

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xix
INTISARI	xx
ABSTRACT	xxi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	10
1.3 Keaslian Penelitian	11
1.4 Manfaat Penelitian	12
1.5 Tujuan Penelitian	12
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	14
2.1 Tuberkulosis	14
2.1.1 Definisi tuberkulosis	14
2.1.2 Epidemiologi	15
2.1.3 Penularan tuberkulosis	17
2.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
2.2.1 Klasifikasi <i>M. tuberculosis</i>	18
2.2.2 Morfologi	18
2.2.3 Dinding sel	20
2.2.4 Pembelahan sel	22
2.2.5 Genomik <i>M. tuberculosis</i>	25
2.2.6 Virulensi	33

2.2.7 Patogenitas	35
2.3 Antigen 85	40
2.4 Respon Imun terhadap <i>M. tuberculosis</i>	46
2.4.1 Imunitas alami	49
2.4.2 Imunitas adaptif	55
2.4.3 Penghindaran <i>M. tuberculosis</i> dari sistem imun	59
2.5 Intradermal Vaksin	66
2.6 Kloning dan Ekspresi Gen	71
2.6.1 Vektor	72
2.6.2 Enzim endonuklease restriksi dan ligase	76
2.6.3 <i>E. coli</i> sebagai inang dalam kloning	78
2.6.4 Transformasi	78
2.6.4.1 Isolasi plasmid DNA	79
2.6.4.2 Over ekspresi	80
2.6.4.3 Elektroforesis	81
2.7 Landasan Teori dan Kerangka Teori Penelitian	84
2.7.1 Landasan teoritis	84
2.7.2 Kerangka teori	88
2.7.3 Hipotesis penelitian	89
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	90
3.1 Jenis Penelitian	90
3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian	90
3.3 Populasi, Sampel dan Tehnik Pengambilan Sampel	91
3.3.1 Populasi sampel penelitian	91
3.3.2 Sampel dan tehnik pengambilan sampel	91
3.4 Bahan dan Alat	91
3.4.1 Bahan	91
3.4.2 Alat	92
3.5 Alur Penelitian	93
3.6 Cara Kerja	95
3.6.1 Persiapan bakteri isolat klinik <i>M. tuberculosis</i>	95

3.6.1.1	Persiapan bakteri uji	95
3.6.1.2	Identifikasi <i>M. tuberculosis</i>	95
3.6.1.3	Subkultur isolat uji	95
3.6.1.4	Bakteri strains reference <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	96
3.6.2	Ekstraksi DNA bakteri	96
3.6.3	Pengukuran konsentrasi DNA	97
3.6.4	Amplifikasi gen penyandi Ag85	97
3.6.5	Analisis produk PCR dengan elektroforesis	98
3.6.6	Kloning dan transformasi	99
3.6.6.1	Ligasi produk amplifikasi pada vektor kloning pET SUMO	99
3.6.6.2	Transformasi DNA rekombinan ke sel kompeten <i>One Short[®]Mach1TM-T1^R E. coli</i>	99
3.6.6.3	Analisa DNA insert	100
3.6.6.4	Isolasi plasmid dari sel kompeten	100
3.6.6.5	Transformasi plasmid ke sel kompeten <i>E. coli</i> <i>BL21 (DE3) One Short[®] cells</i> dengan tehnik <i>heat shock</i>	101
3.6.6.6	Amplifikasi DNA insert	102
3.6.6.7	Sekuensing DNA rekombinan	102
3.6.7	Kultivikasi bakteri rekombinan dan pemurnian protein	103
3.6.7.1	Kultivikasi bakteri rekombinan	103
3.6.7.2	Elektroforesis protein rekombinan dengan <i>Sodyum Dedosyl Sulphate Polyacrilamide</i> <i>Gel Elctroforesis(SDS-PAGE)</i>	104
3.6.7.3	Pemeriksaan protein rekombinan Ag85 dengan <i>Westernblotting</i>	104
3.6.7.4	Pemurnian protein rekombinan dengan prutino Ni-NTA System	105
3.6.7.5	Analisis lokalisasi subseluler protein Ag85 ..	106

3.6.7.6 Analisis struktur protein Ag85	106
3.6.7.7 Analisis daerah imunogenik protein Ag85 ...	106
3.6.7.8 Identifikasi prediksi epitop imunogenik protein Ag85 terhadap sel B, sel T dan MHC kelas I dan MHC kelas II	107
3.6.8 Vaksinasi mencit galur <i>Balb/c</i> dengan protein rekombinan Ag85	107
3.6.8.1 Persiapan hewan coba	107
3.6.8.2 Vaksinasi mencit galur <i>Balb/c</i>	107
3.6.8.3 Pengambilan darah dan isolasi sel NK dan Sel T CD8+	108
3.6.8.4 Penentuan kadar <i>granzyme B</i> dengan metode ELISA.....	109
3.6.8.5 Penentuan kadar <i>perforin</i> dengan metode ELISA	110
3.6.8.6 Penentuan jumlah sel NK dan sel T CD8+ dengan metode <i>flowcytometry</i>	111
3.6.8.7 Uji proliferasi limfosit metode MTT	112
3.6.8.8 Uji Interleukin-1 β (IL-1) sel makrofag metode ELISA	113
3.7 Klasifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	115
3.7.1 Klasifikasi variabel penelitian	115
3.7.2 Definisi operasional	116
3.8 Analisa Data	117
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	118
4.1 Hasil Penelitian.....	118
4.1.1 Amplifikasi <i>gen fbpA</i> dan <i>fbpB M. tuberculosis</i>	118
4.1.2 Sekuensing <i>gen fbpA</i> dan <i>fbpB M. tuberculosis</i>	119
4.1.3 Struktur dan penentuan epitop protein rekombinan Ag85A dan Ag85B terhadap sel T, sel B, MHC I dan MHC II	121

4.1.4 Kloning, transformasi dan purifikasi protein rekombinan Ag85A dan Ag85B	132
4.1.5 Uji proliferasi sel T dan B terhadap protein rekombinan Ag85A dan Ag85B secara <i>in vitro</i>	138
4.1.6 Penentuan kadar imuoglobulin, <i>perforin</i> dan <i>ganzyme</i> <i>B</i> serta <i>interleukin-1β</i> (<i>IL-1 β</i>) metode ELISA	144
4.2 Pembahasan	152
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	173
5.1 Kesimpulan	173
5.2 Saran	174
DAFTAR PUSTAKA	175
LAMPIRAN	188

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Klasifikasi gen berdasarkan fungsi dan genom <i>M. tuberculosis</i>	27
Tabel 2.	Faktor penentu virulensi bakteri <i>M. tuberculosis</i>	34
Tabel 3.	Vaksin baru untuk TB status penelitian dan pengembangan	71
Tabel 4.	<i>Homology of samples isolate with bacteria in NCBI database</i> .	123
Tabel 5.	Prediksi sel T epitop protein rekombinan Ag85A dan Ag85B <i>M.tuberculosis</i> dengan menggunakan program <i>GENETYX.ver.8.0</i>	124
Tabel 6.	Prediksi epitop protein rekombinan Ag85A <i>M.tuberculosis</i> terhadap sel B menggunakan program <i>ABCPred prediction</i> dengan <i>score</i> ≥ 0.83	127
Tabel 7.	Prediksi epitop protein rekombinan Ag85B <i>M.tuberculosis</i> terhadap sel B menggunakan program <i>ABCPred prediction</i> dengan <i>score</i> ≥ 0.83	128
Tabel 8.	Prediksi posisis epitop MHC I (HLA-A*0201) protein rekombinan Ag85A <i>M. tuberculosis</i> menggunakan program <i>RANKPEP PREDICTION</i> dengan <i>score</i> ≥ 59	129
Tabel 9.	Prediksi posisi epitop MHC II (HLA-DR17/DRB1*0301 protein rekombinan Ag85A <i>M. tuberculosis</i> menggunakan program <i>RANKPEP PREDICTION</i> dengan <i>score</i> ≥ 5.0	130
Tabel 10.	Prediksi posisi epitop MHC I (HLA-A*0201) protein rekombinan Ag85B <i>M. tuberculosis</i> menggunakan program <i>RANKPEP PREDICTION</i> dengan <i>score</i> ≥ 59.0	131
Tabel 11.	Prediksi posisi epitope MHC II (HLA DR17/DRB1*0301) protein rekombinan Ag85B <i>M. tuberculosis</i> menggunakan program <i>RANKPEP PREDICTION</i> dengna <i>score</i> ≥ 5.0	132

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Estimasi kejadian TB tahun 2017	16
Gambar 2. Morfologi <i>M. tuberculosis</i> dengan mikroskop cahaya dan ... mikroskop elektron	19
Gambar 3. Struktur dinding sel <i>M. tuberculosis</i>	21
Gambar 4. Proses pembelahan <i>M. tuberculosis</i>	23
Gambar 5. Mekanisme <i>dormant</i> dan reaktivasi <i>M. tuberculosis</i> pada jaringan granuloma	25
Gambar 6. Struktur DNA sirkular <i>M. tuberculosis</i> dan gen penyandi ... antigen 85 (Ag85)	28
Gambar 7. Diversitas genetik antigen 85 dan lokasi epitop sel B dan T	42
Gambar 8. Jalur reaksi enzim antigen 85.....	44
Gambar 9. Respon imun terhadap <i>M. tuberculosis</i>	50
Gambar 10. Tahap perkembangan <i>M. tuberculosis</i> dalam <i>host</i>	51
Gambar 11. Pengenalan <i>M. tuberculosis</i> oleh makrofag melalui TLR....	53
Gambar 12. Perkembangan granuloma <i>M. tuberculosis</i>	57
Gambar 13. Mekanisme kerja sel T terhadap <i>M. tuberculosis</i>	58
Gambar 14. Proses apoptosis sel makrofag yang terinfeksi oleh <i>M. tuberculosis</i>	64
Gambar 15. Lokasi TA kloning translasi produk PCR	74
Gambar 16. <i>Mapping</i> gen plasmid pET SUMO	75
Gambar 17. Proses kloning gen target pada <i>E. coli</i> metode <i>Heat Shock</i> ..	84
Gambar 18. Hasil PCR sampel dari isolat klinik	118
Gambar 19. Hasil pensejajaran sekuens <i>gen fbpA</i> penyandi protein Ag85A menggunakan <i>Clustal omega</i>	120
Gambar 20. Hasil pensejajaran sekuens <i>gen fbpB</i> penyandi protein Ag85B menggunakan <i>Clustal omega</i>	120
Gambar 21. Struktur 3D protein Ag85A dan Ag85B menggunakan <i>SWISS-MODEL</i>	122

Gambar 22. Prediksi posisi epitop protein rekombinan Ag85A terhadap sel T dengan program <i>GENETYX ver.8.0</i> dan sel B dengan program <i>ABCPred prediction</i>	125
Gambar 23. Prediksi posisi epitop protein rekombinan Ag85B terhadap sel T dengan program <i>GENETYX ver.8.0</i> dan sel B dengan program <i>ABCPred prediction</i>	126
Gambar 24. Perumbuhan sel kompeten <i>E. coli Mach1</i> dan <i>E. coli BL 21 (DE3)</i> yang membawa sisipan <i>gen fbpA M.tuberculosis</i> pada media LB agar	133
Gambar 25. Pertumbuhan sel kompeten <i>E. coli Mach1</i> dan <i>E. coli BL 21 (DE3)</i> yang membawa sisipan <i>gen fbpB M.tuberculosis</i> pada media LB agar	133
Gambar 26. Elektroforesis plasmid pET SUMO hasil ekstraksi dari sel kompeten <i>E. coli Mach1</i>	134
Gambar 27. Elektroforesis plasmid pET SUMO yang membawa <i>gen fbpA dan fbpB M. tuberculosis</i>	135
Gambar 28. Hasil SDS-PAGE proein Ag85A dan Ag85B yang Diekspresikan menggunakan sel kompeten <i>E. coli BL21(DE3)</i>	136
Gambar 29. Hasil <i>Westernblotting</i> protein Ag85A dan Ag85B Menggunakan <i>6x anti-histidine Tag monoclonal antybodi ..</i>	137
Gambar 30. Hasil pemeriksaan mikroskopis (p; 400x) limfosit T	140
Gambar 31. Hasil pemeriksaan mikroskopis (p;400x) limfosit T yang diwarnai dengan MTT.....	141
Gambar 32. Hasil pemeriksaan mikroskopis (P;400x) limfosit B	141
Gambar 33. Hasil pemeriksaan mikroskopis (P:400x) limfosit B yang diwarnai MTT	142
Gambar 34. <i>Optical dencity</i> (OD) hasil pewarnaan MTT proliferasi limfosit T yang di induksi dengan PHA, Ag85A, dan Ag85B dengan berbagai konsentrasi	143
Gambar 35. <i>Optical dencity</i> (OD) hasil pewarnaan MTT proliferasi limfosit B yang di induksi dengan LPS, Ag85A, dan A85B dengan berbagai konsentrasi	144

Gambar 36. <i>Optical density</i> (OD) hasil ELISA IgG serum mencit <i>Balb/c</i> yang di induksi dengan berbagai perlakuan	145
Gambar 37. Hasil <i>flowcytometri</i> jumlah sel T CD8+ mencit <i>Balb/c</i> yang di deteksi dengan <i>anti-mouse CD8+ FITC</i>	146
Gambar 38. Hasil <i>flowcytometri</i> jumlah sel NK mencit <i>Balb/c</i> yang di deteksi dengan <i>anti-mouse 49b FITC</i>	147
Gambar 39. Kurva standar pemeriksaan ELISA <i>granzyme B</i>	148
Gambar 40. Kurva standar pemeriksaan ELISA <i>perforine</i>	149
Gambar 41. Hasil pemeriksaan ELISA <i>perforine</i> dan <i>granzyme B</i> serum mencit <i>Balb/c</i> yang di induksi dengan berbagai perlakuan..	150
Gambar 42. Kurva standar pemeriksaan ELISA Interleukin-1 β (IL-1 β) .	151
Gambar 43. Hasil uji ELISA IL-1 β sel makrofag secara <i>in vitro</i>	152

ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Ag85A/B/C	: Antigen 85A/B/C
AIDS	: <i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
AG	: <i>Arabinogalactan</i>
APC	: <i>Antigen presenting cell</i>
ARTI	: <i>Annual risk of tuberculosis infection</i>
Fbp	: <i>Febrinolectine binding protein</i>
bp	: <i>base pair</i>
BCG	: <i>Bacillus Calmette-Geurin</i>
BTA	: Basil Tahan Asam
C	: <i>Celcius</i>
CCL4	: <i>Chemokine (C-C motif) ligand 4</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CFP	: <i>Culture filtrat protein</i>
cm	: <i>centimeter</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	: <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
DOTS	: <i>Directly Observed Treatment Shortcourse</i>
DR	: <i>Direct Repeat</i>
ESAT-6	: <i>Early Secreted Antigenic Target – 6</i>
DTH	: <i>Delayed-type Hypersensitivity</i>
DPT	: <i>Diphtheri Pertusis Tetanus</i>
FFAD	: <i>Fas-Associated Death Domain</i>
Fbp	: <i>Fibrinolectin Binding Protein</i>
g	: gram
GMM	: <i>Glucose Monomycolate</i>
GST	: <i>Glutation S-transferase</i>
GTP	: <i>Guanosine Triphosphate</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IFN- γ	: Interferon- γ

IgG	: Immunoglobulin G
IL-2	: Interleukin-2
IPTG	: <i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</i>
IRAK	: <i>IL-1 Reseptor Associated Kinase</i>
IS	: <i>Insertion Sequences</i>
JAK	: <i>Janus Tyrosine Kinase</i>
kDa	: kilo Dalton
LB	: Luria Bertani
LAM	: <i>Lipoarabinomanan</i>
MA	: <i>Mycolic acid</i>
Mb	: Megabase
MBP	: <i>Maltose-binding Protein</i>
MCP 1	: <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
mL	: mili Liter
MDR	: <i>Multi-Drug Resistant</i>
MIP-1 β	: <i>Macrophage inflammatory protein-1β</i>
MIRU	: <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
NAM	: <i>N-acetylmuramic acid</i>
NO	: <i>Nitric oxide</i>
NOD	: <i>Nucleotide-binding Oligomerization</i>
NUS A	: <i>N-utilization Substance Protein A</i>
NRAMP1	: <i>Natural Resistance-associated Macrophage Protein 1</i>
OAT	: Obat Anti Tuberkulosis
PAMP	: <i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBP A	: <i>Penicillin Binding Protein A</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	: <i>Proline-Glutamic acid (Proline (P), Glutamic Acid (E))</i>
PG	: <i>Peptidoglycan</i>

PGRS	: <i>Polymorphic GC-repetitive Sequences</i>
PMN	: <i>Polimorfonuklear</i>
PPD	: <i>Purified Protein Derivative</i>
PPE	: <i>Proline-proline Glutamic Acid</i>
RDs	: <i>Region Difference</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROI	: <i>Reactive Oxygen Intermediates</i>
RNIs	: <i>Reactive Nitrogen Intermediates</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SOC	: <i>Super Optimal Broth</i>
STPKs	: <i>Serine/threonin Protein Kinase</i>
STAT 1	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
SUMO	: <i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
TACO	: <i>Tryptofan Aspartate Containing Coat</i>
TB	: <i>Tuberculosis</i>
TBE	: <i>Tris-Borate-EDTA</i>
TCS	: <i>Two Component System</i>
TDM	: <i>Trehalose Dimycolate</i>
TMM	: <i>Trehalose Monomycolate</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor - β</i>
Th-1	: <i>T helper-1</i>
TLRs	: <i>Toll Like Receptors</i>
TMM	: <i>Trehalose Monomycolate</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
Trx	: <i>Thioredoxin</i>
UV	: <i>Ultra Violet</i>
μ l	: <i>mikro liter</i>
VNTR	: <i>Variable Number Tandem Repeats</i>
VGCC	: <i>Voltage Gated Calcium Channels</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
ZN	: <i>Ziehl Neelsen</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Etika klirence penelitian	188
Lampiran 2.	Surat ijin penelitian ke ITD Surabaya	189
Lampiran 3.	Pensejajaran hasil sekuensing <i>gen fbpA</i> dan <i>fbpB</i> penyandi protein Ag85A dan Ag85B.	190
Lampiran 4.	Prediksi epitop protein Ag85A terhadap sel T dengan <i>GENETYX ver.8</i>	193
Lampiran 5.	Prediksi epitop protein Ag85B terhadap sel T dengan <i>GENETYX ver.8</i>	196
Lampiran 6.	Hasil prediksi epitop protein Ag85A dan Ag85B terhadap Sel B menggunakan <i>software ABCPred</i>	199
Lampiran 7.	Hasil prediksi epitop protein Ag85A dan Ag85B terhadap terhadap MHC I (HLA-A*0201) dan MHC II (HLA-DR17 /DRB1*0301) dengan menggunakan <i>RANGKEP prediction Software</i>	203
Lampiran 8.	Assesment struktur 3D protein Ag85A dan protein Ag85B <i>Software THMTOP</i> dan <i>SOPMA</i>	204
Lampiran 9.	Hasil analisis protein Ag85A dan Ag85B menggunakan <i>Software THMTOP</i> dan <i>SOPMA</i>	207
Lampiran 10.	Komposisi bahan untuk kloning dan ekspresi protein Ag85A dan Ag85B	210
Lampiran 11.	Hasil Uji statistik dengan menggunakan <i>One-Way ANOVA</i>	212