

SKRIPSI

**UJI IMMUNOREAKTIVITAS PROTEIN REKOMBINAN MPT63 DENGAN
IL-6 SEBAGAI SERODIAGNOSTIK TUBERKULOSIS LATEN**

Disusun dan diajukan oleh

KEZYA TANGKETASIK

H041171503



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**UJI IMMUNOREAKTIVITAS PROTEIN REKOMBINAN MPT63 DENGAN
IL-6 SEBAGAI SERODIAGNOSTIK TUBERKULOSIS LATEN**

Disusun dan diajukan oleh:

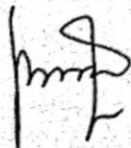
KEZYA TANGKETASIK

H041171503

**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 29 Juni 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan.**

Menyetujui

Pembimbing Utama,



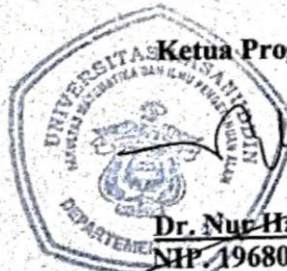
Dr. Rosana Agus, M.Si
NIP. 19650905 199103 2 003

Pembimbing Pertama



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

Ketua Program Studi,



Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si
NIP. 19680129 199702 2 001

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Kezya Tangketasik

Nim : H041171503

Program Studi : Biologi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul Uji Immunoreaktivitas Protein Rekombinan MPT63 dengan IL-6 sebagai Serodiagnostik Tuberkulosis Laten adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemudian hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 29 Juni 2021

Yang Menyatakan



(Kezya Tangketasik)

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan rahmatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul **“Uji Immunoreaktivitas Protein Rekombinan MPT63 dengan IL-6 sebagai Serodiagnostik Tuberkulosis Laten”** yang merupakan syarat dalam menyelesaikan studi untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang dengan penuh suka cita memberikan semangat, motivasi dan membantu secara langsung maupun tidak langsung selama pembuatan skripsi ini. Terutama kepada keluarga ku yang tersayang, papa Marthinus Tangketasik, S.Th dan mama Tirza Trie Saranga, S.E yang selalu mendoakan serta memberikan semangat yang luar biasa dan memberikan dukungan moril maupun materil. Papa dan Mama adalah alasan utama penulis untuk segera menyelesaikan skripsi ini, semoga ini bisa membuat papa dan mama bahagia dan bangga. Untuk adek-adek penulis, Tazya Tangketasik dan Trezya Tangketasik terima kasih sudah mendoakan dan memberi semangat yang penuh.

Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan juga kepada ibu Dr. Rosana Agus, M.Si selaku pembimbing utama dan ibu Zaraswati Dwayana, M.Si selaku pembimbing pertama. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya telah sabar dan meluangkan waktunya dengan memberikan bimbingan, arahan, dan masukan yang sangat berguna dalam penyelesaian skripsi ini. Dalam kesempatan baik ini, penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi.
2. Ibu Dr. Nur Haedar M.Si selaku ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin serta selaku pembimbing akademik yang telah banyak membantu penulis.
3. Bapak Andi Arfan Sabran, S.Si, M.Kes dan Ibu Dr. Elis Tambaru, M.Si selaku penguji sidang sarjana. Terima kasih atas segala saran dan ilmunya. Terima kasih juga kepada seluruh dosen Departemen Biologi yang telah sabar dalam membimbing dan memberikan ilmunya selama proses perkuliahan. Kepada staf pegawai Departemen Biologi juga diucapkan terima kasih telah membantu dalam masalah administrasi.
4. Kepada Handayani Halik, M.Si, S.Si yang sabar dalam membantu, membimbing serta memberi arahan kepada penulis selama melakukan penelitian di Laboratorium Rumah Sakit Universitas Hasanuddin.
5. Teman seperjuangan dan sepenelitian (Genetica Squad), Paula Natasha A.S.V, Jesika Bangkaran, Dian Ramadhani, dan Ferdinando terima kasih untuk setiap bantuannya. Terima kasih sudah sama-sama berjuang dalam suka maupun duka menyelesaikan skripsi ini.
6. Untuk Paula Natasha A.S.V terima kasih sebanyak-banyaknya telah menjadi pendengar yang baik, selalu sabar jika penulis bertanya tentang skripsi dan terima kasih atas bantuan baik berupa saran maupun kritik dan telah mengingatkan penulis untuk selalu rajin mengerjakan skripsi. Semoga Tuhan me

emberkati dan selalu diberikan kebahagiaan dalam hidupnya.

7. Untuk teman seperjuangan Widar Laili, terima kasih telah memberi semangat dan motivasi kepada penulis dalam mengerjakan skripsi ini.
8. Untuk Grace Azarya Sirenden, Librawaty Sara Tangibali, Dewi Puspita Kayangan, dan Grace Randa Kadang sebagai sahabat terbaik penulis. Terima kasih banyak untuk semangat yang selalu diberikan kepada penulis dari awal sampai selesainya pengerjaan skripsi ini. Semoga Tuhan Memberkati dan selalu diberikan kebahagiaan dan kita sama-sama menjadi orang yang sukses.
9. Untuk teman-teman Biologi angkatan 2017, terima kasih untuk kebersamaan, canda tawa, pengalaman organisasi, dukungan dan bantuan dari awal perkuliahan sampai selesai yang diberikan kepada penulis.

Akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya.

Makassar, Mei 2021

Penulis

ABSTRAK

Tuberkulosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang menyebabkan kematian diseluruh dunia meningkat setiap tahunnya. Salah satu uji diagnosis yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya bakteri TB yaitu serodiagnostik. Serodiagnostik dapat digunakan dengan memilih antigen yang tepat yang dapat membedakan antara penyakit TB aktif dan TB laten. Antigen dari *Mtb* yang digunakan yaitu MPT63. Tujuan penelitian untuk menguji immunoreaktivitas protein rekombinan MPT63 sebagai serodiagnostik tuberkulosis laten. Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Februari sampai Mei 2021 di Laboratorium Rumah Sakit Universitas Hasanuddin. Uji immunoreaktivitas protein rekombinan MPT63 menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Protein rekombinan MPT63 yang telah dipurifikasi direaksikan dengan serum penderita TB aktif dan TB laten, kemudian dilakukan pengukuran kadar Interleukin 6 (IL-6) menggunakan ELISA reader. Hasil penelitian menunjukkan kadar IL-6 pada penderita TB laten lebih tinggi dibandingkan TB aktif karena IL-6 menghambat produksi TNF- α yang banyak pada TB laten dan protein rekombinan MPT63 dapat menstimulasi produksi IL-6. Data tersebut didukung oleh hasil uji statistik yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan konsentrasi IL-6 pada penderita TB aktif dan TB laten. Dapat disimpulkan bahwa protein rekombinan MPT63 berpotensi sebagai serodiagnostik tuberkulosis laten.

Kata kunci : Tuberkulosis, MPT63, IL-6, serodiagnostik, ELISA

ABSTRACT

Tuberculosis is a disease caused by the bacteria *Mycobacterium tuberculosis* which causes deaths worldwide to increase every year. One of the diagnostic tests that can be used to detect the presence of TB bacteria is serodiagnostic. Serodiagnostics can be used by selecting the appropriate antigen that can differentiate between active TB disease and latent TB. The antigen of *Mtb* used is MPT63. The purpose of the study was to test the immunoreactivity of the MPT63 recombinant protein as a serodiagnostic latent tuberculosis. This research was conducted from February to May 2021 in the Laboratory of Hasanuddin University Hospital. Test the immunoreactivity of MPT63 recombinant protein using ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) method. MPT63 recombinant protein that has been purified is reacted with serum with active TB and latent TB, then the interleukin-6 (IL-6) levels were measured using ELISA reader. The results showed that IL-6 levels in latent TB patients were higher than active TB because IL-6 inhibited the production of TNF- α in latent TB and MPT63 recombinant protein can stimulate IL-6 production. The data is supported by statistical test results that show that there are differences in IL-6 concentrations in people with active TB and latent TB. It can be concluded that the MPT63 recombinant protein has the potential as a serodiagnostic latent tuberculosis.

Key words : Tuberculosis, MPT63, IL-6, serodiagnostic, ELISA

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERNYATAAN KEASLIAN	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	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	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II. 1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
II.2 Patogenesis <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
II.3 Respon Imun terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
II.4 Peranan Interleukin 6	12
II.5 Diagnosis Tuberkulosis Laten	12
II.6 Serodiagnostik	14
II.7 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	15

II.8 <i>Mycobacterium</i> Protein Tuberculosis 63 (MPT63)	16
BAB III METODE PENELITIAN	19
III.1 Alat.....	19
III.2 Bahan	19
III.3 Prosedur Kerja	19
III.3.1 Kriteria Sampel.....	19
III.3.2 Penyiapan Protein Rekombinan MPT63 sebagai Antigen	20
III.3.3 Uji Immunoreaktivitas Menggunakan Metode ELISA (<i>Enzyme</i> <i>Linked Immunosorbent Assay</i>)	20
III.3.3.1 Coating Protein	20
III.3.3.2 Uji ELISA.....	20
III.3.4 Analisis Data	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
IV.1 Uji Immunoreaktivitas Protein Rekombinan MPT63 dengan Serum....	23
IV.2 Coating Protein.....	23
IV.3 Uji ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) pada Serum.....	25
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	32
V.1 Kesimpulan.....	32
V.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
Tabel 1.	Nilai Absorbansi Standar pada Plate ELISA	24
Tabel 2.	Konsentrasi IL-6 pada Penderita Tuberkulosis Laten	26
Tabel 3.	Konsentrasi IL-6 pada Penderita Tuberkulosis Aktif.....	27
Tabel 4.	Hasil Uji Statistik (One Sample Test)	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
Gambar 1.	Struktur Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
Gambar 2.	Visualisasi Kapsul <i>M. tuberculosis</i> dengan Mikroskop Elektron	6
Gambar 3.	Representasi Skematis Lapisan Sel <i>M. tuberculosis</i>	7
Gambar 4.	Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	8
Gambar 5.	Mekanisme Infeksi <i>M. tuberculosis</i>	9
Gambar 6.	Lokus Protein Rekombinan MPT63	17
Gambar 7.	Struktur Protein Rekombinan MPT63	18
Gambar 8.	Plate ELISA	22
Gambar 9.	Protein Rekombinan MPT63	23

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
Lampiran 1.	Skema Kerja	38
Lampiran 2.	Alat	39
Lampiran 3.	Bahan.....	41
Lampiran 4.	Prosedur Kerja	43
Lampiran 5.	Kurva Larutan Standar	44
Lampiran 6.	Hasil Uji Statistik	45
Lampiran 7.	Titik Persentase Distribusi t (df=1-40).....	46

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang menyebabkan kematian diseluruh dunia meningkat setiap tahunnya. Bakteri *M. tuberculosis* diyakini berasal dari Afrika Timur (Sanyaolu *et al*, 2019). Di seluruh dunia, sekitar 10.000.000 orang terinfeksi TB setiap tahun. Penyakit ini dapat menyerang siapapun, tetapi kebanyakan diderita oleh orang dewasa sekitar 90%. *Mycobacterium tuberculosis* dapat menyebar melalui udara, misalkan dengan batuk yang bisa mempengaruhi paru-paru dan organ tubuh lainnya (WHO, 2019).

Secara global, 10 juta orang (sekitar 9,0-11,1 juta) yang menderita TB pada tahun 2019. Sekitar 1,2 juta kematian yang disebabkan oleh TB. Berdasarkan usia dan jenis kelamin, 58% laki-laki (usia ≥ 15 tahun), 34% perempuan, dan 8% anak-anak (usia < 15 tahun) dilaporkan menderita TB di tahun 2019. Penurunan tingkat kejadian TB 1,6% per tahun pada periode 2000-2018. Wilayah Eropa mengalami penurunan insiden sekitar 15% dan kematian turun 24% antara 2015 dan 2018. Insiden dan kematian juga mengalami penurunan relatif cepat yaitu 4,1% dan 5,4% di wilayah Afrika. Pada tahun 2018, di India kasus TB pada tahun 2013 sebanyak 1,2 juta mengalami peningkatan sebanyak 2 juta pada tahun 2018 (WHO, 2019).

Jumlah kasus baru TB di Indonesia sebanyak 845.000 kasus pada tahun 2018. Pria dewasa yang menderita TB sekitar 57%, wanita dewasa 37% dan anak-anak 11% di tahun 2018 (WHO, 2019). Prevelensi TB lebih besar pada laki-laki dibandingkan

perempuan. Hal ini terjadi kemungkinan karena laki-laki lebih terpapar pada faktor risiko TB misalnya merokok dan kurangnya ketidapatuhan minum obat (Kemenkes RI, 2018). Indonesia menduduki posisi ketiga dengan kasus tuberkulosis (TB) tertinggi di dunia. Sementara posisi pertama dan kedua saat ini adalah India dan China (WHO, 2019).

Pada tahun 2018, jumlah kasus TB di Sulawesi Selatan 23.427, laki-laki berjumlah 13.573 dengan persentase 57,94% sedangkan perempuan berjumlah 9.854 dengan persentase 42,06% (Kemenkes RI, 2019). Jumlah seluruh kasus TB di Kota Makassar pada tahun 2017 sekitar 4.926 kasus. Laki-laki berjumlah 2.837 dengan persentase 57,49%, dan perempuan 2.089 dengan persentase 42,41%, sedangkan kasus TB pada anak umur 0-14 tahun sekitar 336 kasus dengan persentase yang dimiliki yaitu 6,82% (Dinkes Prov Sulsel, 2017).

Serodiagnostik merupakan tes yang digunakan untuk mendeteksi adanya infeksi TB yang didasarkan pada pengenalan antibodi terhadap antigen *Mycobacterium tuberculosis*, bahwa adanya antibodi *Mycobacterium tuberculosis* tertentu dalam darah merupakan indikasi tidak langsung dari penyakit TB. Kunci untuk diagnosis yang akurat menggunakan serodiagnostik dengan memilih antigen yang tepat yang dapat membedakan antara penyakit TB aktif dan laten dengan mempertahankan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Serodiagnostik dapat digunakan karena kesederhanaannya, kemampuan mendeteksi dengan cepat dan biaya yang murah (Khaliq *et al*, 2017).

Saat ini 2 metode untuk diagnostik TB laten yaitu tes kulit tuberkulin (TST) dan tes pelepasan interferon-gamma (IGRA). Kedua tes tersebut bergantung pada imunitas (tanggapan sel T memori). Tes kulit tuberkulin (TST) paling banyak

digunakan terutama karena biayanya yang rendah. TST umumnya dilakukan dengan menggunakan teknik Mantoux namun memiliki spesifisitas yang relatif rendah dan kurang sensitivitas pada sistem kekebalan orang yang hidup dengan HIV. Tes IGRA (*IFN Gamma Realease Assay*) digunakan sebagai alternatif TST karena dianggap lebih spesifik dan dilakukan dengan mengukur interferon- gamma yang dilepaskan oleh sel T setelah stimulasi dengan antigen *Mycobacterium tuberculosis*. Kinerja diagnostik menggunakan IGRA memiliki spesifisitas yang lebih tinggi daripada TST (Doan *et al*, 2017). Berbeda dengan TST, IGRA tidak terpengaruh oleh status vaksinasi bacille Calmette-Guérin (BCG) sehingga berguna untuk evaluasi infeksi TB laten pada individu yang divaksinasi bacille Calmette-Guérin (BCG). Namun, platform IGRA lebih mahal untuk dijalankan, membutuhkan kit khusus serta laboratorium yang terakreditasi (WHO, 2019).

MPT63 dapat berinteraksi langsung dengan dengan inang (host) sehingga protein dapat mengaktifkan respon imun pada individu yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Fidhatami dkk, 2020). MPT63 adalah salah satu protein yang disekresikan *Mycobacterium* yang ditemukan pada sel-sel inflamasi di paru-paru pasien yang mengidap TB. Protein ini terakumulasi dalam sel yang terinfeksi akibat adanya aktivitas *Mycobacterium*. MPT63 memiliki target intraseluler dengan bertindak langsung pada sel yang terinfeksi. MPT63 mampu secara khusus menginduksi aktivasi makrofag (Siromolot & Denis, 2018). MPT63 mampu secara khusus merangsang produksi sitokin (TNF- α dan IL-6) (Rapar dkk, 2015). MPT63 terbukti mampu menginduksi sitokin seperti IL-2, Th1 serta melepaskan IFN- γ (Duan *et al*, 2015).

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh protein rekombinan MPT63 sebagai serodiagnostik tuberkulosis laten.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini yaitu untuk menguji immunoreaktivitas protein rekombinan MPT63 sebagai serodiagnostik tuberkulosis laten.

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi efektivitas protein rekombinan MPT63 sebagai serodiagnostik tuberkulosis laten melalui uji immunoreaktivitas.

I.4 Perumusan Hipotesis

Perumusan hipotesis dari penelitian ini yaitu H_0 menunjukkan rata-rata kandungan IL-6 sama pada jenis kelompok sampel dan H_a menunjukkan rata-rata kandungan IL-6 tidak sama pada jenis kelompok sampel.

I.5 Waktu dan Tempat Penelitian

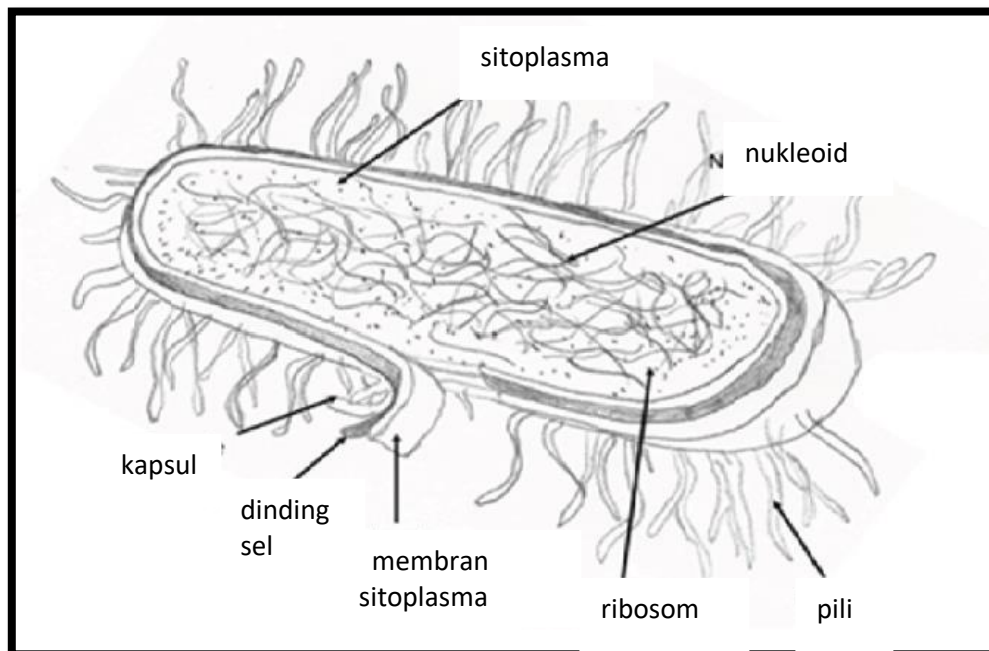
Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Mei 2021 di Laboratorium Penelitian Rumah Sakit Universitas Hasanuddin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

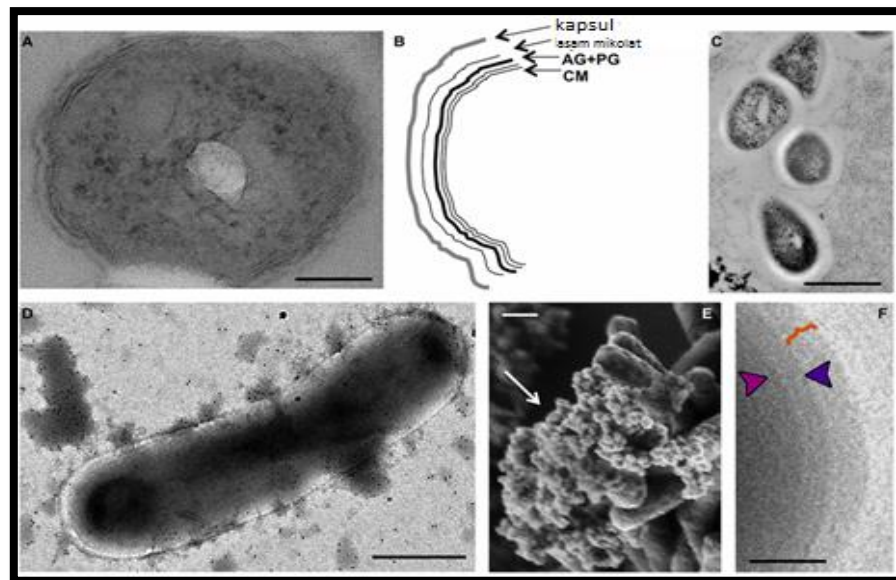
II.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri berbentuk batang, besar, dan bersifat non motil memiliki panjang sekitar 2-4 μm dan lebar 0,2 – 0,5 μm . Bakteri ini bersifat aerob obligat sehingga membutuhkan oksigen untuk melakukan respirasi sel aerobik. *M. tuberculosis* merupakan parasit intraselular fakultatif. Bakteri ini dikenal sebagai bakteri tahan asam karena bakteri ini dapat membentuk kompleks asam dengan pewarna akrilat. Memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal dengan lapisan kaya lipid yang ada pada permukaan luar sel yang memberi sifat tahan luntur terhadap asam. Ukuran genomik *M. tuberculosis* adalah 4,4 Mb mengandung 3959 gen dimana hanya 40% gen fungsional dan 60% non-fungsional (Khare *et al*, 2018).



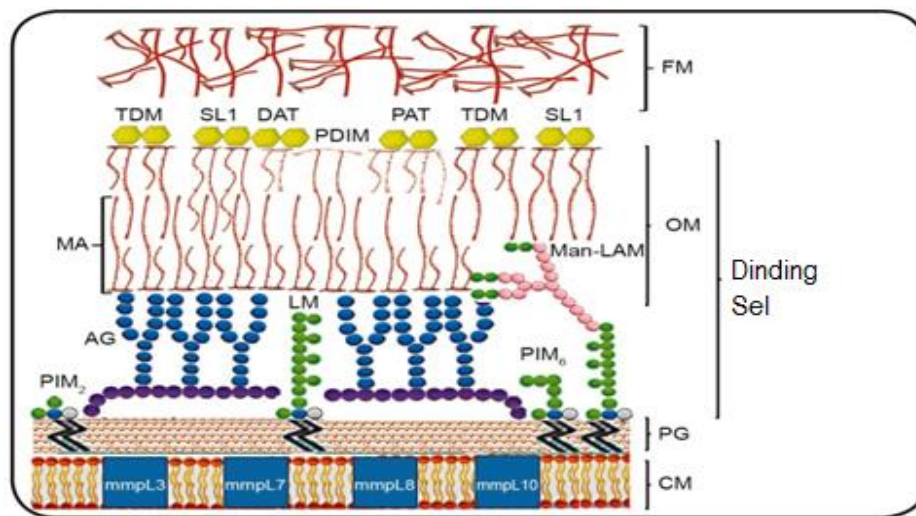
Gambar 1. Struktur Morfologi *Mycobacterium tuberculosis* (Jabir *et al*, 2018)

Dinding sel *M. tuberculosis* merupakan struktur kompleks yang disebabkan oleh komposisi kimia yang sangat berbeda dari bakteri lain. Struktur dinding sel yang kompleks ini membuat organisme tahan terhadap banyak obat. Dinding sel *M. tuberculosis* terdiri dari lapisan dalam dan lapisan luar. Lapisan luar mengandung lipid dan protein. Lapisan dalam terdiri dari peptidoglikan, arabinogalaktan, asam mikolik (Khare *et al*, 2018). Asam mikolik disusun dalam bentuk bilayer dalam hubungannya dengan lipid dinding sel yang berfungsi sebagai penghalang permeabilitas cairan yang rendah. Sifat-sifat asam mikolik tercermin dalam fluiditas dan fleksibilitas. Selain itu, asam mikolik juga dapat hadir dalam bentuk teroksidasi di sebagian besar bakteri (Ghazaei, 2018). Struktur sel *M. tuberculosis* terdiri dari empat lapisan utama yaitu membran plasma atau membran dalam, peptidoglikan-arabinogalaktan (AGP) kompleks, membran luar asimetris atau 'mycomembrane' yang secara kovalen terkait dengan AGP melalui asam mikolik, dan bagian terluar adalah kapsul (Kalscheuer *et al*, 2018).



Gambar 2. Visualisasi kapsul *M. tuberculosis* dengan mikroskop elektron (Kalscheuer *et al*, 2018)

Salah satu keunikan dari *M. tuberculosis* adalah lapisannya yang kaya lipid. Sekitar 40% dari berat kering dinding selnya terdiri dari lipid dan sebagian besar kapasitas pengkodean genom bakteri dikhususkan untuk biosintesis dan degradasi lipid. Beberapa lipid dikaitkan dengan respon imun bawaan yang berbeda selama fase awal infeksi. Perbedaan ekspresi lipid ini menentukan apakah *M. tuberculosis* akan memasuki fase infeksi kronis atau tidak (Queiroz & Lee, 2017).



Gambar 3. Representasi skematis lapisan sel *M. tuberculosis* (Queiroz & Lee, 2017).

Klasifikasi dari *Mycobacterium tuberculosis* :

Kingdom : Bacteria

Phylum : Actinobacteria

Order : Actinomycetales

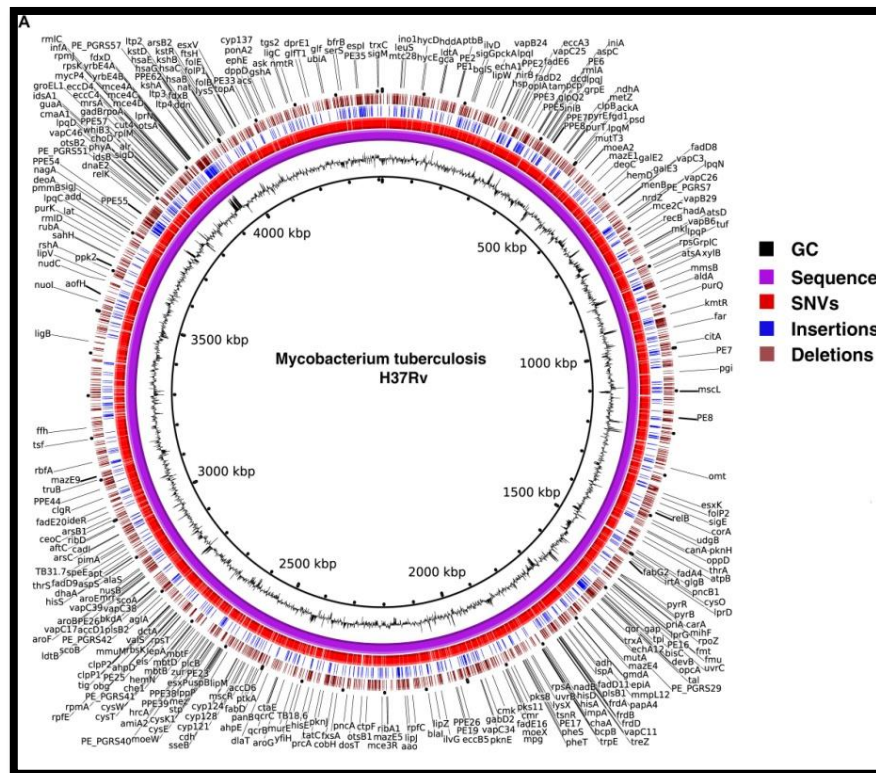
Family : Mycobacteriaceae

Genus : *Mycobacterium*

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

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

Genom *M. tuberculosis* merupakan genom terbesar kedua setelah *Escherichia coli*. Urutan asli dan anotasi dari strain H37Rv memiliki total 4.411.529 pasangan basa yang terdiri dari 3974 gen, di mana 3924 protein yang dikodekan dan 50 RNA stabil. Data base genom terbaru diperbarui menunjukkan bahwa strain H37Rv terdiri dari total 4008 gen yang mengkode total 3906 protein dan 70 RNA stabil. Ukuran genom 4,41 Mb dengan kromosom melingkar tunggal. Secara keseluruhan genom *M. tuberculosis* memiliki kapasitas 91% dan sekitar 65,6% G+C (Lamichhane & Natalie, 2018).



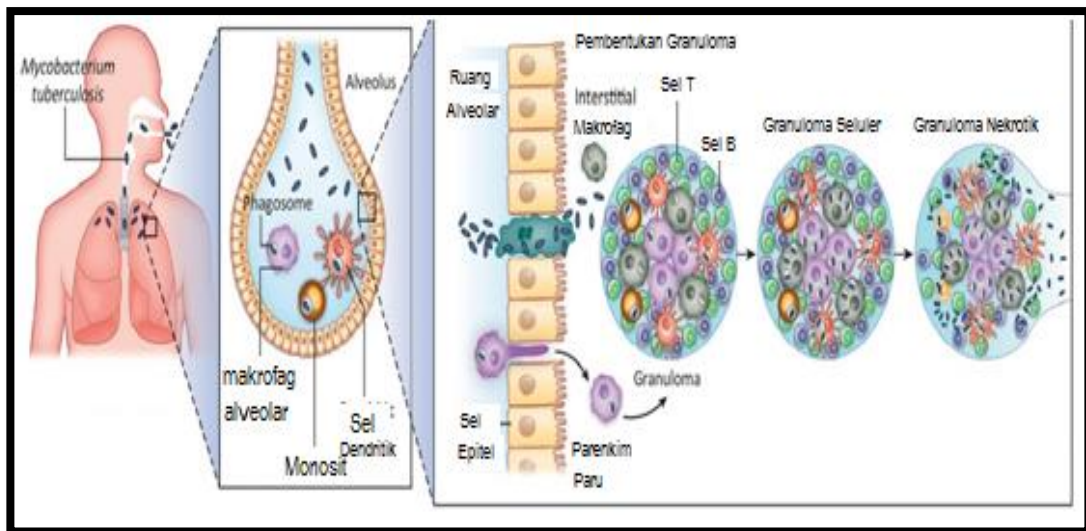
Gambar 4. Genom *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Advani *et al*, 2019)

II. 2 Patogenesis *Mycobacterium tuberculosis*

Penularan penyakit TB diawali dengan adanya basil *M. tuberculosis* yang tersebar di lingkungan oleh orang yang terinfeksi melalui batuk atau bersin yang menyebabkan bakteri tersebar disekitar. Bakteri *M. tuberculosis* kemudian secara tidak

sengaja dihirup oleh orang-orang terdekat, sehingga bakteri masuk melalui saluran pernapasan dan akhirnya menetap di inang alveoli. Selanjutnya, respon imun bawaan terjadi dan makrofag akan menuju ke daerah yang terinfeksi dan akan memfagosit bakteri tersebut. Biasanya makrofag sanggup menghancurkan sebagian besar bakteri *M. tuberculosis*. Akan tetapi, pada sebagian kecil kasus makrofag tidak mampu menghancurkan bakteri TB dan bakteri akan bereplikasi dalam makrofag. Bakteri TB dalam makrofag yang terus berkembang biak akhirnya akan membentuk koloni di daerah tersebut (Ferraris *et al*, 2018).

Proses ini menyebabkan respon imun akan membentuk struktur infeksi khas yang disebut granuloma yang akan melindungi makrofag yang terinfeksi dari serangan lebih lanjut. Granuloma dapat melindungi bakteri infeksi selama beberapa dekade dan menyebabkan homeostasis antara respon imun inang dan bakteri patogen yang menyerang akan terganggu setiap kali terjadi immunosupresif. Oleh karena itu, pasien HIV positif berisiko tinggi terkena TB (Ferraris *et al*, 2018).



Gambar 5. Mekanisme Infeksi *M. tuberculosis* (Koch & Valerie, 2018).

Menurut Queiroz & Lee (2017), *M. tuberculosis* memasuki paru-paru dan bertemu dengan ruang udara alveolar. Ruang udara alveolar dibentuk oleh tipe I dan II pneumosit. Pneumosit tipe I mencakup sekitar 96% dari luas permukaan alveolar, sedangkan sel tipe II menutupi sekitar 4%. Diperkirakan bahwa *M. tuberculosis* difagosit oleh makrofag setelah memasuki paru-paru, tetapi dari ruang alveolar menunjukkan bahwa *M. tuberculosis* kemungkinan besar akan berinteraksi dengan pneumosit terlebih dahulu. Kemudian makrofag dan limfosit bermigrasi ke tempat infeksi dan membentuk granuloma.

Kemampuan *M. tuberculosis* untuk bertahan dalam inang tampaknya bergantung pada siklus metabolisme beta-oksidasi dan glioksilatnya. Pada tikus, bakteri menggunakan asam lemak sebagai sumber karbon eksklusif. Selama siklus beta-oksidasi, bahkan asam lemak rantai dikatabolisme menjadi asetil koenzim A (asetil-KoA), dan asam lemak rantai ganjil menjadi asetil-KoA dan propionil-KoA. Basil mencegah akumulasi toksik propionil-CoA dengan mensintesis lipid berbasis methylmalonyl-CoA [phthiocerol dimycocerosate (PDIM), sulpholipid-1 (SL-1), dan polyacyltrehalose] (Queiroz & Lee, 2017).

Siklus Glyoxylate mengubah molekul asetil-KoA yang berasal dari oksidasi beta asam lemak menjadi intermediet siklus asam tricarboxylic. Selain itu, asetil-KoA adalah substrat untuk asam mikolik (MA), lipid berbasis malonil-CoA. *M. tuberculosis* menyesuaikan metabolisme lipidnya karena mengalami pembatasan kondisi nutrisi yang dipaksakan oleh inang. Mengaktifkan dua jalur secara alternatif, bakteri mensintesis lipid berbasis methylmalonyl dan malonyl yang memungkinkan *M. tuberculosis* melakukan persistensi (Queiroz & Lee, 2017).

II.3 Respon Imun terhadap *Mycobacterium tuberculosis*

Sel dendritik (DC) dan makrofag merupakan garis pertahanan pertama melawan TB dan berperan dalam pembersihan bakteri infeksi. DC menginternalisasi bakteri infeksi dan menyajikan antigen ke sel T sehingga menyebabkan terjadinya aktivasi dan memulai timbulnya respon imun adaptif. Selanjutnya makrofag memfagosit bakteri patogen yang menyerang dengan menginternalisasi dan memaparkannya pada lingkungan fagosom yang bersifat asam dan aktif secara hidrolitik. Makrofag bersama dengan sel-sel epiteloid dan sel raksasa berinti banyak (juga dikenal sebagai sel raksasa Langhans) dan limfosit T juga merupakan konstituen seluler utama granuloma. Pembentukan infeksi *M. tuberculosis* memerlukan kontrol ketat atas produksi sitokin proinflamasi dan antiinflamasi. TNF- α , IFN- γ , dan IL-1 β sangat penting untuk meningkatkan fungsi dari granuloma, sedangkan IL-10 adalah salah satu regulator negatif utama dari respon inflamasi. TNF α adalah sitokin proinflamasi yang memperlihatkan pembentukan granuloma, sementara IFN- γ memperlihatkan presentasi antigen dan perekrutan CD4+ T limfosit atau limfosit T sitotoksik, dengan demikian memediasi pembunuhan mikobakteri. IL-1 β adalah sitokin proinflamasi yang sebagian besar diproduksi oleh monosit, makrofag, dan DC dan terlibat dalam respon imun inang terhadap *M. tuberculosis*. IL-1 β terbukti memediasi sinyal melalui reseptor IL-1 (IL-1R) sebagai respon terhadap infeksi mikobakteri. Berbeda dengan sitokin pro-inflamasi, sitokin IL-10 memiliki sifat anti-inflamasi dan diproduksi oleh makrofag dan sel-T pada infeksi *M. tuberculosis*. IL-10 menonaktifkan fungsi makrofag dengan menurunkan ekspresi TNF α , yang pada gilirannya mengurangi produksi IFN γ oleh sel-T dan dengan

demikian membantu kelangsungan hidup *M. tuberculosis*. Semua sitokin ini disekresikan dan diatur oleh makrofag dan DC setelah mendeteksi pola molekuler terkait patogen (PAMP) tertentu oleh reseptor pengenalan-pola (Ferraris *et al*, 2018).

II.4 Peranan Interleukin 6

Interleukin 6 merupakan sitokin proinflamasi yang dihasilkan oleh beberapa jenis sel, termasuk makrofag yang teraktivasi, sel T, sel endotel, dan sel otot polos untuk merangsang respon kekebalan tubuh selama terjadi infeksi (Almasyahadah dkk, 2016). Menurut Tania (2014), Interleukin 6 diproduksi di beberapa jenis sel limfoid maupun non limfoid, antara lain yaitu sel T, sel B, monosit, fibroblast, keratinosit, sel endotel, sel mesangial, dan beberapa sel tumor 10. Sitokin ini berpeluang sebagai indikator untuk menilai tingkat inflamasi yang dialami oleh sel endotel pembuluh darah (Yuniarti, 2014). IL-6 berperan dalam aktivitas biologikal termasuk pengaturan respon imun, inflamasi dan hematopoiesis (Tania dkk, 2014). Il-6 dapat membantu sel B untuk membentuk antibodi. Selain itu IL-6 juga dapat menghambat produksi TNF- α (Lopes *et al*, 2013). IL-6 memiliki fungsi proinflamasi dan anti inflamasi sehingga dapat digunakan untuk pemeriksaan klinis (Naseem *et al*, 2016).

II.5 Diagnosis Tuberkulosis Laten

Latent Tuberculosis Infection (LTBI) merupakan keadaan dimana respon imun persisten terhadap stimulasi oleh antigen *Mycobacterium tuberculosis* tanpa adanya bukti TB aktif. Sekitar 30% dari populasi dunia diperkirakan terinfeksi *M. tuberculosis*, hanya 10% dari orang yang terinfeksi berkembang menjadi penyakit TB aktif secara klinis dan 90% tetap dalam fase laten. Orang dengan LTBI tidak memiliki TB aktif dan

tidak merasa sakit tetapi TB tersebut dapat berkembang dalam waktu dekat atau jauh, proses tersebut dinamakan reaktivitas TB. Reaktivitas TB pada orang yang LTBI diperkirakan terjadi sekitar 5-10% dan mayoritas pada orang yang terinfeksi HIV, penyakit TB aktif akan berkembang lima tahun pertama setelah terjadi infeksi awal terjadi. Namun, resiko berkembangnya penyakit TB setelah infeksi tergantung pada beberapa faktor yang paling penting yaitu status dari imunologis inang (Poposka et al, 2018).

Diagnosis TB laten dapat menggunakan tes kulit tuberkulin (TST) dan uji pelepasan interferon-gamma (IGRA). TST sering digunakan untuk individu LTBI tetapi tidak dapat digunakan untuk membedakan infeksi TB aktif atau laten. TST dan IGRA dapat mendeteksi immunosensitisasi sebelumnya terhadap antigen *M. tuberculosis* dan tidak secara langsung menunjukkan keberadaan atau kelangsungan hidup organisme di dalam inang. TST memunculkan reaksi hipersensitifitas tipe tertunda terhadap injeksi intradermal turunan protein murni (PPD) yang mengandung antigen dari *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) (Wu et al, 2017).

IGRA adalah tes darah secara in vitro yang mengukur jumlah interferon gamma (IFN- γ) yang diproduksi oleh CD4+ T lymphocytes (QFT-GIT) atau jumlah sel T yang memproduksi IFN (T-SPOT TB) setelah terjadi stimulasi dengan antigen spesifik *M. tuberculosis* -ESAT-6 dan CFP-10 (Chee et al, 2018). ESAT-6 dan CFP-10 merupakan antigen yang digunakan untuk mendeteksi TB dengan cepat dalam sampel darah (Wu et al, 2017).

II.6 Serodiagnostik

Serodiagnostik merupakan uji reaksi antigen-antibodi secara in-vitro. Uji ini satu dari beberapa prosedur laboratorium yang dilakukan pada sampel serum darah untuk tujuan mendeteksi antibodi atau antigen secara khusus dalam hubungannya dengan penyakit tertentu. Beberapa uji serologi yang digunakan antara lain uji Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), uji hemaglutinin inhibitor, uji netralisasi, uji Mycodot (LAM), dan lain-lain. Serodiagnostik yang digunakan untuk pemeriksaan diagnosis TB metode direct atau indirect. Metode direct terdiri dari deteksi LAM pada sputum dan deteksi antigen pada cairan tubuh. Metode indirect biasanya untuk mendeteksi antibodi terhadap antigen *Mtb*. Metode ini menggunakan respon imun seluler dan humoral yang spesifik dari host untuk melawan infeksi atau penyakit. Tes serodiagnostik TB telah dilakukan sejak tahun 1898, menggunakan preparat sel *M. tuberculosis* atau *M. bovis* (Buchari, 2019).

Pada metode indirect dapat dilakukan dengan uji rapid dan ELISA. Rapid test merupakan salah satu teknik baru uji cepat dalam menegakkan diagnosis TB dengan menggunakan Immunochromatography Tuberculosis (ICT-TB) yang merupakan uji serologi untuk mendeteksi antibodi *M. tuberculosis* dalam serum. Uji ICT-TB ini menggunakan 5 antigen spesifik yang berasal dari membran sitoplasma *M. tuberculosis*, diantaranya antigen *M. tuberculosis* 38 kDa. Antigen *M. tuberculosis* 38 kDa yang di sekresikan oleh *M. tuberculosis* diendapkan dalam bentuk garis melintang pada membran immunokromatografi strip tes, tes ini mendeteksi adanya antibodi immunoglobulin G (IgG) terhadap antigen tersebut. Prinsip kerja ICT-TB adalah reaksi antigen pada alat yang akan berikatan dengan anti-TB dari sampel penderita yang dikonjugasikan ke partikel halus berwarna, yaitu *colloidal gold* (merah)

sebagai pelabel. Partikel tersebut sangat halus (1–20 nm) sehingga daya migrasinya kuat sehingga dalam waktu yang sangat singkat dapat mencapai garis atau antigen pengikat dan menimbulkan sinyal warna yang spesifik (Buchari, 2019).

Metode indirect pada uji ELISA dapat mendeteksi respon humoral yaitu berupa proses antigen-antibodi yang terjadi yang memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi dengan berlabel enzim sebagai penanda reaksi. Terdapat beberapa metode prinsip uji ini yang dapat untuk mendeteksi Ag atau antibodi dengan *solid phase*. Prinsip dari pemeriksaan ELISA adalah reaksi antigen-antibodi (Ag-Ab) dimana setelah penambahan konjugat, yaitu antigen atau antibodi yang dilabel enzim dan substrat, akan menghasilkan perubahan warna. Perubahan warna ini yang akan diukur intensitasnya dengan alat pembaca yang disebut sebagai ELISA reader dengan menggunakan panjang gelombang tertentu (Buchari, 2019).

II.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah uji diagnostik klinis yang banyak digunakan untuk mendeteksi berbagai macam penyakit mulai dari penyakit menular hingga sebagai biomarker kanker. ELISA merupakan metode diagnostik yang tepat, sensitif, fleksibel dan dapat diukur. Meskipun ada berbagai alat tes skrining cepat untuk mendeteksi antigen atau antibodi, namun tes tersebut memiliki sensitivitas dan spesifitas yang lebih rendah dibandingkan dengan ELISA (Thiha & Fatimah, 2015). Tes ELISA untuk antibodi anti-TB telah digunakan di India selama lebih dari 25 tahun untuk mendiagnosis kasus TB yang tidak dapat dideteksi dengan metode konvensional (Maes, 2016). Metode ELISA memiliki

sensitivitas dan spesifisitas yang relatif tinggi. Namun, metode ini membutuhkan 5 hingga 6 jam serta peralatan ilmiah khusus (Wu *et al*, 2017).

Pada tes ELISA terdapat microchip yang mampu mendeteksi tanggapan IgG terhadap beberapa antigen dari sampel plasma pasien TB dengan sistem deteksi yang cepat. Microchip TB Elisa (MTBE) menggunakan glikolipid pada permukaan *Mycobacterium tuberculosis* yaitu trehalosa 6,6'-dimycolate (TDM) dan dua protein yang dimurnikan, 38 kDa glikolipoprotein dan antigen 85A (Ag85A), sebagai antigen yang berdasarkan pada imunogenisitas yang diketahui dan aplikasinya dalam serodiagnosis TB. Setiap microchip memiliki saluran di mana dapat dilakukan pengujian yang berbeda. Setiap saluran terdiri dari ruang-ruang yang terhubung, yang diisi dengan reagen (Mani *et al*, 2016).

MTBE dilakukan dengan menggerakkan antigen *M. tuberculosis* di masing-masing ruang menggunakan magnet di bawahnya. Setiap ruang melakukan fungsi yang berbeda, yang pertama digunakan untuk penangkapan IgG, yang kedua untuk pengikatan antibodi anti-IgG sekunder berlabel biotin, dan yang ketiga untuk pengikatan enzim polimer streptavidin (Mani *et al*, 2016).

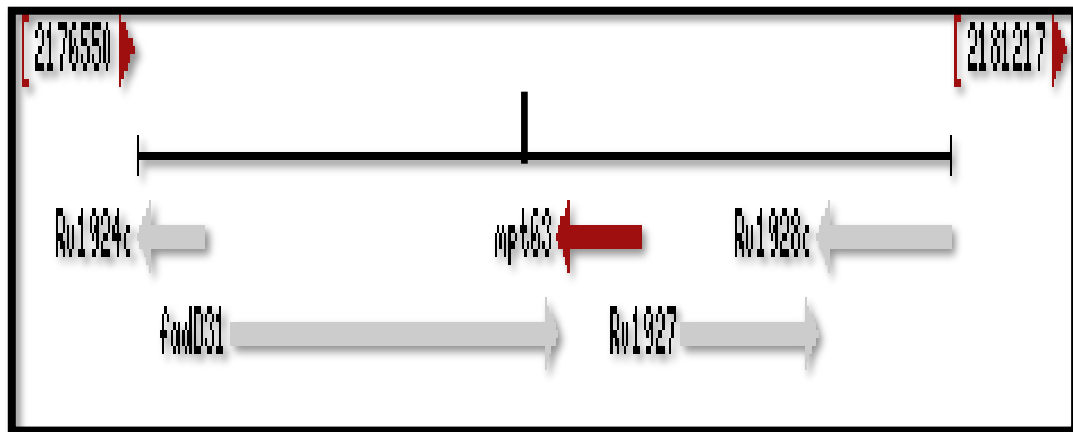
II.8 *Mycobacterium Protein Tuberculosis 63 (MPT63)*

MPT63 merupakan salah satu protein yang disekresikan *Mycobacterium* yang ditemukan pada sel-sel inflamasi di paru-paru pasien yang mengidap TB. Protein ini terakumulasi dalam sel yang terinfeksi akibat adanya aktivitas *Mycobacterium*. MPT63 memiliki target intraseluler dimana dapat bertindak secara langsung pada sel yang terinfeksi. MPT63 mampu secara khusus menginduksi aktivasi makrofag (Siromolot & Denis, 2018). Menurut Mustafa (2009), MPT63 dapat menstimulasi sel Th1, dengan

kemampuan menginduksi tanggapan positif dari HLA heterogen donor dan kemampuan untuk mengikat molekul HLA-DR secara bebas dan epitop sel Th1 tersebar di seluruh urutan protein. Selain itu, MPT63 telah terbukti mampu menginduksi sitokin seperti IL-2, Th1, serta melepaskan IFN- γ (Duan *et al*, 2015).

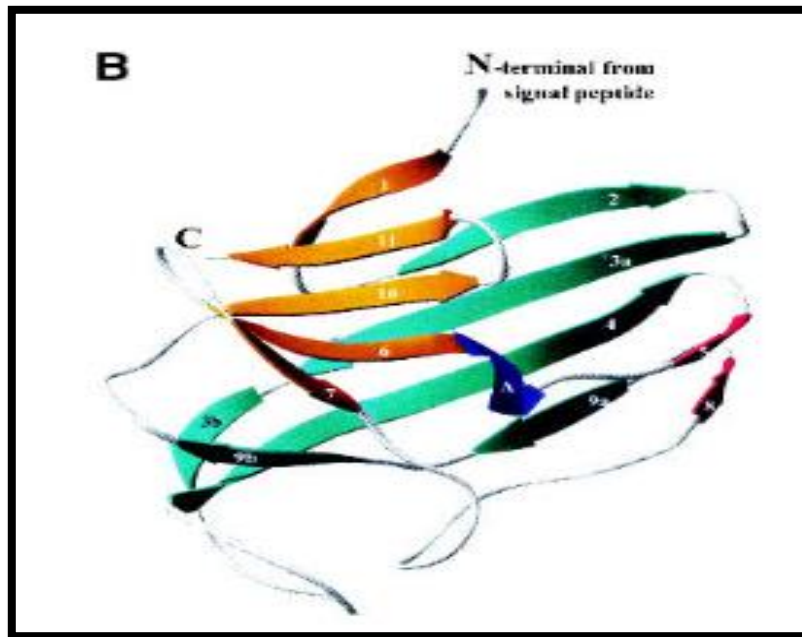
Menurut Siromolot dan Denis (2018), MPT63 memiliki berat molekul 16 kDa. Protein MPT63 merupakan protein yang dikode oleh gen Rv1926c dengan vektor plasmid pQE30 pada bakteri *Escherichia coli* BL21 (Manca *et al*, 1997). Rv1926c adalah kandidat yang baik untuk diagnostik kompleks-spesifik pada *Mycobacterium tuberculosis* (Redchuk *et al*, 2012).

Menurut NCBI (2019), protein rekombinan MPT63 berada di lokus Rv1926c



Gambar 6. Lokus Protein Rekombinan MPT63 (NCBI, 2019)

Struktur dari MPT63 berupa β -sandwich yang dicirikan oleh dua β -sheet yang saling berlawanan dan terdiri dari susunan sandwich β -sheet antiparalel. MPT63 memiliki kemiripan struktural dengan struktur imunoglobulin sehingga lipatan MPT63 dapat diklasifikasikan sebagai anggota keluarga immunoglobulin. Kemiripan ini menyebabkan protein MPT63 terlibat dalam interaksi sel host pada proses endositosis dan fagositosis (Goulding *et al*, 2002).



Gambar 7. Struktur Protein Rekombinan MPT63 (Goulding *et al*, 2002).