

SKRIPSI

**ANALISIS KADAR IL-6 PADA SERUM PENDERITA TUBERKULOSIS
AKTIF DAN ORANG SEHAT SETELAH DIREAKSIKAN DENGAN
PROTEIN REKOMBINAN MTSP11 SEBAGAI KANDIDAT
VAKSIN TUBERKULOSIS**

Disusun dan diajukan oleh

PAULA NATASHA ARINCY SHELLAGINELLA VIERIN

H041 17 1523



**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**ANALISIS KADAR IL-6 PADA SERUM PENDERITA TUBERKULOSIS
AKTIF DAN ORANG SEHAT SETELAH DIREAKSIKAN DENGAN
PROTEIN REKOMBINAN MTSP11 SEBAGAI KANDIDAT
VAKSIN TUBERKULOSIS**

Disusun dan diajukan oleh

PAULA NATASHA ARINCY SHELLAGINELLA VIERIN

H041 17 1523

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Program Sarjana Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal 5 Juli 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan.

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



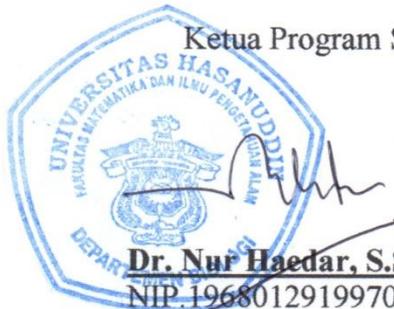
Dr. Rosana Agus, M.Si.
NIP.196509051991032003

Pembimbing Pertama



Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si.
NIP.196512091990082001

Ketua Program Studi,



Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si.
NIP.196801291997022001

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Paula Natasha Arincy Shellaginella Vierin
NIM : H041171523
Program Studi : Biologi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul Analisis Kadar IL-6 pada Serum Penderita Tuberkulosis Aktif dan Orang Sehat setelah Direaksikan dengan Protein Rekombinan MTSP11 sebagai Kandidat Vaksin Tuberkulosis adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemudian hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 05 Juli 2021
Yang Menyatakan



(Paula Natasha A.S.V.)

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penulis akhirnya dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul Analisis Kadar IL-6 pada Serum Penderita Tuberkulosis Aktif dan Orang Sehat setelah Direaksikan dengan Protein Rekombinan MTSP11 sebagai Kandidat Vaksin Tuberkulosis sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan karena segala keterbatasan yang ada. Untuk itu demi skripsi ini, penulis sangat membutuhkan dukungan dan sumbangsih pikiran berupa kritik dan saran yang bersifat membangun.

Selama proses perwujudan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan doa yang tulus untuk penulis. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada semua pihak yang dengan penuh suka cita memberikan semangat, motivasi dan bantuan selama proses pencapaian gelar sarjana. Oleh sebab itu dengan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada keluarga terkhusus untuk kedua orangtua dan adik terkasih, ayahanda Antonius Yun Saptono dan ibunda Chatarina Rini Kusmiati, serta adik Bonifasia Velamoni Cesarincy Chrisan Myelin. Untuk ayahanda dan ibunda, terima kasih banyak karena selalu menemani, mendampingi, mengarahkan, dan senantiasa mendoakan penulis. Terima kasih karena selalu menjadi motivasi dan alasan utama penulis untuk

segera menyelesaikan skripsi ini, semoga skripsi ini dapat menjadi hadiah terindah untuk kedua orangtua. Untuk adikku satu-satunya, terima kasih banyak karena senantiasa menghibur, memberi semangat dan motivasi penulis dikala stres, lelah, dan jenuh dalam mengerjakan skripsi.

Kepada ibu Dr. Rosana Agus, M.Si., selaku pembimbing utama dan ibu Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si. selaku pembimbing pertama, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas bimbingan, ilmu, nasehat, arahan berupa kritik dan saran yang membangun serta motivasi yang telah diberikan selama penulis melaksanakan proposal, penelitian hingga ke tahap penyusunan skripsi ini. Terima kasih karena selalu sabar dalam membimbing penulis dan senantiasa meluangkan waktu untuk terus memberi bimbingan dan arahan sehingga skripsi ini dapat selesai pada waktu yang tepat. Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin serta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi mulai dari awal perkuliahan sampai penyusunan skripsi penulis.
2. Ibu Dr. Nur Haedar, M.Si. selaku ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, dosen Penasehat Akademik (PA) dan dosen penguji. Terima kasih atas ilmu, masukan, nasehat, kritik serta saran yang diberikan kepada penulis, terlebih kesabaran dalam membimbing penulis dari awal perkuliahan.
3. Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. selaku dosen penguji. Terima kasih atas masukan, nasehat, kritik serta saran yang diberikan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyusun skripsi sampai selesai.

4. Seluruh Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi yang telah membimbing penulis selama proses perkuliahan, serta seluruh pegawai dan staf Departemen Biologi yang selalu membantu penulis baik dalam menyelesaikan urusan administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.
5. Kepada teman sepenelitian Jesika Bangkaran, Ferdinando, Dian Ramadhani, dan khususnya Kezya Tangketasik, terima kasih karena selalu menemani bahkan sejak penulis masih berstatus sebagai mahasiswa baru, mendengarkan keluh kesah penulis, mendoakan serta memotivasi penulis selama menyelesaikan skripsi.
6. Kepada sahabat terkasih Gita Lovissa Mangande. Terima kasih selalu menemani penulis sejak sekolah dasar hingga perguruan tinggi, menghibur, dan memberi dukungan selama penulis menyelesaikan skripsi.
7. Kepada teman terkasih Bulan Rhea. Terima kasih selalu meluangkan waktu dan mendengarkan semua keluh kesah penulis, mendoakan, menghibur dan senantiasa mendukung penulis selama menyelesaikan skripsi.
8. Teman-teman Biologi 2017 (Biovergent), khususnya Widar Laili, Ghea Farmaning Tyas Putri, Ummi Khaera, Sofiea Binti Syarifudin, Nadhila Idris, Putri Fahrani, Irma Amelia, Nirwana, dan Ainun Amalia. Terima kasih sudah menjadi teman yang baik, solid, tidak sungkan untuk menegur penulis bila melakukan kesalahan, selalu membantu dan mendukung penulis dari awal perkuliahan sampai akhir penyusunan skripsi.
9. Teman-teman KKN Biringkanaya 10, khususnya Wafiqah dan Dhila. Terima kasih karena telah menjadi teman yang selalu suportif, tidak pernah bosan memberi motivasi untuk selalu semangat dan tidak menyerah, serta mendukung penulis sejak awal KKN sampai akhir penyusunan skripsi.

10. Kepada kanda Sri Sulastriani, S.Si. terima kasih selalu memberikan saran dan membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi, juga kanda Hasmirawati, S.Si, Nurhikmah, S.Si, dan Pramegita Cahyani, S.Si yang telah menginspirasi penulis dalam penyusunan skripsi.

Penulis mengucapkan terima kasih banyak untuk semua pihak yang mendukung dan terlibat dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, semoga kedepannya skripsi ini dapat berguna sebagai referensi tambahan bagi banyak orang.

Makassar, Mei 2021

Penulis

ABSTRAK

Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan dapat menyebar secara *aerosol*. Penyakit tuberkulosis dapat dicegah dengan pemberian vaksin *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). Namun, penggunaan vaksin BCG memiliki efektifitas yang tidak berlangsung lama dan tidak mencakup semua kelompok umur. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kadar IL-6 pada serum penderita tuberkulosis aktif dan orang sehat setelah direaksikan dengan protein rekombinan MTSP11 sebagai kandidat vaksin tuberkulosis. Penelitian ini menggunakan protein rekombinan MTSP11 yang telah dimurnikan kemudian direaksikan dengan serum penderita tuberkulosis aktif dan orang sehat menggunakan metode ELISA. Hasil penelitian yang diperoleh yaitu nilai rata-rata kadar IL-6 pada penderita tuberkulosis aktif sebesar 167.92 pg/mL dan pada orang sehat sebesar 74.45 pg/mL. Data hasil uji ELISA kemudian diuji statistik menggunakan *one sample test*. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kadar IL-6 pada serum penderita tuberkulosis aktif dan orang sehat setelah direaksikan dengan protein rekombinan MTSP11. Kadar IL-6 yang lebih tinggi pada serum penderita tuberkulosis aktif dibandingkan dengan serum orang sehat dikarenakan munculnya respon imun protektif terhadap protein rekombinan MTSP11 sebagai antigen. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa protein rekombinan MTSP11 yang dikode oleh gen Rv3204 berpotensi sebagai kandidat vaksin tuberkulosis.

Kata Kunci: Tuberkulosis, *Mycobacterium tuberculosis*, MTSP11, IL-6, vaksin ELISA

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* bacteria and can spread *aerosols*. Tuberculosis can be prevented by giving the *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) vaccine injection. However, the BCG vaccine has short-term effectiveness and does not cover all age group. This study aims to determine the concentration of IL-6 in active tuberculosis patients and normal serum after being reacted with the recombinant protein MTSP11 as a tuberculosis vaccine candidate. This study used purified recombinant protein MTSP11 that reacted with active tuberculosis patients and normal serum using ELISA method. The results obtained that the average IL-6 concentration in patients with active tuberculosis was 167.92 pg/mL and in normal was 74.45 pg/mL. The data from ELISA assay then statistically tested using one sample test. The result showed that there was a significant difference in active tuberculosis patients and normal serum after being reacted with the recombinant protein MTSP11. The higher concentration of IL-6 in active tuberculosis patients compared to normal serum are due to the emergence of a protective immune response against the recombinant protein MTSP11 as an antigen. From these results it can be concluded that recombinant protein MTSP11 encoded by Rv3204 gene is a potential candidate for tuberculosis vaccine.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, MTSP11, IL-6, vaccine, ELISA

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan Penelitian	4
I.3 Manfaat Penelitian	4
I.4 Perumusan Hipotesis	4
I.5 Waktu dan Tempat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
II.2 <i>Methylated DNA-protein cyctein Methyltransferase 11 kDa</i> (MTSP11).....	8
II.3 Patogenesis <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
II.4 Respon Imun Terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
II.5 Peranan Interleukin 6 (IL-6).....	13

II.6 Vaksin	14
II.6.1 Vaksin <i>Bacillus Calmette- Guérin</i>	19
II.7 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	21
BAB III METODE PENELITIAN	26
III.1 Alat	26
III.2 Bahan	26
III.3 Prosedur Kerja	26
III.3.1 Kriteria Sampel.....	26
III.3.2 Persiapan Protein MTSP11 sebagai Antigen	27
III.3.3 Analisis Kadar IL-6 Menggunakan Metode ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	27
III.3.3.1 Coating Protein MTSP11	27
III.3.3.2 Uji ELISA.....	28
III.3.4 Analisis Data	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	30
IV.1 Analisis Kadar IL-6 Menggunakan Metode ELISA.....	30
IV.1.1 Coating (Pelapisan) Protein MTSP11.....	31
IV.2 Uji ELISA	33
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	39
V.1 Kesimpulan.....	39
V.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	45

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 1. Nilai absorbansi larutan standar pada plate ELISA	32
Tabel 2. Hasil pengukuran konsentrasi IL-6 pada sampel serum orang sehat	34
Tabel 3. Hasil pengukuran konsentrasi IL-6 pada sampel serum penderita TB aktif.....	35
Tabel 4. Hasil uji statistik <i>T Test</i>	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Dipindai dengan Mikrograf Elektron Mag 15549X.....	5
Gambar 2. Dinding Sel <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
Gambar 3. Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	8
Gambar 4. Lokus Rv3204	9
Gambar 5. Mekanisme Infeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
Gambar 6. ELISA Plate	28
Gambar 7. Protein MTSP11	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Skema Kerja.....	45
Lampiran 2. Bahan.....	46
Lampiran 3. Alat.....	48
Lampiran 4. Prosedur Kerja	49
Lampiran 5. Kurva Larutan Standar ELISA	50
Lampiran 6. Hasil Uji Statistik.....	51
Lampiran 7. Titik Persentase Distribusi t (df = 1 – 40)	52

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi bakteri yang telah dikenal hampir di seluruh dunia. TB dianggap sebagai penyakit kronis yang dapat menurunkan daya tahan fisik penderitanya secara serius serta dapat menyebabkan kematian. TB disebabkan oleh bakteri basil *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat menyebar melalui udara, terutama ketika penderita TB batuk. TB dapat mempengaruhi paru-paru (TB paru) dan juga organ di luar paru-paru (TB luar paru) (WHO, 2020).

Diperkirakan 10,0 juta (8,9–11,1 juta) orang mengidap TB di tahun 2019, jumlah yang relatif stabil dalam beberapa tahun terakhir. Secara global, terdapat 1,2 juta (1,1–1,3 juta) kematian akibat TB di tahun 2019 (terjadi pengurangan sebesar 1,7 juta pada tahun 2000) dan penambahan jumlah kematian sebanyak 208.000 (177.000–242.000) diantara pengidap HIV (terjadi pengurangan sebesar 678.000 pada tahun 2000) (WHO, 2020).

Secara geografis, sebagian besar kasus TB di tahun 2019 yang berada di lingkup Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) yaitu Asia Tenggara (44%), Afrika (25%) dan Pasifik Barat (18%), dengan jumlah yang lebih kecil di Timur Mediterania (8,2%), Amerika (2,9%) dan Eropa (2,5%). Delapan negara menyumbang dua pertiga kasus TB dari jumlah total secara global, yaitu India (26%), Indonesia (8,5%), Cina (8,4%), Filipina (6%), Pakistan (5,7%), Nigeria (4,4%), Bangladesh (3,6%) dan Afrika Selatan (3,6%) (WHO, 2020). Berdasarkan data *Global Tuberculosis Report 2020*, Indonesia masuk ke dalam 12 negara yang

memiliki angka kejadian kasus tuberkulosis tertinggi di dunia pada tahun 2019. Indonesia menduduki peringkat kedua setelah India sebagai negara dengan pengidap TB terbanyak di dunia, yaitu sekitar 845.000 jiwa di tahun 2019. Indonesia memiliki populasi sebanyak 271 juta jiwa, dimana 845.000 jiwa mengidap TB; 562.000 jiwa teridentifikasi mengidap TB dan 283.000 jiwa belum teridentifikasi, dan 96.000 jiwa meninggal karena TB; termasuk 4.700 jiwa meninggal karena HIV (WHO, 2020). Lima provinsi dengan TB tertinggi adalah Jawa Barat, DKI Jakarta, Gorontalo, Banten dan Papua Barat (Lubis & Annisa, 2019). Berdasarkan Survei Prevalensi Tuberkulosis tahun 2013-2014, prevalensi TB dengan konfirmasi bakteriologis Indonesia sebesar 759 per 100.000 penduduk berumur 15 tahun ke atas (Kemenkes RI, 2018).

Provinsi Sulawesi Selatan memiliki jumlah penderita TB paru sebanyak 19.071 orang. Penderita TB paru pada laki-laki sebanyak 11.226 orang dan perempuan sebanyak 7.845 orang, serta penderita TB paru pada anak-anak berusia 0-14 tahun sebanyak 1.067 orang. Jumlah BTA (+) yang terdaftar dan diobati sebanyak 11.476 orang (60,17%), jumlah kesembuhan sebanyak 5.366 orang (46,75%), jumlah angka keberhasilan pengobatan TB sebanyak 10.877 orang (57,03%), dan jumlah kematian selama pengobatan TB sebanyak 1.601 orang (8,39%) (Dinkes Makassar, 2020).

Penyakit tuberkulosis dapat dicegah dengan pemberian vaksin pada usia dini atau pada saat bayi baru lahir. Pemberian vaksin di usia dini diharapkan mampu menekan jumlah kasus TB di dunia. Vaksin tuberkulosis yang masih digunakan sampai sekarang adalah BCG atau *Bacillus Calmette-Guérin*. Vaksin ini ditemukan oleh dua orang ilmuwan berkebangsaan Perancis (Kaufmann *et al.*, 2016). Penggunaan BCG secara luas dalam program vaksinasi bayi rutin dapat

mencegah lebih dari 115.000 kematian TB per kelompok kelahiran dalam 15 tahun pertama kehidupan (WHO, 2018).

Namun, terdapat beberapa kekurangan pada vaksin BCG ini, seperti penggunaan vaksin yang tidak mencakup semua kelompok umur (hanya pada usia anak-anak dan remaja akhir) (Kaufmann *et al.*, 2015), efektifitas tidak berlaku jangka panjang dimana hanya 10-15 tahun pertama kehidupan, perbedaan wilayah secara geografis menyebabkan efektifitas BCG bervariasi karena terpapar oleh bakteri lingkungan (Zhu *et al.*, 2018), dan dapat memberikan hasil positif pada tes tuberkulin (TST) (Lim *et al.*, 2004). Pengembangan vaksin TB terus dilakukan agar vaksin dapat digunakan oleh semua kelompok umur, salah satu protein yang dapat dijadikan sebagai vaksin adalah MTSP11.

MTSP11 merupakan antigen yang dihasilkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. MTSP11 mampu menginduksi produksi IFN-gamma (IFN- γ) dan interleukin (IL)-12p40 signifikan dalam sel mononuklear darah perifer dari reaktor tuberkulin yang sehat. Kelebihan MTSP11 yaitu produksi IL-12p40 sebagai respon terhadap rMTSP11 secara signifikan lebih tinggi daripada MTSP17. IL-12p40 adalah sitokin awal utama dalam perkembangan tanggapan imun protektif terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (Lim *et al.*, 2004). Penelitian mengenai MTSP11 sebagai kandidat vaksin sampai saat ini belum banyak dilakukan, sehingga dalam penelitian ini MTSP11 akan digunakan sebagai kandidat vaksin untuk penderita tuberkulosis.

Berdasarkan hal tersebut sehingga dilakukan penelitian untuk menganalisis kadar IL-6 pada serum penderita tuberkulosis aktif dan orang sehat setelah direaksikan dengan protein rekombinan MTSP11 sebagai kandidat vaksin tuberkulosis.

I.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar IL-6 pada serum penderita tuberkulosis aktif dan orang sehat setelah direaksikan dengan protein rekombinan MTSP11 sebagai kandidat vaksin tuberkulosis.

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai efektivitas protein rekombinan MTSP11 sebagai kandidat vaksin tuberkulosis melalui analisis kadar IL-6 pada serum penderita tuberkulosis aktif dan orang sehat.

I.4 Perumusan Hipotesis

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

Ho : Rata-rata konsentrasi IL-6 sama pada serum penderita tuberkulosis aktif dan orang sehat.

Ha : Rata-rata konsentrasi IL-6 tidak sama pada serum penderita tuberkulosis aktif dan orang sehat.

I.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2021 sampai Mei 2021 di Laboratorium Penelitian Rumah Sakit Universitas Hasanuddin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Menurut Breed *et al.* (1957), klasifikasi *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf, 1883) Lehmann dan Neumann, 1896 yaitu sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria

Subkingdom : Posibacteria

Phylum : Actinobacteria

Order : Actinomycetales

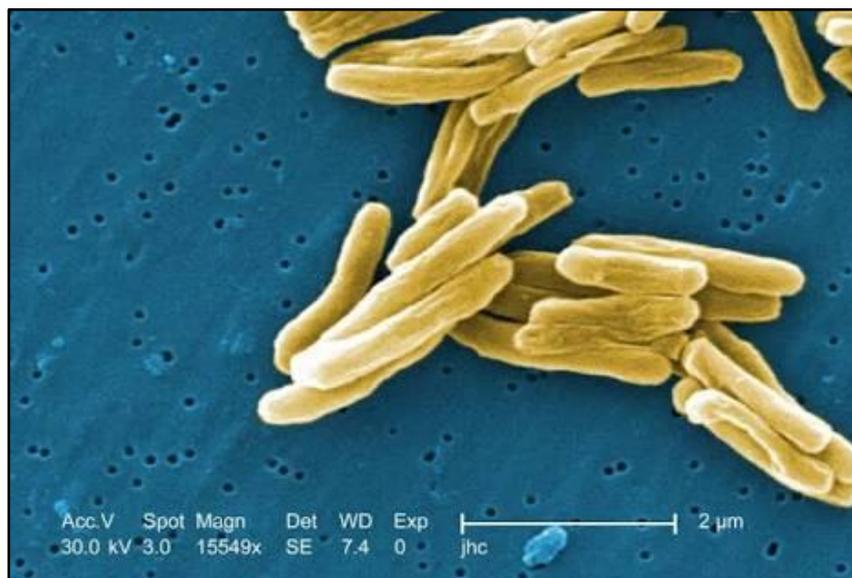
Suborder : Corynebacterineae

Family : Mycobacteriaceae

Genus : *Mycobacterium*

Species : *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf, 1883) Lehmann dan Neumann, 1896

Sumber : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957)



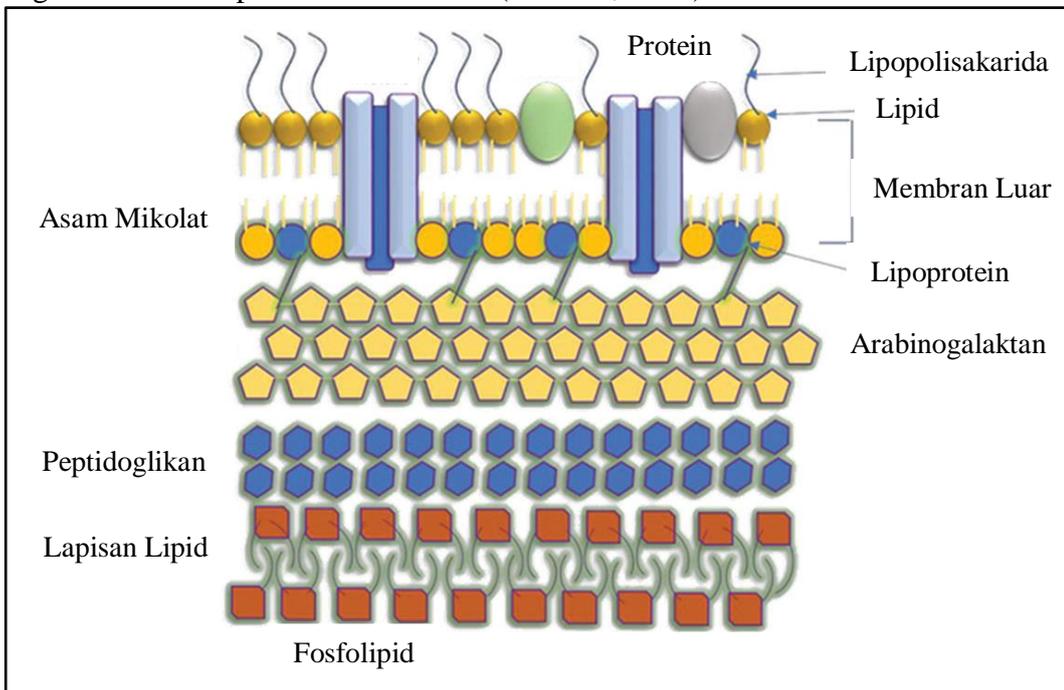
Gambar 1. *Mycobacterium tuberculosis* Dipindai dengan Mikrograf Elektron Mag 15549X.CDC (IDPH, 2011).

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) adalah bakteri berbentuk batang atau basil yang bersifat non-motil, tidak membentuk spora, aerob obligat, dan tahan asam (Dunn *et al.*, 2016). Panjang bakteri sekitar 2-4 μm dan lebar 0,2-0,5 μm . Bakteri ini bersifat aerob obligat, dimana bakteri membutuhkan oksigen untuk bermetabolisme dan ketika tidak tersedia oksigen maka bakteri tidak dapat bermetabolisme (Khare *et al.*, 2018). Bakteri ini juga bersifat parasit intraseluler fakultatif yang berkembang biak di dalam sel fagosit, khususnya makrofag dan monosit (Sakamoto, 2012). Mtb melakukan pembelahan secara lambat dan memakan waktu sekitar 15-20 jam. Bakteri ini dikenal sebagai bakteri tahan asam karena bakteri ini dapat membentuk kompleks asam yang stabil ketika ditambahkan pewarna akrilmetana. *Mycobacterium* spp. memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal dengan lapisan luar permukaan sel yang kaya akan lipid dan berfungsi dalam memberi sifat tahan asam (Khare *et al.*, 2018).

Ciri khas dari Mtb adalah adanya dinding sel yang memiliki kandungan lipid tinggi dan terdiri dari 40% dari berat dinding sel. Semua spesies Mtb menghasilkan kelompok asam lemak α -alkil dan β -hidroksi yang memiliki berat molekul tinggi (60-90 karbon) (Gazzaei, 2018). Mtb memiliki permukaan sel yang tersusun dari lapisan lilin karena adanya asam mikolat yang membuat bakteri ini menjadi bakteri tahan asam (Khare *et al.*, 2018).

Dinding sel Mtb terdiri dari lapisan dalam dan lapisan luar. Lapisan luar terdiri dari lipid dan protein. Lapisan dalam terdiri dari peptidoglikan, arabinogalaktan, dan asam mikolat yang secara kovalen terhubung untuk membentuk struktur kompleks yang memanjang dari lapisan luar membran plasma ke asam mikolat (Khare *et al.*, 2018). Lebih dari 60% dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* adalah lipid dan 50% asam mikolat keseluruhan

berat total dari dinding sel. Dinding sel ini bersifat hidrofobik dan dapat digunakan dalam penentuan virulensi (Gazzaei, 2018).

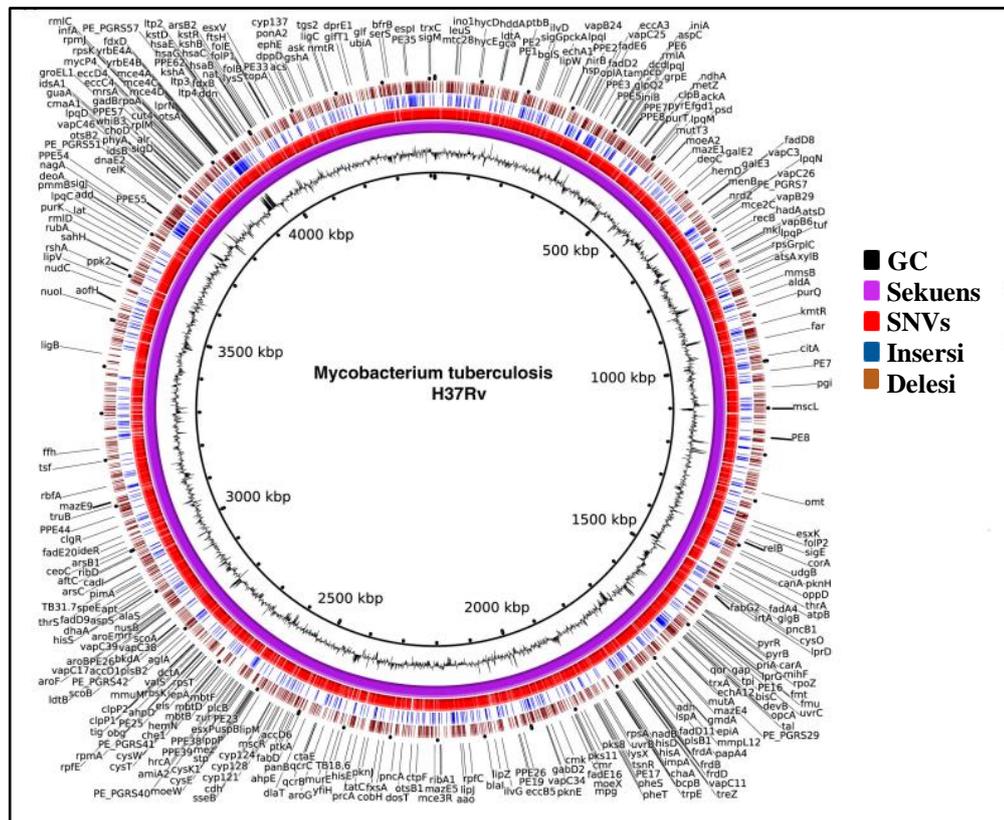


Gambar 2. Dinding Sel *Mycobacterium tuberculosis* (Gazzaei, 2018).

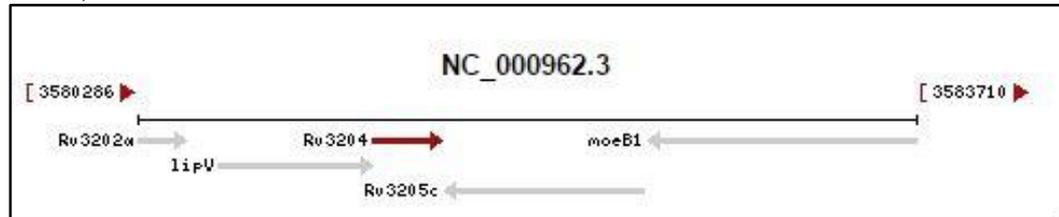
Asam mikolat, asam lemak rantai panjang 2-alkil, 3-hidroksi, adalah ciri khas dari dinding sel Mtb. Asam mikolat disusun dalam bentuk bilayer berasosiasi dengan lipid pada dinding sel yang berfungsi sebagai penghalang permeabilitas cairan yang rendah. Sifat-sifat asam mikolat adalah tercermin dalam fluiditas dan fleksibilitas dinding sel. Sifat kimiawi dari asam mikolat termasuk asam α -mikolat menunjukkan adanya ketidakjenuhan seperti cincin siklopropana. Selain itu, asam mikolat juga dapat ditemukan dalam bentuk teroksidasi di sebagian besar bakteri (Gazzaei, 2018).

Urutan asli dan anotasi *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv memiliki total 4.411.529 pasangan basa yang terdiri dari 3.974 gen, di mana 3.924 protein dikodekan dan 50 RNA yang stabil. *Database* genom terbaru menunjukkan bahwa strain H37Rv terdiri dari 4.008 gen yang mengkode total 3.906 protein dan 70 RNA stabil. Peta terpadu *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv berukuran 4,41 Mb

dengan kromosom sirkuler tunggal. Keseluruhan genom memiliki setidaknya kapasitas pengkodean 91% dengan sekitar 65,6% GC. Diantara total gen penyandi hanya 59% dari gen yang ditranskripsi, dengan ekspresi yang lebih tinggi diperoleh melalui koordinasi transkripsi dan replikasi, yang mencerminkan tingkat pertumbuhannya yang lambat. Kandungan GC yang tinggi dari genom menunjukkan bahwa komposisi asam amino dari proteom terlalu banyak seperti Glisin, Alanin, Prolin dan Arginin sedangkan asam amino yang dikode oleh AT kaya akan nukleotida (Lisin dan Asparagin) ditemukan dalam jumlah yang lebih rendah (Lamichhane *et al.*, 2018).



yang mengandung 102 asam amino dan memiliki ukuran gen 306 bp (Agus *et al.*, 2019). MTSP11 berfungsi dalam proses perbaikan dan metilasi DNA. Menurut NCBI, MTSP11 terletak di lokus Rv3204.



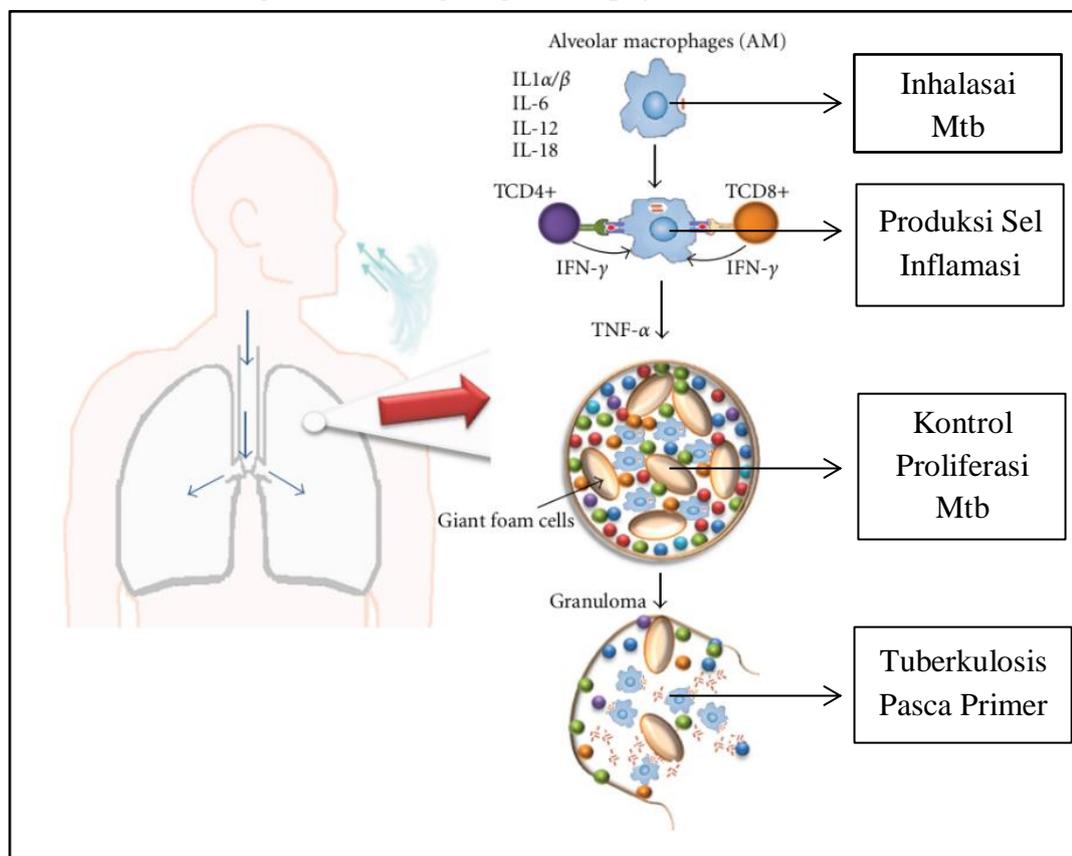
Gambar 4. Lokus Rv3204 (NCBI, 2020).

Menurut Lim *et al.*, (2004) MTSP11 merupakan protein hasil sekresi *Mycobacterium tuberculosis* yang mampu menginduksi produksi IFN-gamma (IFN- γ) dan interleukin (IL)-12p40 signifikan dalam sel mononuklear darah perifer dari reaktor tuberkulin yang sehat. Produksi IL-12p40 merupakan hasil respon terhadap rMTSP11 yang secara signifikan lebih tinggi daripada MTSP17. IL-12p40 adalah sitokin awal utama dalam perkembangan tanggapan imun protektif terhadap *Mycobacterium tuberculosis*.

II.3 Patogenesis *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis ditularkan oleh penderita TB secara *aerosol* (melalui udara). Ukuran tetesan (*droplet*) Mtb yang ditularkan oleh penderita TB berkisar antara 0,65-7,0 μm (Shiloh, 2016). Bakteri yang ditularkan mampu menyebar hingga ke bagian distal paru-paru. Sel pertama yang bertemu dengan mikobakteri adalah makrofag alveolar. Makrofag alveolar akan menghancurkan Mtb melalui proses fagositosis. Kemampuan Mtb untuk membentuk infeksi produktif sepenuhnya bergantung pada kelangsungan hidup bakteri tersebut di makrofag selama tahap awal. Mayoritas penderita yang terinfeksi Mtb secara efisien akan menahan pertumbuhan bakteri, sehingga bakteri tersebut dapat bertahan hidup secara laten tanpa menunjukkan gejala (Stutz *et al.*, 2017).

Mycobacterium tuberculosis memiliki kekurangan dalam hal virulensi, seperti tidak adanya toksin dan flagela, mengingat bahwa bakteri ini termasuk bakteri patogen. Meskipun begitu, Mtb telah mengembangkan adaptasi selnya untuk menghindari kekebalan tubuh dan bertahan hidup dalam tubuh inangnya. Hal menarik terlihat dari mekanisme *Mycobacterium tuberculosis* yang secara sistematis menonaktifkan, merangsang, atau mengubah jalur sinyal sel inang normal untuk meningkatkan kelangsungan hidupnya sendiri (Stutz *et al.*, 2017).



Gambar 5. Mekanisme Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. (Zuniga *et al.*, 2012).

Adapun mekanisme infeksi *Mycobacterium tuberculosis* yaitu sebagai berikut (Zuniga *et al.*, 2012):

1. Inhalasi Mtb. Peristiwa inhalasi Mtb melibatkan penelanan basil oleh makrofag alveolar dan seringkali pelisisan secara langsung dengan mekanisme bakterisida makrofag yang berbeda, termasuk generasi zat antara nitrogen

reaktif (RNI) dan zat antara oksigen reaktif (ROI). Keberhasilan mekanisme ini tergantung pada kapasitas mikrobisidal intrinsik dari makrofag alveolar, karakteristik patogen dari galur Mtb yang terhirup, dan lingkungan mikro inflamasi di lokasi infeksi.

2. Produksi Sel Inflamasi. Sel yang bertahan berkembang biak secara logaritmik di dalam makrofag alveolar dan DC (*Dendritic Cell*) serta menginduksi produksi mediator imun seperti TNF- α , IL-6, IL-12p80, IL-1 α , dan IL-1 β yang mengaktifkan makrofag untuk menginduksi pelisisan bakteri. IFN- γ adalah sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh sel T CD4 + dan CD8 + serta sel NK teraktivasi sebagai respons terhadap IL-12 dan IL-18 yang diproduksi oleh makrofag alveolar dan DC. Dalam keadaan inflamasi paru-paru yang disebabkan oleh proliferasi Mtb, sel-sel inflamasi perifer, termasuk monosit, neutrofil, dan DC, dibawa ke paru-paru. DC diaktifkan melalui pensinyalan TLR, dan monosit kemudian dibedakan menjadi makrofag efektor yang menghasilkan zat mikrobisidal termasuk TNF- α , yang berkontribusi pada kontrol pertumbuhan Mtb, dan pembentukan granuloma.
3. Kontrol Proliferasi Mtb. Fase ini ditandai oleh penghambatan proliferasi Mtb dengan interaksi sel-sel yang efisien dan pembentukan granuloma. Sebagai hasil dari stimulasi sitokin kronis, makrofag berdiferensiasi menjadi sel epiteloid dan menjadi sel raksasa yang menyatu. Pembentukan granuloma ditandai oleh agregasi sel T dan makrofag yang terinfeksi Mtb yang dihambat penyebarannya. Selain peranan utama dari sitokin proinflamasi (misalnya, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-17, dan IL-23) dalam pembentukan dan stabilitas granuloma, adanya kemokin seperti CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, dan CXCL10 sangat penting dalam pembentukan sel-sel inflamasi untuk

membentuk granuloma. Mekanisme ini memungkinkan pengembangan infeksi TB primer yang terlokalisasi yang akhirnya dapat menjadi infeksi yang stabil (juga dikenal sebagai laten). Pada lebih dari 90% infeksi laten mengandung Mtb yang dibatasi oleh dinding granuloma. Siklus aktivasi dan penekanan seluler mencegah replikasi dan penyebaran Mtb.

4. Tuberkulosis Pasca Primer. Sebagai keberlanjutan dari Mtb yang berhasil bertahan, terkait kegagalan dalam pengawasan sistem imun, penyakit laten dapat diaktifkan kembali, menginduksi kerusakan bronkus di dekatnya dan mengkondisikan penyebaran Mtb ke daerah lain di paru-paru.

II.4 Respon Imun Terhadap *Mycobacterium tuberculosis*

Mekanisme respon imun terhadap infeksi bakteri patogen intraseluler sangat tergantung dari keberadaan lokasi infeksi. Suatu zat dalam bentuk hormon dan sel-sel lain dalam reaksi imunologi atau reaksi inflamasi yang berfungsi sebagai sinyal intrasel akan dilepaskan oleh limfosit T atau yang lebih dikenal sebagai limfokin. Limfokin yang penting dalam proses infeksi *Mycobacterium tuberculosis* diantaranya yaitu, faktor kemotaksis makrofag, faktor aktivasi limfosit, dan interferon gamma (IFN- γ). Pada lesi TB, limfokin dari sel T akan menyebabkan akumulasi dan aktivasi makrofag, serta peningkatan jumlah limfosit TNF-alpha (TNF- α) dan TGF-beta (TGF- β) akan mengakibatkan kerusakan jaringan (Jabir *et al.*, 2018).

Fase pertama infeksi *Mycobacterium tuberculosis* ditandai dengan fagositosis makrofag. Fagositosis oleh makrofag akan terjadi akibat aktivitas bakteri dalam fagosom. Selama 2-6 minggu pembentukan granuloma yang difasilitasi oleh CMI akan terjadi dan bakteri kemudian akan hidup dan menetap selamanya di tengah-tengah granuloma. Interaksi makrofag-bakteri diawali oleh

hubungan antara dinding sel bakteri dan makrofag pada saat fusi fagosom-lisosom. Penghambatan pertumbuhan bakteri, bahkan kematian, akan lebih lanjut terjadi, reaksi inflamasi dan presentasi antigen sel T selanjutnya akan muncul. Dalam timus, sel T mengekspresikan antigen permukaan, CD4, CD5, dan CD8, yang dalam perkembangan selanjutnya berada dan menandai subset sel T. Sel limfosit yang berperan dalam reaksi CMI pada infeksi tuberkulosis adalah sel limfosit T helper (CD4), dan sel penekan T limfosit (CD8) adalah sel dengan kekhususan dan fungsi yang dikontrol ketat oleh MHC (Jabir *et al.*, 2018).

Mycobacterium tuberculosis difagositosis oleh makrofag yang berfungsi sebagai APC (*Antigen Presenting Cell*). Antigen ini disekresikan oleh Mtb bersama dengan MHC Kelas II dan akan bereaksi dengan CD4 pada reseptor T dan melepaskan IL-1, selanjutnya akan menggantikan CD4. Sinyal ini akan memberi tanda pada limfosit untuk menghasilkan limfokin, termasuk interferon- γ , IL-2, BCGF (*B Cell Growth Factor*), dan faktor kemotaksis. IFN- γ akan mengaktifkan makrofag untuk menghancurkan intrasel *Mycobacterium tuberculosis*. Pengaktifan makrofag oleh IFN- γ tersebut akan menimbulkan reaksi antara bagian somatik dari antigen bakteri yang bereaksi dengan CD4 melalui ekspresi MHC Kelas II dengan makrofag sebagai APC. Makrofag aktif ini akan menyebabkan beberapa perubahan, seperti terjadinya peningkatan aktivitas hidrolase dan peningkatan metabolisme glukosa (Jabir *et al.*, 2018).

II.5 Peranan Interleukin 6 (IL-6)

Interleukin 6 (IL-6) merupakan sitokin yang tersusun dari 184 asam amino. IL-6 disekresikan oleh sel stroma dan sel imun yang teraktivasi, seperti sel T, monosit atau makrofag, sel endotelium, fibroblas, dan hepatosit. IL-6 akan terekspresi saat terjadi stres seluler, seperti inflamasi (peradangan), infeksi, luka,

dan kanker. Kadar IL-6 dapat meningkat sampai ribuan kali lipat ketika mengalami stres seluler serta membantu dalam mengkoordinasikan respon terhadap disregulasi homeostasis jaringan (Choy and Rose-Jhon, 2017).

IL-6 merupakan sitokin proinflamasi yang berperan penting dalam fase respon akut dan dalam proses transisi dari fase akut menuju fase inflamasi/peradangan kronis (Choy and Rose-Jhon, 2017). IL-6 bersama dengan beberapa sitokin proinflamasi lain seperti IFN- γ , TNF- α , IL-12, dan IL-18 berfungsi sebagai imunitas protektif terhadap patogen selama fase awal infeksi. IL-6 berfungsi untuk menstimulasi sekresi IFN- γ dalam mengaktivasi makrofag selama terjadi infeksi Mtb (Joshi *et al.*, 2015).

Sekresi IFN- γ oleh IL-6 merupakan bentuk respon imun protektif terhadap infeksi Mtb dan berperan penting sebagai pertahanan awal terhadap pertumbuhan bakteri di dalam paru-paru. Fungsi IL-6 pada tuberkulosis aktif umumnya bersifat negatif, seperti meningkatkan pertumbuhan Mtb di dalam sel monosit perifer serta menghambat produksi TNF- α dan IL-1 β yang dapat meningkatkan kemampuan intraseluler dalam membunuh Mtb dan perkembangan granuloma (Correia *et al.*, 2009).

II.6 Vaksin

Vaksin adalah zat biologis yang memberikan kekebalan adaptif aktif terhadap penyakit tertentu. Vaksin biasanya mengandung obat yang menyerupai mikroorganisme penyebab penyakit. Vaksin sering dibuat dari salah satu mikroorganisme yang terbunuh atau dilemahkan, toksin atau protein permukaannya yang dimasukkan melalui mulut, suntikan, ataupun melalui semprotan hidung untuk merangsang sistem kekebalan tubuh (Dai *et al.*, 2019). Pemberian vaksin diharapkan dapat merangsang respon imun lebih cepat apabila

tubuh terpapar kembali oleh patogen dan dapat menciptakan imunitas kelompok (*Herd Immunity*) (Skwarczynski and Toth, 2017).

Menurut WHO (2013), terdapat empat jenis vaksin yang dikategorikan sesuai dengan kegunaan antigen dalam pembuatan vaksin, yaitu:

1. *Live Attenuated Vaccines* (LAV)

LAV merupakan vaksin yang telah ada sejak tahun 1950-an. LAV berasal dari patogen berupa virus atau bakteri yang dilemahkan dalam kondisi laboratorium. Ketika LAV diinjeksikan ke dalam tubuh, patogen yang dilemahkan tersebut akan hidup di dalam tubuh, tetapi karena telah dilemahkan, patogen tersebut tidak akan menyebabkan penyakit atau hanya menimbulkan penyakit yang sangat ringan. Menurut Centers Disease Control and Prevention (CDC) (2015), respon imun terhadap LAV hampir sama ketika tubuh terinfeksi penyakit secara alami. Sistem imun tidak dapat membedakan antara infeksi LAV maupun infeksi virus lainnya.

Keuntungan menggunakan LAV, yaitu mampu menstimulasi respon imun seluler dan humoral secara cepat karena adanya pola molekuler terkait patogen (PAMPs), hanya memerlukan pemberian vaksin sebanyak satu sampai dua dosis untuk membentuk sistem kekebalan tubuh jangka panjang, penggunaan seluruh bagian patogen dapat merangsang respon imun terhadap antigen dalam bentuk struktur alaminya. Pemberian vaksin seperti Polio Sabin dapat diberikan secara oral sehingga memiliki biaya yang lebih murah. Adapun kelemahan LAV, yaitu virus yang hidup di dalam vaksin dapat orang-orang dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah, pemberian vaksin terbatas pada orang yang mengalami immunosupresi, proses pembuatan dan biaya transportasi vaksin yang mahal, dan perlakuan khusus seperti pendinginan merupakan faktor penting untuk menjaga

kualitas vaksin (meningkatkan imunogenitas vaksin) (Skwarczynski and Toth, 2017). Beberapa contoh vaksin LAV yang direkomendasikan oleh WHO yaitu, BCG (tuberkulosis), Polio Sabin (oral), *Measles* (rubella dan varicella), Rotavirus, dan demam kuning (*Yellow Fever*).

2. *Inactivated Whole-Cell Vaccines*

Inactivated Whole-Cell Vaccines merupakan vaksin yang terbuat dari mikroorganisme seperti virus dan bakteri yang telah dimatikan melalui proses mekanik dan kimiawi. Vaksin ini tidak menyebabkan suatu penyakit, bahkan pada orang yang mengidap imunodefisiensi. *Inactivated Whole-Cell Vaccines* tidak dapat bereplikasi (CDC, 2015). Pemberian *Inactivated Whole-Cell Vaccines* selalu membutuhkan banyak dosis. Dosis pertama tidak menghasilkan sistem imun protektif, tetapi sebagai “pengenalan” terhadap sistem imun. Respon imun protektif berkembang setelah dosis kedua atau ketiga (CDC, 2015).

Keuntungan menggunakan *Inactivated Whole-Cell Vaccines* yaitu penggunaan seluruh patogen dapat menstimulasi kekebalan tubuh terhadap antigen secara alami pada bagian permukaan patogen, berisi PAMPs, memiliki resiko infeksi yang rendah, dapat diberikan kepada semua orang bahkan pada orang yang mengalami gangguan sistem imun, lebih aman dibandingkan dengan LAV, dapat dikirim dalam bentuk kering beku, dan memiliki jangka waktu penyimpanan yang lebih lama (Skwarczynski and Toth, 2017). Adapun kelemahan *Inactivated Whole-Cell Vaccines*, yaitu patogen yang dimatikan tidak dapat berkembang dengan baik sehingga diperlukan antigen dalam jumlah besar untuk menstimulasi sistem imun (pemberian dosis yang lebih tinggi), dapat menimbulkan mutasi seperti pada virus influenza, menimbulkan reaksi pasca vaksin seperti demam, nyeri, kemerahan dan bengkak di lokasi penyuntikan, serta

biaya yang mahal (Skwarczynski and Toth, 2017). Beberapa contoh *Inactivated Whole-Cell Vaccines* yang direkomendasikan oleh WHO yaitu, Pertussis (wP) dan *Inactivated Polio Vaccine (IPV)*.

3. Vaksin Subunit

Vaksin subunit merupakan vaksin, yang sama seperti *Inactivated Whole-Cell Vaccines*, terbuat dari komponen atau bagian tertentu dari patogen. Vaksin subunit memiliki perbedaan dengan *Inactivated Whole-Cell Vaccines*, yaitu vaksin subunit hanya mengandung bagian antigenik dari patogen. Bagian dari patogen inilah yang akan digunakan untuk menstimulasi respon imun protektif.

Vaksin subunit terbagi menjadi tiga jenis, yaitu (WHO, 2013):

1. Vaksin subunit berbasis protein, yaitu vaksin yang menggunakan bagian protein spesifik dari patogen sebagai komponen utama untuk menstimulasi respon imun.
2. Vaksin subunit berbasis polisakarida, yaitu vaksin yang menggunakan bagian kapsul polisakarida (gula) dari patogen, khususnya pada bakteri.
3. Vaksin subunit yang terkonjugasi, yaitu vaksin yang telah terkonjugasi dengan molekul polisakarida dan molekul protein.

Keuntungan menggunakan vaksin subunit yaitu vaksin tidak bersifat infeksius, dapat diberikan kepada orang yang memiliki sistem imun lemah, dan memiliki efek samping yang lebih sedikit (Skwarczynski and Toth, 2017). Selain itu, vaksin subunit memiliki beberapa keuntungan lain seperti dapat memperkuat sistem imun menggunakan adjuvan, efektif pada rute intranasal dan mulut, serta berpotensi dalam pengembangan antigen spesifik sebagai perlindungan untuk melawan penyakit (Soyi, 2016). Adapun kelemahan vaksin subunit, yaitu beberapa antigen memiliki kapabilitas yang terbatas dalam menstimulasi respon

imun protektif, memerlukan bahan tambahan (ajuvan) untuk meningkatkan respon imun, tidak mampu menstimulasi respon sel T memori jika tidak berkonjugasi dengan protein, dan biaya pembuatan vaksin relatif mahal (Skwarczynski and Toth, 2017). Beberapa contoh vaksin subunit yang direkomendasikan oleh WHO yaitu, Acellular Pertussis (aP), Hepatitis B (HepB), *Haemophilus influenzae* type b conjugate (Hib), Pneumococcal conjugate, 7-valent (PCV-7), 10-valent (PCV-10), dan 13-valent (PCV-13).

4. Vaksin Toksoid (*Inactivated toxins*)

Vaksin toksoid merupakan vaksin yang terbuat dari toksin hasil produksi bakteri, seperti tetanus dan difteri. Toksin yang berasal dari protein (toksoid) bersifat aman/tidak berbahaya dan bisa digunakan sebagai antigen sebagai komponen vaksin untuk menstimulasi sistem imun. Peningkatan sistem imun menggunakan vaksin toksoid dapat dilakukan dengan cara mengabsorpsi toksoid ke aluminium atau garam kalsium, sebagai bahan tambahan (ajuvan). Vaksin toksoid aman digunakan dan tidak menimbulkan penyakit, stabil, tidak berubah jika terjadi perubahan temperatur, kelembaban dan cahaya. Contoh vaksin toksoid yaitu *Tetanus toxoid* (TT) dan *Diphtheria toxoid* (DT dan Td) (WHO, 2013).

Selain keempat jenis vaksin di atas, terdapat dua jenis vaksin yaitu vaksin rekombinan dan vaksin DNA. Vaksin rekombinan merupakan vaksin yang terbuat dari antigen yang telah direkayasa secara genetik (CDC, 2015). Keuntungannya, yaitu dapat memilih vektor, vektor dapat tumbuh dan disimpan dengan mudah, aman dan stabil, secara umum tidak memerlukan ajuvan, serta antigen yang tidak diinginkan dapat dieliminasi dengan mudah. Adapun kelemahan vaksin rekombinan yaitu memerlukan biaya tambahan untuk pengembangan vektor. Contoh vaksin rekombinan, Hepatitis B dan HPV (Skwarczynski and Toth, 2017).

Vaksin DNA merupakan vaksin yang terbuat dari plasmid bakteri yang telah dipurifikasi. Saat ini, vaksin DNA banyak dikembangkan tidak hanya bertujuan untuk profilaksis, tetapi juga untuk menangani penyakit non-infeksi seperti kanker dan rematik (Myhr, 2016). Keuntungan menggunakan vaksin DNA yaitu DNA yang digunakan bersifat aman dan stabil, produksi plasmid DNA dapat dilakukan dalam skala besar dan dalam waktu yang singkat, dapat direkayasa dengan plasmid DNA berspektrum luas untuk beberapa epitop antigen, serta dapat meningkatkan sistem imun terhadap antigen seperti virus dan bakteri dalam jangka waktu yang lama. Contoh vaksin DNA yaitu vaksin *mosquito-borne virus* untuk mencegah penyakit *West Nile Virus* (Radji, 2009).

II.6.1 Vaksin *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)

Salah satu vaksin yang terus dikembangkan adalah vaksin BCG. Vaksin ini dapat mencegah penyakit tuberkulosis. BCG atau *Bacillus Calmette-Guérin* merupakan satu-satunya vaksin tuberkulosis yang digunakan selama hampir 100 tahun terakhir (Ahsan, 2015). Vaksin BCG pertama kali ditemukan pada tahun 1921 oleh dua ilmuwan Perancis bernama Albert Calmette dan Camille Guérin (Kaufmann *et al.*, 2016). Kedua ilmuwan ini berhasil membuat vaksin tuberkulosis yang berasal dari bakteri *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan (Clark *et al.*, 2006). Vaksinasi BCG dapat diberikan pada bayi yang baru lahir (WHO, 2018). Pemberian vaksin di awal kelahiran dapat mencegah penyakit serius pada anak, seperti TB meningitis dan TB milier (Zhu *et al.*, 2018).

Kelebihan vaksin BCG yaitu memiliki efektifitas yang bervariasi dari 0-80% pada populasi berbeda di dunia. Hasil meta analisis menunjukkan bahwa vaksin BCG dapat menurunkan resiko semua jenis tuberkulosis (lebih dari 50%), khususnya pada tuberkulosis meningitis dan tuberkulosis milier yang mencapai

70% pada bayi dan anak-anak (Tafreshi, 2016). Pemberian vaksin ini hanya dapat melindungi bayi dan anak-anak selama kurang lebih 10-15 tahun pertama kehidupan mereka, khususnya dari tuberkulosis meningitis dan tuberkulosis milier, namun tidak berlaku untuk tuberkulosis paru (Migliori *et al.*, 2017).

Namun, vaksin BCG memiliki beberapa kelemahan, seperti BCG hanya efektif melindungi bayi dan anak-anak dari tuberkulosis meningitis dan tuberkulosis milier, namun tidak memberi perlindungan terhadap tuberkulosis paru (Nieuwenhuizen *et al.*, 2018), memberikan hasil positif pada tes tuberkulin (TST) (Lim *et al.*, 2004), memiliki efektivitas yang bervariasi pada tuberkulosis paru terutama pada orang dewasa atau pada usia remaja akhir (Mcshane *et al.*, 2016) karena berkurangnya kekebalan tubuh seiring bertambahnya usia (Sarhan, 2010), pemberian vaksin BCG kepada bayi penderita HIV dapat menyebabkan penyakit BCGosis (Kaufmann *et al.*, 2016). Menurut Nieuwenhuizen *et al.* (2018), tingkat efektivitas BCG lebih tinggi di negara-negara beriklim dingin, seperti di Inggris dan Norwegia, serta menunjukkan tingkat efektivitas yang rendah di negara-negara beriklim hangat seperti di India dan Indonesia. Tingkat efektivitas yang bervariasi ini disebabkan oleh peningkatan paparan atau kontaminasi bakteri lingkungan yang nampaknya mengurangi reaktivitas BCG.

Selain beberapa hal diatas, bervariasinya efektivitas BCG dapat disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya (Tafreshi, 2016):

1. Jenis media kultur dan perbedaan strain BCG yang digunakan.
2. Variasi genetik pada populasi yang diteliti.
3. Terjadinya kontaminasi bakteri lingkungan seperti *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium marinum*, dan *Mycobacterium intraseluler* yang menyebabkan BCG tidak mampu memicu respon imun.

II.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA adalah tes cepat yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur antibodi atau antigen terhadap virus, bakteri, dan bahan lainnya. Metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi banyak agen infeksius yang mempengaruhi unggas dan mamalia. Metode ELISA menggunakan fase padat yang terdiri dari 96 pelat polistiren, meskipun bahan lain juga dapat digunakan. Fungsi fase padat adalah untuk melumpuhkan antigen atau antibodi dalam sampel, hal ini terjadi karena antigen atau antibodi mengikat fase padat. Setelah inkubasi, pelat dicuci untuk menghilangkan bahan yang tidak terikat. Dalam beberapa pengujian konjugat kemudian ditambahkan ke pelat dan diinkubasi (Mahdi, 2018).

Konjugat terdiri dari antigen atau antibodi yang telah dilabeli dengan enzim. Bergantung pada format uji, bagian reaktif pada konjugat secara imunologis terikat dengan fase padat atau sampel. Bagian enzim pada konjugat dapat dideteksi. Pelat dicuci lagi dan substrat enzim (hidrogen peroksida dan kromogen) ditambahkan dan diinkubasi. Warna akan timbul akibat pengikatan enzim dan kepadatan optik dibaca dengan pembacaan pelat ELISA (Mahdi, 2018).

ELISA menggunakan konsep imunologi dasar dari antigen yang mengikat antibodi spesifiknya, yang memungkinkan deteksi sejumlah kecil antigen seperti protein, peptida, hormon, atau antibodi dalam sampel cairan. ELISA menggunakan antigen dan antibodi berlabel enzim untuk mendeteksi molekul biologis, dimana enzim yang paling umum digunakan adalah alkalin fosfatase (EC 3.1.3.1) dan glukosa oksidase (E.C. 1.1.3.4). Antigen dalam fase fluida diimobilisasi, biasanya ke dalam 96 pelat mikrotiter. Antigen dibiarkan berikatan dengan antibodi spesifik kemudian dideteksi oleh antibodi sekunder yang ditambah enzim. Substrat kromogenik untuk enzim menghasilkan perubahan

warna atau fluoresensi yang mengindikasikan adanya antigen. Tindakan kuantitatif atau kualitatif dapat dinilai berdasarkan pembacaan kolorimetri. Substrat fluorogenik memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dan secara akurat dapat mengukur kadar konsentrasi antigen dalam sampel (Gan *et al.*, 2013).

Ada beberapa metode ELISA yang dapat digunakan untuk mendeteksi antigen atau antibodi, diantaranya (Gan *et al.*, 2013):

1. *Indirect* ELISA

Sampel yang harus dianalisis untuk antigen spesifik melekat pada pelat mikrotiter, diikuti oleh larutan protein yang tidak bereaksi seperti serum albumin sapi untuk memblokir area pelat yang tidak dilapisi dengan antigen. Antibodi primer yang berikatan khusus dengan antigen, kemudian ditambahkan, diikuti oleh antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim. Substrat enzim digunakan untuk mengukur antibodi primer melalui perubahan warna. Konsentrasi antibodi primer yang ada dalam serum berkorelasi langsung dengan intensitas warna. Kelemahan utama *Indirect* ELISA adalah metode imobilisasi antigen tidak spesifik. Ketika serum digunakan sebagai antigen uji, semua protein dalam sampel dapat menempel pada pelat mikrotiter. Kelemahan ini dapat diatasi dengan penangkap antibodi khusus untuk uji antigen spesifik yang diambil dari serum, seperti pada metode *Sandwich* ELISA.

2. *Sandwich* ELISA

Metode *sandwich* digunakan untuk mengidentifikasi antigen sampel spesifik. Permukaan sumur pelat disiapkan dengan jumlah antibodi terikat yang diketahui untuk menangkap antigen yang diinginkan. Setelah situs pengikatan spesifik tidak diblokir menggunakan albumin serum sapi, sampel yang mengandung antigen diterapkan ke pelat. Antibodi primer spesifik kemudian

ditambahkan ke "*sandwich*" antigen. Antibodi sekunder yang terhubung dengan enzim digunakan untuk mengikat antibodi primer. Konjugat antibodi-enzim yang tidak terikat dibersihkan. Substrat ditambahkan dan dikonversi secara enzimatik ke warna yang nantinya dapat dikuantifikasi. Salah satu keuntungan menggunakan antibodi spesifik yang dimurnikan untuk menangkap antigen adalah metode ini dapat menghilangkan kebutuhan untuk memurnikan antigen dari campuran antigen lain, sehingga menyederhanakan pengujian dan meningkatkan spesifisitas dan sensitivitasnya.

Metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi berbagai antibodi, seperti IL-6. Metode yang digunakan berupa Human Interleukin 6 Platinum ELISA Kit. *Sandwich* ELISA Kit ini dapat digunakan untuk mendeteksi secara kuantitatif kadar IL-6 Platinum (disebut juga IL-6) secara *in-vitro* dalam serum, plasma, sel lisis, sel kultur supernatan, dan jaringan yang terhomogenisasi. Prinsip kerja Kit ini yaitu plate ELISA terlebih dahulu dilapisi dengan antibodi IL-6. IL-6 yang terdapat pada sampel akan berikatan dengan antibodi yang telah melekat pada permukaan plate. Antibodi IL-6 yang telah dibiotinilasi ditambahkan ke dalam plate dan berikatan dengan IL-6 pada sampel. Streptavidin-HRP ditambahkan dan berikatan dengan IL-6 yang terbiotinilasi. Setelah proses inkubasi, Streptavidin-HRP yang tidak terikat akan tercuci selama proses pencucian. *Substrate solution* ditambahkan ke dalam sumuran dan terjadi perubahan warna yang menunjukkan kadar IL-6. Reaksi dihentikan dengan penambahan *stop solution* asam dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm (BT Laboratory, 2021).

3. *Compepetitive* ELISA

Kunci utama metode *Compepetitive* ELISA adalah proses reaksi kompetitif antara antigen sampel dan antigen yang terikat pada sumur-sumur pelat

mikrotiter dengan antibodi primer. Pertama, antibodi primer diinkubasi dengan antigen sampel dan kompleks antibodi-antigen yang dihasilkan ditambahkan ke sumur yang telah dilapisi dengan antigen yang sama. Setelah masa inkubasi, setiap antibodi yang tidak terikat dibersihkan. Semakin banyak antigen dalam sampel, semakin banyak antibodi primer akan terikat pada antigen sampel. Oleh karena itu, akan ada sejumlah kecil antibodi primer yang tersedia untuk mengikat antigen yang dilapisi pada sumur.

Antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim ditambahkan kemudian diikuti oleh substrat untuk memperoleh sinyal kromogenik atau fluoresen. Tidak adanya warna pada sumur pelat menunjukkan adanya antigen dalam sampel. Keuntungan utama *Competitive ELISA* adalah sensitivitasnya yang tinggi terhadap perbedaan komposisi dalam campuran antigen kompleks, bahkan ketika pendeteksi antibodi spesifik hadir dalam jumlah yang relatif kecil. Metode ini sering digunakan untuk mendeteksi antibodi HIV dalam serum pasien. Antigen HIV dilapisi pada permukaan sumur pelat mikrotiter dan dua antibodi spesifik diterapkan: satu dikonjugasikan dengan enzim dan yang lainnya dari serum pasien. Persaingan kumulatif terjadi antara kedua antibodi untuk antigen yang sama. Jika antibodi hadir dalam serum maka reaksi antigen-antibodi terjadi, meninggalkan jumlah antigen yang sangat rendah yang tersedia untuk mengikat dengan antibodi berlabel enzim. Sebagian besar antibodi berlabel enzim terikat dicuci kemudian akan menghasilkan perubahan warna minimal atau tidak ada. Tidak adanya warna merupakan indikasi sampel HIV-positif.

4. *Multiple and Portable ELISA*

Multiple and Portable ELISA adalah metode baru yang menggunakan media *multicatcher* dengan 8 atau 12 pin *immunosorbent* yang melekat di bagian

tengah dan dapat direndam dalam sampel yang dikumpulkan. Pencucian dan inkubasi dengan antigen dan kromogen enzim yang terkonjugasi dilakukan dengan mencelupkan pin ke dalam *microwell prefilled* dengan reagen. Keuntungan utama dari kit lab siap pakai ini adalah relatif murah, dapat digunakan untuk skrining populasi yang besar, dan tidak memerlukan tenaga terampil atau peralatan laboratorium, menjadikannya alat yang ideal untuk pengaturan sumber daya rendah. Aplikasi klinis meliputi deteksi di tempat perawatan penyakit menular, racun bakteri, penanda onkologis, dan skrining obat.