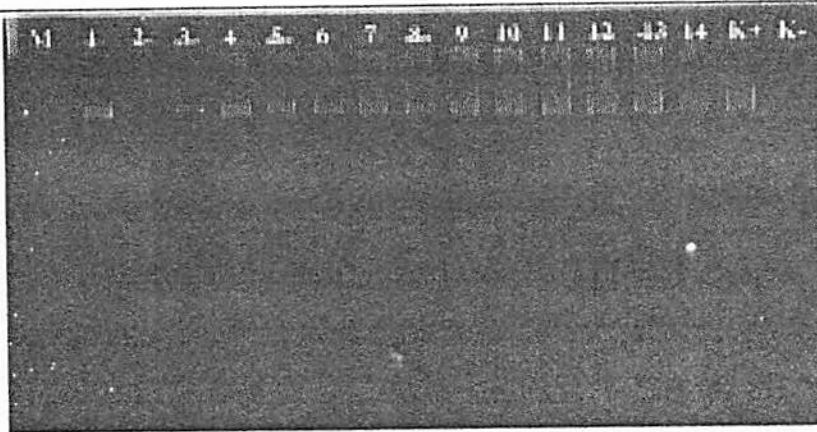


27.	18/07/2018	<p>Optimasi primer baru eccB5^{IR} - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA</p> <p>Dengan mengoptimasi master mix (PCR Mix Bioland, kappa dan Promega) PCR mix, Primer R,F, DNA templet dan DW</p> <p>Marker : Sizer 100bp (Intron Biotechnology)</p> <p>Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR Mix: 10µl - Primer F : 1µl - Primer R: 1µl - DW : 6µl - DNA template : 3µl - Total : 20µl - Pre denaturasi : 95°C selama 1 menit - Denaturasi : 95°C selama 10'' - Annealing : 53.8C-15'' - Siklus 35x - Extension : 72°C selama 15'' - Final extension : 72°C – 3' - Elongation : 4°C – 5' <p>Keterangan ELP hasil PCR:</p> <p>M : Marker 100bp DNA ladder</p> <ul style="list-style-type: none"> - Optimasi dengan sampel Bovis dan H37Rv
-----	------------	---



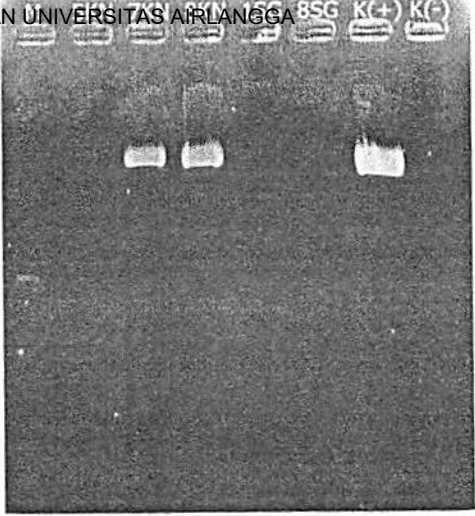
28.	20/07/2018	<p>Optimasi primer baru eccB⁵IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA Dengan Sampel : isolat, sputum, h37rv PCR mix, Primer R,F, DNA templet dan DW Marker : Sizer 100bp (Intron Biotechnology) Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR Mix: 10µl - Primer F : 1µl - Primer R: 1µl - DW : 6µl - DNA template : 3µl - Total : 20µl - Pre denaturasi : 95°C selama 1 menit - Denaturasi : 95°C selama 10'' - Annealing : 53.8C-15'' - Siklus 35x - Extension : 72°C selama 15'' - Final extension : 72°C – 3' - Elongation : 4°C – 5' <p>Keterangan ELP hasil PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - M : Marker 100bp DNA ladder - 1 : Isolat - 2 : Sputum - 3 : H37rv - 4 : M.fortuitum 	
29.	23/07/2018	Studi literatur	
30.	25/08/2018	Ekstraksi kit	
31.	29/08/2018	- Draft manuscript LTBI	

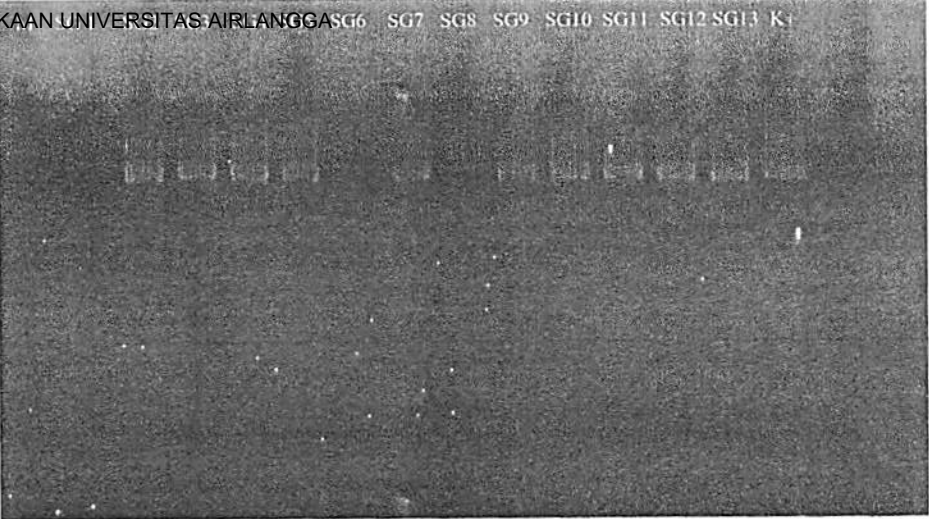
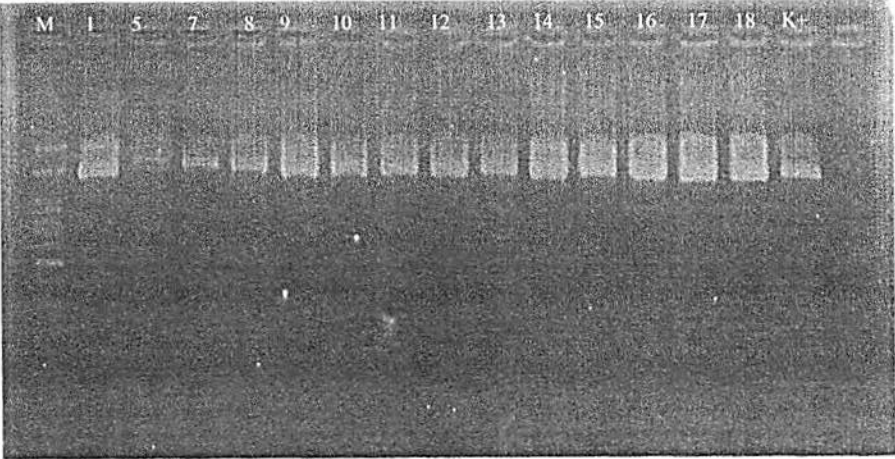
		- Diskusi dengan pembimbing PUSATAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
32.	04/08/2018	<p>Optimasi primer baru eccB5 Dengan Sampel : isolat, h37rv PCR mix, Primer R,F, DNA templet dan DW Marker : Sizer 100bp (Intron Biotechnology) Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR Mix: 10μl - Primer F : 1μl - Primer R: 1μl - DW : 6μl - DNA template : 3μl - Total : 20μl - Pre denaturasi : 95°C selama 1 menit - Denaturasi : 95°C selama 10'' - Annealing : 53.8C-15'' - Siklus 35x - Extension : 72°C selama 15'' - Final extension : 72°C - 3' - Elongation : 4°C - 5' <p>Keterangan ELP hasil PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - M : Marker 100bp DNA ladder - 1 : 1KN - 2 : 5KN - 3 : 7KN - 4 : 8KN - 5 : 9KN - 6 : 10KN - 7 : 11KN

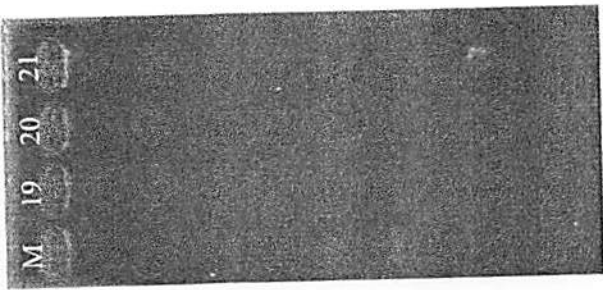


		<ul style="list-style-type: none"> - 8 : 12 km - 9 : 13KN - 10 : 14KN - 11 : 15KN - 12 : 16KN - 13 : 17KN - 14 : 18KN - K+ - K- 	IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
33.	08/08/2018	<p>PCR Dengan Sampel : isolat, h37rv PCR mix, Primer R,F, DNA templet dan DW Marker : Sizer 100bp (Intron Biotechnology) Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR Mix: 25µl - Primer F : 1µl - Primer R: 1µl - DW : 20µl - DNA template : 3µl - Total : 50µl - Pre denaturasi : 95°C selama 1 menit - Denaturasi : 95°C selama 10'' - Annealing : 53.8C-15'' - Siklus 35x - Extension : 72°C selama 15'' - Final extension : 72°C – 3' - Elongation : 4°C – 5' 	

34.	08/08/2018	Sequencing 1KN, 7KN, 8KN, 9KN, 11KN
35.	20/08/2018	Analisis hasil sequencing
36.	23/08/2018	Pengajuan izin ke puskesmas dan diskusi kasus TB
37.	27/08/2018	Diskusi dengan pembimbing dan stdu literatur
38.	29/08/2018	- Diksusi dengan pembimbing - Ekstraksi kit
39.	03/09/2018	PCR
40.	10/09/2018	Studi Literatur
41.	12/09/2018	Studi literatur dan persiapan draft manuscript
42.	20/09/2018	Ekstraksi sampel dengan kit Qiagen
43.	24/09/2018	Ekstraksi sampel dengan kit Qiagen

44.	06/10/2018	<p>PCR sampel 5KN, 7KN, 8KN, 8SG, 8SSG 8SG PCR mix, Primer R,F, DNA templet dan DW Marker : Sizer 100bp (Intron Biotechnology) Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR Mix: 25μl - Primer F : 1μl - Primer R: 1μl - DW : 18μl - DNA template : 5μl - Total : 50μl - Pre denaturasi : 95°C selama 1 menit - Denaturasi : 95°C selama 10'' - Annealing : 53.8C-15'' - Siklus 35x - Extension : 72°C selama 15'' - Final extension : 72°C – 3' - Elongation : 4°C – 5' 	
45.	7/10/2018	<p>PCR sampel SG = 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13 K(+) PCR mix, Primer R,F, DNA templet dan DW Marker : Sizer 100bp (Intron Biotechnology) Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR Mix: 25μl - Primer F : 1μl - Primer R: 1μl 	

		<ul style="list-style-type: none"> - DW : 18μl - DNA template : 5μl - Total : 50μl - Pre denaturasi : 95°C selama 1 menit - Denaturasi : 95°C selama 10'' - Annealing : 53.8C-15'' - Siklus 35x - Extension : 72°C selama 15'' - Final extension : 72°C - 3' - Elongation : 4°C - 5' 	
46.	7/10/2018	<p>PCR sampel KN = 1,5,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18, K+</p> <p>PCR mix, Primer R,F eccD5 , DNA templet dan DW Marker : Sizer 100bp (Intron Biotechnology) Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR Mix: 25μl - Primer F : 1μl - Primer R: 1μl - DW : 18μl - DNA template : 5μl - Total : 50μl - Pre denaturasi : 95°C selama 1 menit 	

		<ul style="list-style-type: none"> - Denaturasi : 95°C selama 10'' - Annealing : 53.8C-15'' - Siklus 35x - Extension : 72°C selama 15'' - Final extension : 72°C - 3' - Elongation : 4°C - 5'
47.	7/10/2018	<p>PCR sampel KN = 19, 20, 21 K+</p> <p>PCR mix, Primer R,F, DNA templet dan DW</p> <p>Marker : Sizer 100bp (Intron Biotechnology)</p> <p>Racikan :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR Mix: 25µl - Primer F eccD5 : 1µl - Primer R eccD5: 1µl - DW : 18µl - DNA template : 5µl - Total : 50µl - Pre denaturasi : 95°C selama 1 menit - Denaturasi : 95°C selama 10'' - Annealing : 53.8C-15'' - Siklus 35x - Extension : 72°C selama 15'' - Final extension : 72°C - 3' - Elongation : 4°C - 5' 

48.	10/10/2018	Kirim sampel untuk sequencing
49.	13/10/2018	Oral presenter di ISM-CMID
50.	14/10/2018	Seminar ISM-CMID
51.	15/10/2018	Guest Lecturer dan studi literatur
52.	18/10/2018	Workshop bioinformatics
53.	19/10/2018	Workshop bioinformatics
54.	20/10/2018	Workshop bioinformatics
55.	23/10/2018	Analisis hasil sequencing
56.	26/10/2018	Revisi draft dan studi literatur

Lampiran 2. Seminar Internasional : oral presenter



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certificate is awarded to

Siti Kurniawati, drh., M.Ked.Trop

in recognition of valuable contribution on the International Seminar 2nd MCLS 2017

2nd MOLECULAR AND CELLULAR LIFE SCIENCES :

**Structural Biology, Bio-molecular modeling, Bio-molecular dynamics
with applications in biotechnology & medicine**

as **Oral Presenter**

Surabaya, July 17-18th, 2017

長谷川 俊治
Prof. Dr. Toshiharu Hase
Director of European Center of
Osaka University

Dr. Ali Rohman
Chairperson 2nd MCLS Committee
Universitas Airlangga

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



Lampiran 3. Jurnal

a. *African Journal of Infectious Disease : status publish*

Journal List > Afr J Infect Dis > v.12(2): 2015 > PMC6085738

African Journal of Infectious Diseases : AJID

ATHMSI

Afr J Infect Dis 2018; 12(2): 37-42
Published online 2018 Jun 15. doi: [10.21010/ajid.v12i2.6](https://doi.org/10.21010/ajid.v12i2.6)PMCID: PMC6085738
PMID: [30109284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30109284/)SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF *ECCB5* GENE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX ISOLATES FROM SUSPECTED PULMONARY TB PATIENTS IN SURABAYA INDONESIASiti Kurniawati,¹ Soedarsono Soedarsono,² Aulanni'am Aulanni'am,³ and Ni Made Mertaniasih^{4,5,*}

Author information > Article notes > Copyright and License information > Disclaimer

Abstract

Go to:

Background:

Go to:

Mycobacterium tuberculosis Complex (MTBC) is a group of *Mycobacterium* that causes tuberculosis (TB). TB is an infectious disease that remains a global health problem. Indonesia is one of the five countries in the world where TB is the most prevalent and became the country with the second largest rate of TB in 2014 and 2015. MTBC has high pathogenicity that can cause infections in animals and humans. The most common route of transmission is via *airborne* droplet nuclei and contact with animals or humans infected with TB. MTBC has many virulence factors. One of these factors is EccB5 that is encoded by *eccB5* gene. EccB5 is a transmembrane protein-conserved membrane protein and could play a role in inducing damage in host cells, macrophage infection, and may correlate with active disease. The characterization of *eccB5* gene needs to be studied to determine the nucleotide sequences, which may be associated with active disease. The aim of this research was to analyze the nucleotide sequences of *eccB5* gene of MTBC from suspected pulmonary tuberculosis patients, SNPs of *eccB5* gene and possible correlation with the disease, especially in Indonesia.

b. *Indian Journal of Tuberculosis* : Under review 1

Manuscript Details

Manuscript number	IJTB_2016_257
Title	The specific fragment of <i>eccB5</i> gene of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex from sputum of pulmonary tuberculosis patients at Dr. Soetomo Hospital Surabaya Indonesia
Article type	Full length article

Abstract

Background Tuberculosis (TB) is a contagious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). TB is still a significant health problem worldwide and Indonesia is one of the top five countries where the incidence of TB cases is the highest. The crucial factor in detection of TB in patients clinically suspected of TB is accurate microbiological detection and identification in the laboratory using diagnostic tools. Recent developments of molecular diagnostics using nucleic acid amplification with PCR technique has been frequently used and has been highly profitable. The objective of this research is to evaluate the accuracy of PCR technique using a specific fragment of the *eccB5* gene as the target gene. Methods From January 2016 to July 2016 sputum was collected from patients with suspected pulmonary TB in Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia, with DNA extraction using a commercial kit DNeasy@cat.no. 69504 (Qiagen Ltd, Germany). Samples were tested using PCR technique with the specific primer for the specific DNA target 313bp of *eccB5* gene of MTBC. This method was compared with the standard culture method of BACTEC MGIT 960 system (Becton, Dickinson & Company, 7 Loveton Circle Sparks, Maryland, United States of America) for evaluation of its accuracy. Result In total 21 samples of sputum suspected of pulmonary TB were examined, and 17 samples showed specific DNA fragments of the 313 bp. Positive detection was 17 (80,95%) from 21 samples, as well as sensitivity and specificity were 100% respectively. Conclusion The PCR technique based on the specific fragment of *eccB5* gene is highly sensitive and specific in detecting MTBC from sputum suspected of pulmonary TB.

Keywords PCR; the specific fragment *eccB5* gene; *Mycobacterium tuberculosis* complex; pulmonary tuberculosis

Corresponding Author Ni Mertaniasih

Order of Authors Siti Kurniawati, Agnes Dwi Sis Perwitasari, Desak Nyoman Surya Suametriana Dewi, Nastiti Intan Permata Sari, Ni Mertaniasih

Lampiran 4. Rencana HKI

Primer: Forward eccB5

- - Primer Information - - - - -

Sequence: 5' GCAGTGGCAAATACCCAGGTCAATGTC 3'
 Length: 27
 Meets criteria: Yes
 Composition: A: 8 C: 7 G: 7 T: 5
 Molar absorbance: 31.2 µg/ml = 1 OD260
 Linked molecule: No molecule association

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

Criteria -	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	51	Yes
Tm C	Range 55-80	69	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'end	1	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	3	Yes
Stability	>= 1.2 kcals 5'vs3'	1.9	Yes
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	1	Yes
Runs	< 4 base runs	3	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	none	Yes
Hairpins	Annealing 55 C	none	Yes
Worst-case False Priming C		n/a	

- - Primer Notes - - - - -

Primer: reverse eccB5

- - Primer Information - - - - -

Sequence: 5' GGCAATATTCTCGGGCTTGATGACC 3'
 Length: 25
 Meets criteria: Yes
 Composition: A: 5 C: 6 G: 7 T: 7
 Molar absorbance: 32.5 µg/ml = 1 OD260
 Linked molecule: No molecule association

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

Criteria -	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	52	Yes
Tm C	Range 55-80	67	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	6	Yes
Stability	>= 1.2 kcals 5'vs3'	1.9	Yes
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	2	Yes
Runs	< 4 base runs	3	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes
Hairpins	Annealing 55 C	none	Yes
Worst-case False Priming C		n/a	

- - Primer Notes - - - - -

