

PS1

38

Jakarta

Rahasia untuk Kalangan Terbatas

LAPORAN AKHIR PENELITIAN RISBINKES

UJI KUALITAS METODE EKSTRAKSI DNA *Mycobacterium tuberculosis*
MENGUNAKAN GUANIDINE THIOSIANAT DAN CHELEX TERMODIFIKASI

TERBALIK
PS1 38



Penyusun

Kindi Adam

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

KEMENTERIAN KESEHATAN RI

2012

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan

PERPUSTAKAAN

Tanggal : 17-6-2013

No. Indek : _____

No. Klass : Ps 1

38

Rahasia untuk Kalangan Terbatas

LAPORAN AKHIR PENELITIAN RISBINKES

UJI KUALITAS METODE EKSTRAKSI DNA *Mycobacterium tuberculosis*
MENGUNAKAN GUANIDINE THIOSIANAT DAN CHELEX TERMODIFIKASI



Penyusun

Kindi Adam

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

KEMENTERIAN KESEHATAN RI

2012

JUDUL PENELITIAN

Uji Kualitas Metode Ekstraksi DNA *M. tuberculosis* Menggunakan Guanidine Thiosianat dan Chelex Termodifikasi

SUSUNAN TIM PENELITI

Nama	Keterangan
Ketua Pelaksana Kindi Adam, M.Biotech	Bertanggung jawab dalam keseluruhan penelitian
Peneliti 1 Yuni Rukminiati, M.Biomed	Bertanggung jawab dalam penanganan spesimen M.tuberculosis
Peneliti 2 Rosa Adelina, Apt	Bertanggung jawab dalam formulasi reagen dan penyimpanan
Litkayasa Novi Amalia, AMAK	Bertanggung jawab dalam penyimpanan dan tahapan penelitian

LEMBARAN LAPORAN PENDAMPINGAN
PENDAMPINGAN LAPORAN RISBINKES 2012

Laporan Risbin tahun 2012 :

Judul: Uji Kualitas Metode Ekstraksi DNA *M. tuberculosis* Menggunakan Teknik Guanidine Thiosianat dan Chelex Termodifikasi

Ketua Pelaksana: Kindi Adam

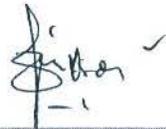
Instansi Pelaksana: Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

Dinyatakan telah melalui Proses Pendampingan Laporan Ilmiah dan telah diperbaiki sesuai hasil pendampingan yang dilakukan pada hari Senin-Jumat, 26 - 30 November 2012.

Demikian lembaran laporan pendampingan ini kami buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bogor, Desember 2012

MENYETUJUI,

Pendamping :
Nama: Dr. Vivi Lisdawati, MSc., Apt.
Tanda Tangan: 



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226

Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933

E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: <http://www.litbang.depkes.go.id>

KEPUTUSAN
KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
NOMOR : HK.03.05/1/323/2012

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA
RISET PEMBINAAN KESEHATAN (RISBINKES) BADAN PENELITIAN DAN
PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN RI TAHUN 2012

KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

- Menimbang** :
1. Bahwa untuk melaksanakan kegiatan Riset Pembinaan (Risbin) Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Tahun 2012 perlu dibentuk Tim Pelaksana Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) pada masing-masing Satuan Kerja di Lingkungan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
 2. Bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes);
- Mengingat** :
1. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130);
 2. Undang-Undang Nomor 18 tahun 2002 tentang Sistem Nasional Penelitian, Pengembangan, Penerapan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 84, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4219);
 3. Undang-undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063);

4. Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);
5. Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Aih Teknologi Kekayaan Intelektual serta Hasil Penelitian dan Pengembangan oleh Perguruan Tinggi dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara Tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4497);
6. Peraturan Presiden Nomor 10 Tahun 2005 tentang Unit Organisasi dan Tugas Eselon I Kementerian Negara Republik Indonesia sebagaimana telah diubah terakhir dengan Peraturan Presiden Nomor 50 Tahun 2008;
7. Instruksi Presiden Nomor 4 tahun 2003 tentang Pengkoordinasian Perumusan dan Pelaksanaan Kebijakan Strategis Pembangunan Nasional Ilmu Pengetahuan dan Teknologi;
8. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/ 1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
9. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/ Menkes/ SK/ XI/ 1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
10. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 1144/ Menkes/ Per/ VIII/ 2010 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;
11. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 021/Menkes/SK/1/2011 tentang Rencana Strategis Kementerian Kesehatan Tahun 2010 – 2014;
12. Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Nomor: HK.03.05/1/147/2012 tentang Tim Pengelola Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Tahun 2012;

MEMUTUSKAN :

Menetapkan :

KESATU : KEPUTUSAN KEPALA BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN TENTANG PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA RISET PEMBINAAN KESEHATAN (RISBINKES) BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN KEMENTERIAN KESEHATAN TAHUN 2012.

KEDUA : Pembentukan Tim Pelaksana Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) Tahun 2012 dengan susunan Tim sebagaimana tersebut dalam lampiran keputusan ini.

KETIGA : Tim Pelaksana Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) Tahun 2012 bertugas:

1. Mengkoordinir pelaksanaan kegiatan penelitian dan pengembangan kesehatan sesuai dengan bidang fokus, jenis insentif, judul penelitian, pelaksana penelitian/perekayaan dan jumlah dana yang dialokasikan sesuai dengan Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Nomor: HK.03.05/1/147/2012 tentang Tim Pengelola Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Tahun 2012;
2. Melakukan monitoring dan evaluasi terhadap semua pelaksanaan kegiatan Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) sebagaimana dimaksud pada butir 1;
3. Melaporkan proses pelaksanaan, kemajuan dan akhir kegiatan penelitian secara periodik kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan yang meliputi dokumen *hard copy* dan *soft copy* sebagai berikut:
 - a. Laporan akhir penelitian
 - b. Data mentah dan karakteristik data penelitian (definisi operasional, struktur data, dsb)
 - c. Naskah rancangan publikasi ilmiah hasil penelitian
 - d. Usulan HKI untuk hasil penelitian yang berorientasi HKI

- KEEMPAT** : Tim Pelaksana Riset Pembinaan Kesehatan (Risbinkes) Tahun 2012 bertanggungjawab kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- KELIMA** : Tim sebagaimana dimaksud pada diktum kedua diberikan honorarium sesuai dengan ketentuan yang berlaku;
- KEENAM** : Biaya pelaksanaan kegiatan penelitian ini dibebankan pada Daftar Isian Penggunaan Anggaran Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Tahun 2012;
- KETUJUH** : Keputusan ini mulai berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan bulan Desember 2012.

DITETAPKAN DI : JAKARTA
PADA TANGGAL : 12 JANUARI 2012



LAMPIRAN 1
 KEPUTUSAN KEPALA BADAN LITBANGKES
 NOMOR : HK.03.05/1/323/2012
 TANGGAL : 12 JANUARI 2012

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA RISET PEMBINAAN BADAN LITBANGKES TAHUN 2012

No	Judul penelitian	Satuan Kerja	Panel	Tim Pelaksana	Jabatan Tim
1	Pengembangan Formula Ekstraksi DNA M. tuberculosis Menggunakan Teknik Guanidine Thiosianat Termodifikasi	Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan	Penyakit Menular	Kindi Adam, S.Si	Ketua Pelaksana
				Yuni Rukminiati, M.Biomed	
				Rosa Adelina, Apt	
				Novi Amalia	
2	Modulasi Ekspresi Protein Antiproliferasi dan Proapoptosis Ekstrak Daun Sirsak (<i>Annona muricata</i> L.) terhadap Tikus Terinduksi 7,12-Dimetil Benz[α]Antazena (DMBA)	Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan	Penyakit Tidak Menular	Rosa Adelina, S.Farm, Apt	Ketua Pelaksana
				drh. Putri Reno Intan	Peneliti
				Intan Sari Oktoberina	Teknisi
3	Pola Diare dan Terapinya pada Pasien Balita di Rumah Sakit Penyakit Infeksi Sulianti Saroso dan Puskesmas Bantar Gebang Bekasi	Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik	Penyakit Menular	dr. Armaji Kamaludi Syarif	Ketua Pelaksana
				Syachroni, S.Si	Peneliti
				Aniska Novita Sari, S.Si	Peneliti
4	Hubungan Karakteristik Penderita Human Immunodeficiency Virus/ Acquired Immune Deficiency Syndrome (HIV) Dewasa dengan Lama Waktu Perawatan di RSPI Sulianti Saroso	Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik	Penyakit Menular	dr. Heni Kismayawati	Ketua Pelaksana
				Aris yulianto, S.Si	Peneliti
				Arga Yudhistira, S.Sos	Peneliti
5	Studi Pelaksanaan Pemberian Profilaksis Tuberkulosis pada Anak di Puskesmas Wilayah DKI Jakarta dan Bekasi	Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik	Kesehatan Ibu Dan Anak	dr. Retna Mustika Indah	Ketua Pelaksana
				dr. Dona Arlinda	Peneliti
				dr. Armaji Kamaludi Syarif	Peneliti

No	Judul penelitian	Satuan Kerja	Panel	Tim Pelaksana	Jabatan Tim
6	Studi Pelaksanaan Skrining Kanker Serviks dengan Metode Inspeksi Visual Asetat (IVA) pada Puskesmas Pilot Project Skrining Kanker Serviks	Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik	Kesehatan Ibu Dan Anak	dr. Cicih Opitasari	Ketua Pelaksana
				Agus Dwi Harso, S.Si	Peneliti
				Sundari Wirasmi, S.Si	Peneliti
7	Penatalaksanaan Diabetes Melitus Tipe 2 di Puskesmas Abadi Jaya dan Depok Jaya	Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik	Penyakit Tidak Menular	dr. Dona Arlinda	Ketua Pelaksana
				Qurrotul Ainin Meta Puspita, S.TP	Peneliti
				Anggita Bunga Anggraini, S.Farm, Apt	Peneliti
8	Akses dan Pemanfaatan Jaminan Persalinan (Jampersal) di Kabupaten Pandeglang	Pusat Teknologi Intervensi Kesehatan Masyarakat	Kesehatan Ibu Dan Anak	Suparmi, SKM, MKM	Ketua Pelaksana
				Rofingatul Mubasyiroh, SKM	Peneliti
				dr. Dewi Kristanti	Peneliti
9	Analisis Faktor Keberhasilan dan Kegagalan Praktik Pemberian ASI Eksklusif pada Pekerja Buruh Industri Tekstil di Jakarta Tahun 2012	Pusat Teknologi Intervensi Kesehatan Masyarakat	Kesehatan Ibu Dan Anak	Anissa Rizkianti, SKM	Ketua Pelaksana
				dr. Ika Saptarini	Peneliti
				Novianti, S.Sos	Peneliti
10	Hubungan Status Gizi dengan Prestasi Belajar Anak Sekolah Dasar di Daerah Kumuh (Slum Area) Kotamadya Jakarta Pusat	Pusat Teknologi Intervensi Kesehatan Masyarakat	Kesehatan Ibu Dan Anak	Prisca Petty Arfines, S.Gz	Ketua Pelaksana
				Fithia Dyah Puspitasari	Peneliti
				Indri Yunita Suryaputri	Peneliti
				Asep Hermawan, S.Kep	Teknisi
11	Hubungan Rokok terhadap Intelegensia Siswa SMU X di Kabupaten Bogor	Pusat Teknologi Intervensi Kesehatan Masyarakat	Kesehatan Lingkungan	Enung Khotimah, SKM	Ketua Pelaksana
				Rosita, SKM	Peneliti
				Eva Laelasari, S.Si	Peneliti
12	Pengaruh Pemberian Chemosterilan Alami (<i>Solanum nigrum</i> L) terhadap Jumlah dan Kualitas Sperma <i>Tikus</i> Sprague Warley	Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit	Kesehatan Lingkungan	Esti Rahardianingtyas, S.Si	Ketua Pelaksana
				Arum Sih Joharina, S.Si	Peneliti
				drh. Tika Fiona Sari	Peneliti
				Muhidin, SKM	Teknisi

No	Judul penelitian	Satuan Kerja	Panel	Tim Pelaksana	Jabatan Tim
13	Identifikasi Serotipe Virus Dengue pada Nyamuk <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i> di Kota Salatiga dengan Metode RT-PCR	Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit	Kesehatan Lingkungan	drh. Tika Fiona Sari	Ketua Pelaksana
				Arum Sih Joharina, S.Si	Peneliti
				Yusnita Mirna Anggraeni, S.Si	Peneliti
14	Aplikasi Teknik Serangga Mandul (TSM) dalam Upaya Pengendalian Populasi Vektor Demam Berdarah Dengue <i>Aedes aegypti</i> di Daerah Endemis Salatiga	Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit	Kesehatan Lingkungan	Riyani Setyaningsih, S.Si	Ketua Pelaksana
				Siti Alfiah, SKM	Peneliti
				Maria Agustini, SKM	Peneliti
				Nofika Indriyati, AMKL	Teknisi
15	Pengaruh Pemberian Ramuan Tanaman Obat Meniran, Echinacea, Temulawak dan Kunyit terhadap Aktivitas Immunomodulator Mencit	Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional	Penyakit Tidak Menular	Ika Yanti Marfuatush Sholikhah, M.Sc	Ketua Pelaksana
				Nuning Rahmawati, M.Sc., Apt	Peneliti
				Fitriana, S.Farm	Teknisi
16	Analisis Produksi dan Pemasaran Pegagan, Tempuyung dan Seledri di Tingkat Petani dan BBPPTOOT Tawangmangu	Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional	Penyakit Tidak Menular	Nurui Husniyati Listyana, SP	Ketua Pelaksana
				Tri Widayat, M.Si	Peneliti
				Rahma Widyastuti, SP	Peneliti
17	Pengaruh Perasan Buah Ciplukan (<i>Physalis angulata</i> L) terhadap Kadar TSH dan FT4 Mencit Galur Swiss	Balai Penelitian Gangguan Akibat Kekurangan Iodium	Penyakit Tidak Menular	Atfien Susbiantonny, S.Farm	Ketua Pelaksana
				Sri Nuryani Wahyuningrum, S.Si	Peneliti
				Catur Wijayanti, Amd	Teknisi
18	Pendekatan Positive Deviance untuk Penanggulangan Gangguan Akibat Kekurangan Iodium di Daerah Endemik, Kabupaten Blitar, Jawa Timur	Balai Penelitian Gangguan Akibat Kekurangan Iodium	Penyakit Tidak Menular	Noviyanti Liana Dewi, SKM	Ketua Pelaksana
				Marizka Khairunissa, S.Ant	Peneliti
				Palupi Dyah Ayuni, Amd	Peneliti

No	Judul penelitian	Satuan Kerja	Panel	Tim Pelaksana	Jabatan Tim
19	Evaluasi Tatalaksana Penderita Hipertiroid di Klinik BP2GAKI Magelang	Balai Penelitian Gangguan Akibat Kekurangan Iodium	Penyakit Tidak Menular	dr. Taufiq Hidayat	Ketua Pelaksana
				Alfien Susbiantonny, S.Farm	Peneliti
				Roly Anis Siregar, Amd.TEM	Teknisi
20	Bioekologi Vektor Malaria di Kabupaten Sarmi Provinsi Papua	Balai Litbang Biomedis Papua	Kesehatan Lingkungan	Windarti Fauziah, S.Si	Ketua Pelaksana
				Tri Nury Kridaningsih, S.Si	Peneliti
				Irawati Wike, AMAK	Teknisi
21	Gambaran Infeksi Opportunistik pada Penderita HIV-AIDS di Kota Jayapura	Balai Litbang Biomedis Papua	Penyakit Menular	Yunita Y.R Mirino, SKM	Ketua Pelaksana
				dr. Antonius Oktavian, M.Kes	Peneliti
				Anugerah M. Juliana, SKM	Peneliti
22	Uji Daya Bunuh Ekstrak Daun Oleander (<i>Nerium Oleander Mill</i>) terhadap Nyamuk <i>Aedes Aegypti</i> dan <i>Culex Quingefasqiatus</i>	Balai Litbang Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang	Kesehatan Lingkungan	Rina Isnawati, S.Si	Ketua Pelaksana
				Murni, S.Si	Peneliti
				Nelfita	Teknisi
23	Analisis Determinan dan Gambaran Spasial Kejadian Malaria di Wilayah Kerja Puskesmas Bambiloka Kabupaten Mamuju Utara Provinsi Sulawesi Barat	Balai Litbang Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Donggala	Kesehatan Lingkungan	Riri Arifah Patuba, SKM	Ketua Pelaksana
				Sitti Chadijah, SKM, M.Si	Peneliti
				Ni Nyoman Veridiana, SKM	Peneliti
				Malonda Maksud	Teknisi
24	Program Pengendalian Malaria di Desa Tebat Gabus Kecamatan Kisam Tinggi Kab. OKU Selatan: Penilaian Kebutuhan dari Perspektif Penyelenggara Kesehatan dan Masyarakat	Loka Litbang P2B2 Baturaja	Penyakit Menular	Maya Arisanti, SKM	Ketua Pelaksana
				Hotnisa Sitorus, M.Sc	Peneliti
				Tri Wurisastuti, S.Stat	Peneliti
				Tien Febriyati	Teknisi
25	Penentuan Vektor Filariasis dan identifikasi Spesies <i>Filaria</i> yang Terdapat pada Wilayah Kerja PKM Batumarta VIII Kabupaten Oku Timur	Loka Litbang P2B2 Baturaja	Kesehatan Lingkungan	R. Irpan Pahlepi, SKM	Ketua Pelaksana
				Santoso, MSc	Peneliti
				Deriyansyah Eka Putra, SKM	Peneliti
				Emawati, Amkl	Teknisi

No	Judul penelitian	Satuan Kerja	Panel	Tim Pelaksana	Jabatan Tim
28	Penentuan Daerah Rawan DBD dengan Pemetaan Berbasis Pengindraan Jauh dan Sistem Informasi Geografi di Kota Banjar	Loka Litbang P2B2 Ciamis	Kesehatan Lingkungan	Yuneu Yuliasih, SKM	Ketua Pelaksana
				Andri Ruliansyah, SKM, M.Sc	Peneliti
				Setiazy Hasbullah, S.Si	Peneliti
27	Gambaran Kondisi Lingkungan Fisik, Biologi dan Sosial di Daerah Endemis DBD Kota Banjar Menurut Strata Endemisitas	Loka Litbang P2B2 Ciamis	Kesehatan Lingkungan	Arda Dinata, SKM	Ketua Pelaksana
				Mara Ipa, SKM, MSc	Peneliti
				Panji Wibawa Dhewantara, S.Si	Peneliti
				Nurul Hidayati Kusumastuti, SKM	Teknisi
28	Identifikasi Vektor Utama Demam Berdarah Dengue dan Sebaran Virus Dengue di Kabupaten Banjarnegara	Balai Litbang P2B2 Banjarnegara	Kesehatan Lingkungan	Nova Pramestuti, SKM	Ketua Pelaksana
				Rr. Anggun Paramita Djati, MPH	Peneliti
				Jarohman Raharjo, SKM	Peneliti
				Ulfah Farida T, Amd	Teknisi
29	Identifikasi Parasit (cacing) di Berbagai Habitat di Kabupaten Banjarnegara	Balai Litbang P2B2 Banjarnegara	Penyakit Menular	Dwi Priyanto, S.Si	Ketua Pelaksana
				Rahmawati, S.Si	Peneliti
				Dewi Puspita Ningsih, SKM	Peneliti
				Endang Setiyani	Teknisi
30	Perilaku <i>Anopheles spp</i> dan Upaya Proteksi Ibu Hamil terhadap Kejadian Malaria di Kabupaten Sumba Barat Daya	Loka Litbang P2B2 Waikabubak	Kesehatan Lingkungan	Majematang Mading SKM	Ketua Pelaksana
				Hanani M. Laumatay, SKM	Peneliti
				Mefi S. Tallan, SKM	Peneliti
				Agus Fatma Wijaya	Teknisi
31	Studi Endemitas Filariasis dan Pemetaan Menggunakan Metode GIS (<i>Geographic Information System</i>) di Kecamatan Umbu Ratu Nggay Barat, Kabupaten Sumba Tengah	Loka Litbang P2B2 Waikabubak	Kesehatan Lingkungan	drh. Rais Yunarko	Ketua Pelaksana
				Yona Patanduk, SKM	Peneliti
				Fajar Sakti P., S.Si	Peneliti
				Yustinus Desato, Amd. Kep	Teknisi

No	Judul penelitian	Satuan Kerja	Panel	Tim Pelaksana	Jabatan Tim
32	Probabilitas Hipertensi pada Penduduk Miskin di Kecamatan Ulee Kareng Kota Banda Aceh	Loka Litbang Biomedis Aceh	Penyakit Tidak Menular	dr. Eka Fitria	Ketua Pelaksana
				drh. Bayakmiko Yunsa	Peneliti
				Marya Ulfa, S.Si	Peneliti
				Sari Hanum, Amd.AK	Teknisi
33	Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Penularan Kontak Serumah TB Paru di Wilayah Kerja Puskesmas Darul Imarah, Kabupaten Aceh Besar Tahun 2012	Loka Litbang Biomedis Aceh	Penyakit Menular	dr. Nelly Marissa	Ketua Pelaksana
				Abidah Nur, S.Gz	Peneliti
				Ira, S.Si	Peneliti
				Andi Zulhaida, Amd.Ak	Teknisi

DITETAPKAN DI : JAKARTA
PADA TANGGAL : 12 JANUARI 2012



KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil 'Alamin, segala puji penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu wa Ta'alanatas segala rabmat, kemudahan dan kesempatan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul "*Uji Kualitas Metode Ekstraksi DNA M. tuberculosis Menggunakan Teknik Guanidine Thiosianat Termodifikasi*" dengan segala keterbatasan yang ada pada diri penulis.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si,Apt. selaku Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian Pengembangan kementerian Kesehatan atas segala dukungan, kesempatan dan kepercayaan yang diberikan kepada Penulis untuk melakukan penelitian ini.

Ucapan terimakasih juga Penulis sampaikan kepada Dr. Vivi Lisdawati, Msi, Apt selaku Kepala bidang Teknologi Dasar Kesehatan, sebagai pencetus ide penelitian ini, Dr.drg.Magdarina D Agtini selaku ketua PPI yang memberi masukan dan saran. Kambang Sariaji, M.Biomed selaku Koordinator Laboratorium Bakteriologi dan Dra. Ani Isnawati, M.Kes, Apt selaku Koordinator Laboratorium Farnasi di Pusat Biomedis dan teknologi Dasar Kesehatan Jakarta beserta Staf yang telah memberi waktu, kesempatan kepada tim kami untuk menyelesaikan penelitian ini.

Ucapan terima kasih yang tulus juga Penulis sampaikan kepada Rekan-rekan Peneliti atas masukan dan kritikan selama penelitian, persahabatan dan dukungannya. Akhirnya, teristimewa istri penulis, Sintawati, S.Pd. yang terkasih dan tersayang yang senantiasa setia mendoakan, memberikan dukungan moril, semangat, perhatian serta selalu hersedia berbagi suka dan duka sehigga Penulis dapat menyelesaikan penelitian ini ini.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa Laporan ini masib jaub dari sempurna dan masih banyak kekurangan. Oleh karena itu sumbang saran yang bersifat membangun sangat diharapkan untuk menyempurnakan isi tesis ini. Harapan penulis kiranya laporan penelitian ini berguna dan memberikan manfaat bagi kita semua.

RINGKASAN PENELITIAN

Tantangan dalam melakukan deteksi infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) pada pasien suspek Tuberkulosis paru (TB) di Indonesia membutuhkan solusi yang tepat, cepat dan sederhana. Program penanggulangan TB di Indonesia masih menggunakan diagnostik konvensional dengan pemeriksaan uji mikroskopis dan biakan kultur. Untuk mendapatkan hasil pemeriksaan Basilus Tahan Asam (BTA) *Mtb* secara mikroskopis dibutuhkan jumlah bakteri *Mtb* minimal 10.000 BTA per ml dahak. Selain itu, uji mikroskopis juga membutuhkan tenaga laboratorium yang terlatih untuk mendapatkan hasil uji yang berkualitas. Uji konvensional lain menggunakan kultur bakteri *Mtb* pada media sediaan yang sesuai memiliki sensitifitas yang lebih tinggi dibanding uji mikroskopis. Namun dibutuhkan waktu pertumbuhan bakteri yang lebih lama (2-4 minggu). Berdasarkan hal ini maka pengembangan teknik deteksi secara molekuler untuk identifikasi bakteri *Mtb* merupakan salah satu langkah alternatif.

Deteksi molekuler untuk *deoxyribo nucleid acid* (DNA) *M.tuberculosis* dapat menggunakan teknik *nucleid acid amplification test* (NAAT) antara lain *Polymerase chain reaction* (PCR) konvensional dan metode *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP).

Salah satu tahap penting dalam teknik deteksi molekuler TB adalah tahap isolasi DNA bakteri *M. tuberculosis* dari sampel klinis (dahak) pasien TB. Penggunaan reagen dan metode ekstraksi yang sesuai dapat menjadi alternatif mempermudah isolasi DNA *M. tuberculosis* dari dahak. Penelitian bertujuan untuk memodifikasi metode isolasi DNA dan formula reagen ekstraksi menggunakan senyawa guanidin tiosianat dan chelex serta uji stabilitas serta reliabilitas reagen termodifikasi.

Metode ekstraksi DNA yang dimodifikasi adalah a). Metode Guanidine thiosianat tanpa menggunakan sentrifugasi serta modifikasi formula dengan menambahkan proteinase K dan β -mercaptoetanol yang bertujuan untuk mempercepat lisis sel dan pemurnian DNA hasil ekstraksi, dan b) Menggunakan pemanasan dengan Chelex 10%. Sampel adalah kultur *M.tuberculosis* H37Rv yang merupakan koleksi Bahan Biologis Tersimpan (BBT) dari laboratorium Bakteriologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (BTDK). Observasi stabilitas dan reliabilitas reagen dilakukan dengan menyimpan reagen ekstraksi pada suhu dan cahaya yang bervariasi selama 8 pekan. Modifikasi metode ekstraksi DNA

Mtb ini akan mendukung *grand design* penelitian TB di Pusat BTDK, Badan Litbang Kesehatan

Hasil menunjukkan bahwa ekstraksi dengan metode guanidin tiosianat baik dengan sentrifugasi maupun pemanasan dengan chelex 10% memberikan konsentrasi DNA lebih tinggi dibandingkan dengan reagen kit komersial. Namun hasil amplifikasi DNA dengan PCR pada metode ekstraksi menggunakan guanidin tiosianat dengan modifikasi penambahan proteinase K dan 2-mercaptoethanol perlu dilakukan optimasi lebih lanjut, mencakup suhu dan siklus amplifikasi, karena pita DNA yang dihasilkan sangat tipis. Penggunaan pemanasan dengan Chelex 10% untuk ekstraksi DNA Mtb menghasilkan konsentrasi DNA \pm 5-6 kali lipat dibanding menggunakan kit komersial dan pita DNA hasil elektroforesis dapat terlihat dengan baik.

Berdasarkan hasil tersebut di atas, perlu pengembangan lebih lanjut untuk mengetahui sensitifitas dan spesifisitas penggunaan Chelex 10% serta optimasi metode kerja untuk reagen guanidin tiosianat termodifikasi dalam proses ekstraksi DNA *M.tuberculosis*.

ABSTRAK

Ekstraksi *Deoxyribon Nucleid Acid* (DNA) merupakan tahap pertama dan menentukan dalam metode deteksi molekular *M.tuberculosis* menggunakan teknik *Nucleid Acid Amplification Test* (NAAT). Penelitian yang dilakukan bertujuan membandingkan hasil ekstraksi DNA dengan menggunakan metode guanidin tiosianat dalam kit komersial dibandingkan dengan metode guanidin tiosianat termodifikasi serta metode ekstraksi menggunakan pemanasan dengan Chelex 10%. Sampel berupa 3 kultur *Mtb* H37Rv, koleksi Laboratorium Bakteriologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan dalam media Loweinstein Jensen (LJ) yang dilarutkan dalam NaCl, yang kemudian diekstraksi dengan menggunakan 3 metode ekstraksi. Konsentrasi DNA *Mtb* H37Rv hasil ekstraksi diukur menggunakan Nano Drop dan amplifikasi dilanjutkan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional serta sistem deteksi dilakukan secara elektroforesis. Hasil ekstraksi menggunakan metode guanidin tiosianat tanpa modifikasi dan dengan modifikasi langkah kerja serta pemanasan dengan chelex 10% menghasilkan konsentrasi DNA *Mtb* yang lebih tinggi dibandingkan dengan kit komersial. Ekstraksi DNA dengan guanidin tiosianat yang dimodifikasi dengan penambahan proteinase K dan 2-mercaptoethanol tidak menunjukkan hasil yang lebih baik dibanding dengan metode lain. Waktu ekstraksi dengan teknik pemanasan dengan Chelex 10% lebih cepat dibanding dengan metode guanidin tiosianat maupun pada kit komersial. Hasil ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi DNA dengan metode guanidin tiosianat tanpa modifikasi dan pemanasan dengan Chelex 10% berpotensi untuk digunakan lebih lanjut dan dimanfaatkan pada fasilitas laboratorium sederhana.

DAFTAR ISI

	Hal
1. Pendahuluan	1
2. Tinjauan Pustaka	2
3. Tujuan dan Manfaat Penelitian	3
4. Metode Penelitian	5
5. Hasil	12
6. Pembahasan	14
7. Kesimpulan dan Saran	17
8. Ucapan Terima Kasih	18
9. Daftar Kepustakaan	19
Lampiran	21

DAFTAR TABEL

Tabel 1 : Instrumen pengumpulan data	Hal 8
Tabel 2 : Konsentrasi DNA (ng/ul) Hasil Ekstraksi DNA dengan menggunakan kit dan formula guanidin tiosianat	12
Tabel 3 : Konsentrasi DNA (ng/ul) Hasil Ekstraksi DNA dengan menggunakan formula Chelex	12
Tabel 4: Hasil ekstraksi DNA <i>Mycobacterium tuberculosis</i> menggunakan formula dibanding dengan kit. Analisis menggunakan Anova dengan posthoc test Tukey HSD	14

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1 : Kerangka Konsep Penelitian	5
Gambar 2 : Alur Kerja	6
Gambar 3 : Hasil elektroforesis ampikon yang diekstraksi dengan menggunakan kit (Kit 1,2 dan 3) dan formula modifikasi chelex (C4, C6-1, C6-3, C7, C8-2 dan C9) serta Guanidin tiosianat (tanpa modifikasi: C1; modifikasi metode: D3; modifikasi formula : E2 dan F2)	13

1. PENDAHULUAN

Tantangan dalam melakukan deteksi infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) pada pasien suspek Tuberkulosis paru (TB) di Indonesia membutuhkan solusi yang tepat, cepat dan sederhana. Program penanggulangan TB di Indonesia masih menggunakan diagnostik konvensional dengan pemeriksaan uji mikroskopis dan biakan kultur. Untuk mendapatkan hasil pemeriksaan Basilus Tahan Asam (BTA) *Mtb* secara mikroskopis dibutuhkan jumlah bakteri minimal 10.000 BTA per ml dahak. Selain itu, uji mikroskopis juga membutuhkan tenaga laboratorium yang terlatih untuk mendapatkan hasil uji yang berkualitas. Uji konvensional menggunakan kultur bakteri pada media sediaan yang sesuai memiliki sensitifitas yang lebih tinggi dibanding uji mikroskopis. Namun dibutuhkan waktu pertumbuhan bakteri yang lebih lama (2-4 minggu)^{1,2,3,4}. Berdasarkan hal ini maka pengembangan teknik deteksi secara molekuler untuk identifikasi bakteri *Mtb* merupakan salah satu langkah alternatif.

Deteksi molekuler untuk mengidentifikasi *deoxyribo nucleid acid* (DNA) dari *Mtb* dapat menggunakan teknik *nucleid acid amplification test* (NAAT), antara lain secara *Polymerase chain reaction* (PCR) konvensional dan metode *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP).

Salah satu tahap penting dalam teknik deteksi molekuler TB adalah tahap isolasi DNA bakteri *Mtb* dari sampel dahak pasien TB. Reagen ekstraksi komersil yang ada saat ini menggunakan senyawa guanidin tiosianat dalam komposisinya dengan harga yang tinggi karena masih diimpor dari luar Indonesia. Metode ekstraksi lain adalah dengan pemanfaatan senyawa Chelex yang sering digunakan dalam ekstraksi DNA untuk keperluan forensik⁵. Penggunaan metode guanidin tiosianat dan Chelex termodifikasi menjadi alternatif yang mudah, murah dan cepat untuk mengisolasi DNA *Mtb* dari sampel dahak pasien TB di Indonesia.

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas maka dilakukan penelitian dengan judul: “ Uji Kualitas Metode Ekstraksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* Menggunakan Teknik Guanidine Thiosianat dan Chelex Termodifikasi “.

2. TINJAUAN PUSTAKA

Penyakit tuberkulosis disebabkan oleh bakteri *Mtb* yang penularannya melalui percikan dahak penderita tuberkulosis di udara. Indonesia menempati peringkat ke-4 terbanyak penderita tuberkulosis setelah India, Cina dan Afrika Selatan. Setiap tahunnya di dunia terdapat sekitar 8 juta penderita tuberkulosis paru dan sekitar 3 juta orang diantaranya meninggal akibat penyakit ini. Menurut WHO, pada tahun 2000 di kawasan Asia Tenggara diduga terdapat lebih dari 3.8 juta penderita tuberkulosis baru dan terjadi lebih dari 1.3 juta kematian yang akibat tuberkulosis⁶.

Laboratorium berperan penting dalam mengidentifikasi kasus tuberkulosis. Kecepatan dan keakuratan hasil uji diagnostik *Mtb* akan membantu klinisi membuat keputusan dalam pemilihan terapi obat dan membantu untuk mencegah penyebaran tuberkulosis. Diagnosis Tuberculosis mencakup didalamnya tes tuberkulin (tes Mantoux), radiografi dada dan uji bakteriologi. Uji bakteriologi yang dilakukan secara konvensional mencakup observasi mikroskopik dengan basilus tahan asam (BTA) dan kultur bakteri dari sampel sputum yang telah digunakan beberapa dekade¹.

Uji mikroskopis dengan menggunakan Basilus tahan asam (BTA) *Mtb* merupakan uji konvensional yang murah, sederhana namun memiliki kekurangan dalam sensitivitas dan spesifitasnya². Metode proporsi menggunakan media Lowenstein Jensen (LJ) merupakan metode baku emas pemeriksaan tuberkulosis yang membutuhkan waktu inkubasi yang lama, yaitu 28-40 hari³. Sedangkan pada penggunaan media cair seperti BACTEC MGIT 960 membutuhkan waktu inkubasi sekitar 15 hari, tetapi biaya lebih tinggi. Pada metode kultur, dibutuhkan waktu hingga 1-3 pekan untuk tumbuh secara optimal dan dapat diamati dengan baik⁷. Waktu penumbuhan kultur bakteri yang lama menyebabkan metode ini tidak dapat digunakan sebagai alat deteksi cepat TB.

Uji diagnostik infeksi *Mtb* secara molekular dapat dijadikan alternatif untuk mengatasi keterbatasan metode diagnostik TB yang sudah ada. Beberapa teknik deteksi molekular dari *Mtb* yang sudah dipasarkan antara lain AMTD (Gen-Probe Inc) yang mengamplifikasi rRNA *Mtb*, Amplicor dan Cobas amplicor (Roche) dengan PCR 16S rRNA, BD-ProbeTec (Beckton Dickinson) dengan amplifikasi sekuen insersi (IS6110) dan *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP, Eiken) dengan amplifikasi *isothermal*⁸.

Kelebihan dari teknik molekular dalam deteksi TB adalah penatalaksanaannya yang cepat, membutuhkan waktu 3-6 jam dan akurasi hingga 92%^{8,9}. Selain itu, hasil deteksi molekular TB dapat diamati secara langsung dengan hasil yang konsisten untuk

sampel dalam jumlah besar. Pengembangan metode LAMP telah pula dikembangkan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes¹⁰.

Salah satu tahap penting dalam teknik deteksi molekular TB adalah tahap isolasi DNA bakteri *Mtb* dari spesimen klinis pasien (dahak atau urin). Untuk mengaplikasikan teknik deteksi molekular dari *Mtb* di lapangan, maka perlu dikembangkan teknik yang sederhana untuk melakukan isolasi DNA secara ekstraksi dari sampel pasien TB yang diambil. Berbagai teknik ekstraksi DNA dengan menggunakan kit ekstraksi komersial dihadapkan pada kendala biaya. Pengembangan Teknik ekstraksi DNA *Mtb* yang sederhana dan ekonomis dapat dikembangkan untuk menjadi alternatif teknik deteksi yang cepat, efektif dan efisien untuk deteksi dini infeksi *Mtb* di Indonesia.

Dasar dari kit komersial untuk isolasi DNA antara lain adalah dengan menggunakan denaturan guanidin tiosianat. Penggunaan Guanidine isotiosianat untuk menghilangkan inhibitor PCR (KCl, NaCl, polisakarida, sisa EDTA, SDS dan etanol) dari sample klinis pasien TB juga pernah dilakukan sebelumnya³. Guanidin tiosianat merupakan denaturator protein yang mampu melisiskan sel dan dapat digunakan dalam ekstraksi DNA dan menginaktifkan enzim RNase dan DNase. Penggunaan proteinase K dalam buffer guanidine untuk mengisolasi DNA menghasilkan produk isolat DNA dengan kemurnian tinggi⁹.

Metode lain adalah penggunaan Chelex yang merupakan agen pelisis mengandung resin yang mampu menginaktivasi inhibitor pada teknik PCR¹¹, dan juga teknik deteksi yang berbasis amplifikasi lain. Dalam ekstraksi DNA, chelex berperan dengan mengikat ion dari berbagai protein dan inhibitor berbasis pergantian ion (*ion exchange*) yang dalam proses PCR akan menghambat kerja enzim pengamplifikasi, seperti *taq polimerase* pada PCR.

3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. TUJUAN UMUM

Memperoleh kandidat reagen diagnostik molekular termodifikasi untuk deteksi cepat kasus TB di Indonesia yang dikembangkan secara mandiri.

3.2. TUJUAN KHUSUS

1. Mendapatkan metode dan formula ekstraksi DNA *M.tuberculosis* termodifikasi yang mudah, efisien dan akurat .
2. Memperoleh data awal stabilitas dan reliabilitas dari metode dan formula reagen ekstraksi DNA *M.tuberculosis* termodifikasi.

3.3. MANFAAT PENELITIAN

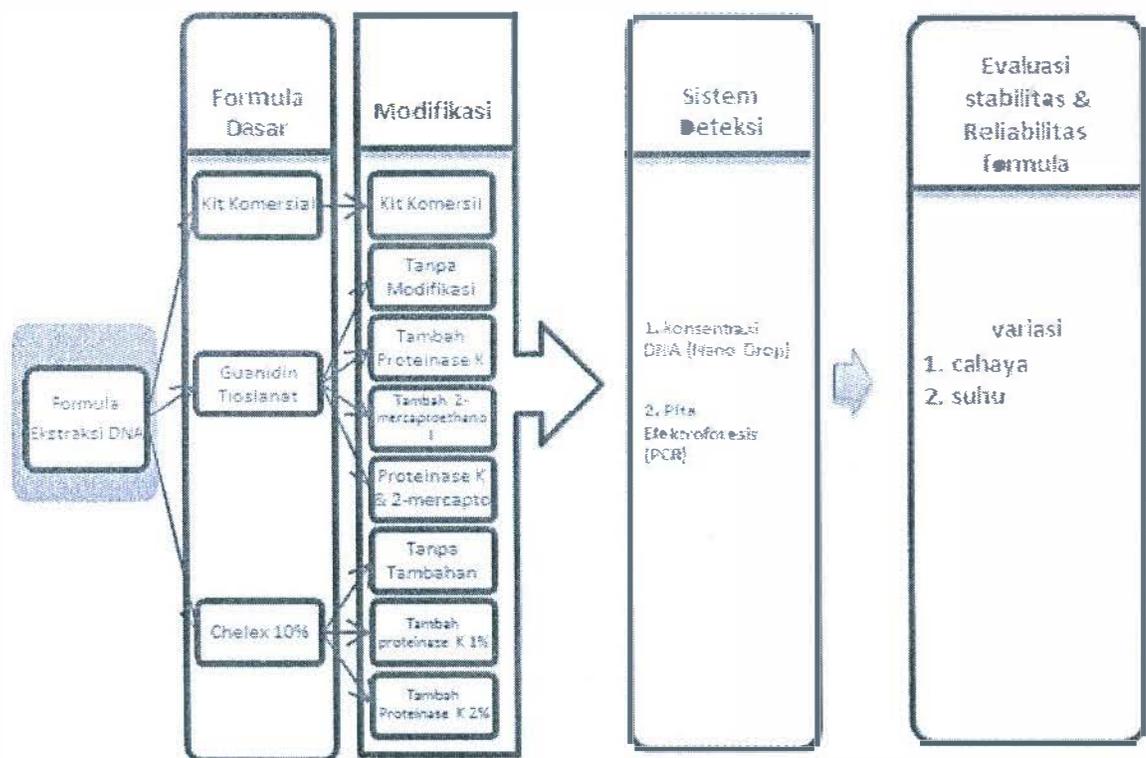
Manfaat dari penelitian ini adalah:

Upaya mendukung *grand design* penelitian TB di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan sebagai langkah awal kemandirian bangsa di bidang diagnostik molekular kasus TB.

4. METODE PENELITIAN

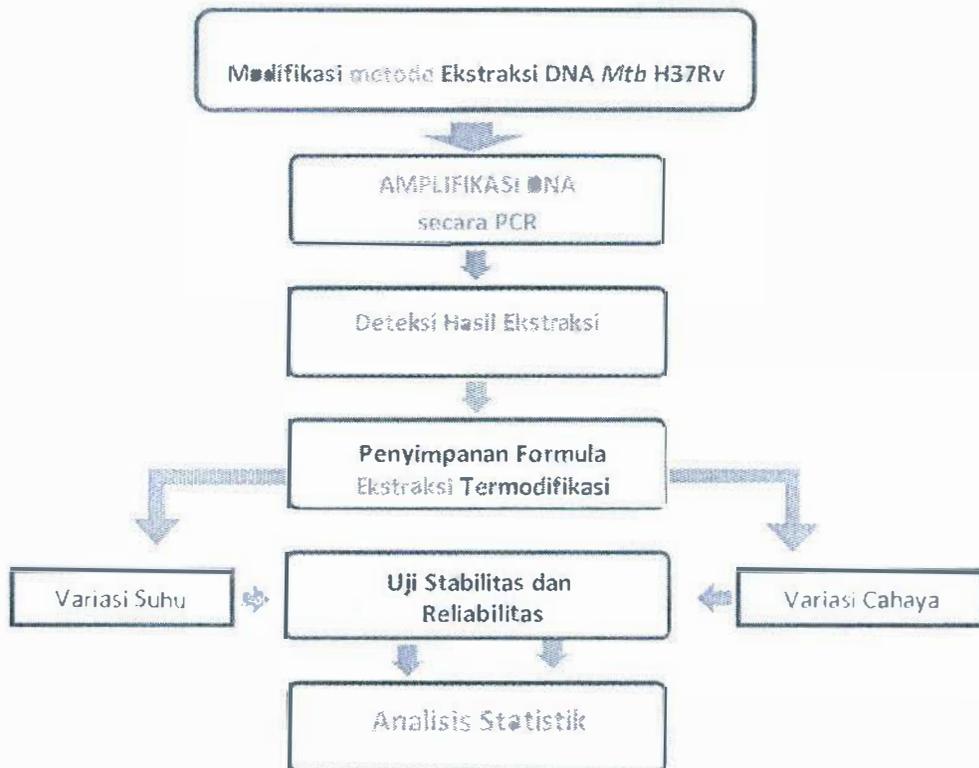
4.1. KERANGKA KONSEP

Dalam ekstraksi DNA terdapat tahapan yang dapat digolongkan sebagai faktor utama dan faktor tambahan. Pembagian ini mengacu kepada metode ekstraksi DNA yang pertama kali dijelaskan oleh Boom¹⁴ yang menjadi rujukan dalam berbagai metode ekstraksi DNA. Faktor tambahan dikembangkan oleh Chakravorty² dan Hossain⁹.



Gambar 1: Kerangka Konsep Penelitian

4.2. ALUR KERJA



Gambar 2. Alur Kerja

4.3. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Laboratorium Farmasi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan - Balitbang Kemenkes RI selama 8 bulan (Mei-Desember)

4.4. DESAIN PENELITIAN

Desain penelitian ini quasi eksperimental dengan dengan pendekatan percobaan menggunakan rancangan acak kelompok lengkap (RAKL)

4.5. JENIS PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium

4.6. SAMPEL

Sampel adalah kultur *Mtb* H37Rv dalam medium Loweinstein-Jensen koleksi Laboratorium Bakteriologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes

Perhitungan besar sampel untuk uji stabilitas terhadap suhu dan cahaya diambil dengan menggunakan perhitungan Federer sebagai berikut.

$$(t-1)(n-1) \geq 15, \text{ dengan :}$$

T = perlakuan

N = jumlah sampel

Jumlah perlakuan terdiri dari reagen termodifikasi dan tanpa modifikasi dengan masing-masing diperlakukan dengan penyimpanan terhadap suhu (ruang dan referigator) dan cahaya (dengan dan tanpa cahaya). Berdasarkan rumus federer didapat jumlah pengulangan untuk masing-masing perlakuan adalah 3. Sehingga total sampel untuk seluruh penelitian adalah 32.

4.7. VARIABEL

Variabel independen dari penelitian ini adalah sampel yang digunakan dalam ekstraksi. Variabel dependen dari penelitian ini adalah formula ekstraksi yang dimodifikasi, suhu serta pencahayaan yang diberlakukan terhadap formula yang dibuat.

4.8. INSTRUMEN PENELITIAN DAN PENGUMPULAN DATA

Pengumpulan data untuk identifikasi stabilitas dan reliabilitas dilakukan dengan menggunakan instrumen pengumpulan data seperti ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1: Instrumen pengumpulan data uji stabilitas dan reliabilitas

Reagen		Penyimpanan	Pekan			
			1	2	4	8
Tanpa modifikasi	Suhu	refrigator				
		Ruang				
	Cahaya	Dengan cahaya				
		Tanpa cahaya				
Dengan modifikasi	Suhu	Refrigator				
		Ruang				
	cahaya	Dengan cahaya				
		Tanpa cahaya				

4.9. PENGUMPULAN DATA

Pengumpulan data uji stabilitas dan reliabilitas dilakukan terhadap hasil ekstraksi DNA kultur *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv menggunakan reagen dan buffer termodifikasi yang sudah disiapkan sesuai waktu pengambilan bahan, yaitu: Pada pekan ke-1, 2, 4, 8 setelah penyiapan reagen. Penyiapan reagen disimpan dalam 2 variabel, yaitu: Penyimpanan pada suhu ruang dibandingkan suhu referigrator dan penyimpanan pada cahaya ruang dan tanpa cahaya. Tiap ekstraksi DNA dari masing-masing variable dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

4.10. BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilakukan di laboratorium Bakteriologi dengan fasilitas *Biosafety Laboratory Level 2 (BSL) -2* menggunakan *Biosafety Cabinet (BSC)* dan alat pelindung diri (APD) setingkat penanganan agen resiko 3 untuk ekstraksi DNA dari kultur *Mycobacterium tuberculosis*. Pembuatan dan penyimpanan formula dilakukan di laboratorium farmasi.

4.10.1. BAHAN KIMIA/REAGEN

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| 1. NaOH | 9. Larutan EDTA |
| 2. HCl | 10. Triton-X |
| 3. Na-sitrat | 11. Diatom |
| 4. N-asetil L-sistein | 12. Etanol absolut |
| 5. Akuades/akuabides | 13. Diatom, Celite |
| 6. Larutan TE | 14. Kit ekstraksi DNA |
| 7. Guanidine tiosianat | 15. Proteinase K |
| 8. Tris-HCL | 16. B-mercaptoetanol |

4.10.2. PERALATAN DAN BAHAN HABIS PAKAI

Bahan habis pakai yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tube nuklease free
2. glove
3. Tissue bebas serat
4. Pipet tip 10 ul
5. Pipet tip 20 ul
6. Pipet tip 100 ul
7. Pipet tip 200 ul
8. Pipet tip 1000 ul
9. Masker
10. Alkohol 70%
11. Botol penyimpan reagen 150 ml

4.10.3. CARA KERJA

4.10.3.1. PEMBUATAN BUFFER

Bufèr lisis dibuat dengan melarutkan 120 g guanidin tiosianat (Fluka chemie AG, buchs, switzerland) ke dalam 100 ml 0,1 M tris-HCl pH 6,4 (boehringer GmbH, Mannheim, Germany). Kemudian ditambahkan 22 ml 0,2 M larutan EDTA (Titirplex, Merck, Germany) diatur dengan NaOH hingga pH 8 dan ditambahkan 2,6 g triton X-100 (Packard Instrument CO.Inc, Downers Grove, Ill) lalu dihomogenasikan.

Buffer pencuci dibuat dengan melarutkan 120 g guanidine tiosianat ke dalam 100 ml 0,1 M Tris-HCl pH 6,4. Pelarutan guanidine dibantu dengan pemanasan menggunakan waterbath pada suhu 60^o- 65^oC dengan pengocokan secara terus-menerus.

Buffer TE dibuat dengan melarutkan 10mM Tris-HCl dengan 1 mM EDTA (pH 8) di dalam autoklaf (20 menit pada suhu 121^oC). larutan ini merupakan larutan stok 100 X.

Suspensi diatom dibuat dengan menambahkan 50 ml H₂O dan 500 ul, 32% (wt/vol) HCl ke dalam 10 g Analytical grade high purity Celite (Janssen Chimica, Beerse, Belgium). Larutan disimpan dalam botol yang ditutup rapat dan diautoklaf.

4.10.3.2. EKSTRAKSI DNA

- a. 500 ul kultur dicampur dengan larutan pelisis (NaOH, Na-sitrat dan N-asetil L-sistein) dengan konsentrasi 1:1 dalam tabung mikrosentrifus steril dan dikocok dengan rotary shaker selama 20 menit pada 420 rpm.
- b. Kemudian dilakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Pelet kemudian dicuci dengan akuades steril dua kali
- c. Selanjutnya ditambahkan larutan TE dan larutan pelisis (guanidin tiosianat, tris-HCL, EDTA dan trinton X) dan 20 ul diatom. Kemudian dikocok kembali selama 10 menit dengan kecepatan 100 rpm lalu disentrifus selama 2 menit.
- d. Pelet kemudian dicuci dengan buffer dan etanol 70% dingin masing-masing dua kali, lalu dikeringkan pada 56^oC.
- e. Pada pelet kering kemudian ditambahkan larutan TE dan diinkubasi pada 56^oC selama 10 menit.
- f. Setelah disentrifus dilakukan pengukuran konsentrasi dan kualitas DNA dengan menggunakan spektrofotometri.

4.10.3.3. ELEKTROFORESIS GEL

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan agarose 0,5% dan menggunakan etidium bromide (1 ug/ml) dalam buffer (40mM Tris-20mM sodium asetat-2 mM sodium

EDTA dengan pH 7,7 asam asetat, etidium bromide ditambahkan sebanyak 1 ug/ml tiap buffer). Untuk melihat hasil elektroforesis digunakan UV transluminator

4.10.3.4. ANALISIS DATA

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan analisis deskriptif bivariat dengan uji ANOVA terhadap kualitas dan kemurnian DNA untuk variable cahaya dan suhu terhadap waktu untuk tiap reagen

4.11. PERTIMBANGAN ETIK PENELITIAN

Pertimbangan Etik penelitian diajukan kepada komisi Etik Penelitian Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Kementerian Kesehatan RI

5. HASIL

Formula ekstraksi DNA yang berhasil dibuat dalam penelitian ini berjumlah 2 formula dengan masing-masing formula dimodifikasi lebih lanjut. Formula pertama yang dibuat mengacu kepada formula yang dibuat oleh Boom et al tahun 1991 yang berbasis pada Guanidin Tiosianat. Modifikasi pertama yang dilakukan terhadap formula Guanidin Tiosianat adalah dengan merubah tahapan ekstraksi yang dilakukan (lampiran) dengan tidak menggunakan sentrifugasi. Modifikasi kedua yang berbasis guanidin tiosianat adalah dengan penambahan proteinase K, dan penambahan proteinase K dan 2-mercaptoethanol secara bersamaan. Tahapan ekstraksi yang dilakukan dengan menggunakan teknik guanidin tiosianat adalah sebagaimana dijelaskan dalam metode.

Tabel 2: Konsentrasi DNA (ng/ul) Hasil Ekstraksi DNA dengan menggunakan kit dan formula guanidin tiosianat

Metode ekstraksi	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rerata
Kit komersil	9,1	12,9	5,6	9,2
Guanidin Tiosianat	29,55	27,85	42,4	33,2
Guanidin Tiosianat Modifikasi metode	46,2	38,4	40,5	41,7
Guanidin Tiosianat + Proteinase K	42,9	53,3		48,1
Guanidin Tiosianat + Proteinase K + 2-mercaptoethanol	41,9	40,8		41,4

Formula ekstraksi DNA yang kedua dalam penelitian ini berbasis pada agen pelisis Chelex. Penggunaan Chelex untuk ekstraksi DNA sebelumnya pernah dilakukan oleh Walsh et al (1991) untuk ekstraksi forensik. Dalam penelitian ini, konsentrasi chelex yang digunakan adalah 10%. Selanjutnya dilakukan variasi penggunaan Proteinase K dalam larutan chelex 10% sejumlah konsentrasi 0,1% dan 0,2% metode ekstraksi DNA dengan menggunakan Chelex dilakukan dengan pemanasan menggunakan PCR pada suhu 99°C

Tabel 3 : Konsentrasi DNA (ng/ul) Hasil Ekstraksi DNA dengan menggunakan formula Chelex

Metode ekstraksi	1	2	Rerata
Chelex 10%	58,3	24,5	41,4
Chelex 10% + proteinase K 0,1%	47,1	22,5	34,8
Chelex 10% + proteinase K 0,2%	111,7	10,7	61,2

Hasil elektroforesis sebagaimana ditunjukkan pada gambar 3 menjelaskan bahwa ekstraksi DNA dengan menggunakan Chelex maupun kit dapat diamplifikasi dengan baik menggunakan teknik PCR. Primer yang digunakan mengamplifikasi DNA sepanjang ± 360 pb sebagaimana juga ditunjukkan oleh marker. Hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan metode ekstraksi Chelex lebih tebal dibandingkan dengan kit. Ekstraksi dengan menggunakan guanidin tiosianat¹⁴ tanpa modifikasi dan dengan modifikasi cara kerja menunjukkan hasil yang cukup baik dibandingkan dengan formula yang dimodifikasi menggunakan proteinase K dan 2-mercaptoethanol.



Gambar 3. Hasil elektroforesis ampikon yang diekstraksi dengan menggunakan kit (Kit 1,2 dan 3) dan formula modifikasi chelex (C4, C6-1, C6-3, C7, C8-2 dan C9) serta Guanidin tiosianat (tanpa modifikasi: C1; modifikasi metode: D3; modifikasi penambahan proteinase K : E2 dan proteinase K serta 2-mercaptoethanol F2)

6. PEMBAHASAN

Perkembangan dalam teknik molekular untuk mendeteksi berbagai patogen telah dikembangkan semenjak teknik amplifikasi DNA ditemukan. Pemanfaatan teknik deteksi molekular pada infeksi *Mtb* pertama kali dikembangkan dengan menggunakan teknik amplifikasi⁹. Penggunaan kit komersil untuk ekstraksi DNA dalam deteksi molekular *M.tuberculosis* telah banyak dilakukan sebelumnya dalam deteksi molekular *Mycobacterium tuberculosis*.

Berbagai teknik yang sudah dikembangkan untuk deteksi molekular^{2, 12, 13} menunjukkan bahwa ada alternatif lain dalam ekstraksi maupun deteksi *Mycobacterium tuberculosis* secara molekular. Penggunaan agen pelisis guanidin tiosianat terbukti efektif untuk ekstraksi DNA dari sampel *Mycobacterium tuberculosis* baik dari sputum maupun kultur². **Modifikasi lain ada peuggunaan senyawa Chelex.**

Penelitian ini memberikan alternatif teknik ekstraksi DNA dengan menggunakan teknik guanidin tiosianat **dan chelex** yang telah dikembangkan sebelumnya dan kemudian **dimodifikasi untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis***¹⁴. Pengembangan lebih lanjut dari formula guanidin tiosianat mengacu pada formula yang dibuat oleh Hossain⁹ maupun yang **dimodifikasi** pada penelitian ini tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dalam konsentrasi DNA yang berhasil diekstraksi, sebagaimana yang ditunjukkan oleh tabel 4. **Tetapi** jika dibandingkan dengan kit komersil, **maka formula** Guanidin tiosianat dan Chelex memberikan hasil konsentrasi DNA **yang** lebih baik.

Tabel 4: Hasil ekstraksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan formula dibanding dengan kit. Analisis menggunakan Anova dengan posthoc test Tukey HSD

Metode	Subset for alpha = 0.05	
	1	2
Kit Komersial	9.1667	
Guanidin Tiosianat (GT)	33.2667	33.2667
Chelex + Prot K 0,1%		34.8000
GT + PK + 2 mercapto		41.3667
Chelex		41.4000
GT Metode		41.7000
GT + Prot K		48.1000
Sig.	.060	.436

Hasil analisis dengan menggunakan ANOVA dengan *pos hoc test* Tukey digunakan untuk mengetahui perbandingan antara satu metode dengan metode yang lain. Kelompok yang tidak berbeda nyata dimasukkan dalam satu kolom. Dari tabel 4 diketahui bahwa konsentrasi DNA *Mtb* dari metode ekstraksi dengan menggunakan kit komersial dan guanidin tiosianat tidak berbeda secara nyata. Konsentrasi DNA *Mtb* hasil ekstraksi dengan menggunakan metode yang di modifikasi dari formula Guanidin tiosianat yang dikembangkan oleh Boom¹¹ dengan penambahan proteinase K, 2-mercaptoetanol, maupun ekstraksi menggunakan chelex dengan pemanasan pada suhu 99°C berbeda secara nyata jika dibandingkan dengan kit komersial.

Penggunaan Chelex untuk ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan teknik pemanasan. Formula yang dibuat dalam penelitian ini dengan menggunakan Chelex 10% menunjukkan hasil konsentrasi ekstrak DNA yang lebih tinggi dibandingkan dengan kit komersial maupun metode guanidin tiosianat tanpa modifikasi. Chelex 10% tanpa penambahan proteinase K menghasilkan konsentrasi DNA yang lebih tinggi dibandingkan Chelex 10% dengan penambahan proteinase K dengan konsentrasi 0,1% (walaupun tidak berbeda nyata secara statistik).

Proteinase K berperan sebagai enzim pelisis dan menghilangkan DNase dan RNase yang dapat merusak DNA. Namun dengan teknik pemanasan yang dilakukan, permasalahan yang berhubungan dengan protein, baik sebagai DNase dan RNase dapat dihilangkan. Sehingga Proteinase K tidak berperan dalam lisis sel dan Ekstraksi DNA.

Chelex merupakan agen pelisis yang mengandung resin yang mampu menginaktivasi inhibitor PCR¹⁰ dan juga teknik deteksi yang berbasis amplifikasi lain. Dalam ekstraksi DNA, chelex berperan dengan mengikat ion dari berbagai protein dan inhibitor berbasis pergantian ion (ion exchange) yang dalam proses PCR akan menghambat kerja enzim pengamplifikasi, seperti taq polimerase pada PCR.

Teknik ekstraksi DNA dengan pemanasan menggunakan PCR maupun *Heating block* tidak menunjukkan perbedaan nyata dalam konsentrasi DNA yang dihasilkan (data tidak ditunjukkan). Pada penelitian ini, waktu yang dibutuhkan untuk ekstraksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* dengan menggunakan pemanasan, sentrifugasi dengan guanidin tiosianat dan kit komersial berturut-turut 60, 90 dan 120 menit. Teknik pemanasan lebih cepat untuk ekstraksi DNA namun menghasilkan genom yang terfragmentasi, sebagaimana dijelaskan sebelumnya^{15,16}. Dalam penelitian ini, penggunaan Chelex dioptimalkan untuk mempersingkat waktu pemanasan dalam ekstraksi DNA. Dengan demikian ekstrak DNA

yang dihasilkan tidak terfragmentasi dan dapat digunakan lebih lanjut untuk deteksi molekular.

Hasil amplifikasi PCR dan elektroforesis sebagaimana ditunjukkan dalam gambar 3 memperlihatkan bahwa ekstraksi dengan menggunakan metode Boom¹⁴ (kode GT) lebih baik dibanding guanidin yang dimodifikasi dengan penambahan 2-mercaptoethanol (kode E2 dan F2). Metode Guanidin tiosianat dan ekstraksi dengan pemanasan menggunakan Chelex memberikan hasil amplifikasi PCR yang sama baik jika dibandingkan dengan kit **komersial**. Ekstraksi dengan menggunakan Chelex menunjukkan pita amplikon DNA yang lebih tebal dibandingkan jika menggunakan kit **komersial**. Ini menunjukkan bahwa DNA hasil ekstraksi yang menjadi *template* dari amplifikasi PCR memiliki konsentrasi lebih banyak dibanding dengan **hasil ekstraksi kit komersial**. Hasil deteksi dengan PCR dapat menjadi acuan untuk penggunaan teknik deteksi lainnya yang berbasis pada amplifikasi DNA hasil ekstraksi.

Penggunaan teknik pemanasan dengan chelex lebih cepat dibanding dengan ekstraksi dengan kit **komersial**. Dengan demikian penggunaan chelex yang lebih sederhana dibanding dengan teknik guanidin tiosianat maupun penggunaan kit komersial dapat menjadi alternatif dalam ekstraksi DNA *M.tuberculosis*.

Kelemahan dari penelitian ini adalah belum didapatkan **seluruh** data stabilitas dari reagen **modifikasi** yang digunakan **yang** disimpan dalam waktu yang ditentukan. **Hal ini disebabkan karena keterbatasan waktu** pengamatan yang belum selesai **dilakukan** hingga penyusunan laporan ini dilakukan. Dalam analisis statistik, konsentrasi ekstraksi DNA dengan menggunakan chelex 10% ditambah proteinase K 0,02% tidak dimasukkan karena adanya perbedaan yang sangat jauh antara ulangan dengan sampel pertama dan sampel kedua. Hasil konsentrasi DNA yang sangat besar (111,7 ng/ul) tidak dapat divalidasi dengan ulangan yang dilakukan, walaupun koefisien kemurnian DNA yang berhasil di ekstraksi cukup baik (mendekati 1,8)

7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa:

1. Penggunaan guanidin tiosianat, baik dengan maupun tanpa sentrifugasi **dan** tanpa modifikasi, serta pemanasan dengan chelex 10% dalam ekstraksi DNA *Mtb H37Rv* memberikan konsentrasi DNA yang lebih tinggi dibandingkan dengan kit komersial.
2. Modifikasi formula ekstraksi dengan menggunakan senyawa guanidin tiosianat dan penambahan proteinase K serta 2-mercaptoethanol masih belum memberikan hasil yang optimal. Terbukti dengan pita elektroforesis yang sangat tipis.
3. Waktu ekstraksi dengan teknik pemanasan Chelex 10% **memberikan hasil yang lebih cepat dan lebih baik** dibanding dengan teknik guanidin tiosianat dan penggunaan kit komersial.

7.2. SARAN

1. Optimasi **lebih lanjut mencakup suhu dan konsentrasi** dalam amplifikasi menggunakan formula modifikasi guanidin tiosianat diperlukan untuk mendapatkan pita elektroforesis yang lebih tebal.
2. Pengembangan lebih lanjut untuk teknik ekstraksi DNA dengan **menggunakan** Chelex 10% **menggunakan** pemanasan **dengan** air mendidih perlu dipertimbangkan. **Hal ini karena** dapat digunakan pada fasilitas laboratorium yang sederhana.
3. Perlu uji stabilitas dan realibilitas lebih lanjut terhadap **formula modifikasi** untuk mendapatkan **data yang lebih baik**.

8. UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIPA Risbinkes Badan Litbang Kesehatan. Penulis Menyampaikan ucapan terima kasih kepada seluruh anggota tim penelitian ini, Yuni Rukminiati, Rosa Adelina, Novi Amalia dan juga kepada semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Lab. Farmasi dan Lab Bakteriologi, Ibu Dr. Vivi Lisdawat, Msi, Apt yang mencetuskan ide dasar dalam penelitian ini dan ibu Lina Rustanti yang membantu dalam memberi masukan untuk kelancaran penelitian ini.

9. DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Kent, B. D. & Kubica, G. P. (1985). *Public Health Mycobacteriology: a Guide for the Level III Laboratory*. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control
2. Pandey BD, Poudel A, Yoda T, Tamaru A, Oda N, Fukushima Y et al. 2008. Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. *Journal of Med. Microbiol.* 57, p:439-43
3. Chakravorty S, Tyagi JS. 2001. Novel Use of Guanidine Isothiocyanate in The Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Clinical Material. *FEMS Microbiology Letters*. 205:113-7
4. Ardito, F, B. Posteraro, M. Sanguinetti, S. Zanetti and G. Fadda. 2001. *Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis.* *J. Clin. Microbiol.* 39(12):4440-44
5. Walsh PS, Metzger DA, Higouchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. Apr; 10(4):506-13
6. **WHO. *Global Tuberculosis Report 2012* Diunduh dari http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ Diakses tanggal 6 Desember 2012**
7. Ling DI, Flores FL, Riley LW, Pai M. 2008. Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression
8. Yam WC. 2006. Recent Advances in Rapid Laboratory Diagnosis of Tuberculosis. *The Hongkong Medical Diary*. Vol II, No 1: 6-7
9. Hossain AM, Rizk B, Behzadian A, Thorneycroft IH. 1997. Modified Guanidium Thiosianate Method for Human Sperm DNA Isolation. *Mol Hum Reproduction* . 3(11): 953-6
10. Lisdawati V. 2011. Pengembangan Diagnostik Molekular Loop Mediated Isothermal mplification (LAMP) untuk Deteksi Cepat Tuberkulosis Paru di Indonesia: Desain

Primer Spesifik *gyrB* *Mycobacterium tuberculosis* dari Hasil Analisis Spoligotyping.
Ringkasan Disertasi. FK UI. Jakarta

11. Kocagoz T, Yilmaz E, Ozkara, Kocagos S, Hayran M, Sachedeva M et al. 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Samples by Polymerase Chain Reaction Using a Simplified Procedure. J.Clin. Microbiol. Vol.31 p: 1435-8
12. Wade KA, June IP, Joann LC dan Gail LW. 2005. Comparison of Six Methods of Extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR. J. Clin Microbiol. Vol 43 No.5 p.2471-3
13. Brisson-Noel, A., B. Gicquel, D. Lecossier, V. Levy-Frebault, X. Nassif, and A. J. Hance. 1989. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 335:1069-71.
14. Boom R, Sol CIA, Salimans MvM, Jansen CI, Wertheim-van Dillen PME. 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleid Acids. J. Clin Microbiology. 28(3): 495-503
15. Eisenach KD, Cave MD, Sifford D, Bates JH, Crawford JT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical sputum samples using a polymerase chain reaction. Am Rev Respir Dis 1991; 144: p: 1160-3.
16. Amicosante M, Richeldi L, Trenti G, Paone G, Bisetti A et al. 1995. Inactivation of Polymerase Inhibitor for *Mycobacterium tuberculosis* DNA Amplification in Sputum by Using Capture Resin. J.Clin.Microbiol. Vol 33 p: 629-30.

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Penelitian

**UJI KUALITAS METODE EKSTRAKSI DNA *Mycobacterium tuberculosis*
MENGUNAKAN GUANIDINE THIOSIANAT DAN CHELEX TERMODIFIKASI**

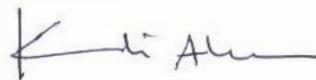
Jakarta, Desember 2012

MENYETUJUI :
Kepala Bidang Biomedis



Dr. Roselinda, M.Epid
NIP. 19580701198712001

KETUA PELAKSANA



Kindi Adam, S.Si
NIP. 198404262010121001

DISETUJUI

KETUA Panitia Pembina Ilmiah



Dr. drg. Magdarina D Agtini, Msc
NIP. 195012061984022001

KETUA KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN
TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN



Drs. Ondri Dwi Sampurno, Msi., Apt.
NIP. 196211191988031001