

KK
KKA
TI 09/11
Sya
i

TESIS

Identifikasi Protein Antigenik *Mycobacterium tuberculosis*, Sebagai Bahan Diagnostik Tuberkulosis



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Yohandromeda Syamsu, SKM

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008**

Identifikasi Protein Antigenik *Mycobacterium tuberculosis*, Sebagai Bahan Diagnostik Tuberkulosis

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Imunologi
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

Yohandromeda Syamsu, SKM

NIM : 090515576M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
13 Februari 2008**

Lembar Pengesahan

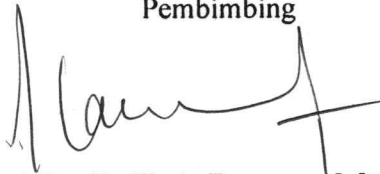
TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 6 Februari 2008

Oleh
Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS.
NIP. 131 406 054

Pembimbing



Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh., M.Sc.
NIP. 131 653 434

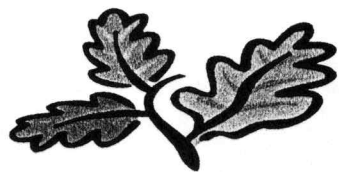
Mengetahui
Ketua Program Studi Imunologi



Prof. Dr. Sri Hidajati Bayu, dr., DTM., MS.
NIP. 130 680 855

Telah diuji pada
Tanggal : 13 Februari 2008
PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. J.F. Palilingan, dr., Sp.P(K)
Anggota : 1. Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS.
2. Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh., M.Sc.
3. Prof. Dr. Sri Hidajati Bayu, dr., DTM., MS.
4. Budiono, dr., M.Kes



*Dedicated for :
My Best Family : My Lovely Wife Tini Elyn Herlina,
My Doughter Khansa Khasfiyya 'Ibaadurrahmaan (Khasfiyya)
and My Son Ahmad Mujaddid 'Ibaadurrahmaan (Aimee)
Let's Creat The Thing Best For The Future*

UCAPAN TERIMAKASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji dan syukur kehadirat Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran dalam proses pelaksanaan penelitian.

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh., M.Sc, Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Saya ucapkan terimakasih kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Selatan yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan program pendidikan magister dan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Rektor Universitas Airlangga Surabaya Prof. Dr. Fisikhul Lisan, Apt., atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya, Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr., atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Ketua Program Studi Imunologi pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Sri Hidajati Bayu, dr., DTM., MS., atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program magister. Berikut kepada seluruh Guru Besar dan Dosen yang telah memberikan ilmunya kepada saya selama pendidikan.

Ketua *Tropical Disease Centre* (TDC) Universitas Airlangga, Pro. Dr. Yoes Prijatna Dahlan, dr., M.Sc., yang telah memberikan izin pada saya untuk menggunakan fasilitas TDC dalam penelitian tesis ini.

Direktur RS. Karang Tembok Surabaya yang telah memberikan izin saya memperoleh sampel penelitian tesis ini. Berikut Direktur Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya yang telah memberikan izin untuk memperoleh bahan isolat klinis dalam penelitian tesis ini.

Terimakasih saya ucapkan kepada Ibu Helen Susilowati, SKM., Ibu Indah Nurani, S.Si., dan Mas Erik, S.Si., penyelia laboratorium DHF TDC Universitas Airlangga, atas bantuannya selama saya melaksanakan penelitian di Laboratorium DHF *Tropical Disease Centre* (TDC) Universitas Airlangga Surabaya.

Terimakasih saya sampaikan kepada Bapak Drs. Jasmadi Joko Kartiko, Apt., MS, Ketua Program Studi Analisis Kesehatan Politeknik Kesehatan Banjarmasin yang telah memberikan fasilitas dan izin selama saya mengikuti pendidikan. Bapak Ahmad Muntaha, S.Pd., MM, Sekretaris Program Studi Analisis Kesehatan Politeknik Kesehatan Banjarmasin atas dukungan dan bantuannya selama saya mengikuti pendidikan. Ibu Dra. Ratih Dewi Dwiyantri, M.Kes, atas dukungan moril dan semangat selama saya mengikuti pendidikan. Bapak Ahmad

Muhlisin, S.Pd., M.Kes, atas semua bantuannya dalam melancarkan pencairan dana beasiswa saya selama menjalani pendidikan. Seluruh dosen dan staf Program Studi Analisis Kesehatan Politeknik Kesehatan Banjarmasin, atas segala bantuan dan dorongannya selama ini.

Terimakasih juga saya sampaikan kepada Mas Erwin Dede Nugroho, GM dan Pemred Radar Banjarmasin, saudara dan sahabat yang selalu penuh inspirasi dalam menjalani hidup. Bang Drs. H. Ogi Fajar Nuzuli, M.Pd., MAP, saudara, kakak, sahabat, guru dalam banyak aktivitas, yang penuh semangat memberikan dorongan dan kesempatan dalam beraktivitas di masyarakat. Bang Ir. Darmawan Jaya Setiawan, saudara dan sahabat dalam banyak aktivitas sosial, trimakasih atas kepercayaan dan amanahnya selama ini. Ustadz Lihan, saudara dan sahabat yang tak pernah berhenti memberikan dukungan dan bantuannya selama saya mengikuti pendidikan.

Terimakasih kepada Ibnu Sina, S.Pi., saudara, sahabat, guru dalam berorganisasi, atas dorongan dan dukungannya selama saya menjalani pendidikan. Bapak Tafsir, S.Pd., dan M. Jayadinoor, S.Pi., saudara dan sahabat, atas dukungannya selama saya mengikuti pendidikan.

Adek-adekku, Siti Ningsih, S.Ked., Nurhayah, Rahmawati, S.Si., staf dan pengelola Radar Banjar Peduli (RBP), atas kesabarannya dalam mengelola RBP dan menjalani aktivitas sosial selama saya berada di Surabaya. Sahabat-sahabat saya di Masyarakat Relawan Indonesia (MRI). Sahabat di Aksi Cepat Tanggap (ACT) Jakarta, atas dukungannya selama ini.

Terimakasih kepada Ibu Wringati, drh., M.Si dan Bapak Suhariyadi, S.Pd., M.Si., saudara dan sahabat, atas semua bantuannya dalam mengikuti perkuliahan pada Program Magister Immunologi angkatan 2005.

Terimakasih dan hormat saya kepada almarhum ayahanda, Bapak Soekar dan almarhumah Mama Djalinar. Terimakasih kepada kakak-kakaku, Drs. Yohanis Syamsu, Dr. Yoharmus Syamsu, Drs., M.Si., Dra. Yohanimar Syamsu, Drs. Yohamir Syamsu, M.Pd., Ir. Yohardi Syamsu, Yoharman Syamsu, S.Sos., M.Si., Yohandri Aven Syamsu, S.Kom., Yohandrizon Syamsu, S.P., dan Yohandriwati Syamsu, S.Sos., atas dukungan dan dorongannya selama saya mengikuti pendidikan.

Kepada mertua yang saya hormati, Mama Yeti "ewet" Rochayati, kakak-kaka iparku Kang Nugraha, Bu Yani, Mas Bambang, Bu Heni, Om Iseng, Mbak Ari, Om Rudi dan Mami Poppy, terimakasih atas dukungan dan dorongannya selama ini.

Terimakasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada Tini Elyn Herlina, S.Sos., istri tercinta, atas pengorbanannya dengan penuh cinta, kasih dan kesabaran dalam menjalani kesendirian selama saya mengikuti pendidikan. Ananda tercinta Khansa Khafiyya 'Ibaadurrahmaan (Khafiyya) dan Ahmad Mujaddid 'Ibaadurrahmaan (Aimee), buah hati saya yang selalu sabar berjauhan selama saya mengikuti pendidikan.

Akhirnya saya berharap tesis ini dapat menjadi sebuah karya yang akan memperkaya khasanah ilmu pengetahuan ditengah-tengah kita semua, amin.

Surabaya, Februari 2008

Penulis

RINGKASAN

**Identifikasi Protein Antigenik *Mycobacterium tuberculosis*,
Sebagai Bahan Diagnostik Tuberkulosis**

Yohandromeda Syamsu, SKM

Tuberkulosis adalah infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Merupakan satu dari infeksi terbesar yang diderita manusia dan masih menjadi masalah kesehatan dunia yang utama sampai saat ini. Dua milyar atau sepertiga populasi manusia di dunia mengalami infeksi laten *Mycobacterium tuberculosis* dan sekitar delapan juta kasus tuberkulosis aktif terjadi setiap tahunnya, dengan tiga juta kematian per tahun.

Penyakit tuberkulosis merupakan penyakit infeksi yang sangat unik (*"The Great Antiquity"*). Walaupun kuman penyebab penyakit sudah ditemukan lebih dari 100 tahun yang lalu dan khemoterapi untuk mengatasi sudah diperkenalkan lebih dari 40 tahun terakhir, namun penyakit ini sampai sekarang masih merupakan masalah kesehatan di negara berkembang dan negara maju.

Awal dari penentuan pengobatan tuberkulosis, seharusnya dimulai dengan penegakan diagnosis yang diikuti pemberian pengobatan yang tepat sedini mungkin. Pada program pengendalian tuberkulosis berdasarkan strategi DOTS menurut rekomendasi WHO, komponen pertama adalah penegakan diagnosis.

WHO merekomendasi strategi DOTS plus, dimana penegakan diagnosis tuberkulosis berdasarkan metode kultur dan uji kepekaan terhadap obat anti tuberkulosis. Penegakan diagnosis berdasar pemeriksaan mikroskopis apusan sputum BTA terbentur kendala sensitivitas maupun spesifisitas. Metode kultur untuk menegakkan diagnosis tuberkulosis masih merupakan metode standar emas, sangat sensitif dan spesifik, namun ada kendala lamanya memperoleh hasil pemeriksaan.

Seiring dengan kemajuan di bidang teknologi, penelitian di bidang diagnostik dan vaksinasi untuk penyakit tuberkulosis telah maju pesat. Urutan genom dari *Mycobacterium tuberculosis* sebagai agen penyebab tuberkulosis telah diketahui, maka informasi mengenai bahan genetik dan kuman ini telah dapat diperoleh.

Ada banyak bagian protein kuman yang potensial imunogenik yang telah berhasil diidentifikasi. Beberapa protein antigenik yang terpenting di antaranya adalah ESAT-6, 38 kDa, hsp 65, hsp 70 dan complex Ag85.

Pendekatan reaksi imunologis, dengan menemukan protein antigenik pada *Other Membrane Protein (OMP) Mycobacterium tuberculosis*, menjadi sebuah harapan untuk mempercepat deteksi dan mampu mempermudah diagnosis, karena teknik pemeriksaan yang sederhana, dan diharapkan memiliki spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi dan saling menguatkan dengan penemuan sebelumnya.

Sehingga, apakah protein antigenik *Mycobacterium tuberculosis* yang diperoleh pada isolat klinis penderita tuberkulosis dari BBLK Surabaya dan Strain Reference *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dapat diidentifikasi, dan mampu berikatan dengan antibodi poliklonal yang terdapat dalam serum penderita tuberkulosis dengan imunobloting metode *strafing imunobloting*.

Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi protein antigenik *Mycobacterium tuberculosis* berdasarkan berat molekul dan menentukan reaktivitas protein spesifik berdasarkan *strafing immunobloting*.

Dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang sifat protein antigenik kuman *Mycobacterium tuberculosis* yang berperan penting dalam identifikasi antibodi atau respons antigen.

Penelitian ini dirancang berdasarkan penelitian *eksploratif* untuk mengidentifikasi protein antigenik subunit *outer membrane protein* (OMP) *Mycobacterium tuberculosis* berdasarkan berat molekul dan menentukan protein yang spesifik reaktivitasnya berdasarkan *strafing immunobloting* protein.

Bahan penelitian adalah isolat klinis penderita tuberkulosis dan *Strain Referens Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya, sebanyak 4 isolat, terdiri dari 1 isolat H37Rv, dan 3 isolat kilinis penderita tuberkulosis.

Antibodi poliklonal diperoleh dari serum penderita tuberkulosis berdasarkan kriteria inklusi : penderita baru yang berkunjung ke RS. Karang Tembok Surabaya, dengan hasil pemeriksaan BTA minimal +2, dan belum mendapat pengobatan.

Variabel penelitian adalah variabel mandiri yaitu protein antigenik dan antibodi poliklonal *Mycobacterium tuberculosis* berdasarkan berat molekul menggunakan metode *strafing immunobloting*.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Tuberkulosis *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga Surabaya dari bulan Oktober 2007 sampai dengan bulan Januari 2008.

Hasil penelitian menunjukkan berat molekul protein isolat A, B, C, dan D yang terekspresi pada SDS-PAGE yang dominan muncul antara lain protein dengan berat molekul 12 kDa, 15 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 35 kDa, 66 kDa, 95 kDa, dan 244 kDa.

Penentuan protein yang spesifik reaktivitasnya berdasarkan *strafing immunobloting* terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis yang dominan dan berpotensi menjadi bahan diagnostik antara lain protein dengan berat molekul 28 kDa, 38 kDa, 61 kDa, dan 95 kDa.

ABSTRACT

Mycobacterium Tuberculosis Antigenic Protein Identification, as Component Diagnostic Of Tuberculosis

Yohandromeda Syamsu, SKM

Tuberculosis is one of the biggest infection suffered by man and still becoming health problem of main world till now. Two billion or one-third population of man in world experiences latent infection Mycobacterium tuberculosis and around eight million active tuberculosis cases happened every year with three million deaths per year.

Beginning from determination of tuberculosis therapy, ought to be started with straightening of correct diagnosis early possible according to recommendation WHO. At last decade, WHO recommends strategy DOTS plus, straightening of tuberculosis diagnosis based on culture method { gold standard} and sensitivity test to anti tuberculosis drug. Straightening of diagnosis based on microscopic inspection of apusan sputum BTA is collided by sensitivity constraint and also nucleotide specificity.

Along with progress in technology area, research of diagnostic area and vaccination for tuberculosis disease has made good strides. Genome sequence from Mycobacterium tuberculosis as tuberculosis causal agent has been known.

There is many part of potential germ proteins of imunogenic which has successfully is identified. Some antigenic protein the most important among others is ESAT-6, 38 kDa, hsp 65, hsp 70 and complex Ag85. Approach reaction of imunologic by finding antigenic protein at Other Membrane Protein (OMP) Mycobacterium tuberculosis becomes a hope to quicken detection and waters down diagnosis.

This research designed based on research of exsplorative to identify antigenic protein Mycobacterium tuberculosis based on molecule weight and determines specific protein of reaktifity based on strafing imunobloting subunit outhur membrane protein (OMP) bacterium Mycobacterium tuberculosis to isolate H37RV (reference) and 3 (three) isolate clinic confirmation with 15 antibodies poliklonal from patient serum tuberculosis.

Result of research shows protein molecule weight expression dominant at SDS-PAGE to 12 kDa, 15 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 35 kDa, 66 kDa, 95 kDa, and 244 kDa.

Determination of specific protein of reaktifity dominant based on strafing imunobloting protein by poliklonal antibody in tuberculosis patient serums and having opportunity to become diagnostic material is 28 kDa, 38 kDa, 61 kDa, and 95 kDa.

Key word : Antigenic Protein of Mycobacterium Tuberculosis

ABSTRAK

**Identifikasi Protein Antigenik *Mycobacterium tuberculosis*,
Sebagai Bahan Diagnostik Tuberkulosis**

Yohandromeda Syamsu, SKM

Tuberkulosis merupakan satu dari infeksi terbesar yang diderita manusia dan masih menjadi masalah kesehatan dunia yang utama sampai saat ini. Dua milyar atau sepertiga populasi manusia di dunia mengalami infeksi laten *Mycobacterium tuberculosis* dan sekitar delapan juta kasus tuberkulosis aktif terjadi setiap tahunnya, dengan tiga juta kematian per tahun.

Awal dari penentuan pengobatan tuberkulosis, seharusnya dimulai dengan penegakan diagnosis yang tepat sedini mungkin sesuai rekomendasi WHO. Pada dekade terakhir, WHO merekomendasi strategi DOTS plus, penegakan diagnosis tuberkulosis berdasarkan metode kultur (*gold standar*) dan uji kepekaan terhadap obat anti tuberkulosis. Penegakan diagnosis berdasar pemeriksaan mikroskopis apusan sputum BTA terbentur kendala sensitivitas maupun spesifisitas.

Seiring dengan kemajuan di bidang teknologi, penelitian bidang diagnostik dan vaksinasi untuk penyakit tuberkulosis telah maju pesat. Urutan genom dari *Mycobacterium tuberculosis* sebagai agen penyebab tuberkulosis telah diketahui.

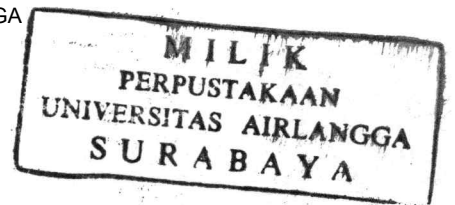
Ada banyak bagian protein kuman yang potensial imunogenik yang telah berhasil diidentifikasi. Beberapa protein antigenik yang terpenting di antaranya adalah ESAT-6, 38 kDa, hsp 65, hsp 70 dan complex Ag85. Pendekatan reaksi imunologis dengan menemukan protein antigenik pada *Other Membrane Protein* (OMP) *Mycobacterium tuberculosis* menjadi sebuah harapan untuk mempercepat deteksi dan mempermudah diagnosis.

Penelitian ini dirancang berdasarkan penelitian *eksploratif* untuk mengidentifikasi protein antigenik *Mycobacterium tuberculosis* berdasarkan berat molekul dan menentukan reaktifitas protein spesifik berdasarkan *strafing immunobloting* subunit *outer membrane protein* (OMP) bakteri *Mycobacterium tuberculosis* terhadap isolat H37Rv (referensi) dan 3 (tiga) isolat klinis yang dikonfirmasi dengan 15 antibodi poliklonal dari serum penderita tuberkulosis.

Hasil penelitian menunjukkan berat molekul protein isolat A, B, C, dan D yang terekspresi pada SDS-PAGE yang dominan muncul antara lain protein dengan berat molekul 12 kDa, 15 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 35 kDa, 66 kDa, 95 kDa, dan 244 kDa.

Penentuan protein yang spesifik reaktifitasnya berdasarkan *strafing immunobloting* terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis yang dominan dan berpeluang menjadi bahan diagnostik antara lain protein dengan berat molekul 28 kDa, 38 kDa, 61 kDa, dan 95 kDa.

Kata Kunci : Protein antigenik *Mycobacterium tuberculosis*



DAFTAR ISI

	Halaman
Persembahan	i
Ucapan Terimakasih	ii
Ringkasan	iv
Abstract	vi
Abstrak	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	xi
Daftar Tabel	xiii
Daftar Lampiran	ivx
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tuberkulosis	6
2.1.1 Penyakit Tuberkulosis	6
2.1.2 Patogenesis Tuberkulosis	7
2.1.3 Pengobatan	12
2.1.4 Epidemiologi	12
2.1.5 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13

2.2 Aspek imunologi	16
2.2.1 Respons Imunitas Seluler Terhadap Tuberkulosis	17
2.2.1.1 Respons Sel Limfosit T	17
2.2.1.1.1 Sel Limfosit T CD4+	18
2.2.1.1.2 Sel Limfosit T CD8 ⁺	20
2.2.1.1.3 Sel Limfosit T	22
2.3. Penelitian Berkaitan Protein Antigenik <i>M. Tuberculosis</i> ...	22
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	34
BAB IV METODE PENELITIAN	37
4.1 Rancangan Penelitian	37
4.2 Kriteria dan Ukuran Sampel	38
4.2.1 Kriteria Sampel	38
4.2.2 Ukuran Sampel	38
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	39
4.4 Bahan dan Alat Penelitian	38
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	43
4.5.1 Lokasi Penelitian	43
4.5.2 Waktu Penelitian	43
4.6 Prosedur Penelitian	43
4.7 Teknik Analisis Data	49
BAB V HASIL PENELITIAN	51
5.1 Isolasi Protein Antigenik Isolat A, B, C, dan D	51

5.2 Reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberculosis	54
5.3 Reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberculosis	57
5.4 Reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberculosis	59
5.5 Reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberculosis	63
BAB VI PEMBAHASAN	66
6.1 Isolasi Protein Antigenik Isolat A, B, C, dan D	66
6.2 Reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat A, B, C, dan D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberculosis	69
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	85
7.1 Kesimpulan	85
7.2 Saran	85
DAFTAR PUSTAKA	87
LAMPIRAN-LAMPIRAN	93

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , pengecatan tahan asam	14
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	34
Gambar 4.1 Rancangan Penelitian	37
Gambar 4.2 Pembuatan Suspensi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	44
Gambar 4.3 Pelaksanaan ultrasonikasi pada proses isolasi protein <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	45
Gambar 4.4 Pengukuran kadar protein <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dengan menggunakan spektrofotometer	46
Gambar 4.5 Elektroforesis protein <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47
Gambar 4.6 Alur Kerja Penelitian	50
Gambar 5.1 Berat Molekul Standar (<i>marker</i>) yang digunakan dalam penelitian menggunakan 8-16 % Tris-glycine SDS-PAGE..	52
Gambar 5.2 Ekspresi berat molekul isolat A, B, C, dan D terhadap protein marker pada SDS-PAGE	53
Gambar 5.3 Reaktifitas berat molekul protein isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis	54
Gambar 5.4 Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis laki-laki	56
Gambar 5.5 Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis perempuan	56
Gambar 5.6 Reaktifitas berat molekul protein isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis	57
Gambar 5.7 Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita	

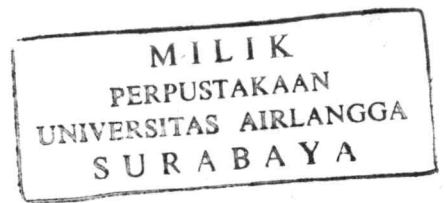
	tuberkulosis laki-laki	58
Gambar 5.8	Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis perempuan	59
Gambar 5.9	Reaktifitas berat molekul protein isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis	60
Gambar 5.10	Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis laki-laki	62
Gambar 5.11	Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis perempuan	62
Gambar 5.12	Reaktifitas berat molekul protein isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis	63
Gambar 5.13	Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis laki-laki	65
Gambar 5.13	Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis perempuan	65

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1	Berat molekul isolat A, B, C, dan D (<i>dominan</i>) yang muncul terhadap protein marker 53
Tabel 5.2	Reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat A (<i>dominan</i>) terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis 55
Tabel 5.3	Reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat B (<i>dominan</i>) terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis 58
Tabel 5.4	Reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat C (<i>dominan</i>) terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis 61
Tabel 5.5	Reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat D (<i>dominan</i>) terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis 64

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Informasi Penelitian dan Lembar Persetujuan Keikutseeraan dalam penelitian	93
Lampiran 2 : Lembar Persetujuan Keikutsertaan dalam Penelitian	97
Lampiran 3 : Keterangan Kelaikan Etik	98
Lampiran 4 : Keterangan Isolat <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	99
Lampiran 5 : Penderita tuberkulosis yang diambil serumnya untuk bahan antibodi poliklonal	100
Lampiran 6 : Pemeriksaan Kadar Protein Isolat A, B, C, dan D	101
Lampiran 7 : Berat Molekul (kDa) Isolat A, B, C, dan D Hasil SDS-PAGE Terhadap Protein Marker	102
Lampiran 8 : Reaktifitas berat molekul protein (kDa) isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis	105
Lampiran 9 : Reaktifitas berat molekul protein (kDa) isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis	108
Lampiran 10 : Reaktifitas berat molekul protein (kDa) isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis	111
Lampiran 11 : Reaktifitas berat molekul protein (kDa) isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis	115



Bab I Pendahuluan

1.1 Latar Belakang Masalah

Tuberkulosis (TB) adalah infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang dapat menimbulkan lesi pada berbagai jaringan tubuh. Organ sasaran yang sering diserang oleh infeksi bakteri ini terutama adalah jaringan "parenchyme" organ paru. Selain itu, dapat juga menyebar ke organ ginjal menimbulkan TB-ginjal, di usus menimbulkan peritonitis tuberkulosa, pada jaringan saraf menimbulkan meningitis tuberkulosa, pada kelenjar getah bening menimbulkan TB-kelenjar yang sering menyerang anak-anak.

Tuberkulosis merupakan satu dari infeksi terbesar yang diderita manusia dan masih menjadi masalah kesehatan dunia yang utama sampai saat ini (Abbas *et al.*, 2000; Parslow *et al.*, 2001; Kaufmann, 2002). Dua milyar atau sepertiga populasi manusia di dunia mengalami infeksi laten *Mycobacterium tuberculosis* dan sekitar delapan juta kasus tuberkulosis aktif terjadi setiap tahunnya, dengan tiga juta kematian per tahun. (Kaufmann, 2002; Vincenti *et al.*, 2003).

Penyakit tuberkulosis merupakan penyakit infeksi yang sangat unik ("The Great Antiquity") (Kaufmann *et al.*, 2002). Walaupun kuman penyebab penyakit sudah ditemukan lebih dari 100 tahun yang lalu dan khemoterapi untuk mengatasi sudah diperkenalkan lebih dari 40 tahun terakhir, namun penyakit ini sampai sekarang masih merupakan masalah kesehatan di negara berkembang dan negara maju (WHO, 2003).

Dalam dekade ini, hubungan mekanisme imun terhadap patogenesis tuberkulosis menjadi salah satu perhatian. Perkembangan pengetahuan tentang mekanisme imun pada tuberkulosis, juga dapat menjadi dasar perkembangan vaksin maupun terapi imun lain. Sampai saat ini, vaksin yang efektif untuk pencegahan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* belum ditemukan. Bacillus Calmette-Guerin (BCG), suatu strain *Mycobacterium bovis* yang telah dilemahkan, telah digunakan untuk vaksinasi secara luas lebih dari 60 tahun, mampu memberikan hipersensitivitas kulit lambat, namun belum jelas mekanisme peranan imunitas seluler dalam menghambat *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler (Parslow *et al.*, 2001).

Pengobatan penyakit tuberkulosis meliputi banyak faktor, selain pemberian obat anti tuberkulosis untuk menghambat atau mengurangi atau bahkan eliminasi *Mycobacterium tubereculosis* dalam jaringan "parenchyme" paru, juga faktor lain yang tidak kalah penting adalah peningkatan peran respons imun yang juga efektif mikrobakterisidal. Namun sampai saat ini belum diketahui dengan jelas hasil kedua efek mikrobakterisidal dari kedua faktor tersebut, apakah dapat secara tuntas mengeliminasi *Mycobacterium tubeculosis* atau masih dalam kondisi dormant. Pada kondisi penurunan fungsi sistem imun, dapat terjadi kemungkinan reaktivasi dari kondisi dormant menjadi proses sakit atau sakit lebih berat.

Oleh karena itu awal dari penentuan pengobatan, seharusnya dimulai dengan penegakan diagnosis yang diikuti pemberian pengobatan yang tepat sedini mungkin. Pada program pengendalian tuberkulosis berdasarkan strategi DOTS menurut rekomendasi WHO, komponen pertama adalah penegakan diagnosis.

Pada awal strategi DOTS dilaksanakan penegakan diagnosis tuberkulosis berdasar pemeriksaan apusan sputum *basil tahan asam* (BTA) secara sewaktu, pagi, sewaktu (SPS), dan indikasi harus suspek tuberkulosis tertentu dilakukan kultur dan uji kepekaan terhadap obat anti tuberkulosis.

Pada dekade terakhir, WHO merekomendasi strategi DOTS plus, pada mana penegakan diagnosis tuberkulosis berdasarkan metode kultur dan uji kepekaan terhadap obat anti tuberkulosis. Penegakan diagnosis berdasar pemeriksaan mikroskopis apusan sputum BTA terbentur kendala sensitivitas maupun spesifisitas. Metode kultur untuk menegakkan diagnosis tuberkulosis masih merupakan metode standar emas, sangat sensitif dan spesifik, namun ada kendala lamanya memperoleh hasil pemeriksaan.

Seiring dengan kemajuan di bidang teknologi, penelitian di bidang diagnostik dan vaksinasi untuk penyakit tuberkulosis telah maju pesat. Urutan genom dari *Mycobacterium tuberculosis* sebagai agen penyebab tuberkulosis telah diketahui, maka informasi mengenai bahan genetik dan kuman ini telah dapat diperoleh.

Ada banyak bagian protein kuman yang potensial imunogenik yang telah berhasil diidentifikasi. Beberapa protein antigenik yang terpenting di antaranya adalah ESAT-6, 38 kDa, hsp 65, hsp 70 dan complex Ag85.

Pendekatan reaksi imunologis misalnya dengan menemukan epitope/protein antigenik pada *Outer Membrane Protein* (OMP) *Mycobacterium tuberculosis* selain yang telah ditemukan di atas, dalam menegakkan diagnosis tuberkulosis menjadi sebuah harapan untuk mempercepat deteksi dan mampu mempermudah diagnosis, karena teknik pemeriksaan yang sederhana, dan

diharapkan memiliki spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi dan saling menguatkan dengan penemuan sebelumnya.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah protein antigenik *Mycobacterium tuberculosis* yang diperoleh pada isolat klinis penderita tuberkulosis dari BBLK Surabaya dan Strain Reference *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) dapat diidentifikasi berdasarkan reaktifitasnya dengan *strafing imunobloting*.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum :

Karakterisasi reaktifitas protein antigenik kuman *Mycobacterium tuberculosis*.

1.3.2 Tujuan khusus :

1. Identifikasi protein antigenik *Mycobacterium tuberculosis* berdasarkan berat molekul menggunakan metode SDS-PAGE.
2. Menentukan reaktifitas protein (spesifik) tersebut terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis menggunakan metode *strafing imunobloting*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat bagi Perkembangan Ilmu Pengetahuan

Memberikan informasi ilmiah tentang protein antigenik kuman *Mycobacterium tuberculosis* yang berperan penting dalam identifikasi antibodi atau respons antigen.

I.4.2 Manfaat bagi Penggunaan Praktis

Memberikan alternatif metode pemeriksaan penderita tersangka tuberkulosis yang mudah dan cepat dengan spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi.

BAB 11
TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tuberkulosis

2.1.1 Penyakit Tuberkulosis

Tuberkulosis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, dimana paru merupakan organ tempat masuk dan predileksi yang utama. Droplet yang terinhalasi mengandung sejumlah bakteri yang kemudian difagositosis oleh makrofag alveolar. Makrofag merupakan tempat berdiamnya patogen ini dan kemudian mentranspornya ke aliran limfe. Suatu lesi granulomatous kecil berkembang untuk menghambat bakteri (Kaufmann, 2002; Rom dan Garay, 2004).

Sekitar 90% orang yang terpapar *Mycobacterium tuberculosis*, berisiko akan terinfeksi, namun mereka tidak langsung sakit, dan bila bakteri ini tidak dieradikasi, penyakit tuberkulosis akan berkembang di kemudian hari. Penyembuhan tidak mungkin terjadi secara spontan dengan segera setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Pada orang dengan gangguan sistem imun, setelah infeksi primer penyakit akan langsung berkembang. Misalnya pada kasus orang terinfeksi HIV, risiko berkembangnya penyakit dalam tahun-tahun berikutnya secara dramatis meningkat tergantung pada beratnya imunodefisiensi. Artinya, saat sistem imun melemah, akan terjadi reaktivasi penyakit (Forbes *et al.*, 1998; Kaufmann, 2002).

2.1.2 Patogenesis Tuberkulosis

Tahapan kunci dalam patogenesis tuberkulosis adalah kemampuan *Mycobacterium tuberculosis* untuk masuk dan bereplikasi di dalam makrofag orang yang terinfeksi. Selama infeksi primer, *nuclei droplet-aerosol* mengandung sejumlah kecil *Mycobacterium tuberculosis* yang terdeposit pada alveoli paru dan kemudian difagosit oleh makrofag alveolar. *Mycobacterium tuberculosis* memasuki makrofag melalui *receptor-mediated* fagositosis yang merupakan suatu proses yang melibatkan reseptor komplemen (CR1, CR3 dan CR4), reseptor manosa dan *scavenger receptor*. Setelah multiplikasi intraseluler, *Mycobacterium tuberculosis* menyebar ke nodus limfe regional dalam tubuh inang. Dalam sebagian besar kasus, inang mengembangkan suatu respons pertahanan terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* yang melibatkan basil tuberkel dengan pembentukan granuloma yang mengandung agregat dan sel-sel raksasa, apoptotik, dan makrofag terinfeksi (Lucy *et al.*, 2002).

Seluruh proses patogenesis tuberkulosis ini meliputi beberapa stadium, yaitu :

- Stadium 1 : *Droplet nuclei* terinhalasi, partikel *Mycobacterium tuberculosis* siap difagositosis, diproses, dan dipresentasikan oleh makrofag alveolar.
- Stadium 2 : Mulai 7-21 hari setelah infeksi awal, *Mycobacterium tuberculosis* bermultiplikasi tanpa batas dalam makrofag yang tidak teraktivasi. Makrofag yang lain mulai extravasasi dari darah tepi. Makrofag-makrofag ini juga memfagositosis *Mycobacterium tuberculosis* tetapi sebagian makrofag juga tidak teraktivasi dan tidak dapat menghancurkan *Mycobacterium tuberculosis*

Stadium 3 : Limfosit berinfiltrasi, terutama sel T. Stadium ini banyak ditentukan oleh *Cell Mediated Immunity (CMI)*. Pada stadium ini mulai terbentuk tuberkel dengan karakteristik nekrosis kaseosa.

Stadium 4 : *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan makrofag untuk bereplikasi dan terjadilah pertumbuhan tuberkel yang kemudian dapat menginvasi bronchus. Jika ini terjadi, infeksi dapat menyebar ke bagian paru yang lain dan secara hematogen dapat menghasilkan tuberkulosis ekstrapulmoner (miliaris) yang mempunyai dua bentuk :

1. Lesi eksudatif yang dihasilkan dari akumulasi PMN, terjadi bentukan *soft tubercle*.
2. Lesi produktif atau granuloma terjadi saat inang menjadi hipersensitif terhadap tuberkuloprotein, dimana terjadi bentukan *hard tubercle*.

Stadium 5 : Pusat kaseosa mencair, dimana situasi ini kondusif bagi *Mycobacterium tuberculosis* untuk tumbuh dan cepat bermultiplikasi di ekstraseluler. Dinding bronchus bisa menjadi nekrotik dan ruptur, menghasilkan suatu kavitas yang memungkinkan *Mycobacterium tuberculosis* untuk cepat menyebar ke bagian lain dari paru. Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dapat berkembang menjadi infeksi yang berat. Bila lesi primer sembuh akan menjadi jaringan ikat atau terjadi kalsifikasi yang disebut *Ghon complex* (Joklik *et al.*, 1992; Alcamo, 1994; Todar, 2002).

Pembentukan suatu infeksi produktif tergantung kemampuan *Mycobacterium tuberculosis* untuk menginvasi ruang alveolar dan bertahan di dalam makrofag. Sebaliknya infeksi makrofag oleh *Mycobacterium tuberculosis* mengarah kepada aktivasi mekanisme mikrobisidal yang beragam, meliputi fusi fagolisosom, *respiratory burst*, produksi sitokin proinflamasi yang membatasi pertumbuhan organisme, dan pengerahan serta aktivasi leukosit tambahan (Giacomini *et al.*, 2001).

Saat permulaan respons imun alamiah mendominasi, terjadi pengerahan limfosit T ke paru untuk menghambat *Mycobacterium tuberculosis* di dalam granuloma. Granuloma terdiri atas makrofag teraktivasi yang dikelilingi oleh limfosit T, fibroblas, dan sel epiteloid. Produksi dan keseimbangan antara sitokin proinflamasi (IL-1, IL-6, IL-12 dan TNF- α) dan inhibitor (IL-10 dan TGF- β) yang disekresi oleh fagosit mononuklear setelah paparan terhadap antigen microbial, mengatur respons sel T dan juga berperan dalam pembentukan dan pemeliharaan granuloma. Sitokin yang diproduksi oleh sel T seperti IFN- γ dapat mengaktivasi monosit dan makrofag untuk menjadi mikrobisidal. Sehingga hubungan antara sel T dan fagosit mononuklear melalui sitokin penting untuk hasil akhir infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Terdapat empat gambaran klinis dari infeksi *Mycobacterium tuberculosis*, tergantung pada keadaan bakteri ini dalam makrofag yaitu segera dieliminasi, menjadi dorman dalam tubuh inang, menyebabkan tuberkulosis primer, atau reaktif beberapa tahun kemudian setelah infeksi primer (Giacomini *et al.*, 2001).

Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi kronik dan termasuk prototype *histiocytic proliferation*. Splenomegali merupakan suatu gambaran hiperplasia

retikuloendotelial pada tuberkulosis. Pada lesi tuberkulosis, terlihat makrofag pada semua stadium perkembangan, mulai dari monosit baru sampai dengan *multinucleated giant cell* yang matur. Satu gambaran yang menarik dari infeksi ini adalah beberapa organisme bertahan dan tetap berproliferasi di dalam makrofag. Armstrong dan D'Arcy-Hart (1971) menduga bahwa organisme yang bertahan dalam fagosom tidak mendapatkan suatu komplemen enzim hidrolitik dari *discharge* lisosom primer dan sekunder (Territo dan Cline, 1976)

Perkembangan tuberkulosis tergantung pada pengaturan oleh keseluruhan fungsi sistem makrofag, yaitu efektivitas tiap-tiap sel dan jumlah total sel-sel yang berespons. Meskipun *Mycobacterium tuberculosis* ini pada awalnya bermultiplikasi intraseluler, dengan perkembangan imunitas seluler bakteri ini akan dimusnahkan (Territo dan Cline, 1976).

2.1.3 Pengobatan

Kemampuan *Mycobacterium tuberculosis* untuk dorman namun tetap viabel dan mampu menyebabkan penyakit adalah suatu tantangan besar dalam pengobatan tuberkulosis. *Mycobacterium tuberculosis* adalah organisme yang tumbuh lambat, yang memerlukan penatalaksanaan suatu kombinasi obat-obatan dalam waktu yang lama untuk mencapai efektivitas terapi dan mencegah kejadian resistensi. Reaksi efek samping obat harus menjadi perhatian utama dalam pemilihan obat (Somaraju, 2002; WHO, 2003).

Konsentrasi lipid yang tinggi pada dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* menunjang untuk impermeabilitas dan resistensi terhadap agen antimikrobia (Todar, 2002).

Tiga konsep dasar pada pengobatan tuberkulosis yaitu :

1. Regimen harus mengandung beberapa obat yang *Mycobacterium tuberculosis* peka terhadapnya.
2. Obat harus diberikan secara teratur.
3. Terapi obat harus dilanjutkan selama waktu yang cukup.

Secara tradisional, obat antituberkulosis diklasifikasikan menjadi obat garis pertama (*first line drugs*) yang manfaatnya sangat besar dan toksisitasnya dalam derajat yang dapat diterima. Termasuk dalam obat jenis ini adalah isoniazid, pirazinamid, rifampisin, ethambutol dan streptomisin. Sebagian besar pasien-pasientuberkulosis berhasil diterapi dengan obat ini (Somaraju, 2002).

Obat garis kedua (*second line drugs*) lebih toksik dan kurang efektif, diindikasikan hanya apabila *Mycobacterium tuberculosis* resisten terhadap obat-obat garis pertama. Obat yang termasuk dalam golongan ini adalah etionamid, sikloserin, asam amino salisilat, rifabutin, quinolon, kapreomisin, viomisin dan tiasetazon (Somaraju, 2002).

Tuberkulosis diterapi dengan kombinasi beberapa obat, menggunakan campuran 3-4 obat dengan kemampuan yang berbeda :

- Aktivitas antibakteri : misalnya isoniazid, rifampisin, streptomisin, dan ethambutol
- Menghambat berkembangnya resistensi : seperti isoniazid, rifampisin, streptomisin, ethambutol dan ethionamid
- Sterilisasi yaitu untuk membunuh basil yang menetap dalam jangka waktu yang lama dalam bulan terakhir kemoterapi, misalnya rifampisin, pirazinamid, dan isoniazid (Gangadharam dan Jenkins, 1998)

Di beberapa negara, vaksinasi melawan tuberkulosis rutin dilakukan. Vaksin *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) adalah suatu strain *live attenuated Mycobacterium bovis* yang telah diperkenalkan tahun 1922. Percobaan klinis awal di Eropa memperlihatkan bahwa vaksin ini memberikan perlindungan sampai 80%, namun percobaan yang lebih baru di India dan Afrika memperlihatkan efektivitas yang lebih kecil (Anonim, 2002).

2.1.4 Epidemiologi

Tuberkulosis masih merupakan masalah kesehatan dunia yang utama. Pada tahun 2000, sekitar sepertiga dari penduduk dunia terinfeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Delapan juta kasus baru terjadi pada tuberkulosis dan 2,9 juta orang mati setiap tahunnya karena penyakit ini. Angka harapan hidup turun secara drastis karena tuberkulosis ini, yaitu 33,3 juta manusia (2,3% dari keseluruhan penyakit). Gambaran ini lebih dramatis jika mempertimbangkan hubungan yang berbahaya antara tuberkulosis dengan *Acquired Immune Deficiency Virus* (AIDS). Setengah juta manusia mati pada tahun terakhir ini karena infeksi gabungan antara *Mycobacterium tuberculosis* dan *human immunodeficiency virus* (HIV). Meningkatnya kasus tuberkulosis terhadap epidemi HIV dipengaruhi pula oleh beberapa faktor yang kompleks seperti ketidaktaatan penderita terhadap pengobatan antituberkulosis, komplikasi dari infeksi, dan faktor sosial seperti kepadatan penduduk dan kurangnya pemukiman yang layak (Forbes *et al.*, 1998; Kauffman, 2002; Rom dan Garay, 2004).

Masalah ini lebih sulit lagi dengan meningkatnya jumlah strain resistensi obat (*Multi Drugs Resistance* atau MDR). Lebih dari lima puluh juta

orang rentan terinfeksi dengan strain MDR dari *Mycobacterium tuberculosis*, dan di berbagai tempat lebih dari 15% dari keseluruhan kasus tuberkulosis disebabkan oleh strain MDR. Hal ini juga diperparah dengan dengan jadwal terapi yang cukup panjang dan meningkatnya biaya perawatan. Di beberapa negara berkembang, tuberkulosis MDR pada kenyataannya tidak lebih panjang diterapi (Forbes *et al.*, 1998; Kauffman, 2002).

2.1.5 *Mycobacterium tuberculosis*

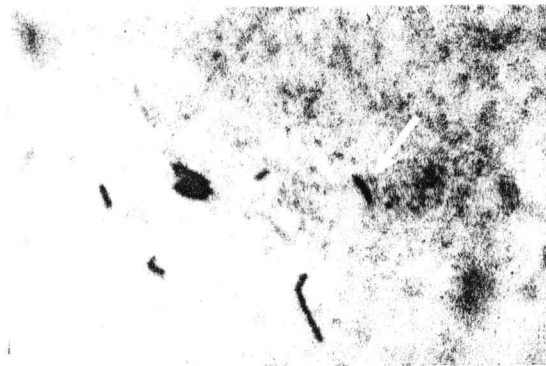
Mycobacterium tuberculosis adalah bakteri berukuran besar dengan panjang 2-4 μm dan lebar 0.2-0.5 μm , berbentuk batang, nonmotil. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri obligat aerob sehingga kasus klasik tuberkulosis, kompleks *Mycobacterium tuberculosis* ini selalu ditemukan pada lobus atas dari paru yang baik aerasinya. Bakteri ini merupakan parasit intraseluler fakultatif, biasanya menginfeksi fagosit mononuklear (makrofag), dan memiliki waktu generasi yang lambat, 15-20 jam, yang merupakan karakteristik fisiologis yang berkontribusi sifat virulensinya (Joklik *et al.*, 1992; Brooks *et al.*, 2000; Todar, 2002).

Media yang digunakan untuk menumbuhkan *Mycobacterium tuberculosis* adalah media Middlebrook's, medium Lowenstein-Jensen dan Ogawa. Koloni *Mycobacterium tuberculosis* kecil dan berwarna buram ketika ditumbuhkan pada medium pertumbuhan dan tumbuh 2-8 minggu (Joklik *et al.*, 1992; Todar, 2002).

Mycobacterium tuberculosis tidak diklasifikasikan sebagai bakteri Gram-positif atau Gram-negatif karena bakteri ini tidak memiliki karakteristik

kimia dari keduanya, meskipun bakteri mengandung peptidoglycan (murein) pada dinding selnya. Jika pengecatan gram terlihat pada *Mycobacterium tuberculosis*, pengecatan ini bersifat gram positif sangat lemah atau tidak sama sekali (Warsa *et al.*, 1994; Todar, 2002).

Spesies *Mycobacterium* diklasifikasikan sebagai bakteri tahan asam karena sifat impermeabilitasnya dengan pewarnaan dan pengecatan tertentu serta mampu mempertahankan warna saat dipanaskan dan diberi komponen organik yang bersifat asam. Satu metode pengecatan tahan asam untuk *Mycobacterium tuberculosis* adalah pengecatan Ziehl-Neelsen. Basil tahan asam terlihat berwarna pink pada suatu latar belakang yang kontras.



Gambar 2.1 *Mycobacterium tuberculosis*, pengecatan tahan asam (Todar, 2002)

Struktur dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* sangat menarik perhatian karena keunikannya diantara prokariot dan merupakan penentu utama virulensi bagi bakteri ini. Kompleks dinding sel mengandung peptidoglikan, arabinogalaktan, asam mikolat, lipomanan dan lipoarabinomanan. Lebih dari 60% dinding sel mikobakteria adalah lipid. Fraksi lipid dinding *Mycobacterium tuberculosis* mengandung tiga komponen utama, yaitu :

1. Asam mikolat

Merupakan lipid pada dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* dan menyusun lebih dari 50% berat kering envelope. Asam mikolat merupakan molekul hidrofobi kuat yang membentuk suatu lapisan lipid mengelilingi organisme dan berpengaruh terhadap kemampuan permukaan dinding sel serta menjadi suatu penentu virulensi yang bermakna. Kemungkinan komponen inilah yang mencegah mikobakteria diserang oleh protein kation, lisozim dan radikal oksigen pada granul fagositik serta melindungi mikobakteria ekstraselular dari deposisi komplemen dalam serum.

2. Cord Factor

Bertanggung jawab untuk susunan serpentine cord. *Cord factor* paling banyak diproduksi oleh strain virulen *Mycobacterium tuberculosis* dan toksik bagi sel mamalia dan juga sebagai penghambat migrasi PMN.

3. Wax-D

Pada envelope dinding sel dan merupakan komponen utama dari Freund's complete adjuvant (Joklik *et al.*, 1992; Todar, 2002; Crick *et al.*, 2004).

Konsentrasi lipid yang tinggi dari dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* berhubungan dengan kemampuan bakteri seperti :

- Impermeabilitas terhadap pangecatan dan pewarnaan
- Resisten terhadap berbagai antibiotic
- Resisten terhadap pembunuhan oleh komponen alkaline
- Resisten terhadap lisis osmotik melalui deposisi komplemen
- Resisten terhadap oksidasi letal dan bertahan hidup di dalam makrofag.

2.2. Aspek Imunologi

Mycobacterium tuberculosis adalah penyebab tuberkulosis pada manusia yang merupakan satu-satunya reservoir. Bakteri ini memiliki mekanisme khusus untuk masuk ke dalam sel. Basil tuberkel dapat mengikat secara langsung reseptor manosa pada makrofag melalui dinding sel yang berhubungan dengan glikolipid termanosilasi, LAM, atau secara tidak langsung melalui reseptor komplemen tertentu atau reseptor Fc (Creve *et al.*, 2002; Todar, 2002; Crick *et al.*, 2004).

Respons imun inang terhadap masuknya *Mycobacterium tuberculosis* berupa terbentuknya serum antibodi dan komplemen, kemudian terjadi aktivasi granulosit. Bakteri ini akan merangsang terbentuknya *T-lymphocyte-mediated immunology*. Serum antibodi dan komplemen tidak efektif untuk melawan bakteri ini. Adanya limfosit T yang tersensitisasi dan aktivasi makrofag adalah kunci dari kekebalan. Mikroba sebagai antigen yang mendekat pada permukaan makrofag akan diproses melalui penghubung pembentukan *Major Histocompatibility Complex (MHC)*. Dengan susunan seperti itu makrofag yang berinteraksi dengan limfosit T membentuk *macrophage-activating factors* yaitu interferon gamma (IFN- γ). Rangkaian di atas menunjukkan efektivitas kekebalan melawan bakteri intraseluler (Todar, 2002).

Mycobacterium tuberculosis merupakan patogen intraseluler dengan kemampuan bertahan di dalam kompartemen fagosomal. Hal ini efektif untuk melawan sistim imun inang, karena menghalangi maturasi fagosom pada tahap awal dan menghambat fusi fagolisosom (Kaufmann, 2002).

Mekanisme yang pasti telah diketahui, yaitu suatu protein yang disekresi oleh bakteri ini memodifikasi membran fagosom. *Mycobacterium tuberculosis*

bisa tinggal dalam fagosom atau menghilang dari fagosom, dan dalam penemuan kasus, fagosom menjadi suatu lingkungan yang protektif untuk tumbuh dalam makrofag, walaupun sebenarnya fagolisosom merupakan lingkungan yang tidak menguntungkan, dimana beberapa bakteri patogen lain terbunuh. Fagosom pada awalnya kurang berdampak merugikan bagi *Mycobacterium tuberculosis* karena ia mampu mengakomodasi dirinya dengan baik. Namun penghambatan maturasi fagosom oleh *Mycobacterium tuberculosis* tidak lengkap, karena beberapa bakteri terbunuh atau setidaknya terhambat bereplikasi melalui mekanisme bakterisidal intraseluler yang meliputi oksigen reaktif dan nitrogen intermedit yang diproduksi oleh makrofag teraktivasi (Parslow *et al.*, 2001; Kaufmann, 2002; Todar, 2002).

Mycobacterium tuberculosis mampu menentang efek toksik dari oksigen intermediate yang dihasilkan dalam proses fagositosis. *Mycobacterium tuberculosis* mensekresi kompleks antigen 85 yang terdiri atas suatu kelompok protein yang diketahui untuk mengikat fibronectin. Protein ini dapat membantu dalam *walling off* bakteri dari sistim imun dan bisa memfasilitasi pembentukan tuberkel meskipun hal ini terbukti jarang terjadi (Todar, 2002).

Mycobacterium tuberculosis memiliki waktu generasi lambat, sehingga sistim imun bisa tidak siap untuk mengenali bakteri ini (Alcamo, 1994; 2002; Todar, 2002).

2.2.1 Respons Imunitas Seluler Terhadap Tuberkulosis

2.2.1.1 Respons Sel Limfosit T

Limfosit T merupakan mediator obligat kekebalan, mereka tidak bekerja sendiri tetapi harus berinteraksi dengan sel-sel imun respon lainnya untuk

mencapai resistensi yang optimal. Semua populasi sel T (CD4, CD8) berperan dalam proteksi. Sel T yang mengekspresikan reseptor, 95% lebih terdiri dari sel T post timus terdapat pada organ perifer dan darah. Sebaliknya sel T hanya sedikit terdapat pada daerah tersebut, tetapi lebih banyak terdapat pada jaringan mukosa seperti paru-paru. Bukti bahwa sel T sangat diperlukan untuk resistensi tuberkulosis berdasarkan percobaan bahwa tikus mutan yang dihilangkan sel T dengan cara delesi gen yang mengkode sel T, relatif resisten terhadap infeksi BCG subletal selama 4 minggu infeksi, kemudian pertumbuhan BCG meningkat dan akhirnya tikus tersebut akan mati karena infeksi BCG (Orme I, Cooper A, 1999).

2.2.1.1.1 Sel Limfosit T CD4+

Sel limfosit T/dapat dibagi menjadi sel T CD4+ yang mengenal peptida antigenik yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas II dan sel T CD8+ yang mengenal peptida antigenik yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I (Chan J, Kauffmann HE, 1994). Sel T CD4+ berperan penting pada sistem pertahanan terhadap tuberkulosis. Tikus yang mengalami deplesi sel T CD4+ yang sebelumnya terinfeksi *M. bovis*, terbukti tidak dapat mengontrol pertumbuhan mikobakteri, sedangkan tikus yang deplesi sel T CD8+ menunjukkan efek yang berbeda. Selain itu transfer adoptif sel T CD4+ pada binatang yang telah disensitisasi akan memberi perlindungan terhadap tuberkulosis. Deplesi sel T CD4+ karena infeksi HIV ditandai dengan meningkatnya kerentanan terhadap tuberkulosis primer dan reaktivasi (Barnes PF, et al., 1994).

Berdasarkan studi eksperimental dan studi tuberkulosis pada manusia menunjukkan bahwa deplesi sel T CD4+ akan memperburuk infeksi oleh *M. tuberculosis* dan BCG. Konsisten dengan penemuan tersebut menunjukkan bahwa tikus mutan dengan defisiensi gen MHC kelas II, sehingga fungsi aktif sel T CD4+ tidak ada, maka tikus tersebut akan mati karena infeksi BCG dan *M. tuberculosis*. Deplesi sel T CD4+ pada infeksi virus HIV juga dapat mengakibatkan tuberkulosis pada pasien AIDS (Chan J, Kauffmann HE, 1994).

Berdasarkan fungsinya Sel T CD4+ dibedakan menjadi 2 sub populasi yaitu sel Th1 dan Th2. Sel Th1 menghasilkan IFN , IL-2 dan limfotoksin yang berfungsi meningkatkan aktivitas mikrobisidal makrofag serta menimbulkan hipersensitifitas tipe lambat. Sedangkan sel Th2 menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10 yang berfungsi merangsang diferensiasi dan per-tumbuhan sel B. Sel Th1 dan sel Th2 menghasilkan IL-3, GM-CSF (*Granulocyt Macrophage-Colony Stimulating Factor*) dan TNF. Baik Th1 dan Th2 berpengaruh terhadap manifestasi infeksi oleh patogen intra seluler. Sel Th1 memberikan resistensi imunologi terhadap infeksi melalui produksi inter-feron gamma, sedangkan sel Th2 akan memperburuk penyakit melalui IL-4 (Dannenberg AM, 1994).

Data yang telah dipublikasi menunjukkan bahwa jenis sitokin yang diproduksi sebagai respon terhadap *M. tuber-culosis* masih diperdebatkan. Beberapa studi menunjukkan bahwa klon sel T CD4+ yang reaktif terhadap *M. tuberculosis* adalah Th1 yang menghasilkan IFN dalam konsentrasi tinggi dan IL-4 dan Il-5 dalam konsentrasi rendah. Penelitian lain menunjukkan bahwa klon sel T yang reaktif terhadap *M. tuberculosis* akan menghasilkan IFN dan IL-4 atau IFN , IL-2, IL-5 dan IL-10. Studi terakhir melaporkan beberapa klon akan

mengekspresikan mRNA terhadap IL-4 meskipun IL-4 tidak terdeteksi pada supernatan kultur sel (Barness PF, et al., 1994).

Meskipun beberapa penelitian menitikberatkan pada fungsi sel T CD4+ yang berperan sebagai antimikobakteri melalui produksi sitokin dan aktivasi makrofag, mekanisme lain dari sel T pada sistem pertahanan tubuh adalah melalui sitolisis langsung oleh makrofag dan sel fagosit yang terinfeksi *M. tuberculosis*.

Kultur sel T sitolitik yang spesifik terhadap *M. tuberculosis* secara *in vitro* adalah sel T CD4+ dan aktivitas sel tersebut pada lokasi penyakit meningkat dibandingkan pada sel darah tepi. Kaufmann (1988) menyatakan bahwa beberapa makrofag yang terinfeksi *M. tuberculosis* mempunyai potensi antimikobakteri yang rendah sehingga basil terhindar dari sistem imun hospes. Sel T sitolitik yang mengenal antigen mikobakteri dapat melisis makrofag tersebut sehingga basil yang dilepaskan akan dimakan dan dibunuh oleh makrofag dengan aktivitas mikobakteri yang lebih tinggi. Selain itu sel T sitolitik dapat berperan sebagai *scavenger* dengan melisis makrofag yang mati sehingga dapat dikatabolis oleh sel mononuklear di sekitarnya (Barness PF, et al., 1994).

2.2.1.1.2 Sel Limfosit T CD8⁺

Sel T CD8+ merupakan populasi sel T sitolitik yang mempunyai fungsi pertahanan terhadap patogen intraseluler pada binatang percobaan. Tidak seperti sel CD4+, sel T CD8+ tidak menghasilkan IL-2 tetapi lebih tergantung pada sumber eksogen (12). Peran sel T CD8+ dapat dibuktikan dengan percobaan bahwa deplesi sel T CD8+ akan memperburuk infeksi *M. tuberculosis* dan BCG pada tikus, dan transfer sel CD8+ yang selektif akan melindungi terhadap

tuberkulosis. Penelitian lain menggunakan tikus mutan dengan delesi gen 2-mikro-globulin, yaitu gen yang dibutuhkan untuk ekspresi MHC kelas I sehingga sel T CD8+ tidak berfungsi secara aktif, maka tikus akan mati dengan cepat karena infeksi *M tuberculosis* tetapi tidak dengan infeksi BCG (Chan J, Kauffmann HE, 1994).

Namun sel T CD8+ jarang diidentifikasi pada tuberkulosis manusia (Barness PF, et al., 1994; Chan J, Kauffmann HE, 1994). Sel T CD8+ tidak terkonsentrasi secara selektif pada lokasi penyakit (*site of disease*) pada pasien tuberkulosis dan parahnya tuberkulosis pada pasien HIV tidak dipengaruhi oleh jumlah sel T CD8+. Sebaliknya tidak adanya korelasi antara tes tuberkulin kulit positif dan proteksi terhadap tuberkulosis dapat disebabkan oleh karena tes tuberkulin tidak dapat digunakan untuk me-ngetahui aktivitas sel T CD8 sitotoksik (Barness PF, et al., 1994).

Berbagai studi in vitro menunjukkan bahwa sel T CD4+ yang reaktif terhadap mikobakterium sangat potensial meng-hasilkan IFN .Namun IFN juga dihasilkan oleh sel T CD8+ yang spesifik terhadap mikobakterium. Sitokin merupakan mediator utama resistensi tuberkulosis. Sel T CD4+ dan sel T *Cermin* (*Dunia Kedokteran No. 137, 2002 36*)

Respon sensitivitas tipe lambat tidak identik dengan imunitas protektif. Tes kulit tuberkulin negatif pada orang sehat menunjukkan tidak adanya infeksi *M. tuberculosis* sebelumnya dan tidak adanya populasi sel T *memory* yang reaktif terhadap *M. tuberculosis*. Pada pasien dengan infeksi tuberkulosis atau sakit tuberkulosis, tes kulit tuberkulin negatif merupakan hasil dari proses yang

berhubungan dengan respon hipersensitivitas tipe lambat, seperti infeksi HIV dan tuberkulosis itu sendiri (Chan J, Kauffmann HE, 1994).

CD8+ yang reaktif mikobakterium juga mengekspresikan aktifitas sitolitik yang spesifik yaitu; dapat melisiskan makrofag yang telah disensitisasi antigen mikobakterial atau terinfeksi BCG atau *M tuberculosis*. Kedua fungsi tersebut dapat ditunjukkan secara in vitro tetapi juga proteksi secara in vivo (Chan J, Kauffmann HE, 1994).

2.2.1.1.3 Sel Limfosit T

Beberapa bukti menunjukkan bahwa sel T berperan pada respon imunitas awal terhadap infeksi *M. tuberculosis*. Selain sel T, sel lain juga menghasilkan IFN dan meng-ekspresikan aktivitas sitolitik yang berperan pada resistensi. Sel NK maupun sel T menghasilkan IFN dan melisiskan sel target yang tersensitisasi mikobakterium. *M. tuberculosis* relatif resisten terhadap makrofag. Keberadaan *M tuberculosis* pada individu sehat selama beberapa tahun tanpa menyebabkan penyakit menunjukkan bawa sistem imun gagal menghilangkan patogen tersebut dan harus mengandalkan efek mikobakteri-sidal dan menghambatan pertumbuhan mikobakteri (Chan J, Kauffmann HE, 1994).

2.3. Penelitian Berkaitan Protein Antigenik *Mycobacterium tuberculosis*

Ada beberapa penelitian yang pernah dilakukan berkaitan dengan protein antigenik oleh beberapa orang peneliti di dalam dan diluar negeri. Diantaranya seperti yang diuraikan dibawah ini :

GH Bothamley, et al., 1992. dalam penelitiannya yang berjudul "*Clinical Value of the Measurement of Mycobacterium tuberculosis Spesific Antibody in Pulmonary tuberculosis.*" Suatu serological test yang bisa membantu ke arah diagnosis tuberkulosis menggunakan titer antigen kuman *Mycobacterium tuberculosis* yang berbeda, antara lain 38 kDa, 19 kDa, ML 34 epitope, dan hsp 65. Dari penelitian ini diperoleh kesimpulan, bahwa antigen atau epitope spesifik bisa membantu dalam hasil diagnosa, penilaian ramalan, dan monitoring chemotherapi pada pasien dengan tuberkulosis paru-paru.

Krishna k. Singh, et al., 2005. dalam penelitiannya "*Immonogenicity of the Mycobacterium tuberculosis PPE55 (Rv3347c) Protein during Incipient and Clinical Tuberculosis,*" menyatakan bahwa PPE55 adalah suatu protein yang sangat immunogenik yang bermanfaat untuk membedakan antara *dormant* tuberkulosis dan masih dalam permulaan dengan subclinical tuberkulosis.

GH Bothamley dan RM Rudd, 1994. dalam penelitiannya "*Clinical evaluation of a serological assay using a monoclonal antibody (TB72) to the 38 kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis,*" menguji suatu immunosorbent pengujian kadar logam enzyme-linked (ELISA) modifikasi suatu radioimmunoassay, menggunakan Tb72 monoclonal sebagai serological menguji tuberkulosis dalam klinis. Kesimpulannya, TB72 test menyediakan informasi tambahan pada hasil diagnosa dan perawatan tuberkulosis.

KM Samanich, et all., 2000. dalam penelitiannya "*Serodiagnostic Potential of Culture Filtrate Antigens of Mycobacterium tuberculosis,*" menyatakan bahwa recombinan Ag 85C dan MPT32 pada *E. coli* menunjukkan

penurunan reaksi terhadap penderita tuberkulosis dan protein 88-kDa paling berpeluang untuk serodiagnosis tuberkulosis pada individu yang terinfeksi HIV.

Donatella Vincenti, et al., 2003. dalam penelitiannya "*Identification of Early Secretory Antigen Target-6 Epitopes for the Immunodiagnosis of Active Tuberculosis*," bertujuan untuk membedakan epitope spesifik *Mycobacterium tuberculosis* dalam mendiagnosis tuberkulosis aktif dan untuk membedakan jenis infeksi berdasarkan asal negaranya menggunakan dua multiepitopic peptides dari ESAT-6 dalam mendiagnosis.

Andersen AB, et al., 1992. dalam penelitiannya "*Structure and Fuction of a 40,000-molecular-weight protein Antigen of Mycobacterium tuberculosis*," suatu gen yang menyandi suatu protein antigen dari *Mycobacterium tuerculosis* dengan suatu bobot molekular 40,000 yang telah disequencing. Atas dasar urutan homology dan analisa fungsional, menunjukkan bahwa protein adalah suatu L-Alanine dehydrogenase, suatu unsur yang penting menyangkut peptidoglycan dinding sel.

Andersen AB, et al., 1991.dalam peneliannya "*MPB64 possesses 'tuberculosis-complex'-specific B- and T-cell Epitopes*," mengembangkan monoclonal antibodi reaktif dengan suatu protein dari *Mycobacterium tuberculosis* dengan berat molekul 24 kDa. Protein ini direkayasa mirip dengan MPB 64 (Harboe et al.,). Cross-Reactive MoAb mempertunjukkan MPB itu 64 lebih mycobacterial, dimana MPB 64 ditunjukkan untuk mempengaruhi daya hypersensitivitas reaksi pada babi guinea outbred yang diimunisasi dengan M. tebese dan M. bovis bacille Calmette-Guérin (BCG).

Borremans M, 1989. dalam penelitiannya "*Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of Mycobacterium tuberculosis,*" menguraikan identifikasi dari gen yang menyandi suatu immunodominant 32-kilodalton (kDa) dari *Mycobacterium tuberculosis*. Antigen 32-Kda dengan berlimpah dikeluarkan ke dalam kultur. Hasil recombinant clones memperlihatkan suatu 140- atau 125-kDa beta-galactosidase hasil peleburan protein yang reaktif dengan antigen polyclonal kelinci anti-32 kDa serum yang dideteksi. Perbandingan *Mycobacterium tuberculosis* antigen 32-kDa dengan *Mycobacterium bovis* BCG alpha-antigen yang ditemukan 73.8% homolog antar urutan DNA dan 72.8% homology antar amino urutan asam. Akhirnya, peleburan protein 140-kDa bisa dengan untuk manusia yang terinfeksi tuberculosis. Hasil ini mengkonfirmasi temuan sebelumnya antigen 32-kDa bisa digunakan sebagai alat berharga untuk diagnosis serologi pada penderita tuberculosis. Lebih dari itu, ketersediaan protein recombinant membuka perspektif untuk lokalisasi relevan B- dan T-Cell epitope daerah pada antigen 32-kDa.

Laqueyrie A, et al., 1995. dalam penelitiannya "*Cloning, sequencing, and expression of the alpha gene coding for the Mycobacterium tuberculosis 45/47-kilodalton secreted antigen complex,*" suatu *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-kDa antigen kompleks, kehadiran BCG dari kultur air-saringan sebelumnya. Antigen penyerang kuman sama dengan antigen yang terdapat pada medium kultur tuberculosis pada air-saringan. Hybridisasi analisa mencerna total DNA genomic dari *Mycobacterium tuberculosis* (acuan H37Rv dan H37Ra) yang menunjukkan bahwa pada gen sel tunggal pada genome tersebut. N-Terminal identitas atau homology dari *Mycobacterium tuberculosis* dan *Mycobacterium*

bovis BCG membersihkan molekul global yang serupa dan menyimpulkan komposisi asam amino menunjukkan hasil yang sempurna.

Harboe M, et al., 1986. dalam penelitiannya "*Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of Mycobacterium bovis BCG,*" merupakan protein immunogenik MPB64 dan MPB80 *Mycobacterium bovis BCG* yang homogen dengan MPB70. MPB70 dan MPB80 menunjukkan suatu distribusi serupa pada substrains BCG, keduanya terdapat dalam konsentrasi tinggi pada cairan kultur BCG substrain Tokyo, BCG Moreau, BCG Rusia, dan BCG Swedia dan dalam jumlah sangat kecil pada BCG Glaxo, BCG Tice, BCG Copenhagen, dan BCG Pasteur. Dalam berbagai larutan physicochemical, kandungan MPB70 dan MPB80 sama, tetapi MPB80 mempunyai suatu kadar yang lebih rendah. Hasil ini menunjukkan MPB70 dan MPB80 mempunyai format yang sama pada produk gen yang sama, akibat perubahan postsynthetic. Sebagai pembanding, MPB64 mempunyai suatu bobot molekular yang lebih tinggi. Urutan asam amino N-Terminal tidak menunjukkan homology dengan MPB70, kedua protein tidak ini menunjukkan persamaan immunologik. MPB64 dan MPB70 hanya menunjukkan cross-reactivas sangat terbatas dengan jenis mycobacteria yang lain tetapi cross-reacted dengan *Nocardia asteroid*. Kejadian yang sama pada delapan substrains BCG yang berbeda menunjukkan bahwa kedua protein dipengaruhi oleh mekanisme kendali serupa, tetapi berlawanan dengan MPB70, MPB64 terjadi pada konsentrasi cukup dalam dua tegangan *Mycobacterium tuberculosis* untuk memberi suatu noda beda pada two-dimensional polyacrylamide 'gel' agar-agar electrophoresis cairan kultur.

Shinnick TM, 1987. dalam penelitiannya "*The 65-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis*," merupakan protein 65-kilodalton (kDa) yang telah dikenali sebagai salah satu antigen yang penting pada *Mycobacterium tuberculosis*. Gen yang menyandi antigen ini terisolasi dari suatu lamda gt11-*Mycobacterium tuberculosis*. Urutan nucleotida gen ini ditemukan sebagai 540-amino-acid. Urutan ini menunjukkan hubungan dengan antigen 65-kDa yang membentuk suatu plasmid. Protein yang dihasilkan bereaksi secara rinci dengan protein anti-65-kDa.

Andersen AB, Hansen EB, 1989. dalam penelitiannya "Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*," satu protein seperti antigen b (Pab) dengan bobot molekular 38,000, yang mengikat monoclonal antibodi kuman HYT28, TOPI 2, HBT 12, HGT 3, TB 71, dan TB 72. Gen yang menyandi protein ini terisolasi dari suatu lamda gt11 *Mycobacterium tuberculosis*. Urutan nucleotida dari recombinan mycobacterial yang akan ditentukan di masukkan, hingga pada saat pembacaan ditemukan asam amino 374. Urutan asam amino memperlihatkan 30% homolog dengan protein phosphate-binding, Psts, dari *Escherichia coli*. Pab gen merupakan subclone pada pBR322 bersama dengan lacZ gen, dan penghapusan diperoleh dari 3 menit akhir. Anti-Pab monoclonal digunakan untuk memeriksa protein kasar lysates *E. coli* diubah dengan penghapusan plasmids. Antigen b, a 38,000 merupakan salah satu protein dari *Mycobacterium tuberculosis* yang menunjukkan epitopes spesifik penderita tuberkulosis.

Nahid Mohaghehpour, et al., 1998. dalam penelitiannya "*CTL Response to Mycobacterium tuberculosis: Identification of an Immunogenic Epitope in the 19-kDa Lipoprotein1,*" studi ini menggunakan pengetahuan tentang HLA-A binding pada pengujian kadar logam yang peptide-binding immunofluorescence-based untuk menyaring untuk potensi epitopeHLA-A yang terdapat di 19-kDa lipoprotein *Mycobacterium tuberculosis* (M.Tb19). Sel T CD8+ diperoleh dari HLA-A1+ pasien dengan tuberkulosis aktif seperti pada vaksin TBC. Hasil menunjukkan suatu Peptide yang terdiri atas residu 88 dan 97 M.Tb19 (P88-97). CTL yang dibentuk spesifik untuk P88-97 menunjukkan lyse autologous monocytes terkena infeksi/tersebar dengan sangat oleh H37Ra. Hasil ini mempertunjukkan M.Tb19 itu menimbulkan kelas HLA Yang I-restricted CTLS pada vitro dan pada vivo yang mengenali secara endogin proses Ag. Epitopes jenis ini bermanfaat dalam perancangan suatu vaksin tuberkulosis.

P Launois, et al., 1994. dalam penelitiannya "*T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy,*" dimana, MTAG85A peptides yang dikenali oleh PBMC dari lepromin-positive orang sehat dan paucibacillary lepra pasien, terdapat 90% homolog antara 85A protein *M. leprae* dan *M. tuberculosis* berbeda. Multibacillary pasien tidak reaktif ke Ag85 atau MT85A peptides.

Nugraha, Jusak, 2006. dalam penelitiannya yang berjudul "*Urutan Asam amino dari epitop Regio N. Terminus Antigen ESAT-6 Sebagai Marka Diagnostik Penyakit Tuberkulosis Paru Aktif,*" Penyakit tuberkulosis (TB) paru masih merupakan masalah kesehatan, baik di Indonesia maupun di seluruh dunia. Vaksin

BCG, sekalipun telah berhasil menurunkan prevalensi TB primer, tetapi belum berhasil mengurangi prevalensi TB pasca-primer.

Seiring dengan kemajuan di bidang teknologi, penelitian di bidang diagnostik dan vaksinasi untuk penyakit TB telah maju pesat. Urutan genom dari *Mycobacterium tuberculosis* sebagai agen penyebab TB telah diketahui dengan lengkap, maka informasi mengenai seluruh bahan genetik dan kuman ini telah dapat diperoleh. Antigen ESAT -6 dengan berat molekul 6 kDa, merupakan protein antigenik yang disekresikan oleh kuman *M. tuberculosis*.

Ada banyak bagian protein kuman yang potensial imunogenik yang telah berhasil diidentifikasi. Beberapa protein antigenik yang terpenting di antaranya adalah ESAT -6, 38 kDa, hsp 65, hsp 70 dan complex Ag85.

ESAT -6 merupakan antigen penting yang dikenali oleh sel T protektif baik pada hewan coba maupun pada manusia. ESAT -6 ini disandi oleh gen RD 1 (Region of difference) yang terdapat pada *M. tuberculosis* dan *M. bovis* yang patogen, dan tidak terdapat pada *M. bovis* BCG strain vaksin yang avirulen. Bila gen yang menyandi ESAT -6 dimasukkan ke *M. bovis* BCG maka didapatkan peningkatan daya proteksi pada percobaan hewan yang mendapat challenge dengan kuman *M. tuberculosis*. Antigen ESAT -6 terdiri dari 95 asam amino dan mempunyai beberapa epitop di antaranya terdapat pada bagian N-terminus yang bersifat hidrofilik dan terpapar di bagian permukaan. Di bagian ini tentu ada satu atau lebih epitop yang reaktif dengan antibodi dalam sera subyek populasi Indonesia yang menderita TB paru aktif dan ada pula overlapping common sequence yang reaktif hanya pada sera perawat sehat yang merawat penderita TB.

Pemecahan masalah ini dilakukan dengan penelitian jenis observasional dengan rancangan cross-sectional. Variabel penelitian yang diperiksa adalah banyaknya frekuensi overlapping common sequence asam amino (epitop) dari residu asam amino 1-35 antigen ESAT-6 yang reaktif terhadap antibodi (IgG) dalam sera subyek penderita TB aktif, subyek kontrol sabat dan subyek perawat sehat. Rancangan analisis data dilakukan dengan uji Z.

Analisis dan residu asam amino 1-35 dan antigen ESAT-6 *M.tuberculosis* yang dipotong dengan panjang 9 mer, sating tumpang tindih 8 mer serta offset 1 mer, dan diuji reaktivitasnya dengan antibodi dalam sera ke tiga kelompok subyek penelitian menggunakan metode B-cell epitope scanning. Analisis dari hasil penelitian menunjukkan bahwa telah ditemukan dua jenis epitop. Yang pertama adalah epitop yang reaktif terhadap sera penderita TB peru aktif dan perawat sehat yang terpapar *M. tuberculosis*, dan berbeda bermakna dengan sera kontrol sehat. Epitop ini disebut epitop infeksi TB berat yaitu IHSLID (2530). Jenis kedua adalah epitop protektif dengan overlapping common sequence asam amino (epitop) EAAASA (12-17) yang reaktif terhadap antibodi spesifik pada kelompok sera subyek perawat sehat yang terpapar *M. tuberculosis* dan hanya sedikit berbeda pada orang sehat dan penderita TB dengan perbedaan frekuensi yang bermakna.

Epitop protektif ini ditemukan overlapping dengan daerah yang merupakan epitop sel T pada populasi Jerman dan India, dan diperkirakan juga pada populasi Indonesia sehingga mungkin juga dapat menimbulkan respons imun seluler yang protektif.

Sarwo Handayani, 2002. dalam penelitiannya "*Karakteristik protein antigen M.tuberculosis multi resisten Obat anti Tuberculosis degan cara imunobloting menggunakan serum pasien TB,*" dimana karakteristik protein dilakukan dengan cara imunobloting menggunakan tidak adanya perbedaan antara kedua protein antigen kuman tersebut, karena hanya terlihat satu pita protein yang dengan berat molekul 70 kDa. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh karena protein belum terpisah dengan baik, sehingga hanya terlihat satu pita protein saja, kadar protein yang diperoleh rendah, isolasi belum sempurna atau adanya protein yang rusak selama proses ekstraksi sehingga protein tersebut tidak tampak.

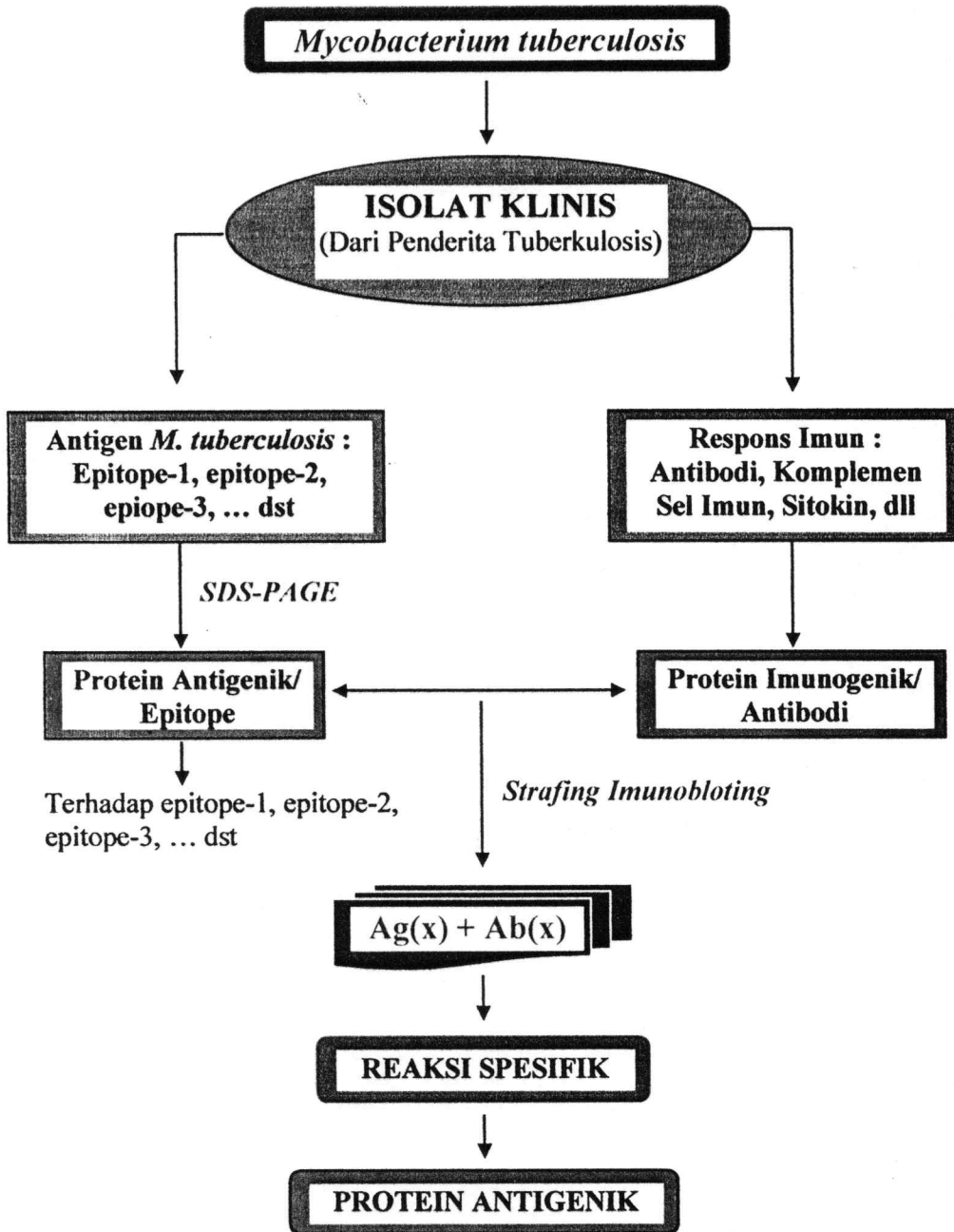
Kalma, 2004. dalam penelitiannya "*Deteksi antibodi spesifik terhadap Mycobacterium tuberculosis dalam serum penderita tuberculosis paru menggunakan AIM TB Rapid Card,*" yang bertujuan mempelajari kemampuan teknik imunokromatografi AIM TB Rapid Card untuk deteksi antibody spepsifik *Mycobacterium tuberculosis* dalam serum penderita tuberculosis paru, serta mempelajari perbedaan kemampuan diagnosis tuberculosis paru antara teknik imunokromatografi AIM TB Rapid Card dengan teknik mikroskopis BTA. Tujuan khususnya untuk menentukan sensitivitas dan spesifisitas teknik imunokromatografi AIM TB Rapid Card, dan menentukan perbedaan hasil diagnosis tuerkulosis paru antara teknik imunokromatografi AIM TB Rapid Card dengan teknik mikroskopis BTA. Hasilnya, ternyata teknik imunokromatografi AIM TB Rapid Card memiliki sensitivitas 64 % dan spesifisitas 100 %. Hasil yang diperoleh dari uji statistic chi-square ternyata tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,87$) pada hasil diagnosis tuberculosis paru antara teknik imunokromatografi AIM TB Rapid Card dengan teknik mikroskopis BTA.

Basundari Sri Utami, 2002. dalam penelitiannya "*Uji validitas teknik PCR (polymerase chain reaction) dan pemeriksaan mikroskopis bakteri tahan asam sebagai alat diagnosis penderita TB paru di rumah sakit Persahabatan, Jakarta,*" dengan tujuan menentukan validitas PCR sebagai perangkat diagnosis pada tersangka penderita tuberculosis. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat bagi program pemberantasan tuberculosis terutama sebagai informasi tentang validitas diagnosis dan kemungkinan penggunaan PCR sebagai alat diagnosis. Hasilnya, sebagai perangkat diagnosis TB paru, PCR valid dapat membedakan penderita TB paru dan bukan penderita TB paru, akan tetapi kurang reliabel dibanding hasil pemeriksaan mikroskopis BTA.

Wahyunitisari, Manik Retno, 2005. dalam penelitiannya "*Uji polymerase chain reaction (PCR) untuk menilai kebijakan klinis penentuan diagnosa tuberculosis paru di rumah sakit Dr. Soetomo Surabaya,*" yang bertujuan untuk menelaah diagnosis tuberculosis paru berdasarkan gejala klinis, pemeriksaan mikroskopis BTA dan radiologis, dengan menggunakan uji PCR. Sehingga dapat diketahui seberapa banyak penderita yang dinyatakan tuberculosis dengan BTA negatif dan hasil roentgen positif, yang memberikan hasil positif dengan PCR, dan seberapa banyak pula penderita yang dinyatakan bukan tuberculosis dengan BTA negatif dan hasil roentgen negatif, yang memberikan hasil positif dengan PCR. Hasilnya, dari 24 penderita dengan hasil roentgen negatif dan tidak diobati sebagai penderita tuberculosis paru, ternyata 8 penderita (33,33 %) diantaranya memberikan hasil positif dengan pemeriksaan PCR, yang berarti terdapat kuman *Mycobacterium tuberculosis* pada sputumnya. Apakah penderita perlu diobati sebagai penderita tuberculosis paru, hal ini perlu pembahasan tersendiri dengan

para klinisi. Tetapi secara teoritis mikrobiologi bahwa penderita ini adalah orang yang pada sputumnya mengandung kuman *Mycobacterium tuberculosis* dan dapat menularkan ke orang lain dengan derajat tertentu.

Bab III
Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Mycobacterium tuberculosis masuk kedalam tubuh manusia melalui jalan inhalasi (pernafasan). Organ sasaran yang sering diserang oleh infeksi bakteri ini terutama adalah jaringan "*parenchyme*" organ paru. Bakteri ini terdeposit dalam jaringan paru.

Mukosa pernafasan berupa sputum yang mengandung bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dari manusia yang terinfeksi dapat dijadikan sebagai bahan pemeriksaan untuk penegakan diagnosis tuberkulosis berdasarkan metode kultur sebagai standar emas (*gold standard*). Hasil kultur dari sputum ini merupakan isolat klinik yang digunakan dalam penelitian ini.

Respons imun manusia terhadap masuknya *Mycobacterium tuberculosis* berupa terbentuknya serum antibodi dan komplemen, kemudian terjadi aktivasi granulosit. Bakteri ini akan merangsang terbentuknya *T-lymphocyte-mediated immunology*.

Protein subunit *outer membrane protein* (OMP) dalam isolat klinis penderita tuberkulosis kemudian dilakukan *imunoelektroforesis* menggunakan metode SDS-PAGE untuk mengidentifikasi berat molekul-berat molekul protein (kDa) yang terkandung didalamnya.

Untuk memastikan apakah protein-protein (kDa) yang didapatkan dari hasil SDS-PAGE dibloting (*western blott*) menggunakan metode *strafing imunobloting* menggunakan antibodi poliklonal yang terdapat dalam serum penderita tuberkulosis.

Apabila ada kesesuaian antara protein yang terdapat pada *outer membrane protein* (OMP) dengan antibodi poliklonal yang terdapat dalam serum penderita

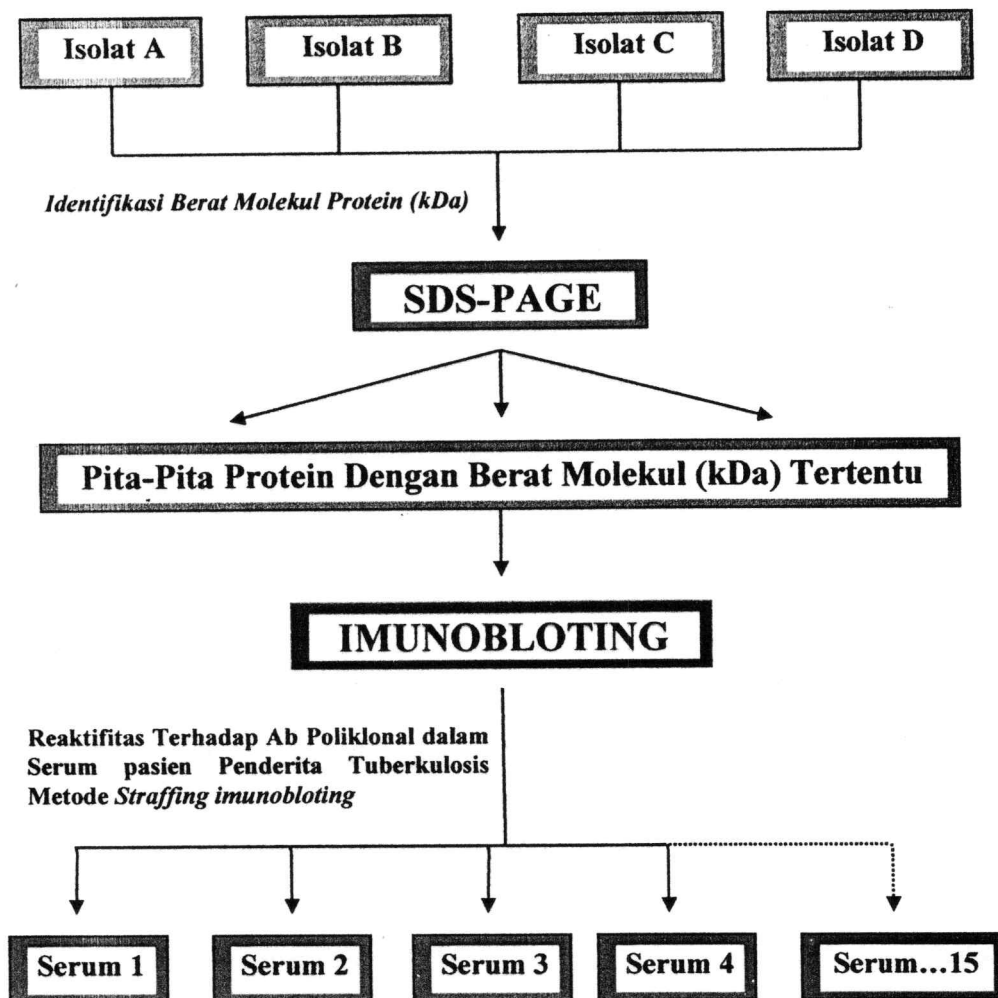
tuberkulosis akan terjadi reaksi berupa ikatan antigen-antibodi berupa pita (*band*) elektroforesis.

Reaksi ini merupakan reaksi yang spesifik. Protein yang berikatan dengan antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis ini merupakan protein antigenik dari *Mycobacterium tuberculosis*.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang berdasarkan penelitian *eksploratif* untuk mengidentifikasi dan reaktifitas protein subunit *outer membrane protein* (OMP) bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

tersebut adalah *Mycobacterium tuberculosis*. Isolat tersebut diberi label isolat A (H37Rv), isolat B, isolat C, dan isolat D (isolat klinis penderita tuberkulosis).

Antibodi poliklonal diperoleh dari 14 (empat belas) orang pasien penderita tuberkulosis, berupa serum penderita, sesuai kriteria inklusi di RS. Karang Tembok Surabaya. Dan 1 (satu) serum pasien penderita tuberkulosis dimana isolat klinisnya dijadikan sebagai bahan penelitian.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

Variabel penelitian adalah variabel mandiri yaitu protein antigenik dan antibodi poliklonal bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

4.3.1 Definisi Operasional Variabel

- a. Protein antigenik adalah fraksi luar (*Outer Membrane Protein/ OMP*) yang terdapat pada bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang paling bersifat antigenik dan berperan sebagai epitope dari kuman tersebut yang bereaksi dengan antibodi dalam serum penderita.
- b. Antibodi poliklonal adalah protein yang dihasilkan oleh organ limfoid primer penderita tuberkulosis akibat masuknya protein antigenik dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang bisa ditemukan dalam serum penderita.

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Bahan dan alat untuk pembuatan suspensi bakteri dan serum

- Isolat H37Rv, isolat klinis B, C, dan D.

- Darah lengkap (*whoole blood*) penderita tuberkulosis.
- NaCl fisiologis steril.
- PBS (*phosphate buffer saline*) steril.
- *Laminar flow*.
- Bunsen.
- Ose.
- Sentrifuge
- Tabung sentrifuge
- Botol sample (serum)

4.4.2 Bahan dan alat untuk pengukuran kadar protein bahan penelitian

- Bovine Serum Albumin.
- Suspensi isolat A, B, C, dan D.
- Standar protein.
- Spektrofotometer UV-1601 merek Shimadzu.
- Klinipet .
- Tabung reaksi.

4.4.3 Bahan dan alat untuk identifikasi protein antigenik

4.4.3.1 Bahan dan alat untuk pelaksanaan SDS-PAGE

- Suspensi isolat A, B, C, dan D.
- Buffer transblot.
- *Bovine Serum Albumin* (BSA)
- Kertas *Whatmann*.

- Fastblot
- Fast-red/Coomasine blue.
- Substrat.
- Bis-acrylamide.
- Tris.
- *Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel Electroforesis (SDS-PAGE).*
- *Tetramethyldiamine (TEMED).*
- Ammonium persulfate.
- Glycerol.
- Glycine.
- Coomasie blue.
- *Marker* protein (produksi Bio-Rad).
- Asam sitrat 10%.
- *Incubator shaker.*
- Ultracentrifus merek BeckmanTMLE-80K Produksi AS.
- *Waterbath.*
- *Refrigerated sentrifuge* merek Hitachi tipe Himac SCR 20 B .
- *Sonikator Ultrasonic homogenizer* tipe 4710 series, produksi Cole-Parmer Instrument Co. Chicago Illinois.
- *Shaker* model VRN-2000.

4.4.3.2 Bahan dan alat untuk pelaksanaan *western blotting* (*Strafing Immunobloting*)

- Gel PAGE yang mengandung protein

- Membran nitroselulose.
- Marker Rainbow (produksi Bio-Rad).
- Kertas Whatman.
- Tris.
- *Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel Electroforesis (SDS-PAGE)*.
- Glycine.
- TBS Tween 0,05%.
- Bovine Serum Albumin.
- Antibodi pasien penderita tuberkulosis.
- Substrat Phospatase BCIP / NBT (*5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-Phospatase/Nitroblue Tetrazolium*).
- Substrat.
- Substrat AEC (*Amino Ethil Carbazole*).
- NN Dimetil Formamid.
- 0,05 M Sodium Acetat *Buffer*.
- Fast-red/coomasine blue.
- H₂O₂.
- Cetakan dan *chamber* untuk SDS merek Biometra.
- *Power suplay* merek Bio-Rad.
- *Shaker* GFL.
- *Blotter* merek Biometra .
- *Cutter*.
- Plastik selofan

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium DHF *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga, Kampus C Mulyorejo Surabaya.

4.6.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan Juni 2007 sampai dengan bulan Januari 2008.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Suspensi *Mycobacterium tuberculosis*

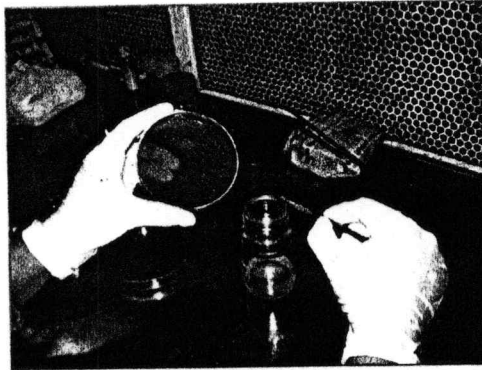
Dari hasil kultur kuman pada media Lowenstein Jansen, ditemukan tanda khas koloni *Mycobacterium tuberculosis* antara lain : koloni berwarna putih kekuning-kuningan, permukaan kering dan rapuh dengan tepi yang tidak beraturan (seperti bunga kol).

Tes Niacin pada semua isolat memberikan hasil (+), tes Katalase negatif, tes Nitrat positif, dan tes PNB negatif, sementara hasil tes resistensi OAT memberikan hasil sensitif untuk isolat A (H37Rv), dan negatif untuk isolat B, C, dan D (isolat klinis penderita tuberculosis).

Untuk pembuatan bahan penelitian, terlebih dahulu dilakukan pembuatan suspensi kuman dengan penambahan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) steril. Suspensi ini dapat langsung digunakan.

Pembuatan bahan ini dilakukan dengan memanen koloni *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan ose steril dan dilarutkan pada *Phosphat Buffer Saline*

(PBS) steril. Kemudian dihomogenisasi dengan shaker, hingga didapatkan suspensi bahan yang homogen.



Gambar 4.2 Pembuatan Suspensi *Mycobacterium tuberculosis*

4.7.2 Identifikasi *outer membrane protein (OMP) Mycobacterium tuberculosis*

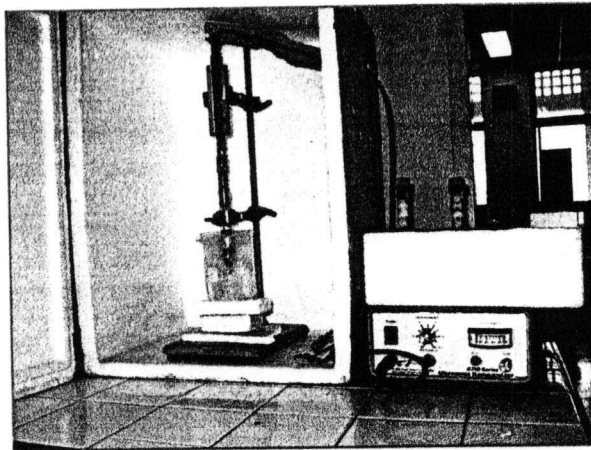
4.7.2.1 Persiapan Bahan

Sebelum dilakukan identifikasi protein membran luar (OMP), suspensi bakteri diperlakukan dengan buffer dan dilanjutkan sonikasi.

Sonikator yang dipakai adalah Ultrasonic Homogenizer tipe 4710/series, metode yang digunakan merupakan modifikasi caranya dengan kekuatan 20 kHz dan pemakaian 3 menit diikuti dengan istirahat 2 menit dan perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 kali. Setelah dilakukan sonikasi dilanjutkan dengan sentrifugasi lagi.

Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dan akan diperoleh pellet (dibuang) supernatant kemudian dilakukan ultrasentrifugasi dengan kecepatan 40.000 rpm selama 20 menit sehingga diperoleh pellet dan selanjutnya dilarutkan ke dalam 20 ml 2 % triton X/100 ditambah PBS sama

banyak dan diinkubasi pada 37⁰C selama 20 menit. Kemudian dilakukan ultrasentrifugasi ulang (40.000 rpm/4⁰C selama 20 menit), supernatan dibuang dan pellet dilarutkan dengan PBS untuk dilakukan ultrasentrifugasi lagi. Hasilnya supernatan (dibuang) sehingga diperoleh pellet yang kemudian dilarutkan dengan tabung eppendorf dan dilakukan vortex selama 30 detik, larutan ini merupakan protein solubel yang perlu diukur berat molekulnya.



Gambar 4.3 Pelaksanaan ultrasonikasi pada proses identifikasi protein *Mycobacterium tuberculosis*

4.7.2.2 Pengukuran Kadar Protein Bahan

Suspensi isolat *Mycobacterium tuberculosis* (bahan penelitian) sebelum diukur berat molekul diukur terlebih dulu kadar protein per ml dengan menggunakan alat spectrophotometer tipe UV 1601 merek Shimadzu dan protein standar memakai 4,38 gr% *Bovine Serum Albumin* (BSA). Dengan alat ini diketahui kadar kandungan proteinnya yang kemudian dapat dipakai sebagai ukuran pemakaian protein tersebut baik untuk SDS-PAGE, dan *western blotting*.



Gambar 4.4 Pengukuran kadar protein *Mycobacterium tuberculosis* dengan menggunakan spektrofotometer

4.7.2.3 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Poly acrilamide Gel Electrophoresis*)

Protein yang diperoleh dilakukan pengukuran berat molekul (BM) dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Poly acrilamide Gel Electrophoresis*) dengan kadar gel 10 %.

Pelaksanaan SDS-PAGE meliputi antara lain pembuatan stacking gel, separating gel, running gel, electrophoresis, washing dan staining. Pada running pada electrophoresis digunakan arus listrik 200 v kekuatan 100 mA.

Suspensi Bahan dimasukkan 10-20 μ l ke dalam *laemmli buffer* dengan perbandingan 1:2 di *ependrof*. Kemudian diberi lubang pada tutup *ependrof* dan dipanaskan dengan *waterbath* 100⁰ C selama 5 menit.

Disiapkan suspensi *acrylamide* yang disesuaikan dengan berat molekul protein yang akan dianalisis. Suspensi *acrylamide* dimasukkan ke dalam *glass plate* dan tunggu sampai mengeras (*separating gel*).

Sisir (*comb*) diangkat dengan hati-hati dan dicuci dengan larutan penyangga elektroforesis. Kemudian *glass plate* diletakkan pada *frame* dan

dimasukkan ke dalam *chamber* selanjutnya diisi dengan suspensi akrilamid sebagai stacking gel. Kemudian dimasukkan sisir tepat di atas gel diantara *glass plate* yang terisi oleh akrilamid dan dibiarkan sampai gel mengeras.

Pada bak elektroforesis diisi *running buffer* dan sample dimasukkan pada sumuran kolom sebanyak 20 ml. Sebelumnya sampel dilarutkan dalam RSB (*resolving sample buffer*) dan dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit. Elektroforesis (*running*) dijalankan pada kondisi voltase 200 V, 100 mA, selama 1-2 jam. Kemudian diwarnai dengan fast-red.



Gambar 4.5 Elektroforesis protein *Mycobacterium tuberculosis*

4.7.3 Reaktifitas *outer membrane protein* (OMP) *Mycobacterium tuberculosis* terhadap antibodi poliklonal penderita tuberkulosis dengan metode *strafing imunobloting*.

Protein yang diperoleh ditransfer ke membran nitroselulose dan dilakukan *strafing imunobloting* dengan antibodi poliklonal (*Western Blotting*), maka hasilnya akan didapat protein yang spesifik dengan cara sebagai berikut :

Gel yang mengandung fragmen protein yang terpisah berdasarkan berat molekulnya dilepas dari *glass plate*. Kemudian disusun lima kertas *Whatmann* yang dipotong dengan ukuran 10 x 12 cm di basahi dengan *buffer transblot*.

Diletakkan gel PAGE di atas kertas *Whatmann* dan ratakan, sehingga tidak ada udara di bawah gel. Kemudian ditaruh membran nitroselulosa di atas gel dan ratakan sehingga dibawah membran bebas udara.

Diletakkan lima potong kertas *Whatmann* di atas membran nitroselulosa yang telah dibasahi dengan *buffer transblot*. Kemudian *fastblot* ditutup dan disesuaikan arus listrik positif dan negative, dinyalakan dan diatur miliamper (mA) dan voltasenya, proses transfer protein ini akan memakan waktu 1 jam 30 menit.

Membran yang mengandung fragmen protein kemudian dicuci tiga kali dengan *washing buffer*, dan digoyang dengan shaker. Membran nitroselulosa di blok dengan *bovine serum albumin* (BSA) 1 % dan digoyangkan dengan shaker dalam kecepatan 30.

Membran nitroselulosa dicuci dengan *washing buffer* tiga kali dan direaksikan dengan antibodi pertama dengan pengenceran 1:10, kemudian digoyang dengan shaker selama 30 menit.

Membran nitroselulosa dicuci kembali dengan *washing buffer* tiga kali kemudian direaksikan dengan antibodi kedua atau konjugat dengan pengenceran 1:1000.

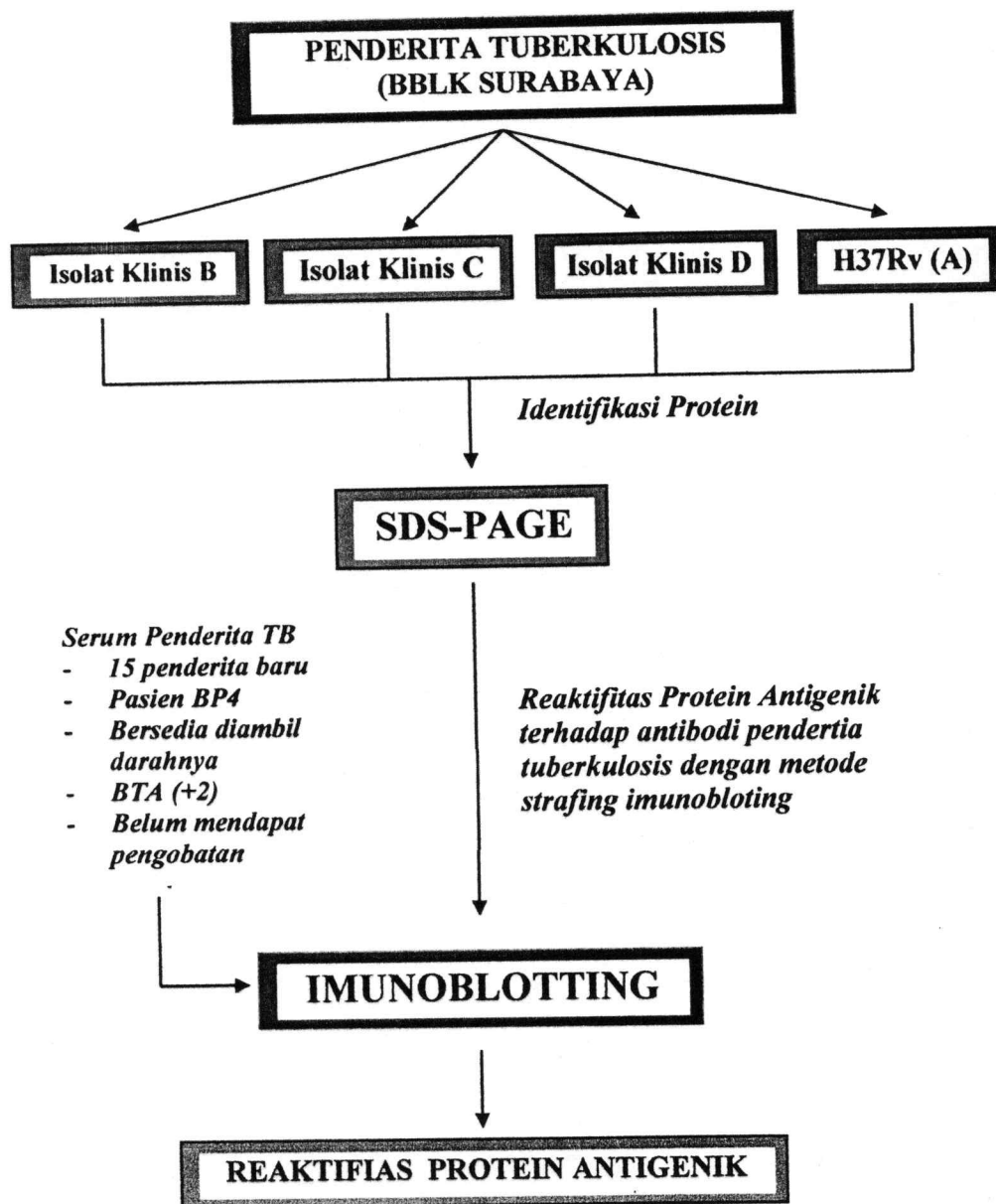
Membran nitroselulosa dicuci lagi dengan *washing buffer* sampai tiga kali, kemudian divisualisasikan dengan pewarnaan *fast-red* dan digoyangkan dengan shaker secara horizontal sampai timbul warna. Jika warna sudah kuat maka

stoplah dengan cara mengangkat membran dan keringkan dengan udara. Simpan membran nitroselulosa yang terlihat ada pitaanya (*band*) sebagai dokumen.

4.8 Teknik Analisis Data

Pengamatan hasil penelitian dicatat dan ditabulasikan, kemudian dihitung berat molekul protein hasil elektroforesis terhadap isolat A, B, C, dan D. Termasuk berat molekul hasil rekatifitas antibodi poliklonal sampel 1-15 terhadap isolat A, B, C, dan D. Hasil berat molekul yang diperoleh di buatkan tabel distribusi frekuensi kemunculannya terhadap hasil isolasi dan karakterisasi protein antigenik bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.

4.9 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.6 Alur Kerja Penelitian

BAB V HASIL PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan terhadap empat isolat yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya. Terdiri atas satu isolat H37Rv yang diberi kode isolat A, dan 3 (tiga) isolat klinis yang berasal dari biakan (kultur) bahan sputum penderita tuberkulosis, diberi kode isolat B, C, dan D.

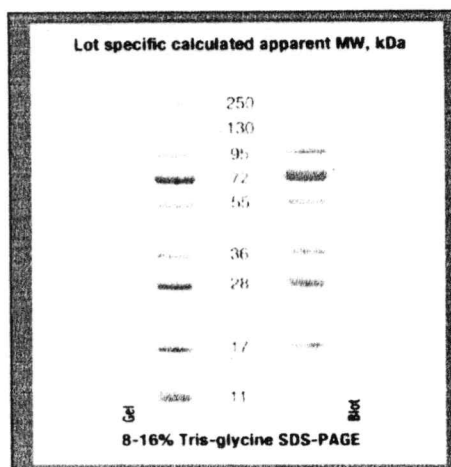
Antibodi poliklonal diperoleh dari serum penderita tuberkulosis baru dengan hasil pemeriksaan mikroskopis BTA minimal (+2). Berasal dari pasien yang memeriksakan diri di RS. Karang Tembok Surabaya sebanyak 14 penderita. Dan satu serum penderita yang isolat klinisnya digunakan sebagai bahan penelitian.

Sampel penelitian (antibodi poliklonal) ini terdiri dari 8 (delapan) orang laki-laki dan 7 (tujuh) orang perempuan. Kisaran umur pada sampel penelitian laki-laki 27-55 tahun, sedang pada perempuan kisaran umurnya 24-40 tahun, dengan status klinis pasien (BTA) 53,3 % (+3) dan 46,7 % (+2).

5.1 Identifikasi Protein Isolat A, B, C, dan D

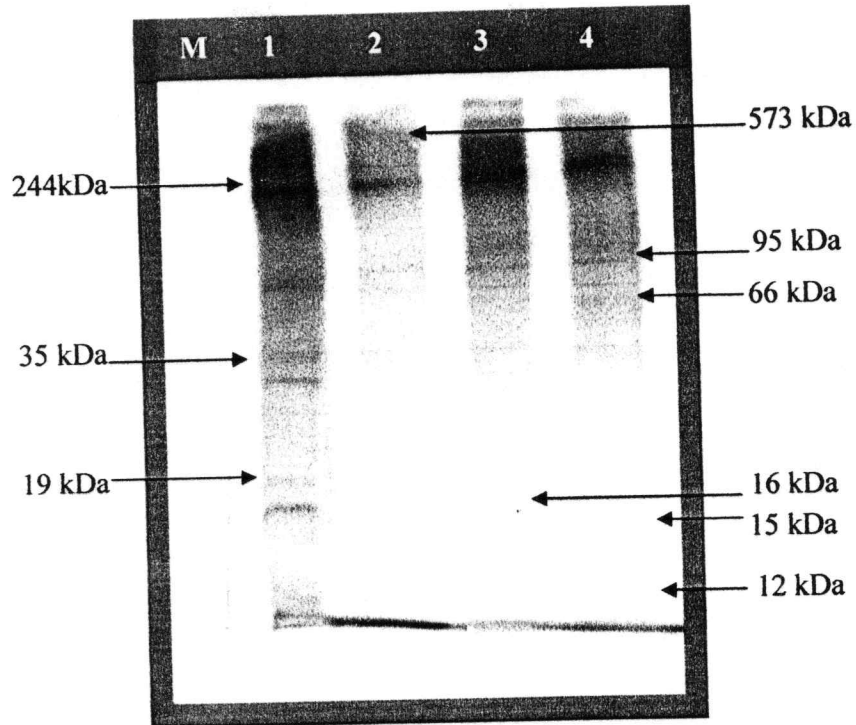
Pemeriksaan kadar protein yang terkandung dalam isolat A, B, C, dan D per ml menggunakan *spectrophotometer* tipe UV 1601 merek Shimadzu dan protein standar 4,38 gr% *bovine serum albumin* (BSA), diperoleh kandungan protein 2,6 gr% untuk isolat A; 1,9 gr% untuk isolat B; 3,01 gr% untuk isolat C; dan 2,7 gr% untuk isolat D. Kadar protein yang diperoleh tersebut menunjukkan kondisi yang baik untuk SDS-PAGE, dan *immunoblotting*.

Berat molekul (BM) standar (*marker*) dalam penelitian ini menggunakan nilai berat molekul mulai dari 11 kDa sampai 250 kDa menggunakan 8-16 % Tris-glycine SDA-PAGE, seperti terlihat pada gambar 5.1 berikut :



Gambar 5.1 Berat Molekul Standar (*marker*) yang digunakan dalam penelitian menggunakan 8-16 % Tris-glycine SDS-PAGE

Identifikasi berat molekul protein menggunakan prosedur SDS-PAGE yang dilakukan terhadap isolat A, B, C, dan D terhadap berat molekul standar (*marker*) seperti pada gambar 5.1 diatas, diperoleh berat molekul protein yang terekspresi pada isolat A (H37RV) sebanyak 14 protein, yaitu 573 kDa, 244 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 66 kDa, 44 kDa, 41 kDa, 35 kDa, 29 kDa, 23 kDa, 19 kDa, 16 kDa, 15 kDa, dan 12 kDa. Pada isolat B diperoleh 6 protein, yaitu 573 kDa, 244 kDa, dan 95 kDa, 35 kDa, 19 kDa, dan 16 kDa. Pada isolat C ditemukan 10 protein, yaitu 573 kDa, 275 kDa, 142 kDa, 128 kDa, 95 kDa, 66 kDa, 35 kDa, 19 kDa, 16 kDa, dan 12 kDa. Sementara pada isolat D ditemukan protein sebanyak 10, yaitu 501 kDa, 308 kDa, 115 kDa, 95 kDa, 66 kDa, 26 kDa, 19 kDa, 17 kDa, 15 kDa, dan 12 kDa. Secara jelas dapat divisualisasikan pada gambar 5.2 berikut :



Gambar 5.2 Ekspresi berat molekul isolat A, B, C, dan D terhadap protein marker pada SDS-PAGE

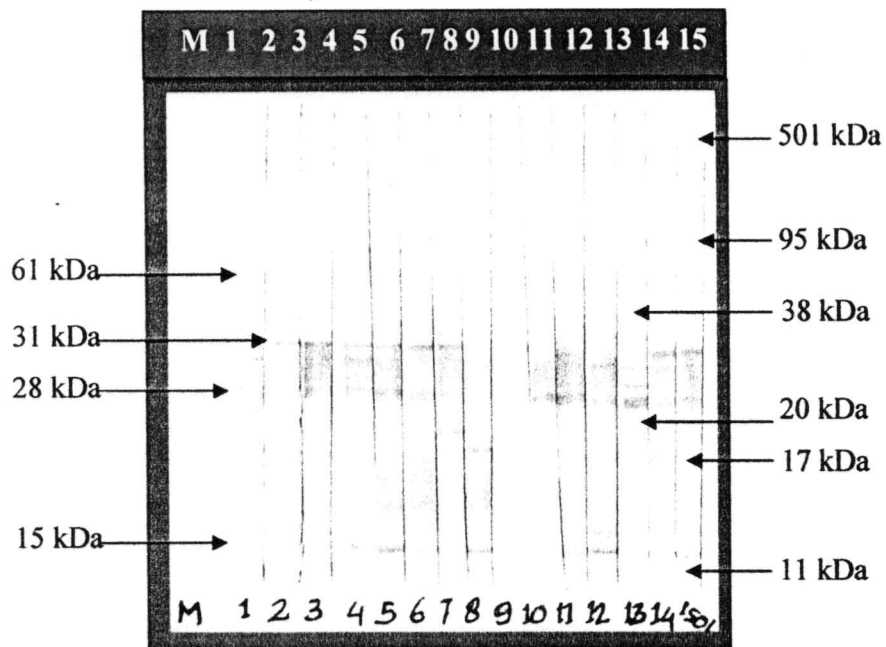
Dari gambar 5.2 diatas, terlihat berat molekul yang dominan muncul pada SDS-PAGE antara lain protein dengan berat molekul 12 kDa, 15 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 35 kDa, 66 kDa, 95 kDa, dan 244 kDa. Secara lebih lengkap dapat dilihat pada tabel 5.1 berikut :

Tabel 5.1 Berat molekul isolat A, B, C, dan D (*dominan*) yang muncul terhadap protein marker

Berat Molekul Isolat A, B, C, dan D Terhadap Marker			
Isolat A	Isolat B	Isolat C	Isolat D
244	244	244	244
95	95	95	95
66	-	66	66
35	35	35	35
19	19	19	19
16	16	16	16
15	-	15	15
12	-	12	12

5.2 Reaktivitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Pada pengukuran reaktivitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis diperoleh sebanyak 13 protein pada sampel 1; sampel 2 sebanyak 10 protein; sampel 3 sebanyak 12 protein; sampel 4 sebanyak 14 protein; sampel 5 sebanyak 15 protein; sampel 6 sebanyak 12 protein; sampel 7 sebanyak 9 protein; sampel 8 sebanyak 9 protein; sampel 9 sebanyak 15 protein; sampel 10 sebanyak 12 protein; sampel 11 sebanyak 15 protein; sampel 12 sebanyak 16 protein; sampel 13 sebanyak 16 protein; sampel 14 sebanyak 15 protein; dan sampel 15 sebanyak 14 protein; seperti divisualisasikan dalam gambar 5.3 berikut :



Gambar 5.3 Reaktivitas berat molekul protein isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

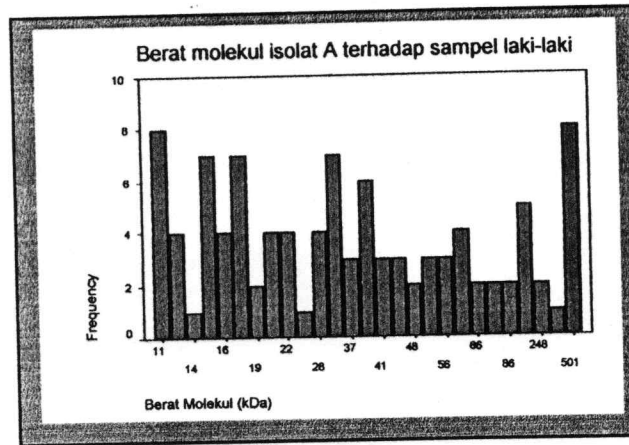
Dari gambar 5.3 diatas, terlihat reaktifitas berat molekul protein isolat A terhadap 15 antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis yang dominan muncul diantaranya protein dengan berat molekul 11 kDa, 15 kDa, 17 kDa, 20 kDa, 28 kDa, 31 kDa, 38 kDa, 61 kDa, 95 kDa, dan 501 kDa. Hal ini juga dapat terlihat pada tabel 5.2 berikut :

Tabel 5.2 Reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat A (*dominan*) terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Serum penderita tuberculosis														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501
-	-	-	95	95	95	-	95	95	-	95	95	95	95	95
61	61	61	-	61	61	-	-	61	-	61	-	61	-	-
38	38	38	38	38	-	-	-	38	-	38	-	-	38	-
31	31	31	31	31	31	31	-	31	-	31	-	-	31	31
28	-	-	28	-	-	-	-	28	-	28	28	28	28	28
20	-	20	-	20	20	-	-	20	20	-	20	20	20	-
17	17	17	-	-	-	17	17	17	17	17	17	-	17	17
15	15	15	15	15	15	-	15	15	15	15	15	15	15	15
11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11

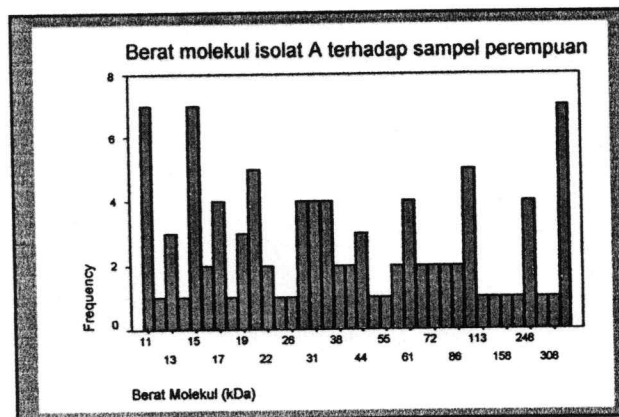
Dari tabel 5.2 diatas terlihat reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis adalah protein dengan berat molekul 11 kDa sebanyak 15 kali atau 100 %, protein 15 kDa sebanyak 14 kali atau 93,3 %, protein 17 kDa sebanyak 11 kali atau 73,3 %, protein 20 kDa sebanyak 9 kali atau 60 %, protein 28 kDa sebanyak 8 kali atau 53,3 %, protein 31 kDa sebanyak 11 kali atau 73,3 %, protein 38 kDa sebanyak 8 kali atau 53,3 %, protein 61 kDa sebanyak 8 kali atau 53,3 %, protein 95 kDa sebanyak 10 kali atau 66,7 %, dan protein 501 kDa sebanyak 15 kali atau 100 %.

Ada beberapa protein pada isolat A yang kemunculannya hanya pada sampel dengan jenis kelamin tertentu, namun tidak ditemukan pada sampel dengan jenis kelamin sebaliknya, seperti terlihat pada gambar 5.4 dan 5.5 berikut :



Gambar 5.4 Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis laki-laki.

Dari gambar 5.3 diatas, diperoleh reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis laki-laki adalah protein dengan berat molekul 308 kDa.

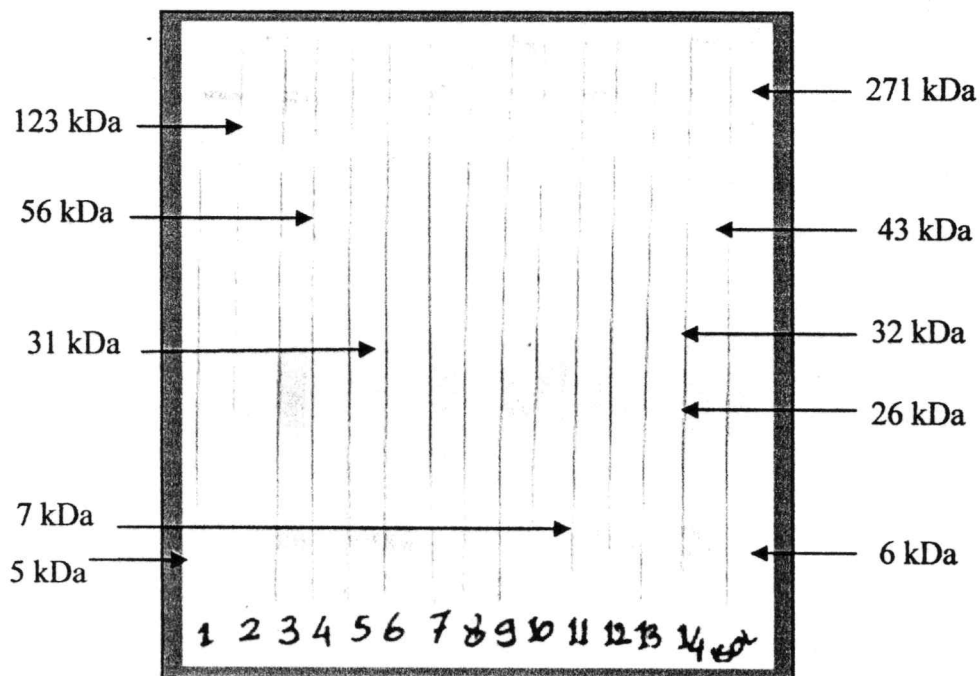


Gambar 5.5 Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis perempuan.

Dari gambar 5.4 diatas, diperoleh reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis perempuan adalah protein dengan berat molekul 18 kDa, 24 kDa, 113 kDa, dan 218 kDa.

5.3 Reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Pada pengukuran reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis diperoleh sebanyak 4 protein pada sampel 1; 4 pada sampel 2; 7 pada sampel 3; 7 pada sampel 4; 4 pada sampel 5; 5 pada sampel 6; 4 pada sampel 7; 3 pada sampel 8; 6 pada sampel 9; 2 pada sampel 10; 4 pada sampel 11; 5 pada sampel 12; 6 pada sampel 13; 15 pada sampel 14; dan 5 protein pada sampel 15.



Gambar 5.6 Reaktifitas berat molekul protein isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis.

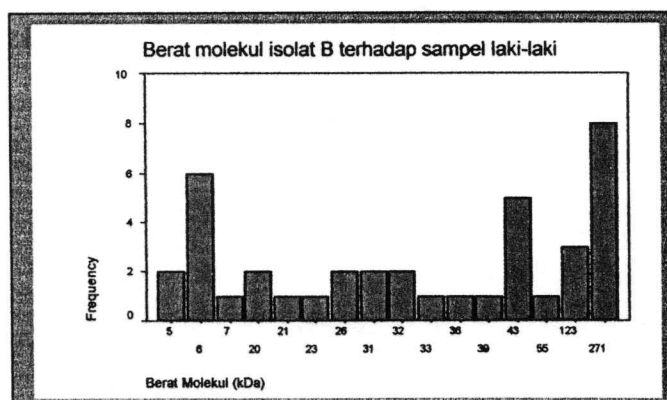
Dari gambar 5.6 diatas, terlihat reaktifitas berat molekul protein isolat B terhadap 15 antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis yang dominan muncul diantaranya protein dengan berat molekul 6 kDa dan protein 271 kDa. Hal ini juga dapat terlihat pada tabel 5.3 berikut :

Tabel 5.3 Reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat B (*dominan*) terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Serum penderita tuberkulosis														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271
6	-	6	6	6	6	-	6	6	-	6	6	6	6	6

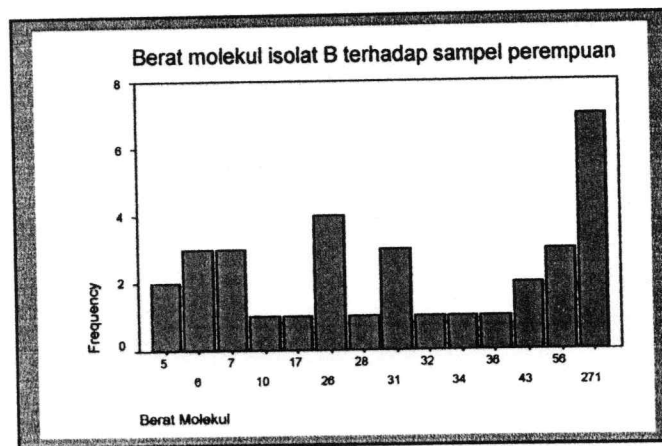
Dari tabel 5.3 diatas, terlihat reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis adalah protein dengan berat molekul 6 kDa sebanyak 9 kali atau 60 %, dan protein 271 kDa sebanyak 15 kali atau 100 %.

Ada beberapa protein pada isolat B yang kemunculannya hanya pada sampel dengan jenis kelamin tertentu, namun tidak ditemukan pada sampel dengan jenis kelamin sebaliknya, seperti terlihat pada gambar 5.7 dan 5.8 berikut :



Gambar 5.7 Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis laki-laki.

Dari gambar 5.7 diatas, diperoleh reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis laki-laki adalah protein dengan berat molekul 20 kDa, 21 kDa, 23 kDa, 33 kDa, 36 kDa, 55 kDa, dan 123 kDa.



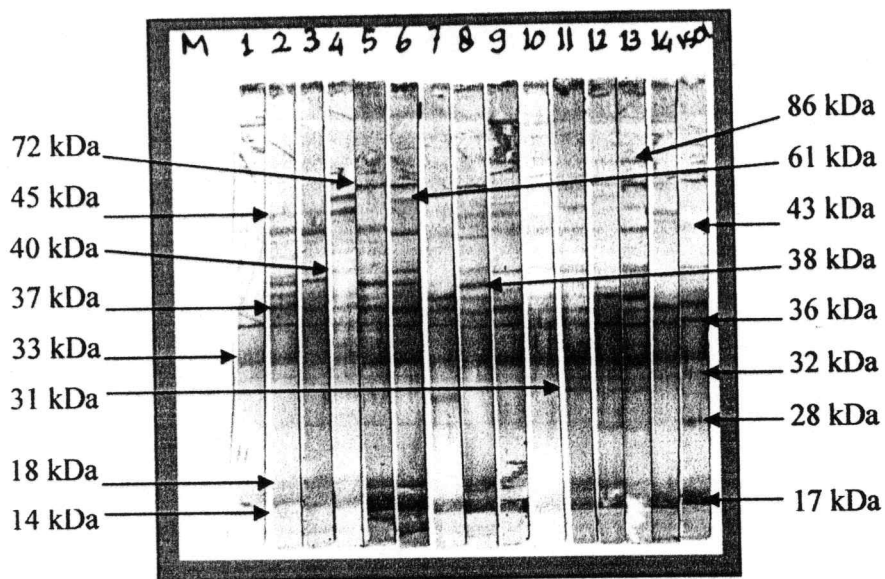
Gambar 5.8 Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis perempuan.

Dari gambar 5.8 diatas, diperoleh reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis perempuan adalah protein dengan berat molekul 28 kDa, dan 56 kDa.

5.4 Reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Pada pengukuran reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis diperoleh sebanyak 11 protein pada sampel 1; sampel 2 sebanyak 17 protein; sampel 3 sebanyak 14 protein; sampel 4 sebanyak 16 protein; sampel 5 sebanyak

15 protein; sampel 6 sebanyak 15 protein; sampel 7 sebanyak 13 protein; sampel 8 sebanyak 16 protein; sampel 9 sebanyak 15 protein; sampel 10 sebanyak 14 protein; sampel 11 sebanyak 18 protein; sampel 12 sebanyak 14 protein; sampel 13 sebanyak 17 protein; sampel 14 sebanyak 16 protein; dan sampel 15 sebanyak 12 protein; seperti divisualisasikan dalam gambar 5.8 berikut :



Gambar 5.9 Reaktifitas berat molekul protein isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis.

Dari gambar 5.8 diatas, terlihat reaktifitas berat molekul protein isolat C terhadap 15 antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis yang dominan muncul diantaranya protein dengan berat molekul 14 kDa, 18 kDa, 28 kDa, 32 kDa, 33 kDa, 36 kDa, 37 kDa, 38 kDa, 40 kDa, 43 kDa, 45 kDa, 61 kDa, 95 kDa, dan protein 499 kDa. Hal ini juga dapat terlihat pada tabel 5.4 berikut :

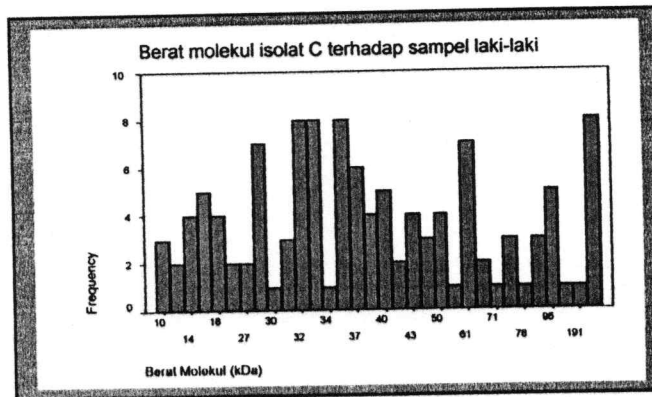
Tabel 5.4 Reaktivitas berat molekul protein (kDa) pada isolat C (*dominan*) terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Serum penderita tuberkulosis														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
499	499	499	499	499	499	499	499	499	499	499	499	499	499	499
-	-	-	95	95	95	95	95	95	95	95	-	95	-	-
-	61	61	61	61	61	61	61	61	61	61	61	61	61	61
-	-	-	-	-	45	-	45	45	45	45	45	45	45	45
-	43	43	43	43	43	-	-	-	-	43	43	-	-	43
40	-	-	-	40	40	-	40	40	-	40	40	40	40	-
-	-	-	-	-	-	38	38	38	38	38	38	38	38	38
-	37	37	37	37	37	37	37	-	37	37	37	37	-	-
36	-	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
28	28	28	28	28	-	-	28	28	28	28	-	28	28	28
-	-	-	-	18	18	-	18	18	18	18	18	18	18	18
-	-	-	-	-	14	14	14	14	14	14	14	14	14	-

Dari tabel 5.4 diatas, terlihat reaktivitas berat molekul protein (kDa) pada isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis adalah protein dengan berat molekul 14 kDa sebanyak 9 kali atau 60 %, protein 18 kDa sebanyak 10 kali atau 66,7 %, protein 28 kDa sebanyak 12 kali atau 80 %, protein 32 kDa sebanyak 15 kali atau 100 %, protein 33 kDa sebanyak 15 kali atau 100 %, protein 36 kDa sebanyak 14 kali atau 93,3 %, protein 37 kDa sebanyak 11 kali atau 73,3 %, protein 38 kDa sebanyak 9 kali atau 60 %, protein 40 kDa sebanyak 9 kali atau 60 %, protein 43 kDa sebanyak 8 kali atau 53,3 %, protein 45 kDa sebanyak 9 kali atau 60 %, protein 61 kDa sebanyak 14 kali atau 93,3 %, protein 95 kDa sebanyak 9 kali atau 60 %, dan protein 499 kDa sebanyak 15 kali atau 100 %.

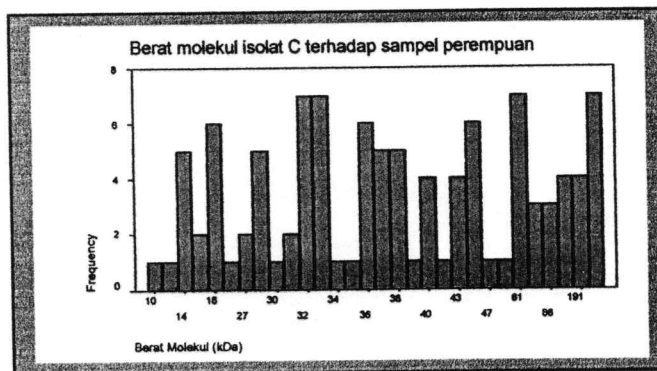
Ada beberapa protein pada isolat C yang kemunculannya hanya pada sampel dengan jenis kelamin tertentu, namun tidak ditemukan pada sampel

dengan jenis kelamin sebaliknya, seperti terlihat pada gambar 5.10 dan 5.11 berikut :



Gambar 5.10 Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberculosis laki-laki.

Dari gambar 5.10 diatas, diperoleh reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberculosis laki-laki adalah protein dengan berat molekul 13 kDa, 53 kDa, 65 kDa, 71 kDa, 78 kDa, dan 142 kDa.

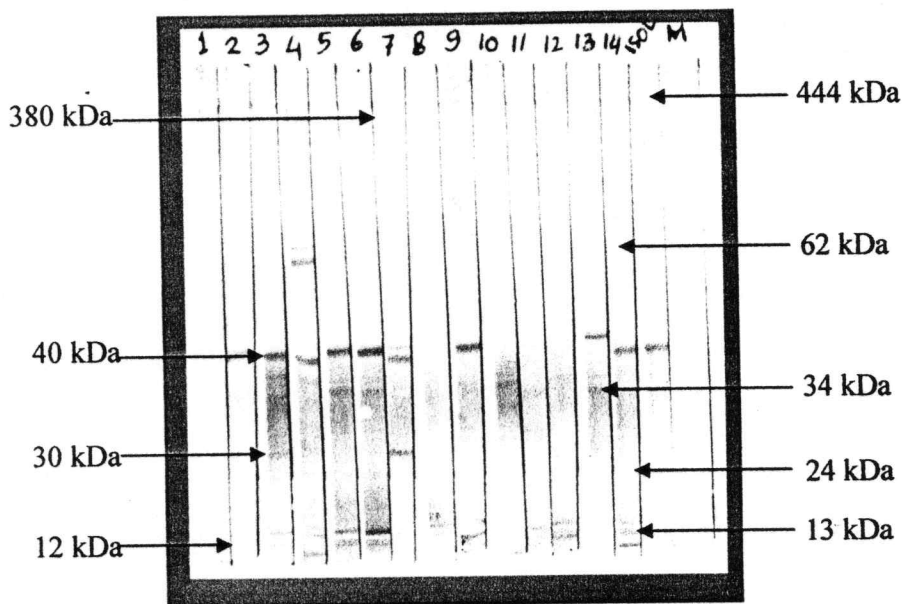


Gambar 5.11 Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberculosis perempuan.

Dari gambar 5.11 diatas, diperoleh reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis perempuan adalah protein dengan berat molekul 39 kDa, dan 47 kDa.

5.5 Reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Pada pengukuran reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis diperoleh sebanyak 4 protein pada sampel 1; 6 pada sampel 2; 12 pada sampel 3; 8 pada sampel 4; 8 pada sampel 5; 10 pada sampel 6; 7 pada sampel 7; 7 pada sampel 8; 10 pada sampel 9; 7 pada sampel 10; 9 pada sampel 11; 6 pada sampel 12; 11 pada sampel 13; 7 pada sampel 14; dan sampel 15 sebanyak 5 protein; seperti divisualisasikan dalam gambar 5.12 berikut :



Gambar 5.12 Reaktifitas berat molekul protein isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis.

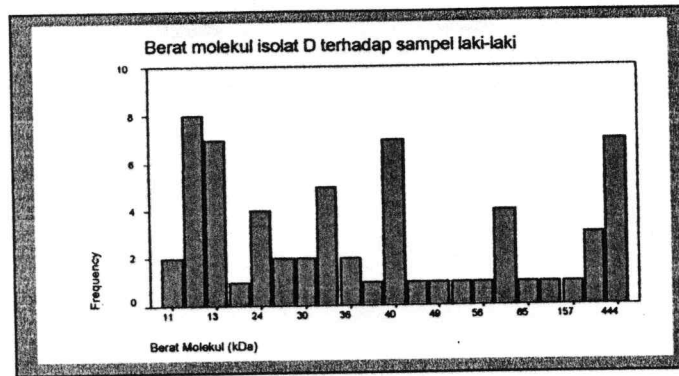
Dari gambar 5.11 diatas, terlihat reaktifitas berat molekul protein isolat D terhadap 15 antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis yang dominan muncul diantaranya protein dengan berat molekul 12 kDa, 13 kDa, 34 kDa, 40 kDa, dan 444 kDa. Hal ini juga dapat terlihat pada tabel 5.5 berikut :

Tabel 5.5 Reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat D (*dominan*) terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Serum penderita tuberculosis														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	-	-	444
-	40	40	40	40	40	40	40	40	-	40	-	40	40	40
34	34	34	-	34	34	-	-	34	34	34	-	34	34	-
-	13	13	13	13	13	13	13	13	-	13	13	13	13	13
12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

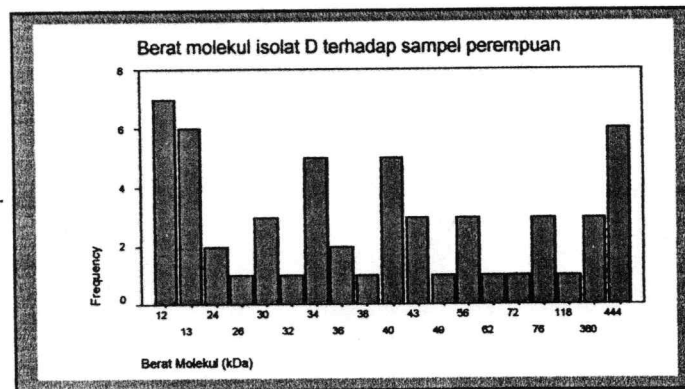
Dari tabel 5.4 diatas, terlihat reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis adalah protein dengan berat molekul 12 kDa sebanyak 15 kali atau 100 %, protein 13 kDa sebanyak 13 kali atau 86,7 %, protein 34 kDa sebanyak 10 kali atau 66,7 %, protein 40 kDa sebanyak 12 kali atau 80 %, dan 444 kDa sebanyak 13 kali atau 86,7 %.

Seperti halnya pada isolate A, B, dan C, ditemukan beberapa protein pada isolat D yang kemunculannya hanya pada sampel dengan jenis kelamin tertentu, namun tidak ditemukan pada sampel dengan jenis kelamin sebaliknya, seperti terlihat pada gambar 5.13 dan 5.14 berikut :



Gambar 5.13 Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis laki-laki.

Dari gambar 5.13 diatas, diperoleh reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis laki-laki adalah protein dengan berat molekul 11 kDa, 23 kDa, 49 kDa, 52 kDa, dan 157 kDa.



Gambar 5.14 Kemunculan berat molekul protein (kDa) pada isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum penderita tuberkulosis perempuan.

Dari gambar 5.14 diatas, diperoleh reaktifitas berat molekul protein (kDa) pada isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis perempuan adalah protein dengan berat molekul 32 kDa, 72 kDa, dan 118 kDa.

BAB VI PEMBAHASAN

6.1 Identifikasi Protein Isolat A, B, C, dan D

Teknik SDS-PAGE merupakan langkah lanjutan untuk mengetahui protein spesifik dengan berat molekul tertentu. Dalam penelitian ini diperoleh gambaran SDS-PAGE berupa beberapa *band* tebal yang dimiliki oleh OMP *Mycobacterium tuberculosis*, yang berada di sekitar protein *marker* berat molekul 250 kDa. Setelah dilakukan penghitungan ternyata *band* tersebut mempunyai berat molekul 244 kDa. *Band* juga ditemukan disekitar protein *marker* 95 kDa, setelah dilakukan perhitungan ternyata *band* tersebut mempunyai berat molekul 95 kDa.

Sementara *band* yang ditemukan disekitar protein *marker* 72 kDa, setelah dihitung *band* tersebut mempunyai berat molekul 66 kDa. *Band* yang ditemukan disekitar protein *marker* 36 kDa ternyata mempunyai berat molekul 35 kDa. Sedangkan *band* yang ditemukan disekitar protein *marker* 11 kDa - 17 kDa, setelah dilakukan perhitungan mempunyai berat molekul 12 kDa, 15 kDa, 16 kDa, dan 19 kDa.

Perbedaan hasil penghitungan berat molekul pada hasil penelitian ini bisa disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya : kondisi *acrilamid* (lama atau baru); persentase *acrilamid*; pH *Tris Hcl* (8,8 atau 8,6); dan kekuatan *power* suplay. Faktor-faktor tersebut sangat mempengaruhi *running* protein pada proses elektroforesis (Widjajanto, 2003).

Keberagaman hasil isolasi protein dengan SDS-PAGE ini bisa difahami, karena menurut Cole ST, Brosch R, Parkhill J, *et al.*, 1998. Menerangkan bahwa

genom bakteri *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai kemampuan mengekspresikan lebih kurang 4.000 protein

Berat molekul yang dominan muncul pada SDS-PAGE antara lain protein dengan berat molekul 12 kDa, 15 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 35 kDa, 66 kDa, 95 kDa, dan 244 kDa.

Berat molekul yang diperoleh dari SDS-PAGE ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh GH Bothamley, *et al.*, 1992. dalam penelitiannya yang berjudul "*Clinical Value of the Measurement of Mycobacterium tuberculosis Spesific Antibody in Pulmonary tuberculosis.*" Terutama untuk protein dengan berat molekul 19 kDa, 35 kDa, dan 66 kDa. Suatu serological test yang bisa membantu ke arah diagnosis tuberkulosis menggunakan titer antigen kuman *Mycobacterium tuberculosis* yang berbeda, antara lain 38 kDa, 19 kDa, ML 34 epitope, dan hsp 65. Dari penelitian ini diperoleh kesimpulan, bahwa antigen atau epitope spesifik bisa membantu dalam hasil diagnosa, penilaian ramalan, dan monitoring kemoterapi pada pasien dengan tuberkulosis paru-paru.

Dalam penelitian lain, Shinnick TM, 1987. "*The 65-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis,*" menemukan protein yang sama, yaitu 65 kDa. Dimana protein 65-kilodalton (kDa) yang telah dikenali sebagai salah satu antigen yang penting pada *Mycobacterium tuberculosis*. Gen yang menyandi antigen ini terisolasi dari suatu lamda gt11- *Mycobacterium tuberculosis*. Urutan nucleotida gen ini ditemukan sebagai 540-amino-acid. Urutan ini menunjukkan hubungan dengan antigen 65-kDa yang membentuk suatu plasmid. Protein yang dihasilkan bereaksi secara rinci dengan protein anti-65-kDa.

Protein 19 kDa yang ditemukan pada hasil SDS-PAGE, mempunyai kesamaan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Nahid Mohaghehpour, *et al.*, 1998. "*CTL Response to Mycobacterium tuberculosis: Identification of an Immunogenic Epitope in the 19-kDa Lipoprotein*," Studi ini menggunakan pengetahuan tentang HLA-A binding pada pengujian kadar logam yang *peptide-binding immunofluorescence-based* untuk menyaring potensi epitope HLA-A yang terdapat di 19-kDa lipoprotein *Mycobacterium tuberculosis* (M.Tb19). Sel T CD8+ diperoleh dari HLA-A1+ pasien dengan tuberkulosis aktif seperti pada vaksin TBC. Hasil menunjukkan suatu Peptide yang terdiri atas residu 88 dan 97 M.Tb19 (P88-97). CTL yang dibentuk spesifik untuk P88-97 menunjukkan *lyse autologous monocytes* terkena infeksi/tersebar oleh H37Ra. Hasil ini menunjukkan M.Tb19 itu menimbulkan kelas HLA yang *I-restricted* CTLs pada in vitro dan pada in vivo. Epitope jenis ini bermanfaat dalam perancangan suatu vaksin tuberkulosis.

Dalam penelitian sejenis yang dilakukan oleh Sarwo Handayani, 2002. "*Karakteristik protein antigen M.tuberculosis multi resisten Obat anti Tuberculosis degan cara imunobloting menggunakan serum pasien TB*," juga ditemukan protein dengan berat molekul 70 kDa. Dimana karakteristik protein dilakukan dengan cara imunobloting ditemukan tidak adanya perbedaan antara kedua protein antigen kuman tersebut, karena hanya terlihat satu pita protein yang dengan berat molekul 70 kDa. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh karena protein belum terpisah dengan baik, sehingga hanya terlihat satu pita protein saja, kadar protein yang diperoleh rendah, isolasi belum sempurna atau adanya protein yang rusak selama proses ekstraksi sehingga protein tersebut tidak tampak.

Untuk protein dengan berat molekul 12 kDa, 15 kDa, 16 kDa, 95 kDa, dan 244 kDa yang dominan muncul pada SDS-PAGE mungkin merupakan protein yang khas untuk *outer membrane protein* (OMP) bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang terdapat pada pasien penderita tuberkulosis Rumah Sakit Karang Tembok Surabaya.

6.2 Reaktifitas berat molekul protein antigenik (kDa) isolat A, B, C, dan D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Karakterisasi selanjutnya adalah *western blotting*. Pada tahap ini dapat diketahui reaktifitas protein antigenik yang dapat berikatan dengan antibodi. Hasil *blotting* pada penelitian ini dengan menggunakan bahan antigen protein spesifik dengan antibodi poliklonal menunjukkan reaksi yang jelas. Ini berarti terjadi reaksi pengikatan antara antigen dengan antibodi yang homolog. Reaksi demikian menunjukkan bahwa respons imun yang ditimbulkan oleh tubuh penderita dalam membentuk antibodi adalah akibat reaksi dari antigen sebagai benda asing yang spesifik.

Dari hasil *western blotting* pada isolat A, dapat diketahui bahwa protein dengan berat molekul 11 kDa, 15 kDa, 17 kDa, 20 kDa, 28 kDa, 31 kDa, 38 kDa, 61 kDa, 95 kDa yang tampak sebagai *band* yang tebal pada hasil SDS-PAGE, juga tercetak tebal di lebih dari 50 % semua reaksi protein OMP *Mycobacterium tuberculosis* dengan antibodi poliklonal dari 15 serum penderita tuberkulosis.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Borremans M, 1989 terutama untuk protein dengan berat molekul 32 kDa. Dalam penelitiannya "*Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein*

gene of Mycobacterium tuberculosis," menguraikan identifikasi dari gen yang menyandi suatu immunodominant 32-kDa dari *Mycobacterium tuberculosis*. Antigen 32-kDa dengan berlimpah dikeluarkan ke dalam kultur. Hasil recombinan klon memperlihatkan suatu 140 atau 125-kDa beta-galactosidase hasil pelepasan protein yang reaktif dengan antigen polyclonal kelinci anti-32 kDa serum yang dideteksi. Perbandingan *Mycobacterium tuberculosis* antigen 32-kDa dengan *Mycobacterium bovis* BCG alpha-antigen yang ditemukan 73.8% homolog antar urutan DNA dan 72.8% homolog antar urutan asam amino. Pelepasan protein 140-kDa bisa dengan untuk manusia yang terinfeksi tuberkulosis. Hasil ini mengkonfirmasi temuan sebelumnya antigen 32-kDa bisa digunakan sebagai alat berharga untuk diagnosis serologi pada penderita tuberkulosis. Lebih dari itu, ketersediaan protein recombinant membuka perspektif untuk lokalisasi relevan B- dan T-Cell epitope daerah pada antigen 32-kDa.

Protein lain yang muncul di semua reaksi protein (kurang dari 50 %) dengan antibodi poliklonal adalah protein dengan berat molekul 12 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 22 kDa, 37 kDa, 41 kDa, 44 kDa, 55 kDa, 56 kDa, 66 kDa, 72 kDa, 86 kDa, 95 kDa, dan 248 kDa.

Hasil ini agak berbeda dengan pendapat Bothamley GH, (1995) kecuali untuk protein dengan berat molekul 38 kDa, bahwa antigen yang telah dievaluasi melalui beberapa penelitian yang berbeda termasuk pemurnian turunan protein, sonikasi mikobakterial, glikolipid mikobakterial, antigen 38 kDa, α -kristalin 16 kDa, 45/47 kDa antigen MPT32, antigen 85A, antigen 85B, antigen A60, Kp 90, dan Lipoarabinomannan, merupakan pengembangan diagnosis serologis pada tuberkulosis aktif. Namun untuk protein dengan berat molekul 38 kDa yang

ditemukan pada isolat A mempunyai arti lain, karena antigen dengan berat molekul 38 kDa merupakan protein *Mycobacterium tuberculosis* yang paling sering dipelajari dalam diagnosis serologis penderita tuberculosis (Bothamley GH, 1995; Daniels TM, 1996).

Protein ini (38 kDa), memberikan spesifisitas sangat tinggi, yaitu > 98 %, antibodi anti 38 kDa ditemukan secara dini pada pasien dengan kasus lama dan kasus ulangan penyakit tuberculosis (Bothamley *et al.*, 1992). Namun, beberapa studi menunjukkan bahwa sensitivitas dari antibodi anti 38 kDa dalam mendeteksi dengan pengecatan positif bervariasi, mulai dari 50 % dengan di Cleveland, Ohio, sampai 90 % pada pasien di India dan Cina (Bothamley, 1995; Daniel T *et al.*, 1985; Ma Y *et al.*, 1986). Sensitivitas pada pasien dengan pengecatan negative menunjukkan hasil yang rendah, 5 % sampai 15 %.

Dalam penelitian lain, GH Bothamley dan RM Rudd, 1994. menyatakan hal yang sama untuk protein dengan berat molekul 38 kDa. "*Clinical evaluation of a serological assay using a monoclonal antibody (TB72) to the 38 kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis,*" menguji suatu immunosorbent menggunakan pengujian kadar logam enzyme-linked (ELISA) modifikasi suatu radioimmunoassay, menggunakan Tb72 monoclonal sebagai serological menguji tuberculosis dalam klinis. Kesimpulannya, TB72 test menyediakan informasi tambahan pada hasil diagnosa dan perawatan tuberculosis.

Menurut Chan ED, Heifets L, Iseman MD (1995), kurang lebih separoh pasien dengan infeksi bakteriologis pada TB paru adalah pengecatan negative. Telah diobservasi dengan beberapa antigen (19 kDa, lipoarabinomannan, Ag 85, 38 kDa) yang dikonfirmasi dengan pasien dengan pengecatan positif, memberikan

hasil deteksi terhadap sensitivitas antibodi yang rendah terhadap pasien dengan pengecatan negatif. Jadi, sensitivitas dengan antigen 38 kDa bervariasi antara 16,5 sampai 86% pada pasien dengan pengecatan negatif.

Hal yang sama ditemukan dalam penelitian Andersen AB, Hansen EB, 1989 untuk protein dengan berat molekul 38 kDa. "*Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of Mycobacterium tuberculosis,*" satu protein seperti antigen b (Pab) dengan bobot molekul 38,000, yang mengikat monoclonal antibodi kuman HYT28, TOPI 2, HBT 12, HGT 3, TB 71, dan TB 72. Gen yang menyandi protein ini terisolasi dari suatu lambda gt11-*Mycobacterium tuberculosis*. Urutan nucleotida dari recombinan mycobacterial yang akan ditentukan dimasukkan, hingga pada saat pembacaan ditemukan asam amino 374. Urutan asam amino memperlihatkan 30% homolog dengan protein phosphate-binding. Antigen 38,000 merupakan salah satu protein dari *Mycobacterium tuberculosis* yang menunjukkan epitopes spesifik penderita tuberkulosis.

Protein dengan berat molekul 11 kDa hasil ekspresi serum penderita tuberkulosis terhadap isolat A dapat digunakan sebagai bahan untuk diagnosis penderita tuberkulosis. Karena protein ini selalu muncul di setiap reaksi antara protein (antigen) yang terdapat pada isolat A dengan serum (antibodi) penderita tuberkulosis.

Selain itu protein dengan berat molekul 15 kDa, 17 kDa, 20 kDa, 28 kDa, 31 kDa, 38 kDa, 61 kDa, dan 95 kDa juga bisa digunakan sebagai bahan diagnostik, namun dalam sensitivitas yang rendah. Karena hanya mampu berikatan dengan antibodi pada serum penderita tuberkulosis antara 50%-75%.

Hasil *western blotting* pada isolat B, menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 6 kDa dan 271 kDa yang tampak sebagai *band* yang tebal pada hasil imunobloting, juga tercetak tebal di lebih dari 50 % pada semua reaksi protein OMP *Mycobacterium tuberculosis* dengan antibodi poliklonal dari 15 serum penderita tuberkulosis. Protein lain yang muncul pada reaksi protein dengan antibodi poliklonal penderita tuberkulosis adalah protein berat molekul 5 kDa, 7 kDa, 26 kDa, 31 kDa, 32 kDa, 43 kDa, 56 kDa, 123 kDa.

Protein yang terekspresi pada imunobloting menggunakan isolat B terhadap serum penderita tuberkulosis memberikan hasil yang berbeda dibandingkan prosedur yang sama menggunakan isolat A, C, dan D. Walaupun secara umum memberikan hasil yang berbeda, namun ada beberapa protein dengan berat molekul yang sama. Hasil ini juga terlihat pada ekspresi serum pasien penderita tuberkulosis terhadap isolat C dan D. Hal ini bisa difahami, karena menurut Cole ST, Brosch R, Parkhill J, *et al.*, 1998. Menerangkan bahwa genom bakteri *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai kemampuan mengekspresikan lebih kurang 4.000 protein. Kemampuan melakukan sekuensing dan cloning terhadap genom dalam mengekspresikan lebih banyak protein rekombinan hasil pemurnian, mampu dengan cepat memberikan keputusan sebagai kandidat antigen untuk imunodiagnosis penderita tuberkulosis.

Hasil *western blotting* pada isolat C, dapat diketahui bahwa protein dengan berat molekul 14 kDa, 18 kDa, 28 kDa, 32 kDa, 33 kDa, 36, 37 kDa, 38 kDa, 40 kDa, 43 kDa, 45 kDa, 61 kDa, 95 kDa yang tampak sebagai *band* yang tebal pada hasil imunobloting, juga tercetak tebal di lebih dari 50 % pada semua

reaksi protein OMP *Mycobacterium tuberculosis* dengan antibodi poliklonal dari 15 serum penderita tuberculosis.

Protein lain yang muncul pada reaksi protein dengan antibodi poliklonal adalah protein berat molekul 10 kDa, 17 kDa, 27 kDa, 31 kDa, 50 kDa, 72 kDa, 86 kDa, dan 191 kDa.

Pada prosedur imunoblotting menggunakan isolat A, C, dan D terhadap serum penderita tuberculosis ini, kembali mengekspresikan protein dengan berat molekul 38 kDa dan protein 14 kDa pada isolat C. Hasil ini terlihat pada lebih dari 60 % hasil blotting. Ini sekaligus membuktikan bahwa antigen dengan berat molekul 14 kDa dan 38 kDa berpeluang dijadikan bahan imunodiagnostik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Lyaschenko *et al.*, 1998 dan 2000. menerangkan bahwa evaluasi yang telah dilakukannya terhadap reaktivitas serum dari pasien penderita tuberculosis dengan pengecatan positif dan negatif dengan 12 protein *Mycobacterium tuberculosis* termasuk ESAT-6, protein 14 kDa, MPT63, protein 19 kDa, MPT70, MPT64, MPT51, MTC28, Ag 85B, protein 38 kDa, MPT32, dan KatG. Hasilnya menunjukkan, kecuali untuk antigen 38 kDa yang dikenali lebih dari 30 % pasien dengan tuberculosis. Semua antigen lainnya dikenali lebih rendah oleh pasien penderita tuberculosis (6 % sampai 22 %).

Hasil *western blotting* pada isolat D, dapat diketahui bahwa protein dengan berat molekul 12 kDa, 13 kDa, 34 kDa, 40 kDa, dan 444 kDa yang tampak sebagai *band* yang tebal pada hasil imunoblotting, di lebih dari 50 % untuk semua reaksi protein OMP *Mycobacterium tuberculosis* dengan antibodi poliklonal dari 15 serum penderita tuberculosis. Protein lain yang muncul pada reaksi protein

dengan antibodi poliklonal adalah protein berat molekul 24 kDa, 30 kDa, 62 kDa, dan 380 kDa.

Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Andersen AB, et al., 1991 terutama untuk protein dengan berat molekul 24 kDa. Dalam penelitiannya "*MPB64 possesses 'tuberculosis-complex'-specific B- and T-cell Epitopes,*" mengembangkan *monoclonal antibody* reaktif dengan suatu protein dari *Mycobacterium tuberculosis* dengan berat molekul 24 kDa. Protein ini direkayasa mirip dengan MPB 64 (Harboe et al.). Cross-Reactive MoAb mempertunjukkan MPB itu 64 lebih mycobacterial, dimana MPB 64 ditunjukkan untuk mempengaruhi daya hypersensitivitas reaksi pada babi guinea outbred yang diimunisasi dengan *M. tuberculosis* dan *M. bovis bacille Calmette-Guerin* (BCG).

Dalam penelitiannya, Laqueyrierie A, et al., 1995 juga menemukan protein dengan berat molekul 45 kDa dan 47 kDa. Dalam penelitiannya "*Cloning, sequencing, and expression of the alpha gene coding for the Mycobacterium tuberculosis 45/47-kilodalton secreted antigen complex,*" suatu *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-kDa antigen kompleks, kehadiran BCG dari kultur saringan udara sebelumnya. Antigen penyerang kuman sama dengan antigen yang terdapat pada medium kultur tuberkulosis pada saringan udara. Hybridisasi analisa mencerna total genom DNA dari *Mycobacterium tuberculsis* (acuan H37Rv dan H37Ra) yang menunjukkan bahwa pada gen sel tunggal genome tersebut. N-Terminal identitas atau homolog dari *Mycobacterium tuberculsis* dan *Mycobacterium bovis* BCG membersihkan molekul global yang serupa dan menyimpulkan komposisi asam amino menunjukkan hasil yang sempurna.

Harboe M, et al., 1986. dalam penelitiannya "*Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of Mycobacterium bovis BCG,*" terdapat kesesuaian terutama untuk protein dengan berat molekul 70 kDa dan 80 kDa. Merupakan protein immunogenik MPB64 dan MPB80 Mycobacterium bovis BCG yang homogen dengan MPB70. MPB70 dan MPB80 menunjukkan suatu distribusi serupa pada substrains BCG, keduanya terdapat dalam konsentrasi tinggi pada cairan kultur BCG substrain Tokyo, BCG Moreau, BCG Rusia, dan BCG Swedia dan dalam jumlah sangat kecil pada BCG Glaxo, BCG Tice, BCG Copenhagen, dan BCG Pasteur. Dalam berbagai larutan physicochemical, kandungan MPB70 dan MPB80 sama, tetapi MPB80 mempunyai suatu kadar yang lebih rendah. Hasil ini menunjukkan MPB70 dan MPB80 mempunyai format yang sama pada produk gen yang sama, akibat perubahan postsynthetic. Sebagai pembanding, MPB64 mempunyai suatu bobot molekular yang lebih tinggi. Urutan asam amino N-Terminal tidak menunjukkan homology dengan MPB70, kedua protein tidak ini menunjukkan persamaan immunologik. MPB64 dan MPB70 hanya menunjukkan cross-reactivas sangat terbatas dengan jenis mycobacteria yang lain tetapi cross-reacted dengan Nocardia asteroid. Kejadian yang sama pada delapan substrains BCG yang berbeda menunjukkan bahwa kedua protein dipengaruhi oleh mekanisme kendali serupa, tetapi berlawanan dengan MPB70, MPB64 terjadi pada konsentrasi cukup dalam dua tegangan *Mycobacterium tuberculosis* untuk memberi suatu noda beda pada two-dimensional polyacrylamide 'gel' agar-agar electrophoresis cairan kultur.

Ekspresi berat molekul serum penderita tuberkulosis terhadap isolat A dan isolat D memberikan hasil positif *band* pada blotting protein dengan berat molekul

24 kDa, walaupun hasil ini cukup rendah (6 % pada isolat A dan 40 % pada isolat D). Hasil ini mempunyai arti cukup penting dalam imunodiagnosis, seperti di jelaskan oleh Nakamura RM, Einck L, Velmonte MA, *et al.*, 2001. bahwa sebuah tes imunodiagnostik baru melalui sebuah jalur transdermal menggunakan antigen 24 kDa (MPB-64). Setelah dilakukan evaluasi secara berkelanjutan terhadap pasien yang kontak dan relawan, memberikan hasil sensitivitas yang tinggi (87 %) dan spesifisitas (100 %). Kemampuan dari tes ini pada kasus tuberkulosis yang lain belum di evaluasi dan mungkin dari beberapa kelompok resiko tinggi yang terbatas dengan respon imun seluler seperti individu yang terinfeksi HIV, dan individu-individu yang menggunakan terapi suppresif. Hal ini akan menjadi dasar pada respons tipe delay hipersensitivitas.

Beberapa protein hasil imunoblotting yang dominan muncul pada 15 sampel serum penderita tuberkulosis terhadap isolat A dan berpotensi menjadi bahan diagnostik penderita tuberkulosis diantaranya protein dengan berat molekul 11 kDa, protein 15 kDa, protein 17 kDa, protein 20 kDa protein 28 kDa, protein 31 kDa, protein 38 kDa, protein 61 kDa, protein 95 kDa dan protein 501 kDa. Hal ini karena kemunculan protein dengan berat molekul tersebut berkisar antara 53,3 % sampai 100 %. Namun, untuk melihat sejauh mana sensitifitas bahan protein tersebut harus dilakukan penelitian lebih jauh diantaranya mencakup besar sampel, umur penderita, jenis kelamin, patogenesis, lama dan riwayat penyakit, sosial ekonomi, dan sebagainya.

Pada isolat B, beberapa protein yang dominan muncul pada 15 sampel serum penderita tuberkulosis dan berpotensi menjadi bahan diagnostik berbeda dengan pada isolat B, diantaranya protein dengan berat molekul 6 kDa, dan

protein 271 kDa. Hal ini karena kemunculan protein dengan berat molekul tersebut berkisar antara 60 % dan 100 %. Namun, untuk melihat sejauh mana sensitifitas bahan protein tersebut harus dilakukan penelitian lebih jauh diantaranya mencakup besar sampel, umur penderita, jenis kelamin, patogenesis, lama dan riwayat penyakit, sosial ekonomi, dan sebagainya.

Pada isolat C, beberapa protein yang dominan muncul pada 15 sampel serum penderita tuberkulosis dan berpotensi menjadi bahan diagnostik penderita tuberkulosis diantaranya protein dengan berat molekul 14 kDa, protein 18 kDa, protein 28 kDa, protein 14 kDa, protein 32 kDa, protein 33 kDa, protein 36 kDa, protein 37 kDa, protein 38 kDa, protein 40 kDa, protein 43 kDa, protein 45 kDa, protein 61 kDa, protein 95 kDa, dan protein 499 kDa. Hal ini karena kemunculan protein dengan berat molekul tersebut berkisar antara 53,3 % sampai 100 %. Namun, untuk melihat sejauh mana sensitifitas bahan protein tersebut harus dilakukan penelitian lebih jauh diantaranya mencakup besar sampel, umur penderita, jenis kelamin, patogenesis, lama dan riwayat penyakit, sosial ekonomi, dan sebagainya.

Ada beberapa protein yang kemunculannya pada isolat A juga ditemukan pada isolat C diantaranya protein dengan berat molekul 28 kDa, protein 38 kDa, protein 61 kDa, dan protein 95 kDa.

Pada imunoblotting terhadap isolat D, terlihat beberapa protein yang dominan muncul pada 15 sampel serum penderita tuberkulosis dan berpotensi menjadi bahan diagnostik penderita tuberkulosis diantaranya protein dengan berat molekul 12 kDa, protein 13 kDa, protein 34 kDa, protein 40 kDa, dan 444 kDa. Hal ini juga karena kemunculan protein dengan berat molekul tersebut berkisar

antara 66,7 % sampai 100 %. Namun, untuk melihat sejauh mana sensitifitas bahan protein tersebut harus dilakukan penelitian lebih jauh diantaranya mencakup besar sampel, umur penderita, jenis kelamin, patogenesis, lama dan riwayat penyakit, sosial ekonomi, dan sebagainya.

Beberapa protein pada isolat A yang kemunculannya pada sampel dengan jenis kelamin tertentu, namun tidak ditemukan pada sampel sebaliknya, yaitu protein dengan berat 18 kDa, protein 24 kDa, protein 113 kDa, protein 218 kDa, dan protein 308 kDa. Pada isolat B protein dengan berat molekul 20 kDa, protein 21 kDa, protein 23 kDa, protein 28 kDa, protein 33 kDa, protein 36 kDa, protein 55 kDa, protein 56 kDa, dan protein 123 kDa. Pada isolat C protein dengan berat molekul 13 kDa, protein 39 kDa, protein 47 kDa, protein 53 kDa, protein 65 kDa, protein 71 kDa, protein 78 kDa, dan protein 142 kDa. Sedangkan pada isolat D protein dengan berat molekul 11 kDa, protein 23 kDa, protein 32 kDa, protein 49 kDa, protein 52 kDa, protein 72 kDa, protein 118 kDa, dan protein 157 kDa. Hal ini menjadi sebuah masukan baru karena kemunculannya hanya berdasarkan jenis kelamin tertentu. Namun, untuk melihat sejauh mana sensitifitas bahan protein tersebut harus dilakukan penelitian lebih jauh diantaranya mencakup besar sampel, jenis kelamin, dan sebagainya.

Perbedaan hasil imunoblotting dalam menentukan antigen yang memiliki peluang sebagai bahan diagnosis tuberkulosis dipengaruhi oleh banyak hal, diantaranya status penderita tuberkulosis, apakah cavitari atau non-cavitari tuberkulosis, mungkin juga terhadap jenis kelamin, sosial ekonomi, umur penderita dan sebagainya. Kemampuan mengekspresikan banyak protein oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* secara umum bisa difahami, apalagi dalam

penelitian ini tidak dibatasi oleh status penderita. Hal ini bisa dijelaskan dengan penelitian yang dilakukan oleh Samanich K, Belisle JT, Laal S (2001) dan Samanich K, Belisle JT, Sonnenberg MG, *et al.*, (1998), menerangkan bahwa hasil pemeriksaan laboratorium secara mapping dua dimensi terhadap fraksi filtrat-filtrat kultur yang dikenali oleh antibodi dari pasien dengan tuberkulosis yang telah diklasifikasi menurut hasil pengecatan basil dasar *acid-fast*, status radiologik, dan status HIV untuk menggambarkan antigen-antigen yang mempunyai peluang (kandidat) untuk serodiagnosis penderita tuberkulosis.

Hasil studi ini memperlihatkan : *Pertama*, lebih dari 100 protein terekspresi pada kultur filtrat *Mycobacterium tuberculosis* dalam media pertumbuhan bakteriologis minimal. Hanya satu subset kira-kira 12 protein (12 protein *Mycobacterium tuberculosis* termasuk ESAT-6, protein 14 kDa, MPT63, protein 19 kDa, MPT70, MPT64, MPT51, MTC28, Ag 85B, protein 38 kDa, MPT32, dan KatG) yang dikenali secara baik oleh antibodi dari penderita dengan non-cavitari tuberkulosis.

Kedua, pasien dengan cavitari tuberkulosis berbeda dengan pasien non-cavitari tuberkulosis dalam kepemilikan antibodi dengan subset yang sama terhadap kira-kira 12 antigen dan terhadap penambahan subset kira-kira 10 antigen, salah satu diantaranya adalah protein 38 kDa.

Ketiga, pasien-pasien dengan non-cavitari tuberkulosis yang terinfeksi oleh HIV memiliki subset antibodi yang sama terhadap kira-kira 12 antigen dengan pasien non-HIV, dan non-cavitari tuberkulosis.

Keempat, pengecatan positif dan pengecatan negatif pada penderita tuberkulosis non-cavitari mengenali subset antigen yang sama. Walaupun titer antibodi secara umum lebih tinggi pada kelompok penderita terdahulu.

Kelima, walaupun kenyataannya terdapat perbedaan antara individu yang terinfeksi dengan strain yang berbeda, terdapat sebuah kesamaan (homogenitas) yang signifikan terhadap subset antigen yang dikenali pada individu yang berbeda.

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan *Mycobacterium tuberculosis*, diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya, yang berasal dari rujukan dari beberapa rumah sakit di wilayah Jawa Timur. Penggunaan bahan (isolat) dari BBLK ini dimaksudkan sebagai acuan standar. Laboratorium ini menjadi rujukan bagi laboratorium klinik di Jawa Timur yang telah mengantongi sertifikasi dengan grade A.

Proses identifikasi dan kultur biakan tuberkulosis di BBLK Surabaya dilakukan sesuai standar dari WHO, dimulai dari persiapan bahan (sputum), pembuatan sediaan apus sputum, pewarnaan BTA metode Zhiel Nielsen, Pembacaan sediaan (mikroskopis) menggunakan skala IUATLD, kultur standar pada media Lowenstein Jansen, tes identifikasi Niacin, dan dilanjutkan tes resistensi OAT (obat anti tuberkulosis) dengan media Lowenstein Jansen.

Dari hasil kultur kuman pada media Lowenstein Jansen, ditemukan tanda khas koloni *Mycobacterium tuberculosis* antara lain : koloni berwarna putih kekuning-kuningan, permukaan kering dan rapuh dengan tepi yang tidak beraturan (seperti bunga kol).

Tes Niacin pada semua isolat memberikan hasil (+), tes Katalase negative, tes Nitrat positif, tes PNB negative, sementara hasil tes resistensi OAT memberikan hasil sensitif untuk isolat A, dan negative untuk isolat B, C, dan D.

Dari keseluruhan kondisi isolat, hasil identifikasi dan kultur yang digunakan sebagai bahan dalam penelitian ini, dipastikan bahwa bahan tersebut adalah benar-benar bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan memenuhi syarat sebagai bahan dalam penelitian ini.

Suspensi *Mycobacterium tuberculosis* dari isolat diperoleh dengan memanen koloni yang tumbuh pada medium Lowenstein Jansen berumur 3 minggu menggunakan ose steril, dan melarutkannya dalam 5 ml PBS (*phosphate buffer saline*) sampai semua koloni yang tumbuh habis. Penggunaan PBS dimaksudkan sebagai buffer yang akan mempertahankan pH larutan dan berfungsi untuk mempertahankan kondisi kuman sesuai aslinya. Hal ini karena PBS hanya bersifat sebagai medium transport yang tidak memiliki bahan nutrisi untuk pertumbuhan kuman.

Penggunaan isolat muda (berumur 3 minggu) dikarenakan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* pada usia kultur tersebut memberikan respons optimal dalam reaksi serologis.

Pembuatan antibodi monoklonal maupun poliklonal mempunyai peranan yang penting dalam aplikasi di kedokteran, sebab teknik ini bermanfaat untuk deteksi antigen dari specimen bakteri, dalam penelitian ini sangat penting untuk keakuratan hasil *western blotting*.

Pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan mengambil darah (whole blood) penderita tuberkulosis. Hal ini dilakukan karena setiap penderita

tuberkulosis akan memproduksi antibodi (dalam bentuk antibodi poliklonal) beberapa minggu setelah terinfeksi oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis*.

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa serum penderita tuberkulosis yang digunakan dalam imunoblotting metode *western blott* memberikan hasil adanya ikatan antigen-antibodi antara protein yang terdapat pada suspensi kuman baik pada isolat A, B, C, dan D dengan berbagai derajat (kekuatan) ikatan. Hal ini menunjukkan bahwa antibodi poliklonal yang terdapat dalam serum penderita berikata dengan protein antigenik yang terdapat dalam suspensi isolat bahan penelitian.

Holt (1994), menyatakan bahwa dalam melakukan isolasi OMP bakteri dapat dilakukan dengan cara lama, menggunakan metode fenol panas (*Hot Phenol Method*), tetapi ada kemungkinan akan tercampur dengan protein lain dari dalam sel. Metode yang baru dikembangkan dan mudah dilakukan adalah metode Matsujama (Harn, 1992), yaitu dengan menggunakan alat ultrasonikasi dengan frekuensi dan waktu tertentu sehingga dinding sel bakteri pecah.

Pada penelitian ini, sebelum dilakukan pemecahan (sonikasi), suspensi bahan penelitian di sensitisasi dengan buffer. Kemudian sel bakteri dipecah dengan menggunakan alat ultrasonikator dengan frekuensi 20 KHz dengan waktu pemakaian dimodifikasi. Modifikasi berdasarkan pengalaman Widjajanto (2003) bahwa isolasi protein OMP bakteri menggunakan cara berselang-seling 3 menit jalan 2 menit istirahat yang diulang 3 kali pada suhu dingin (direndam es batu), ternyata hasilnya baik dan dapat diperoleh protein dalam jumlah yang banyak.

Pelaksanaan sonikasi memerlukan suhu dingin karena efek ultra sonikasi menimbulkan panas yang berpengaruh terhadap bakteri. Suhu sangat berpengaruh

terhadap kimia sel, membran lipid, lipopolisakarida, OMP, fimbria dan virulensinya. Oleh karena itu pada saat melakukan isolasi OMP *Mycobacterium tuberculosis*, pengaturan suhu harus dilakukan dengan sebaik-baiknya. Pengaturan suhu tersebut dilakukan baik pada saat inkubasi, sonikasi, maupun sentrifugasi, sehingga OMP yang diperoleh dapat optimal.

Dalam penelitian ini, pengaturan suhu dilakukan dengan sebaik-baiknya, baik sewaktu inkubasi, sonikasi, maupun pada saat sentrifugasi. Dengan demikian hasil yang diperoleh dapat optimal.

Sebelum dilakukan sonikasi terhadap suspensi bakteri, perlu diperhatikan waktu biakan bakteri. Waktu pertumbuhan bakteri ini penting karena pada saat tersebut bakteri berada pada fase peningkatan pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan pendapat Harn (1992) bahwa pada fase peningkatan pertumbuhan, kondisi bakteri sangat baik dan jumlah bakteri menjadi banyak.

Setelah didapatkan protein OMP *Mycobacterium tuberculosis*, maka perlu diketahui kadar protein tersebut. Untuk itu pengukuran kadar protein dilakukan dengan alat spektrofotometer. Hasil pengukuran kadar protein OMP *Mycobacterium tuberculosis* isolat A sebesar 2,6 g%; isolat B sebesar 1,9 g%; isolat C sebesar 3,01 g%, dan isolat D sebesar 2,7 g%. Jumlah tersebut cukup untuk mendapatkan protein spesifik yang bersifat antigenik.

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian identifikasi protein antigenik *Mycobacterium tuberculosis* sebagai bahan diagnostik ini, dapat disimpulkan beberapa hal, antara lain :

1. Berat molekul protein yang terekspresi pada isolat A, B, C, dan D hasil SDS-PAGE yang dominan muncul antara lain protein dengan berat molekul 12 kDa, 15 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 35 kDa, 66 kDa, 95 kDa, dan 244 kDa.
2. Penentuan reaktifitas protein yang spesifik berdasarkan *strafing imunobloting* terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis yang dominan muncul dan berpeluang menjadi bahan diagnostik penderita tuberkulosis antara lain protein dengan berat molekul 28 kDa, 38 kDa, 61 kDa, dan 95 kDa

7.2 Saran

1. Ada beberapa protein dengan berat molekul tertentu hasil *strafing imunobloting* yang kemunculannya dominan terhadap 15 antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis diantaranya protein dengan berat molekul 28 kDa, 38 kDa, 61 kDa, dan 95 kDa. Hal ini bisa dijadikan sebagai kandidat bahan diagnostik penderita tuberkulosis. Namun, sebelumnya harus dievaluasi melalui penelitian lebih lanjut terkait besar sample, status klinis, dan lain-lain.

2. Diharapkan ada penelitian lebih lanjut berhubungan dengan berat molekul protein antigenik *Mycobacterium tuberculosis* mencakup besar sampel, umur penderita, jenis kelamin, patogenesis, lama dan riwayat penyakit, sosial ekonomi, dan sebagainya untuk melihat sejauh mana sensitifitas bahan protein tersebut sebagai bahan diagnostik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AKL, Andrew H, and Pober JS, 2000. *Immunity to Microbes. In Cellular and Molecular Immunology*. 4th Edition, Philadelphia: WB Saunders Company, pp. 352 – 354.
- Alcamo IE, 1994. *Fundamentals of Microbiology*. 4th edition, California : The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, pp 456-458.
- Andersen AB, Hansen EB, 1998. *Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b,a 38,000-molecular-weight protein of Mycobacterium tuberculosis*. Micobacteria Departement, Denmark, J Infect Immun, Vol. 57 No. 8, pp 2481-2488.
- Andersen AB, Andersen P, Ljungqvist L, 1992. *Structure and fuction of a 40,000-molecular-weight protein antigen of Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun J, Vol. 6, pp 2317-23.
- Andersen AB, Ljungqvist L, Haslov K, Bentzon MW, 1991. *MPB64 possesses tuberculosis-complex specific B-and T-cell epitopes*. Scand J Immunol, Vol. 34 No. 3, pp 365-72.
- Anonim, 2002. *Mycobacterium tuberculosis*.
<http://www.micro.msb.le.ac.uk/default.html>
- Baratawidjaja KG, 2001. *Imunologi Dasar*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hlm 185 – 195.
- Barclay AN, ML Birkeland, MH Brown, AD Beyers, SJ Davis, C Somoza, and AF William (ed), 1997. *The Leucocyte Antigen Facts Book*, 2nd edition, Academic Press, New York.
- Baron EJO, Paterson LR, Finegold SM, 1990. *Diagnostic Microbiology*. 9th Ed. Balley & Scotts. St. Louis. Baltimore. Sydney. Philadelphia. London. Madrid. Boston. Toronto.
- Barness PF, Modlin RL and Ellner JJ, 1994. *T-Cell Response and Cytokine*. Washington DC, ASM Press, pp 417-36
- Bellanti JA, Robbins JB, 1993. *Imunoterapi, Dalam (Bellanti JA, ed) Imunologi III, (Wahab SA, penterjemah) Yogyakarta : Gajah Mada University Press.*

- Borremans M, et al, 1989. *Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun J, Vol. 57 No. 10, pp 3123-30.
- Bothamley GH, Rudd R, Festenstein F and Ivanyi J, 1992. *Clinical value of the measurement of Mycobacterium tuberculosis specific antibody in pulmonary tuberculosis*. Medical Research Council Tuberculosis and Related Infections Unit, Hammersmith Hospital, London, J Thorax, Vol 47, pp 270-275.
- Bothamley GH, 2004. *Epitope-specific antibody levels demonstrate recognition of new epitope and changes in titer but not affinity during treatment of tuberculosis*. American Society for Microbiology, J Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Vol. 11 No. 5, pp 942-951.
- Bothamley GH, Rudd R, 1994. *Clinical evaluation of a serological assay using a monoclonal antibody (TB72) to the 38 kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis*. ERS J Ltd, Vol. 7, pp 240-246.
- Bothamley GH, 1995. *Serological diagnosis of tuberculosis*, Eur Respir J, Vol 8, pp 676-688.
- Cappucino JG, and Natalie S, 1985. *Microbiology a Laboratory Manual*. 2nd Edition, Wesley Publishing Company Inc.: Canada.
- Chan J, Kauffmann HE, 1994. *Immune Mechanism of Protection*. Washington DC, ASM Press, pp 389-416.
- Chan ED, Heifets L, Iseman MD, 2000. *Immunological diagnosis of tuberculosis, a review*, Tuber Lung Dis J, Vol. 80, pp 131-140.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al., 1998. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*, Nature J, vol. 393, pp 573-544.
- Crick DC, Brennan PJ, and McNeil, 2004. *The Cell Wall of Mycobacterium tuberculosis*. In (Rom WN and Garay SM, eds). Tuberculosis, 2nd ed, Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, pp 117 – 118.
- Daniels TM, 1996. *Imunodiagnosis of tuberculosis*, In : Room WR, Garay S, eds., In : Tuberculosis, Boston : Little, Brown, pp 223-231.
- Daniel T, Debanne SM, van der Kuyp F, 1985. *Enzyme-linked immunosorbent assay using Mycobacterium tuberculosis antigen 5 and PPD for the serodiagnosis of tuberculosis*, J Chest, Vol. 88, pp 388-392.
- Dannenber AM, 1994. *Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis: an Interplay of Tissue-damaging and Macrophage-activating Immune Response-Dual*

- mechanism That Control Bacillary Multiplication*. Washington DC: ASM Press, pp 473-0
- Forbes BA *et al.* 1998. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 10th edition. Texas : Mosby, Inc, pp 717 – 748.
- Gandasoebrata R, 1995. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta : Penerbit Dian Rakyat. hal 9.
- Giacomini *et al.*, 2001. *Infection of Human Macrophages and Dendritic Cells with Mycobacterium tuberculosis Induces a Differential Cytokine Gene Expression That Modulates T Cell Response*. The American Association of Immunologists.
- Handayani S, 2002. *Karakteristik protein antigen Mycobacterium tuberculosis multi resisten obat anti tuberkulosis dengan cara immunoblotting menggunakan serum pasien TB*. JKPKBPPK, Litbangkes Depkes, Jakarta.
- Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, Torres ML, Ramirez C, Cruz N, 1986. *Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of Mycobacterium bovis BCG*. Infect Immun J, Vol. 52. No. 1, pp 293-302.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, and Williams ST, 1994. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Williams & Wilkins, USA : 179180.
- Jawetz E, Melnick JL, and Adelberg EA, 1980. *Review of Medical Microbiology*. 14th ed. Lange Medical Publication. Los Altos Chicago.
- Jocklick WK, Willet HP, and Amos DB, 1984. *Zinsser Microbiology*, 18th Ed. Appleon-Century-Crofts/Norwalk. Connecticut.: 598-599, 604-605.
- Joklik WK *et al*, 1992. *Zinsser Microbiology*. 20th Edition, USA : Appleton & Lange, pp 497 – 501.
- John WM, 1996. *The Protein Protocols Hand Book*. Humana Press. Totowa. New Jersey.
- Kalma, 2004. *Deteksi antibody spesifik terhadap Mycobacterium tuberculosis dalam serum penderita tuberculosis paru menggunakan AIM TB Rapid*. JIPTUNAIR, Surabaya.
- Kaufmann, 2002. *Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophage*. Ann Rheum Dis 61 (Suppl II): ii54-ii68.
- Krishna K Sing, Yuxin Dong, Sai A Patinbandla, David N, McMurray, Vijay K Arora, and Suman Laal, 2005. *Immunogenicity of Mycobacterium tuberculosis PPE55 (Rv3347c) protein during incipient and clinical*

- tuberculosis*. American Society for Microbiology, J Infection and Immunity, Vol. 73 No. 8, pp 5004-5014.
- Laqueyrie A, Militzer P, Romain F, Eiglmeier K, Cole S, Marchal G, 1995. *Cloning, sequencing, and expression of the alpha gene coding for the Mycobacterium tuberculosis 45/47-kilodalton secreted antigen complex*. Infect Immun J, Vol. 63 No. 10, pp 4003-10.
- Launois P, et al, 1994. *T-cell-epitope mapping of major secreted microbial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy*. J Infection and Immunity, Vol. 62 No. 9, pp 3679-3687.
- Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, et al., 1998. *Heterogeneous antibody response in tuberculosis*, Infect Immun J, vol. 66, pp 3936-3940.
- Lyashchenko KP, Singh M, Colangeli R, et al., 2000. *A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious disease*, immunol Meth J, vol. 242, pp 91-100.
- Lucy E, et al, 2002. *Mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages exhibit enhanced cellular adhesion with increased expression of LFA-1 and ICAM-1 and reduced expression and/or function of complement receptors, FcγRII and the mannose receptor*. Microbiology J, vol. 148: pp 3161-3171.
- Ma Y, Wang YM, Daniel TM, 1986. *Enzyme-linked immunosorbent assay using Mycobacterium tuberculosis antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China*, Am Rev Respir Dis, vol. 134, pp 1273-1275.
- Mason D (ed), 2002. *Leucocyte Typing VII*, Oxford University Press.
- Miler LE et al, 1991. *Manual of Laboratory Immunology*. 2nd edition, Philadelphia: Lea & Febiger, pp 159 – 189.
- Nahid M, et al, 1998. *CTL response to Mycobacterium tuberculosis: identification of an immunogenic epitope in the 19-kDa lipoprotein*. The J of Immunology, Vol. 161, pp 2400-2460.
- Nakamura RM, Einck L, Velmonte MA, et al., 2001. *Detection of active tuberculosis by an MPB-64 transdermal path : a field study*, Scand Infect Dis J, vol. 33, pp 405-407.
- Nugraha J, 2006. *Urutan asam amino dari epitope regio N. terminus antigen ESAT-6 sebagai marka diagnostik penyakit tuberculosis paru aktif*. JIPTUNAIR, Surabaya.
- Parslow TG et al, 2001. *Natural Immunity. In Medical Immunology*. 10th ed. USA : Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division, pp 19, 614 - 615.

- Pottumarthy S, Weels VC, Morris AJ, 2000. *A comparison of seven test for serological diagnosis of tuberculosis*, *Clinical Microbiologic J*, vol. 38, pp 2227-2231.
- Rantam FA, 2003. *Metode Immunologi*. Surabaya : Penerbit Airlangga University, hlm 145-161.
- Roitt I, 1985. *Immunity to Infections. In Essential Immunology*. 5th edition. USA: Blackwell Scientific Publication. pp.194 – 196.
- Roitt I, J. Brostoff and Male D, 2001. *Immunology*. 6th ed, London: Harcourt Publisher Ltd, pp 8.1, 15.20 – 15.22.
- Rom WN, and Garay SM, *Tuberculosis*. 2nd ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp 13.
- Samanich KM, Keen MA, Vissa VD, Harder JD, Spencer JS, Belisle JT, Zolla-Pazner S, and Laal S, 2000, *Serodiagnostic potential of culture filtrate antigens of Mycobacterium tuberculosis*. *American Society for Microbiology, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunologi J*, Vol. 7 No. 4, pp 662-668.
- Samanich KM, Belisle JT, Laal S, 2001. *Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients*, *Infect Immun J*, vol. 69, pp 4600-4609.
- Samanich KM, Belisle JT, Sonnenberg MG, *et al.*, 1998. *Delineation of human antibody responses to culture filtrate antigens of Mycobacterium tuberculosis*, *Infect Dis J*, vol. 178, pp 1534-1538.
- Sears DW, 1997. *Cells and Organs of The Immune System*. USA: W. H. Freeman & Co. and Sumanas, Inc, pp 3.11.
- Shaw S, L Turni, and K Katz (ed), *Protein Reviews on web: An International WWW Resources/Journal*.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/>
- Shin, 2002. *Immune evasion by Mycobacterium tuberculosis*. *Current Opinion in Immunology* 15: 450.
- Shinnick TM, 1987. *The 65-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis*, *J Bacteriol*, Vol. 163 No. 3, pp 1080-8.
- Smith I, 2003. *Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence*. *Clin Microbiol J. Rev* 16 : 3.
- Somaraju V, 2002. *Drugs Used in Tuberculosis and Leprosy*.
- Sri Utami B, 2002. *Uji validitas teknik PCR (polymerase chain reaction) dan pemeriksaan mikroskopis bakteri tahan asam sebagai alat diagnosis*

penderita TB paru di rumah sakit Persahabatan Jakarta. JKPKBPPK, Litbangkes Depkes, Jakarta.

- Subowo, 1993. *Fagositosis Dalam Immunobiologi*. Bandung : Angkasa, hlm 151 – 165.
- Susilohadi W, dan Suwarno, 2001. *Pengaruh Berbagai Tingkat Ultra Sonikasi Terhadap Antigenisitas Protein Membran Kuman S. pullorum*. Surabaya : Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya.
- Susilohadi W, 2003. *Isolasi Dan Karakterisasi Protein Immunogenik Salmonella pullorum Sebagai Bahan Vaksin Sub Unit*. Surabaya : Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Territo dan Cline, 1976. *Macrophage and Their Disorder in Man. In (Nelson DS). Immunobiology of the Macrophage*. San Fransisco : A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich Publisher, Academic Press, pp 598 - 605.
- Todar K, 2002. *Mechanisms Of Bacterial Pathogeniciy: Endotoxins*. Todar's Online Textbook of Bacteriology.1-7.
- Orme I, Cooper A, 1999. *Cytokine/Chemokine in Immunity to Tuberculosis*, J Immunologi-173, pp 945-53.
- Vincenti D *et al.*, 2003. *Identification of Early Secretory Antigen Target- 6 Epitopes for the Immunodiagnostic of Active Tuberculosis*. Molecular Medicine 9: 105.
- Wahyuningsari, Retno M, 2005. *Uji polymerase chain reaction (PCR) untuk menilai kebijakan klinis penentuan diagnosa tuberkulosis paru di rumah sakit Dr. Soetomo Surabaya*. JIPTUNAIR, Surabaya.
- Warsa *et al*, 1994. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Binarupa Aksara, hlm 191–199.
- World Health Organization, 2003. *Guidelines for Workplace TB Control Activities, The Contribution of Workplace TB Control Activities to TB Control in The Community*. Geneva : WHO, pp 27.

Lampiran 1 : Informasi Penelitian dan Lembar Persetujuan Keikutseeraan dalam penelitian

INFORMASI PENELITIAN

Judul Penelitian : Identifikasi Protein Antigenik *Mycobacterium tuberculosis*, Sebagai Bahan Diagnostik Tuberkulosis
Peneliti : Yohandromeda Syamsu, S.KM

Anda (sebagai pasien atau penanggung jawab/keluarga pasien) diajak untuk ikut dalam suatu penelitian mengenai Identifikasi Protein Antigenik *Mycobacterium tuberculosis*, Sebagai Bahan Diagnostik Tuberkulosis.

Pertama, keikutsertaan anda sangat kami hargai dan bersifat sukarela. Anda bisa memilih untuk tidak ikut atau keluar dari penelitian setiap saat.

Kedua, karena merupakan suatu penelitian, subjek penelitian mungkin saja tidak mendapatkan manfaat langsung dari penelitian ini. Penelitian ini sendiri akan menambah pengetahuan tentang jenis dan macam protein antigenik yang terdapat pada *outer membrane protein* (OMP) kuman *Mycobacterium tuberculosis* yang digunakan untuk melihat efektifitasnya sebagai bahan diagnostik tuberkulosis.

Silakan baca informasi ini dengan hati-hati atau minta tolong orang lain membacakannya. Anda akan memperoleh salinan dari formulir ini untuk disimpan. Sebelum anda memutuskan untuk berpartisipasi, luangkan waktu anda untuk bertanya dan berdiskusi mengenai penelitian ini dengan siapapun di Balai Pengobatan dan Pemberantasan Penyakit Paru (BP4) Surabaya, Bagian Paru Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya, atau dengan keluarga, atau dengan teman, atau dengan dokter, atau dengan petugas kesehatan lainnya.

Alasan Untuk Melakukan Penelitian

Tuberkulosis (TB) adalah infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang dapat menimbulkan lesi pada berbagai jaringan tubuh. Organ sasaran yang sering diserang oleh infeksi bakteri ini terutama adalah jaringan "*parenchyme*" organ paru. Selain itu, dapat juga menyebar ke organ ginjal menimbulkan TB-ginjal, di usus menimbulkan peritonitis tuberkulosa, pada jaringan saraf menimbulkan meningitis tuberkulosa, pada kelenjar getah bening menimbulkan TB-kelenjar yang sering menyerang anak-anak.

Tuberkulosis merupakan satu dari infeksi terbesar yang diderita manusia dan masih menjadi masalah kesehatan dunia yang utama sampai saat ini (Abbas *et al.*, 2000; Parslow *et al.*, 2001; Kaufmann, 2002). Dua milyar atau sepertiga populasi manusia di dunia mengalami infeksi laten *Mycobacterium tuberculosis* dan sekitar delapan juta kasus tuberkulosis aktif terjadi setiap tahunnya, dengan tiga juta kematian per tahun. (Kaufmann, 2002; Vincenti *et al.*, 2003).

Penyakit tuberkulosis merupakan penyakit infeksi yang sangat unik ("*The Great Antiquity*") (Kaufmann *et al.*, 2002). Walaupun kuman penyebab penyakit

sudah ditemukan lebih dari 100 tahun yang lalu dan khemoterapi untuk mengatasi sudah diperkenalkan lebih dari 40 tahun terakhir, namun penyakit ini sampai sekarang masih merupakan masalah kesehatan di negara berkembang dan negara maju (WHO, 2003).

Dalam dekade ini, hubungan mekanisme imun terhadap patogenesis tuberkulosis menjadi salah satu perhatian. Perkembangan pengetahuan tentang mekanisme imun pada tuberkulosis, juga dapat menjadi dasar perkembangan vaksin maupun terapi imun lain. Sampai saat ini, vaksin yang efektif untuk pencegahan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* belum ditemukan. Bacillus Calmette-Guerin (BCG), suatu strain *Mycobacterium bovis* yang telah dilemahkan, telah digunakan untuk vaksinasi secara luas lebih dari 60 tahun, mampu memberikan hipersensitivitas kulit lambat, namun belum jelas mekanisme peranan imunitas seluler dalam menghambat *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler (Parslow *et al.*, 2001).

Seiring dengan kemajuan di bidang teknologi, penelitian di bidang diagnostik dan vaksinasi untuk penyakit tuberkulosis telah maju pesat. Urutan genom dari *Mycobacterium tuberculosis* sebagai agen penyebab tuberkulosis telah diketahui, maka informasi mengenai bahan genetik dan kuman ini telah dapat diperoleh.

Ada banyak bagian protein kuman yang potensial imunogenik yang telah berhasil diidentifikasi. Beberapa protein antigenik yang terpenting di antaranya adalah ESAT-6, 38 kDa, hsp 65, hsp 70 dan complex Ag85.

Pendekatan reaksi imunologis misalnya dengan menemukan protein antigenik pada *Other Membrane Protein* (OMP) *Mycobacterium tuberculosis* selain yang telah ditemukan diatas, dalam menegakkan diagnosis tuberkulosis menjadi sebuah harapan untuk mempercepat deteksi dan mampu mempermudah diagnosis, karena teknik pemeriksaan yang sederhana, dan diharapkan memiliki spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi dan saling menguatkan dengan penemuan sebelumnya.

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi protein antigenik *Mycobacterium tuberculosis* yang diperoleh pada isolat klinis TB dari BBLK Surabaya dan Strain Reference *M. tuberculosis* H37RV. Hasil penelitian diharapkan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dalam memberikan masukan informasi tentang karakterisasi protein antigenik kuman *Mycobacterium tuberculosis*, sebagai bahan diagnostik tuberkulosis sekaligus memberikan alternatif metode pemeriksaan penderita tersangka tuberkulosis yang mudah dan cepat dengan spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi.

Siapa yang Dapat Berpartisipasi dalam Penelitian ini ?

Semua orang, pria atau wanita berusia diatas 21 tahun yang menderita penyakit tuberkulosis berdasarkan hasil pemeriksaan BP4 Surabaya atau RS. Dr. Soetomo Surabaya, baik yang dirawat inap atau dirawat jalan.

Apa yang Terjadi Jika Anda Ikut Serta Dalam Penelitian Ini

Segera setelah anda setuju untuk ikut, akan dilakukan penyaringan untuk mengikuti penelitian ini. Penyaringan akan dilakukan terhadap kriteria umur, menderita tuberkulosis, dan menandatangani formulir persetujuan.

Selanjutnya, kami akan mengambil sampel darah melalui vena *medianus cubiti* sebanyak 10 ml menggunakan jarum dan spuit steril. Selanjutnya sampel darah tersebut akan kami beri label dengan nomor dan kode tertentu, akan dirahasiakan dan hanya kami yang mengetahuinya.

Setelah anda melewati penyaringan dan diambil sampel darahnya, kami akan memberikan susu, telur, dan gula, untuk meningkatkan kembali gizi setelah diambil darahnya.

Prosedur yang sama akan dilakukan untuk pasien dengan bahan isolat klinis tuberkulosis dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya, kami akan mintakan tanda tangan anda pada formulir persetujuan.

Pemeriksaan Apa yang Dilakukan Pada Sampel?

Kami akan melakukan beberapa uji berkaitan dengan karakteristik protein antigenik *other membrane protein* (OMP) kuman *Mycobacterium tuberculosis* yang terdapat dalam bahan isolat klinis menggunakan metode SDS-PAGE.

Sedangkan bahan sampel darah akan kami jadikan serum yang nantinya akan dijadikan sebagai bahan antibodi poliklonal dalam pemeriksaan imunoblotting.

Resiko yang ada Sehubungan dengan Keikutsertaan Anda dalam Penelitian

Umumnya prosedur dalam pengambilan darah tidak menimbulkan keluhan. Keluhan yang mungkin terjadi antara lain rasa sakit, perdarahan dan bengkak pada bekas jarum yang bersifat sementara.

Manfaat Apa yang Akan Anda Peroleh dari Penelitian Ini?

Secara langsung anda mungkin tidak akan mendapatkan manfaat dari penelitian ini. Namun, secara ilmiah penelitian ini bertujuan mengidentifikasi protein antigenik *Mycobacterium tuberculosis* yang diperoleh pada isolat klinis penderita tuberkulosis dari BBLK Surabaya dan Strain Reference *M. tuberculosis* H37RV.

Hasil penelitian diharapkan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dalam memberikan masukan informasi tentang karakterisasi protein antigenik kuman *Mycobacterium tuberculosis*, sebagai bahan diagnostik tuberkulosis sekaligus memberikan alternatif metode pemeriksaan penderita tersangka tuberkulosis yang mudah dan cepat dengan spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi.

Hasil Penelitian

Hasil penelitian tidak diberikan kepada anda atau dokter yang merawat anda. Data ini tidak dimasukkan dalam arsip kesehatan anda. Semua informasi bersifat rahasia.

Alternatif Lain dalam Keikutsertaan pada Penelitian ini

Jika anda tidak ikut serta dalam penelitian ini, maka kami akan menawarkan kepada penderita tuberkulosis yang lain.

Kerahasiaan

Informasi tentang peserta akan dirahasiakan dan tidak dapat diketahui oleh pihak lain diluar penelitian ini tanpa izin anda (sebagai peserta atau penanggungjawab peserta).

Biaya

Asuransi kesehatan anda tidak perlu mengeluarkan biaya atas ketidaknyamanan yang terjadi akibat pengambilan sampel darah yang kami lakukan. Apabila ketidaknyamanan atas tindakan ini berlanjut, maka segala biaya atas ketidaknyamanan tersebut menjadi tanggungjawab kami. Sedangkan biaya pengobatan penyakit yang anda derita tetap menjadi tanggungan anda atau asuransi kesehatan anda.

Pertanyaan

Jika anda punya pertanyaan sehubungan dengan penelitian dan keikutsertaan anda, dapat menghubungi :

Nama : Yohandromeda Syamsu, S.KM

No. Hp: 08125134911

Lampiran 2 : Lembar Persetujuan Keikutsertaan dalam Penelitian

**Lembar Persetujuan
Keikutsertaan dalam Penelitian**

Penelitian : Identifikasi Protein Antigenik *Mycobacterium tuberculosis*,
Sebagai Bahan Diagnostik Tuberkulosis
Peneliti : Yohandromeda Syamsu, S.KM

Persetujuan dari Pasien

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama :
Usia :
Alamat :

Saya mengerti sepenuhnya resiko dan manfaat dari keikutsertaan saya pada penelitian ini dan menyatakan setuju untuk ikut serta.

Surabaya, November 2007

(.....)
Nama Jelas, Tanda Tangan atau Cap Jempol

Persetujuan dari Penanggungjawab/Keluarga

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama Lengkap :
Hubungan dengan pasien :
Alamat :

Saya mengerti sepenuhnya resiko dan manfaat dari keikutsertaan keluarga saya pada penelitian ini dan menyatakan setuju bila keluarga saya untuk ikut serta.

Surabaya, November 2007

(.....)
Nama Jelas, Tanda Tangan atau Cap Jempol

Lampiran 3 : Keterangan Kelaikan Etik



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 06/EC/KEPK/FKUA/2007

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL:

**IDENTIFIKASI EPITOPE / PROTEIN ANTIGENIK MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS, SEBAGAI BAHAN DIAGNOSTIK**

PENELITI UTAMA :

Yohandromeda Syamsu, S.KM

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN :

Tropical Disease Centre (TDC) Universitas Airlangga Surabaya

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Surabaya, 8 November 2007



KETUA

[Signature]
Prof. H.M. Sajid Darmadipura, dr., SpS, SpBS
NIP : 130604278

Lampiran 4 : Keterangan Isolat *Mycobacterium tuberculosis*



DEPARTEMEN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BALAI BESAR LABORATORIUM KESEHATAN SURABAYA
Jalan Karangmenjangan No. 18 Surabaya 60286
Telp. Tata Usaha : 031-5021451, Kabag. TU / Fax.: 031-5021452 pes. 104, 031-5020388
E-mail : blksub@idola.net.id



Surabaya, 10 Desember 2007

Kontrol isolat **M. tuberculosis H37Rv**

Kultur : Warna koloni kuning, permukaan koloni tampak kering, rapuh dan tidak rata

Tes identifikasi :

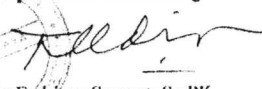
- Tes Niacin : Positif
- Tes Katalase : Negatif
- Tes Nitrat : Positif
- Tes PNB : Negatif

Tes Kepekaan :

- INH : Sensitif
- Rifampicin : Sensitif
- Streptomisin : Sensitif
- Ethambutol : Sensitif

An. Kepala Balai Besar Lab. Kes. Surabaya

Kepala Seksi Mikrobiologi


dr. Endriana Soeryat, Sp.PK

NIP. 140 193 293

Lampiran 5 : Penderita tuberkulosis yang diambil serumnya untuk bahan antibodi poliklonal

Tabel : Penderita tuberkulosis yang diambil serumnya untuk bahan antibodi poliklonal

No	Kode Sampel	Jenis Kelamin	Umur	Status Klinis (BTA)
1	1	Laki-laki	27 thn	+++
2	2	Perempuan	25 thn	++
3	3	Laki-laki	37 thn	++
4	4	Laki-laki	47 thn	+++
5	5	Laki-laki	50 thn	++
6	6	Perempuan	40 thn	++
7	7	Laki-laki	35 thn	++
8	8	Laki-laki	70 thn	+++
9	9	Perempuan	33 thn	+++
10	10	Perempuan	29 thn	+++
11	11	Laki-laki	32 thn	+++
12	12	Perempuan	33 thn	++
13	13	Perempuan	36 thn	+++
14	14	Laki-laki	55 thn	++
15	15	Perempuan	24 thn	+++

Lampiran 6 : Pemeriksaan Kadar Protein Isolat A, B, C, dan D

Spl No.	ABS	K*ABS	Ket.
1	-0,000	-0,6836	
2	0,000	0,000	Blk
3	0,316	17,8	A
4	0,229	1281,1	B
5	0,368	2059,0	C
6	0,327	1830,0	D
7	0,532	2977,7	Std

Kadar Protein :**1. Isolat A**

$$\frac{0,316}{0,532} \times 4,38 \text{ gr\%} = 2,6 \text{ gr\%}$$

2. Isolat B

$$\frac{0,229}{0,532} \times 4,38 \text{ gr\%} = 1,9 \text{ gr\%}$$

3. Isolat C

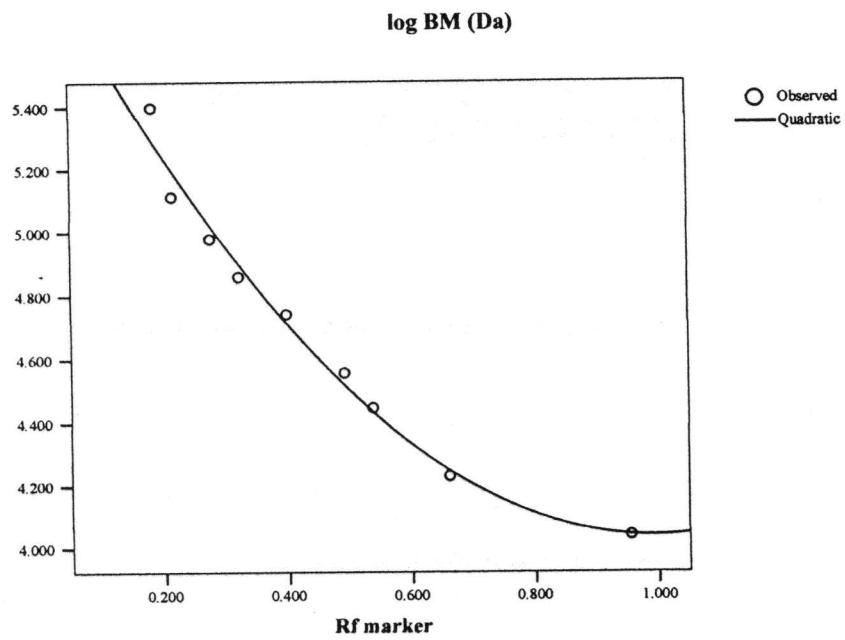
$$\frac{0,368}{0,532} \times 4,38 \text{ gr\%} = 3,01 \text{ gr\%}$$

4. Isolat D

$$\frac{0,327}{0,532} \times 4,38 \text{ gr\%} = 2,7 \text{ gr\%}$$

Lampiran 7 : Berat Molekul (kDa) Isolat A, B, C, dan D Hasil SDS-PAGE Terhadap Protein Marker

Marker			
mm	kDa	Rf	Log BM (Da)
12	250	0.185	5.398
14	130	0.215	2.114
18	95	0.277	1.978
21	72	0.323	1.857
26	55	0.4	1.74
32	36	0.492	1.556
35	28	0.538	1.447
43	17	0.662	1.23
62	11	0.954	1.041



Lampiran 7 : (Lanjutan)

Quadratic

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.992	.983	.978	.065

The independent variable is Rf marker.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1.477	2	.738	176.981	.000
Residual	.025	6	.004		
Total	1.502	8			

The independent variable is Rf marker.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf marker	-3.815	.427	-2.162	-8.924	.000
Rf marker ** 2	1.926	.377	1.238	5.108	.002
(Constant)	5.929	.103		57.813	.000

$$\text{Log Y} = 5.929 - 3.815x + 1.926x^2$$

Berat Molekul (kDa) Isolat A, B, C, dan D Hasil SDS-PAGE Terhadap Protein Marker

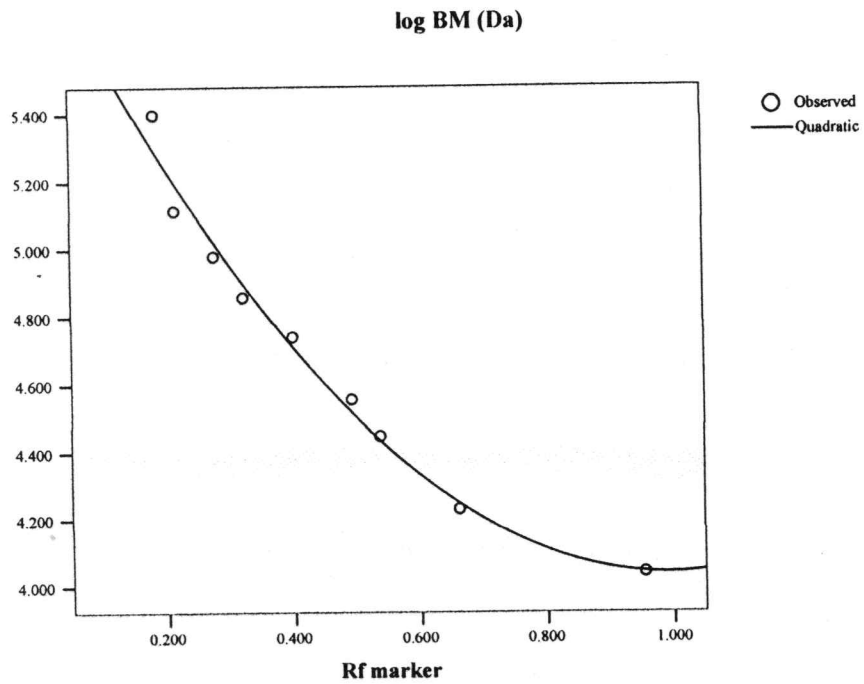
Sampel A			Sampel B			Sampel C			Sampel D		
mm	Rf	Log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
3	0.046	5.758	3	0.046	5.758	3	0.046	5.758	4	0.062	5.700
10	0.154	5.387	10	0.154	5.387	9	0.138	5.439	8	0.123	5.489
19	0.292	4.979	19	0.292	4.979	15	0.231	5.151	17	0.262	5.062
22	0.338	4.860				16	0.246	5.107	19	0.292	4.979
23	0.354	4.820				19	0.292	4.979	23	0.354	4.820
28	0.431	4.643				23	0.354	4.820	36	0.554	4.407
29	0.446	4.611				31	0.477	4.547	42	0.646	4.268
31	0.477	4.547				42	0.646	4.268	43	0.662	4.248
34	0.523	4.461				45	0.692	4.211	47	0.723	4.178
38	0.585	4.356				54	0.831	4.089	54	0.831	4.089
42	0.646	4.268									
45	0.692	4.211									
48	0.738	4.163									
54	0.831	4.089									
57	0.877	4.065									

Lampiran 7 : (Lanjutan)

No	BM Marker (kDa)	BM Isolat Terhadap Marker			
		Isolat A	Isolat B	Isolat C	Isolat D
1	250	573	573	573	501
2	130	244	244	275	308
3	95	95	95	142	115
4	72	72		128	95
5	55	66		95	66
6	36	44		66	26
7	28	41		35	19
8	17	35		19	17
9	11	29		16	15
10		23		12	12
11		19			
12		16			
13		15			
14		12			

Lampiran 8 : Reaktivitas berat molekul protein (kDa) isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Marker			
mm	kDa	Rf	Log BM (Da)
12	250	0.185	5.398
14	130	0.215	2.114
18	95	0.277	1.978
21	72	0.323	1.857
26	55	0.4	1.74
32	36	0.492	1.556
35	28	0.538	1.447
43	17	0.662	1.23
62	11	0.954	1.041



Lampiran 8 : (Lanjutan)

Reaktivitas berat molekul protein (kDa) isolat A terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Sampel 1			Sampel 2			Sampel 3			Sampel 4			Sampel 5		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
4	0.062	5.700	4	0.062	5.700	4	0.062	5.700	4	0.062	5.700	4	0.062	5.700
9	0.138	5.439	8	0.123	5.489	23	0.354	4.820	18	0.277	5.020	18	0.277	5.020
24	0.369	4.784	24	0.369	4.784	24	0.369	4.784	20	0.308	4.937	20	0.308	4.937
26	0.4	4.711	26	0.4	4.711	26	0.4	4.711	22	0.338	4.860	22	0.338	4.860
29	0.446	4.611	30	0.462	4.578	28	0.431	4.643	25	0.385	4.746	24	0.369	4.784
30	0.462	4.578	33	0.508	4.488	30	0.462	4.578	26	0.4	4.711	28	0.431	4.643
31	0.477	4.547	36	0.554	4.407	33	0.508	4.488	27	0.415	4.677	30	0.462	4.578
33	0.508	4.488	42	0.646	4.268	46	0.708	4.193	30	0.462	4.578	33	0.508	4.488
35	0.538	4.434	47	0.723	4.178	44	0.677	4.229	33	0.508	4.488	40	0.615	4.311
39	0.6	4.333	60	0.923	4.049	47	0.723	4.178	35	0.538	4.434	44	0.677	4.229
40	0.615	4.311	63	0.969	4.041	55	0.846	4.080	39	0.6	4.333	45	0.692	4.211
48	0.738	4.163				59	0.908	4.053	44	0.677	4.229	46	0.708	4.193
60	0.923	4.049				60	0.923	4.049	47	0.723	4.178	48	0.738	4.163
63	0.969	4.041				63	0.969	4.041	60	0.923	4.049	54	0.831	4.089
64	0.985	4.040							63	0.969	4.041	55	0.846	4.080
												60	0.923	4.049
												63	0.969	4.041

Sampel 6			Sampel 7			Sampel 8			Sampel 9			Sampel 10		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
4	0.062	5.700	4	0.062	5.700	4	0.062	5.700	4	0.062	5.700	4	0.062	5.700
10	0.154	5.387	10	0.154	5.387	18	0.277	5.020	9	0.138	5.439	10	0.154	5.387
18	0.277	5.020	23	0.354	4.820	25	0.385	4.746	14	0.215	5.198	17	0.265	5.053
24	0.369	4.784	31	0.477	4.547	29	0.446	4.611	19	0.292	4.979	20	0.308	4.937
29	0.446	4.611	33	0.508	4.488	31	0.477	4.547	21	0.323	4.898	21	0.323	4.898
31	0.477	4.547	39	0.6	4.333	40	0.615	4.311	24	0.369	4.784	23	0.354	4.820
33	0.508	4.488	44	0.677	4.229	44	0.677	4.229	28	0.431	4.643	28	0.431	4.643
40	0.615	4.311	46	0.708	4.193	47	0.723	4.178	30	0.462	4.578	31	0.477	4.547
44	0.677	4.229	60	0.923	4.049	60	0.923	4.049	33	0.508	4.488	40	0.615	4.311
46	0.708					63	0.969	4.041	35	0.538	4.434	43	0.662	4.248
47	0.723								39	0.6	4.333	47	0.723	4.178
60	0.923								40	0.615	4.311	60	0.923	4.049
63	0.969								44	0.677	4.229	62	0.954	4.042
									47	0.723				
									60	0.923				
									62	0.954				

Lampiran 8 : (Lanjutan)

Sampel 11			Sampel 12			Sampel 13			Sampel 14			Isolat D		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
4	0.062	5.700	4	0.062	5.700	4	0.062	5.700	4	0.062	5.700	4	0.062	5.700
10	0.154	5.387	11	0.169	5.339	10	0.154	5.387	19	0.292	4.979	10	0.154	5.387
19	0.292	4.979	18	0.277	5.020	15	0.231	5.151	25	0.385	4.746	19	0.292	4.979
24	0.369	4.784	20	0.308	4.937	19	0.292	4.979	29	0.446	4.611	22	0.338	4.860
27	0.415	4.677	22	0.338	4.860	24	0.369	4.784	30	0.462	4.578	25	0.385	4.746
28	0.431	4.643	23	0.354	4.820	29	0.446	4.611	33	0.508	4.488	27	0.415	4.677
30	0.462	4.578	25	0.385	4.746	31	0.477	4.547	35	0.538	4.434	33	0.508	4.488
33	0.508	4.488	28	0.431	4.643	35	0.538	4.434	38	0.585	4.356	35	0.538	4.434
35	0.538	4.434	31	0.477	4.547	37	0.569	4.382	40	0.615	4.311	39	0.6	4.333
39	0.6	4.333	35	0.538	4.434	40	0.615	4.311	42	0.646	4.268	44	0.677	4.229
42	0.646	4.268	40	0.615	4.311	42	0.646	4.268	44	0.677	4.229	47	0.723	4.178
44	0.677	4.229	42	0.646	4.268	44	0.677	4.229	47	0.723	4.178	50	0.769	4.134
48	0.738	4.163	45	0.692	4.211	47	0.723	4.178	50	0.769	4.134	53	0.815	4.099
55	0.846	4.080	48	0.738	4.163	51	0.785	4.121	55	0.846	4.080	60	0.923	4.049
60	0.923	4.049	51	0.785	4.121	55	0.846	4.080	60	0.923	4.049	63	0.969	4.041
63	0.969	4.041	58	0.892	4.058	60	0.923	4.049	63	0.969	4.041			
			60	0.923	4.049	63	0.969	4.041						
			63	0.969	4.041									

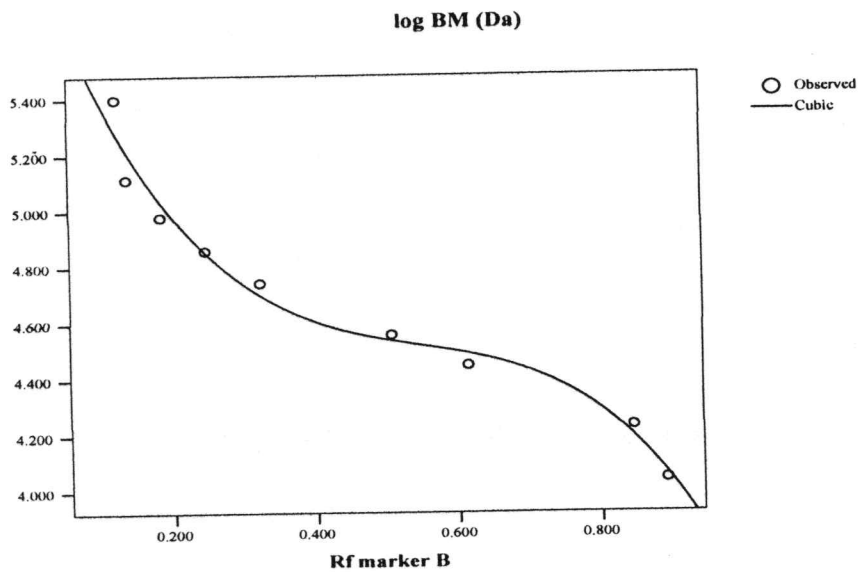
No	Marker (kDa)	Berat Molekul Protein (kDa) Serum Penderita Tuberkulosis terhadap Isolat A														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	250	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501	501
2	130	275	308	66	95	95	248	248	95	275	248	248	218	248	95	248
3	95	61	61	61	86	86	95	66	56	158	113	95	95	142	56	95
4	72	55	55	55	72	72	61	37	41	95	86	61	86	95	41	72
5	55	41	38	44	56	61	41	31	37	79	79	48	72	61	38	56
6	36	38	31	38	55	44	37	22	20	61	66	44	66	41	31	48
7	28	37	26	31	48	38	31	17	17	44	44	38	56	37	28	31
8	17	31	19	17	38	31	20	16	15	38	37	31	44	28	23	28
9	11	28	15	16	31	20	17	11	11	31	20	28	37	24	20	22
10		22	11	15	28	17	16		11	28	18	22	28	20	19	17
11		20	11	12	22	16	15			22	15	19	20	19	17	15
12		15		11	17	16	11			20	11	17	19	17	15	14
13		11		11	15	15	11			17	11	15	16	15	14	13
14		11		11	11	12				15		12	15	13	12	11
15		11			11	12				11		11	13	12	11	11
16						11				11		11	11	11		
17						11						11	11			
18												11				

Lampiran 9 : Reaktifitas berat molekul protein (kDa) isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Case Summaries^a

		BM kDa	log BM (Da)	Rf marker B
1		250	5.398	.123
2		130	5.114	.138
3		95	4.978	.185
4		72	4.857	.246
5		55	4.740	.323
6		36	4.556	.508
7		28	4.447	.615
8		17	4.230	.846
9		11	4.041	.892
Total	N	9	9	9
	Sum	694	42.361	3.876
	Mean	77.11	4.70678	.43067
	Median	55.00	4.74000	.32300
	Std. Deviation	75.506	.433250	.298255

a. Limited to first 100 cases.



Lampiran 9 : (Lanjutan)

Cubic

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.989	.978	.965	.081

The independent variable is Rf marker B.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1.469	3	.490	74.585	.000
Residual	.033	5	.007		
Total	1.502	8			

The independent variable is Rf marker B.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf marker B	-7.345	1.853	-5.057	-3.963	.011
Rf marker B ** 2	12.685	4.263	8.913	2.975	.031
Rf marker B ** 3	-7.727	2.810	-4.914	-2.750	.040
(Constant)	6.007	.213		28.140	.000

$$\text{Log } Y = 6.007 - 7.345x + 12.685x^2 - 7.727x^3$$

Reaktifitas berat molekul protein (kDa) isolat B terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Sampel 1			Sampel 2			Sampel 3			Sampel 4			Sampel 5		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
6	0.092	5.433	6	0.092	5.433	6	0.092	5.433	6	0.092	5.433	6	0.092	5.433
10	0.154	5.148	30	0.462	4.559	11	0.169	5.091	11	0.169	5.091	35	0.538	4.524
52	0.8	4.293	34	0.523	4.530	24	0.369	4.636	21	0.323	4.698	39	0.6	4.498
63	0.969	3.770	39	0.6	4.498	27	0.415	4.591	24	0.369	4.636	63	0.969	3.770
						30	0.462	4.559	38	0.585				
						49	0.754	4.368	51	0.785				
						63	0.969	3.770	63	0.969				

Sampel 6			Sampel 7			Sampel 8			Sampel 9			Sampel 10		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
6	0.092	5.433	6	0.092	5.433	6	0.092	5.433	6	0.092	5.433	6	0.092	5.433
19	0.292	4.751	24	0.369	4.636	24	0.369	4.636	24	0.369	4.636	46	0.708	4.423
24	0.369	4.636	37	0.569	4.511	63	0.969	3.770	46	0.708				
39	0.6	4.498	52	0.8	4.293				59	0.908				
63	0.969	3.770							62	0.954				
									64	0.985				

Lampiran 9 : (Lanjutan)

Sampel 11			Sampel 12			Sampel 13			Sampel 14			Isolat D		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
6	0.092	5.433	6	0.092	5.433	6	0.092	5.433	6	0.092	5.433	6	0.092	5.433
46	0.708	4.423	46	0.708	4.423	19	0.292	4.751	24	0.369	4.636	19	0.292	4.751
63	0.969	3.770	54	0.831	4.229	37	0.569	4.511	39	0.6	4.498	39	0.6	4.498
64	0.985	3.695	63	0.969	3.770	44	0.677	4.451	46	0.708	4.423	62	0.954	3.836
			64	0.985	3.695	46	0.708	4.423	62	0.954	3.836	64	0.985	3.695
						62	0.954	3.836	64	0.985	3.695			

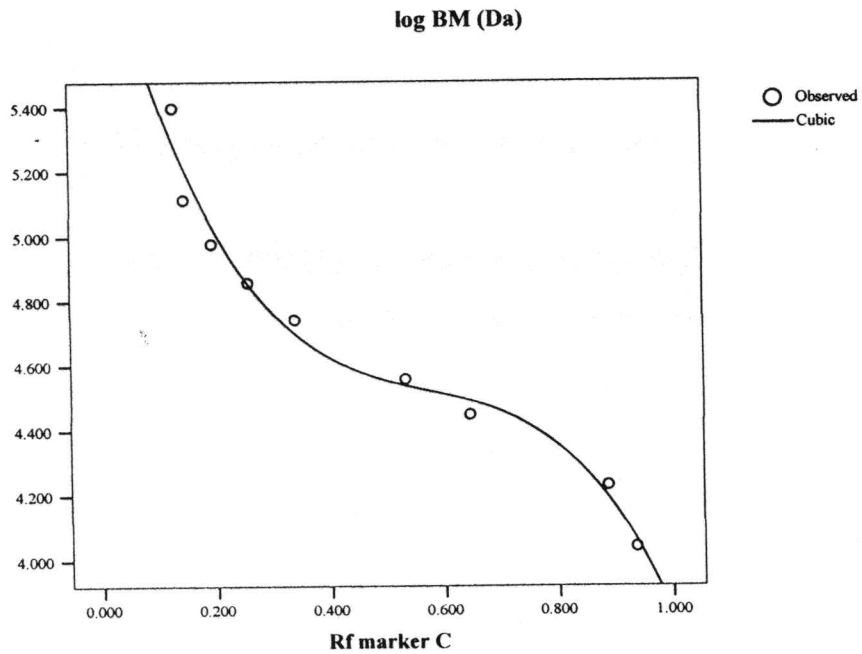
No	Marker (kDa)	Berat Molekul Protein (kDa) Serum Penderita Tuberkulosis terhadap Isolat B														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	250	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271	271
2	130	123	36	123	123	33	56	43	43	43	26	26	26	56	43	56
3	95	20	34	43	55	31	43	32	6	26		6	17	32	31	31
4	72	6	31	39	43	6	31	20		10		5	6	28	26	7
5	55			36	32		6			7			5	26	7	5
6	36			23	21					6				7	5	
7	28			6	6											
8	17															
9	11															

Lampiran 10 : Reaktifitas berat molekul protein (kDa) isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Case Summaries^a

		BM kDa	log BM (Da)	Rf marker C
1		250	5.398	.129
2		130	5.114	.145
3		95	4.978	.194
4		72	4.857	.258
5		55	4.740	.339
6		36	4.556	.532
7		28	4.447	.645
8		17	4.230	.887
9		11	4.041	.935
Total	Sum	694	42.361	4.064
	Mean	77.11	4.70678	.45156
	Std. Deviation	75.506	.433250	.312592

a. Limited to first 100 cases.



Lampiran 10 : (Lanjutan)

Cubic

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.989	.978	.965	.081

The independent variable is Rf marker C.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1.469	3	.490	74.980	.000
Residual	.033	5	.007		
Total	1.502	8			

The independent variable is Rf marker C.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf marker C	-7.016	1.765	-5.062	-3.974	.011
Rf marker C ** 2	11.558	3.874	8.925	2.984	.031
Rf marker C ** 3	-6.715	2.436	-4.920	-2.757	.040
(Constant)	6.009	.213		28.180	.000

Log Y = 6.009-7.016x+11.558x^2-6.715x^3

Reaktifitas berat molekul protein (kDa) isolat C terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Sampel 1			Sampel 2			Sampel 3			Sampel 4			Sampel 5		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
3	0.048	5.698	3	0.048	5.698	3	0.048	5.698	3	0.048	5.698	3	0.048	5.698
15	0.242	4.893	16	0.258	4.853	16	0.258	4.853	10	0.161	5.151	12	0.194	5.034
17	0.274	4.816	18	0.29	4.783	18	0.29	4.783	12	0.194	5.034	18	0.29	4.783
25	0.403	4.619	22	0.355	4.674	24	0.387	4.636	14	0.226	4.936	20	0.323	4.722
26	0.419	4.604	24	0.387	4.636	25	0.403	4.619	16	0.258	4.853	21	0.339	4.697
31	0.5	4.551	25	0.403	4.619	29	0.468	4.569	18	0.29	4.783	24	0.387	4.636
35	0.565	4.523	27	0.435	4.591	31	0.5	4.551	21	0.339	4.697	26	0.419	4.604
38	0.613	4.505	29	0.468	4.569	36	0.581	4.517	24	0.387	4.636	29	0.468	4.569
39	0.629	4.498	32	0.516	4.544	38	0.613	4.505	29	0.468	4.569	31	0.5	4.551
44	0.71	4.451	36	0.581	4.517	44	0.71	4.451	31	0.5	4.551	36	0.581	4.517
54	0.871	4.229	38	0.613	4.505	52	0.839	4.293	36	0.581	4.517	38	0.613	4.505
			39	0.629	4.498	55	0.887	4.193	38	0.613	4.505	44	0.71	4.451
			41	0.661	4.482	57	0.919	4.111	40	0.645	4.490	53	0.855	4.262
			44	0.71	4.451	59	0.952	4.011	52	0.839	4.293	55	0.887	4.193
			52	0.839	4.293				55	0.887	4.193	57	0.919	4.111
			55	0.887	4.193				59	0.952	4.011			
			57	0.919	4.111									

Lampiran 10 : (Lanjutan)

Sampel 6			Sampel 7			Sampel 8			Sampel 9			Sampel 10		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
3	0.048	5.698	3	0.048	5.698	3	0.048	5.698	3	0.048	5.698	4	0.065	5.600
12	0.194	5.034	13	0.21	4.983	12	0.194	5.034	8	0.129	5.282	13	0.21	4.983
14	0.226	4.936	19	0.306	4.752	16	0.258	4.853	12	0.194	5.034	16	0.258	4.853
19	0.306	4.752	21	0.339	4.697	17	0.274	4.816	14	0.226	4.936	18	0.29	4.783
23	0.371	4.654	28	0.452	4.579	19	0.306	4.752	16	0.258	4.853	21	0.339	4.697
24	0.387	4.636	29	0.468	4.569	23	0.371	4.654	18	0.29	4.783	23	0.371	4.654
26	0.419	4.604	31	0.5	4.551	26	0.419	4.604	23	0.371	4.654	27	0.435	4.591
29	0.468	4.569	36	0.581	4.517	27	0.435	4.591	26	0.419	4.604	29	0.468	4.569
31	0.5	4.551	39	0.629	4.498	29	0.468	4.569	28	0.452	4.579	31	0.5	4.551
36	0.581	4.517	41	0.661	4.482	32	0.516	4.544	31	0.5	4.551	36	0.581	4.517
38	0.613	4.505	45	0.726	4.438	36	0.581	4.517	36	0.581	4.517	38	0.613	4.505
45	0.726	4.438	54	0.871	4.229	39	0.629	4.498	38	0.613	4.505	44	0.71	4.451
53	0.855	4.262	56	0.903	4.154	44	0.71	4.451	44	0.71	4.451	54	0.871	4.229
56	0.903	4.154				53	0.855	4.262	53	0.855	4.262	56	0.903	4.154
59	0.952	4.011				56	0.903	4.154	55	0.887	4.193			
						58	0.935	4.064						

Sampel 11			Sampel 12			Sampel 13			Sampel 14			Isolat D		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
3	0.048	5.698	3	0.048	5.698	3	0.048	5.698	3	0.048	5.698	3	0.048	5.698
12	0.194	5.034	7	0.113	5.354	8	0.129	5.282	7	0.113	5.354	7	0.113	5.354
14	0.226	4.936	8	0.129	5.282	12	0.194	5.034	15	0.242	4.893	18	0.29	4.783
18	0.29	4.783	17	0.274	4.816	15	0.242	4.893	17	0.274	4.816	23	0.371	4.654
21	0.339	4.697	23	0.371	4.654	18	0.29	4.783	18	0.29	4.783	24	0.387	4.636
23	0.371	4.654	24	0.387	4.636	23	0.371	4.654	23	0.371	4.654	28	0.452	4.579
24	0.387	4.636	26	0.419	4.604	26	0.419	4.604	26	0.419	4.604	30	0.484	4.559
25	0.403	4.619	27	0.435	4.591	28	0.452	4.579	28	0.452	4.579	35	0.565	4.523
27	0.435	4.591	29	0.468	4.569	30	0.484	4.559	30	0.484	4.559	39	0.629	4.498
29	0.468	4.569	31	0.5	4.551	31	0.5	4.551	31	0.5	4.551	44	0.71	4.451
31	0.5	4.551	34	0.548	4.530	34	0.548	4.530	34	0.548	4.530	53	0.855	4.262
35	0.565	4.523	38	0.613	4.505	36	0.581	4.517	36	0.581	4.517	54	0.871	4.229
38	0.613	4.505	45	0.726	4.438	39	0.629	4.498	39	0.629	4.498			
40	0.645	4.490	53	0.855	4.262	40	0.645	4.490	41	0.661	4.482			
43	0.694	4.462	55	0.887	4.193	44	0.71	4.451	44	0.71	4.451			
45	0.726	4.438				52	0.839	4.293	52	0.839	4.293			
53	0.855	4.262				54	0.871	4.229	54	0.871	4.229			
55	0.887	4.193												

Lampiran 10 : (Lanjutan)

No	Marker (kDa)	Berat Molekul Protein (kDa) Serum Penderita Tuberkulosis terhadap Isolat C														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	250	499	499	499	499	499	499	499	499	499	499	499	499	499	499	499
2	130	78	72	72	142	95	95	95	95	191	95	95	191	191	191	191
3	95	65	61	61	95	61	86	61	72	95	72	86	61	95	86	61
4	72	42	47	43	86	53	61	50	71	86	61	61	45	86	65	45
5	55	40	43	42	72	50	45	38	61	72	50	50	43	61	61	43
6	36	36	42	37	61	43	43	37	45	61	45	45	40	45	45	38
7	28	33	39	36	50	40	40	36	40	45	38	43	38	40	40	36
8	17	32	37	33	43	37	37	33	38	40	37	40	37	38	38	33
9	11	31	35	32	37	36	36	32	37	38	36	38	36	37	36	32
10		28	33	28	36	33	33	30	36	36	33	37	33	36	34	28
11		17	32	20	33	32	32	27	33	33	32	36	32	34	33	18
12			31	17	32	28	27	17	32	32	28	33	27	33	32	17
13			30	13	28	18	18	14	28	28	18	32	18	32	31	
14			28	10	20	17	14		18	18	14	31	14	31	28	
15			20		17	13	10		14	14		28		28	18	
16			17		10				10			27		18	14	
17			13									18		14		
18												14				

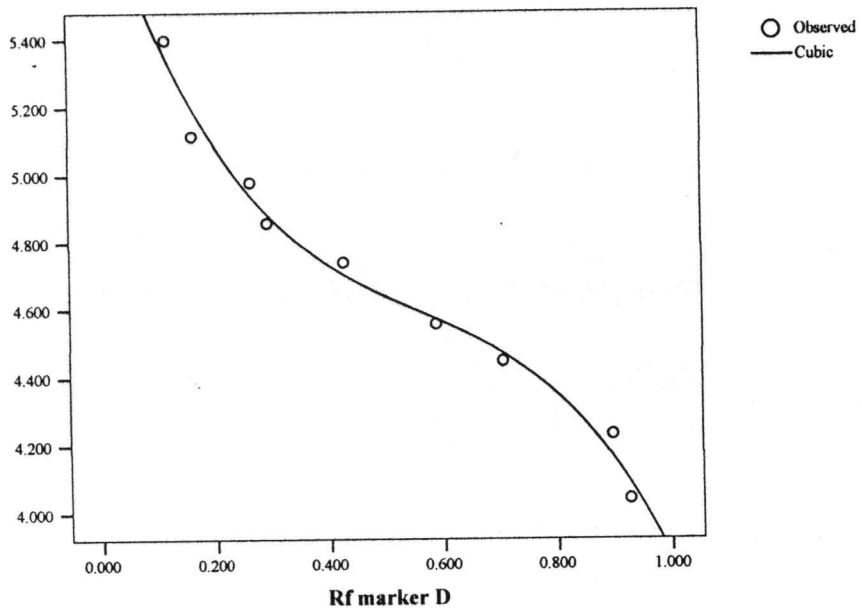
Lampiran 11 : Reaktifitas berat molekul protein (kDa) isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Case Summaries^a

		BM kDa	log BM (Da)	Rf marker D
1		250	5.398	.118
2		130	5.114	.162
3		95	4.978	.265
4		72	4.857	.294
5		55	4.740	.426
6		36	4.556	.588
7		28	4.447	.706
8		17	4.230	.897
9		11	4.041	.926
Total	Sum	694	42.361	4.382
	Mean	77.11	4.70678	.48689
	Std. Deviation	75.506	.433250	.306395

a. Limited to first 100 cases.

log BM (Da)



Lampiran 11 : (Lanjutan)

Cubic

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.993	.986	.977	.065

The independent variable is Rf marker D.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1.480	3	.493	116.524	.000
Residual	.021	5	.004		
Total	1.502	8			

The independent variable is Rf marker D.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf marker D	-5.318	1.251	-3.761	-4.250	.008
Rf marker D ** 2	8.126	2.734	6.194	2.972	.031
Rf marker D ** 3	-4.809	1.730	-3.481	-2.780	.039
(Constant)	5.866	.156		37.524	.000

$$\text{Log Y} = 5.866 - 5.318x + 8.126x^2 - 4.809x^3$$

Reaktivitas berat molekul protein (kDa) isolat D terhadap antibodi poliklonal dalam serum pasien penderita tuberkulosis

Sampel 1			Sampel 2			Sampel 3			Sampel 4			Sampel 5		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
3	0.044	5.647	3	0.044	5.647	3	0.044	5.647	3	0.044	5.647	3	0.044	5.647
10	0.147	5.245	30	0.441	4.689	24	0.353	4.790	20	0.294	4.883	34	0.5	4.637
43	0.632	4.537	37	0.544	4.604	26	0.382	4.752	23	0.338	4.811	37	0.544	4.604
63	0.926	4.091	43	0.632	4.537	37	0.544	4.604	24	0.353	4.790	41	0.603	4.560
			62	0.912	4.127	41	0.603	4.560	28	0.412	4.718	42	0.618	4.548
			63	0.926	4.091	43	0.632	4.537	38	0.559	4.592	53	0.779	4.381
						48	0.706	4.470	62	0.912	4.127	62	0.912	4.127
						51	0.75	4.420	64	0.941	4.050	63	0.926	4.091
						53	0.779	4.381						
						54	0.794	4.359						
						62	0.912	4.127						
						63	0.926	4.091						

Lampiran 11 : (Lanjutan)

Sampel 6			Sampel 7			Sampel 8			Sampel 9			Sampel 10		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
3	0.044	5.647	3	0.044	5.647	3	0.044	5.647	3	0.044	5.647	3	0.044	5.647
19	0.279	4.910	4	0.059	5.580	4	0.059	5.580	23	0.338	4.811	4	0.059	5.580
21	0.309	4.857	24	0.353	4.790	24	0.353	4.790	25	0.368	4.770	34	0.5	4.637
26	0.382	4.752	37	0.544	4.604	38	0.559	4.592	37	0.544	4.604	43	0.632	4.537
34	0.5	4.637	38	0.559	4.592	54	0.794	4.359	42	0.618	4.548	48	0.706	4.470
37	0.544	4.604	51	0.75	4.420	61	0.897	4.163	43	0.632	4.537	54	0.794	4.359
41	0.603	4.560	61	0.897	4.163	62	0.912	4.127	46	0.676	4.499	63	0.926	4.091
42	0.618	4.548	62	0.912	4.127	64	0.941	4.050	48	0.706	4.470			
62	0.912	4.127	64	0.941	4.050				61	0.897	4.163			
63	0.926	4.091							63	0.926	4.091			
										Isol				

Sampel 11			Sampel 12			Sampel 13			Sampel 14			Isol D		
mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da	mm	Rf	log y Da
4	0.059	5.580	3	0.044	5.647	4	0.059	5.580	4	0.059	5.580	3	0.044	5.647
37	0.544	4.604	4	0.059	5.580	14	0.206	5.073	29	0.426	4.703	19	0.279	4.910
39	0.574	4.581	39	0.574	4.581	19	0.279	4.910	38	0.559	4.592	37	0.544	4.604
43	0.632	4.537	46	0.676	4.499	26	0.382	4.752	44	0.647	4.524	62	0.912	4.127
48	0.706	4.470	61	0.897	4.163	35	0.515	4.626	61	0.897	4.163	63	0.926	4.091
54	0.794	4.359	63	0.926	4.091	36	0.529	4.615	63	0.926	4.091			
62	0.912	4.127				43	0.632	4.537	64	0.941	4.050			
63	0.926	4.091				52	0.765	4.400						
64	0.941	4.050				54	0.794	4.359						
						61	0.897	4.163						
						63	0.926	4.091						

No	Marker (kDa)	Berat Molekul Protein (kDa) Serum Penderita Tuberkulosis terhadap Isolat D														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	250	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	380	380	444
2	130	157	49	62	76	43	76	380	380	62	380	40	380	118	49	76
3	95	34	40	56	65	40	72	62	62	56	43	38	38	76	40	40
4	72	12	34	40	62	36	56	40	40	40	34	34	30	56	34	13
5	55		13	36	52	34	43	26	24	36	30	30	13	43	13	12
6	36		12	34	40	24	40	13	13	34	24	24	12	40	12	
7	28			30	13	13	36	12	12	32	12	13		34	11	
8	17			26	12	12	34			30		12		26		
9	11			24			13			13		11		24		
10				23			12			12				13		
11				13										12		
12				12												