

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi bakteri yang telah dikenal hampir di seluruh dunia. TB dianggap sebagai penyakit kronis yang dapat menurunkan daya tahan fisik penderitanya secara serius serta dapat menyebabkan kematian. TB disebabkan oleh bakteri basil *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat menyebar melalui udara, terutama ketika penderita TB batuk (WHO, 2020). Tuberkulosis (TB) yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) telah menjangkiti manusia selama ribuan tahun. *Mycobacterium tuberculosis* sangat menular dan menginfeksi saluran pernapasan melalui tetesan udara. TB masih menjadi ancaman serius bagi kesehatan masyarakat, dengan 10,6 juta kasus baru dan 1,6 juta kematian dilaporkan di seluruh dunia pada tahun 2021. Selain itu, tantangan besar dalam pencegahan dan pengobatan TB disebabkan oleh munculnya TB yang resistan terhadap berbagai obat (MDR-TB), kurangnya metode yang efektif untuk diagnosis banding infeksi TBC laten (LTBI), sistem kekebalan tubuh, dan penyakit TBC laten (Zhang *et al.*, 2023).

Menurut WHO Global Tuberculosis Report 2023, tuberkulosis tetap menjadi salah satu penyakit infeksi paling mematikan di dunia. Pada tahun 2022, diperkirakan ada sekitar 10,6 juta kasus baru TB secara global, dan sekitar 1,6 juta orang meninggal akibat penyakit ini. Sebagian besar kasus dan kematian terjadi di negara berkembang dengan beban TB yang tinggi. Indonesia adalah salah satu negara dengan beban TB tertinggi di dunia. Pada tahun 2022, Indonesia menyumbang sekitar 8,5% dari total kasus TB global. Pemerintah Indonesia, bekerja sama dengan WHO, telah melakukan berbagai upaya untuk menanggulangi TB, termasuk kampanye deteksi dini dan pengobatan yang lebih efektif. Meski begitu, tantangan besar masih ada, terutama dalam hal penemuan kasus yang belum terdeteksi dan pengobatan yang tidak tuntas (WHO, 2023).

Berdasarkan data terbaru dari Dinas Kesehatan Sulawesi Selatan, kasus tuberkulosis (TB) di provinsi ini menunjukkan peningkatan yang signifikan. Selama tahun 2023, ditemukan 25.378 kasus TB, naik dari 21.167 kasus pada tahun 2022. Meskipun TB lebih sering ditemukan pada orang dewasa, anak-anak juga rentan terhadap infeksi ini, terutama jika mereka tinggal di lingkungan dengan kasus TB aktif, sistem kekebalan tubuh yang belum matang, atau terhadap pelayanan kesehatan yang memadai. Dalam akhir, perhatian terhadap TB pada anak semakin meningkat, termasuk peningkatan jumlah kasus yang terdeteksi. Pada tahun 2023, jumlah kasus TB pada anak di Indonesia menunjukkan peningkatan yang cukup signifikan. Tercatat sebanyak 1.477 kasus TB pada anak, naik dari 1.238 kasus yang dilaporkan pada tahun sebelumnya.



(2022). Peningkatan ini menunjukkan adanya tantangan dalam upaya pengendalian TB pada kelompok usia anak, namun juga mencerminkan membaiknya deteksi dini dan pelaporan kasus di fasilitas kesehatan.

Peningkatan ini disebabkan oleh adanya kontak serumah dengan pengidap TB, biasanya dari anggota keluarga terdekat (Dinkes Sulsel, 2024). Sebagai negara dengan prevalens TB yang tinggi, dalam praktik klinik banyak dijumpai bayi baru lahir yang kontak serumah dengan pasien TB aktif yang infeksius atau terkonfirmasi secara bakteriologis, termasuk jika bayi lahir dari ibu TB aktif. Penyakit tuberkulosis dapat dicegah dengan pemberian vaksin pada usia dini atau pada saat bayi baru lahir. Pemberian vaksin di usia dini diharapkan mampu menekan jumlah kasus TB di dunia. Vaksin tuberkulosis yang masih digunakan sampai sekarang adalah BCG atau *Bacillus Calmette-Guérin* (Kaswandani dan Nastiti, 2023).

Oleh karena itu terdapat inovasi yaitu vaksin subunit. Vaksin subunit adalah jenis vaksin yang hanya mengandung bagian spesifik dari patogen, seperti protein atau antigen, yang mampu memicu respon imun tanpa menimbulkan penyakit. Vaksin ini telah dikembangkan untuk meningkatkan keamanan dan efektivitas vaksinasi. Vaksin ini memiliki keuntungan berupa keamanan, spesifisitas Tinggi dan stabilitas yang cukup bagus (WHO, 2024). Vaksin subunit bekerja dengan memperkenalkan antigen atau spesifik kepada sistem imun. Antigen ini dikenali oleh sel-sel imun, seperti sel B dan sel T, yang kemudian menghasilkan antibodi spesifik dan memori imunologis terhadap patogen tersebut. Jika individu yang divaksinasi terpapar patogen asli di masa depan, sistem imun dapat merespons dengan cepat dan efektif, mencegah infeksi atau penyakit serius (Widuri *et al.*, 2021).

ESAT-6 (*Early Secretory Antigenic Target 6*) yang merupakan protein yang diekspresikan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan telah diidentifikasi sebagai kandidat vaksin potensial untuk tuberkulosis (TB). ESAT-6 dijadikan vaksin rekombinan untuk melawan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* karena beberapa alasan yaitu pertama, imunogenisitas tinggi protein ini dikenal memiliki kemampuan yang kuat untuk merangsang sistem kekebalan tubuh. Protein ESAT-6 adalah antigen yang sangat imunogenik, yang berarti mereka mampu memicu respons kekebalan yang kuat dan spesifik terhadap *M. tuberculosis*. Kedua sebagai deteksi dini, protein ESAT-6 adalah protein yang diekspresikan awal oleh *Mtb* selama infeksi, ini memungkinkan deteksi dini infeksi, yang penting untuk intervensi cepat dan pengendalian penyebaran TB. Ketiga, sebagai *Mtb*, protein ini tidak ditemukan pada vaksin BCG) atau pada kobakteri non-TB, sehingga penggunaannya dalam vaksinurangi kemungkinan hasil positif palsu yang disebabkan oleh infeksi dengan mikobakteri lain. Keempat potensi untuk efektif, penggunaan protein ESAT-6 dalam vaksin rekombinan meningkatkan efektivitas vaksin TB di masa mendatang.



Keterbatasan vaksin BCG saat ini dalam memberikan perlindungan yang optimal terhadap infeksi tuberkulosis (TB) pada orang dewasa, khususnya dalam mencegah bentuk TB paru yang paling umum dan menular karena itu, terdapat kebutuhan mendesak untuk mengembangkan vaksin baru yang efektif, yang mampu memberikan perlindungan jangka panjang dan lebih luas terhadap berbagai bentuk TB, serta dapat digunakan secara lebih efisien dalam program imunisasi global untuk mengendalikan penyebaran TB (Aagaard *et al.*, 2011).

1.1 Dasar Teori

1.1.1 Tuberkulosis

Tuberkulosis adalah suatu penyakit kronik menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri ini berbentuk batang dan bersifat tahan asam sehingga sering dikenal dengan Basil Tahan Asam (BTA) (Kemenkes, 2019). Tuberkulosis (TB) adalah gangguan kesehatan berupa infeksi yang diakibatkan mikroorganisme patogen *Mycobacterium tuberculosis*, infeksi merupakan salah satu jenis infeksi yang paling berbahaya di dunia. Secara definisi, Tuberkulosis diartikan sebagai infeksi yang diakibatkan oleh infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis* atau dikenal dengan istilah *MTb* yang pada kebanyakan kasus ditemukan menyerang organ paru-paru, meski begitu infeksi ini juga dapat memengaruhi berbagai organ tubuh lainnya (Febriani *et al.*, 2022).

Tuberkulosis biasanya menular dari manusia ke manusia lain lewat udara melalui percik renik atau droplet nucleus (<5 microns) yang keluar ketika seorang yang terinfeksi TB paru atau TB laring batuk, bersin, atau bicara. Percik renik juga dapat dikeluarkan saat pasien TB paru melalui prosedur pemeriksaan yang menghasilkan produk aerosol seperti saat dilakukannya induksi sputum, bronkoskopi dan juga saat dilakukannya manipulasi terhadap lesi atau pengolahan jaringan di laboratorium. Percik renik, yang merupakan partikel kecil berdiameter 1 sampai 5 µm dapat menampung 1-5 basilli, dan bersifat sangat infeksius, dan dapat bertahan di dalam udara sampai 4 jam. Karena ukurannya yang sangat kecil, percik renik ini memiliki kemampuan mencapai ruang alveolar dalam paru, dimana bakteri kemudian melakukan replikasi (Kemenkes, 2019).

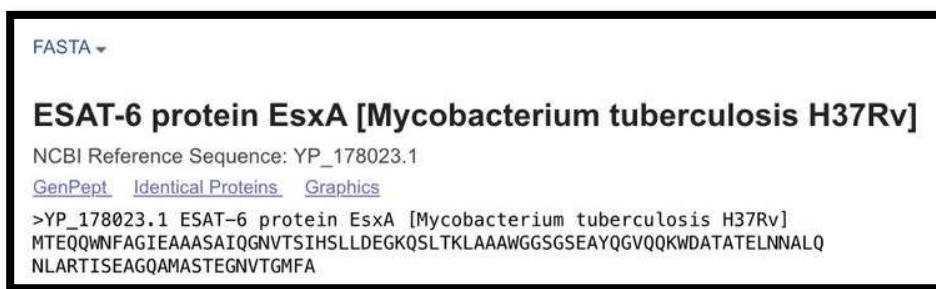
Ada 3 faktor yang menentukan transmisi MTB yaitu pertama jumlah organisme yang keluar ke udara, kedua konsentrasi organisme dalam udara, ditentukan oleh volume ruang dan ventilasi dan ketiga lama seseorang menghirup udara terkontaminasi. Satu batuk dapat memproduksi hingga 3,000 percik renik dan satu kali bersin dapat memproduksi hingga 1 juta percik renik. Sedangkan, dosis yang diperlukan terjadinya suatu infeksi TB adalah 1 sampai 100 bakteri. Dosis yang paling infeksius adalah penularan dari pasien dengan hasil pemeriksaan sputum positif, dengan hasil 3+ merupakan kasus paling infeksius. Pemeriksaan sputum negative bersifat tidak terlalu infeksius. Paru hampir selalu tidak infeksius, kecuali bila penderita juga terinfeksi dengan TB laten tidak bersifat infeksius, karena bakteri



yang menginfeksi mereka tidak bereplikasi dan tidak dapat melakukan transmisi ke organisme lain (Kemenkes, 2019).

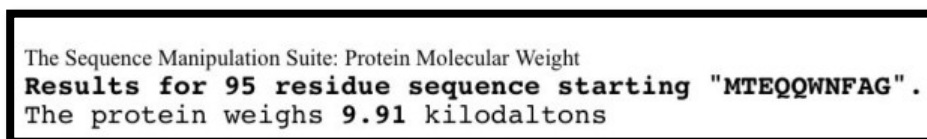
1.1.2 ESAT-6

ESAT-6 (*Early Secreted Antigenic Target 6*) adalah salah satu protein yang disekresikan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan dianggap sebagai target potensial untuk vaksin subunit TB. ESAT-6 merupakan salah satu antigen yang paling kuat dari *Mycobacterium tuberculosis* dan mampu merangsang respons imun yang signifikan. Ini membuatnya menjadi kandidat yang menarik untuk vaksin subunit karena kemampuan untuk menginduksi respon imun yang protektif. Vaksin subunit yang mengandung ESAT-6 menawarkan keuntungan dari aspek keamanan karena hanya menggunakan fragmen protein yang spesifik tanpa risiko infeksi hidup. Ini juga memungkinkan desain vaksin yang lebih terarah dan kemungkinan efek samping yang lebih rendah (Smith *et al.*, 2023).



Gambar 1. Urutan asam amino dari protein ESAT-6 yang diidentifikasi melalui BLAST pada basis data NCBI.

Early Secreted Antigen Target (ESAT-6) merupakan antigen yang bersifat imunogenik dan dapat disekresi baik oleh bakteri *Mtb* dan wild type dari *M. bovis* dimana respon imun dapat diukur dan diamati setelah adanya produksi IFN- γ setelah distimulasi oleh antigen tersebut. 9,91 kDa merupakan antigen yang berperan dalam virulensi *Mtb* (Prihantika *et al.*, 2019).



Gambar 2. Berat molekul protein ESAT-6 yang diidentifikasi melalui BLAST pada basis data Bioinformatics.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Escherichia coli BL21

Mycobacterium tuberculosis membutuhkan waktu 16-20 jam untuk mengganda, sehingga membutuhkan waktu yang lama untuk mengkulturkan, memproduksi vaksin membutuhkan waktu yang singkat untuk produksi. Masalah tersebut dapat dicegah dengan menggunakan gen pengkode protein rekombinan dari *Mtb* ke dalam

Escherichia coli BL21 yang waktu generasinya lebih singkat. *E. coli* BL21 rekombinan hasil transformasi gen dari *M. tuberculosis* memiliki potensi memproduksi protein rekombinan yang akan digunakan sebagai antigen yang digunakan dalam pembuatan vaksin. Protein rekombinan dapat diekspresikan dengan menginduksi Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). IPTG merupakan senyawa yang berfungsi sebagai penginduksi ekspresi gen. Pertumbuhan *E. coli* BL21 rekombinan juga dapat berpengaruh terhadap produksi protein rekombinan. Pertumbuhan *E. coli* BL21 rekombinan berhubungan dengan waktu inkubasi dan kepadatan sel. Semakin lama waktu inkubasi, semakin padat sel yang dihasilkan. Banyaknya sel yang dihasilkan sebanding dengan banyaknya protein rekombinan yang dihasilkan (Hermana *et al.*, 2015).

1.1.4 Karakterisasi Protein dengan SDS-PAGE

SDS-PAGE adalah alat yang esensial dalam analisis protein, dan penggunaannya sangat luas dalam berbagai bidang penelitian biologi dan biokimia. Teknik ini memungkinkan pemisahan dan analisis yang akurat dari campuran protein kompleks, memberikan wawasan penting tentang struktur dan fungsi protein. SDS-PAGE memiliki prinsip yaitu denaturasi Protein, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) adalah deterjen anionik yang digunakan untuk denaturasi protein. SDS mengikat protein, memberikan muatan negatif yang seragam per satuan panjang rantai polipeptida. Proses ini memutus interaksi non-kovalen, sehingga protein menjadi terdenaturasi dan linier. Prinsip kedua Poliakrilamida gel, gel poliakrilamida berfungsi sebagai matriks penyangga yang memisahkan protein berdasarkan ukuran. Protein bermigrasi melalui gel ketika medan listrik diterapkan, dengan protein yang lebih kecil bergerak lebih cepat daripada protein yang lebih besar. Prinsip elektroforesis, setelah denaturasi, sampel protein dimuat ke dalam sumur gel dan dikenakan medan listrik. Protein bermigrasi melalui gel menuju elektroda positif (anoda) karena muatan negatif yang diberikan oleh SDS (Laemmli, 1970).

Kelebihan SDS-PAGE yaitu pertama agregat dan partikel tak larut air akan terlarut dalam SDS dan diubah menjadi rantai peptide Tunggal. Kedua pemisahan protein hampir seluruhnya bergantung pada ukuran peptida. Ketiga seluruh gel dapat dikalibrasi dengan memuatkan suatu ukuran standar (suatu campuran protein dari komposisi yang telah diketahui). Keempat tingkat *cross-linking* gel dan ukuran pori dapat diatur bergantung pada ukuran protein yang akan dipisahkan. Hal tersebut dapat dilakukan dengan mengganti konsentrasi akrilamid dan konsentrasi *cross-linker* bisakrilamid (Wink, 2013).



elitian

in ini adalah untuk memproduksi protein rekombinan ESAT-6 *tuberculosis* pada *Escherichia coli* BL21.

ini, diharapkan dapat mendapatkan protein rekombinan at imunogenik.

buffer PBS IX pH 7.4 sebanyak 2 ml. lalu dilakukan pemecahan dinding bakteri dengan teknik sonikasi yang dilakukan berulang selama 3 kali dengan durasi masing-masing 30 detik kHz. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 8.500 rpm selama 25 menit dengan suhu 4°C untuk memisahkan protein rekombinan dan dinding sel bakteri. Memisahkan pelet sel sebagai fraksi *insoluble* dan supernatant mengandung protein soluble. Supernatant di pisahkan masing masing ke dalam tube eppendorf dan pelet dilarutkan dalam PBS IX pH 7 sebanyak 25 ul.

2.3.4 Karakterisasi Protein Dengan Metode SDS-PAGE

Sampel protein dari supernatan dan pelet masing masing dimasukkan ke dalam tube ependorf sekitar 10 µl dicampur dengan 10 µl loading buffer dengan perbandingan 1:1, dididihkan selama 10 menit dalam waterbath suhu 95°C. Sampel dan marker protein dimasukkan ke sumur-sumur gel pada alat elektroforesis sebanyak 20 µl. Dimasukkan buffer running SDS, sebelum memulai elektroforesis.

Elektroforesis dilakukan pada tegangan mulai 120 V dan 400 mA selama 1 jam. Gel hasil elektroforesis kemudian direndam dalam larutan staining atau colorisasi selama 30 menit, setelah itu dicuci dengan aquades berkali-kali sampai gel tidak berbau. Gel hasil elektroforesis yang telah diwarnai dimasukkan ke dalam larutan decolorisasi selama 1 jam kemudian dicuci dan di larutkan Kembali ke dalam larutan decolorisasi selama 16 jam untuk menghilangkan warna pada gel yang tidak mengandung pita protein. Pita pada gel hasil elektroforesis dicocokkan dengan pita gel prestained protein ladder, kemudian didokumentasikan.

