

SKRIPSI

**ANALISIS KADAR IL-6 PADA SERUM PENDERITA TUBERKULOSIS
AKTIF DAN ORANG SEHAT SETELAH DIREAKSIKAN DENGAN
PROTEIN REKOMBINAN sMTL-13 SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN
TUBERKULOSIS**

Disusun dan diajukan oleh

FERDINANDO S SILANG

H041171301



**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 sMTL-13 SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN
TUBERKULOSIS**

Disusun dan diajukan oleh :

FERDINANDO S SILANG

H041171301

**Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam Rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Studi Biologi Fakultas Matematika dan
Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
pada tanggal 12 Juli 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan**

Menyetujui,

Pembimbing Utama



Dr. Rosana Agus, M. Si
NIP. 19650905 199103 2 003

Pembimbing Pertama



Dr. Zaraswati Dwyana, M. Si
NIP. 19651209 199000 2 001

Ketua Departemen,



Dr. Nur Haedar, M. Si
NIP. 19680129 199702 2001

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ferdinando S Silang

NIM : H041171301

Departemen : Biologi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul Analisis Kadar IL-6 pada Serum Penderita Tuberkulosis aktif dan Orang sehat setelah Direaksikan dengan Protein Rekombinan sMTL-13 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, 12 Juli 2021

Yang Menyatakan



Ferdinando S Silang

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena atas Berkah, Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini yang berjudul “Analisis Kadar IL-6 pada Serum Penderita Tuberkulosis aktif dan Orang sehat setelah Direaksikan dengan Protein Rekombinan sMTL-13 sebagai Kandidat Vaksin Tuberkulosis” dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Skripsi ini disusun dengan segala keterbatasan dari penulis, sehingga masih memiliki berbagai macam kekurangan. Oleh karena itu, penulis membutuhkan dukungan berupa saran dan kritik dari berbagai pihak yang bersifat membangun untuk kesempurnaan skripsi ini. Tanpa dukungan, motivasi, saran dan kritik dari berbagai pihak penulis akan kesulitan dalam menyelesaikan skripsi ini.

Selama proses penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan doa untuk penulis. Penulis ingin menyampaikan terima kasih yang mendalam kepada kedua orang tua penulis Ayahanda Sumardy dan Ibunda Elda Suryani yang penulis hormati, sayangi, dan cintai atas pengorbanan, dukungan, motivasi kasi sayang dan doanya dalam membesarkan dan mendidik penulis hingga saat ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada semua keluarga yang selalu memberikan doa dan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si selaku Pembimbing Akademik yang selalu memberi saran, semangat dan motivasi dalam menjalani masa studi, Ibu Dr. Rosana Agus, M.Si selaku Pembimbing Utama dan Ibu Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si selaku Pembimbing Pertama, atas dukungan, bantuan, arahan, saran, kritik, waktu dan kesabarannya menghadapi penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Hasanuddin, Ibu Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu., M.A bersama staf atas kemimpinan dan kebijakannya selama ini.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Si beserta staf bagi kemimpinan dan kebijakannya serta membantu penulis dalam hal kepentingan akademik dan administrasi.
3. Ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Ibu Dr. Nur Haedar, M.Si atas ilmu dan motivasinya.
4. Tim penguji skripsi Bapak Dr. Eddy Soekandarsi, M.Si dan Ibu Dr. Elis Tambaru, M.Si atas bimbingan dan arahnya selama penyusunan skripsi ini.
5. Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, yang telah mendidik, membina, dan memberikan ilmunya selama perkuliahan serta kepada Staf dan Pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu dalam bidang administrasi dan dukungan selama ini.

6. Kak Handayani H S.Si, M. kes beserta seluruh analis HUM-RC beserta staff RS. Universitas Hasanuddin yang telah memberi bimbingan dan pengarahan dalam mengerjakan penelitian di HUM-RC
7. Sahabat seperjuangan (Tim sobat-sobat TB) dalam penelitian ini Jesika Bangkaran, Dian Ramadhani, Keyza Tangketasik, dan Paula Natasha yang selalu mendukung, memberi semangat, dan menemani dalam suka duka penyelesaian skripsi dan penelitian ini.
8. Teman-teman seperjuangan Perbulutangkis Muh. Faathir, Hasmono, Sahril, Syamsuriadi yang selalu menyemangati, menemani, mengajak, dan memotivasi lewat permainan badminton yang memicu semangat untuk mengerjakan tugas akhir ini.
9. Teman-teman *Big Boss* yang selalu ada menemani saat suka dan duka setiap perjuangan selama masa studi hingga selesainya tugas akhir ini
10. Teman-teman Pengurus UKMB Unhas 2019 dan 2020 yang telah memberi semangat, dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini
11. Lembaga tercinta UKM Bulutangkis Unhas yang telah memberi banyak pengalaman yang berarti selama masa studi di Universitas Hasanuddin
12. Teman-teman Biologi Angkatan 2017 yang telah banyak membantu dan memberikan semangat dan motivasinya selama perkuliahan.
13. Teman-teman GMKI FMIPA Unhas khususnya angkatan 2017 yang selalu memberi semangat dan doa dengan kasih dalam menyelesaikan skripsi ini
14. Teman-teman IPA 5 SMAN 1 Pasangkayu yang telah memberikan semangat dan motivasinya.

Pada akhirnya saya berterima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan namanya satu persatu yang telah banyak membantu, memberikan semangat, motivasi, saran dan kritiknya hingga karya tulis ini terselesaikan. Semoga Tuhan YME memberikan rahmat dan lindungannya serta karya tulis ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan, AMIN.

Makassar, 12 Juli 2021

Penulis

ABSTRAK

Parameter protein rekombinan berpotensi sebagai kandidat vaksin tuberkulosis adalah dapat meningkatkan dan menstimulasi produksi sitokin dalam hal ini adalah IL-6, yang ditandai dengan adanya perbedaan konsentrasi yang signifikan antara serum penderita TB aktif dan orang sehat ketika direaksikan dengan antigen dalam hal ini protein rekombinan sMTL-13. Penelitian ini bertujuan untuk menguji analisis kadar sitokin IL-6 yang direaksikan dengan protein rekombinan sMTL-13 pada serum penderita TB aktif dan orang sehat sebagai kandidat vaksin Tuberkulosis. Penelitian ini dilakukan pada Februari sampai Mei 2021 di Laboratorium *Hasanuddin Medical Research Center* (HUM-RC) Rumah Sakit Universitas Hasanuddin Makassar. Analisis Kadar IL-6 dilakukan dengan cara mereaksikan antigen protein rekombinan sMTL-13 dengan serum penderita TB aktif dan serum orang sehat kemudian diukur konsentrasi IL-6 pada kedua serum sebagai indikator suatu protein rekombinan berpotensi dijadikan kandidat vaksin tuberkulosis melalui uji ELISA. Analisis kadar menunjukkan bahwa konsentrasi IL-6 pada serum penderita TB aktif lebih tinggi yaitu 91,04 pg/ml dibandingkan dengan konsentrasi IL-6 pada serum darah orang sehat yang hanya memiliki nilai konsentrasi sebesar 74,45 pg/ml. Protein sMTL-13 menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap bakteri TB sehingga layak dijadikan sebagai kandidat vaksin tuberkulosis.

Kata kunci : sMTL-13, IL-6, Tuberkulosis, Uji ELISA, Vaksin.

ABSTRACT

The potential recombinant protein parameter as a candidate for the tuberculosis vaccine is that it can increase and stimulate cytokine production in this case IL-6, which is characterized by a significant concentration difference between serum active TB sufferers and healthy serum people when recorded with antigens in this case, recombinant protein sMTL-13. This study aims to test the analysis of IL-6 cytokine levels reacted with the recombinant protein sMTL-13 in serums of active TB patients and healthy serum as candidates for the tuberculosis vaccine. This research was conducted from February to May 2021 at Hasanuddin Medical Research Center (HUM-RC) Laboratory of Hasanuddin University Hospital, Makassar. Analysis of IL-6 levels was conducted by reacting recombinant protein antigen sMTL-13 with serum with active TB and healthy serum and then measuring the concentration of IL-6 in both serums as an indicator of a recombinant protein worthy of being a candidate for tuberculosis vaccine through ELISA test. Analysis of levels showed that the concentration of IL-6 in serums with active TB was higher at 91.04 pg/ml compared to IL-6 concentrations in healthy people's blood serums that only had a concentration value of 74.45 pg/ml. The sMTL-13 protein shows a significant influence on TB bacteria so it is potent to be a candidate for the tuberculosis vaccine.

Keywords: sMTL-13, IL-6, Tuberculosis, ELISA Test, Vaccine.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
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.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1 Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
II.2 Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
II.3 Protein Rekombinan sMTL-13	9
II.4 Tuberkulosis	11
II.4.1 Pengertian Tuberkulosis	11
II.4.2 Patogenesis Tuberkulosis	13
II.5 Respon Imun terhadap Tuberkulosis	16
II.6 Peran Interleukin (IL)-6 dalam Respon Imun	22
II.7 Vaksin Tuberkulosis	24
II.8 Uji ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	35
BAB III METODE PENELITIAN	38
III.1 Alat	38

III.2 Bahan	38
III.3 Prosedur Kerja	38
III.3.1 Kriteria Sampel	38
III.3.2 Penyiapan Protein sMTL-13 sebagai Antigen	39
III.3.3 Analisis Kadar IL-6 menggunakan Metode ELISA	39
III.3.3.1 Pelapisan (<i>Coating</i>) Protein	39
III.3.3.2 Uji ELISA	40
III.3.3.3 Analisis Data	41
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	42
IV.1 Uji Immunoreaktivitas	42
IV.2 Coating Protein Rekombinan sMTL-13	43
IV.3 Uji ELISA	47
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	57
V.1 Kesimpulan	57
V.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN	63

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Nilai Standar Uji ELISA	44
Tabel 2. Hasil Uji ELISA Serum Penderita TB Aktif	48
Tabel 3. Hasil Uji ELISA Serum Orang Sehat	50
Tabel 4. Uji Statistik <i>One Sample t Test</i>	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Morfologi dari <i>Mycobacterium tuberculosis</i> yang diamati melalui mikroskop elektron transmisi	6
Gambar 2. Genome <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	8
Gambar 3. Lokus gen Rv1419 yang mengkode protein sMTL-13	8
Gambar 4. Struktur Protein sMTL-13 yang dikodekan oleh <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dengan kode gen Rv1419	10
Gambar 5. Struktur Protein sMTL-13 yang dikodekan oleh <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dengan kode gen Rv1419	14
Gambar 6. Fungsi dan letak TB primer dan TB post primer	16
Gambar 7. Respon imun adaptif terhadap penyakit TB	20
Gambar 8. Sampel pada ELISA Plate	41
Gambar 9. Protein rekombinan sMTL-13	43
Gambar 10. Kurva Nilai OD Standar	45

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tuberkulosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulosis (TB) dapat menyerang paru-paru, dan beberapa organ tubuh yang lain. Penyakit ini pertama kali ditemukan oleh Robert Koch pada tanggal 24 Maret 1882, dimana gejala yang dapat ditimbulkan berupa batuk, nafas pendek, hilangnya nafsu makan, turunnya berat badan, demam, dan kelelahan. Penyakit ini secara umum dapat ditularkan melalui udara, misalnya saat batuk. Tuberkulosis merupakan penyakit menular dan menjadi salah satu penyakit penyebab kematian terbesar di dunia (Satu peringkat diatas HIV/AIDS). Sekitar seperempat dari populasi dunia terinfeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis*, sehingga sangat berisiko berkembangnya penyakit TB.

WHO (World Health Organization), melaporkan bahwa sejak tahun 1995 WHO melakukan pemantauan secara global mengenai standar pemantuan kasus TB dan terus mencari pengobatan yang paling sesuai terhadap TB. Bahkan, dalam sebuah laporan mengenai Tuberkulosis yang diterbitkan oleh WHO pada tahun 2017, menjelaskan bahwa sejak 1995, telah diterbitkan laporan mengenai perkiraan angka kematian akibat TB setiap tahunnya selama dua dekade terakhir. Tuberkulosis merupakan penyebab kematian terbesar ke-sembilan di dunia. Pada tahun 2017 terdapat sekitar 10,4 juta orang terjangkit penyakit TB dan 1 juta diantaranya adalah kasus TB anak, dimana 56% diantaranya tersebar di lima di Negara yaitu India, Indonesia, China, Filipina dan Pakistan (WHO, 2019).

Berdasarkan data WHO yang berhasil dihimpun, Indonesia sejauh ini telah mencapai kurang lebih sekitar 845.000 kasus TB dan masuk ke dalam lima besar Negara dengan kasus TB terbesar di dunia. Sejauh ini sebanyak 17 Provinsi di Indonesia memiliki prevalensi yang berada diatas prevelensi Tuberkulosis nasional. Beberapa provinsi tersebut adalah Nanggroe Aceh Darussalam, Sumatera Barat, Riau, DKI Jakarta, Jawa Tengah, DI Yogyakarta, Banten, Nusa Tenggara Barat, Nusa Tenggara Timur, Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur, Sulawesi Tengah, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, Gorontalo, Papua Barat, dan Papua. Sebagian besar estimasi insiden TBC pada tahun 2016 terjadi di kawasan Asia Tenggara (45%) dimana Indonesia termasuk salah satu di antara negara Asia Tenggara tersebut (Kemenkes RI, 2019).

Data yang diperoleh dari Kementerian Kesehatan, khusus di kota Makassar data jumlah pasien TB, khususnya TB (+) terbaru adalah sebanyak 72,44% ada tahun 2013, dan mengalami peningkatan sebesar 78,12% pada tahun 2014, yang kemudian terus mengalami peningkatan hingga tahun 2019. Hal ini menunjukkan bahwa kota Makassar merupakan salah satu kota dengan tingkat prevalensi TB yang besar di Indonesia. Berdasarkan data Dinas Kesehatan Provinsi Sulawesi Selatan pada tahun 2018, penderita penyakit menular ini mencapai 23.427 kasus. Angka ini meningkat signifikan dibanding tahun sebelumnya yang hanya 7.914 kasus. Kabupaten Takalar menduduki peringkat pertama dalam jumlah kasus dengan pertumbuhan penderita TB di atas 109 %, Pare-pare 79%, Pinrang 75%, Makassar 70%, kabupaten Luwu 33 % serta kabupaten Sidrap 36 %. (Dinkes Sulsel, 2018).

Jumlah kasus TB yang saat ini masih sangat tinggi, mengakibatkan ilmuan-ilmuan dunia mencoba menemukan solusi yang tepat untuk mengatasi TB sekaligus mencapai target WHO pada 2035 yaitu *Eradikasi* TB. Salah satu solusi untuk mencapai hal tersebut adalah dengan mengembangkan vaksin TB. Satu-satunya vaksin yang digunakan untuk memerangi TB sampai saat ini adalah vaksin *Bacillus Calmette-Gurein* (BCG), yang dikembangkan sejak tahun 1921 dari strain MTB *1773p2*. Vaksin ini dapat meminimalisir penularan TB pada anak, meskipun demikian keefektifan dari vaksin ini masih menjadi perdebatan terutama kemampuan vaksin ini dalam melawan dan melindungi orang dewasa dari infeksi TB. Selain itu, beberapa kelemahan dari vaksin ini seperti tingkat efektivitas vaksin yang hanya mencapai 50-70%, vaksin BCG dapat menimbulkan gejala klinis dan kecacatan pada pasien, tidak efektif dalam mencegah TB Paru dan TB Meningitis pada orang dewasa, dan reaksi perlindungan kekebalan akan aktif dalam waktu yang cukup lama yaitu 6-12 minggu, sehingga diperlukan inovasi baru dalam pengembangan vaksin TB salah satunya dengan melakukan pengembangan kandidat vaksin TB yang baru dan jauh lebih efektif dari vaksin BCG (Farajnia *et al*, 2019).

Vaksin dengan tingkat efisiensi yang tinggi menjadi faktor keberhasilan dalam menangani kasus TB dan mengurangi risiko penularan TB. Pengembangan vaksin baru merupakan salah satu solusi yang sangat penting untuk mengurangi penularan TB. Mengembangkan kandidat vaksin baru yang efektif dapat dilakukan dengan menggunakan protein rekombinan sMTL-13 yang disekresikan oleh gen Rv1419. sMTL-13 merupakan protein rekombinan yang mampu bereaksi

dan merangsang sitokin pro-inflamasi seperti Interleukin (IL)-6 yang meningkatkan produksi sitokin tersebut sehingga dapat berperan dalam pengendalian TB, serta menunjukkan titer yang tinggi pada serum penderita TB (Nogueira *et al*, 2010).

Kemampuan sMTL-13 dalam menginduksi sitokin IL-6, melatar belakangi dilakukan penelitian mengenai potensi sMTL-13 dalam menginduksi atau merangsang sitokin IL-6 sebagai kandidat vaksin Tuberkulosis dengan menggunakan metode uji ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*).

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini yaitu untuk menguji analisis kadar sitokin IL-6 yang direaksikan dengan protein rekombinan sMTL-13 pada serum penderita TB aktif dan orang sehat sebagai kandidat vaksin Tuberkulosis.

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai efektivitas protein rekombinan sMTL-13 sebagai kandidat vaksin Tuberkulosis.

I.4 Perumusan Hipotesis

Perumusan hipotesis dari penelitian ini yaitu sebagai berikut : H_a artinya terdapat pengaruh yang nyata dari protein sMTL-13 terhadap kelompok sampel sedangkan H_o artinya tidak terdapat pengaruh yang nyata dari protein sMTL-13 terhadap kelompok sampel.

I.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Mei 2021 di Laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUMRC) Rumah Sakit Universitas Hasanuddin.

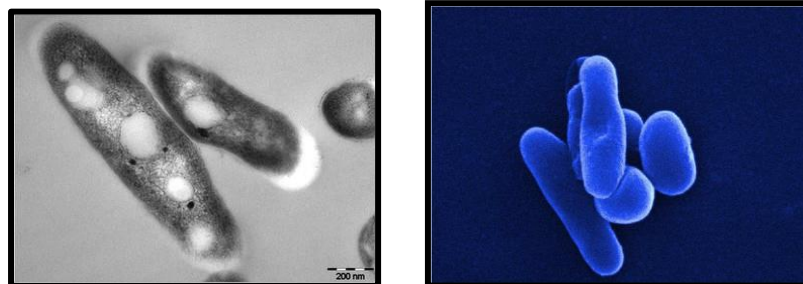
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Morfologi *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis pertama kali ditemukan oleh Robert Koch pada tahun 1882. Bakteri tersebut merupakan bakteri jenis Bacillus gram positif yang berukuran kecil, dengan dinding yang tebal dan kaya akan zat lilin (terbuat dari peptidoglikan), hal ini mengakibatkan keberadaan bakteri ini bersifat hidrofobik di alam. Mesofil ini sangat berbeda dengan bakteri lainnya, bakteri jenis ini dapat tumbuh dengan cepat dalam keadaan asam dan lambat jika berada di alam (Lamichhane, 2018). Klasifikasi dari *Mycobacterium tuberculosis*:

Kingdom : Bacteria
Phylum : Actinobacteria
Order : Actinomycetales
Family : Mycobacteriaceae
Genus : *Mycobacterium*
Species : *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf) Lehmann and Neumann
Sumber : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th Edition* (1957)



Gambar 1. Morfologi dari *Mycobacterium tuberculosis* yang diamati melalui mikroskop elektron transmisi (NCBI, 2020).

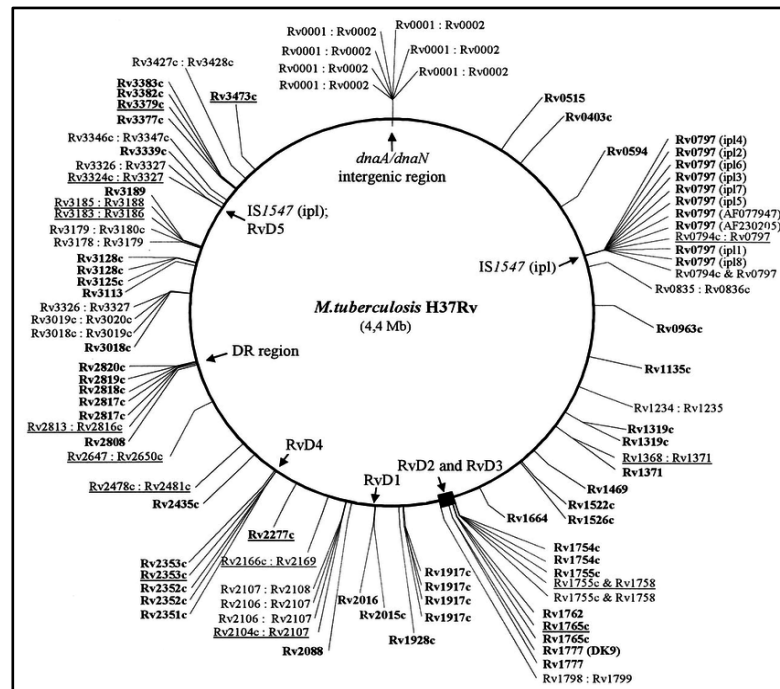
II.2 Genom *Mycobacterium tuberculosis*

Strain umum yang sering digunakan dalam studi *Mycobacterium tuberculosis* adalah H37Rv, strain yang memiliki genom yang lengkap. *Mycobacterium* H37Rv pertama kali diisolasi dari dahak pasien tuberkulosis pada tahun 1905. Virulensi dari H37Rv tersebut terus bertahan selama 22 tahun dan didistribusikan di seluruh dunia dan secara ekstensif digunakan sebagai strain tuberkulosis. Urutan asli dan anotasi dari strain ini memiliki total 4.411.529 pasang basa yang terdiri dari 3974 gen, 3924 protein yang dikodekan, dan 50 RNAs stabil. Genom terbaru yang diperbarui menunjukkan terdapat 4008 gen yang mengkodekan total 3906 protein dan 70 RNAs yang stabil pada strain H37Rv (Lamichhane, 2018).

Melalui perbandingan database, fungsi gen pengkode protein telah diklasifikasikan ke dalam 11 kelompok besar. Sekitar 40% gen pengkodean protein dinyatakan sebagai hipotetik yang terlayani. Menurut Lamichhane (2018), tinggi G+C isi dari genom menunjukkan komposisi asam amino proteome terdiri dari glisin, alanine, prolin dan arigin. Sedangkan asam amino yang dikodekan nukleotida A+T kaya akan lisin dan Asparagin. Lebih lanjut, analisis proteome diidentifikasi oleh dua protein besar yaitu Proline Glutamic Acid (PE) dan Proline Proline asam Glutamat (PPE) yang sangat kaya akan Glisn. Namun, sekitar 7 % urutan pengkodean masih belum diketahui (Lamichhane, 2018).

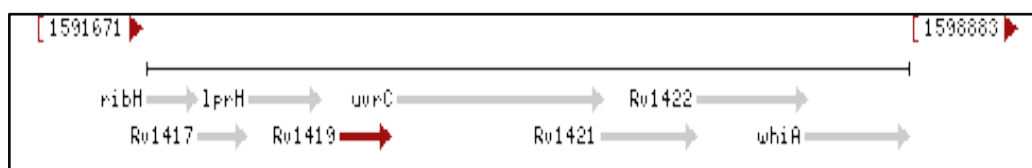
Struktur protein dapat membantu peneliti dalam memprediksi fungsi protein yang dikenal maupun yang belum teridentifikasi yang menjadikannya sebagai protein kandidat baru. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan spesies

yang memiliki keragaman genomic yang paling sedikit. Kedua genom lengkap dari H37Rv dan CD1551 dapat diurutkan secara selaras. Lingkaran konsentris luar menunjukkan daerah pengkodean protein, sedangkan lingkaran konsentris kedua menunjukkan lokasi *Nonsynonymous* pengganti dalam kromosom.



Gambar 2. Genome *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Sampson *et al*, 2001).

Mycobacterium tuberculosis H37Rv merupakan strain yang paling umum digunakan dalam mempelajari *Mycobacterium*. Urutan genomik dari strain tersebut sangat lengkap sehingga membuat strain tersebut menjadi strain acuan dalam mempelajari struktur genomik dari *Mycobacterium tuberculosis* (Bespyatykh *et al*, 2017).



Gambar 3. Lokus gen Rv1419 yang mengkode protein sMTL-13 (NCBI, 2020).

II.3 Protein Rekombinan sMTL-13

Rv1419 merupakan gen yang memiliki 474 susunan nukleotida dan mengkode 157 asam amino dan 33 Asam amino N-terminal. Analisis struktural protein yang dikodekan oleh Rv1419, dengan teknik bioinformatika dan Difraksi sinar X menunjukkan bahwa protein tersebut memiliki *ricin* jenis β -trefoil yang dapat terlibat dalam beberapa proses biologis seperti sel-sel adhesi, sel mitosis, dan imunitas bawaan, serta dapat memainkan peranan penting dalam interaksi dengan patogen (Liang *et al*, 2016).

Liang *et al* (2016) menegaskan bahwa Rv1419 akan tereduksi menjadi *T helper1* tipe antigen *immunodominant* yang mengandung banyak Epitop sel T. Nogueira *et al* menambahkan bahwa Rv1419 yang mengkode protein sMTL-13 dapat merangsang IFN- γ keluar dari sel darah mononuklear perifer (PBMC) pasien tuberkulosis aktif. IFN- γ adalah sitokin yang paling unggul dalam pengendalian TB yang telah dibuktikan dengan melakukan percobaan pada tikus dan manusia terhadap infeksi bakteri *Mycobacterium*. Protein sMTL-13 juga menjadi antigen imunodominan tipe Th1 yang mengandung banyak epitop sel T (Liang *et al*, 2016).

Proses bioinformatika mengidentifikasi tiga protein yang mampu mengikat glikan yang diidentifikasi dalam genom *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Serangkaian proses bioinformatik telah mengidentifikasi 11 protein dimana 9 diantaranya diberi anotasi sebagai calon lektin. Namun, sebagian protein yang dikodekan oleh beberapa gen uji masih menghalangi fungsi gen tersebut, kecuali protein sMTL-13 yang mampu diujikan pada gen Rv1419 yang nantinya dapat bertindak sebagai kandidat vaksin untuk Tuberkulosis (Kolbe *et al*, 2019).



Gambar 4. Struktur Protein sMTL-13 yang dikodekan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dengan kode gen Rv1419 (NCBI, 2020).

Rv1419 merupakan gen yang mengkode protein sMTL-13 dalam *Mycobacterium tuberculosis*. Protein sMTL-13 berperan selama masuknya bakteri dalam makrofag induk yaitu makrofag yang berasal dari manusia. Selain itu, tingkat TNF yang lebih rendah dapat terdeteksi pada sel yang terinfeksi Rv1419, yang menunjukkan bahwa lektin ini penting dalam pengenalan patogen (Bafica *et al.*, 2015). Kolbe *et al* (2019) menambahkan bahwa produk gen *Mycobacterium tuberculosis* Rv1419, menunjukkan kemiripan urutan asam amino sebesar 41% dengan jenis lektin yang mengkode protein sMTL-13. Lektin tersebut yang di uji secara *in vivo*, sangatlah penting perannya dalam mencegah infeksi *Mycobacterium*. Protein sMTL-13 yang dikodekan oleh gen Rv 1419 dapat berfungsi dalam proses pengembangan vaksin atau pengobatan penyakit tuberkulosis, selain itu gen ini dapat bertindak sebagai biomarker untuk tuberkulosis. Hal ini dikarenakan sifat lektin tersebut yang anti *toxin* terhadap beberapa bakteri yang masuk kedalam tubuh salah satunya *Mycobacterium tuberculosis* (Kolbe *et al*, 2019).

Sekresi lectin 13 kDa dari *Mycobacterium tuberculosis* menunjukkan respon terhadap salah satu antigen yaitu sMTL-13. sMTL-13 yang digunakan sebagai antigen tersebut, terdeteksi di dalam pemeriksaan cairan darah pasien TB aktif, hal ini menunjukkan bahwa antigen tersebut dapat bereaksi dengan IFN- γ , yang dibuktikan dengan meningkatnya produksi IFN- γ dalam sel PBMC pasien TB aktif selama pasien tersebut masih terinfeksi. Hal yang sangat penting dari penggunaan antigen tersebut, bahwa serum pasien TB aktif yang direaksikan dengan IgG terhadap antigen sMTL-13, menunjukkan respon menurun yang sangat cepat dan signifikan setelah dilakukan pengobatan pada pasien. Dengan demikian antigen sMTL-13, yang berasal dari Lectin 13 kDa yang disekresikan dari gen Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis* sebagai gen yang mengkodekan antigen tersebut, dapat dijadikan salah satu protein kandidat biomarker dan vaksin terhadap penyakit Tuberkulosis baik Tuberkulosis aktif maupun Tuberkulosis Laten (Nogueira *et al*, 2010).

II.4 Tuberkulosis

II.4.1 Pengertian Tuberkulosis

Tuberkulosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulosis dapat menyerang paru-paru, dan beberapa organ tubuh yang lain. Penyakit ini pertama kali ditemukan oleh Robert Koch pada tanggal 24 Maret 1882, dimana gejala yang dapat ditimbulkan berupa batuk, nafas pendek, hilangnya nafsu makan, turunnya berat badan, demam, dan kelelahan. Penyakit ini secara umum dapat ditularkan melalui udara, misalnya saat batuk. Tuberkulosis merupakan penyakit menular dan menjadi salah satu penyakit penyebab kematian terbesar di dunia (WHO, 2019).

Negara-negara Eropa ditahun 2020, dinyatakan telah mencapai target pengurangan kasus TB yaitu 35% sejak tahun 2000. Didalam laporannya yang terbit pada tahun 2019, WHO menjelaskan bahwa kasus TB turun sebesar 15% dalam kurun waktu 2015-2018, dan jumlah kematian akibat TB turun sebanyak 24% dalam periode tersebut. Insiden dan kasus kematian TB juga dilaporkan mengalami penurunan yang cukup besar yaitu 4,1% di negara-negara regional Afrika per tahun, adapun negara – negara tersebut adalah Kenya, Reublik Afrika Selatan, Tanzania dan Zimbabwe. Meskipun demikian, sejak tahun 2016 dilaporkan bahwa angka kematian akibat TB semakin turun 3% setiap tahunnyadan target WHO pada tahun 2020 angka pengurangan tersebut diperkirakan akan bertambah 4-5%, (WHO, 2019).

Tuberkulosis sampai saat ini masih menjadi salah satu penyakit menular yang mematikan. Pada tahun 2017, sekitar 10 juta orang mengidap penyakit TB, dan 1,6 juta kasus kematian di dunia tercatat akibat infeksi tuberkulosis. Lebih dari 60% kasus TB tersebut berasal dari tujuh negara penyumbang kasus TB terbesar di dunia yaitu India, Indonesia, China, Filipina, Pakistan, Nigeria, dan Afrika Selatan (Parmer, 2018). TB secara umum menular dari seorang penderita ke penderita lainnya melalui udara, ketika seseorang batuk, atau sedang bersuara, partikel kecil yang mengandung *M. tuberculosis* dikeluarkan melalui udara dan masuk melalui mulut hingga menyerang saluran-saluran yang ada di dalam tubuh seperti paru-paru, sekitar 1-5 mikron partikel di lepaskan ke udara dengan diameter partikelnya mencapai 1/5000 inci (Parmer, 2018).

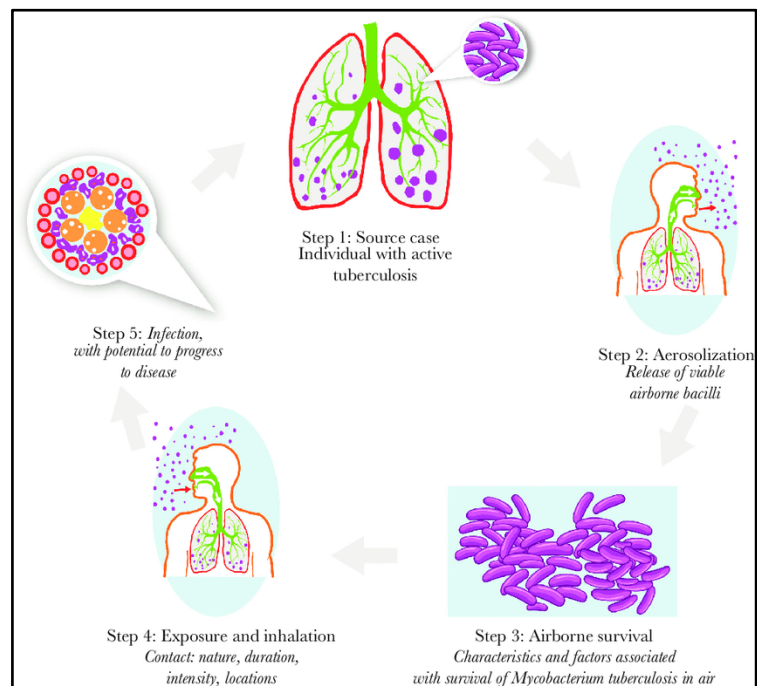
Kemungkinan penularan TB tergantung pada karakteristik pasien dan faktor lingkungan. Misalnya, seseorang yang mengidap TB akan rentan terhadap

penyakit paru atau tenggorokan, karena ketika orang tersebut batuk dan tidak menutup mulut atau hidungnya, maka partikel TB akan masuk karena radiografi dada terbuka dan menunjukkan kavitasi (Parmer, 2018).

II.4.2 Patogenesis Tuberkulosis

Tingkat penurunan kasus tuberkulosis saat ini mencapai 1,5% dan perlu ditingkatkan sekitar 4-5% di tahun 2020, hingga mencapai target 10% per tahun hingga tahun 2025, hal ini sesuai dengan target yang telah ditetapkan oleh WHO. Target penurunan 10% Per tahun adalah prioritas utama yang saat ini diterapkan oleh WHO, hal ini dianggap penting mengingat pada tahun 1950-an di Eropa Barat pengendalian terhadap TB sangat gencar dilakukan sehingga berhasil mengurangi kasus TB di dunia saat itu (Churchyard, 2017).

Churchyard (2017) menjelaskan secara sederhana siklus penularan TB dimulai ketika seseorang yang menjadi sumber utama TB atau pengidap TB yang berada di lingkungan yang belum terpapar oleh TB sebelumnya menghasilkan partikel infeksius. Kemudian, penderita TB tersebut mengeluarkan partikel tersebut dengan cara batuk atau bersin sehingga *M. tuberculosis* tersebut berada di udara dan terhirup oleh individu yang peka terhadap TB atau individu yang bisa terinfeksi oleh TB. Kemudian individu baru tersebut berpotensi untuk terinfeksi dan mengidap penyakit TB. Bakteri target, host, dan katalisator merupakan komponen yang dapat mempengaruhi penularan tuberkulosis, bahkan dapat mempercepat penurunan kasus infeksi dan kematian akibat tuberkulosis. Infeksi dan durasi penularan TB tergantung pada faktor inang dan bakterinya. Orang dengan TB Paru positif sangat mudah menularkan TB terhadap orang yang serumah dengannya atau orang yang pernah kontak dengan penderita



Gambar 5. Siklus mekanisme penularan tuberkulosis (Churchyard, 2017)

Siklus hidup *Mycobacterium tuberculosis* pada dasarnya memiliki tujuan untuk menginfeksi dan menginduksi sistem kekebalan. Periode siklus TB tersebut, berlangsung selama beberapa dekade, hingga akhirnya dapat mengakibatkan infeksi TB paru aktif baik melalui reaktivasi maupun infeksi ulang yang berlanjut menghasilkan rongga di paru-paru, sebelum akhirnya di tularkan ke lingkungan. Penyakit atau kematian host dapat mengurangi resiko penularan parasit di paru, Hunter melaporkan bahwa orang yang memiliki rongga paru yang ber dinding tipis, akan dilapisi oleh membran yang besar, tetapi tidak menyisahkan lesi lain hanya TB yang mampu bertahan yang terdapat di dalam (Hunter, 2018).

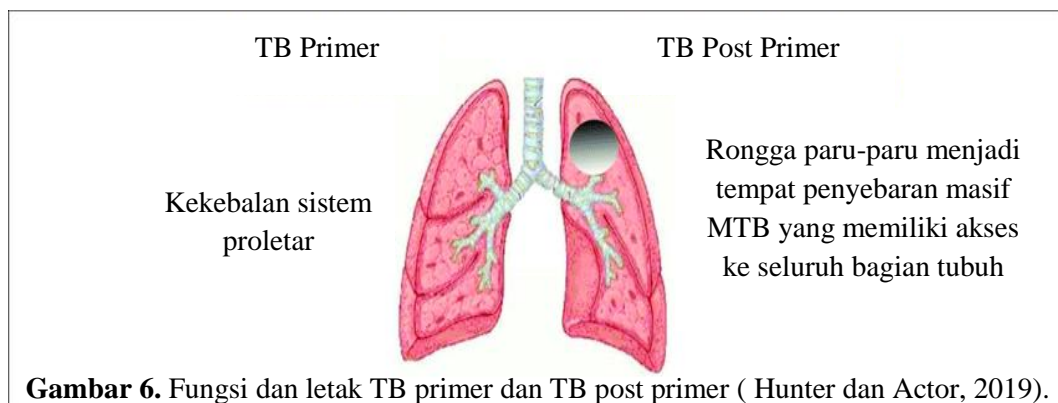
Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* ditularkan melalui inhalasi aerosolized yang dilepaskan oleh pasien yang terinfeksi TB dengan cara batuk. Proses awal infeksi ditandai kontak antara bakteri inhalasi dengan sel inang

melalui udara. Menurut Kolbe, sel target utama dari *Mycobacterium tuberculosis* adalah makrofag alveolar, yang bersifat pathogen melalui proses fagositosis. Sistem kekebalan tubuh memulai sejumlah tanggapan terhadap benda asing yang masuk termasuk *M. tuberculosis* dengan cara membatasi bakteri tersebut bereplikasi dan menyebar dengan tujuan untuk menghilangkan bakteri pathogen tersebut.

Hunter (2018) menjelaskan bahwa TB Primer adalah infeksi TB yang terjadi pada seseorang yang memiliki sistem kekebalan yang rendah, sehingga tidak mampu untuk melokalisasi dan mengendalikan MTB didalam granuloma. Hal ini akan berdampak luas sehingga dapat mempengaruhi terjadinya infeksi lain seperti AIDS, Meningitis, Tuberkulosis akut, dan memungkinkan terjadinya granumola paru ekstra. Infeksi dapat menyebar melalui saluran limfatik atau aliran darah ke kelenjar getah bening, serta melalui organ-organ yang lain. Pada orang yang immunokompeten, infeksi tersebut dapat dikontrol setiap minggu.

TB primer telah diteliti secara ekstensif pada manusia dan hewan. Berbeda dengan TB Post primer yang sulit untuk dikenali keberadaannya. Sejak lama telah diketahui bahwa faktor risiko yang paling penting bagi berbagai jenis penyakit TB adalah infeksi awal TB. TB post primer merupakan infeksi yang terjadi setelah infeksi TB primer. TB ini hanya terbatas pada daerah paru, kemudian menyebar melalui salura udara sebagai TB Bronkogenik yang dapat mengakibatkan nekrosis yang lebih besar dari TB primer. Sifat patologis dan radiologis dasar dari TB post primer yang dilaporkan oleh banyak peneliti di era preantibiotik, kini dihiraukan dan mulai ditinggalkan bahkan dilupakan oleh para peneliti Biologi Molekuler Modern (Hunter dan Actor, 2019).

Beberapa model TB pada hewan menunjukkan pola organisme dalam jaringan dan patologi yang sama dengan TB post primer. Setelah infeksi awal pada hewan yang mengandung, maka jumlah MTB yang terdapat di dalamnya akan tetap konstan selama berbulan-bulan hingga hewan tersebut mati, hal inilah yang disebut dengan proses patologi atau *progressive pathology*. Pernyataan tersebut dapat menjelaskan bahwa masalah utama dalam penelitian mengenai tuberkulosis adalah untuk menjelaskan mengapa kekebalan terhadap infeksi TB tidak mampu diterapkan pada manusia, tikus, babi, yang pada kenyataannya dapat menghentikan perkembangan penyakit tersebut. Ini merupakan karakteristik dari TB post primer yang sulit untuk dideteksi (Hunter dan Actor, 2019).



Gambar 6. Fungsi dan letak TB primer dan TB post primer (Hunter dan Actor, 2019).

II. 5 Respon Imun Terhadap Tuberkulosis

Pemahaman mengenai kekebalan manusia terhadap infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, termasuk potensi immunitas terhadap vaksin antigen TB, berbagai tahapan infeksi TB, dan waktu sistem imun tubuh dalam menanggapi infeksi tersebut merupakan hal yang sangat penting dalam mengembangkan vaksin TB yang mampu menghentikan proses infeksi *Mycobacterium tuberculosis* sehingga tidak berkembang menjadi tuberkulosis

Saat ini, hanya sebagian kecil antigen MTB yang berhasil dieksploitasi untuk mengembangkan vaksin TB, bahkan dibuat sebagai bahan vaksin TB, seperti ESAT-6, TB 10.4, dan Ag85 A-B, merupakan contoh antigen yang sering digunakan dalam pembuatan vaksin TB. Namun, saat ini tidak ada penelitian yang mampu memastikan secara spesifik mengenai perubahan kekebalan tubuh terhadap antigen MTB saat infeksi terjadi dan sebelum penyakit TB berkembang, sehingga penelitian mengenai imunitas terhadap antigen *Mycobacterium tuberculosis* untuk kepentingan pengembangan vaksin masih terus dilakukan sampai saat ini. Sistem kesehatan di Greenland saat ini menggunakan QFT untuk melacak infeksi MTB yang dapat dideteksi. QFT merupakan standar yang ditetapkan untuk mengukur induksi sel T (Michelsen *et al.*, 2017).

Disisi lain, penelitian terhadap kerentanan TB telah memberi pencerahan mengenai variasi komponen immunitas tubuh manusia terhadap bakteri. Martino *et al* (2019), menjelaskan bahwa polimorfisme genetik yang berbeda, dapat mengatur respon imun terhadap infeksi TB dan perkembangan penyakitnya telah diidentifikasi dalam *Human Leucoyte Antigen* (HLA), kerusakan reseptor (TLR), Reseptor vitamin D (VDR), sitokinin dengan reseptornya, dan masih banyak komponen imun lainnya. Sejak tahun 1996, 11 gen yang menghubungkan 21 kelainan genetik yang berkaitan dengan kekebalan IFN- γ telah berhasil diidentifikasi.

Virulensi tidak hanya terbatas pada strain bakteri saja, tetapi juga mempertimbangkan ekspresi gen *Mycobacterium tuberculosis* yang berdiferensiasi di berbagai fase infeksi. Makrofag, neutrophil, sel dendritic (DCs),

sel pembunuh alami atau *Natural Killer* (NK), dan sel lainnya merupakan sel pelengkap utama dalam sistem kekebalan. Selain itu, sel AECs juga mendukung pertahanan tubuh dalam melawan MTB dan termasuk dalam komponen-komponen imunitas (Martino *et al.*, 2019).

Neutrofil granulosit adalah populasi sel yang paling melimpah dalam BAL dan dahak pasien TB aktif. Sel ini dapat berperan dalam mekanisme pertahanan terhadap MTB. Secara khusus, terdapat korelasi antara jumlah granulosit neutrophil yang terdapat dalam darah dan disekeliling pembuluh darah. Peptida antimikroba dan neutrofil apoptosis dapat bersifat patogenensis ketika distimulan oleh makrofag, sehingga memungkinkannya melawan infeksi oleh MTB didalam tubuh. Martino *et al* (2019), menambahkan bahwa neutrofil tidak hanya memainkan peran positif dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi MTB, melainkan juga dapat memainkan peran sebaliknya, dimana neutrofil dapat menyebabkan kerusakan jaringan melalui produksi dan pelepasan produk antimikroba yang dihasilkan. Hal ini juga akan ikut berpengaruh terhadap tereduksinya sel limfosit. Neutrofil mengeluarkan ligan 1 (PD-L1), yang berinteraksi dengan reseptor limfosit yang secara khusus berfungsi dalam mereduksi sel limfosit, kemudian terjadi infeksi kronis yang membuat limfosit hilang fungsi, dan akhirnya menjadi sel mati.

Beberapa komponen dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* mampu dikenali dengan jelas oleh NKp44 dari sel *Natural Kill* (NK). MTB yang masuk terinfeksi oleh sel *NKs Lyse* dan kemudian menstimulasi Makrofag untuk memproduksi IFN- γ dan IL-22 yang akan meningkatkan fusi *Phagolysomal*

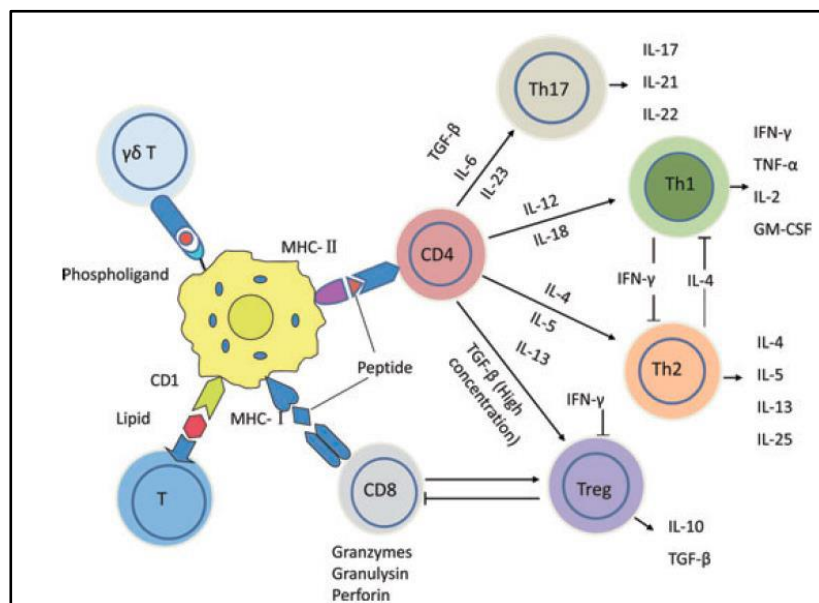
sehingga mampu menghambat replikasi MTB dan merangsang produksi tambahan IFN- γ oleh limfosit CD8+. Produksi ini juga tidak lepas dari peran IL-15 dan IL-18 yang terbentuk akibat adanya infeksi oleh sel makrofag. Sebagai infeksi control, mekanisme dendrit sel (DC) tersebut merangsang pengembangan limfosit T dengan reseptor γ^{δ} melalui produksi TNF- α dan IL-12 (Martino *et al.*, 2019).

Respon imun oleh limfosit T dimulai saat MTB menyebar di dalam kelenjar getah bening. Limfosit T menjalani proses aktivasi dan perluasan populasi tertentu sebagai antigen MTB. Respon imun selular dapat dibuktikan selama 2-6 minggu setelah terjadinya infeksi MTB oleh perkembangan respon hipersensitivitas terhadap intradermal tuberculin (DHT) atau derivat protein murni (Martino *et al.*, 2019).

Berbeda dengan limfosit CD4+, limfosit CD8+ tidak memegang peranan dalam mengendalikan infeksi dan penyakit TB. Limfosit CD8+ mengenali antigen MTB melalui molekul *Major Histocompatibility Complexi* (MHC) kelas I, dan menghasilkan IL-6, IL-2, IFN- γ dan TNF- α yang memiliki peranan penting dalam mengendalikan *Mycobacterium tuberculosis*. Selain itu, limfosit CD8+ mengerahkan tindakan sitolitik untuk melawan MTB yang dinyatakan melalui perforin dan granulysin, meskipun tidak melibatkan ikatan FAS (CD95) dengan interaksi FAS Ligan. Disisi lain, limfosit CD8+ memproduksi IL-10 dan TGF- β yang tidak mendukung perkembangan infeksi oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Martino *et al.*, 2019).

Berbagai macam sel bawaan dan sel imun saling beradaptasi dan menjalankan peran masing-masing saat merespon sel MTB yang masuk ke tubuh.

DNA MTB berhasil mencegah pecahnya AIM2 yang meradang sehingga menghambat sintesis IL-1 dan IL-18. Dalam kondisi normal, IFN- γ merangsang ekspresi molekul MHC II pada makrofag. Namun, aktivasi TLR2 yang berkepanjangan, memungkinkan MTB dapat menekan dan melawan mekanisme tersebut. Bahkan dalam sel yang telah diekspresikan oleh molekul-molekul MHC II, MTB berhasil memblokir kehadiran antigen melalui tindakan pada ESCRT (endosomal seleksi kompleks yang diperlukan untuk transportasi). Manipulasi oleh MTB ini juga mempengaruhi fungsi DCs, Neutrofil, dan semua komponen lain yang terlibat dalam sistem immunitas tubuh (Martino *et al.*, 2019). Nogueira *et al* (200) menambahkan bahwa sMTL-13 dapat meningkatkan produksi IFN- γ dari pasien TB aktif (ATB). Kemudian sera dari pasien TB aktif tersebut menampilkan titer yang tinggi terhadap IgG AB terhadap sMTL-13, sehingga respon yang ditimbulkan menurun bersamaan dengan keberhasilan terapi antituberkulosis oleh sMTL-13 (Nogueira *et al.*, 2010).



Gambar 7. Respon imun adaptif terhadap penyakit TB (Syafa'ah, 2016)

Infeksi MTB umumnya menyebabkan induksi sejumlah besar sitokin. Sitokin efektor, di antaranya IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-17, IL-23 dan *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) memiliki peran penting dalam respons imun mukosa terhadap MTB. Hal penting yang harus dipahami tentang produksi sitokin pada infeksi MTB adalah aktivasi makrofag sebagai respons stimulasi IFN- γ dan TNF- α . Makrofag yang tidak teraktifasi adalah habitat umum kuman MTB, berada dalam lingkungan intraseluler, yang berarti mencegah terjadinya fusi fagosom dan lisosom, mencegah terpajannya MTB pada pH rendah dan RNI yang seharusnya penting untuk eliminasi MTB (Syafa'ah, 2016).

Selain IFN- γ dan TNF- α , terdapat beberapa sitokin seperti IL-12, IL-17 dan IL-23 berkontribusi dalam respons host terhadap MTB dengan memicu peran sel Th1. IL-12 adalah sitokin lain dengan fungsi immuno regulator yang menghubungkan respons imun bawaan dan adaptif. IL-12 diproduksi banyak oleh makrofag, yang penting untuk respons imun terhadap infeksi MTB. Fungsi biologis lain dari IL-12 adalah termasuk kemampuannya untuk meningkatkan produksi IFN- γ dan mengaktifasi NK dan sel T native (Syafa'ah, 2016).

Sel T helper 1 (Th1) secara stimulant dapat merangsang dan menghasilkan beberapa jenis sitokin yang berperan dalam respon terhadap bakteri MTB, diantaranya adalah TNF- α , IFN- γ , dan IL-2. TNF- α merupakan jenis sitokin yang berperan lebih awal dalam merespon infeksi MTB. Sitokin ini berperan dalam merangsang produksi *Reactive Nitrogen Intermediates* (RNIs) yang berfungsi sebagai perantara fungsi tuberkulostatik dari makrofag, dalam hal ini TNF- α bekerja berdampingan dengan IFN- γ . Selain itu, dalam hal respon imun terhadap

TB, TNF- α juga berperan dalam pembentukan granuloma yang berperan dalam mengendalikan penyakit (Prasetyo, 2019).

TNF- α sangat berperan dalam aktivasi makrofag, sitokin ini banyak dihasilkan oleh sel T CD4+ dan CD8+, dalam hal respon imun sebagian besar sel tubuh memiliki respon terhadap TNF- α , sehingga menjadikan sitokin ini sebagai sitokin yang sering diujikan terhadap serum darah khususnya dalam hal mencari kandidat vaksin TB dan fungsinya yang baik sebagai mediator proinflamasi yang utama. TNF- α juga sangat berperan dalam migrasi sel imun ke tempat infeksi MTB (Prasetyo, 2019).

IL-6 merupakan sitokin yang paling banyak berperan dalam respon terhadap beberapa penyakit radang kronis pada manusia salah satunya terhadap penyakit Tuberkulosis. Martinez *et.al* (2013) menyatakan bahwa IL-6 dan TNF- α adalah dua sitokin yang berbeda dari segi fungsinya dalam respon imun, namun peran kedua sitokin ini sangatlah penting dalam merespon bakteri MTB yang masuk kedalam tubuh. Berbeda dengan TNF- α yang menunjukkan perannya saat mekanisme respon terhadap *antimycobacterial*, IL-6 baru menunjukkan peranannya saat setelah infeksi terjadi dimana IL-6 sangat penting untuk resistensi terhadap tuberkulosis setelah masa infeksi (Martinez *et.al*, 2013).

II.6 Peran Interleukin (IL)-6 dalam Respon Imun

Makrofag merupakan sel inang pertama yang berinteraksi dengan bakteri MTB ketika bakteri tersebut masuk kedalam tubuh dan menjadi habitat utama untuk pertumbuhan dan replikasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Peran makrofag dalam interaksinya dengan MTB dalam tubuh, menjadi kunci dalam

pengendalian TB termasuk dengan berbagai strain bakteri MTB yang telah dikenali sebelumnya, kemudian terjadi induksi oleh elaborasi dari beberapa sitokin pro-inflamasi yaitu interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-12, tumor necrosis factor- α (TNF- α), *granulocyte-macrophage (GM) colony-stimulating factor* (CSF; GM-CSF), *granulocyte-CSF* (G-CSF) dan sitokin antiinflamasi seperti IL-10. IL-6 merupakan sitokin multifungsi bersama dengan TNF- α dan IL-1 yang mengawali masa pro-inflamasi awal saat TB masuk ke dalam tubuh (Singh and Amit, 2013).

IL-6 juga terlibat dalam promosi respon sel T dan sel B, berpartisipasi dalam hematopoiesis, sitokin ini juga berperan dalam priming vaksin subunit TB, bahkan dalam uji secara *in vivo* menggambarkan bahwa tikus yang kekurangan kadar IL-6 dalam tubuh sangat rentan terpapar oleh TB. Selain itu IL-6 juga dapat menginduksi IFN- γ untuk perlindungan terhadap TB dan secara paradoks, sitokin ini juga menghambat pertumbuhan TNF- α dan IL-1, elaborasi sitokin ini terjadi ketika masa infeksi atau peradangan (Singh and Amit, 2013).

IL-6 merupakan sitokin *pleiotropic* yang mampu melakukan beberapa fungsi patokologis pada manusia yang diproduksi oleh berbagai sel fagosit monuklear, edotel sel, sel limfosit T dan B. Sitokin tersebut merangsang sintesis protein akut, terutama protein C reaktif sebagai respon rangsangan terhadap penyakit. Pada TB aktif menunjukkan bahwa kadar IL-6 memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibanding dengan sitokin proinflamasi yang lainnya. Sitokin ini disekresikan oleh makrofag yang telah lebih dahulu terinfeksi oleh MTB, IL-6 mampu menghambat respon TNF- α oleh makrofag yang tidak terinfeksi sehingga berdekatan dengan yang telah terinfeksi. Hal ini menunjukkan bahwa IL-6 sangat berperan dalam respon kekebalan tubuh terhadap MTB. Meskipun menghambat

pertumbuhan TNF- α dan IL-1 β , penelitian secara *in vivo* telah membuktikan bahwa sitokin ini mampu memberi perlindungan yang sangat tinggi terhadap *Mycobacterium tuberculosis* yang dibuktikan dengan tikus yang sangat rentan terpapar TB karena produksi IL-6 yang sangat rendah (Lopes *et al.*, 2013).

II.7 Vaksin Tuberkulosis

Secara global, saat ini terdapat sebanyak 7,1 juta jiwa dilaporkan terpapar TB hingga akhir tahun 2019, angka ini naik dari 7 juta orang yang terpapar pada tahun 2018. Angka ini merupakan lonjakan yang besar dari tahun 2017, dimana saat itu jumlah kasus TB dilaporkan sebanyak 6,4 juta yang berarti terdapat peningkatan yang signifikan sebesar 0,7 juta hanya dalam kurun waktu selama 2 tahun. Peningkatan ini menjadi peningkatan terbesar setelah sebelumnya pada periode 2009-2012 terjadi peningkatan sebesar 0,1 juta jiwa. Berdasarkan data WHO tahun 2020, banyak negara saat ini mengalami kenaikan angka kasus baru TB yang signifikan sejak tahun 2013. Kontributor terbesar peningkatan kasus TB secara global adalah India dan Indonesia, dimana kedua negara tersebut menempati peringkat pertama dan kedua dalam peningkatan kasus Tuberkulosis per tahun (WHO, 2020).

Vaksin yang digunakan untuk melawan TB diperkenalkan pertama kali pada 1921 oleh ilmuwan Prancis Albert Calmette and Camille Guerin, yang kemudian nama mereka diabadikan menjadi nama vaksin tersebut yaitu vaksin Bacille Calmette Guerin (BCG) dan menjadi satu-satunya vaksin yang secara legal digunakan dalam melawan TB. Vaksin subunit terdiri dari antigen yang diyakini dapat memberi perlindungan protektif yang tinggi terhadap TB.

Seringkali beberapa antigen dikombinasikan untuk meningkatkan daya lindung vaksin. Untuk meningkatkan perlindungan, antigen diformulasikan dengan *adjuvant* atau disisipkan kedalam dan dibawah oleh vektor virus rekombinan, beberapa vaksin vektor rekombinan dikembangkan tidak hanya sebagai penguat untuk vaksin BCG, melainkan juga sebagai strategi utama untuk meningkatkan tingkat kekebalan terhadap MTB yang terdiri atas vektor virus yang berbeda atau kombinasi antigen dari *Mycobacterium tuberculosis* (Kaufmann *et al.*, 2017).

Vaksin masih menjadi pilihan utama dalam hal penanganan TB di dunia, usaha pencegahan dan pengendalian TB dengan vaksin Bacille Calmette-Guerin (BCG) dapat mengurangi risiko penularan TB khususnya pada anak-anak, namun penggunaan vaksin tersebut pada anak masih berisiko dan menimbulkan beberapa gejala akibat penggunaannya, sehingga prioritas utama WHO saat ini adalah tetap mengembangkan vaksin BCG tersebut untuk mengurangi risiko infeksi, mengembangkan obat atau vaksin baru, dan mengembangkan cara diagnosis cepat terhadap TB dengan mengembangkan biomarker yang tepat di titik perawatan.

Vaksin BCG pertama kali digunakan di Iran pada tahun 1947 dari strain *Pasteur 1773p2* yang dikultur di Iran dan sampai saat ini masih menjadi satu-satunya vaksin yang digunakan dalam penanganan dan pengobatan TB. Dalam beberapa laporan, vaksin ini masih menjadi kontroversi dan perdebatan mengenai keefektifannya dalam melindungi individu dari variasi TB yang saat ini berbeda-beda. Vaksin BCG memiliki tingkat efektivasi sebesar 50-70% dalam melindungi tubuh dan melawan infeksi TB, vaksin ini memiliki riwayat gejala klinis yang masih menimbulkan beban dan kecacatan pada pasien, sehingga dimasa yang akan

datang diharapkan adanya pengembangan vaksin TB yang lebih efektif. Secara umum vaksin ini belum efektif jika digunakan pada anak-anak bahkan akan menimbulkan risiko yang tinggi diakrenakan usia anak yang masih dini, sehingga penggunaanya dibatasi pada anak, bahkan dalam sebuah penelitian yang dilakukan, menunjukkan bahwa vaksin ini tidak mampu melindungi anak dari infeksi dan gejala TB (Farajnia *et. al.*, 2019).

Menurut Prasetyo *et.al.*, tahun 2019, vaksinasi merupakan cara yang paling tepat saat ini untuk menanggulangi penyakit menular salah satunya adalah TB dan satu-satunya vaksin TB yang saat ini digunakan adalah vaksin bacille Calmette-Guerin (BCG), namun vaksin ini menunjukkan efektivitas yang terbatas dalam hal mencegah penularan bakteri MTB pada orang dewasa dan tidak efektif dalam mencegah menularnya TB Paru, karena itu perlu dikembangkan produk vaksin baru sehingga target eradiksi TB yang dicanangkan WHO pada tahun 2035 berhasil.

Selama 20 tahun terakhir, sebagian besar anak-anak di dunia telah diberi vaksin BCG segera setelah lahir atau saat pertama kali mengenal dan bersentuhan langsung dengan fasilitas layanan kesehatan. Pada tahun 2005, United Kigdom (UK) yang sebelumnya melakukan vaksinasi pada masa remaja, beralih lebih cepat ke bayi karena risiko penularan TB yang tinggi bisa saja berasal dari orang tua, seperti ayah, ibu, kakek, dan nenek sehingga vaksinasi dilakukan secara cepat. Beberapa negara lain yang tidak dan belum melakukan vaksinasi, untuk mengurangi risiko tertular dan infeksi rendah digunakan tes kulit tuberculin atau

TST sebagai cara yang dirasa efektif untuk mengetahui risiko infeksi dari tuberkulosis (Dockrell dan Steven, 2017).

Antigen spesifik dari BCG yang menginduksi sel T secara luas, menggambarkan bahwa sebagian besar antigen *Mycobacterium* yang dimiliki oleh BCG dapat dikenali oleh sistem imun. Pengembangan komponen senyawa penyusun BCG serta respon komponen yang menginduksi vaksin tersebut merupakan salah satu langkah terbaik untuk meningkatkan immunogenitas BCG sekaligus sebagai cara untuk mengembangkan vaksin ini menjadi lebih baik. Salah satu strategi yang mulai diterapkan dalam pengembangan vaksin ini adalah dengan menyisipkan gen *Listeriolysin* yang akan memberi akses dan memfasilitasi antigen BCG untuk masuk kedalam antigen endogenus melalui jalur sederhana, dan hasilnya vaksin BCG yang disisipi gen tersebut lebih imunogenik serta mudah menginduksi IL-17 dan sel Th 1 untuk memproduksi sel T pada manusia (Dockrell dan Steven, 2017).

Ketersediaan vaksin BCG saat ini dinyatakan sangat terbatas di beberapa negara yang terdampak besar TB. Sebuah analisis penelitian menyatakan bahwa rata-rata 43 dari 194 negara per tahun mengalami kehabisan stok atau *stock-out*. Jumlah rata-rata durasi stok ketersediaan vaksin BCG untuk negara-negara tersebut adalah selama 1,4 bulan pada periode tahun 2005-2013. Pada tahun 2014 dan 2015, durasi tingkat ketersediaan vaksin ini rata-rata meningkat masing-masing 2,6 dan 2,8 per bulan. Disamping itu, permintaan global terhadap vaksin ini mengalami peningkatan rata-rata tahunan sebesar 227 juta dosis seiring dengan meningkatnya penambahan kasus TB dunia periode 2018-2020. Pada tahun 2017, ketersediaan pasokan vaksin BCG 1,5 kali lebih besar dari jumlah permintaan,

yang menandakan bahwa vaksin ini masih menjadi prioritas utama dalam pengendalian TB karena merupakan vaksin TB satu-satunya yang saat ini dikembangkan, dengan keadaan tersebut diperlukan sebuah pengembangan vaksin baru yang lebih efektif dan dapat menekan laju pertumbuhan TB di dunia (Cernuschi *et al.*, 2017).

BCG biasanya diberikan kepada bayi dan anak-anak yang berusia dibawah 16 tahun, namun vaksin ini tidak akan bekerja untuk orang dewasa yang berusia diatas 30 tahun, karena sebelumnya orang dewasa tidak pernah diberikan tes tuberculin atau TST sehingga membuat vaksin tersebut tidak bekerja dan tidak efektif sama sekali terhadap orang dewasa. Dalam sebuah penelitian menunjukkan bahwa vaksin BCG hanya memberi perlindungan kepada anak sampai umur 15 tahun dari infeksi MTB dan gejalanya, meskipun juga ditemukan durasi perlindungan yang lama terhadap orang yang memiliki hasil TST negatif sebelum dilakukan vaksinasi dan perlindungan tersebut akan menurun seiring bertambahnya usia seseorang. Efektivitas vaksin BCG sangatlah bervariasi berada di kisaran antara 0-80% dan 70-80% efektif terhadap bentuk TB yang parah seperti TB meningitis. Hal ini dinilai kurang efektif dalam mencegah variasi bentuk TB yang berkembang dan mempengaruhi paru-paru, meskipun demikian BCG tetap menjadi salah satu strategi penting dalam menangani kasus-kasus TB di negara-negara dengan beban kasus TB yang tinggi, karena dianggap bermanfaat bagi bayi dengan kontrol TB yang konsisten (Gorish, *et al.*, 2018).

Tuberculin Skin Test (TST) digunakan sebagai uji untuk mendeteksi dan mendiagnosa infeksi Tuberkulosis laten, selain itu TST juga digunakan sebagai indikator vaksinasi TB. Tetapi pandangan mengenai hasil TST pada orang dewasa

masih menjadi perdebatan dan kontroversi karena paparan antigen TB dapat menunjukkan reaksi hasil positif yang palsu untuk individu yang tidak divaksinasi. Menurut Gorish, *et al* (2018), tes *Mantoux* telah menjadi metode klasik dan sederhana yang digunakan untuk mendeteksi infeksi tuberkulosis laten, sama halnya dengan TST, tes ini juga telah digunakan dalam waktu yang lama untuk vaksinasi ketika tidak ada kontak yang terjadi antara individu dengan individu yang positif TB dalam satu rumah. Tes kulit *Mantoux* ini digunakan sebagai metode penyaringan dalam menentukan respon imun terhadap vaksin BCG yang diujikan terhadap orang dewasa yang sehat dan yang telah divaksinasi di negara bagian Khartoum di Sudan sebagai salah satu negara yang memiliki beban TB yang tinggi di wilayah Timur Afrika (Gorish, *et al.*, 2018).

Dua protein yang terkandung dalam *M.tuberculosis* mempunyai potensi sebagai kandidat diagnostik melalui tes berbasis sistem kekebalan tubuh dan sebagai kandidat vaksin tuberkulosis, protein itu adalah MPT83 yang dikodekan oleh gen Rv2873 dan MPT64 yang dikodekan oleh gen Rv1980c. Protein MPT64 merupakan protein yang disekresikan dari 24 kDa yang dikodekan oleh gen Rv1980c dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang tidak dijumpai dalam strain BCG, *M. bovis*, *M. leprae* maupun dalam spesies *Mycobacterial* lainnya. Antigen ini hanya ditemukan pada sel-sel yang sehat, yang biasanya tumbuh dan aktif mereplikasi diri (Ahmad *et al*, 2019).

Produksi antigen MPT64 dilakukan secara bioteknologi dengan mengkloning gen pengkode yaitu Rv1980c yang kemudian diekspresikan ke dalam sel *Escherichia coli* BL21. MPT64 menyebabkan respon hipersensitif yang

sangat kuat dalam merangsang produksi tingkat tinggi IFN pada pasien TB sehingga dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh pasien terhadap TB sehingga protein ini sangat berpotensi sebagai kandidat vaksin TB (Ahmad *et al*, 2019).

Satu-satunya vaksin berlisensi yang saat ini digunakan melawan TB paru dan ekstra pulmonary adalah vaksin BCG. Vaksin ini berasal dari strain bakteri patogen *M. bovis* yang menyerang sapi dan ternak lainnya, dibuat secara *in vitro* selama 13 tahun (1908-1921) dengan total 231 bagian. Sejak 1921, vaksin BCG telah digunakan pada bayi dan anak-anak dan hal tersebut dinyatakan efektif melindungi bayi dan anak dibawah 15 tahun dan berhasil mencegah 120.000 kematian anak setiap tahunnya. Namun vaksin ini gagal melindungi orang dewasa melawan TB paru yang menjadi manifestasi utama dari penyakit TB. Penurunan efektifitas BCG yang telah terjadi selama 10 tahun menjadi masalah bagi negara-negara dengan risiko TB yang sangat tinggi, dikarenakan vaksinasi yang telah terjadi saat lahir, mengakibatkan orang-orang tersebut berisiko tinggi dikemudian hari bahkan menjadi yang paling rentan (Whitlow *et al*, 2020).

Vaksin BCG dapat menimbulkan risiko bagi individu *immunocompromised*, yaitu keadaan dimana individu memiliki masalah dengan sistem imun sehingga terjadi kondisi khusus seperti kelainan imunitas bawaan, penyakit autoimun dan beberapa masalah lain yang terkait dengan sistem imun. Vaksin BCG dapat membuat pasien atau individu yang memiliki immunodeficiencies primer rentan mengalami komplikasi parah, selain itu penggunaan vaksin BCG terhadap bayi yang terpapar HIV tetapi tidak terinfeksi mengakibatkan pengurangan proliferasi sel T dan produksi konsentrasi sitokin pelindung yaitu TNF- α dan IFN- γ menjadi lebih rendah dibandingkan dengan sitokin yang

terdapat pada bayi yang sehat. Hal tersebut mengakibatkan keterlambatan kematangan sistem kekebalan tubuh pada bayi yang terpapar HIV sehingga mengakibatkan risiko terpapar TB sangatlah tinggi (Whitlow *et al*, 2020).

1. Vaksin subunit

Vaksin merupakan substansi yang telah lama dikenal untuk memperoleh respon imun terhadap mikroorganisme yang bersifat patogen. Pengembangan vaksin telah mencapai tiga generasi dimana vaksin generasi pertama dikembangkan dengan menggunakan mikroba patogen yang telah dilemahkan, dengan tingkat keamanan yang masih sangat rendah sehingga dimana vaksin generasi pertama seringkali bermutasi kembali menjadi virulen yang menimbulkan efek yang tidak diinginkan pada sel inang seperti menyebabkan penyakit dan dapat menyerang jaringan tubuh. Kemudian dikembangkan vaksin generasi kedua yang mengandung mikroorganisme yang telah dimatikan menggunakan zat atau bahan kimia, namun vaksin ini memiliki kelemahan dimana vaksin biasanya mengalami kegagalan yaitu tidak adanya respon imun dari dalam tubuh (Susmiarsih, 2018).

Kelemahan yang terdapat pada vaksin generasi pertama dan kedua, mendorong dikembangkannya vaksin generasi baru atau vaksin generasi ketiga, yaitu vaksin yang diperoleh dari rekombinan subunit protein. Vaksin subunit protein dibuat melalui teknik DNA rekombinan untuk memproduksi fragmen antigenik dari mikroorganisme. Berkembangnya kemajuan teknologi DNA rekombinan, maka dikembangkan jenis vaksin generasi keempat yang disebut vaksin DNA (Susmiarsih, 2018).

Sejauh ini vaksin subunit tuberkulosis H56 yang dikembangkan dari antigen Ag85B, ESAT 6 dan Rv2660c dari bakteri MTB, terbukti dapat memberi perlindungan yang tinggi terhadap pra dan pasca penularan tuberkulosis. Vaksin terapis TB tersebut lebih sering digunakan bagi pasien dengan infeksi TB laten yang dapat mengekspresikan antigen berbeda dari TB aktif (Li *et al.*, 2017).

Vaksin subunit memiliki keunggulan dalam hal biaya produksi dan keselamatan kerja. Vaksin ini dikembangkan dengan cara mengacaukan struktur virus, sehingga menghasilkan campuran komponen virus. Vaksin subunit sebagai vaksin alternatif dapat mengandung satu atau lebih protein dan fragmen peptida virus. Misalnya vaksin influenza yang terdiri dari dua antigen murni yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) yang berhasil diisolasi dari tiga strain virus influenza kemudian dikombinasikan membentuk vaksin trivalent memungkinkan mengandung atau tidak mengandung adjuvan. Vaksin subunit bakteri terdiri dari dua tipe yaitu vaksin subunit beracun yang menargetkan bakteri beracun yang menjadi sumber penyakit dan vaksin subunit berbasis polisakarida yang menargetkan infeksi bakteri enkapsulasi (Hudu *et al.*, 2016).

2. Vaksin DNA

Mekanisme vaksin DNA dalam merangsang sistem imun dimulai dengan plasmid yang telah disisipi DNA asing diinjeksikan kedalam jaringan, kemudian plasmid DNA tersebut bereplikasi secara otonom memproduksi protein asing atau yang dikenal dengan antigen yang disandi oleh gen asing. Antigen kemudian menstimulasi sel B sehingga sel B memproduksi protein antibodi terhadap antigen. Sel yang mengandung antigen asing tersebut, bertindak sebagai sel

penyajikan antigen (APC). Kemudian dengan mekanisme dari jalur tertentu, melalui jalur MHC I pada sel CD8⁺ atau melalui MHC II pada sel CD4⁺ sel T, APC merangsang sistem imunitas tubuh (Susmiarsih, 2018).

Sebagian besar vaksin TB yang dikembangkan menggunakan antigen diekspresikan dalam replikasi Bacilli. Vaksin tuberkulosis yang dikembangkan dari antigen *Mycobacterium tuberculosis* yang berkaitan dengan sifat latensi (Vaksin TB laten), masih memerlukan penelitian lebih lanjut untuk menemukan vaksin jenis baru. Dengan mendeteksi tingkat produksi IFN- γ pada PBMCs manusia, diperoleh tiga antigen yang memiliki imunogenitas yang kuat terhadap tuberkulosis laten yaitu Rv1738, Rv2626c, dan Rv3130c. Ketiga antigen tersebut sangat berpotensi menjadi kandidat vaksin tuberkulosis laten (Li *et al.*, 2017).

Isolasi gen yang menyandi epitop dan mengekspresikannya di dalam sel inang merupakan dasar dikembangkannya vaksin subunit rekombinan. Manfaat utama penggunaan epitop dari protein tunggal sebagai vaksin memungkinkan penginduksian imunitas yang tidak berefek samping dan menghindari respon imun yang diinduksi oleh bagian-bagian lain dari organisme patogen. Selain itu, vaksin subunit tidak bereplikasi dalam inang sehingga tidak patogen dan lebih aman namun demikian penggunaan vaksin ini masih memerlukan kajian dosis dan penggunaan adjuvan (Susmiarsih, 2018).

Vaksin DNA adalah vaksin yang dikembangkan dari plasmid yang mengandung sekuens DNA dengan mengkode antigen spesifik atau tertentu berdasarkan respon imun target. Kelebihan dari vaksin DNA sendiri adalah lebih stabil, mudah dibuat, mudah diinjeksikan, dan aman. Sementara itu kelemahan dari vaksin ini ialah memiliki imunogenitas yang rendah. Antigen spesifik yang

tedapat dalam plasmid dari vaksin ini akan menstimulasi terbentuknya ekspresi gen, kemudian antigen tersebut akan dikenali oleh sistem imun sehingga memicu terjadinya respon imun yang melibatkan komponen-komponen dalam sistem imun itu sendiri seperti sel T *helper*, sel T sitotoksik, dan berbagai macam antibodi seperti sitokin-sitokin (Dewi, 2017).

Vaksin DNA bekerja dengan cara ekspresi DNA asing yang masuk kedalam tubuh secara *in vivo* menghasilkan protein antigen. Antigen tersebut di presentasikan oleh kerja sistem imun yaitu *antigen-presenting cell* (APC) seperti sel dendritik dan makrofag. Antigen dalam vaksin ini ialah antigen yang mati atau tidak hidup, tidak bereplikasi dan tidak menular, hal inilah yang membedakan antara vaksin DNA dengan infeksi virus (Dewi, 2017).

3. Vaksin Rekombinan

Vaksin rekombinan dibuat dan dikembangkan melalui teknologi DNA rekombinan dengan prinsip dasar yaitu pengklonan gen yang direayasa untuk menghasilkan protein yang diinginkan. Pengklonan gen merupakan suatu proses memasukan DNA atau gen asing ke dalam sel inang dengan bantuan vektor yang bertujuan untuk memperbanyak gen yang bersifat identik. Prinsip pengklonan gen dilakukan dengan cara menyisipkan gen yang hendak diperbanyak kedalam vektor untuk membentuk DNA rekombinan yang memiliki kemampuan bereplikasi di dalam sel inang (Susmiarsih, 2018).

Vaksin rekombinan merupakan metode modern yang saat ini digunakan untuk mengembangkan vaksin, dengan cara melibatkan ekspresi rekombinan protein dan vektor virus. Teknologi ini memungkinkan pengembangan vaksin menjadi lebih muda dan risiko keselamatan menjadi lebih rendah karena

melibatkan teknologi bioproses yang lebih terkontrol dengan masa produksi yang lebih singkat. Contoh vaksin tipe ini adalah vaksin rekombinan hepatitis B, yang merupakan vaksin rekombinan pertama yang berlisensi (Hudu *et al*, 2016).

4. *Live attenuated vaccines (LAV)*

Vaksin jenis ini terbuat dari keseluruhan replikasi mikroorganisme kompeten yang diinjeksikan dalam masa patogenitas yang menghasilkan efek perlindungan dalam jangka waktu yang lama. Namun sangat berpotensi mengancam keselamatan bagi inang atau penerima karena virus nya dapat kembali menjadi bersifat virulen dan menjadi patogen sehingga mengganggu sistem kekebalan tubuh. Selain itu vaksin jenis ini dapat dinetralkan oleh antibodi utama tubuh sehingga menjadi tidak aktif dan terjadi mutasi (Hudu *et al*, 2016).

Salah satu penyakit mematikan yang berhasil di atasi dengan menggunakan vaksin LAV adalah cacar, vaksin ini telah menyelamatkan jutaan nyawa dari bahaya wabah cacar sehingga tercatat sebagai salah satu penemuan terpenting dalam dunia medis (Connel and Florian, 2020).

II.8 Uji ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Tes serologis seperti ELISA merupakan metode tes yang disarankan sebagai metode alternatif dalam diagnosis tuberkulosis. Sejak tahun 1948 dimana uji serologi menggunakan tes aglutinasi pertama kali dilakukan, telah banyak alat tes yang digunakan untuk mendeteksi antibodi spesifik terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. ELISA digunakan dalam tes serologi untuk mendiagnosis tuberkulosis bovine. Teknik ELISA diaplikasikan sebagai metode sensitif pertama kali pada pengukuran antibodi hewan (Sayin and Erganis, 2013).

Enzyme immunoassay (EIA) dan Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) adalah uji atau metode yang sering digunakan dalam obat-obatan dan sebagai metode kualitas kontrol dalam industri, selain itu juga digunakan sebagai alat analitik dalam penelitian biomedis untuk deteksi dan kuantifikasi antigen spesifik atau antibodi yang terdapat dalam sampel tertentu. Kedua tes tersebut memiliki prinsip-prinsip dasar yang sama. ELISA menggunakan konsep imunologi dasar dimana antigen mengikat antibodi spesifiknya, yang mendeteksi sebagian kecil antigen seperti protein, peptida, hormon, atau antibodi yang ada pada sampel (Gan dan Kurti, 2013).

Berbagai macam teknik ELISA telah dikembangkan dan dimodifikasi dari satu metode kunci yaitu mendeteksi secara langsung atau tidak langsung antigen dengan mengikuti pola atau melumpuhkan antibodi menangkap antigen atau antigen spesifik masing-masing, langsung ke permukaan sumur. Masing-masing dari teknik ELISA yang telah dimodifikasi dapat digunakan untuk keperluan kuantitatif maupun kualitatif. Beberapa Modifikasi dari metode ELISA adalah *Indirect ELISA*, *Sandwich ELISA* dan *Competitive ELISA*. Kelemahan utama dari metode *Indirect ELISA* adalah metode imobilisasi antigen tidak secara spesifik. Ketika serum yang hendak digunakan sebagai antigen uji, semua protein dalam sampel dapat menempel kedalam sumur-sumur dari *plate* mikrotiter. Namun kekurangan atau kelemahan ini dapat diatasi dengan cara menangkap antibodi menjadi antibodi spesifik dari serum sampel (Gan and Kurti, 2013).

Teknik *Sandwich ELISA* digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi sampel antigen spesifik. Permukaan sumuran disiapkan dengan

sejumlah antibodi untuk menangkap antigen yang diinginkan. Setelah pengikatan spesifik, situs diblokir dengan menggunakan serum albumin bovine, sampel yang mengandung antigen diterapkan di permukaan piringan. Salah satu keuntungan menggunakan antibodi untuk menangkap antigen spesifik adalah dapat memurnikan antigen dari campuran antigen lain sehingga diperoleh antigen murni sehingga meningkatkan sensitivitas dari alat tes (Gan and Kurti, 2013).

Prinsip dari metode *Competitive ELISA* adalah rekasi kompetitif antara antigen dan antigen terikat yang saling berkompetisi untuk terikat dengan *plate* mikrotiter dengan antibodi primer atau antibodi utama. Keuntungan utama dari metode ini adalah sensitivitas yang tinggi terhadap perbedaan penyusun dalam campuran antigen kompleks, bahkan ketika deteksi antibodi yang spesifik hadir dalam jumlah yang relatif sedikit. Metode ini dapat digunakan untuk menentukan potensi ekstrak allergen standar dan mengukur antibodi polisakarida kapsul *Haemophilus influenzae* tipe b dalam sera manusia dari subjek yang divaksinasi. Metode ini juga sering digunakan untuk mendeteksi antibodi HIV yang terdapat dalam sera pasien (Gan and Kurti, 2013).