UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

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 *Mycobacterium tuberculosis* 18
2.2.1 Klasifikasi *M. tuberculosis* 18
2.2.2 Morfologi 18
2.2.3 Dinding sel 20
2.2.4 Pembelahan sel 22
2.2.5 Genomik *M. tuberculosis* 25
2.2.6 Virulensi 33

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

2.2.7 Patogenitas 35
2.3 Antigen 85 40
2.4 Respon Imun terhadap *M. tuberculosis* 46
2.4.1 Imunitas alami 49
2.4.2 Imunitas adaptif 55
2.4.3 Penghindaran *M. tuberculosis* 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 ristriksi dan ligase 76
2.6.3 *E. coli* 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 *M. tuberculosis* 95

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

3.6.1.1 Persiapan bakteri uji 95
3.6.1.2 Identifikasi *M. tuberculosis* 95
3.6.1.3 Subkultur isolat uji 95
3.6.1.4 Bakteri strains reference *M. tuberculosis* 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 *One Short®Mach1^{TM}-T1^{R} E. coli* 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 *E. coli BL21* (DE3) *One Short® cells* dengan tehnik *heat shock* 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 *Sodyum Dedosyl Sulphate Polyacrilamide Gel Elctroforesis(SDS-PAGE)* 104
3.6.7.3 Pemeriksaan protein rekombinan Ag85 dengan *Westernblotting* 104
3.6.7.4 Pemurnian protein rekombinan dengan prutino Ni-NTA System 105
3.6.7.5 Analisis lokalisasi subseluler protein Ag85 .. 106

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

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 *Balb/c* dengan protein rekombinan Ag85 107
3.6.8.1 Persiapan hewan coba 107
3.6.8.2 Vaksinasi mencit galur *Balb/c* 107
3.6.8.3 Pengambilan darah dan isolasi sel NK dan Sel T CD8+ 108
3.6.8.4 Penentuan kadar *granzyme B* dengan metode ELISA..... 109
3.6.8.5 Penentuan kadar *perforin* dengan metode ELISA 110
3.6.8.6 Penentuan jumlah sel NK dan sel T CD8+ dengan metode *flowcytometry* 111
3.6.8.7 Uji proliferasi limfosit metode MTT 112
3.6.8.8 Uji Interleukin-1β (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 *gen fbpA* dan *fbpB M. tuberculosis*..... 118
4.1.2 Sekuensing *gen fbpA* dan *fbpB M. tuberculosis* 119
4.1.3 Struktur dan penentuan epitop protein rekombinan Ag85A dan Ag85B terhadap sel T, sel B, MHC I dan MHC II 121

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

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 *in vitro* 138
4.1.6 Penentuan kadar imuolobulin, *perforin* dan *ganzyme B* serta *interleukin-1β (IL-1 β)* 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

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Klasifikasi gen berdasarkan fungsi dan genom *M. tuberculosis* 27

Tabel 2. Faktor penentu virulensi bakteri *M. tuberculosis* 34

Tabel 3. Vaksin baru untuk TB status penelitian dan pengembangan 71

Tabel 4. *Homology of samples isolate with bacteria in NCBI database* . 123

Tabel 5. Prediksi sel T epitop protein rekombinan Ag85A dan Ag85B *M.tuberculosis* dengan menggunakan program *GENETYX.ver.8.0* 124

Tabel 6. Prediksi epitop protein rekombinan Ag85A *M.tuberculosis* terhadap sel B menggunakan program *ABCPred prediction* dengan *score* ≥ 0.83..... 127

Tabel 7. Prediksi epitop protein rekombinan Ag85B *M.tuberculosis* terhadap sel B menggunakan program *ABCPred prediction* dengan *score* ≥ 0.83..... 128

Tabel 8. Prediksi posisis epitop MHC I (HLA-A*0201) protein rekombinan Ag85A *M. tuberculosis* menggunakan program *RANKPEP PREDICTION* dengan *score* ≥ 59 129

Tabel 9. Prediksi posisi epitop MHC II (HLA-DR17/DRB1*0301 protein rekombinan Ag85A *M. tuberculosis* menggunakan program *RANKPEP PREDICTION* dengan *score* ≥ 5.0 130

Tabel 10. Prediksi posisi epitop MHC I (HLA-A*0201) protein rekombinan Ag85B *M. tuberculosis* menggunakan program *RANKPEP PREDICTION* dengan *score* ≥ 59.0 131

Tabel 11. Prediksi posisi epitope MHC II (HLA DR17/DRB1*0301) protein rekombinan Ag85B *M. tuberculosis* menggunakan program *RANKPEP PREDICTION* dengna *score* ≥ 5.0 132

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR GAMBAR

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

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

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

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

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

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

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

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

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

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

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

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Respons Imun Terhadap Protein Rekombinan Antigen 85A dan 85B M. tuberculosis Pada Mencit Balb/c
FIHIRUDDIN, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; Prof. dr. Tri Wibawa, Ph.D.,Sp.MK(K); Prof.Dr.dr. Ni Made Mertan
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR LAMPIRAN

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