

PERNYATAAN KESANGGUPAN PELAKSANAAN DAN PENYUSUNAN LAPORAN PENELITIAN

Saya yang bertanda-tangan di bawah ini:

Nama : Dr. Titta Novianti, S.Si, M.Biomed

NIDN : 0318116801

Instansi : Universitas Esa Unggul

Sehubungan dengan Kontrak Penelitian:

Tanggal Kontrak Induk* : 124/C3/DT.05.00/PL/2025

Nomor Kontrak Induk* : 28 Mei 2025

Tanggal Kontrak Turunan** : 4 Juni 2025, 5 Juni 2025

Nomor Kontrak Turunan** : 0973/LL3/AL.04/2025, 013/SP-PFR/VI/2025

Judul Penelitian : [Eksplorasi potensi antimikroba eco-enzyme terhadap aktivitas bakteri MultiDrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan metoda in-silico dan in-vivo

Tahun Usulan : 2025

Tahun Pelaksanaan : 2025

Jangka Waktu Penelitian : 1 tahun

Periode Penelitian : Tahun ke 1 dari 2 tahun*

Dana Penelitian :

Periode	Dana Penelitian (Rp)	Dana Tambahan (Rp)
Tahun ke-1	127.930.000,00	-

Dengan ini menyatakan bahwa Saya bertanggungjawab penuh untuk menyelesaikan penelitian serta mengunggah laporan kemajuan dan laporan akhir penelitian sebagaimana diatur dalam Kontrak Penelitian tersebut diatas.

Apabila sampai dengan masa penyelesaian pekerjaan sebagaimana diatur dalam Kontrak Penelitian tersebut di atas saya lalai/cidera janji/wanprestasi dan/atau terjadi pemutusan Kontrak Penelitian, saya bersedia untuk mengembalikan/menyetorkan kembali uang ke kas negara sebesar nilai sisa pekerjaan yang belum ada prestasinya.

Demikian surat pernyataan ini dibuat dengan sebenarnya.

Jakarta, 5 Juni 2025



Dr. Titta Novianti, S.Si,
M.Biomed

Keterangan:

*diisi tanggal dan nomor Kontrak Induk antara DRTPM Kemdikbudristek dengan LP/LPPM Perguruan Tinggi Negeri atau LLDIKTI

****Kontrak Turunan:**

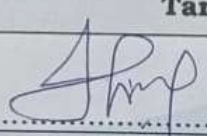
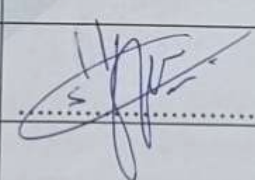
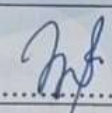
- Untuk Perguruan Tinggi Negeri diisi tanggal dan nomor kontrak antara LP/LPPM Perguruan Tinggi dengan Peneliti
- Untuk Perguruan Tinggi Swasta diisi tanggal dan nomor kontrak LLDIKTI dg PTS dan PTS dengan Peneliti yang dipisahkan dengan tanda koma(,)

PAKTA INTEGRITAS KETUA DAN ANGGOTA PELAKSANA PENELITIAN

Kami yang bertanda tangan di bawah ini, bekerjasama dengan Kementerian Pendidikan Tinggi, Sains dan Teknologi (Kemdiktisaintek) dalam rangka melaksanakan penelitian skema Penelitian Fundamental – Reguler yang berjudul Eksplorasi potensi antimikroba eco-enzyme terhadap aktivitas bakteri MultiDrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan metoda in-silico dan in-vivo dengan ini menyatakan bahwa:

1. Tidak akan melakukan praktik Korupsi, Kolusi, dan Nepotisme (KKN) dalam pelaksanaan penelitian dan penggunaan bantuan dana penelitian dari Kemdiktisaintek;
2. Memiliki komitmen, kemampuan, dan kesanggupan untuk memberikan hasil terbaik dalam pelaksanaan penelitian sesuai dengan kontrak yang telah ditetapkan oleh Kemdiktisaintek;
3. Proposal penelitian berjudul Eksplorasi potensi antimikroba eco-enzyme terhadap aktivitas bakteri MultiDrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan metoda in-silico dan in-vivo yang diusulkan bersifat original dan tidak sedang mendapat sumber pendanaan lain (kecuali skema penelitian yang bersifat kerja sama dan/atau memiliki mitra yang *co-funding*);
4. Tidak sedang terkena sanksi administrasi maupun sanksi etik lainnya; dan
5. Apabila kami melanggar hal-hal yang dinyatakan dalam PAKTA INTEGRITAS ini, bersedia menerima sanksi administratif, menerima sanksi dipublikasikan melalui media massa, digugat secara perdata dan/atau dilaporkan secara pidana.

Jakarta, 5 Juni 2025

No	Identitas	Tanda Tangan	
1	Dr. Titta Novianti, M.Biomed		
2	Seprianto, M.Si		
3	Dr. Henny Saraswati, M.Biomed		
4	Sabar Pambudi, PhD		
5	Didik Huswo Utomo, PhD	non dosen.	

B. RINGKASAN

Isian ringkasan penelitian tidak lebih dari 300 kata yang berisi urgensi, tujuan, metode, dan luaran yang ditargetkan

[Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita penyakit Tuberkulosis (TB) di urutan ke 8 di dunia dan merupakan salah satu dari delapan Negara penyumbang kasus Multidrug Resistant Tuberkulosis (MDR-TB) tertinggi di dunia (1)(2). Peningkatan kasus MDR-TB secara global menyoroti pentingnya upaya pencegahan, deteksi dini, dan pengobatan efektif untuk mengendalikan kejadian MDR-TB.(3) Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* penyebab MDR-TB mengalami resistensi terhadap dua obat antibiotik yaitu isoniazid dan rifampisin.(4) Kasus MDR-TB merupakan tantangan besar bagi dunia karena terjadi mutasi pada beberapa gen, diantaranya gen *rpoB* dan gen *katG*. Oleh karena itu pengembangan agen antimikroba baru bakteri MDR-TB menjadi kebutuhan mendesak. Senyawa antimikroba diharapkan dapat merusak membrane sel bakteri, menghambat metabolisme, serta menghambat pembentukan biofilm. (5)(6) Beberapa hasil penelitian menunjukkan Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa eco-enzyme berpotensi sebagai antimikroba bakteri patogen, yang diyakini akan merusak membrane sel bakteri dan menghambat pertumbuhan bakteri.(1)(7)

Tujuan penelitian Analisis potensi enzyme dari eco-enzyme sebagai agen antimikroba bakteri MDR-TB melalui analisis secara in-silico dan in-vivo, untuk melisiskan membrane bakteri sebagai upaya mengatasi masalah MDR-TB.

Metoda penelitian Penelitian dilakukan selama 2 tahun diawali dengan analisis hasil metagenomik mikroba eco-enzyme yang telah dilakukan pada tahun sebelumnya. Pada tahun pertama dilakukan kultur bakteri hasil isolasi dari eco-enzyme dilanjutkan uji aktivitas biokimia dan aktivitas enzimatis. Selanjutnya dilakukan uji sekuensing bakteri yang dominan dan aktif menghasilkan enzim. Hasil aktivitas bakteri dilanjutkan dengan studi in-silico bioinformatika untuk desain molekuler dinamika potensi antimikroba enzyme yang diperoleh.(8) Tahun kedua, dilakukan desain primer gen dari enzyme pada tahun pertama dan dilakukan cloning gen pada bakteri *e-coli* dan dilakukan kultur sel. Uji in-vivo aktivitas antimikroba dilakukan secara in-vivo dengan menggunakan sampel kultur bakteri *Tuberculosis* MDR-TB.

Luaran yang ditargetkan adalah publikasi di journal International bereputasi yaitu *BMC Microbiology Journal* (Q2), paten, HKI inovasi, buku referensi, dan publikasi prosiding]

C. KATA KUNCI

Isian 5 kata kunci yang dipisahkan dengan tanda titik koma (;)

[eco-enzyme, antimikroba, MDR-TB, in-silico, in-vivo

D. PENDAHULUAN

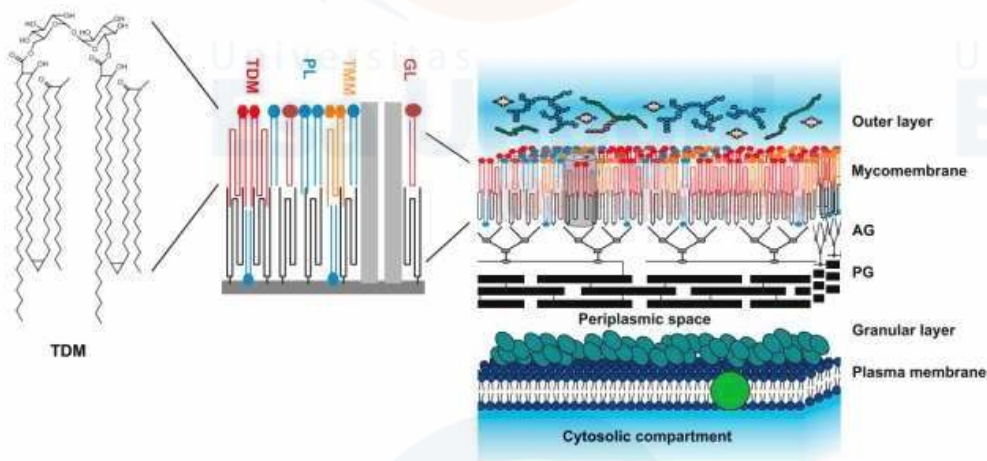
Pendahuluan penelitian tidak lebih dari 1000 kata yang memuat, latar belakang, rumusan permasalahan yang akan diteliti, pendekatan pemecahan masalah, state-of-the-art dan kebaruan, peta jalan (road map) penelitian setidaknya 5 tahun. Sitasi disusun dan ditulis berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan.

[Tuberkulosis (TB) menjadi salah satu penyakit infeksi paling mematikan di dunia, Munculnya *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap berbagai obat atau *Multidrug resistant Tuberculosis* (MDR-TB) menjadi tantangan besar dalam pengendalian penyakit ini. Pasien MDR-TB mengalami resistensi terhadap dua obat lini pertama yaitu isoniazid dan rifampisin.(9)(10) Berbagai penelitian dilakukan dalam penanganan MDR-TB dari mulai diagnostic hingga berbagai terapi.(3)(11)(12)

Isoniazid merupakan obat anti tuberkulosis pertama yang menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengikat RNA polymerase dependent DNA bakteri sehingga menghambat sintesis RNA bakteri. Isoniazid diaktifkan oleh enzim *katG* pada bakteri, aktivasi ini menghasilkan bentuk radikal bebas dari

isoniazid yang sangat reaktif.(9) Radikal aktif ini berikatan dengan nikotinamida adenine dinukleotida (NAD) di dalam bakteri, membentuk kompleks isoniazid-NAD. Kompleks ini kemudian menghambat enzim enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA). InhA berperan dalam biosintesis asam mikolat komponen utama dinding sel bakteri TB. Pada penderita MDR-TB terjadi mutasi gen katG sehingga terjadi resistensi terhadap isoniazid. Mutasi yang paling sering ditemui pada gen katG yaitu mutasi asam amino serin menjadi threonine pada kodon 315.(13)(14) Antibiotik rifampisin bekerja mengikat langsung pada subunit beta dari enzim RNA polymerase bakteri (*rpoB* gene). Enzim ini berperan dalam transkripsi DNA menjadi mRNA langkah vital untuk sintesis protein bakteri. Rifampisin menempel di saluran tempat RNA yang baru dibuat keluar dari RNA polymerase dan menghambat di tahap awal transkripsi. Rifampisin juga membunuh bakteri yang aktif berkembang biak maupun yang dalam keadaan dorman dengan aktivitas metabolik rendah. (4)(15) *M. tuberculosis* bisa jadi resisten kalau ada mutasi di gen *rpoB* yang mengkode subunit beta RNA polymerase. Resistensi terhadap rifampisin pada *M. tuberculosis* sebagian besar disebabkan oleh mutasi gen *rpoB* yang menyandi RNA polymerase sub unit beta pada 81 hot spot region. Mutasi yang terjadi adalah adanya substitusi asam amino serin (TCG) menjadi leusin (TTG) pada kodon 531 (Ser531Leu), sehingga rifampisin tidak bisa menempel dengan baik.(4)(16)

Dinding sel bakteri *Tuberkulosis* lebih tebal dibanding bakteri lain, sehingga bakteri TB sulit ditembus antibiotik dan dapat bertahan hidup lebih lama dalam tubuh manusia. Lapisan dalam membran plasma (gambar 1) yang terdiri dari lipid dan protein yang berperan menjaga integritas sel, senyawa peptidoglikan yang memberi kekuatan mekanik pada dinding sel, senyawa arabinogalaktan yang menghubungkan peptidoglikan ke lapisan luar, dan asam mikolat (mycolic acid) mengandung lapisan lilin tebal sehingga kebal terhadap banyak antibiotik, pewarnaan gram, dan kekeringan. Terakhir senyawa lipoarabinomannan (LAM) yang memiliki peran menghambat respons imun inang.(17)(18)



Gambar 1. Lapisan mikonat atau mycomenrna yang terletak di dalam membrane bakteri Tuberkulosis

Beberapa enzim spesifik dapat menarget dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* dan memecah asam mikolat. Asam mikolat adalah asam lemak panjang (lipid kompleks), salah satu enzim yang mampu memecah lemak tersebut antara lain enzim lipase karena mampu memecah trigliserida dan lemak kompleks, termasuk komponen dinding sel mikolat.(18) (7) Enzim lipase mampu memecah fosfolipid, sehingga membran menjadi bocor (leakage), sehingga ion, nutrisi, dan molekul penting keluar dari sel. Enzyme lipase, merupakan salah satu produk fermentasi dari eco-enzyme berbagai limbah sayuran, kulit buah, serta Selain itu,

senyawa bioaktif seperti asam asetat, alkohol, dan senyawa fenolik dalam eco-enzyme berpotensi merusak struktur bakteri.(19)(20) Oleh karena itu eco-enzyme merupakan sumber daya alami yang memiliki bahan antimikroba, salah satunya diduga sebagai antimikroba bakteri Tuberkulosis MDR-TB.(7)(21)(22) Mekanisme antimikroba enzim terhadap membran bakteri bekerja dengan cara merusak struktur dan fungsi vital dari dinding sel atau membran bakteri. Gangguan homeostasis tersebut menyebabkan kematian bakteri. Enzim protease berperan dalam memecah protein struktural atau enzim penting di membrane sehingga membran kehilangan integritas, metabolisme terganggu, dan akhirnya sel mati.(7)(18)

Rumusan Permasalahan

1. Bagaimana kandungan enzim lipase pada eco-enzyme dari hasil reaksi enzimatis?
2. Apakah enzim lipase pada eco-enzyme memiliki potensi sebagai antimikroba terhadap bakteri MDR-TB dengan memecah peptidoglikan pada lapisan mikolat yang sangat keras?
3. Bagaimana mekanisme seluler yang terjadi sehingga ketiga enzim tersebut mampu berperan sebagai antimikroba bakteri MDR-TB, melalui uji *in silico* dan *in vitro*.

Pendekatan pemecahan masalah

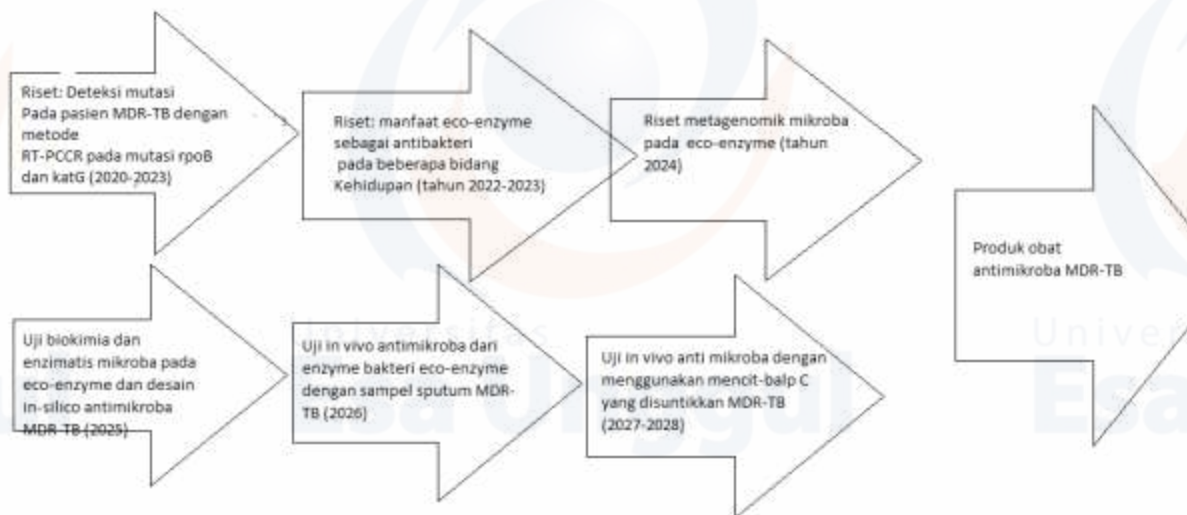
Uji antimikroba dari eco-enzyme dimulai dengan indentifikasi bakteri melalui metageno mik mikroba untuk menganalisis kelimpahan bakteri, serta identifikasi spesies hingga phylum bakteri pada eco-enzyme. Dilakukan identifikasi enzim yang aktif pada bakteri dengan uji enzimatis dan uji biokimia serta dilakukan analisis WGS untuk mengetahui gen aktif pada bakteri. Uji *in-silico* akan mendukung hipotesis kemampuan enzim pada eco-enzyme sebagai antimikroba dengan untuk memprediksi interaksi dan afinitas senyawa bioaktif eco-enzyme dengan target protein melalui molecular docking dan dinamika molekul.(18) Hasil uji *in-silico* ini selanjutnya dapat dilakukan uji secara *in vitro* skala laboratorium.

State of the art dan kebaruan

Penelitian mengenai potensi antimikroba pada bakteri eco-enzyme telah diteliti pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Prapionibacterium acnes*. Hasil uji menunjukkan adanya zona bening pada kultur bakteri dengan metoda difusi. (23) Penelitian lainnya telah dilakukan uji antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*, dan menghasilkan zona benong yang menghambat pertumbuhan bakteri pathogen tersebut.(6) Penelitian mengenai daya antimikroba eco-enzyme terhadap bakteri MDR-TB belum diteliti Oleh karena itu mengingat kasus MDR-TB semakin meningkat, maka perlu dilakukan penelitian mengenai potensi antimikroba dari eco-enzyme, sebagai cairan sejuta enzim. Diduga kandungan enzim lipase pada eco-enzyme berpotensi menghambat dan melisiskan bakteri MDR-TB, karena enzim tersebut memiliki potensi memecah membran sel mikolat pada bakteri MDR- TB.

Peta jalan (road map) 5 tahun

Road map dapat dilihat pada gambar 2 di bawah ini



E. METODE

Isian metode atau cara untuk mencapai tujuan yang telah ditetapkan tidak lebih dari 1000 kata. Pada bagian metode wajib dilengkapi dengan diagram alir penelitian yang menggambarkan apa yang sudah dilaksanakan dan yang akan dikerjakan selama waktu yang diusulkan. Format diagram alir dapat berupa file JPG/PNG. Metode penelitian harus memuat sekurang-kurangnya prosedur penelitian, hasil yang diharapkan, indikator capaian yang ditargetkan, serta anggota tim/mitra yang bertanggung jawab pada setiap tahapan penelitian. Metode penelitian harus sejalan dengan Rencana Anggaran Biaya (RAB).

[Prosedur penelitian

Penelitian ini melanjutkan dari hasil penelitian sebelumnya tentang hasil Analisis metagenomik kelimpahan dan identifikasi bakteri eco-enzyme. Hasil analisis menunjukkan ketiga sampel eco-enzyme (kulit manggis, kulit jeruk dan sayuran) terdapat keragaman bakteri dan fungi yang sangat tinggi. Keragaman mikroba tersebut menunjukkan adanya potensi enzyme yang sangat berperan dalam kesehatan, yaitu sebagai antimikroba, terutama antimikroba MDR-TB. Pembuatan larutan eco-enzyme telah dilaksanakan pada tahun sebelumnya dengan tahapan:

1. Membersihkan sisa sayuran dan kulit buah-buahan yang akan digunakan untuk pembuatan eco-enzyme dengan dipotong kecil-kecil terlebih dahulu
2. Mempersiapkan wadah bersih dari plastik dengan ukuran 2 liter
3. Menggunakan air bersih dan gula merah atau molase
4. Perbandingan sayuran atau kulit buah-buahan, gula merah, dan air adalah 1:3 :10.
5. Semua bahan dijadikan satu dalam wadah, dan dibiarkan tiga bulan dalam wadah plastik tertutup
6. Wadah sekali-sekali dibuka setiap dua hari sekali agar gas CO₂ yang dihasilkan tidak menyebabkan larutan meledak dan larutan tumpah, biasanya ditandai adanya buih di atas larutan
7. Setelah tiga bulan berfermentasi yang ditandai dengan aroma menyengat khas hasil fermentasi, warna kecoklatan, serta adanya lapisan putih di atas eco-enzyme

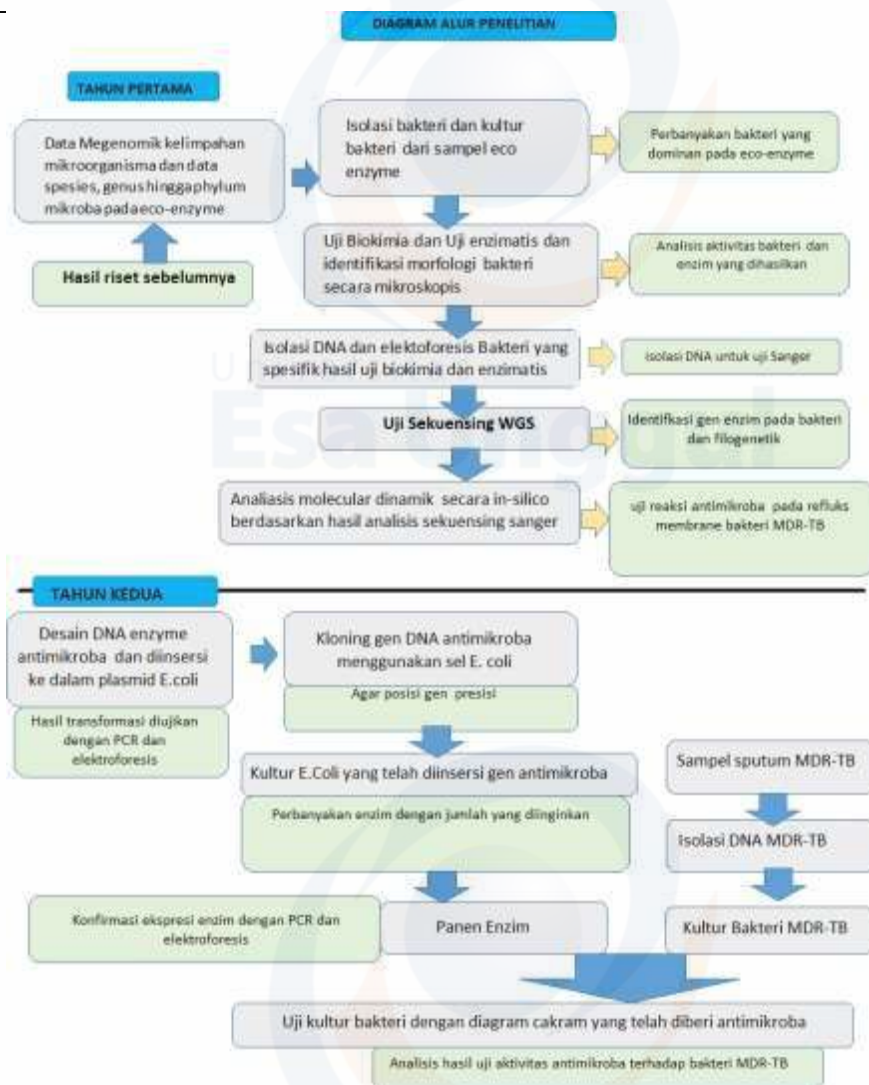
Kelanjutan penelitian mencakup 2 tahap atau 2 tahun pelaksanaan.

Pada tahun pertama, dilakukan analisis aktivitas bakteri dari isolate bakteri eco-enzyme melalui uji biokimia dan uji enzimatis. Kultur bakteri dilakukan untuk mengisolasi bakteri umum pada eco-enzyme menggunakan media *nutrient agar* (NA), yang merupakan media pertumbuhan sederhana dalam mendukung proliferasi bakteri. Sementara isolasi ragi, digunakan media *potato dextrose agar* (PDA). Proses Inokulasi mikroba dilakukan dengan metode *spread plate* dan *pour*

plate, dengan sampel *eco-enzyme* yang telah diencerkan secara bertingkat 10^{-1} , 10^{-3} , dan 10^{-4} . Pengujian biokimia dilakukan untuk menentukan karakteristik metabolisme mikroba yang diperoleh dari isolat koloni tunggal yang telah dikult ur. Pengujian ini mencakup uji fermentasi karbohidrat, Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Indol, Simmons Citrate Agar (SCA), Methyl Red – Voges-Proskauer (MR-VP), dan urease. Setiap uji dilakukan dengan media spesifik untuk mendeteksi aktivitas enzimatik dan jalur metabolisme tertentu. Analisis enzimatik pada bakteri dan yeast dilakukan menggunakan media selektif untuk menguji aktivitas protease, amilase, lipase dan selulase.

Deteksi molekuler dilakukan dengan mengisolasi DNA dari kultur bakteri dan yeast menggunakan *gSYNC DNA Extraction Kit* berdasarkan prosedur standar. Kultur mikro ba dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan pelet sel. Pelet sel ditambahkan buffer lisis dan dilakukan inkubasi berdasarkan protokol kit, dengan tujuan untuk mengeluarkan DNA dari dalam sel. setelah proses lisis, maka dilakukan pemurnian dengan presipitasi dan pencucian dengan etanol, yang diikuti dengan elusi DNA dalam buffer khusus pada kit. DNA yang diperoleh disimpan pada suhu -20°C hingga tahapan analisis berikutnya, Untuk mengetahui susunan basa DNA enzim tersebut dilakukan uji sekuensing Sanger, dengan dilakukan isolasi DNA terlebih dahulu dan konfirmasi kualitas DNA melalui amplifikasi basa DNA dengan PCR dan elektroforesis. Dilakukan uji in-silico untuk penentuan sifat dinamika molekuler enzim sebagai anti microbial dalam kemampuannya menghambat pertumbuhan bakteri MDR-TB.

Pada tahun kedua dilakukan cloning gen enzyme yang diperoleh dari tahun pertama ke dalam sel *e. coli*. Kultur sel *E. coli* dilakukan untuk mendapatkan enzim dalam jumlah banyak untuk dilakukan uji in vitro selanjutnya dalam pembuktian peran enzim sebagai antimicrobial terhadap bakteri MDR-TB. Uji in-vitro dilakukan dengan menggunakan sampel sputum bakteri MDR-TB, isolasi kultur bakteri dan dilakukan uji cakram dengan enzyme hasil kultur dari sel cloning.



Gambar 3. Langkah metoda penelitian dan indicator capaian target

Hasil yang diharapkan atau luaran :

Tahun pertama

Hasil yang diharapkan

1. enzim aktif yang dihasilkan dari proses fermentasi eco-enzyme berupa lipase dan protease yang memiliki kemampuan memecah membrane sel
2. Mekanisme molekuler antimicrobial enzyme aktif yang diperoleh terhadap lisis membrane bakteri secara in silico

Luaran:

1. Publikasi di jurnal bereputasi *BMC Microbiology Journal* (Q2) (<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/>)
2. HKI inovasi
3. paten produk (terdaftar)
4. prosiding International Conference *The 2nd International Conference IC-Biolis*
5. Draft Buku Referensi

Tahun kedua

Hasil yang diharapkan

1. Produk enzim lipase dan protease hasil kultur cloning yang akan digunakan pada uji antimicrobial dari sputum pasien MDR-TB
2. Aktivitas antimicrobial enzim lipase dan protease terhadap bakteri MDR-TB secara in- vivo
3. Produk akhir pada tahap hilirisasi berupa obat dengan kombinasi enzyme

isolat bakteri eco-enzyme yang bersifat anti bakteri MDR-TB
 Luaran:

1. Publikasi di jurnal bereputasi Open Biologi Journal
 (<https://royalsocietypublishing.org/journal/rsob>)
2. HKI
3. Paten produk (publish)
4. Prosiding International *BBC International Conference*
5. Buku referensi terbit

Hasil yang diharapkan dan indikator capaian

No	Aktivitas	Hasil yang diharapkan	Indikator capaian target
Tahun ke 1			
1	Isolasi dan kultur bakteri dari eco-enzyme	Bakteri hasil analisis metagenomik berhasil dikultur	Pertumbuhan bakteri optimal
2	Uji aktivitas enzim bakteri	Hasil uji enzimatis protease, amilase dan lipase berhasil menumbuhkan bakteri	Bakteri eco-enzyme menghasilkan enzyme
3	Uji biokimia	uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, dan sukrosa), Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Indol, Simmons Citrate Agar (SCA), Methyl Red – Voges-Proskauer (MR-VP), dan urease	karakteristik metabolisme mikroba
4	Isolasi DNA bakteri (yang positif dalam uji aktivitas enzim dan uji biokimia)	Isolasi DNA sesuai dengan konsentrasi standar yaitu sebesar	Konsentrasi standar sebagai prasyarat untuk uji selanjutnya, Uji sekuensing WGS
5	Uji PCR dan elektroforesis	Menghasilkan pita DNA bakteri 16S RNA dengan panjang basa DNA sesuai dengan spesies spesifik yang dituju	Panjang pita DNA spesifik dengan spesies hasil isolasi bakteri
6	Uji dan analisis WGS	Pembacaan gen basa DNA yang aktif melakukan reaksi enzimatis	Target adalah gen enzim protease, amilase dan lipase pada bakteri eco-enzyme
7	Uji in-silico molekular docking dan dinamika molekular	Desain molekular docking interaksi antara enzim antimikroba dengan bakteri MDR-TB	Terjadi aktivitas antimikroba enzim bakteri eco-enzyme yang potensi merusak membran bakteri eco-

			enzyme
Tahun ke 2			
8	Desain primer DNA enzyme hasil uji in-silico dan WGS	Desain primer DNA gen enzyme bakteri eco enzyme	DNA primer dapat diinsersi ke dalam plasmid
9	Desain plasmid	Desain DNA plasmid E.coli	
10	Konstruksi dan kloning gen ke dalam plasmid	Ligasi gen dan insersi ke dalam plasmid	
11	Validasi hasil konstruksi dengan PCR dan elektroforesis	Gen berhasil diamplifikasi dan analisis elektroforesis	Panjang basa DNA hasil amplifikasi sesuai dengan panjang gen yang diinsersi
12	Transformasi plasmid ke dalam sel kompeten E.coli	Transformasi plasmid ke sel kompeten E.coli	
13	Kultur sel	Pertumbuhan sel	
14	Isolasi enzyme hasil kloning	Isolat enzyme	
15	Isolasi bakteri MDR-TB dari sputum sampel pasien	Isolat bakteri MDR-TB	
16	Kultur sel bakteri MDR- TB	Kultur bakteri	
17	Uji in-vitro antimikroba dengan diagram cakram pada kultur sel bakteri MDR-TB	Penghambatan pertumbuhan bakteri MDR-TB	MDR-TB tidak tumbuh atau lisis
18	Uji ekspresi gen antimikroba dan ekspresi gen MDR-TB	Ekspresi gen enzim dan gen MDR-TB	Ekspresi gen antimikroba tinggi dan ekspresi Gen MDR-TB menurun

Anggota tim/mitra yang bertanggung jawab pada setiap tahapan penelitian

N o	Nama	Peran	Keahlian	Instansi	Tugas/tanggung jawab
1	Dr. Titta Novianti, M.Biomed	Ketua	Biologi Molekuler	Universitas Esa Unggul	Penyusunan proposal penelitian, analisis hasil WGS dan membimbing

					mahasiswa di laboratorium biologi molekuler, publikasi dan laporan akhir
2	Dr. Henny Saraswati, M.Biomed	Anggota/dosen	Biologi Molekuler dan Imunologi	Universitas Esa Unggul	Analisis kultur Bakteri dan membimbing mahasiswa di lab Biologi Molekuler
3	Seprianto, M.Si	Anggota/dosen	Mikrobiologi	Universitas Esa Unggul	Isolasi bakteri MDR-TB dari sampel sputum pasien dan kultur serta cloning gen ke dalam sel E.coli
3	Didik H. Hustowo, PhD	Anggota/umum	Bioinformatika	Bioinformatics Research Center– Institute of Bioinformatics Indonesia	Uji in silico : molecular docking, dinamika molekuler dan desain primer
4	Sabar Pambudi, PhD	Anggota/umum	Rekayasa genetika	Pusat Riset Vaksindan Obat BRIN	Konstruksi gen ke dalam plasmid, pembuatan sel kompeten
6	Zidni Anumillah	Anggota/mahasiswa	Asisten peneliti	Universitas Esa Unggul	Isolasi bakteri dari eco-enzyme, uji biokimia dan enzimatis, isolasi DNA dan PCR
7	Ncum Saminawati	Anggota/mahasiswa	Asisten peneliti	Universitas Esa Unggul	Cloning gen, transformasi Plasmid ke dalam sel, kultur bakteri

8	Samina Jehovya h Daniela Zebaqth	Anggota/ mahasiswa	Asisten peneliti	Universitas Esa Unggul	Isolasi DNA sputum dan uji antimikrobal
---	-------------------------------------	-----------------------	------------------	------------------------	---

]

F. JADWAL PENELITIAN

Jadwal penelitian disusun berdasarkan pelaksanaan penelitian dan disesuaikan berdasarkan lama tahun pelaksanaan penelitian

[

Tahun ke-1

No	Nama Kegiatan	Bulan											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Penyusunan proposal dan persiapan penelitian	V	v	v	V	V							
2	Isolasi dan kultur bakteri dari eco-enzyme						v	V					
3	Uji aktivitas enzim bakteri						V	v					
4	Uji biokimia						v	V					
5	Isolasi DNA bakteri (yang positif dalam uji aktivitas enzim dan uji biokimia)								v				
6	Uji PCR dan elektroforesis								V				
7	Uji dan analisis WGS								v	V			
8	Laporan Kemajuan										V		
9	Uji in-silico molekular docking dan dinamika molekular										v	V	
10	Analisis hasil											V	
11	Publikasi											V	
12	Laporan akhir												

Tahun ke-n

No	Nama Kegiatan	Bulan											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Desain primer DNA enzyme hasil uji in-silico dan WGS	V	v										
2	Desain plasmid		V	V									
3	Konstruksi dan kloning gen ke dalam plasmid				V								
4	Transformasi plasmid ke dalam sel kompeten E.coli					V							
5	Validasi hasil transformasi dengan PCR dan elektroforesis						V						
6	Kultur sel						V	V					

7	Isolasi enzyme hasil cloning							v	V				
8	Laporan kemajuan									V			
9	Isolasi bakteri MDR-TB dari sputum sampel pasien					V	V						
10	Kultur sel bakteri MDR-TB							v	V				
11	Uji in-vitro antimikroba Dengan diagram cakram pada kultur sel bakteri MDR-TB									v	V		
12	Uji aktivitas antimikroba dengan ekspresi gen									V	v		

G. DAFTAR PUSTAKA

Sitasi disusun dan ditulis berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada usulan penelitian yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

- [Singh V, Chibale K. Strategies to Combat Multi-Drug Resistance in Tuberculosis. Acc Chem Res. 2021;54(10):2361–76.
- Yuliwulandari R, Prayuni K, Razari I, Susilowati RW, Zulhamidah Y, Soedarsono S, et al. Genetic characterization of N-acetyltransferase 2 variants in acquired multidrug-resistant tuberculosis in Indonesia. Pharmacogenomics. 2021;22(3):157–63.
- Novianti T. Mutation detection of multidrug-resistant tuberculosis by rt-pcr method as the diagnostic tool for mdr-tb. 2023;10(March):117–27.
- MALADANY Y, WAHYUNI T, KRISMAWATI H. Single Nucleotide Polymorphism in the rpoB Mycobacterium tuberculosis gene from Papua-Indonesia and Its Impact on Rifampicin Resistance: A Whole-Genome Sequencing Analysis. Microbiol Indones. 2021;15(2):37–44.
- Falzon D, Mirzayev F, Wares F, Baena IG, Zignol M, Linh N, et al. Multidrug- resistant tuberculosis around the world: What progress has been made? Eur Respir J 2015;45(1):150–60
doi.org/10.1183/09031936.00101814
- Miotto P, Zhang Y, Cirillo DM, Yam WC. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. Respiriology. 2018;23(12):1098–113.
- Permatananda PANK, I Gde Suranaya Pandit, Putu Nita Cahyawati, Anak Agung Sri Agung Aryastuti. Antimicrobial Properties of Eco Enzyme: A Literature Review. Biosci Med J Biomed Transl Res. 2023;7(6):3370–6.
- Sunuwar J, Azad RK. Identification of Novel Antimicrobial Resistance Genes Using Machine Learning, Homology Modeling, and Molecular Docking. Microorganisms. 2022;10(11).
- Tiberi S, Utjesanovic N, Galvin J, Centis R, D'Ambrosio L, van den Boom M, et al. Drug resistant TB – latest developments in epidemiology, diagnostics and management. Int J Infect Dis [Internet]. 2022;124:S20–5. Available from:https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.03.026
- Tania T, Sudarmono P, Kusumawati RL, Rukmana A, Pratama WA, Regmi SM, et al. Whole-genome sequencing analysis of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis from Java, Indonesia. J Med Microbiol. 2020;69(7):1013–9.
- Lange C, Abubakar I, Alffenaar JWC, Bothamley G, Caminero JA, Carvalho ACC, et al. Management of patients with multidrug-resistant/ extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: A TBNET consensus

- statement. *Eur Respir J.* 2014;44(1):23–63.
12. Hidayah N, Pambudi S, Widayanti T, Suryanggono J, Luqman M, Mulyawati L, et al. The cloning of ESAT-6, EspC and Rv2029c genes obtained from an Indonesian tuberculosis- infected patient. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2023;1271(1).
 13. Singh A, Gupta AK, Singh S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Role of nanoparticles against multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB). *NanoBioMedicine.* 2020. 285–314 p.
 14. Rao P, Chawla K, Shenoy VP, Mukhopadhyay C. Role of real-time PCR for detection of tuberculosis and drug resistance directly from clinical samples. *Indian J Tuberc.* 2016;63(3):149–53.
 15. Reviono, Kushanto P, Eko V, Pakiding H, Nurwidiastih D. Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB): Tinjauan Epidemiologi dan Faktor Risiko Efek Samping Obat Anti Tuberkulosis. *Maj Kedokt Bandung.* 2014;46(4):189–96.
 16. Maladan Y, Krismawati H, Wahyuni T, Tanjung R, Awaludin K, Audah KA, et al. The whole-genome sequencing in predicting *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance in Papua, Indonesia. *BMC Genomics.* 2021;22(1):1–11.
 17. Sri Pananjung AM, Ulfa EU, Senjarini K, Arimurti S. Karakterisasi Isolat Bakteri Fibrinolitik Wu 021055* Asal Perairan Pantai Papuma, Jember. *J Bioteknol Biosains Indones.* 2016;2(1):1.
 18. Swain SS, Sharma D, Hussain T, Pati S. Molecular mechanisms of underlying genetic factors and associated mutations for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1651–63.
 19. Wen Low C, Leong Zhi Ling R, Teo S-S. Effective Microorganisms in Producing Eco-Enzyme from Food Waste for Wastewater Treatment. *Appl Microbiol Theory Technol [Internet].* 2020;28–36. Available from: <http://ojs.wiserpub.com/index.php/AMTT/>
 20. Hanifah IA, Primarista NPV, Prasetyawan S, Safitri A, Adyati T, Srihadyastutie A. The Effect of Variations in Sugar Types and Fermentation Time on Enzyme Activity and Total Titrated Acid on Eco-Enzyme Results of Fermentation. *Proc 7th Int Conf Biol Sci (ICBS 2021).* 2022;22(Icbs 2021):585–9.
 21. Mavani HAK, Tew IM, Wong L, Yew HZ, Mahyuddin A, Ghazali RA, et al. Antimicrobial efficacy of fruit peels eco-enzyme against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(14):1–12.
 22. Ramadona N. Aktivitas Gel Eco-Enzyme Kulit Buah Jeruk Peras (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) Terhadap Penyembuhan Luka Terbuka Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *Skripsi.* 2022;
 23. Joshi AS, Singh P, Mijakovic I. Interactions of gold and silver nanoparticles with bacterial biofilms: Molecular interactions behind inhibition and resistance. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):1–24]