

DISERTASI

URUTAN ASAM AMINO DARI EPITOP REGIO
N-TERMINUS ANTIGEN ESAT-6 SEBAGAI MARKA DIAGNOSTIK
PENYAKIT TUBERKULOSIS PARU AKTIF



JUSAK NUGRAHA

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**URUTAN ASAM AMINO DARI EPITOP REGIO
N-TERMINUS ANTIGEN ESAT-6 SEBAGAI MARKA DIAGNOSTIK
PENYAKIT TUBERKULOSIS PARU AKTIF**

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Rabu
Tanggal : 28 April 2004
Pukul 10.⁰⁰ WIB

Oleh :

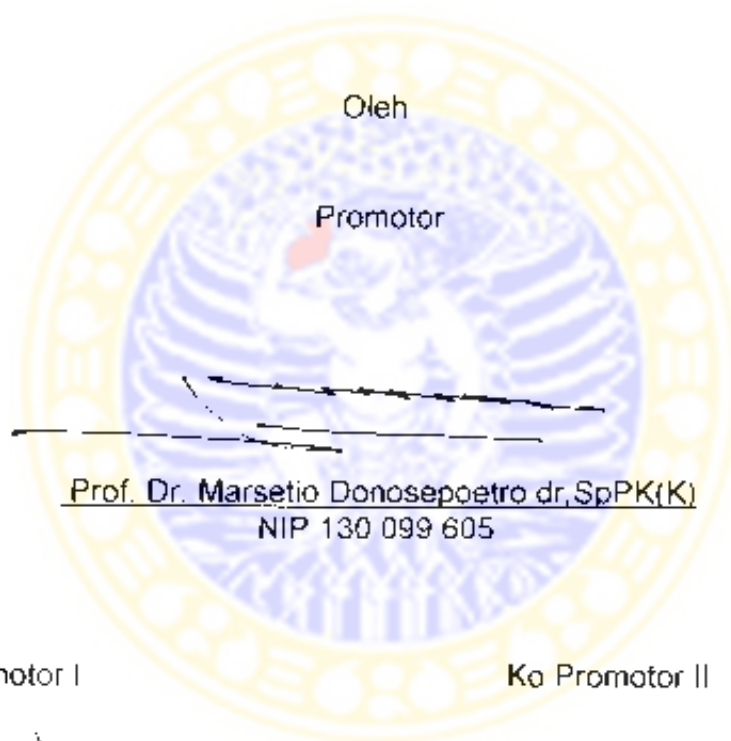
JUSAK NUGRAHA
NIM. 099813119 D

**REKAM
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI

Pada tanggal 6 Juli 2004



Prof. Dr. Marsetio Donosepoetro dr, SpPK(K)
NIP 130 099 605

Ko Promotor I

Ko Promotor II

Prof. Dr Indro Handojo, dr, SpPK(K)
NIP 140 030 034

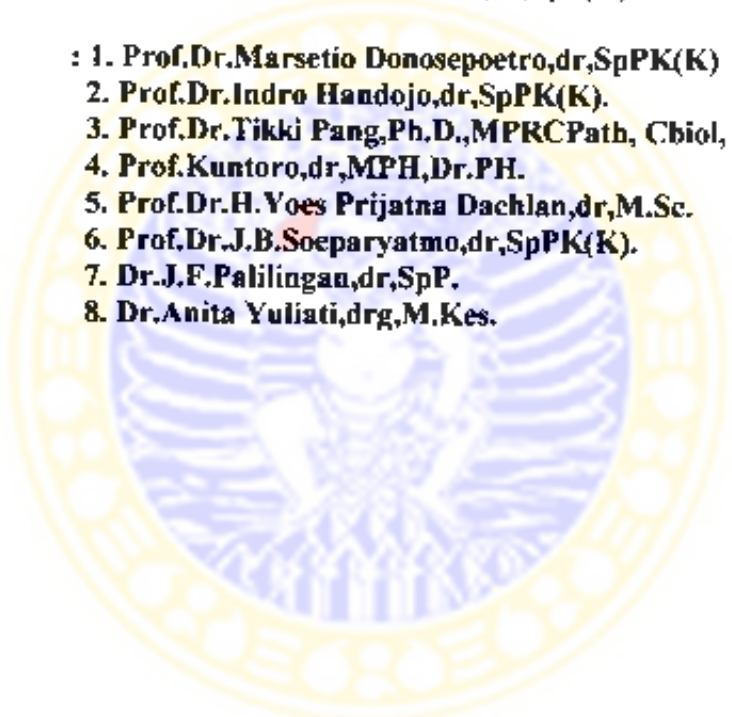
Prof. Tikki Pang, Ph D, MPRCPATH, FIBiol
No Paspot RI F 67844

**Telah diuji pada ujian tertutup
Tanggal 2 April 2004**

SUSUNAN PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof.Dr.H.Muhammad Amin,dr,SpP(K)

**Anggota : 1. Prof.Dr.Marsetio Donosepoetro,dr,SpPK(K)
2. Prof.Dr.Indro Handojo,dr,SpPK(K).
3. Prof.Dr.Tikki Pang,Ph.D.,MPRCPath, Cbiol, FIBiol
4. Prof.Kuntoro,dr,MPH,Dr.PH.
5. Prof.Dr.H.Voes Prijatna Dachlan,dr,M.Sc.
6. Prof.Dr.J.B.Soeparyatmo,dr,SpPK(K).
7. Dr.J.F.Palilingan,dr,SpP.
8. Dr.Anita Yulianti,drg,M.Kes.**



**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 2619 /J03/PP/2004
Tanggal : 13 April 2004**

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya ucapkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena atas perkenannya saya dapat menyelesaikan disertasi ini dengan seluruh kegiatan akademis yang berkaitan.

Selama menjalankan pendidikan Doktor, sungguh banyak bantuan dan dorongan moril dari berbagai pihak. Untuk itu perkenankanlah saya menyampaikan terima kasih kepada:

Prof. Dr. Marsetio Donosepoetro, dr, SpPK (K), atas kesediaannya menjadi Promotor, yang dengan penuh kesabaran dan kearifan yang mendalam, telah banyak memberikan dorongan, bimbingan dan saran-saran sampai dengan selesainya disertasi ini.

Prof. Dr. Indro Handojo, dr, SpPK(K), atas kesediaannya menjadi Kopromotor I, yang dengan penuh perhatian, pengertian dan kesabaran terus memberikan dorongan dan membangkitkan semangat saya, serta memberikan alternatif pemecahan masalah yang saya hadapi dan memberikan masukan serta bimbingan sampai dengan selesainya disertasi ini.

Prof Dr. Tikki Pang, B Soc (Hons) (ANU), PhD (ANU), MPRCPATH, Cbiol, FIBiol, atas kesediaannya selaku Kopromotor II di tengah kesibukan beliau menjadi konsultan WHO di Jenewa, yang dengan penuh kesabaran, pengertian dan perhatian telah banyak memberikan dorongan, bimbingan dan saran-saran sampai dengan selesainya disertasi ini.

Pemerintah Republik Indonesia melalui Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dana BPPS dalam mengikuti pendidikan program doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Rektor Universitas Airlangga **Prof.Dr.med.H.Puruhito,dr,SpB (TKV)** dan mantan rektor **Prof.H.Soedarto,dr,DTMH,PhD**, atas ijin yang diberikan sehingga saya dapat melanjutkan pendidikan pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr, SpP, selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan mantan direktur **Prof.Dr.H.Soedijono Tirtowidardjo, dr, Sp THT**, dan semua asisten direktur yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk dapat melanjutkan pendidikan pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga, juga kepada staf administrasi yang banyak membantu demi kelancaran pendidikan doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof.Dr.Juliati Hood A, dr ,MS,SpPA,FIAC, selaku ketua program studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan mantan ketua program studi Ilmu Kedokteran **Prof. Dr. H. Pitono Soeparto dr, SpA(K)**, yang telah banyak memperlancar proses akademik kepada saya selama belajar.

Prof.Dr.H.MS Wijadi,dr, SpTHT, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin untuk melanjutkan pendidikan program doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

SP Edijanto, dr,SpPK(K), Kepala Laboratorium Patologi Klinik FK Unair, yang telah memberikan ijin untuk melanjutkan pendidikan program doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof.Hood Alsagaff,dr,SpP, Kepala Laboratorium Ilmu Penyakit Paru RSUD Dr.Soetomo/FK Universitas Airlangga, **Prof.Dr.Benyamin Palgunadi Margono, dr, SpP**, Kepala Poli Paru RSUD Dr.Soeotmo dan **Dr. JF Paliingan, dr,SpP**, yang telah memberikan ijin dan bantuan untuk memperoleh dan mengambil sampel penderita di Ruang dan Poliklinik Penyakit Paru.

RA Handojo, dr, SpP; Barkah, dr; Endro Kuncoro, dr; Jan Endroso,dr,SpP; M.Junus, dr, yang telah memberikan ijin, perkenan dan bantuan untuk memperoleh dan mengambil sampel para perawat sehat di RS Paru Batu dan RS Hasta Brata, Batu

Arthur P Kawilarang,dr,MS , yang telah membantu memperoleh relawan sehat dan mendatangkan beberapa bahan reagens.

Para penderita tuberkulosis paru, para perawat sehat, serta relawan sehat yang telah bersedia ikut dalam penelitian ini, sehingga kami dapat menyelesaikan disertasi ini.

Angela diPasquale, PhD, selaku Asia Manager Chiron Mimotopes Australia, yang telah membantu konsultasi, pengadaan serta *trouble shooting* dari peptida sintetik dalam bentuk kit.

Prof. Dr. Indro Handojo, dr, SpPK, Kepala Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Bag. Patologi Klinik FK Unair, **Sri Hariastuti** dan **Ketut Wirjadi**, analis, yang telah memberikan ijin, bantuan dan sumbangan tenaga selama kami bekerja dalam menyelesaikan penelitian ini.

Dr. Anita Yulianti, drg, MKes, selaku konsultan yang telah banyak membantu pelaksanaan metode *Epitope mapping* dalam penelitian ini dan saran perbaikan naskah disertasi ini.

Prof. H.Kuntoro, dr, MPH, Dr. PH, selaku konsultan metode penelitian dan statistik yang telah memberikan masukan dan arahan pada waktu ujian proposal sampai selesainya penulisan disertasi ini.

Prof. Dr. Muhammad Amin, dr, SpP, selaku konsultan dalam masalah Ilmu Penyakit Paru yang telah memberikan masukan dan arahan sampai pada selesainya penulisan disertasi ini.

Dr. J.F. Palilingan, dr, SpP, selaku konsultan yang telah banyak membantu dalam diagnosis penderita TB dan memberi banyak literatur kepustakaan.

Lindawati Alimsardjono, dr, MKes dan **Djaenal Ponari**, atas bantuannya pada pemeriksaan bakteriologi, kultur serta identifikasi kuman *Mycobacterium tuberculosis* dari spesimen penderita.

Dr. Ni Made Mertaniasih, dr, MS, yang telah membantu konsultasi masalah mikrobiologi dari kuman *Mycobacterium tuberculosis*.

Guru dan dosen saya sejak menuntut ilmu di Sekolah Dasar, Sekolah Menengah Pertama, Sekolah Menengah Atas, Fakultas Kedokteran, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, saya sampaikan penghargaan setinggi-tingginya dan terima kasih sedalam-dalamnya atas segala fasilitas, pendidikan dan bimbingan yang telah diberikan kepada saya.

Staf dosen pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga **Prof.Bambang Rahino Setokoesoemo, dr.,** almarhum **Prof.Eddy Pranowo Soedibjo,dr,MPH., Prof.Dr.Pitono Soeparto,dr,SpA(K), Prof. Purnomo Suryohudoyo,dr., Prof.H.Kunto Wibisono.,Prof.Soetandyo Wignyosoebroto MPA, Prof.Dr.Josef Glinka SVD., Prof Koentoro, dr,MPH, DrPH., Widodo JP, MS,MPH, DrPH, Prof.Dr.H.Sarmanu,drh,MS., Prof.Dr.Zainuddin,Apt, H.Fuad Amsyari,dr,MPH,PhD.,Prof.Dr,Suhartono Taat Putra,dr,MS.,Dr.Eddy Bagus Warsito, MS,SpMK.,Siti Pariani, dr,MS,PhD.,Dr,L.Dyson, MA, Prof.Dr.Indro Handoyo,dr,SpPK(K)., Dr.Irwan Setiabudi,dr,SpPK(K).**

Seluruh rekan seangkatan di Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah banyak memberikan dorongan dan masukan kepada saya.

Seluruh rekan-rekan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang telah rela menggantikan tugas saya selama belajar dan memberikan kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan ini.

Kepada almarhum kedua orang tua saya **Hiram Nugraha** dan ibunda tercinta **Sharon Nugraha**, yang telah membesarkan dan mendidik saya, yang selalu menyertai iringan doa sehingga saya sampai berkesempatan menjalankan pendidikan tertinggi di akademik,dan kepada ibu mertua **Monica Tjan Poo Tjeng**, yang selalu menyertai seluruh keluarga, saya mengucapkan banyak terima kasih dengan iringan salam hormat saya.

Kasih sayang dan terima kasih saya yang tulus kepada seluruh keluargaku, istriku, **Caecilia Mariani**, anak-anakku **Hans Kristian, Klaus Kristian** yang telah ikut memberikan dorongan, pengertian, pengorbanan dan iringan doa kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan doktor ini.

Pada akhirnya dari perjalanan panjang melelahkan yang ditempuh sampai selesainya penulisan disertasi ini, saya mohon dengan rendah hati, atas segala sesuatu yang kurang berkenan, untuk dimaafkan. Semoga Tuhan yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang selalu melimpahkan rahmat dan karuniaNya kepada semua pihak yang telah membantu saya dengan tulus ikhlas, sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan doktor ini, amin.

RINGKASAN

URUTAN ASAM AMINO DARI EPITOP REGIO N-TERMINUS ANTIGEN ESAT-6 SEBAGAI MARKA DIAGNOSTIK PENYAKIT TUBERKULOSIS PARU AKTIF

Jusak Nugraha

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 dari 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 sehat dan subyek perawat sehat. Rancangan analisis data dilakukan dengan uji Z.

Analisis dari residu asam amino 1-35 dari antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* yang dipotong dengan panjang 9 mer, saling 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 paru aktif dan perawat sehat yang terpapar *M. tuberculosis*, dan berbeda bermakna dengan

sera kontrol sehat. Epitop ini disebut epitop infeksi TB berat yaitu IHSLLD (25-30). 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.

Berpijak pada hasil analisis data yang diperoleh dalam penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Epitop infeksi TB berat IHSLLD (25-30) didapatkan baik pada penderita TB maupun pada perawat sehat yang terpapar *M. tuberculosis*.
2. Epitop protektif EAAASA (12-17) didapatkan hanya pada perawat sehat yang terpapar *M. tuberculosis*.

Beberapa hal yang disarankan untuk diteliti lebih lanjut adalah sebagai berikut :

1. Perlu diteliti tentang epitop sel-T pada manusia Indonesia yang khas pada antigen ESAT-6 *M. tuberculosis*.
2. Perlu diteliti epitop sel-B seperti pada penelitian ini dengan jumlah sampel yang lebih besar atau memeriksa regio yang lain dari urutan asam amino ESAT-6.
3. Perlu diteliti penggunaan uji diagnostik dengan menggunakan kedua epitop antigen ESAT-6 ialah epitop protektif dan epitop infeksi TB berat, pada populasi di Indonesia.
4. Perlu diteliti lebih lanjut tentang kemungkinan pengembangan epitop protektif *M. tuberculosis* untuk dijadikan vaksin DNA.

Saran tersebut di atas diperlukan untuk memecahkan beberapa permasalahan yang belum dapat dipecahkan dalam penelitian ini.

SUMMARY

The amino acid sequence of epitope from N-terminal region of ESAT-6 antigen as a diagnostic marker of active pulmonary tuberculosis.

Pulmonary TB is still a major health problem in Indonesia as well as in other countries world wide. Although BCG vaccine has succeeded to decrease the prevalence of primary TB, it has not yet succeeded to decrease the prevalence of post-primary TB.

In concordance with the advancement in the technology field, research in TB diagnostics and vaccination has been much improved. The genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* as causative agent for TB, has been completely determined so information about all genetic material of this microorganism can be obtained. ESAT-6 antigen with 6 kDa molecular weight is an antigenic protein which is secreted by *M. tuberculosis*.

There are many parts from this microorganism which are potentially immunogenic. Some important antigenic proteins are ESAT-6, 38 kDa, hsp65, hsp 70 and Ag85.

ESAT-6 as an important antigen, can be recognized by protective T-cells in experimental animals as well as humans. ESAT-6 is encoded by the RD-1 gene (Region of Difference) which is present in pathogenic *M. tuberculosis* and *M. bovis*, but is absent in the avirulent vaccine strain *M. bovis var.BCG*. By inserting gene encoding ESAT-6, an enhancement of protective immune response can be obtained in experimental animal models challenged with *M.tuberculosis*. ESAT antigen consists of 95 amino acids and has many epitopes, some of the epitopes are found in the N-terminal region which is hydrophilic and exposed to outer side. This N-terminal region may have one or more epitopes which are specifically reactive with antibody in sera from Indonesian active pulmonary TB patients, and epitopes which are specifically reactive with antibody in sera from healthy nurses working in the pulmonary disease ward.

This problem solving is done by an observational research approach with a *cross sectional design*. The research variable investigated is the frequency of amino acid overlapping common sequence (epitope) from amino acid residue 1-35 ESAT-6 antigen, which is specifically reactive with antibody (IgG) in sera of active pulmonary TB patients, healthy control and healthy nurse working in the pulmonary ward. Statistic analysis is performed using Z-test.

Amino acid residue 1-35 of antigen ESAT-6 is cut into 27 peptides, with 9-mer long, 8 mer overlapping and 1 mer offset. Reactivity with the sera from the 3 research groups was examined using B-cell epitope scanning method. The analysis of research results revealed two kinds of epitopes. The first epitope is a heavy TB infection epitope with overlapping common sequence: IHSLLD (25-30). This epitope is specifically reactive with antibody found in pulmonary TB patients and pulmonary ward nurses. The second epitope is a protective epitope with overlapping common sequence EAAASA (12-17) which is reactive specifically with antibody found in the pulmonary ward nurses group.

This protective B-cell epitope is also overlapping with a part of T-cell epitope, found in the German and Indian population and suspected also of overlapping with T-cell epitope in the Indonesian population. Therefore this B-cell epitope can also elicit a protective cellular immune response.

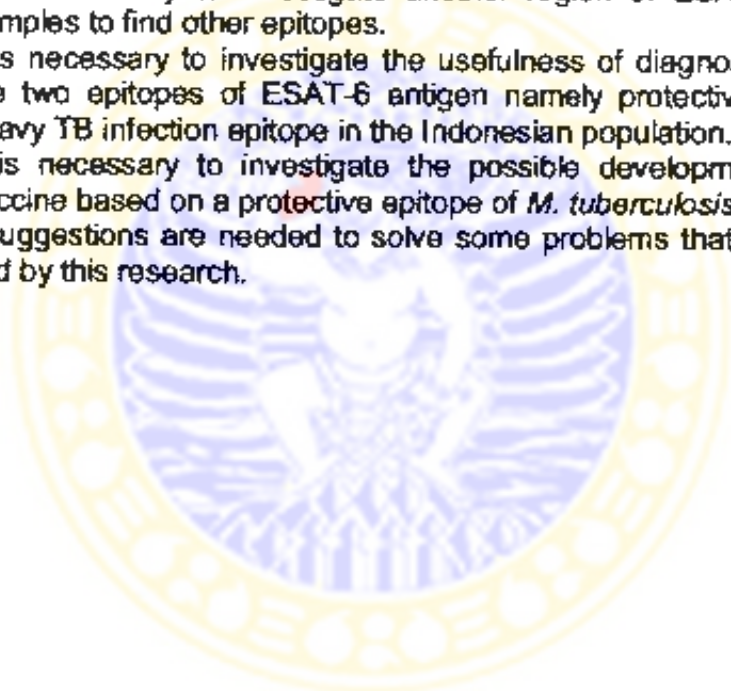
Conclusion from result of data analysis is as follows:

1. Heavy TB infection epitope IHSLLD (25-30) is found to be reactive with TB patients group and pulmonary-ward nurse group.
2. Protective epitope EAAASA (12-17) is reactive only with the pulmonary ward nurse group.

Some suggestions to continue the investigation are as follows:

1. It is necessary to investigate specific T-cell epitope from ESAT-6 antigen found in the Indonesian population.
2. It is necessary to investigate another region of ESAT-6 with more samples to find other epitopes.
3. It is necessary to investigate the usefulness of diagnostic tools using the two epitopes of ESAT-6 antigen namely protective epitope and heavy TB infection epitope in the Indonesian population.
4. It is necessary to investigate the possible development of a DNA vaccine based on a protective epitope of *M. tuberculosis*.

The above suggestions are needed to solve some problems that cannot yet be accomplished by this research.



ABSTRACT

The amino acid sequence of epitope from N-terminal region of ESAT-6 antigen as a diagnostic marker of active pulmonary tuberculosis Jusak Nugraha

There is an urgent need for reliable diagnostic tools for patients exposed to *Mycobacterium tuberculosis* in the developing countries. The ESAT-6 is a secreted antigen which is absent in *M. bovis* BCG and many environmental mycobacteria. The ESAT-6 gene is located in the RD-1 region, which is not found in *M. bovis* BCG and environmental mycobacteria. There is potential use of this antigen as a diagnostic marker.

A study to find the specific B-cell epitope of N-terminal region of antigen ESAT-6 was carried out on 10 sera of active pulmonary TB patients, 10 sera of healthy individuals and 10 sera of healthy pulmonary nurses. For this purpose the amino acid sequence of residues 1 to 35 of the N-terminal region of ESAT-6 antigen was cut into a series of 27 peptides, 9 mer overlapping peptides with an overlapping of 8-mer and an offset of one amino acid. The series of 27 peptides were synthesized on the surface of polyethylene pins by Chiron Technologies, Clayton, Victoria, Australia, in the form of an epitope scanning kit, and screened using sera of the 30 subjects entered in this study using an indirect ELISA method.

The results of the study revealed that 2 types of reactive overlapping common sequence of amino acids were present, as follows:

1. TB heavy infective epitope, corresponding to peptides with the amino acid sequence IHSLLD (residue 25 to 30).
2. TB protective epitope, corresponding to peptides with the amino acid sequence EAAASA (residue 12 to 17).

This study was also revealed that the TB infection marker was also reactive to the antibodies found in the healthy nurse group exposed to *M. tuberculosis*. Further more this TB infective epitope can still be used as a diagnostic tool using combination of two epitopes, namely TB infective and protective epitopes, by using immunochromatographic assay method.

The results are in concordance with those of other studies in that the response to ESAT-6 antigen was more intensive in individuals who were in close contact with TB patients, compared to those who were less in close contact. This findings may contribute to the application of reagents such as ESAT-6 in the diagnostic of tuberculosis in the enormous reservoir of latent human tuberculosis, particularly in developing countries.

Keywords : ESAT-6, B-cell epitope mapping, *M. tuberculosis*, diagnostic marker, protective marker.

DAFTAR ISI

	halaman
Sampul dalam	ii
Persyaratan gelar.....	iii
Lembar pengesahan.....	iv
Ucapan terima kasih.....	v
Ringkasan.....	ix
Summary.....	xi
Abstract.....	xiii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
DAFTAR SINGKATAN	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar belakang masalah.....	1
1.1.1 Patogenesis tuberkulosis paru.....	4
1.1.2 Peran ESAT-6 pada patogenesis TB.....	5
1.1.3 Sikuen asam amino dari protein ESAT-6 kuman <i>M. tuberculosis</i>	6
1.1.4. Identifikasi masalah ..	6
1.2. Rumusan masalah	7
1.3. Tujuan penelitian.....	7
1.4. Manfaat penelitian.....	8
1.4.1. Sumbangan teoritis pada keilmuan.....	8
1.4.2. Sumbangan praktis pada keilmuan.....	8
BAB 2 : TINJAUAN PUSTAKA ..	10
2.1. Angka kejadian dan epidemiologi tuberkulosis.....	10
2.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
2.3. Metode transmisi / invasi kuman <i>M. tuberculosis</i>	13
2.4. Patogenesis tuberkulosis	14

2.5. Respons Imun terhadap <i>M. tuberculosis</i>	15
2.6. Struktur antigen <i>M. tuberculosis</i>	17
2.7. Manifestasi klinik dan gambaran radiografis tuberkulosis paru....	19
2.8. Sarana diagnostik mikobakteriologi molekuler	21
2.8.1 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	21
2.8.2 <i>Ligase Chain Reaction (LCR)</i>	23
2.9. Serodiagnosis tuberkulosis paru	25
2.10 ESAT-6	28
2.11 Dasar molekuler <i>epitop</i>	29
2.12 Cara Penentuan <i>epitop</i>	33
2.13 <i>Polyethylene pins</i>	35
2.14 Vaksin DNA	36
BAB 3 : KERANGKA KONSEPTUAL	40
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	40
BAB 4 : METODE PENELITIAN	44
4.1. Jenis dan rancangan penelitian	44
4.2. Subyek penelitian.....	45
4.3. Definisi operasional variabel	46
4.4. Tempat penelitian	46
4.5. Perencanaan waktu penelitian.....	47
4.6. Cara kerja	48
4.6.1 Pemeriksaan klinis.....	48
4.6.2. Pemeriksaan mikrobiologis	48
4.6.3.1 Pengambilan darah.....	49
4.6.3.2. Pemeriksaan <i>epitope scanning</i>	49
4.6.4 <i>Pembersihan ujung pin (disruption)</i>	50
4.6.5 <i>Titrasi papan catur</i>	51
4.6.6. Penentuan sekuen asam amino (<i>epitop</i>) dengan antibodi dalam serum.....	51
4.7. Pengendalian mutu (<i>Quality Control</i>)	54
4.8. Cara evaluasi hasil uji ELISA.....	55
4.9 Cara evaluasi hasil penelitian	55

4.10 Alur penelitian	57
BAB 5. HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN	58
5.1. Hasil pemotongan 35 urutan asam amino dari regio N-terminus antigen ESAT-6 <i>M.tuberculosis</i> yang saling tumpang tindih.....	59
5.2 Hasil identifikasi <i>overlapping common sequence</i> asam amino (epitop) dari antigen ESAT-6 dengan sera penderita TB paru aktif, orang sehat bebas TB, dan perawat sehat terpapar kuman TB. ...	60
5.2.1 Hasil analisis dengan sera subyek penderita TB paru aktif.....	60
5.2.2 Hasil analisis dengan sera subyek orang sehat bebas TB.	63
5.2.3 Hasil analisis dengan sera subyek perawat sehat terpapar TB...	67
5.2.4 Analisis perbandingan epitop pada sera subyek TB paru aktif dan orang sehat bebas TB.	70
5.2.5 Analisis perbandingan epitop pada sera subyek perawat sehat terpapar TB dan penderita TB paru aktif.....	74
BAB 6. PEMBAHASAN	79
BAB 7.KESIMPULAN DAN SARAN	96
7.1.Kesimpulan	96
7.2. Saran	97
DAFTAR PUSTAKA	99
LAMPIRAN	105

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 2.1 <i>Mycobacteria</i> yang penting dalam klinik.....	12
Tabel 2.2. Penggunaan <i>B-cell Epitope mapping (Pepscan)</i> untuk identifikasi epitop reaktif dari berbagai jenis patogen..	36
Tabel 2.3 Calon vaksin DNA (bagian antigen) yang telah dicoba untuk mencegah infeksi <i>Mycobacterium</i>	38
Tabel 5.1 Reaktivitas ke 27 peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i> dengan antibodi dalam sera subyek TB paru aktif.	60
Tabel 5.2 Reaktivitas ke 27 peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i> dengan antibodi dalam sera orang sehat non-TB.....	64
Tabel 5.3 Reaktivitas ke 27 peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i> dengan antibodi dalam sera perawat sehat	67
Tabel 5.4 Ke 27 peptida yang memberikan absorbensi reaktif dengan antibodi dalam sera subyek bebas TB dan subyek TB paru aktif.....	71
Tabel 5.5 Pengelompokan <i>overlapping common sequence</i> asam amino (epitop) dari peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i> dengan antibodi dalam sera subyek bebas TB, subyek TB paru aktif..71	
Tabel 5.6 Frekwensi, persentase dan nilai Z dari <i>overlapping common sequence</i> asam amino (epitop) yang ditemukan dengan antibodi dalam sera subyek bebas TB dan sera subyek TB paru yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i>	73
Tabel 5.7 Ke 27 peptida yang memberikan absorbensi reaktif dengan antibodi dalam sera subyek penderita TB paru aktif dan subyek perawat sehat terpapar TB	74
Tabel 5.8 Pengelompokan <i>overlapping common sequence</i> asam amino (epitop) dari peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i> dengan antibodi dalam sera subyek bebas TB, subyek perawat sehat	75
Tabel 5.9 Frekuensi, persentase dan nilai Z dari <i>overlapping common sequence</i> asam amino (epitop) yang ditemukan dengan antibodi dalam sera subyek penderita TB dan sera subyek perawat sehat yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i>	76

Tabel 5.10 Temuan jenis *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dengan antibodi dalam sera subyek penelitian yang memberikan absorben reaktif (> *cutoff value*)..... 77



DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 2.1 Prinsip dasar uji PCR-TB	22
Gambar 2.2 Prinsip dasar uji LCR	24
Gambar 2.3 Gen pada Regio RD-1.....	28
Gambar 2.4 Contoh epitop dari suatu antigen	30
Gambar 2.5 Prosedur dari sintesis peptida	35
Gambar 4.1. 27 Peptida yang telah dilekatkan pada permukaan pin.	52
Gambar 4.2. Pin plastik untuk kontrol positif dan kontrol negatif	54
Gambar 4.3 Gambaran reaktivitas peptida dengan antibodi	55
Gambar 5.1. Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sampel TB No.1 dan 2	61
Gambar 5.2. Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sampel TB No.3 dan 4	61
Gambar 5.3 Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sampel TB No.5 dan 6	62
Gambar 5.4 Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sampel TB No.7 dan 8	62
Gambar 5.5 Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sampel TB No.9 dan 10	63
Gambar 5.6. Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek normal No.1 dan 2	64
Gambar 5.7. Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek normal No.3 dan 4	65
Gambar 5.8. Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek normal No.5 dan 6	65
Gambar 5.9. Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek normal No.7 dan 8	66

Gambar 5.10 Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek normal No.9 dan 10	67
Gambar 5.11. Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera perawat sehat No.1 dan 2	68
Gambar 5.12 Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek normal No.3 dan 4	68
Gambar 5.13 Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek normal No.5 dan 6	69
Gambar 5.14 Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek normal No.7 dan 8	69
Gambar 5.15 Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek normal No.9 dan 10	70
Gambar 5.16 Hasil identifikasi epitop infeksi berat dan epitop protektif pada manusia	78
Gambar 6.1. Uji imunokromatografi memakai 2 macam antigen.....	91

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1. Tabel 1. Sikuen asam amino dari peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cutOff value</i> dengan sera subyek penderita TB, subyek normal dan perawat sehat.	105
Lampiran 2. Tabel 2. Pengelompokan sikuen asam amino dari peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cutOff value</i> dengan sera subyek penderita TB, subyek normal dan perawat sehat.	108
Lampiran 3. Tabel 3. Sikuen asam amino dari peptida yang memberikan absorbensi amat reaktif (>10%) dengan sera subyek penderita TB, subyek normal dan perawat sehat.	110
Lampiran 4. Tabel 4. Pengelompokan sikuen asam amino dari peptida yang memberikan absorbensi amat reaktif (>10%) dengan sera subyek penderita TB, subyek normal dan perawat sehat.	112
Lampiran 5. Perhitungan uji statistik kelompok subyek penderita TB dan subyek normal.	114
Lampiran 6. Perhitungan uji statistik kelompok subyek perawat sehat dan penderita TB paru aktif.	118
Lampiran 7. Hasil analisis subyek penderita TB paru aktif dengan uji ELISA.	121
Lampiran 8. Hasil analisis subyek normal dengan uji ELISA.	122
Lampiran 9. Hasil analisis subyek perawat sehat dengan uji ELISA.	123
Lampiran 10. Reagen yang digunakan dalam uji ELISA.	124
Lampiran 11. Daftar asam amino dan singkatannya.	125
Lampiran 12. Sikuen asam amino antigen ESAT-6.	126
Lampiran 13. Lembar informasi.	127
Lampiran 14. Pernyataan persetujuan.	128
Lampiran 15. Surat izin penelitian.	129
Lampiran 16. Surat keterangan kelaikan etik penelitian.	131
Lampiran 17. Sertifikat kontrol kualitas dari <i>Mimotopes</i>	132

DAFTAR SINGKATAN

ESAT-6	: 6 kDa-Early Secreted Antigenic Target
RD1	: genomic Region of Difference 1
CFP-10	: Culture Filtrate Protein 10 kDa
WHO	: World Health Organizational
DOTS	: Directly Observed Treatment, Short Course
DNA	: Deoxyribonucleic acid
TB	: Tuberculosis
RSUD	: Rumah Sakit Umum Daerah
UPF	: Unit Pelayanan Fungsional
Th	: sel T helper
IFN	: Interferon
IL	: Interleukin
TNF	: Tumor Necrotic Factor
MHC	: Major Histocompatibility Complex
HLA	: Human Leucocyte Antigen
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
BCG	: Bacillus Calmette Guerin
PPD	: Protein Purified Derivative
DTH	: Delayed Type Hipersensitivity
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

BAB 1 PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang Masalah

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) merupakan suatu bakteri patogen pada manusia yang manifestasi klinisnya adalah tuberkulosis (TB). Sampai sekarang tuberkulosis paru masih merupakan masalah kesehatan masyarakat, terutama di negara sedang berkembang, karena daerah pemukiman yang kumuh dan padat, pengobatan yang lama dan mahal, sulitnya diagnosis dan belum adanya vaksin yang efektif untuk TB. Vaksin yang banyak digunakan saat ini yaitu BCG yang hanya memberikan perlindungan dengan efikasi bervariasi sekitar 0 - 70 % (Bailey et al, 1980). Upaya pemberantasan penyakit tuberkulosis paru di Indonesia terus dilakukan dengan memakai rejimen obat rekomendasi WHO, antara lain strategi DOTS (*Directly Observed Treatment Short Course*) sejak tahun 2000. Kenyataannya TB di Indonesia menduduki peringkat ke tiga setelah India dan Cina dan banyak menimbulkan kecacatan pada penderitanya (Amin, 2003). Di seluruh dunia 1,7 milyar penduduk atau kurang lebih sepertiganya terkena infeksi kuman *M. tuberculosis* dan menyebabkan 2 juta kematian setiap tahunnya (WHO 2000; Enarson, 2004).

Upaya pencegahan dengan vaksin BCG berhasil menurunkan prevalensi dari tuberkulosis primer atau subprimer seperti meningitis TB dan TB millier, tetapi belum berhasil mengurangi prevalensi tuberkulosis pasca-primer (Kardjito, 1996).

Vaksin BCG dibuat dari strain *M. tuberculosis var. bovis* yang ditanam berulang-ulang sehingga kehilangan virulensinya. Vaksin BCG menyebabkan terjadinya proses TB primer di kulit. Seperti diketahui vaskularisasi di kulit jauh lebih sedikit dibandingkan dengan di paru, sehingga kemungkinan terjadinya vaskulitis TB kaseosa dan penyebaran secara hematogen amat kecil. Bila individu yang telah mendapat vaksinasi BCG tersebut, kemudian menderita TB paru, maka proses yang terjadi adalah TB pasca-primer yang penyebarannya

terjadi secara bronkogen, sehingga tidak sampai menimbulkan TB ekstrapulmonal, khususnya meningitis TB di kemudian hari (Ho, 1997).

Berbagai upaya telah dicoba untuk mengembangkan metode baru berdasarkan kemajuan di bidang imunologi, biokimiawi dan rekayasa genetika untuk mempercepat diagnosis kuman tuberkulosis dalam rangka memperpendek waktu yang dibutuhkan untuk biakan dan identifikasinya (Kardjito, 1983; Handoyo, 1988; Grosset 2000). Sekuens genom dari kuman *M. tuberculosis* telah diketahui dengan lengkap pada tahun 2003 (Gamier et al, 2003) dan kini para peneliti berada pada era pasca-genomik.

Usaha preventif dengan pendidikan kesehatan (*health education*) juga terbukti sulit dan hasilnya meragukan.

Usaha *case finding* yang dilakukan adalah dengan pemeriksaan BTA dahak. Padahal kita ketahui bahwa pada penderita yang dicurigai menderita TB, hanyalah sekitar 10 – 15% yang BTA dahaknya positif, yaitu pada TB paru terbuka (Handoyo, 1988). Sebaliknya sekitar 85 – 90% BTA dahaknya negatif dan lolos dari cakupan program. Penelitian menunjukkan bahwa dari yang BTA-nya negatif ini dalam waktu setahun 49% berubah menjadi BTA dahak positif. Akibat dari hal di atas maka oleh WHO ditengerei bahwa pencarian kasus di Indonesia masih kurang intensif (WHO, 2000). Atas dasar ini maka perlu kiranya ada pemeriksaan tambahan yang spesifik, cepat, murah dan dapat dilaksanakan di lapangan. Pemeriksaan laboratorium yang menunjang antara lain adalah **serologi**. Pemeriksaan serologi dapat ditujukan untuk mencari antigen dalam dahak maupun antibodi spesifik dalam serum penderita. Kendala yang ada pada pemeriksaan serologi adalah sebagai berikut.

1. Rendah spesifisitas. Di negara endemik seperti Indonesia ini, di mana vaksinasi BCG dilakukan secara massal, kadangkala timbul reaksi silang dari orang dengan pasca-vaksinasi BCG dengan antigen *M. tuberculosis*. Masalah ini dapat diatasi bila kita dapat mencari marka epitop untuk *M. tuberculosis*, yang merangsang timbulnya antibodi non-protektif yang amat spesifik, dengan melakukan *antibody-scanning* dalam darah

penderita TB, perawat sehat yang telah lama merawat penderita TB dan orang sehat non-TB, yang ber-reaksi dengan epitop *M. tuberculosis*.

2. Waktu pemeriksaan yang lama sampai beberapa jam. Ini dapat diatasi dengan melakukan *rapid test* memakai kertas saring berisi konjugat berlabel *colloidal gold* yaitu dengan cara *immunochromatography assay*, seperti pada tes kehamilan dan *dengue test*, yang hanya perlu waktu beberapa menit saja (1- 15 menit).
3. Tingginya biaya. Masalah ini dapat diatasi dengan cara membuat sendiri atau membeli perangkat kertas *immunochromatography assay* ini dan mengisinya dengan antigen atau antibodi *strain* lokal yang spesifik.

Ditinjau dari permasalahan di atas baik di bidang vaksinasi maupun di bidang diagnostik, dapat disimpulkan bahwa masih diperlukan pengembangan pengetahuan tentang sifat imunogenitas berbagai bagian bakteri maupun sifat genetiknya serta patogenesis penyakit infeksi. Sehubungan dengan hal tersebut, walaupun telah banyak penelitian yang dilakukan tentang *M. tuberculosis*, sebab masalah mendasar yang berkaitan dengan patogenesis penyakit, ternyata penelitian tentang epitop yang berperan pada patogenesis dan respons imun orang Indonesia belum pernah dilakukan.

Pada kearlahan penyakit TB yang aktif didapatkan respons imun yang didominasi oleh sel Th2. Dominasi Th2 berakibat timbulnya antibodi non-protektif, yang dapat digunakan sebagai marka adanya proses yang berlebihan, yang dapat digunakan sebagai marka adanya proses TB yang aktif.

Pada para perawat di ruangan yang merawat penderita TB, telah diketahui menunjukkan adanya penularan yang tinggi, yang dibuktikan dengan hasil tes Mantoux yang positif kuat dengan diameter > 16 mm, akan tetapi mereka tidak menjadi sakit (Handojo, 1988). Kemungkinan pada kelompok ini mempunyai HLA yang berbeda dengan kelompok penderita TB. Kelompok ini bisa memproses epitop sel-T dari ESAT-6 yang merupakan faktor virulens, sehingga respons imun lebih menuju ke arah Th-1. Respons imun terhadap *M. tuberculosis* walaupun didominasi oleh Th-1, tetapi respons Th-2 juga ikut dibangkitkan.

Pada perawat ini mungkin ada sesuatu antibodi protektif yang melindungi mereka terhadap kuman yang baru masuk, yang masih berada ekstraseluler, dan dapat menangkap kuman ini untuk kemudian diproses lebih lanjut. Untuk pemusnahan kuman yang sudah berada dalam sel (intraseluler) dibutuhkan respons imun Th-1. Bila pada kelompok ini ditentukan epitop sel-B nya, kemungkinan dapat ditemukan antibodi protektif beserta dengan epitopnya. Belakangan ini diketahui bahwa protein sekresi ekstraseluler dengan berat 6kDa (ESAT-6) merupakan faktor virulensi dan mempunyai potensi protektif dan diagnostik spesifik pada hewan coba (Laurens et al, 2000).

Berdasarkan hasil penelitian epitop sel-T kuman *M. tuberculosis*, ditemukan bahwa respons imun sel-T manusia terhadap epitop ESAT-6 *M. tuberculosis* didapatkan juga di daerah N-terminus pada populasi India dan Jerman (van Pittius et al, 2002) yaitu daerah yang sama dengan target penelitian ini. Atas dasar data tersebut maka diduga ada kemungkinan bahwa pada orang Indonesia juga terdapat *overlapping* antara epitop sel-T dengan epitop sel-B dari ESAT-6 atau epitop sel B yang ditemukan sebenarnya merupakan bagian dari epitop sel T.

1.1.1 Patogenesis tuberkulosis paru

Kuman *M. tuberculosis* yang masuk ke dalam paru akan ditelan oleh makrofag melalui interaksi ligand-reseptor dan makrofag ini mempunyai tiga peranan penting, yaitu mencegah penyebaran kuman, mengundang datangnya sel imunokompeten dan membantu aktivasi sel-B dan sel-T. Kuman ini bersifat aerobik obligat tetapi fakultatif intraseluler. Respons imun protektif didominasi oleh imunitas seluler dengan sedikit bantuan dari antibodi (Kaufmann, 2002). Kuman ini kadang kala berada di ekstraseluler dan beredar dalam sirkulasi, sehingga antibodi terhadap kuman ini bersifat protektif parsial, artinya antibodi ini tidak mampu mengeliminasi kuman, tapi ia membutuhkan bantuan interferon- γ untuk menghilangkannya. Untuk ini juga dibutuhkan peran dari MHC kelas II. Di dalam makrofag yang tidak aktif, *M. tuberculosis* mampu berkembang biak

cara menghambat asidifikasi fagosom, maturasi fagosom dan fusi dari fagosom-lisosom (Kaufmann, 2002).

Pada makrofag yang teraktivasi oleh IFN- γ atau TNF- α , pengembalian hambatan terhadap maturasi fagosom dan fusi lisosom berkorelasi dengan hambatan pertumbuhan *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* seperti halnya patogen yang lain yang persisten, dalam evolusinya, telah mengembangkan mekanisme untuk menghindari respons imun *host* (Handojo, 2002).

Walaupun aktivasi dari makrofag oleh IFN- γ dapat mengembalikan blokade dari maturasi lisosom, *M. tuberculosis* dapat mempengaruhi sinyal dari IFN- γ dengan cara sebagai berikut:

1. Penurunan (*down regulation*) dari molekul presentasi antigen MHC kelas II dari CD1 dan molekul CD1, serta ko-stimulasi dari molekul B7 pada makrofag terinfeksi menurunkan aktivasi sel T yang menghasilkan sekresi IFN- γ .
2. Makrofag terinfeksi mengeluarkan IL-10 dan TGF- β yang menghambat aktivasi makrofag, presentasi antigen dan aktivasi sel T.
3. *M. tuberculosis* mampu memacu terjadinya apoptosis dari sel-T $\gamma\delta$. (Kaufmann, 2002)

1.1.2 Peran ESAT-6 pada patogenesis TB.

Walaupun vaksinasi BCG kelihatannya parsial protektif dalam mengontrol infeksi awal *M. tuberculosis*, hasil dari percobaan klinis adalah vaksinasi ini tidak berguna untuk stimulasi respons terhadap re-aktivasi maupun re-infeksi. Dalam kaca mata vaksinologi konvensional hal ini kelihatannya paradoksial bahwa sebuah respons imun yang efektif terhadap infeksi primer menjadi kurang efektif terhadap infeksi kedua. Berpijak pada landasan ini maka perlu dipikirkan suatu vaksinasi pasca-paparan (*Post-exposure vaccine*). Telah diketahui bahwa pengulangan BCG ternyata tidak efektif (Kaufmann, 2002). Ternyata ada protein yang terdapat pada *M. tuberculosis* tetapi tidak ada pada *M. bovis*. Sebuah protein BM rendah yang disekresikan ke ekstraseluler, yang dikenal sebagai ESAT-6, mempunyai peran yang menonjol pada respons imun alamiah terhadap

infeksi *M. tuberculosis*. Diperkirakan ESAT-6 merupakan faktor virulensi, sebab protein ini hanya dijumpai pada *strain* yang virulen saja. Protein ini disandi oleh gen RD-1, suatu regio yang tidak terdapat pada *strain* BCG tetapi dijumpai pada *M. bovis* yang virulen (Andersen, 2000). Hasil penelitian Arend et al (2000) menunjukkan bahwa ESAT-6 dapat memprovokasi timbulnya respons imun protektif jangka panjang terhadap infeksi dengan *M. tuberculosis*.

1.1.3. Sikuen asam amino dari protein ESAT-6 kuman *Mycobacterium tuberculosis*.

Sikuen asam amino dari antigen ESAT-6 telah diketahui dan terdiri dari 95 asam amino (Sorensen et al 1995; Harboe et al, 1998). Rangkaian peptida ESAT-6 diperkirakan sedikitnya memiliki tiga jenis epitop.

1. Epitop yang merangsang sel limfosit CD4 Th1 dan memicu produksi IFN- γ yang berfungsi mengaktivasi makrofag (epitop protektif), sehingga merupakan calon vaksin yang baik untuk TB
2. Epitop yang merangsang sel limfosit B dan memicu produksi antibodi yang amat spesifik terhadap kuman TB (epitop marka TB), sehingga merupakan calon antigen yang amat spesifik untuk uji serologis TB.
3. Epitop yang merangsang timbulnya hipersensitivitas tipe lambat, sehingga merupakan calon pengganti PPD yang baik untuk uji Mantoux dan tidak dipengaruhi vaksin BCG (epitop DTH) (Handoyo, 2003)

Harboe et al, (1998) melakukan pemetaan epitop sel B secara kasar dan mendapatkan bahwa pada ESAT-6 terdapat epitop sel B yang berlokasi pada bagian terminal-N dari rantai polipeptida ESAT-6 (peptida 1-27) yang akan menjadi calon antigen yang amat spesifik untuk uji serologis TB.

Maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut di daerah N-terminal ini yang masih mengandung beberapa epitop. Untuk keperluan tersebut perlu diuji lebih lanjut reaktivitasnya dengan antibodi dalam serum manusia yang menderita TB aktif, khususnya di Jawa Timur.

1.1.4 Identifikasi Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang permasalahan di atas, maka dapat diidentifikasi suatu permasalahan sebagai berikut:

Upaya deteksi penyakit TB masih belum memuaskan, terutama di negara berkembang di mana kasus tuberkulosis terus meningkat. Salah satu faktor penyebab adalah kurangnya cakupan karena sarana diagnostik yang kurang memadai.

Uji serologis yang ada memeriksa antibodi terhadap keseluruhan antigen, padahal antigen tersebut terdiri dari beberapa epitop, sehingga antibodi yang bereaksi juga beraneka-ragam.

Pokok masalah adalah yang berhubungan dengan urutan asam amino dari epitop antigen ESAT-6 yang dapat berfungsi sebagai marka proses tuberkulosis aktif, dalam arti bahwa terdapat epitop tertentu yang bereaksi sangat spesifik terhadap antibodi (IgG) dalam sera subyek penderita TB paru aktif. Hal lain adalah kemungkinan terdapatnya antibodi spesifik terhadap epitop dari ESAT-6 yang mungkin berfungsi protektif pada mereka yang terpapar pada kuman *M. tuberculosis*, namun tidak menjadi sakit.

Epitop yang terdapat pada antigen ESAT-6 belum diteliti di Indonesia dan belum diketahui bagaimana pola reaksi dari sera para penderita TB paru aktif, orang sehat maupun perawat sehat yang lama merawat penderita TB, apakah mungkin terdapat perbedaan reaksi terhadap berbagai macam epitop yang terdapat pada antigen ESAT-6 *M. tuberculosis*.

1.2. Rumusan Masalah

Atas dasar identifikasi permasalahan tersebut dapat dirumuskan masalah penelitian ini sebagai berikut:

1.2.1. Bagaimanakah urutan asam amino regio N-terminal epitop ESAT-6, yang spesifik dan reaktif terhadap antibodi (IgG) dalam sera penderita TB aktif, sehingga epitop tersebut dapat dipakai sebagai marka diagnostik TB paru aktif.

1.2.2 Bagaimanakah urutan asam amino regio N-terminal epitop ESAT-6, yang spesifik dan reaktif terhadap antibodi (IgG) dalam sera perawat sehat, sehingga epitop tersebut dapat dipakai sebagai calon vaksin.

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menentukan pola reaksi berbagai epitop antigen ESAT-6 terhadap sera penderita TB paru aktif, orang normal dan perawat sehat yang lama (lebih dari dua tahun) merawat penderita TB namun tidak sakit.

1.3.2 Tujuan khusus

1.3.2.1. Menentukan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dari regio N-terminus antigen ESAT-6, yang spesifik dan reaktif terhadap antibodi (IgG) dalam sera subyek TB paru aktif.

1.3.2.2. Menentukan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dari regio N-terminus antigen ESAT-6, yang spesifik dan reaktif terhadap antibodi (IgG) dalam sera perawat sehat yang merawat penderita TB.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Sumbangan teoritis pada keilmuan.

1. Dengan menjalankan metode *epitope scanning* di Indonesia, khususnya di lingkungan Universitas Airlangga, maka metode ini dapat digunakan untuk mengembangkan penelitian patogenesis suatu penyakit dengan mengidentifikasi epitop yang berperan, apabila struktur primer antigennya telah diketahui.
2. Apabila potongan peptida yang spesifik telah ditemukan, maka peptida ini memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi tes yang sensitif dan spesifik untuk mendeteksi antibodi spesifik pada penderita TB aktif.

3. Adanya potongan antibodi spesifik pada perawat sehat yang merawat penderita TB, maka hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai data dasar untuk pengembangan vaksin terhadap penyakit TB.

1.4.2. Sumbangan praktis pada ilmuwan.

Pengetahuan mengenai epitop sef B dari antigen ESAT-6 yang ber-reaksi dengan antibodi dalam sera penderita TB aktif, dapat dijadikan dasar untuk mengembangkan suatu pembuatan antigen yang spesifik untuk uji serologis TB paru di Indonesia. Tes diagnostik yang spesifik, cepat, murah dan dapat dikerjakan di Puskesmas sangat diperlukan untuk penemuan kasus yang lebih banyak sehingga dapat diberikan pengobatan lebih dini dan mematahkan rantai penularan, dan dengan demikian dapat membantu program pemerintah dalam upaya pemberantasan tuberkulosis paru.

Pengetahuan mengenai antibodi spesifik dalam sera perawat sehat yang merawat penderita TB, dapat dipertimbangkan sebagai data dasar untuk pengembangan vaksin terhadap TB, yaitu vaksin subunit maupun vaksin DNA, sehingga dapat digunakan untuk pencegahan, terutama pada bayi yang baru lahir.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Angka kejadian dan epidemiologi tuberkulosis

Indonesia merupakan salah satu negara di Asia setelah India dan RRC dengan jumlah penduduk dan kepadatan yang cukup tinggi. Laporan WHO menyatakan bahwa Indonesia termasuk salah satu dari tiga negara dengan kasus tuberkulosis yang tinggi di samping Filipina dan Afrika bagian selatan. Perkiraan angka kejadian tuberkulosis di Indonesia tahun 1990 sebesar 242 per 100.000 penduduk, sedangkan angka kematian karena tuberkulosis pada penderita rawat inap di berbagai rumah sakit yang tercatat dalam laporan Departemen Kesehatan dalam Profil Kesehatan Indonesia tahun 1994 dari tahun 1991 cenderung meningkat yaitu sebesar 3,6% (1991), 4,0% (1992) dan 4,9% (1993) (Prihatini, 1995).

Sigi kesehatan rumah tangga tahun 1992 yang dilaksanakan di Indonesia mendapatkan penyakit tuberkulosis merupakan penyebab kematian nomer dua, padahal tahun 1986 pada sigi yang sama tuberkulosis masih menduduki peringkat ke empat dalam pola penyebab kematian di Indonesia. Kegiatan penanggulangan penyakit ini dengan sistem pengobatan jangka pendek sesuai dengan program nasional pemberantasan tuberkulosis paru, sampai dengan tahun 1994 yang dilakukan oleh berbagai pusat kesehatan masyarakat hanya dilaksanakan oleh 3977 (57,2%) dari 6954 pusat kesehatan masyarakat yang tersebar di seluruh Indonesia. Atas dasar berbagai data tersebut di atas dapatlah disimpulkan bahwa tuberkulosis tetap merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting. Apabila angka penularan tuberkulosis di atas usia 14 tahun masih tinggi serta penanganan penyakit ini "terabaikan" karena kurangnya penyediaan dana, maka tuberkulosis akan tetap merupakan masalah kesehatan yang serius (Aditama, 1995; Enarson et al, 2004). Situasi tersebut akan semakin rawan dengan adanya ancaman baru yang berhubungan dengan munculnya *human immunodeficiency virus* (virus HIV) (Sujudi, 2000). Munculnya *strain M.*

tuberculosis yang resisten terhadap berbagai obat (*Multidrug resistance=MDR*) ikut mempersulit program pemberantasan TB. *Strain MDR M. tuberculosis* adalah isolat *M. tuberculosis* yang resisten minimal terhadap isoniazid dan rifampisin (Made, 2000).

2.2. *Mycobacterium tuberculosis*

Penyebab penyakit tuberkulosis paru, *M. tuberculosis* telah diketahui oleh Robert Koch sejak tahun 1882. Kuman ini termasuk dalam genus *Mycobacterium* dan memiliki 41 spesies yang diakui oleh *International Committee on Systematic Bacteriology* (ICSB). Urutan lengkap dari DNA *M. tuberculosis* telah diselesaikan oleh Garnier dkk dari Institut Pasteur dan kini kita telah berada pada era pasca-genomik (Garnier et al, 2003). Di antara berbagai spesies yang ada terdapat beberapa yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia, seperti yang tercantum dalam tabel 1, mereka dibagi dalam dua kategori besar yaitu *obligate pathogens* dan *opportunistic pathogens* (Cheesbrough, 1984).

M. tuberculosis tergolong dalam kelompok kuman Gram positif, tidak bergerak, aerob, tersusun tunggal atau terdapat dalam kelompok, berbentuk batang lurus atau sedikit melengkung tidak membentuk spora maupun kapsul, berukuran 1-4 x 0,2 - 0,5 μm . *M. tuberculosis* termasuk genus *Mycobacterium* yang tumbuh lambat dengan waktu generasi rata-rata 15-20 jam. Kuman ini tumbuh amat baik dalam media yang mengandung gliserol, asam lemak (kuning telur), albumin, mineral dan glukosa seperti yang terdapat dalam media *Lowenstein-Jensen* dan *Ogawa* (Baron et al, 1990). Basis ini pada media padat memerlukan waktu 2-3 minggu untuk membentuk koloni dengan tepi yang tidak teratur, permukaan kasar dan kering menyerupai kembang kubis, berwarna *cream-buff colour colonies* (Hanna, 2004).

Kuman ini pada sediaan langsung sulit dicat dengan pengecatan Gram oleh karena dinding selnya yang resisten. Kuman ini merupakan basil tahan asam karenanya hanya dapat dicat dengan pengecatan *Ziehl-Neelsen*, *Tan Thiam Hok* atau *Kinyoun Gabett* (Cheesbrough, 1984).

Tabel 2.1. Mycobacteria yang penting dalam klinik (Cheesbrough, 1984).

OBLIGATE PATHOGENS	OPPORTUNISTIC PATHOGENS
<i>M. tuberculosis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. bovis</i> (ketiganya disebut juga <i>M. tuberculosis</i> kompleks) <i>M. leprae</i>	<i>M. kansasii</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. simiae</i> <i>M. xenopi</i>
Tuberkulosis Lepra	terutama penyakit infeksi paru
<i>M. ulcerans</i>	<i>M. avium-intracellulare</i> <i>M. scrofulaceum</i>
<i>skin ulcer/Buruli ulcer</i>	adenitis servikal, terutama anak-anak, bisa juga pada paru
	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i>
	infeksi pada kulit
	<i>M. marinum</i>
	infeksi kulit, dapat melibatkan kel. limfe superfisial.

Mycobacteria merupakan batang Gram positif, tak bergerak, ber-aneka bentuk (*pleomorphic*) termasuk famili *Actinomycetales*. Spesies pada genus ini menunjukkan keanekaragaman yang tinggi dalam berbagai hal. Kebanyakan *Mycobacteria* memilih mengambil kekuatan pada sisi yang baik dengan habitat air dan tanah dan kemampuan untuk menghancurkan senyawa organik rekalsitran seperti *vinylchlonida* atau *phenanthrene* dan memproduksi metabolik sekunder seperti *steroid* dan *alkene* rendah yang optik aktif. Sebaliknya ada beberapa *Mycobacteria* yang mengambil kekuatan pada sisi yang gelap dan menjadi patogen intraselular pada vertebrata yang lebih tinggi dan menyebabkan

kesakitan dan kematian pada hewan dan manusia. *Mycobacterium tuberculosis* termasuk golongan ini.

Mycobacterium tuberculosis bersama-sama *M. bovis*, *M. africanum* dan *M. microti* menyebabkan penyakit yang dikenal sebagai tuberkulosis (TB) dan menjadi anggota dari tuberkulosis kompleks. Tiap anggota dari TB kompleks adalah patogen zoonotik. *M. tuberculosis* biasanya patogen untuk manusia sedangkan *M. bovis* patogen untuk hewan dan manusia. Kuman tuberkulosis kompleks ini memiliki kesamaan sifat biologis yang penting untuk klinik (Baron et al, 1990).

1. *Obligate aerobe*. Tumbuh sangat baik pada jaringan dengan tekanan partial oksigen yang tinggi, seperti misalnya pada apeks paru.
2. Patogen intraseluler fakultatif. Kuman ini memakai MP (*Mononuclear Phagocyte*) sebagai habitat utamanya.
3. Tumbuh lambat dengan waktu generasi 12 sampai dengan 18 jam. Jadi lesi berkembang antara waktu yang sub-akut sampai dengan kronis.
4. Dinding sel mengandung banyak lemak. Akibatnya, selnya bersifat hidrofilik, sehingga cenderung mengelompok bersama. Kuman ini bersifat impermeabel terhadap pewarnaan cat yang biasa seperti misalnya Gram. Kuman tuberkulosis kompleks diklasifikasikan sebagai bakteri tahan asam (BTA) karena mempertahankan cat *Carbo-fuchsin* merah setelah pencucian dengan asam alkohol atau keduanya.
5. Sangat tahan terhadap stres fisik.

2.3. Metode transmisi / invasi kuman *M. tuberculosis*.

Transmisi dari basil TB biasanya terjadi secara aerogen atau rute aerosol melalui udara (*airborne*), tetapi dapat juga terjadi melalui traktus gastrointestinal. Batuk pada hewan atau manusia dengan TB aktif memproduksi *droplet nuclei* yang mengandung satu sampai tiga organisme. *Droplet nuclei* yang mengandung TB dapat tetap tinggal di udara selama beberapa jam. Infeksi akan terjadi bila inhalasi menyebabkan organisme ini mencapai alveolus paru. Transmisi *M.bovis* dari sapi ke manusia terjadi melalui minum susu yang terkontaminasi. Pada

manusia hanya sepersepuluh dari orang terinfeksi akan menunjukkan penyakit aktif dalam hidupnya, jadi kebanyakan tidak mentransmisikan organisme ini. Sebaliknya pada hewan, hampir semua sapi mengembangkan penyakit aktif sehingga dapat mentransmisikan organisme ini ke hewan lain atau manusia (Cheesbrough, 1984).

Di antara kebanyakan orang sehat, infeksi dengan basil TB lebih sering hanya tak tampak secara klinis. Seperti telah disebut di atas, risiko untuk menderita TB secara klinis selama hidup pasca-infeksi adalah 10%. Tetapi risiko ini lebih tinggi pada kelompok sub-populasi tertentu seperti misalnya bayi baru lahir, dan orang dengan keadaan defisiensi imun, maka proporsi yang mengembangkan TB secara klinis menjadi jauh lebih tinggi (Baron, 1990).

2.4. Patogenesis tuberkulosis

Infeksi primer tuberkulosis paru menyebar dari seorang penderita ke seorang yang lain melalui inhalasi udara dari *droplet nuclei*, yang selanjutnya sejumlah basil tahan asam yang terkandung di dalamnya akan masuk ke alveolus. Organisme mikro ini kemudian akan difagositosis oleh makrofag alveolus, tetapi ia tetap hidup dan berkembang biak di dalam makrofag, selanjutnya dibawa ke kelenjer limfe terdekat kemudian berlanjut ke kelenjar limfe regional, bahkan dengan melalui aliran darah kuman akan menyebar ke beberapa tempat yang lebih jauh. Organ paru merupakan salah satu sasaran kuman ini untuk berkembang baik, oleh karena lingkungan dalam organ ini optimal untuk pertumbuhannya dan bagian yang paling banyak terkena yaitu daerah apeks paru. Adanya pertumbuhan kuman di dalam makrofag seperti yang telah disebutkan di atas ditambah perkembang biakan di dalam histosit paru akan menyebabkan masuknya sel efektor dalam jumlah besar, seperti limfosit, neutrofil dan histosit yang akhirnya menyebabkan terbentuknya granuloma yang sering kali disebut sebagai *Ghon Focus*, selanjutnya bila diikuti dengan destruksi jaringan akan terjadi kaveme. *Ghon Focus* dan limfadenitis regional disebut sebagai kompleks primer. Pada pemeriksaan histopatologis konsistensi tuberkulosis lunak dan karenanya disebut nekrosis pengejuan, di mana sel

monosit dan limfosit mengelilingi kuman tuberkulosis atau suatu area nekrotik sentral.

Selanjutnya jaringan yang terinfeksi bisa meluas ke *bronchioli* dan *bronchi*, dan dari sinilah bakteri akan menyebar melalui sekresi pernafasan yaitu dengan batuk yang dapat menular kepada orang lain, dan demikian seterusnya (Grosset, 1980; Grosset, 2000).

2.5. Respons imun terhadap *M. tuberculosis*

Invasi *M. tuberculosis* ke dalam tubuh seseorang akan merangsang sistem pertahanan tubuh alamiah, yaitu pengerahan sel netrofil untuk melakukan fagositosis terhadap kuman tersebut. Kuman *M. tuberculosis* ini tidak hancur selama berada di dalam sel netrofil dan dengan segera meninggalkannya, yang selanjutnya difagositosis oleh makrofag. Dikatakan makrofag ini mempunyai peran yang besar dalam membangkitkan respons imun karena ia akan memproses antigen kuman tersebut dan memaparkannya bersama-sama dengan molekul HLA DR pada permukaan sel makrofag kepada limfosit T sehingga terjadi interaksi antara keduanya melalui reseptor yang terdapat pada permukaan limfosit T. Interaksi ini akan mengaktifkan limfosit tersebut oleh interleukin 1 (IL-1) yang diproduksi oleh makrofag sehingga terjadi beberapa perubahan yaitu transformasi blast, proliferasi dan diferensiasi menjadi subset limfosit T sebagai berikut (Fenton, 1996).

1. *T Helper* (Th) yang terdiri dari 2 subset yaitu Th1 dan Th2. Masing-masing akan memproduksi sitokin, Th1 akan mengeluarkan IL-2 yang akan merangsang proliferasi limfosit tersebut dan sekaligus meningkatkan aktivitas makrofag menghancurkan jasad renik yang terdapat di dalamnya. Limfokin lain yang diproduksi antara lain interferon- γ yang meningkatkan ekspresi HLA DR oleh makrofag.

Th2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10 yang akan merangsang aktivitas sel limfosit B dan selanjutnya terjadi diferensiasi sel limfosit B menjadi sel plasma yang memproduksi imunoglobulin.

2. *T Delayed* (Td) yang berhubungan dengan *Delayed Type Hypersensitivity* (DTH), yang berperan dalam uji tuberkulin yang positif.
3. *T Cytotoxic* (Tc) merupakan sel limfosit T yang dapat memusnahkan sasaran bila terjadi kontak baik secara langsung maupun melalui Ig M.
4. *T Suppressor* (Ts) yang berperan dalam menekan aktivitas sel limfosit Th, sel limfosit Tc, sel limfosit Td dan limfosit B bila respons imun sekuler maupun humoral telah cukup untuk menghancurkan jasad renik yang masuk.
5. *T memory* (Tm) sel ini memberi ingatan pada limfosit T untuk memberi respons yang sama pada invasi kuman yang sama selanjutnya.

Imunoglobulin yang pertama dibentuk pada infeksi primer *M. tuberculosis* adalah Ig M yang kemudian akan diikuti dengan meningkatnya Ig G yang menetap dalam waktu yang lama. Peningkatan Ig A juga didapatkan pada penderita tuberkulosis lanjut, yang dalam beberapa penelitian memang terbukti lebih tinggi daripada penderita dengan infeksi primer. Hal tersebut disebabkan karena pada infeksi lanjut proses infeksi telah menyebar ke arah bronchi/bronkioli yang memiliki permukaan mukosa, dengan demikian Ig A akan diproduksi lebih banyak.

Infeksi akut tuberkulosis dapat dilihat dengan didaptkannya kadar Ig M yang meningkat pada seorang penderita, tetapi kebanyakan penderita infeksi ini datang berobat pada keadaan yang telah menahun sehingga antibodi yang berperan dalam keadaan ini terutama adalah Ig G (Kaufmann, 1999).

Penderita tuberkulosis yang belum pernah mendapatkan pengobatan, umumnya kadar antibodi yang didapatkan tidak setinggi bila penderita telah mendapatkan terapi dalam satu sampai dua bulan. Dilaporkan adanya pembentukan antibodi yang meningkat pada bulan kedua setelah pengobatan yang berhasil, lalu turun sampai ke batas normal pada penderita yang telah sembuh. Beberapa literatur mengemukakan bahwa pengobatan spesifik yang diterima penderita tuberkulosis akan mematikan kuman penyebab pada bulan pertama pengobatan. Matinya kuman penyebab akan mengakibatkan hancurnya selubung kuman yaitu antara lain arabinomanan yang memiliki daya immunosupresif terhadap pembentukan antibodi. Menurut beberapa literatur (Freedman, 1998; Kaufmann, 2002) peranan

antibodi humoral pada tuberkulosis ini masih belum jelas, didapatkan ada antibodi yang protektif tetapi juga dijumpai antibodi yang non-protektif (Kabat, 2003). Peranan respons imun dalam melawan invasi *M. tuberculosis* terutama adalah yang berasal dari imunitas mediasi seluler (*cell mediated immunity*).

2.6. Struktur antigen *M. tuberculosis*

M. tuberculosis memiliki antigen yang kompleks, tersebar baik pada dinding sel maupun pada sitoplasmanya.

Dinding sel basil ini memiliki struktur antigen yang rumit dan terdiri dari beberapa lapisan sebagai berikut :

1. Lapisan permukaan : "*mycosides*", *cord factor*, *phosphatides* dan *sulfatide*
2. Lapisan di bawahnya : *wax D*, merupakan lapisan lemak yang berfungsi sebagai adjuvan yang tidak larut, granulomagenik, dan mengaktifkan makrofag.
3. Lapisan dalam : arabinogalaktan, arabinomanan (polisakarida) dan lapisan murein dari peptidoglikan yang memberi bentuk pada sel kuman.

Antigen dinding sel ini dikatakan tidak spesifik untuk *M. tuberculosis* karena juga terdapat pada spesies mikobakterium yang lain, bahkan bisa didapatkan pada kuman yang lain seperti *Corynebacteria*, *Nocardia* dan *Listeria* (Cheesbrough, 1984).

Usaha untuk mendapatkan antigen yang spesifik untuk *M. tuberculosis* telah banyak dilakukan, yang diawali dengan ditemukannya antigen *Old Tuberculin* oleh Robert Koch yang kemudian disempurnakan lagi oleh Florence Seibert dengan memurnikan antigen tersebut sehingga didapatkan *Purified Protein Derivative* (PPD). Hasil PPD ini dianggap tetap tidak memuaskan sehingga kemudian dikembangkan cara elektroforesis untuk mendapatkan beberapa jenis antigen lain yang diharapkan lebih spesifik untuk *M. tuberculosis* (Ivanyi et al, 1990).

Struktur sitoplasma dari mikobakterium memiliki antigen polipeptida yang dikatakan mempunyai determinan antigen yang lebih spesifik untuk *M.*

tuberculosis; walaupun demikian struktur sitoplasma kuman ini tidak memiliki perbedaan yang spesifik dibandingkan dengan kuman yang lain.

Dewasa ini sejalan dengan perkembangan dan penggunaan elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), kromatografi afinitas dan antibodi monoklonal banyak ditemukan berbagai jenis antigen yang bisa diperoleh dari *M. tuberculosis strain* H37Rv, H37Ra, *M. bovis* BCG yang telah diproses dan dimurnikan dengan kromatografi kolom afinitas yang dilengkapi antibodi monoklonal atau proses pemurnian dapat dilakukan juga dengan *overproducing recombinant Escherichia Coli* pada penderita tuberkulosis paru, yaitu antara lain (Espitia et al, 1989; Subronto, 2002) :

1. Protein 38 kDa : antigen ini merupakan antigen yang cukup spesifik, didapatkan pada penderita tuberkulosis paru aktif dengan dahak positif. Antigen ini memiliki tujuh epitop yang masing-masing spesifik untuk *M. tuberculosis* kompleks, tetapi ekspresi-nya terhadap *M. bovis* kurang spesifik. Tidak didapatkan reaksi silang dengan epitop yang distimulasi dengan sel B. Susunan asam amino antigen ini sesuai dengan lipoprotein. Berdasarkan analisis biomolekuler, struktur antigen ini homolog dengan *phoS gene E. coli*. Jackett dan kawan-kawan menyimpulkan bahwa antigen 38 kDa ini lebih spesifik menggambarkan infeksi tuberkulosis aktif. Hal tersebut karena antigen 38 kDa ini hanya ditemukan pada strain yang virulen. Sayangnya pada proses pemurniannya salah satu dari ketujuh epitop tersebut hilang (Ivanji et al, 1998)
2. hsp-65 : antigen ini merupakan *heat shock protein* yang homolog dengan protein Gro-EL dari *E.coli*. Dikatakan bahwa antigen ini dapat menimbulkan respons imun protektif, namun juga menimbulkan reaksi autoimun (Subronto, 2002).
3. Protein 19 kDa : antigen ini merupakan lipoprotein yang terlibat dalam metabolisme fosfat dan dikatakan menginduksi aktivasi IL-12 dan NOS2 melalui TLR2 (Subronto, 2002)
4. Protein 32 kDa : merupakan *fibronectin-binding protein*.

5. Antigen 85 kompleks : Protein ini terdiri dari 3 protein yang homolog yaitu Ag 85A, B dan C. Antigen ini terdapat pada beberapa *Mycobacteria* yang lain. Antigen ini menginduksi timbulnya IFN- γ yang tinggi pada individu sehat tetapi tidak pada penderita TB.
6. Lipoarabinomanan : antigen ini telah diketahui struktur kimiawinya (lipopolisakarida), termasuk dari lapisan dalam dinding *M. tuberculosis* dan titer antibodi terhadap antigen ini didapatkan pada penderita tuberkulosis maupun pada penderita lepra.
7. Beberapa antigen yang lain misalnya protein 70 kDa (DnaK), 10 kDa (GroES) dan masih banyak lagi yang dalam taraf penelitian untuk mendapatkan antigen yang spesifik dan sensitif untuk perkembangan serodiagnosis tuberkulosis paru.
8. Antigen ESAT-6 akan dibahas tersendiri dalam bab 2.10

2.7. Manifestasi klinis dan gambaran radiografis tuberkulosis paru

Infeksi tuberkulosis umumnya memberikan beberapa gejala klinis, tetapi pada sebagian besar penderita infeksi ini gejala yang timbul tidaklah terjadi langsung tetapi secara perlahan-lahan sehingga seringkali terabaikan. Di lain pihak infeksi ini sendiri bisa juga tidak memberikan gejala walaupun pemeriksaan yang lain memberikan gambaran kelainan yang relevan dengan tuberkulosis paru.

Gejala awal yang sering dirasakan adalah menurunnya nafsu makan disertai dengan sering merasa lelah, berat badan yang turun, demam yang dapat terjadi beringit-tingit bahkan berbulan-bulan atau hanya sekedar gejala yang menyerupai gejala influenza, batuk yang berlangsung lama disertai dengan dahak yang mukoid atau mukopurulen dan atau bersama-sama dengan batuk darah beserta sesak nafas. Bila infeksi berlanjut secara progresif dan belum mendapatkan terapi spesifik maka bisa didapatkan efusi pleura, pleuritis tuberkulosis dan empiema tuberkulosis (Baron et al, 1990; Aditama, 1995).

Gambaran radiografis paru dengan kompleks primer yang baru terbentuk adalah (Davies, 1984) :

1. bercak peningkatan densitas bagian paru yang radiolusen,
2. pembesaran kelenjar regional,
3. limfangitis,
4. efusi pleura yang terlokalisir.

Dapat pula berupa pneumonia, atelektasis, emfisema, gambaran milier, bercak kalsifikasi dan lain sebagainya. Dari X-foto dada hanya dapat dibuat persangkaan kuat akan adanya tuberkulosis. Pemeriksaan radiologis paru walaupun sensitif (82,4%) mempunyai beberapa keterbatasan sebagai berikut Toman (1979).

- a. Sukar untuk membenarkan interpretasi yang tepat terutama pada kasus golongan anak, sehingga membutuhkan keahlian yang khusus dan pengalaman yang banyak.
- b. Membutuhkan kehadiran penderita yang tentunya menyukarkan untuk beberapa penderita yang berasal dari daerah yang jauh dari rumah sakit yang memiliki fasilitas radiografis.
- c. Mengingat efek samping pemeriksaan ini, pemeriksaan ulangan lazim dilakukan terbatas sampai tiga hingga empat kali dalam setahun, sedangkan perkembangan penyakit dapat terjadi lebih cepat.
- d. Pemeriksaan ini lazimnya tidak sampai pada gugus terdepan dari organisasi pemberantasan penyakit (Puskesmas).
- e. Perbedaan (*disagreement*) hasil pembacaan antara pembaca (27-30%) dan antar waktu pembacaan pada seorang pembaca (19-24%) cukup besar.
- f. Tidak dapat dipakai untuk diagnosis pasti. Spesifisitasnya 78%.

Gambaran radiografis tuberkulosis paru pada penderita dengan atau tanpa gejala pada keadaan awal memberikan gambaran infiltrasi parenkim yang disertai dengan pembesaran kelenjar limfe. Lesi parenkim paru ini umumnya tampak pada bagian apeks dan bagian segmen posterior lobus paru atas atau pada bagian superior lobus bawah. Nodul infiltrat memberikan ukuran besar yang bervariasi, sedangkan distribusi lesi bisa *lobar*, *segmental* atau *subsegmental*. Kavitasi sering ditemukan, kecuali pada penderita dengan gangguan sistem imun. Kelainan lain yang juga dapat ditemukan adalah keadaan atelektasis dan

parut fibrotik dengan retraksi hilus dan deviasi trakea yang dapat disertai dengan efusi pleura. Infeksi yang menyebar secara hematogen umumnya memberikan gambaran milier yaitu nodul infiltrat mempunyai besar yang sama (± 2 mm), tersebar difus pada seluruh parenkim paru (Baron et al, 1990).

Pada penderita yang pernah terinfeksi dapat ditemukan kalsifikasi di parenkim paru pada fase penyembuhan atau setelah fase tersebut (Aditama, 1995).

2.8. Sarana diagnostik mikobakteriologi molekuler

2.8.1 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

Polymerase chain reaction merupakan suatu teknik analisis DNA maupun RNA yang berkembang pesat. *Polymerase chain reaction* merupakan teknik amplifikasi suatu segmen DNA secara *invitro* dengan *primer* spesifik untuk amplifikasi dari rantai DNA target sebagai *template*, secara simultan sehingga *DNA copy* dari target meningkat secara sintesis dari suatu rantai komplementer DNA pada arah 5' ke 3' menggunakan *template* rantai tunggal, yang dimulai dari pemisahan rantai ganda DNA target. Pada umumnya PCR memiliki prinsip yang sama yaitu menggunakan dua *primer* yang masing2 komplementer terhadap rantai yang bertawanan pada regio *DNA template* yang telah didenaturasi dengan pemanasan (Made, 2000).

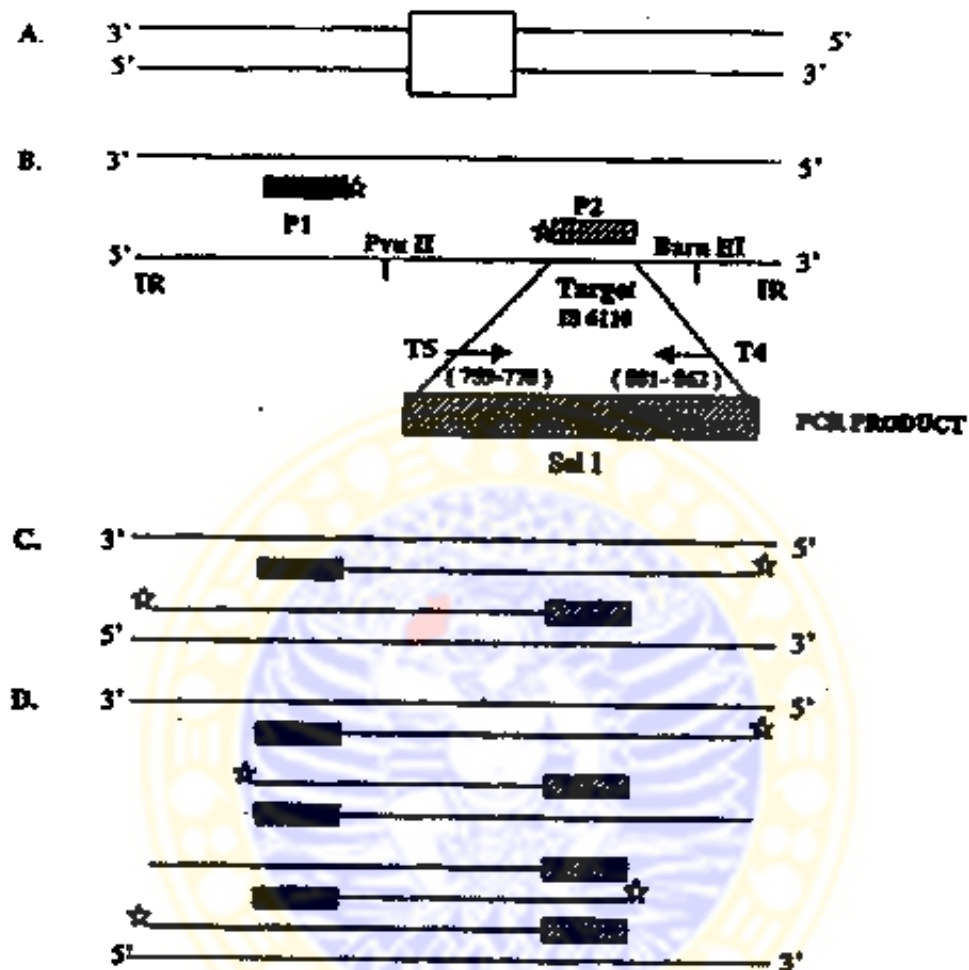
Sama seperti halnya dengan uji PCR untuk kuman lain, PCR-TB terdiri dari 3 tahap.

Tahap 1. Denaturasi

Dalam tahap ini dilakukan denaturasi pada molekul *double stranded DNA-target* dengan pemanasan pada suhu 94°C selama 30-60 detik, menjadi *single stranded DNA* yang masing-masing siap untuk mengikat sikuen asam amino yang komplementer (*primer*). Lihat gambar 2.1 A.

Tahap 2. *Annealing* atau hibridisasi

Dalam tahap ini suhu diturunkan menjadi 45° – 60° C selama 60 – 120 detik sehingga terjadi pengikatan (*annealing*) dari sepasang *primer* yaitu DNA sintetik (*oligonukleotida*) yang komplementer terhadap sekuens spesifik dari target DNA (gambar 2.1B).



Gambar 2.1. Prinsip dasar uji PCR-TB (Handojo, 2001)

Tahap 3. Amplifikasi

Dalam tahap ini suhu dinaikkan menjadi 72°C selama 60 - 20 detik sehingga enzim *Taq polymerase* menjadi aktif dan menyebabkan perpanjangan dari primer sebagai titik awal dari rantai target DNA sebagai cetakan (*template*) (gambar 2.1C). Uji PCR ini dilakukan dengan alat *thermal cycler* sebanyak 20-35 siklus dan secara teoritis diharapkan dapat diproduksi salinan sebanyak 1 milyar dari setiap target DNA (gambar 2.1D). (dikutip dari Handojo, 2001).

Ada beberapa target *primer* yang dapat dipakai untuk uji PCR-TB seperti misalnya *insertion elements* (IS6110 dan IS1081), gen 16sRNA, fragmen genomik *mpt40*, protein 32/38/65/85 kDa, MPB64, MPB 70, kombinasi dari *mpt40* dan IS1081 atau IS6110 dan PAB atau beberapa bagian dari IS6110, namun hanya dua yang sering dipakai yaitu IS6110 dan 16sRNA (Handojo, 2001). Nilai diagnostik Uji PCR-TB dengan target DNA 16S rRNA (*amplicor™*) dilaporkan mempunyai sensitivitas 44 – 98 % dan spesifisitas antara 96-100% (Handojo, 2001). Uji ini tidak dapat membedakan anggota dari *M.tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis* dan *M. bovis BCG*), karena mereka mempunyai gen 16S rRNA yang identik. Untuk membedakan sumber *host* dan virulensinya dianjurkan skrining memakai *primer* yang berasal dari gen RD1, RD9 dan RD 10 (Parsons, 2002).

2.8.2 Ligase Chain Reaction (LCR).

Perbedaan dari uji LCR dan PCR hanya terletak pada *primer* yang dipakai pada kedua tes tersebut. Pada uji LCR sebagai primernya dipakai sepasang *probes DNA* seperti *PAB probes* pada asai LCxMTB.

Uji LCR ini terdiri dari tiga tahap yaitu denaturasi DNA dengan pemanasan, *annealing* dari *LCR probes* dan pemanjangan serta penyambungan dua *probes* yang berpasangan. Sebagai sikuen target untuk asai LCx MTB dipakai salinan tunggal gen kromosom yang mengkode antigen protein B (PAB) yang spesifik untuk *M. tuberculosis* (Abbot Diagnostic Division, 1996).

Pada uji LCR, setelah denaturasi DNA dengan pemanasan menjadi 2 rantai (*strands*), suhu diturunkan sehingga sepasang *probes LCR* dapat diikatkan (*anneal*) pada satu untai target sedangkan sepasang *probes* yang lain akan diikatkan pada rantai yang komplementer. Celah yang terdapat di antara kedua *probes* yang berpasangan dan terhibridisasi diisi oleh enzim DNA polimerase (*thermostable*) dengan menggunakan nukleotida yang tersedia. Selanjutnya kedua ujung sepasang *probes* yang berdekatan akan disambung oleh enzim DNA ligase yang termo-stabil.



Gambar 2.2. Prinsip dasar uji LCR (dipetik dari Handojo,2001)

Probes yang terligasi sekarang bertindak sebagai sikuen target dalam siklus berikutnya seperti tampak dalam gambar 2.2 (dikutip dari Handojo, 2001).

Kelemahan uji PCR-dan LCR-TB.

1. Tidak semua penderita TB paru mengeluarkan basil TB dalam dahaknya.
2. Uji LCR/PCR-TB tidak dapat membedakan basil TB yang hidup dan yang mati.
3. Keandalan dari uji ini tergantung pada target DNA atau primer yang dipilih.
4. Pada TB jaringan seperti tulang, TB kelenjar, pericarditis TB, dan TB otak, penggunaan uji PCR-/LCR-TB tidak dianjurkan sebab pengambilan spesimen untuk pemeriksaan amat invasif atau tidak mungkin dilaksanakan. Disamping itu keandalannya juga tergantung dari spesimen jaringan yang diambil, mengandung basil (DNA) TB atau tidak.
5. Dari segi teknis pelaksanaan tes ini kurang praktis, membutuhkan peralatan dan reagensia yang mahal.
6. Kemungkinan terdapatnya *inhibitor* dalam spesimen yang diperiksa dapat menimbulkan hasil negatif semu.

2.9. Serodiagnosis tuberkulosis paru

Adanya keterbatasan-keterbatasan pada pemeriksaan bakteriologis mendorong cara pendekatan lain yang diharapkan dapat mendeteksi proses penyakit tuberkulosis paru ini lebih dini dengan keandalan yang baik, yaitu dengan serodiagnosis.

Arbing mengawali cara serodiagnosis pada tahun 1898 dengan teknik aglutinasi yang menggunakan suspensi basil *M. tuberculosis* pada sera penderita tuberkulosis paru. Cara ini dalam perkembangan selanjutnya mulai ditinggalkan oleh karena kurang sensitif dan spesifik.

Uji serologis tuberkulosis yang kemudian dipakai adalah uji fiksasi komplemen, tetapi dengan alasan yang sama serta kesulitan yang ada, baik dalam penyediaan antigen yang baik maupun dalam pembakuan metode yang dipakai, maka uji inipun mulai kehilangan popularitasnya sebagai sarana diagnostik tuberkulosis paru (Grange, 1984).

Tahun 1948 Middlebrook-Dubos mengembangkan uji hemaglutinasi (aglutinasi tak langsung) untuk mendeteksi antibodi terhadap *M. tuberculosis* dalam serum penderita tuberkulosis paru dengan menggunakan antigen tuberkulin yang disalurkan pada sel darah merah.

Sebenarnya uji ini cukup praktis dalam pelaksanaannya, namun hasil yang didapatkan memberikan variasi yang besar, baik dalam segi sensitivitas maupun spesifisitasnya.

Hasil yang amat bervariasi inilah yang membuat hilangnya manfaat klinis dari uji hemaglutinasi terhadap infeksi ini. Usaha-usaha untuk mengganti jenis antigen yang digunakan dengan tuberkulo-polisakarida walaupun ada, tetapi tetap saja tidak memberikan hasil seperti yang diharapkan (Grange, 1984; Handojo, 1988).

Mengingat kepraktisan uji ini beberapa peneliti pada tahun 1983 menggunakan kembali uji ini dengan beberapa perbaikan untuk meningkatkan mutu uji hemaglutinasi ini sebagai sarana serodiagnosis tuberkulosis paru.

Perbaikan yang dilakukan menyangkut segi teknik pelaksanaannya yaitu penggunaan sel darah merah domba dengan perlakuan khusus, pemakaian

antigen polipeptida sitoplasma *M. tuberculosis* (H37Rv) yang didapat dengan cara ultrasonikasi dan ultrasentrifugasi.

Usaha perbaikan uji serologis ini memberikan hasil sensitivitas hanya 58%, sedangkan spesifisitasnya hanya 74%, sehingga tetap saja uji serologis ini belum dapat memberikan hasil yang memuaskan (Handojo, 1988)

Pariett dan Youmans tahun 1959 melaporkan penggunaan uji serologis lain untuk diagnosis tuberkulosis dengan menggunakan cara difusi agar ganda (*double gel diffusion test*). Hasil uji serologis ini ternyata memberikan sensitivitas dan spesifisitas yang bervariasi dengan rentang yang besar, sehingga hasil uji laboratoris ini oleh sejumlah peneliti dianggap tidak dapat digunakan untuk menentukan kesembuhan. Sebenarnya uji serologis ini cukup praktis dalam pelaksanaannya, hanya waktu yang diperlukan agak lama (sampai 72 jam) (Grenga, 1984).

Tahun 1963 Shepard dan Kirsh menggunakan uji imunofluoresens tak langsung untuk identifikasi dan penentuan tipe *M. tuberculosis* dan dikatakan bahwa uji ini memberikan hasil yang baik. Hal inilah yang kemudian mendorong Toussaint dan kawan-kawan melakukan modifikasi uji serologis ini dengan menggunakan antigen tarut yang diabsorbsikan pada cakram kertas saring dan dibaca dengan fluorimeter. Cara ini mempunyai akurasi, presisi dan kepraktisan yang lebih tinggi dibandingkan uji imunofluoresens tak langsung yang konvensional, hanya saja sensitivitas uji ini tidak tinggi, 66,6% pada penderita-penderita setelah menjalani pengobatan spesifik.

Tahun 1970 Nassau dan kawan-kawan menggunakan uji imunofluoresens tak langsung ini untuk mendeteksi Ig G terhadap basil tuberkulosis pada serum penderita tuberkulosis paru dengan menggunakan basil tuberkulosis yang telah dirusak dinding selnya sebagai antigen. Cara ini memberikan sensitivitas 89% dan spesifisitas 96%. Hasil yang diperoleh ini ditunjang oleh Mahfouz (1980) yang memakai *Alt tuberculin* yang dipolimerisasikan sebagai antigen. Uji IFA (*immunofluorescens assay*) ini mempunyai beberapa keunggulan selain sensitivitas dan spesifisitasnya yang tinggi, yaitu dapat membedakan proses infeksi tuberkulosis paru yang aktif dan yang inaktif, sehingga dapat dipakai

untuk mengikuti hasil pengobatan, hanya saja uji IFA ini sulit digunakan secara luas di lapangan karena memerlukan peralatan yang canggih, perlu tenaga terlatih serta hasil yang diperoleh harus segera dibaca (Grange, 1984; Handojo, 1988).

Uji serologis lain yang berkembang (1971) untuk mengantisipasi beberapa kelemahan uji tersebut di atas adalah uji RIA (*radio-immunoassay*). Uji ini memakai suspensi basil tuberculosis (H37Rv) yang dimatikan dengan cara pemanasan dan diberi petanda radioisotop. Sensitivitas dan spesifisitas uji RIA ini tinggi mencapai 88,9% dan 81,1%, dan hasil uji ini menjadi lebih sensitif dengan dipakainya antigen *M. tuberculosis var. bovis* BCG oleh Kardjito dan kawan-kawan (1983). Kerugian uji serologis ini yaitu sulit dikerjakan secara luas karena selain memerlukan peralatan yang canggih dan mahal, pelaksanaannya agak rumit, waktu paruh reagensia pendek, memerlukan tenaga terlatih dengan perlindungan terhadap bahan radioaktif yang dipakai (Grange, 1984).

Atas dasar inilah maka Kardjito menggunakan uji ELISA mikro (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) yang lebih praktis dan tidak mahal untuk penentuan kadar antibodi terhadap basil tuberculosis pada serum penderita tuberculosis paru. Hasil penelitian yang didapatkan hanya kenaikan titer Ig G yang bermakna di atas harga normal. Sensitivitas dan spesifisitas yang didapatkan 62% dan 74,3% (Widjajanti, 1990).

Tahun 1983 Handojo dan kawan-kawan mengembangkan suatu uji imunoperoksidase tak langsung untuk serodiagnosis penyakit tuberculosis paru dengan menggunakan polimer peptida sitoplasma *M. tuberculosis var. bovis* (BCG) sebagai antigen. Hasil sensitivitas uji ini 93% sedangkan spesifisitasnya 90%. Dikatakan uji ini cukup praktis, cukup baik dan murah sehingga sampai saat ini banyak digunakan di beberapa sentra kesehatan sebagai salah satu sarana diagnostik infeksi tuberculosis paru. Tahun 1988 Handojo menggunakan teknik peroksidase anti-peroksidase (PAP-TB) dengan antigen polimer yang sama untuk meningkatkan sensitivitas tes (Handojo, 1988).

Arifin (2001) membandingkan uji serologis TB-dot dan ICT-TB dan mendapatkan hasil sensitivitas TB-dot = 92,31%, spesifisitas = 95,83% dan

efisiensi = 94,25%; sedangkan pada ICT-TB didapatkan sensitivitas = 87,18%, spesifisitas = 81,25% dan efisiensi = 83,91%. Perbedaan spesifisitas dan efisiensi diagnostik kedua tes ini ternyata bermakna ($p < 0,05$). Perbedaan spesifisitas dan sensitivitas tes serologi juga dijumpai antara TB-Dot dengan Pathozyme di mana TB-Dot lebih sensitif dan spesifik (Handojo, 1996; Handojo, 2002).

2.10 ESAT-6

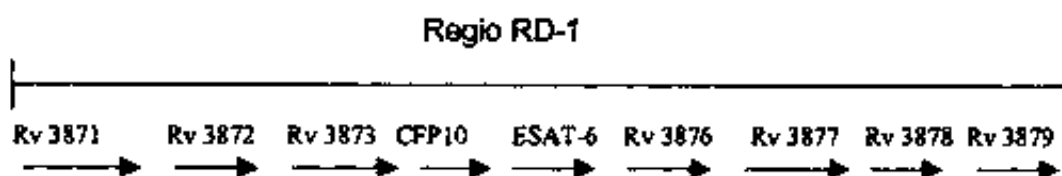
Mahairas et al (1996) berhasil menemukan perbedaan genetik antara *M. bovis* BCG dengan *M. bovis* yang virulen. Ada tiga daerah yang berhasil diidentifikasi dan dinamakan RD1 sampai RD3 (*genomic Regions of Difference*). Ke-tiga daerah tersebut mengalami delesi pada *M. bovis* strain BCG.

Pada analisis selanjutnya ternyata genom RD3 masih dipunyai oleh beberapa isolat klinis dari penderita, yang dianggap virulen.

RD2 yaitu segmen DNA 10,7 kb, mengandung beberapa elemen yang repetitif dan ternyata identik dengan gen Mpt-64. Delesi ternyata hanya dijumpai pada *sub strain* turunan BCG Pasteur setelah tahun 1925. Jadi delesi RD2 ini terjadinya hanya setelah penurunan dari BCG asli mulai tahun 1925.

RD1, segmen DNA 9,5 kb dijumpai terdelesi dari semua *sub strain* BCG dan terkonservasi pada semua isolat yang virulen, baik isolat laboratorium maupun klinis. Bila RD-1 di-insersi-kan kembali ke *strain* BCG, ternyata menyebabkan bakteri berekspresi sama dengan *strain* yang virulen dari *M.bovis* dan *M. tuberculosis* (Mahairas et al,1996).

Kemudian diketahui bahwa gen RD-1 mengandung 9 macam gen struktural ,Rv 3871 sampai 3879, diantaranya ada yang menyandi protein sekresi yang imunogenik yaitu ESAT-6 dan CFP-10 (Smith, 2003).



Gambar 2.3 Gen pada regio RD-1 (Smith,2003)

Andersen dan kawan-kawan pada tahun 1991 menemukan bahwa protein yang disekresi dari *M. tuberculosis* selama pertumbuhannya mempunyai peran penting pada immunitas protektif terhadap tuberkulosis (Andersen et al, 1991)

Sorensen dan kawan-kawan pada tahun 1995 berhasil memurnikan dan mengkarakterisasi antigen ESAT-6 yang disekresi oleh *M. tuberculosis* pada filtrat dari kultur. Analisis dari fraksi subsektuler dari *M. tuberculosis* menunjukkan adanya ESAT-6 ini baik pada fraksi sitosol maupun dinding sel kuman (Sorensen et al, 1995).

Pada penelitian selanjutnya dengan hewan coba, ternyata ESAT-6 ini mampu merangsang sel-T untuk memicu respons imun protektif yang ditandai dengan sekresi IFN- γ yang tinggi (Minion, 2003).

Ethay dan kawan-kawan (1998) menemukan bahwa ESAT-6 ini juga memicu timbulnya respons imun tipe lambat (DTH).

Telah diketahui bahwa suatu daerah dari rantai polipeptida bisa berfungsi sebagai epitop sel-B maupun sel-T, misalnya regio p31-40 dari antigen *M. tuberculosis* 16-kDa, dan beberapa epitop dari antigen lipoprotein 19 kDa. Pada percobaan hewan, dengan memperpanjang bagian hidrofilik ESAT-6, didapatkan reaksi baik oleh sel-B maupun sel-T (Harboe et al, 1998).

Skjot dan kawan-kawan pada tahun 2000 membandingkan berbagai macam protein BM rendah dari filtrat *M. tuberculosis* dan mengidentifikasi ESAT-6 dan keluarganya sebagai antigen sel-T yang dominan.

Ulrich dan kawan-kawan pada tahun 2000 membandingkan reaksi terhadap ESAT-6 dan PPD dengan mengukur kadar IFN- γ dan mendapatkan bahwa ESAT-6 mampu menimbulkan respons imun yang sama sensitifnya dengan PPD.

Urutan asam amino dari ESAT-6 telah diketahui dan dapat dilihat pada lampiran 12 (Sorensen et al, 1995).

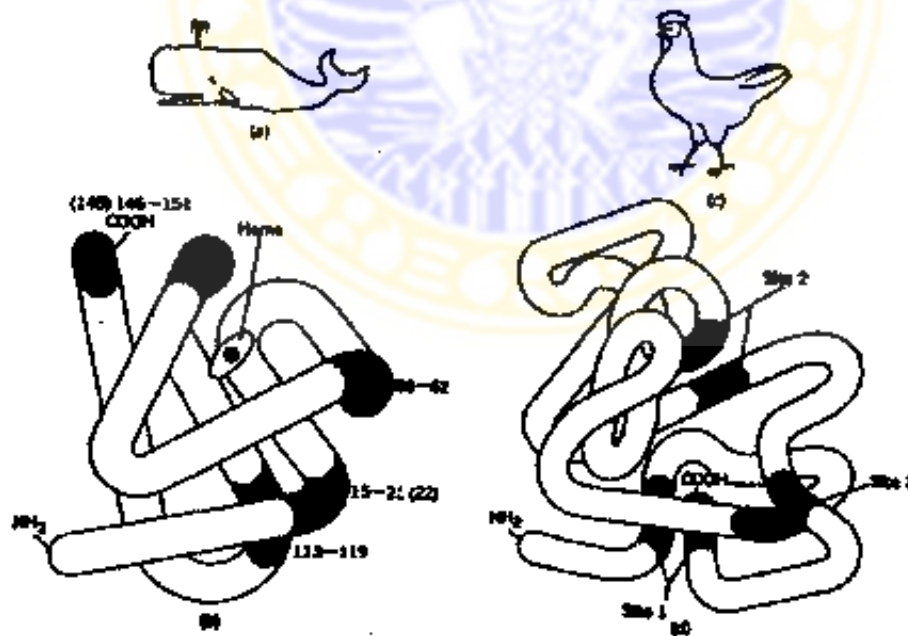
2.11. Dasar molekuler epitop.

Pelbagai molekul besar walaupun diketahui merupakan imunogen, tetapi hanya bagian tertentu saja dari molekul tersebut yang terlibat dalam ikatan antibodi yang ditimbulkannya. Daerah tertentu tersebut selain menentukan

spesifisitas reaksi antigen-antibodi juga sebagai penentu timbulnya respons imun. Daerah molekul yang terdapat pada permukaan disebut antigen determinan atau epitop. Sifat epitop yang terpenting adalah membutuhkan adanya *accessibility* untuk pengenalan oleh reseptor sel B dan antibodi (Goers, 1993; Subowo, 1993)

Determinan antigen atau epitop merupakan bagian dari molekul yang secara spesifik dikenali oleh paratop atau *binding sites* dari molekul antibodi. Atas dasar itu pada protein, determinan antigenik atau epitop ditentukan oleh hanya beberapa residu asam amino yang akan dikenali oleh antibodi. Bagian asam amino yang mengikat antibodi tersebut disebut kontak residu. Suatu syarat yang pasti adalah kontak residu harus terbuka bebas tanpa ditutupi oleh rangkaian asam amino atau lipatan asam amino. Konsep lain yang ditetapkan oleh beberapa peneliti menyebutkan bahwa suatu epitop membutuhkan dua sifat yaitu reaktivitas antigenik dan imunogenisitas (van Rogenmortel, 1989).

Dari segi susunan asam aminonya dikenal dua macam epitop yaitu: *continuous* dan *discontinuous epitopes*.



Gambar 2.4 Contoh distribusi epitop dari suatu antigen (dikutip dari Klein, 1982) Keterangan: (a) sperm whale (b) sperm whale myoglobin (c) ayam (d) eggwhite lysozyme

Continuous epitope (determinan antigenik) yang sesuai dengan fragmen peptida dari protein yang secara antigenik berhubungan dengan protein induknya, terdiri dari sejumlah residu yang berurutan dalam siku protein dan mungkin merupakan bagian dari *discontinuous epitopes* yang lebih besar dan terdiri dari residu-residu yang berjauhan dalam sikuennya dan dipersatukan oleh lipatan dari rantai polipeptida (Pellequer, 1994). (Lihat gambar 2.4)

Bila tidak ada penjelasan yang lebih lanjut, istilah epitop biasanya dipakai untuk epitop sel B yaitu bagian antigen yang dikenal oleh reseptor sel B dan oleh antibodi.

Jenis epitop yang kedua dikenal sebagai epitop sel T, yaitu fragmen peptida dari protein yang telah diproses dalam *antigen presenting cell* (APC) dan bersama-sama dengan molekul protein dari *major histocompatibility complex* (MHC) yang dikenal oleh reseptor dari sel T (Pellequer, 1994).

Dari berbagai pengamatan dapat disimpulkan adanya beberapa persyaratan agar suatu molekul dapat bersifat imunogenik. Beberapa persyaratan ini antara lain adalah:

1. Ukuran Molekul
2. Terjangkaunya epitop pada permukaan molekul antigen
3. Keasingan dan kapasitas imunogenik
4. Peran asam amino khusus pada imunogenisitas.

Molekul dengan BM 14.000 kalau tidak bergabung dengan molekul peningkat (*enhancer*) merupakan antigen yang lemah. Molekul dengan BM 40.000 atau lebih biasanya merupakan antigen yang bagus, dan molekul dengan BM 50.000 atau lebih dengan struktur protein atau peptida-hidrat arang kompleks adalah antigen terbaik. Dari sini terlihat bahwa ukuran suatu molekul merupakan salah satu faktor yang patut dipertimbangkan dalam timbulnya interaksi antigen-antibodi. Khusus untuk protein, dari beberapa pengamatan ditunjukkan bahwa protein dan peptida kecil dengan BM antara 4000 – 5000 kadang-kadang mampu membangkitkan respons imun humoral dan seluler. Suatu potongan antigenik lisosim berupa suatu lengkungan peptida dengan BM sekitar 2000 ternyata mampu membangkitkan kekebalan pada tikus meskipun lambat. Di samping itu,

peptida sintetik berupa polimer asam glutamat dan tirosin dengan BM < 4000 juga bersifat imunogenik. Bahkan oligopeptida tirosin sangat kecil seperti tirtirosin sampai heksa tirosin, asalkan ada gugus p-azobensen arsonat yang terikat, mampu juga merangsang produksi antibodi. Hanya saja semua molekul kecil tadi merupakan imunogen yang lemah dibandingkan molekul besar. Molekul ini akan lebih bersifat imunogenik dengan menggabungkannya dengan molekul pembawa yang lebih besar. Dapat disimpulkan sebenarnya imunogenisitas tidak semata-mata ditentukan oleh ukuran molekul.

Dari berbagai pengamatan, baik terhadap protein alami maupun sintetik, diduga bahwa ukuran penentu antigenik berkisar dari empat sampai enam sisa asam amino. Pengamatan pada antibodi terhadap asam nukleat menunjukkan juga ukuran penentu antigenik yang berkisar antara empat sampai enam nukleotida (Sofro, 1994).

Letak epitop pada suatu molekul sangat mempengaruhi imunogenisitas molekul tersebut. Semakin tersembunyi letaknya, semakin kurang daya imunogenisitasnya. Sebaliknya, semakin terpapar letaknya, semakin besar daya imunogenisitasnya. Hal ini ditunjukkan dari berbagai percobaan antara lain dengan menggunakan antigen sintetik yang komposisi keseluruhan asam aminonya sama, tetapi dengan urutan yang dibuat berbeda. Pengamatan serupa dijumpai pada berbagai molekul antigen protein. Sebagai contoh, mioglobin memiliki daerah antigen pada "pojok" molekulnya, yang terpapar ke arah luar. Demikian pula lisozim yang memiliki daerah lengkungan yang merupakan penentu imunodominan bagi molekulnya (Klein, 1982).

Dari pengamatan terhadap antigen protein, untuk ekspresi kemampuan antigeniknya tidak diperlukan adanya asam amino khusus baik di dalam maupun di luar penentu antigenik atau epitopnya. Tetapi beberapa percobaan menunjukkan bahwa suatu modifikasi khusus dengan oligopeptida pada protein tertentu dapat mempengaruhi imunogenisitasnya. Sebagai contoh adalah modifikasi pada protein gelatin. Protein ini merupakan imunogen yang sangat lemah pada kelinci dan marmut, tetapi modifikasi pada gelatin dengan tirosilasi akan menyebabkan peningkatan imunogenisitasnya. Pengaruh dan

keikutsertaan suatu residu asam amino pada kekhususan antigenik protein asli juga banyak dipelajari dan diamati. Sebagai contoh adalah residu asam amino isoleusin dan prolin. Residu isoleusin posisi 58 pada sitokrom c merupakan bagian imunodominan dari epitopnya, sedangkan pada ribonuklease teroksidasi, bagian imunodominan dari epitopnya adalah residu prolin posisi 117 (Klein, 1982; Sofro, 1994).

Jadi dapat disimpulkan tak ada suatu tolak ukur kimia fisik yang unik sebagai sifat yang khas dari epitop sel B. Suatu sifat penting dari epitop adalah aksesibilitas yang diperlukan untuk dikenali oleh reseptor sel B dan oleh antibodi (Pellequer, 1994).

2.12 Cara Penentuan epitop

Ada tiga strategi dasar untuk identifikasi epitop yang digunakan dewasa ini (Worthington dan Morgan, 1994).

1. Pendekatan yang pertama adalah dengan menggunakan ramalan alur (*algorithms*) untuk identifikasi epitop yang dicurigai, mensintesis peptida yang representatif dan kemudian dilakukan pengujian. Prediksi antigenisitas didasarkan pada skala kecendrungan dari ke 20 residu asam amino yang mencerminkan berbagai sifat fisiko-kimiawi yang telah dihubungkan dengan lokasi dari *continuous epitope* pada protein yang telah dikarakterisasi dengan baik. Parameter yang dipakai meliputi lima hal yaitu:
 - a). *Hydrophilicity / inverted hydrophobicity*.
 - b). *Accessibility*
 - c). *Flexibility* dari fragmen-fragmen yang pendek
 - d). Antigenisitas. Skala antigenisitas dari Weling dkk didasarkan pada frekwensi relatif dari asam amino yang terdapat pada beberapa epitop dari protein-protein yang telah diketahui struktur antigeniknya.
 - e). Struktur sekunder. Elemen-elemen dari struktur sekunder seperti lokasi putaran dan atau heliks telah dipakai untuk mengidentifikasi daerah yang mungkin antigenik dari suatu protein.

Pendekatan ini dibatasi oleh kemampuan dari program komputer yang digunakan untuk menentukan sikuen kandidat dan syarat lain urutan asam amino dari protein yang dicari epitopnya harus diketahui lengkap sebelumnya.

2. Pendekatan kedua adalah membuat fragmen protein dengan metode enzimatis atau teknik DNA rekombinan. Dan menggunakannya untuk melokalisasi suatu epitop pada regio tertentu dari protein. Sikuen dari seluruh protein tak mutlak diperlukan pada tahap ini dan sikuen dari regio yang mengandung epitop dapat ditentukan kemudian.
3. Pendekatan yang ketiga adalah dengan menggunakan *epitope scanning*. Pada *epitope scanning* cara pin dibutuhkan data tentang sikuen protein untuk mensintesis sejumlah peptida kecil yang umumnya tumpang tindih dalam sikuennya dan mewakili suatu rentangan protein yang pendek dan secara bersama-sama merupakan sikuen asam amino yang lengkap dari protein (atau bagiannya yang menarik untuk ditentukan). Peptida kecil ini kemudian diuji dengan sistem assay yang tepat dan epitop yang spesifik yang dikenali selanjutnya ditentukan. *Epitope scanning* merupakan pendekatan yang paling lengkap untuk identifikasi epitop linier dari protein yang diketahui struktur primernya.

Peptida ini dapat disintesis dengan beberapa macam metode yaitu dengan metode *resin based*, *polyethylene rods*, atau *pins*.

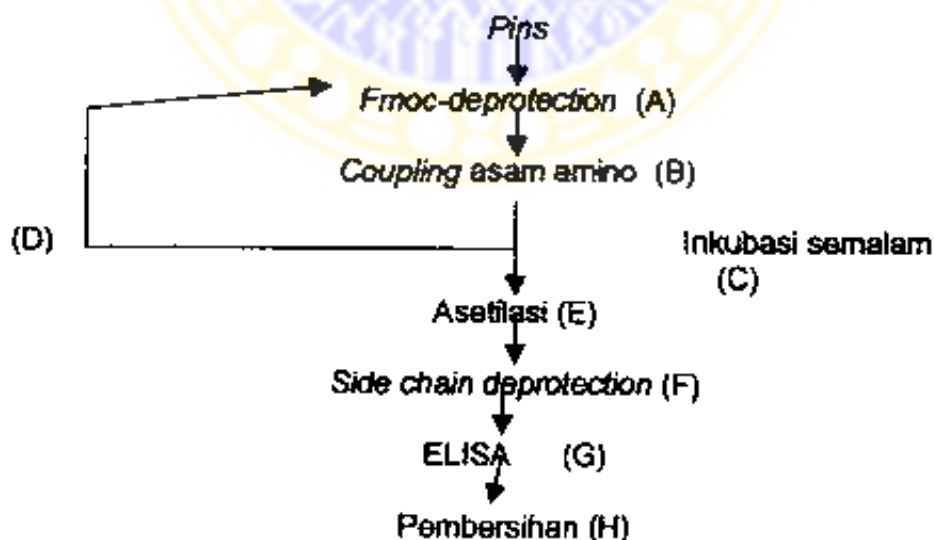
Metode dengan *resin based* membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang mahal karena harus mensintesis peptida dalam jumlah yang banyak. Kemajuan yang penting dalam *epitope scanning* yaitu dikembangkannya suatu teknik yang diuraikan oleh Geysen dkk (1987), yang memungkinkan sintesis beratus-ratus peptida secara bersama-sama pada *polyethylene rods* atau *pins* yang diaktifkan. Teknik dari Geysen dkk tersebut (*multiple peptide synthesis*), dewasa ini merupakan cara yang paling sering dipakai untuk menentukan epitop antibodi (*B-cell epitopes*) dengan menggunakan peptida yang tetap melekat pada pins yang dapat diulang-ulang dipakai untuk assay.

2.13 Polyethylene Pins

Strategi untuk analisis epitop dengan menggunakan sintesis peptida skala kecil dapat menggunakan metode *polyethylene rods* atau *pins* diikuti dengan metode ELISA yang berguna untuk mengidentifikasi epitop antibodi, dan sekarang dikenali sebagai teknologi *Pepscan*. Terbentuknya teknik ini berdasarkan teknologi pin produksi dari *Chiron Mimotopes*, yang memproduksi *kit* untuk *epitope scanning* dengan tiga sistem. Dua *B-cells epitope scanning kit* dan satu *T-cell epitope scanning kit*. *Kit* ini dapat digunakan dengan berbagai prosedur termasuk peptida bebas.

Pada sistem *epitope scanning*, perangkat lunak komputer digunakan untuk mengenali peptida yang akan disintesis, banyaknya asam amino yang dibutuhkan dan jadual untuk sintesis (Worthington dan Morgan, 1994). Reaktivitas peptida sintetik yang dipasangkan pada *pin* diuji terhadap antibodi dalam serum manusia dengan menggunakan teknik ELISA.

Peptida delapan mer yang saling tumpang tindih pada sikuen asam amino dari antigen ESAT-6 regio N-terminus dari residu 1-35 disintesis pada *polyethylene pins* yang disuplai dalam bentuk *kit* dari *Chiron Mimotopes*, Clayton, Vic, Australia. Garis besar dari metode sintesis peptida pada *polyethylene pins* adalah sebagai berikut (Gam, 1992)



Gambar 2.5. Prosedur dari sintesis peptida (dikutip dari Anita, 2000)

Pada tabel 2.2. di bawah dicantumkan beberapa penggunaan *B-cell Epitope mapping (Pepscan)* untuk identifikasi epitop reaktif dari berbagai jenis patogen.

Tabel 2.2 Penelitian epitop sel –B pada beberapa jenis kuman

Peneliti	Tahun	Jenis patogen
Okahashi	1993	<i>Streptococcus mutans</i>
Lachumanan	1993	<i>Rickettsia tsutsugamushi</i>
Matsuhita	1994	<i>Streptococcus mutans</i>
Ogawa	1995	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Panchanatan	1998	<i>Salmonella typhi</i>
Harboe	1998	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Anita	2000	<i>Streptococcus mutans</i>

2.14 Vaksin DNA

Tujuan vaksin genetik sama seperti vaksin tradisional yang memakai patogen yang dimatikan atau dilemahkan yaitu mempersiapkan sistem imun untuk membasmi virus, bakteri atau parasit yang berbahaya secara cepat, sebelum patogen ini berhasil membuat kerusakan di dalam tubuh manusia. Vaksin genetik ini bisa terdiri dari DNA atau RNA, tetapi karena sifat RNA yang kurang stabil, maka biasanya dipakai vaksin DNA (Weiner, 1999).

Vaksin DNA mempunyai struktur yang berbeda dari yang tradisional, yaitu terdiri dari plasmid rekombinan yang mengandung DNA yang menyandi satu atau beberapa antigen protein patogen tertentu dengan menghilangkan gen untuk replikasi atau yang menyebabkan penyakit.

Plasmid terdiri dari DNA untai ganda yang berbentuk cincin, dan biasanya berasal dari bakteri, tetapi tidak mampu menyebabkan infeksi.

Cincin plasmid ini kemudian dimasukkan ke dalam tubuh manusia melalui suntikan ke sel otot atau dengan *gene gun* ke sel kulit. Gen patogen yang dimasukkan ke dalam plasmid kemudian menyandi dan memproduksi antigen

yang mampu membangkitkan respons imun yang normalnya ditimbulkan oleh patogen hidup.

Setelah vaksin DNA memasuki nukleus sel *host*, maka gen di dalam plasmid itu akan dikopikan ke rantai m-RNA yang mobil dan kemudian ditranslasikan ke protein antigenik di sitoplasma. Antigen ini dikenali oleh sistem imun melalui dua jalur. Pertama, mereka bisa dilepaskan langsung meninggalkan sel. Ke dua, protein ini dihancurkan menjadi fragmen dan bergabung dengan molekul MHC klas I dan ditampilkan di permukaan sel.

Vaksin DNA membangkitkan imunitas protektif terhadap patogen terutama dengan mengaktifkan kedua jalur dari sistem imun yaitu imunitas humoral yang menyerang patogen di luar sel dan imunitas seluler yang memusnahkan sel yang telah dikolonisasi oleh patogen. Imunitas dicapai bila kedua aktivitas di atas telah menghasilkan sel memori yang berumur panjang, yang siap menghadapi patogen penyebab penyakit (Cooper, 1995).

Pada respons imun humoral, sel limfosit-B mengikat antigen protein yang dilepaskan dan ini memicu pelepasan antibodi dan mengaktifkan sel B. Sebagian dari sel-B akan menjadi sel memori untuk persiapan yang akan datang.

Fragmen protein antigen atau peptida yang berada pada lekukan molekul MHC klas I memicu terjadinya respons imun seluler. Pada kompleks molekul antigen ini, akan datang sel T sitotoksik pembunuh dan berproliferasi dan menghancurkan sel terikat. Beberapa sel T akan menjadi sel memori untuk persiapan yang akan datang.

Sebelum sel B teraktivasi, *APC (Antigen-presenting cells)* profesional terlebih dahulu mencerna molekul antigen dan menyajikan peptida-nya bersama molekul MHC klas II. Sel *T helper* mengenali kompleks peptida ini bersama dengan molekul "*co-stimulatory*" dan kemudian melepaskan sitokin Th2 yang akan membantu mengaktifasi sel B untuk mengikat antigen.

Persiapan dari sel T sitotoksik juga melibatkan peran *APC* profesional. Setelah *APC* menelan plasmid vaksin, mensintesis antigen yang disandinya, kemudian menyajikan fragmen antigennya bersama molekul MHC klas I, bersama juga dengan molekul "*co-stimulatory*", sel *T killer* akan mengenali

signal ini dan harus terlebih dahulu diaktifkan oleh sitokin Th1 yang dilepaskan sel T *helper* (Weiner, 1999).

Pada pencegahan TB, telah diketahui bahwa antigen ESAT-6 dapat menimbulkan respons imun seluler yang protektif (Lowrie DB, 1997; Minion FC, 2003; Pym AS, 2003). Respons imun seluler diperlukan untuk mengontrol infeksi mikobakteria. Keuntungan penggunaan vaksin DNA adalah menghasilkan respons imun yang kuat dan lama menyerupai dengan efek infeksi dengan patogen yang hidup (Huygen, 2003).

Telah dicoba pelbagai vaksin DNA yang memproduksi antigen tertentu seperti yang tertera pada tabel 2.3. (disalin dari Huygen, 2003)

Tabel 2.3 Calon vaksin DNA (bagian antigen) yang telah dicoba untuk mencegah infeksi *Mycobacterium*.

TABLE 1. Tentative summary of DNA vaccine candidates tested so far for protective efficacy

Antigen	Vector	Challenge	Protective	Reference(s)
6-kDa ESAT-6	pCMV	<i>M. tuberculosis</i>	+	58
6-kDa ESAT-6	pFV430	<i>M. tuberculosis</i>	±	55
6-kDa ESAT-6	pJAC03	<i>M. tuberculosis</i>	+	5
17-kDa MPT64	pFV430	<i>M. tuberculosis</i>	-	25, 99
19-kDa Esp protein	rcCMV/mChL	<i>M. tuberculosis</i>	-	19
19-kDa Esp protein	VJ1.06-4PA	<i>M. tuberculosis</i>	-	74
22-kDa Lipex Esp protein	VJ1.06-4PA	<i>M. tuberculosis</i>	-	34
23-kDa MPT64	pCMV4	<i>M. bovis</i>	±	6, 7, 73
24-kDa alkyl hydrophobicity reductase C	rcCMV/mChL	<i>M. tuberculosis</i>	-	19
26-kDa MPT64 antigen	pFV430	<i>M. tuberculosis</i>	-	25
26-kDa MPT64	pFV430	<i>M. tuberculosis</i>	±	25
30-kDa mycolyl transferase AgFB	pFV430	<i>M. tuberculosis</i>	+	29
30-kDa mycolyl transferase AgFB (BCO)	pFV430	<i>M. tuberculosis</i>	+	54
30-kDa mycolyl transferase AgFB (<i>M. avium</i>)	pFV430	<i>M. avium</i>	-	72
32-kDa mycolyl transferase AgSA	VJ1.06-4PA	<i>M. tuberculosis</i>	+	1, 23
32-kDa mycolyl transferase AgSA (BCG)	VJ1.06-4PA	<i>M. tuberculosis</i>	+	41
32-kDa mycolyl transferase AgSA (BCG)	VR300	<i>M. bovis</i>	+	7
32-kDa mycolyl transferase AgSA (BCO)	pSA-EQFP	<i>M. avium</i>	+	72
33-kDa antigen (<i>M. avium</i>)	pFV430	<i>M. avium</i>	+	40
35-kDa antigen (<i>M. leprae</i>)	pFV430	<i>M. leprae</i>	+	41
36-kDa protein-rich antigen PSA	pCMV/pHMO	<i>M. tuberculosis</i>	±	65
36-kDa Esp protein PstS-1	pCDNAJ	<i>M. tuberculosis</i>	+	39
36-kDa Esp protein PstS-1	VJ1.06-4PA	<i>M. tuberculosis</i>	-	74
36-kDa Esp protein PstS-2	VJ1.06-4PA	<i>M. tuberculosis</i>	-	64
40-kDa Esp protein PstS-3	VJ1.06-4PA	<i>M. tuberculosis</i>	+	64
43 kDa 181P ¹⁸¹ protein	pFV430	<i>M. tuberculosis</i>	+	9
59 kDa MTB39 protein from PPE family	pJAC03	<i>M. tuberculosis</i>	+	13
65 kDa heat shock protein (<i>M. leprae</i>)	pHMO/pCMV	<i>M. tuberculosis</i>	++	65
65 kDa heat shock protein (<i>M. tuberculosis</i>)	VJ1.06-4PA	<i>M. tuberculosis</i>	-	69
65 kDa heat shock protein (<i>M. avium</i>)	p65K-DQFP	<i>M. avium</i>	±	72
78 kDa heat shock protein	pCMV	<i>M. tuberculosis</i>	+	57
84 kDa KatG	pFV430	<i>M. tuberculosis</i>	-	35

Semua percobaan prelinik vaksin DNA TB sejauh ini baru dilakukan pada mencit. Dari sejumlah vaksin DNA di atas yang menjanjikan proteksi yang signifikan terhadap TB pada mencit, tak satupun yang sudah dinyatakan bekerja

lebih ampuh daripada vaksin BCG *M. bovis*. Sampai saat ini belum dapat dijelaskan mengapa suatu vaksin dapat bekerja baik, sedangkan yang lain tidak. Salah satu kelemahan vaksin DNA adalah keterbatasan daya transfeksinya dan jumlah protein sesungguhnya yang diproduksi. Dikatakan dari suntikan DNA sebanyak dosis mikrogram hanya menghasilkan protein sebanyak skala nanogram. Keberhasilan vaksin DNA malaria dan HIV pada percobaan tahap awal fase I, tetap mendorong usaha mencari vaksin DNA TB, karena respons yang diinduksinya ke arah Th-1 baik oleh sel CD4+ dan CD8+ . Secara teoritis vaksin DNA lebih mudah diproduksi, lebih murah dan tidak memerlukan proses pemurnian yang rumit (Huygen, 2003).



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan berdasarkan pada konsep biologi molekuler mengenai epitop ESAT-6 dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang dikenali oleh tiga kelompok yang berhubungan dengan TB yaitu:

1. penderita tuberkulosis aktif,
2. orang sehat : yang tak tertular atau kecil penularannya dan tetap sehat,
3. perawat sehat: mereka yang merawat penderita TB, tertular tetapi tidak sakit.

Molekul ESAT-6 dikenal sebagai protein sekresi yang disandi oleh gene RD-1 dan merupakan faktor virulen. Genome RD-1 (*Region of Difference-1*) ini terdapat pada *M. tuberculosis* dan *M. bovis* yang patogen, tetapi tidak terdapat pada *M. bovis strain BCG* yang non-patogen (Mahairas, 1996).

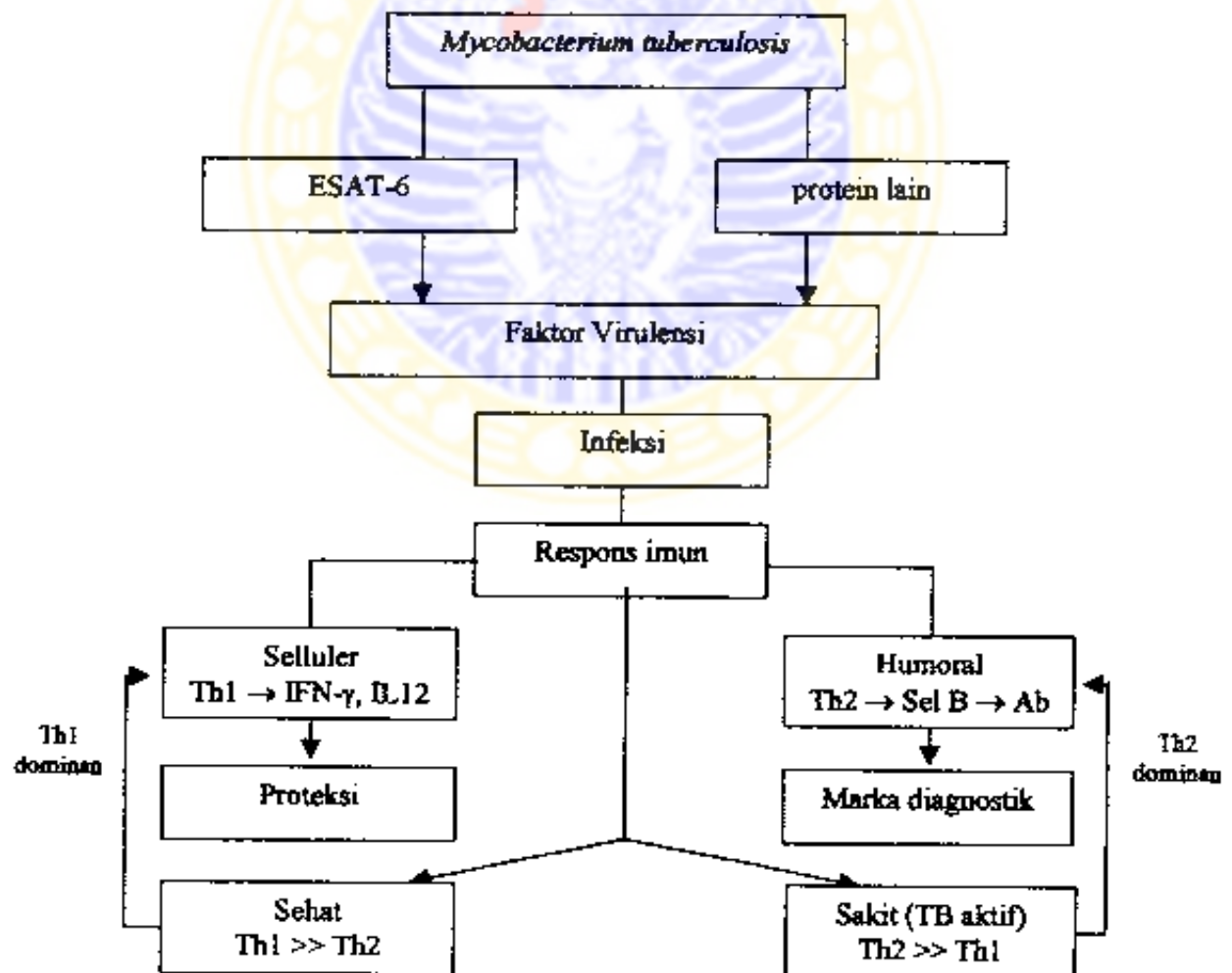
Infeksi dengan kuman tuberkulosis merupakan infeksi bakteri intraseluler yang memerlukan respons kekebalan berupa imunitas seluler (*cell mediated immunity*) dengan efekturnya yaitu makrofag dan limfosit T. Dominasi sel Th2 menunjukkan keadaan penyakit tuberkulosis yang aktif yaitu penyakit yang menyebar dengan nekrosis dan kerusakan luas. Dalam proses penyembuhan dominasi Th2 digantikan oleh Th1 yang sitokinnya bersifat protektif karena mempunyai kemampuan untuk membunuh kuman tuberkulosis (Palitngan, 2001).

Dari percobaan pada hewan diketahui bahwa ESAT-6 ini dapat memicu timbulnya respons imun yang dipelopori oleh sel limfosit B maupun limfosit T.

Mengingat bahwa struktur primer protein ESAT-6 ini telah diketahui, maka untuk mengidentifikasi situen yang spesifik pada protein tersebut (epitop) dapat digunakan metode *epitope scanning*. Di antara epitop dari ESAT-6 yang begitu banyak, tentunya ada satu atau dua epitop yang paling imunoreaktif. Mengingat bahwa ESAT-6 ini hanya disekresi oleh *Mycobacterium* yang patogen, maka diharapkan bahwa pada ESAT-6 ini akan didapatkan epitop yang bersifat

imunospesifik terhadap sel-B dan yang dapat berfungsi sebagai marka proses TB aktif dalam diagnosis TB dan epitop yang membangkitkan respons imun protektif. Apabila susunan asam amino yang spesifik pada ESAT-6 ini dapat diketahui, maka pengetahuan ini dapat digunakan untuk mendisain suatu tes diagnostik spesifik yang baru untuk deteksi dini penyakit tuberkulosis aktif. Bila dapat ditemukan epitop yang dapat menimbulkan respons imun protektif, maka pengetahuan ini dapat digunakan untuk mengembangkan vaksin sub-unit atau vaksin DNA dalam pencegahan TB.

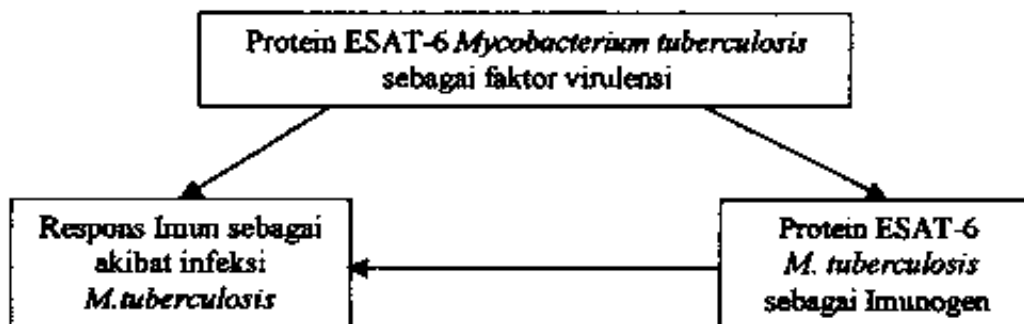
Proses awal infeksi *Mycobacterium tuberculosis* yang diparantari faktor virulensi ESAT-6 sampai timbulnya respons imun, serta kemungkinan respons imun yang terjadi apabila protein ESAT-6 digunakan sebagai imunogen, dapat digambarkan dalam suatu kerangka sebagai berikut.



Jadi hendak dicari apakah terdapat epitop tertentu yang bisa melindungi orang itu terhadap infeksi sehingga tidak menjadi sakit. Diperkirakan pada kelompok perawat sehat, selain memiliki respons imun seluler yang baik, juga ada antibodi yang bisa menangkap kuman *M. tuberculosis* yang baru masuk sehingga mempermudah penghancuran kuman lebih lanjut oleh *innate* maupun *adaptive immunity*.

Virulensi, atau **patogenitas** dapat didefinisikan sebagai kemampuan bakteri untuk menimbulkan infeksi, sedangkan **faktor virulensi** adalah produk bakteri atau strategi yang berhubungan dengan virulensi atau patogenitas. Secara garis besar faktor virulensi ini dapat diklasifikasikan menjadi dua kategori. Pertama, yang mempromosikan kolonisasi dan invasi bakteri ke dalam tubuh hospes, seperti halnya motilitas, perlekatan, fimbriae, kapsul, siderofor dan lain-lain. Kedua adalah faktor virulensi yang sifatnya merusak host, di antaranya adalah toxin bisa exotoxin atau endotoxin, enzim-enzim hidrolitik misalnya hyaluronidase dan protease, *acylated trehalose-2'-sulfates*, dan ESAT-6. Pada fase awal infeksi dijumpai adanya peningkatan sintesis ESAT-6 (*upregulation*).

ESAT-6 walaupun merupakan protein sekresi dengan BM yang rendah, tapi bersifat imunogenik dan dapat merangsang timbulnya respons imun yang diprakarsai oleh sel B. Bagian N-terminus dari ESAT-6 diketahui mempunyai satu daerah hidrofilik yang terpapar pada bagian luar dan pada percobaan binatang peptide ini dapat menimbulkan respons produksi antibodi (Harboe, 1998). Dari uraian di atas, dapat dibuat suatu kerangka (model) konseptual sebagai berikut.



Melandsi pemikiran tersebut maka penelitian ini dimaksudkan untuk menemukan suatu epitop di daerah N-terminus dari antigen ESAT-6 yang bersifat immunospesifik terhadap sel-B dan yang dapat berfungsi sebagai marka proses TB aktif yang berperan dalam diagnosis TB paru dan sekaligus menemukan suatu epitop protektif yang diperkirakan berfungsi menimbulkan antibodi protektif pada mereka yang tertular tetapi tidak sakit sehingga dapat digunakan untuk pengembangan vaksin.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Pada tahap identifikasi oligopeptida berepitop tunggal yang paling dominan pada penderita tuberkulosis paru, jenis penelitiannya adalah observasional dengan rancangan *cross sectional*.

Variabel yang dicari dalam penelitian observasional adalah urutan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dari antigen ESAT-6 *Mycobacterium tuberculosis* yang reaktif terhadap antibodi dalam sera penderita tuberkulosis paru, orang normal dan subyek perawat sehat.

Variabel yang harus dikendalikan adalah:

1. Cara pengambilan sera pada manusia
2. Penyimpanan sampel dan antigen penelitian dalam -20°C
3. Pemilihan subyek penelitian
4. Penggunaan peralatan di laboratorium
5. Penggunaan beberapa bahan (reagen) penelitian.
6. Kriteria penerimaan dan penolakan subyek penelitian.

Jumlah besarnya sampel pada penelitian ini pada subyek penderita TB paru aktif, subyek orang sehat dan subyek perawat sehat adalah sama yaitu masing-masing kelompok sebesar 10 orang.

Jumlah 10 orang penderita TB paru aktif ini dipilih dari 38 orang penderita TB paru aktif yang berobat ke Poliklinik UPF Ilmu Penyakit Paru RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Kelompok perawat sehat yang merawat penderita TB diambil dari 50 orang yang merawat penderita paru di RS Hasta Brata dan RS Paru Batu dan telah bekerja sedikitnya dua tahun. Sebanyak 10 orang relawan sehat terpilih dari 19 orang yang bersedia ikut dalam penelitian ini.

4.2. Subyek Penelitian

Kriteria inklusi penderita TB aktif

1. Sampel penelitian untuk subyek penderita tuberkulosis paru diambil dari penderita baru yang berkunjung ke poliklinik UPF Paru RSUD Dr. Soetomo Surabaya dengan diagnosis berdasarkan biakan positif, dan kelainan foto toraks *moderately advanced* dan sepanjang anamnesis yang cermat belum pernah mendapat obat anti-tuberkulosis.
2. Umur : 18 – 45 tahun.
3. Bersedia ikut dalam penelitian setelah mendapat penjelasan selengkapnyanya mengenai maksud, tujuan, prosedur penelitian serta penyulit yang mungkin terjadi dengan menandatangani *informed consent* (surat persetujuan), sesuai dengan izin yang didapat dari komisi etik RS Dr. Soetomo Surabaya.
4. Tidak masuk dalam penelitian ini, ialah penderita dengan :
 1. merokok,
 2. penyakit jantung atau pembuluh darah yang berat,
 3. kelainan jiwa,
 4. mendapat obat steroid atau obat immunosupresif lainnya,
 5. penyakit diabetes mellitus,
 6. penyakit atopi,
 7. penyakit keganasan atau penyakit imunokompromis lainnya.

Kriteria orang sehat bebas TB

1. Bersedia ikut dalam penelitian setelah mendapatkan penjelasan selengkapnyanya mengenai maksud, tujuan, prosedur penelitian.
2. Dari anamnesis tidak ada keluhan gangguan paru
3. Secara fisik tidak ada keluhan, tanda2 atau gejala penyakit TB
4. Foto toraks tak ada kelainan.
5. tes Mantoux negatif
6. tes laboratorium darah lengkap dalam batas normal
7. Uji TB dot negatif.

Kriteria perawat sehat :

1. telah merawat penderita paru sedikitnya 2 tahun,
2. foto thorax tak ada kelainan,
3. hasil tes Mantoux positif,
4. hasil TB dot negatif
5. tidak pernah memakai obat-obat profilaksis.

4.3 Definisi operasional variabel

1. Penyakit tuberkulosis paru *moderate-advanced* adalah: gambaran kelainan radiologis yang dapat mengenai satu atau kedua paru yang luasnya tidak melebihi satu paru atau bila lesi *dense* atau *confluent* luasnya tidak melebihi dari sepertiga volume satu paru atau bila terdapat kaverna, dengan diameter kurang dari 0,4 cm.
2. Subyek bebas TB terdiri dari orang sehat terutama anak di bawah 12 tahun yang tidak menderita tuberkulosis (dibuktikan dari foto paru yang normal, tes Mantoux PPD negatif dan serologis TB-dot normal).
3. Subyek yang dianggap kebal terhadap tuberkulosis diambil dari perawat yang merawat penderita TB (terpapar) tetapi tidak sakit (dibuktikan dari foto paru yang normal, tetapi tes Mantoux positif).
4. *Overlapping common sequence* asam amino (epitop) : suatu epitop yang didapatkan dengan ditentukan secara tumpang tindih satu dengan lainnya dan mempunyai urutan asam amino yang pendek kurang dari 10 asam amino.

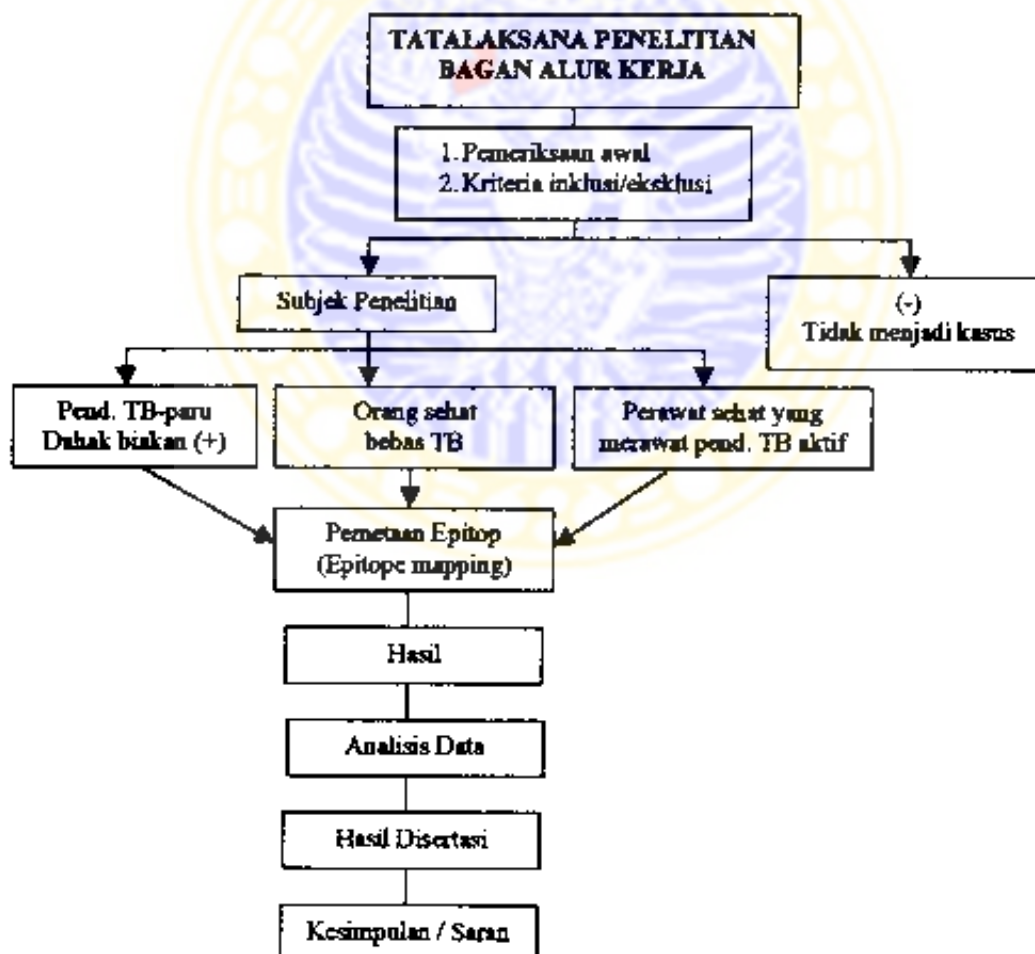
4.4 Tempat penelitian.

1. Poliklinik Paru / SMF RSUD Dr. Soetomo.
2. RS Hasta Brata, Batu
3. RS Paru Batu.
4. Poliklinik Waluyo Jati Surabaya
5. Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
6. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

4.5 Waktu Penelitian:

1. Waktu pengumpulan sampel dari penderita Poli Paru RSUD Dr. Soetomo dan uji bakteriologis dilaksanakan mulai bulan Oktober 2002 s/d Maret 2003.
2. Pengumpulan sampel dari orang sehat dan perawat sehat yang merawat penderita TB dan uji bakteriologis dilaksanakan mulai bulan Januari 2003 s/d Maret 2003.
3. Pelaksanaan uji epitop dari bulan Desember 2002 s/d Agustus 2003.
4. Penulisan disertasi dan analisis statistik April s/d Nopember 2003.

Secara garis besar urutan kerja dari keseluruhan rangkaian penelitian ini adalah sebagai berikut.



4.6 Cara Kerja.

4.6.1 Pemeriksaan klinis.

- a. Data penderita: Anamnesis, pemeriksaan fisis lengkap,
- b. Foto toraks paru (postero-anterior),
- c. Kadar gula puasa dan 2 jam pp,
- d. Pemeriksaan darah lengkap (termasuk laju endap darah, hemoglobin),
- e. BTA,
- f. Biakan dahak.

4.6.2 Pemeriksaan Mikrobiologi

Spesimen dahak penderita dilakukan pemeriksaan langsung dan biakan. Untuk keperluan tersebut terlebih dahulu dilakukan prosedur pencernaan (*digestion*) dan dekontaminasi dengan N-acetyl L-cystein (NALC) / NaOH. Bahan dicampur dalam tabung dengan jumlah sama larutan 4% NaOH dan 2,9% sodium sitrat. Campuran tadi di vortex sebentar selama 5-20 detik supaya merata kemudian didiamkan selama 5-20 menit untuk memberi waktu terjadinya proses penghancuran dan dekontaminasi dan sebentar-sebentar dilakukan pengocokan dengan tangan secara pelahan. Kemudian ditambahkan larutan dapar fosfat (pH 6,8) dan dilakukan pemusingan 3000 g dalam waktu 15 menit. Pada pelet yang diperoleh ditambahkan 1-2 ml larutan dapar fosfat untuk selanjutnya digunakan untuk pemeriksaan bakteri tahan asam (pencetakan Ziehl Neelsen dan biakan) fiksasi spesimen dilakukan dengan cara gelas obyek dilewatkan api 3-4 kali. Pewarnaan dilakukan dengan karbol fuchsin memakai cara Ziehl Neelsen dan dibaca sebanyak 300 lapangan pandang dengan pembesaran obyektif 100 kali menggunakan minyak emersi.

Pembiakan dilakukan pada media *Lowenstein-Jensen*. Dilakukan inokulasi dari spesimen yang telah diencerkan dengan aquades steril atau NaCl 0,9%. Pengeraman dilakukan pada suhu 37°C dalam inkubator. Timbulnya koloni mulai dapat diamati pada hari ke 10-12 dengan membalik media dan mikroskop difokuskan pada permukaan media agar. Biakan yang tidak tumbuh setelah 8 minggu dianggap sebagai negatif.

Identifikasi kuman tuberkulosis dilakukan dengan mengamati kecepatan pertumbuhan kuman, morfologi koloni, adanya pigmentasi dan tes biokimiawi yaitu uji akumulasi *niacin*, uji reduksi nitrat dan tes katalase.

4.6.3.1. Pengambilan darah.

Pengambilan darah pada subyek penderita TB maupun non-TB dilakukan sebagai berikut.

Darah diambil sebanyak 5 ml, dimasukkan tabung Venoject *plain* steril dan dibiarkan 1-2 jam agar terjadi pembekuan. Secara hati-hati bekuan darah dipisahkan dari dinding tabung dengan menggunakan spatula metal atau batang aplikator. Selanjutnya serum dituang dalam tabung steril dan disentrifus dengan kecepatan 2000 g selama 10 menit. Serum dipipet dengan hati-hati dan dibagi dalam beberapa aliquot, lalu disimpan pada suhu -20°C sampai sebelum dilakukan pengujian.

4.6.3.2. Pemeriksaan *Epitope scanning*.

1. Cari urutan antigen ESAT-6 *M.tuberculosis* yang akan dijadikan sasaran.
2. Pemotongan peptida N-terminal dari ESAT-6 dengan *computer program* B-net menjadi 9 mer dengan *overlapping* 8 dan *offset* 1 mer. (lihat lampiran:Tabel 1)
3. Sintesis polipeptida decamer yang *overlapping* 8 mer dari ESAT-6 *Mycobacterium tuberculosis* oleh *Chiron Mimotopes Australia* berupa suatu *kit epitope scanning*.
4. Reaksikan polipeptida tersebut dengan serum penderita tuberkulosis paru dan serum orang sehat dan tentukan absorbennya dengan uji ELISA tak langsung.
5. Analisis epitop yang reaktif pada masing-masing kelompok.

4.6.4. Pembersihan Ujung Pin (*disruption*)

4.6.4.1. **Tujuan** : untuk membersihkan ujung-ujung *pin* dari kontaminasi dengan sisa antibodi yang masih melekat sesudah dipakai untuk melakukan pengujian, sehingga untuk pengujian berikutnya *pin* plastik sudah tidak mengandung sisa antibodi lagi.

4.6.4.2. Bahan dan Alat Penelitian

1. *Epitope scanning kit*: masing-masing oligopeptida tersebut dikaitkan pada ujung dari *polyethylene pins* (panjang 40 mm, Φ 4 mm) yang dipasang pada suatu pemegang *polypropylene block* dan dirancang untuk dapat memegang 96 *pins* dalam bentuk dan jarak antara yang sesuai untuk sumuran lempengan mikrotiter.
2. Natrium hidrogen ortho-fosfat.
3. Natrium dodesil sulfat (SDS) (*Sigma*)
4. 2-Merkaptoetanol (*Merck*)
5. *Disruption buffer*: 0,1 M natrium dihidrogen orto-fosfat pH 7,2, 1 % SDS, 0,01% merkaptoetanol
6. Metanol (BDH)
7. *Sonication bath*
8. *Shaker*

4.6.4.3. Cara Kerja

1. Sebelum dilakukan pengujian dengan serum, oligopeptida yang terikat pada ujung pins dicuci dengan bufer fosfat salin 0,1 M pH 7,2 selama 30 menit.
2. Ujung pins kemudian dibersihkan (*disruption*) dengan cara sebagai berikut.
 - a. Pins direndam dalam *disruption buffer* yang sebelumnya dipanaskan 60°C. Selama dalam larutan ini dilakukan sonikasi selama 10 menit pada 1.000 W, untuk volume rendaman 5 liter.
 - b. Kemudian *pins* direndam dalam air distilasi pada suhu 60°C selama 30 menit lalu dicuci dalam metanol yang telah dipanaskan 60°C dan dikeringkan di udara.

- c. Penyimpanan *pins* dalam kontainer yang tertutup yang mengandung silika gel pada suhu 4°C.

Untuk mengetahui efisiensi dari pembersihan (*disruption*) dari *pins*, dilakukan inkubasi dari *pins* yang telah dibersihkan satu, dua dan tiga kali dengan larutan konjugat. Apabila masih ada antibodi yang masih melekat pada *pins*, maka tentu terjadi perubahan warna setelah diinkubasi dengan konjugat dan diberi substrat. Bila tidak tampak terjadinya perubahan warna, maka *pins* dianggap telah cukup bersih untuk dilakukan uji dengan sampel yang lain.

4.6.5 Titrasi papan catur

Tujuan: untuk mencari pengenceran konjugat dan serum penderita yang optimal untuk dilakukan uji penentuan epitop.

4.6.5.1. Pengujian pengenceran konjugat dan serum yang optimal

Uji dilakukan tanpa memakai pin sintetik yaitu dengan menggunakan *microplate* Elisa. Pada konjugat dicoba pengenceran serial 1/100, 1/150, 1/200, 1/250, 1/500, 1/1000 secara duplo. Pada serum penderita yang positif dilakukan pengenceran serial 1/500, 1/800, 1/1000, 1/1200, 1/1500, 1/2000 secara duplo. Pengenceran yang dipilih adalah pengenceran terakhir yang menghasilkan absorbensi maksimal sebelum terjadi penurunan absorbensi pada pengenceran berikutnya.

Waktu inkubasi dipilih yang waktunya dengan serum sampel memberikan hasil absorbensi yang optimal.

4.6.5.2. Pengujian reaktivitas konjugat dengan peptida pada *pins* tanpa serum penderita.

Tujuan : untuk mengetahui apakah ada ikatan nonspesifik dengan konjugat yang dipakai. Pin diinkubasikan langsung dengan konjugat pada pengenceran yang telah diketahui.

4.6.6. Penentuan sikuen asam amino (epitop) dengan antibodi dalam serum.

Tujuan : untuk menentukan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dari ESAT-6 yang memberikan absorbensi melebihi nilai ambang batas

absorben rujukan (*cut-off value*) dengan antibodi dalam serum dari penderita tuberkulosis paru dan orang sehat atau non-TB.

4.6.6.1. Bahan dan alat Penelitian

1. Lempeng mikrotiter 96 sumuran (Maxisorp, Nunc)
2. *Epitope scanning kit* yang tersusun pada pemegang *polyethylene block*.
3. Larutan dapar pengencer (*diluting buffer*) ; BSA 1 % (fraksi V) ; ovalbumin 1 % (Sigma cat.No.5253), tween 20 dalam salin 0,85% dibufer dengan 0,01 M bufer fosfat pada pH 7,2.
4. Larutan *conjugate diluent* : Sodium caseinate (USB) (Sigma) dalam 0,01 M PBS pH 7,2 dan Tween 20
5. Larutan bufer substrat: *Citric acid monohydrate* (Ajax Chemical) dan dinatriumhidrofosfat.
6. *Goat anti-human IgG* berlabel *horse-radish peroxidase* (HRP).
7. 2,2'-azino-bis[3-ethylbenz-thiozoline-6-sulfonate] (ABTS) (Sigma,A-1888)
8. Hidrogen peroksidase 30%.
9. *Micro-ELISA reader*.



Gambar 4.1. 27 Peptida yang telah dilekatkan pada Pin plastik

4.6.6.2 Cara Kerja

1. Rangkaian peptida yang telah dipesan di *Chiron Technologies* Australia dalam bentuk *pins* disimpan pada suhu -20°C , kemudian *pin* dikeluarkan dari pakingnya dan dibiarkan sekitar 2 jam dalam suhu ruangan. Selanjutnya *pin* siap untuk dilakukan pengujian.
2. Larutan *pre-coat buffer* dimasukkan dalam kotak kecil yang cukup untuk tempat *pin* sebanyak 30 ml, *pin* dimasukkan dan digoyang di atas *shaker* selama 30 menit (larutan ini jangan dibuang, tetapi disimpan).
3. *Pin* dicuci dengan 0,01 M PBS sebanyak 3x, dengan cara *pin* dimasukkan dalam kotak kecil yang berisi 30 ml 0,01 M PBS kemudian digoyang di atas *shaker* selama 5 menit (larutan pencuci tersebut dibuang dan diganti dengan larutan yang baru kemudian digoyangkan di atas *shaker* lagi selama 5 menit). Larutan pencuci tersebut dibuang dan diganti lagi dengan yang baru dan digoyangkan di atas *shaker* selama 10 menit. Pencucian seperti tersebut di atas diulangi 2x lagi, setiap kali dengan larutan 0,01 M PBS yang baru.
4. Dalam kotak yang kecil dimasukkan 32 ml larutan *pre-coat buffer* lalu ditambahkan serum yang akan diuji (pengenceran serum sesuai dengan hasil titrasi papan catur), goyangkan di atas *shaker* selama 2 jam dan diinkubasi semalam dalam lemari es, keesokan harinya digoyang lagi di atas *shaker* selama satu jam.
5. Cuci *pins* 3x 10 menit dengan larutan 0,01 M PBS seperti cara di atas.
6. Konjugat *goat anti-human IgG* dimasukkan dalam 30 ml pelarut konjugat, pengenceran konjugat sesuai dengan hasil titrasi papan catur. Inkubasi dilakukan di atas *shaker* selama 30 menit.
7. Cuci *pin* 3x dengan larutan 0,01 M PBS seperti pada cara di atas.
8. 100 μl larutan substrat yang telah ditambahkan H_2O_2 30% (konsentrasi akhir 0,03 %) dimasukkan dalam sumuran lempengan mikro ELISA dengan dasar datar, kemudian *pin* dimasukkan ke dalam sumuran dari lempengan mikro ELISA, inkubasi di atas *shaker* selama 5 menit sampai terjadi perubahan warna hijau.

9. Bila sudah ada perubahan warna, *pin* diambil dan tes dibaca dengan *micro ELISA reader* pada λ 405 nm.
10. *Pin* yang telah digunakan untuk pengujian tidak boleh langsung digunakan, apabila akan digunakan lagi untuk pengujian berikutnya maka harus dilakukan pembersihan terlebih dahulu.

Pins tersebut di atas dapat dipakai ulang untuk pengujian berikutnya. Untuk membersihkan antibodi yang terikat sebelum oligopeptida digunakan untuk tes ulang, pada ujung *pins* tersebut dilakukan pembersihan (*disruption*) seperti prosedur di atas. *Pins* tersebut dapat disimpan dalam keadaan kering.

4.7 Pengendalian Mutu (*Quality Control*)

Keberhasilan dari indirect ELISA dapat diukur dengan derajat pengikatan antibodi kontrol dengan peptida kontrol positif dengan urutan PLAQQGGG yang berwarna merah (dibuat oleh pabrik) dan telah dilakikan pada *pins* kontrol positif [serum acuan juga telah disediakan oleh pabrik pembuat kit, dan tingkat ikatan yang rendah pada kontrol negatif dari antibodi dengan urutan GLAQQGGG yang ditandai dengan *pin* berwarna hijau.



Gambar 4.2. *Pin* plastik untuk kontrol positif berwarna merah , kontrol negatif warna hijau

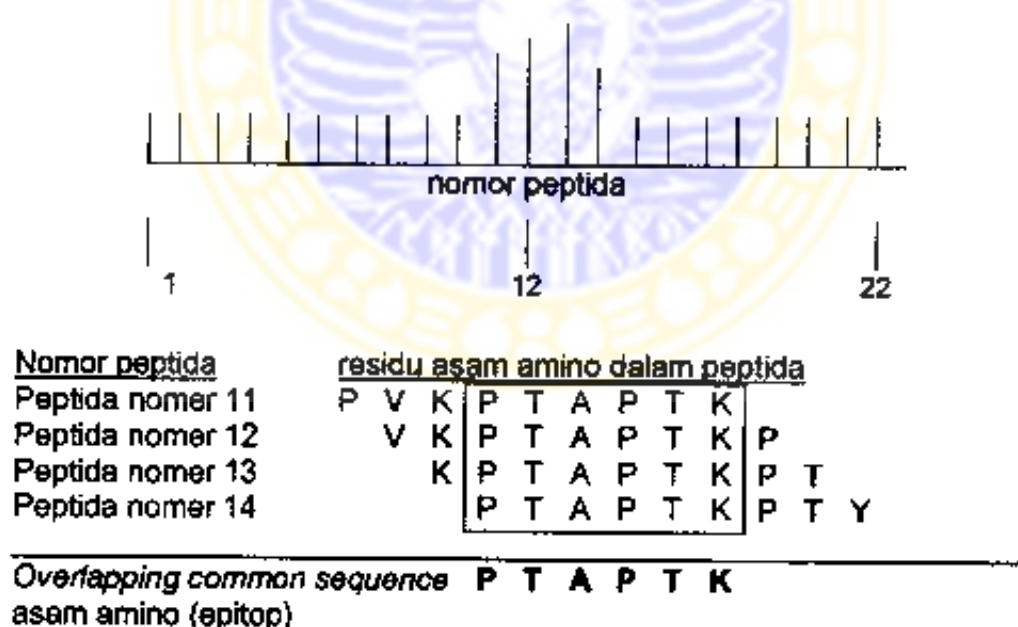
4.8 Cara Evaluasi Hasil Uji ELISA

Interpretasi hasil uji ELISA untuk menentukan peptida mana yang memberikan signal bermakna di atas nilai latar belakangnya dianjurkan menggunakan plot *algorithm* (Stren, 1991) dan pernah digunakan oleh peneliti sebelumnya (Lachumann, 1993; Panchanatan, 1998; Anita, 2000). Cara ini dapat menentukan peptida yang memberikan absorbensi yang signifikan berdasarkan setengah dari rerata absorbensi ditambah dengan tiga kali simpang baku. Nilai tersebut sebagai ambang atas nilai rujukan (*cut-off value*). Nilai absorbensi di atas *cut-off value* dinyatakan signifikan (reaktif).

4.9 Cara Evaluasi Hasil Penelitian

Peptida yang dinyatakan reaktif dan signifikan di atas *cut-off value* dengan antibodi dalam sera subyek penelitian selanjutnya dievaluasi dengan cara sebagai berikut.

1. Penentuan *overlapping common sequence* asam amino (epitop).



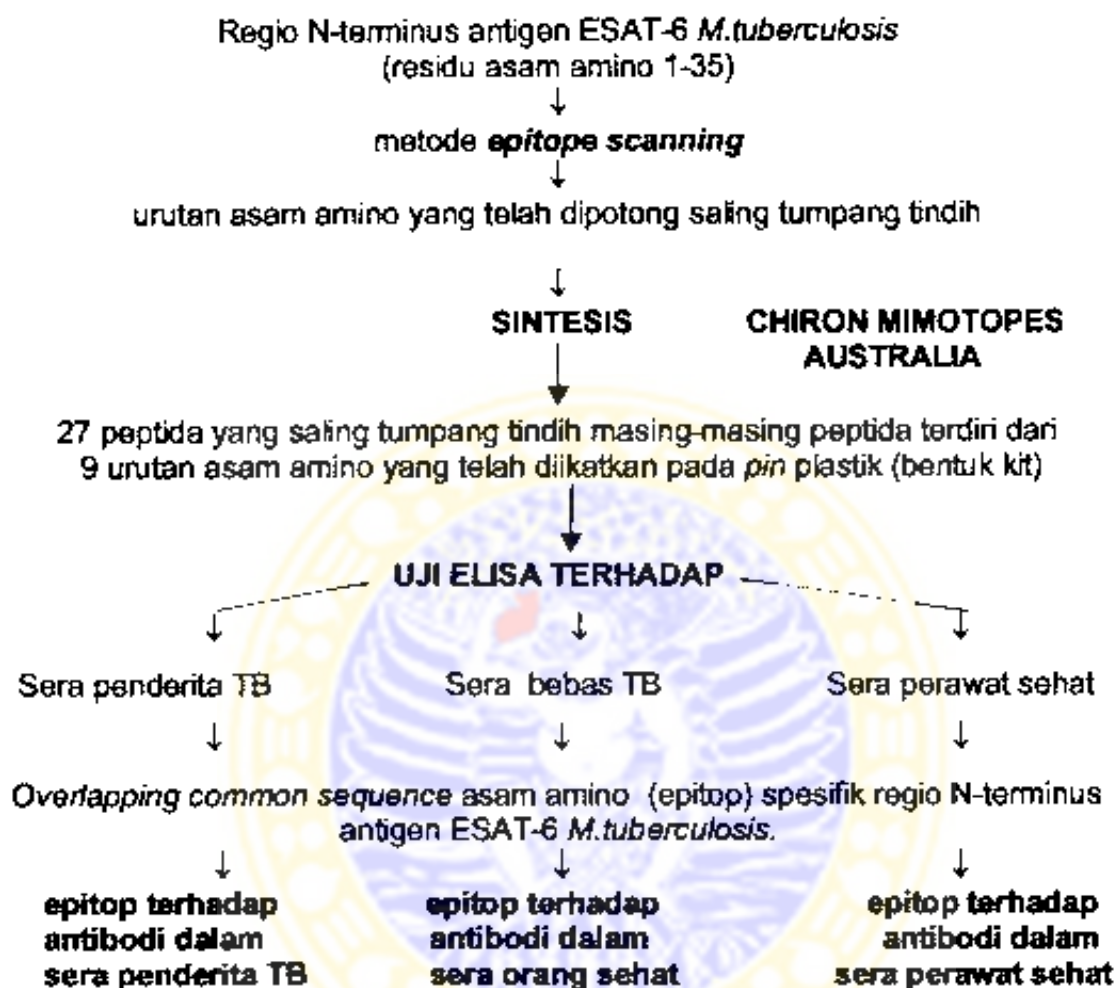
Gambar 4.3

Gambaran reaktivitas peptida dengan antibodi, peptida nomer 11,12,13 dan 14 adalah peptida yang paling reaktif. *Overlapping common sequence* asam amino (epitop) adalah dengan urutan residu asam amino PTAPTK (dikutip dari Anita, 2000)

Penentuan ini didasarkan pada pendapat dari Worthington dan Morgan (1994) dan Carter (1996), yang menyatakan bahwa untuk menentukan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) yaitu peptida yang signifikan di atas *cut-off value* dikelompokkan menurut urutan nomor peptida yang berdekatan, tetapi tidak melebihi empat peptida. Pernyataan ini mengacu pada pendapat Tam (1994), bahwa suatu epitop yang dapat dikenali oleh sel B harus mempunyai sikuen asam amino minimal 6 mer dengan rentangan peptida paling banyak *offset* 4.

2. Pengelompokkan *overlapping common sequence* asam amino (epitop)
Pengelompokkan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) yang reaktif dengan antibodi non-protektif, yang terdapat pada sera subyek penderita TB paru aktif, orang sehat bebas TB dan perawat sehat kebal tertular.
3. Hasil dari pengelompokkan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) tersebut di atas dievaluasi berdasarkan prevalensi antibodinya, untuk selanjutnya dilakukan uji perhitungan secara statistik dengan menggunakan uji Z atau uji proporsi dengan $\alpha = 0,05$ dan Z tabel = 1,96 (Sudjana, 1992; Anita, 2000).

4.10 Alur Penelitian



BAB 5

HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian ini difokuskan pada dua pokok temuan utama, sebagai berikut.

- 5.1 Hasil pemotongan 35 urutan asam amino dari regio N-terminus (1-27) antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* yang saling tumpang tindih.
- 5.2 Hasil identifikasi *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dari antigen ESAT-6 kuman *M. tuberculosis* dengan sera subyek penderita TB paru aktif, orang sehat bebas TB, dan perawat sehat yang terinfeksi *M. tuberculosis* namun tidak sakit, dengan memakai metoda ELISA.

Berpijak pada landasan ini, maka pokok analisis hasil penelitian dalam bab ini mencakup hal sebagai berikut.

- 5.2.1 Hasil penelitian dengan sera subyek TB paru aktif,
- 5.2.2 Hasil penelitian dengan sera subyek orang sehat bebas TB, dan
- 5.2.3 Hasil penelitian dengan sera subyek perawat sehat terpapar TB
- 5.2.4 Analisis perbandingan epitop pada sera subyek TB paru aktif dan orang sehat bebas TB.
- 5.2.5 Analisis perbandingan epitop pada sera subyek perawat sehat terpapar TB dan subyek TB paru aktif.

5.1. Hasil pemotongan 35 urutan asam amino dari regio N-terminus antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* yang saling tumpang tindih.

Pemotongan sikuen asam amino dari antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* var *human* pada regio N-terminus urutan residu 1 - 35 memberikan hasil seperti tampak di bawah ini.

Peptida 1	MTEQQWNFA	(1 - 9)
Peptida 2	TEQQWNFAG	(2 - 10)
Peptida 3	EQQWNFAGI	(3 - 11)
Peptida 4	QQWNFAGIE	(4 - 12)
Peptida 5	QWNFAGIEA	(5 - 13)
Peptida 6	WNFAGIEAA	(6 - 14)
Peptida 7	NFAGIEAAA	(7 - 15)
Peptida 8	FAGIEAAAS	(8 - 16)
Peptida 9	AGIEAAASA	(9 - 17)
Peptida 10	GIEAAASAI	(10 - 18)
Peptida 11	IEAAASAIQ	(11- 19)
Peptida 12	EAAASAIQG	(12 -20)
Peptida 13	AAASAIQGN	(13-21)
Peptida 14	AASAIQGNV	(14-22)
Peptida 15	ASAIQGNVT	(15-23)
Peptida 16	SAIQGNVTS	(16-24)
Peptida 17	AIQGNVTSI	(17-25)
Peptida 18	IQGNVTSIH	(18-26)
Peptida 19	QGNVTSIHS	(19-27)
Peptida 20	GNVTSIHSL	(20-28)
Peptida 21	NVTSIHSL	(21-29)
Peptida 22	VTSIHSLLD	(22-30)
Peptida 23	TSIHSLLD	(23-31)
Peptida 24	SIHSLLD	(24-32)
Peptida 25	IHSLLD	(25-33)
Peptida 26	HSLLD	(26-34)
Peptida 27	SLLD	(27-35)

5.2 Hasil identifikasi *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dari antigen ESAT-6 dengan sera penderita TB paru aktif, orang sehat bebas TB, dan perawat sehat terpapar kuman TB.

5.2.1 Hasil analisis dengan sera subyek penderita TB paru aktif.

5.2.1.1 Nilai absorben di atas nilai *cut-off*

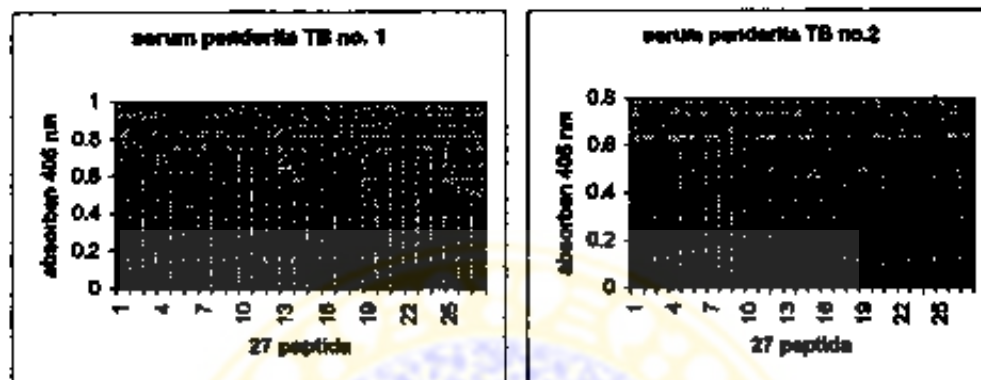
Hasil reaktivitas ke 27 peptida yang telah diikatkan pada permukaan pin plastik dan diuji dengan sepuluh sera dari subyek penderita TB paru aktif yang memberikan absorben di atas nilai rujukannya tampak pada tabel 1 di bawah ini.

Tabel 5.1 Reaktivitas ke 27 peptida yang memberikan absorben di atas *cut-off value* dengan antibodi dalam sera subyek TB paru aktif.

No. sampel	Nilai rujukan (<i>cut-off</i>)	No. peptida yang bereaksi signifikan dengan antibodi dalam sera subyek penderita TB paru aktif.
1	0,752	3,11, 12, 15, 16, 21, 22, 24.
2	0,552	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 16, 17,18, 20, 24,25.
3	0,470	4, 9, 10, 11, 16
4	0,335	3,4,5,7,8,9,10,11,12,13,14,19,20,21,22,23,25,26,27
5	0,411	5, 7, 8, 9,14, 17, 18.
6	0,368	4,5, 11,12,13,15,22,25.
7	0,529	2,6,7,17,20,21,22,23,24.
8	0,587	1, 9, 16.
9	0,703	1,2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16,17,19,20,21,22,24,25
10	0,502	3,17,20,21,22,23,24,25,26.
Rerata ± SD	0,521 ± 0,135	

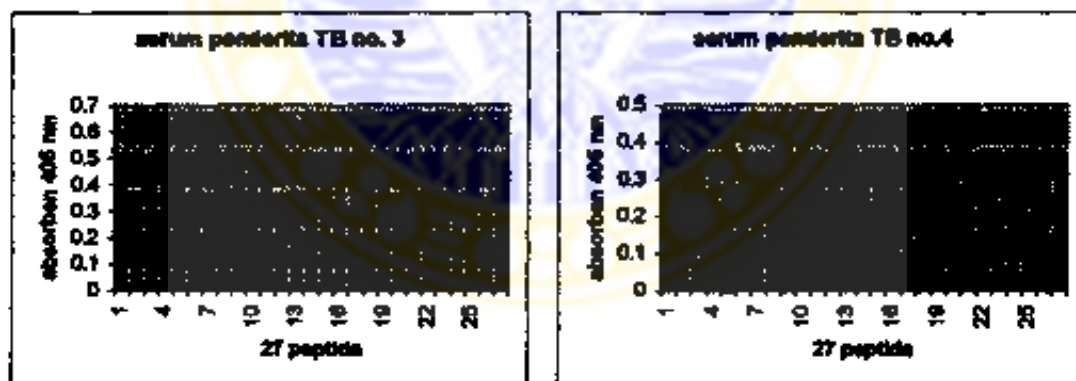
Penjabaran selengkapnya urutan asam amino dari masing-masing peptida yang memberikan absorben di atas *cut-off value* dari tabel 5.1 dapat dilihat pada lampiran 7.

Hasil absorben dari 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek penderita TB bila ditampilkan dalam bentuk grafik akan terlihat dalam gambar 5.1 sampai 5.5.



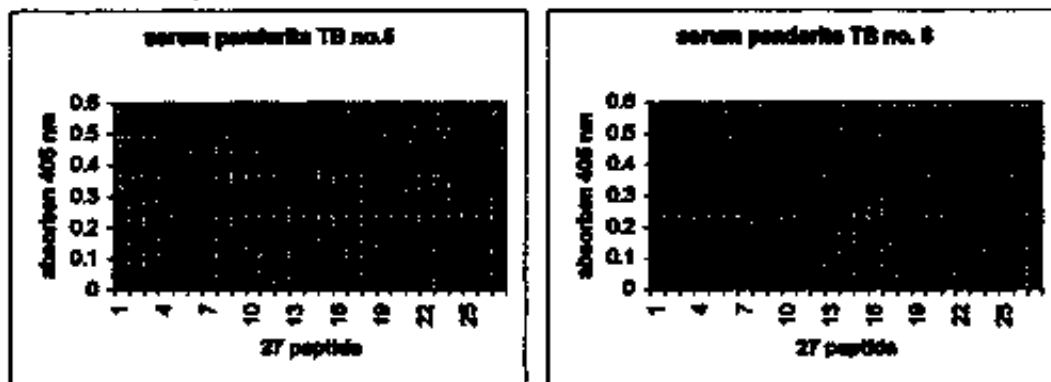
Gambar 5.1.

Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek penderita TB. *Cut-off value* sampel no. 1 = 0,752, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomor peptida 3,11,12,15,16,21,22,24. *Cut-off value* sampel no.2 = 0,552, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada peptida nomor 1,2,3,4,5,6,7,8,9,16,17,18, 20, 24,25.



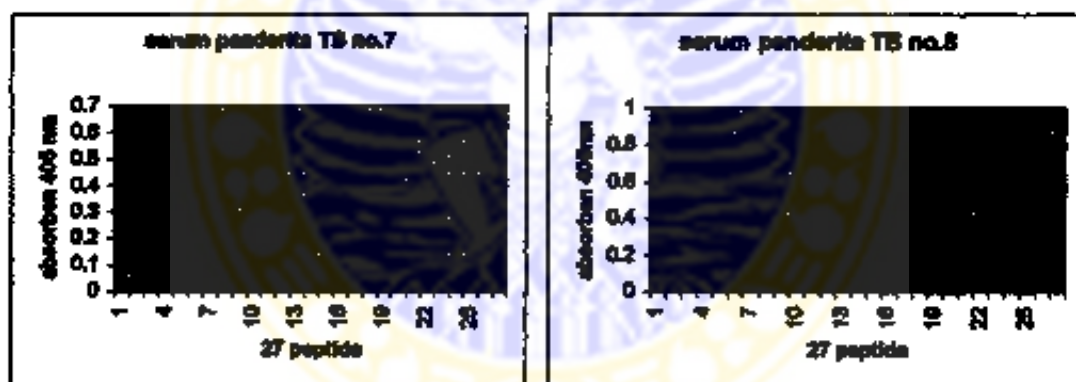
Gambar 5.2.

Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek penderita TB. *Cutoff value* sampel no. 3 = 0,470, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomor peptida 4,9,10,11,16. *Cut-off value* sampel no.4 = 0,335, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada peptida nomor 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14,19,20,21,22, 23, 25, 26, 27.



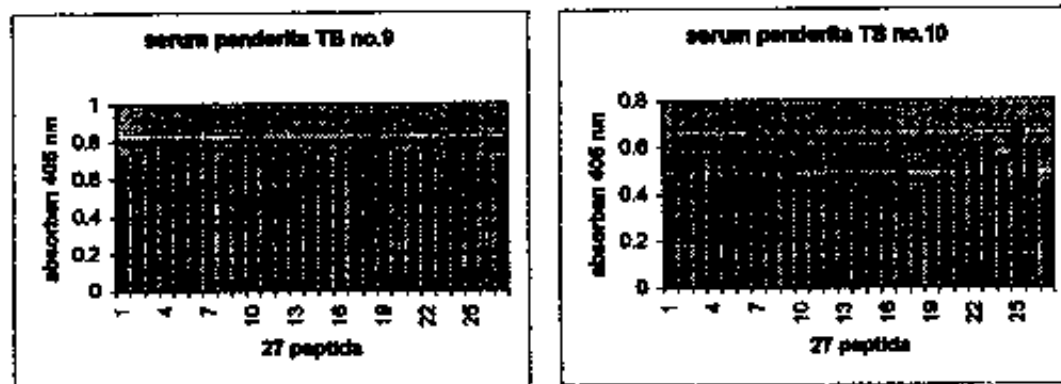
Gambar 5.3.

Reaktivitas 27 peptide yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek penderita TB. *Cut-off* value sampel no. 5 = 0,411, tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomor peptide 5,7, 8, 9,14,17, 18. *Cut-off* value sampel no.8 = 0,368 , tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada peptide nomor 4, 5, 11, 12, 13, 15, 22, 25.



Gambar 5.4.

Reaktivitas 27 peptide yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek penderita TB. *Cut-off* value sampel no. 7 = 0,529, tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomor peptide 2, 6,7,17, 20, 21, 22, 23, 24. *Cut-off* value sampel no.8 = 0,587, tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomor peptide 1,9, 16.



Gambar 5.5.

Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek penderita TB. *Cut-off value* sampel no. 9 = 0,703, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomer peptida 1,2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16,17, 19, 20, 21, 22, 24, 25. *Cut-off value* sampel no.10 = 0,521, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomer peptida 3, 17, 20, 21,22,23,24,25,26.

Dalam gambar 5.1 sampai 5.5 terlihat reaktivitas ke 27 peptida dari regio N terminus (1-35) antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* yang diuji dengan antibodi dalam 10 sera subyek penderita TB. Ternyata pola reaktivitasnya bervariasi antara subyek penderita TB yang satu dengan subyek penderita TB yang lain.

5.2.2 Hasil analisis dengan sera subyek orang sehat bebas TB.

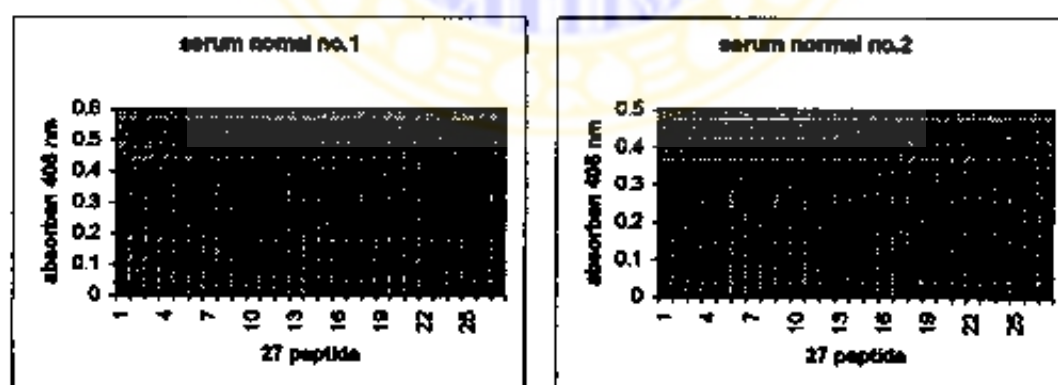
5.2.2.1 Nilai absorben di atas nilai *cutoff*

Hasil absorben dari 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek orang sehat bebas TB yang memberikan absorben di atas nilai rujukannya tampak pada tabel 2 di bawah ini.

Tabel 5.2 Reaktivitas ke 27 peptida yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* dengan antibodi dalam sera orang sehat bebas TB.

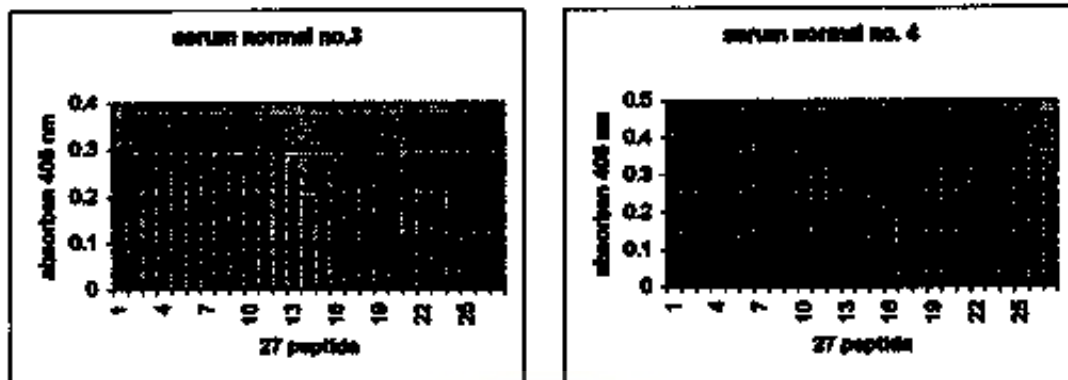
No. sampel	Nilai rujukan (<i>cut-off</i>)	No. peptida yang bereaksi signifikan dengan antibodi dalam sera orang sehat non-TB.
1	0,396	1,3,7,13,20,21
2	0,331	8,15,16, 17,19, 20,21,22.
3	0,292	5,6,7,8,10,11,12,20,26
4	0,409	3,4,5,6,21
5	0,086	3,5,16,18,24,25
6	0,209	12,13,17,18,19,20,21
7	0,092	5,17
8	0,210	1,2,4,5,9,17, 25.
9	0,612	1,2,4,5,10,11,17,18,24,25,26
10	0,303	5, 6, 7, 21
Rerata \pm SD	0,294 \pm 0,157	

Hasil absorbensi masing-masing dari 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek orang sehat bebas TB bila ditampilkan dalam bentuk grafik akan terlihat dalam gambar 5.6 sampai 5.10.



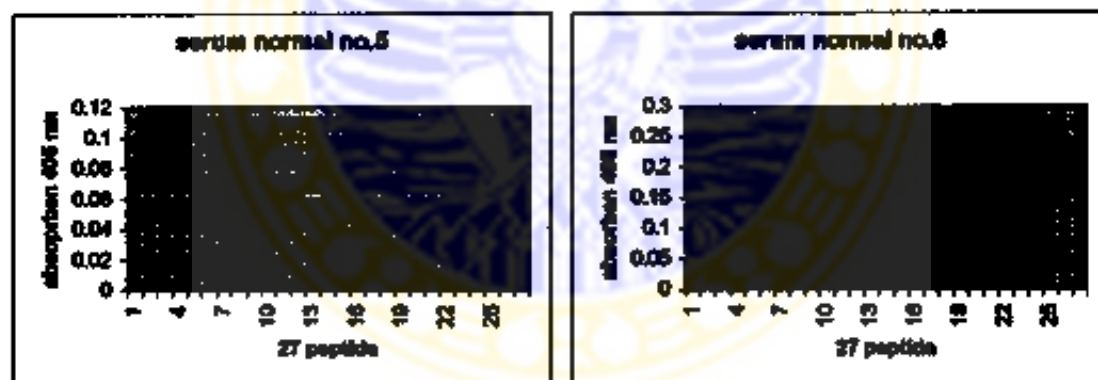
Gambar 5.6.

Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek orang normal. *Cutoff value* sampel no. 1 = 0,396, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomor peptida 1,3,7,13,20, 21. *Cutoff value* sampel no. 2 = 0331, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomor peptida 8,15,16,17,19,20,21,22.



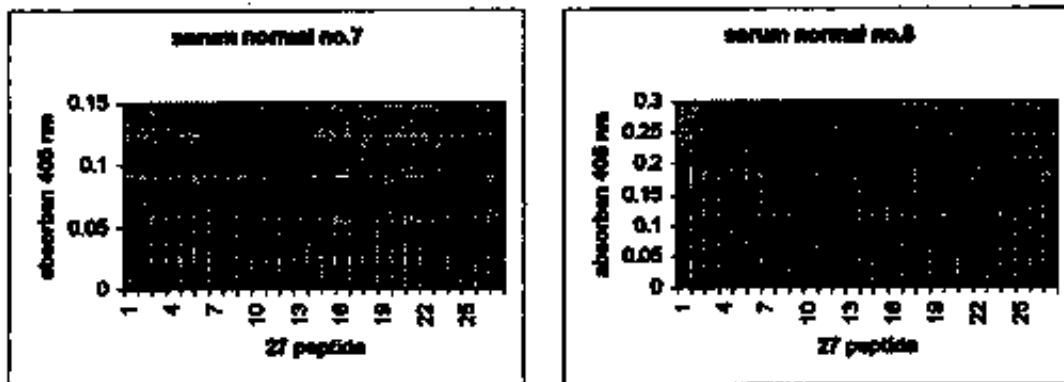
Gambar 5.7.

Reaktivitas 27 peptide yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek orang normal. *Cutoff* value sampel no.3 = 0,282, tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomor peptide 5,6,7, 8,10,11,12,20,26. *Cutoff* value sampel no.4 = 0,409 tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomor peptide 3,4,5,6,21.



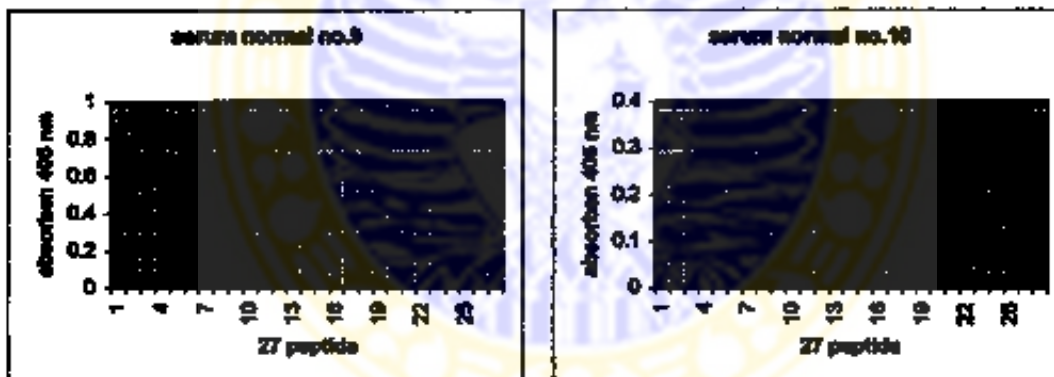
Gambar 5.8.

Reaktivitas 27 peptide yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek orang normal. *Cutoff* value sampel no.5 = 0,066, tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomor peptide 3,5,16,18, 24, 25. *Cutoff* value sampel no.6 = 0,209 tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomor peptide 12, 13, 17,18,19, 20, 21.



Gambar 5.9.

Reaktivitas 27 peptide yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek orang normal. *Cutoff value* sampel no.7 = 0,092, tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomer peptide 5,17. *Cutoff value* sampel no.8 = 0,210 tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomer peptide 1,2,4,5,17,25.



Gambar 5.10.

Reaktivitas 27 peptide yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek orang normal. *Cutoff value* sampel no.9 = 0,612, tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomer peptide 1,2,4,5,10,11,17,18,24,25,26. *Cutoff value* sampel no.10 = 0,303, tampak peptide yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomer peptide 5, 6, 7, 21.

Dalam gambar 5.6 sampai 5.10 terlihat reaktivitas ke 27 peptide dari regio N-terminus (1-35) antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* yang diuji dengan antibodi dalam 10 sera subyek orang normal. Ternyata pola reaktivitasnya bervariasi antara subyek orang normal satu dengan yang lainnya.

5.2.3 Hasil analisis dengan sera subyek perawat sehat terpapar TB.

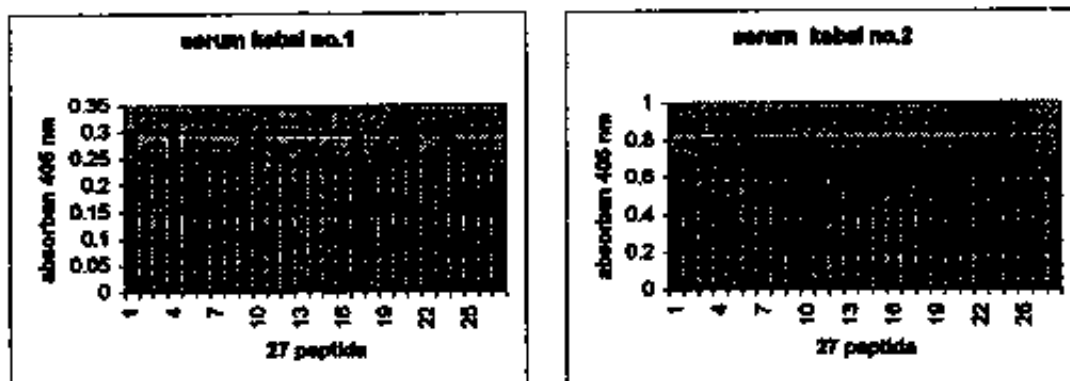
5.2.3.1 Nilai absorben di atas nilai *cut-off*

Hasil absorben dari 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek perawat sehat terpapar TB yang memberikan absorben di atas nilai rujukannya tampak pada tabel 5.3 di bawah ini.

Tabel 5.3 Reaktivitas ke 27 peptida yang memberikan absorben di atas *cut-off value* dengan antibodi dalam sera perawat sehat.

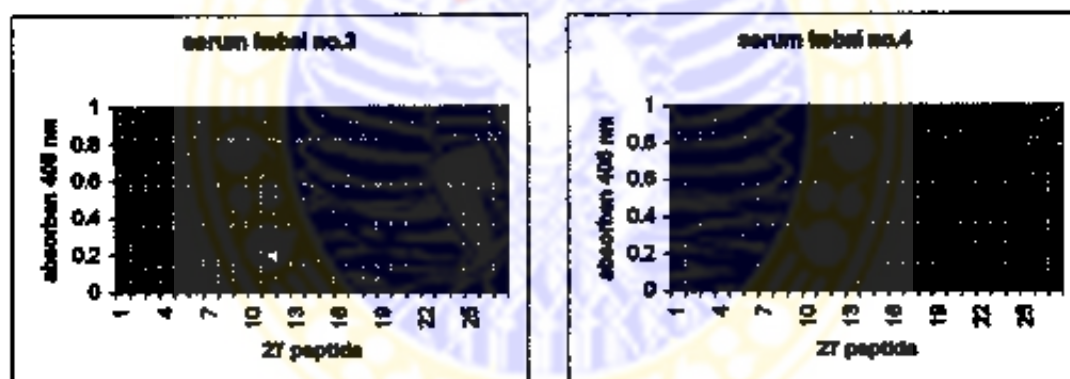
No. sampel	Nilai rujukan (<i>cut-off</i>)	No. peptida yang bereaksi signifikan dengan antibodi dalam sera perawat sehat .
1	0,258	1,2,3,4,5,9,10,17,20,21,22,23,25
2	0,568	1,2,3,4,5,7,8,10,11,12,21,23,24,25,26
3	0,679	2,3,4,5,6,7,8,9,10,21,25,26
4	0,703	1,2,3,5,7,9,10,11,17,18,19,20,21,22,25, 26
5	0,636	2,3,4, 5, 9,10,11,12, 26
6	0,417	1,2,4,5,6,7,9,11,16,17,18
7	0,834	4,5,6,7,8,9,12,13,15,16
8	0,305	1, 2, 3, 5, 7, 9, 10,11,12,13,16,17,21,22,23,24
9	0,703	6,8,16,18,22,24,26
10	0,555	9,10,19,24,25.
Rerata ± SD	0,565 ± 0,186	

Hasil absorben dari 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek perawat sehat bila ditampilkan dalam bentuk grafik akan terlihat dalam gambar 5.11 sampai 5.16.



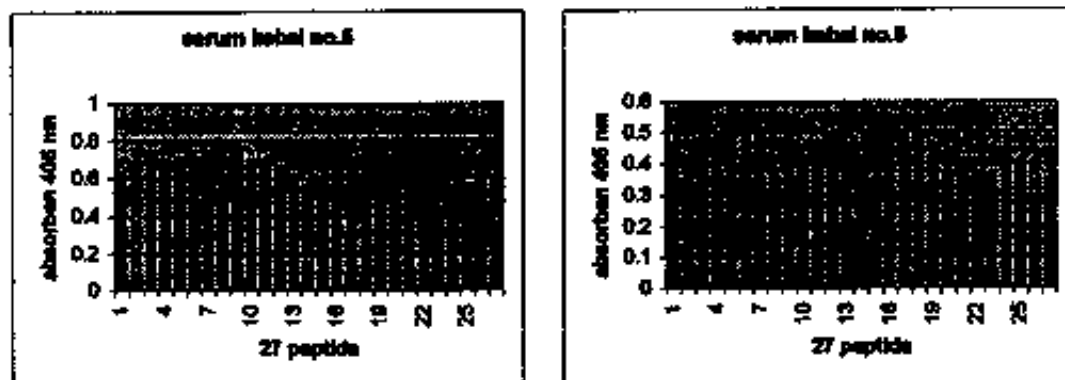
Gambar 5.11

Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek perawat TB sehat. *Cutoff* value sampel no.1 = 0,258, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomer peptida 1,2,3,4,5,9,10,17,20,21,22,23,25. *Cutoff* value sampel no.2 = 0,568 tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomer peptida 1,2,3,4,5,7,8,10,11,12,21,23,24,25,26.



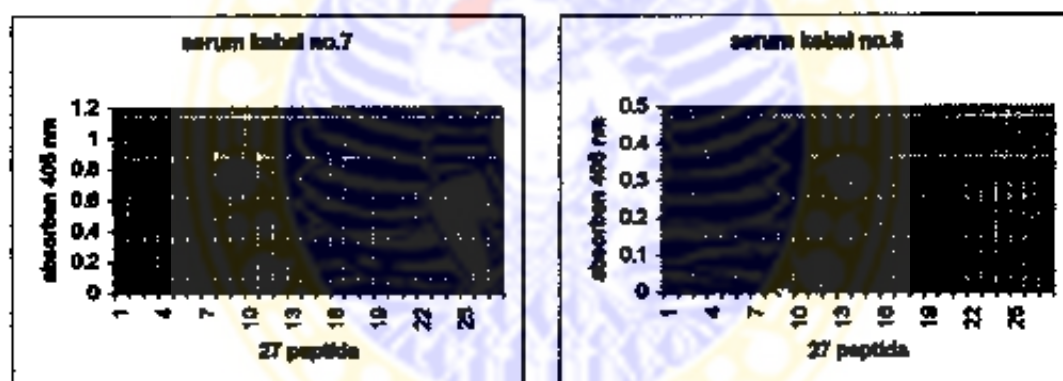
Gambar 5.12.

Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek perawat TB sehat. *Cutoff* value sampel no.3 = 0,679, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomer peptida 2,3,4,5,6,7,9,10,21,25,26. *Cutoff* value sampel no.4 = 0,703 tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomer peptida 1,2,3,5,7,9,10, 11,17,18,19,20, 21,22,25,26



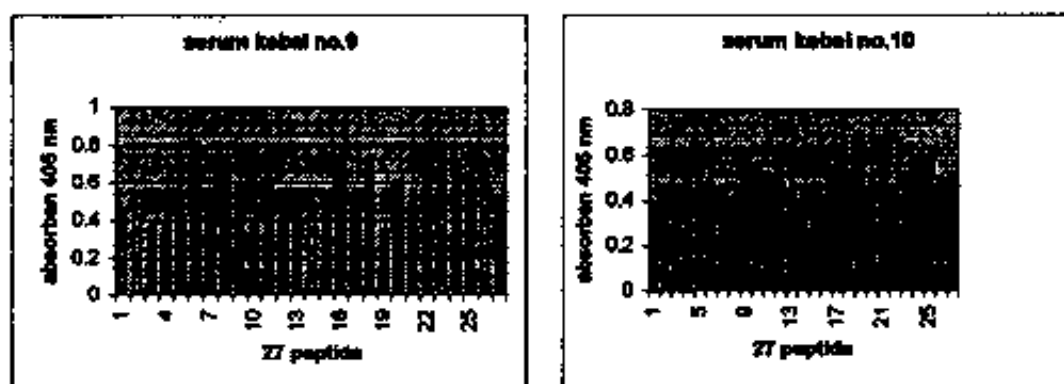
Gambar 5.13

Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek perawat TB sehat. *Cutoff* value sampel no.5 = 0,636, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomor peptida 2,3,4,5,9,10,11, 12, 26. *Cutoff* value sampel no.6 = 0,417 tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomor peptida 1,2,4,5,6, 7,9,11,16,17,18.



Gambar 5.14

Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek perawat TB sehat. *Cutoff* value sampel no.7 = 0,834, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomor peptida 4,5,6,7,8,9,12,13,15, 16. *Cutoff* value sampel no.8 = 0,305 tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off* value berada pada nomor peptida 1,2,3,5,7,9,10,11,12,13,16,17,21,22,23,24.



Gambar 5.15.

Reaktivitas 27 peptida yang diuji dengan antibodi dalam sera subyek perawat TB sehat. *Cutoff value* sampel no.9 = 0,703, tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomor peptida 6,8,16,18,22,24,26. *Cutoff value* sampel no.10 = 0,555 tampak peptida yang signifikan di atas *cut-off value* berada pada nomor peptida 9,10,19, 24, 25.

Dalam gambar 5.11 sampai 5.15 terlihat reaktivitas ke 27 peptida dari regio N terminus (1-35) antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* yang diuji dengan sera subyek perawat sehat. Ternyata pola reaktivitasnya bervariasi antara subyek perawat sehat yang satu dengan yang lainnya.

5.2.4 Analisis perbandingan epitop pada sera subyek TB paru aktif dan orang sehat bebas TB.

Antibodi dalam sera subyek TB paru aktif dan orang sehat bebas TB, keduanya memberikan reaktivitas yang bervariasi terhadap peptida yang diuji, namun tingginya absorbensi yang signifikan dan *cut-off value* dari kedua kelompok tersebut berbeda. Tabel terdahulu (Tabel 5.1 dan 5.2) menunjukkan tampak bahwa rerata absorbensi dari kelompok TB ($0,521 \pm 0,135$) lebih tinggi dibandingkan kelompok sehat bebas TB ($0,294 \pm 0,157$).

Pengelompokan *overlapping common sequence* asam amino untuk menentukan epitop didasarkan pada pendapat Tam (1994), yang menyatakan bahwa suatu epitop untuk dapat dikenali oleh sel B dalam produksi antibodi harus mempunyai sikuen asam amino minimal 6 mer.

Atas dasar inilah maka pengelompokan setiap *overlapping common sequence* untuk suatu epitop dengan *common sequence* asam amino minimal 6 mer ditentukan oleh kelompok peptida dengan rentangan paling banyak *offset* 4. Metode ini juga akan digunakan untuk menentukan epitop dalam penelitian dengan menggunakan sampel yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value*.

Tabel 5.4 Reaktivitas ke 27 peptida yang memberikan absorbensi reaktif dengan antibodi dalam sera subyek orang normal dan subyek TB paru aktif.

Sera subyek bebas TB		Sera subyek TB paru aktif	
No. urut	Reaktif	No	Reaktif
1	1,3,7,13,20,21	1	3,11,12,15,16,21,22,24
2	8,15,16,17,19,20,21,22	2	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,17,18,20,24,25
3	5,6,7,8,10,11,20,26	3	4,9,10,11,16
4	3,4,5,6,21	4	3,4,5,7,8,9,10,11,12,13,14,19,20,21,22,23,25,26,27
5	3,5,16,18,24,25	5	5,7,8,9,14,17,18
6	12,13,17,18,19,20,21	6	4,5,11,12,13,15,22,25
7	5,17	7	2,6,7,17,20,21,22,23,24
8	1,2,4,5,9,17,25	8	1,9,16
9	1,2,4,5,10,11,17,18,24,25,26	9	1,2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16,17,19,20,21,22,24,25
10	5,6,7,21	10	3,17,20,21,22,23,24,25,26

Bila peptida yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* dikelompokkan, maka akan didapatkan hasil seperti terlihat pada tabel 5.5 di bawah ini.

Tabel 5.5 Pengelompokan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dari peptida yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* dengan antibodi dalam sera subyek bebas TB, subyek TB paru aktif.

Sera subyek bebas TB	Jumlah (n)	Sera subyek TB paru	Jumlah (n)
MTEQQWNFA (1)=1 TEQQWNFA (1,2)=2 EQQWNFAGI (3)=2	5	MTEQQWNFA (1)=1 EQQWNFA (1,2,3)=2 TEQQWNFAG (2)=1 EQQWNFAGI (3)=2	6
QQWNFAGI (3,4)=1 QWNFAGIE (4,5)=2 QWNFAGIEA (5)=2 WNFAGIEA (5,6)=3	8	QWNFAGI (3,4,5)=1 QQWNFAGIE (4)=1 QWNFAGIE (4,5)=2 QWNFAGIEA (5)=1 WNFAGIE (4,5,6)=1	6

Sera subyek bebas TB	Jumlah (n)	Sera subyek TB paru	Jumlah (n)
NFAGIEAAA (7)=2 FAGIEAAA (7,8)=1 FAGIEAAAS (8)=1 AGIEAAASA (9)=1	5	NFAGIEAA (6,7)=2 AGIEAAA (7,8,9)=3 AGIEAAASA (9)=1	6
IEAAASAI (10,11)=2 EAAASAIQG (12)=2	4	IEAAASA (9,10,11)=2 EAAASAI (10,11,12)=1 EAAASAIQ (11,12)=1	4
AAASAIQGN (13)=2	2	AAASAIQ (11,12,13)=1 AASAIQG(12,13,14)=1 AASAIQGN (13,14)=1 AASAIQGNV (14)=1	4
SAIQGNVT (15,16)=1 SAIQGNVTS (16)=1 AIQGNVTSI (17)=2	4	ASAIQGNVT (15)=1 SAIQGNVT (15,16)=1 AIQGNVT (15,16,17)=1 SAIQGNVTS (16)=2	5
IQGNVTSI (17,18)=2 IQGNVTSIH (18)=1	3	IQGNVTS (16,17,18)=1 AIQGNVTSI (17)=2 IQGNVTSI (17,18)=1	4
GNVTSIHS (19,20)=2 GNVTSIHSL (20)=1 NVTSIHSL (20,21)=1 NVTSIHSL (21) = 3	7	GNVTSIHSL (20)=1 NVTSIHS (19,20,21)=2 NVTSIHSL (20,21)=2	5
VTSIHSL (21,22)=1	1	VTSIHSL (21,22)=1 VTSIHSLD (22) = 2	3
IHSLLD (24,25)=2	2	TSIHSLD (22,23)=1 SIHSLD (22,23,24)=2 SIHSLDEG (24)=1 IHSLLD (24,25)=2 IHSLLD (25)=1	7
HSLLD (26)=2	2	HSLLD (25,26)=1 SLLD (25,26,27)=1	2

Keterangan

Contoh, TEQQWNFAG (2)=1 mempunyai arti, peptida nomer 2 yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* ditemukan pada 1 antibodi dalam subyek TB paru.

n : banyaknya (prevalensi) subyek penelitian yang mempunyai *overlapping common sequence* asam amino (epitop) yang bersangkutan.

Berdasarkan hasil persentase atau frekuensi dari masing-masing kelompok sampel dari penelitian ini maka dilakukan perhitungan secara uji statistik dengan menggunakan uji Z atau uji proporsional dengan taraf kemaknaan $\alpha = 0,05$ dan Z tabel = 1,96, yang hasilnya seperti tampak pada tabel 5.6 di bawah ini.

Tabel 5.6 Frekuensi, persentase dan nilai Z dari *overlapping common sequence* asam amino (epitop) yang ditemukan dengan antibodi dalam sera subyek bebas TB dan sera subyek TB paru yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value*.

Overlapping common sequence	Sera subyek penelitian						Kemaknaan
	Bebas TB			TB Paru aktif			
	Frek BT	%	n	Frek T	%	n	
EQQWNFA	5	50	10	6	60	10	Z hit = 0,45 < Z tab = 1,96
WNFAGI	8	80	10	6	60	10	Z hit = 0,97 < Z tab = 1,96
AGIEAA	5	50	10	6	60	10	Z hit = 1,02 < Z tab = 1,96
EAAASA	4	40	10	4	40	10	Z hit = 0 < Z tab = 1,96
AAASAIQ	2	20	10	4	40	10	Z hit = 0,97 < Z tab = 1,96
AIQGNVT	4	40	10	5	50	10	Z hit = 0,45 < Z tab = 1,96
IQGNVTS	3	30	10	4	40	10	Z hit = 0,47 < Z tab = 1,96
NVTSIH	7	70	10	5	50	10	Z hit = 0,91 < Z tab = 1,96
VTSIHSL	1	10	10	3	30	10	Z hit = 1,12 < Z tab = 1,96
IHSLLD	2	20	10	7	70	10	Z hit = 2,25 > Z tab = 1,96 *
SLLDEGK	2	20	10	2	20	10	Z hit = 0 < Z tab = 1,96

Keterangan

Frek BT: jumlah subyek bebas TB dengan antibodi dalam sera yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* terhadap *overlapping common sequence* asam amino yang bersangkutan.

Frek T : jumlah subyek TB paru aktif dengan antibodi dalam sera yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* terhadap *overlapping common sequence* asam amino yang bersangkutan.

N : banyak subyek dalam satu kelompok

* : ada perbedaan yang bermakna

Pada tabel 5.6 tersebut di atas, dengan menggunakan perhitungan uji Z perbedaan frekuensi antara antibodi dalam sera subyek bebas TB dan subyek TB paru yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* terhadap *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dari 27 peptida yang diuji dalam penelitian ini didapatkan epitop infeksi berat, dengan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) IHSLLD (25-30). Frekuensi antibodi dalam sera subyek TB yang reaktif terhadap epitop tersebut pada perhitungan secara uji statistik berbeda bermakna dengan frekuensi antibodi dalam sera subyek bebas

TB ($Z_{hit}=2,25 > Z_{tab} = 1,96$). Absorben rerata dari antibodi terhadap epitop IHSLLD pada dua subyek penelitian bebas TB adalah $0,391 \pm 0,395$, dan pada 7 subyek penderita TB paru aktif adalah $0,577 \pm 0,187$. Perbedaan tersebut secara statistik tidak bermakna ($p > 0,05$). Frekuensi epitop ini pada kelompok perawat sehat adalah 60%, tidak berbeda bermakna dengan pada kelompok TB paru aktif (70%), karena itu temuan epitop ini tidak dapat dinamakan sebagai epitop marka TB aktif, tetapi disebut sebagai epitop infeksi berat, karena tidak bisa membedakan antara penderita TB dengan perawat sehat.

5.2.5 Analisis perbandingan epitop pada sera subyek perawat sehat terpapar TB dan penderita TB paru aktif

Antibodi dalam sera subyek perawat sehat terpapar TB dan penderita TB paru aktif, keduanya memberikan reaktivitas yang bervariasi terhadap peptida yang diuji, namun tingginya absorben yang signifikan dan *cut off value* dari kedua kelompok tersebut berbeda. Tampak bahwa rerata absorben dari kelompok perawat sehat ($0,565 \pm 0,186$) sedikit lebih tinggi dibandingkan kelompok penderita TB paru aktif ($0,521 \pm 0,135$). ($p > 0,05$)

Tabel 5.7. Reaktivitas ke 27 peptida yang memberikan absorben reaktif dengan antibodi dalam sera subyek penderita TB paru aktif dan subyek perawat sehat terpapar TB .

Sera subyek TB paru aktif		Sera subyek perawat sehat terpapar TB	
No.	Reaktif		Reaktif
1	3,11,12,15,16,21,22,24	1	1,2,3,4,5,9,10,17,20,21,22,23,25
2	1,2,3,4,5,6,7,8,9,16,17,18,20,24,25	2	1,2,3,4,5,7,8,10,11,12,21,23,24,25,26
3	4,9,10,11,16	3	2,3,4,5,6,7,8,9,10,21,25,26
4	3,4,5,7,8,9,10,11,12,13,14,19,20,21,22,23,25,26,27	4	1,2,3,5,7,9,10,11,17,18,19,20,21,22,25,26
5	5,7,8,9,14,17,18	5	2,3,4,5,9,10,11,12,26
6	4,5,11,12,13,15,22,25	6	1,2,4,5,8,7,9,11,16,17,18
7	2,6,7,17,20,21,22,23,24	7	4,5,6,7,8,9,12,13,15,16
8	1,9,16	8	1,2,3,5,7,9,10,11,12,13,16,17,21,22,23,24
9	1,2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16,17,19,20,21,22,24,25	9	6,8,16,18,22,24,26
10	3,17,20,21,22,23,24,25,26	10	9,10,19,24,25

Bila peptida yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* dikelompokkan, maka akan didapatkan hasil seperti terlihat pada tabel 5.8 di bawah ini.

Tabel 5.8 Pengelompokan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dari peptida yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* dengan antibodi dalam sera subyek bebas TB, subyek perawat sehat.

Sera subyek TB paru	Jumlah (n)	Sera perawat sehat	Jumlah (n)
MTEQQWNFA (1)=1 EQQWNFA (1,2,3)=2 TEQQWNFAG (2)=1 EQQWNFAGI (3)=2	6	TEQQWNFA (1,2)=1 EQQWNFA (1,2,3)=4 EQQWNFAG (2,3)=2	7
QWNFAGI (3,4,5)=1 QQWNFAGIE (4)=1 QWNFAGIE (4,5)=2 QWNFAGIEA (5)=1 WNFAGIE (4,5,6)=1	6	QWNFAGIE (4,5)=4 QWNFAGIE (4,5,6)=2 QWNFAGIEA (5)=2 WNFAGIEAA (6)=1	9
NFAGIEAA (6,7)=2 AGIEAAA (7,8,9)=3 AGIEAAASA (9)=1	6	NFAGIEAA (6,7)=1 NFAGIEAAA (7) = 1 FAGIEAAA (7,8)=1 AGIEAAA (7,8,9)=2 FAGIEAAAS (8)=1 AGIEAAASA (9)=1	7
IEAAASA (9,10,11)=2 EAAASAI (10,11,12)=1 EAAASAIQ (11,12)=1	4	GIEAAASA (9,10) = 5 IEAAASA (9,10,11)=1 EAAASAI (10,11,12)=1 IEAAASAIQ (11)=1 EAAASAIQ (11,12)=1	9
AAASAIQ (11,12,13)=1 AASAIQG(12,13,14)=1 AASAIQGN (13,14)=1 AASAIQGNV (14)=1	4	AAASAIQ (11,12,13)=1 AASAIQG(12,13)=1 AASAIQGN (13)=1	3
ASAIQGNVT (15)=1 SAIQGNVT (15,16)=1 AIQGNVT (15,16,17)=1 SAIQGNVTS (16)=2	5	SAIQGNVT (15,16)=1 AIQGNVT (15,16,17)=1 SAIQGNVTS (18)=1 AIQGNVTS (16,17)=1	4
IQGNVTS (16,17,18)=1 AIQGNVTSI (17)=2 IQGNVTSI (17,18)=1	4	IQGNVTS (16,17,18)=1 AIQGNVTSI (17)=1 IQGNVTSIH (18)=1	3
GNVTSIHSL (20)=1 NVTSIHS (19,20,21)=2 NVTSIHSL (20,21)=2	5	GNVTSIH (18,19,20)=1 QGNVTSIHS (19)=1 NVTSIHSL (20,21)=1 NVTSIHSL (21)=2	5

Sera subyek TB paru	Jumlah (n)	Sera perawat sehat	Jumlah (n)
VTSIHSL (21,22)=1 VTSIHSLD (22) = 2	3	VTSIHSL (21,22)=1 VTSIHSLD (22) = 1	2
TSIHSLD (22,23)=1 SIHSLD (22,23,24)=2 SIHSLDEG (24)=1 IHSLDEG (24,25)=2 IHSLDEGK (25)=1	7	TSIHSLD (22,23)=1 SIHSLDE (23,24)=2 SIHSLDEG (24)=1 IHSLDEG (24,25)=1 IHSLDEGK (25)=1	6
HSLDEGKQ(25,26)=1 SLLDEGK (25,26,27)=1	2	HSLDEGKQ(25,26)=2 SLLDEGK (25,26,27)=1 HSLDEGKQ (26)=2	5

Keterangan

Contoh, QWNFAGIEA (5)=2 mempunyai arti, peptida nomor 5 yang memberikan absorben di atas *cut-off value* ditemukan pada 2 antibodi dalam subyek perawat sehat.

n : banyaknya (prevalensi) subyek penelitian yang mempunyai *overlapping common sequence* asam amino (epitop) yang bersangkutan.

Berdasarkan hasil persentase atau frekuensi dari masing-masing kelompok sampel dari penelitian ini maka dilakukan perhitungan secara uji statistik dengan menggunakan uji Z atau uji proporsi dengan taraf kemaknaan $\alpha = 0,05$ dan Z tabel = 1,96, yang hasilnya tampak seperti pada tabel 5.9 di bawah ini.

Tabel 5.9 Frekuensi, persentase dan nilai Z dari *overlapping common sequence* asam amino (epitop) yang ditemukan dengan antibodi dalam sera subyek penderita TB dan sera subyek perawat sehat yang memberikan absorben di atas *cut-off value*.

Overlapping common sequence	Sera subyek penelitian						
	TB Paru aktif			Perawat sehat			Kemaknaan
	Frek BT	%	n	Frek T	%	n	
EQQWFA	8	80	10	7	70	10	Z hit = 0,47 < Z tab = 1,96
WNFAGI	8	80	10	9	90	10	Z hit = 1,55 < Z tab = 1,96
AGIEAA	8	80	10	7	70	10	Z hit = 0,47 < Z tab = 1,96
EAAASA	4	40	10	9	90	10	Z hit = 2,34 > Z tab = 1,96*
AAASAIQ	4	40	10	3	30	10	Z hit = -0,47 < Z tab = 1,96
AIQGNVT	5	50	10	4	40	10	Z hit = -0,45 < Z tab = 1,96
IQGNVTS	4	40	10	3	30	10	Z hit = -0,47 < Z tab = 1,96
NVTSIH	5	50	10	5	50	10	Z hit = 0 < Z tab = 1,96
VTSIHSL	3	30	10	2	20	10	Z hit = -0,51 < Z tab = 1,96
IHSLD	7	70	10	6	60	10	Z hit = -0,47 < Z tab = 1,96
SLLDEGK	2	20	10	5	50	10	Z hit = 1,41 < Z tab = 1,96

Pada tabel 5.9 tersebut di atas, dengan menggunakan perhitungan uji Z perbedaan frekuensi antara antibodi dalam sera subyek penderita TB paru aktif dan subyek perawat sehat, yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* terhadap *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dari 27 peptida yang diuji dalam penelitian ini didapatkan satu epitop yang khas pada perawat sehat yang merawat penderita TB, yang dapat disebut sebagai epitop protektif TB, dengan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) EAAASA (12-17). Frekuensi antibodi dalam sera subyek perawat sehat yang reaktif terhadap epitop tersebut pada uji perhitungan secara statistik berbeda bermakna dengan frekuensi antibodi dalam sera subyek TB paru aktif ($Z_{hit}=2,34 > Z_{tab} = 1,96$). Absorbensi rerata dari antibodi terhadap epitop EAAASA pada 4 subyek penelitian TB paru aktif adalah $0,500 \pm 0,187$ dan pada 9 subyek penelitian perawat sehat adalah $0,578 \pm 0,169$. Perbedaan tersebut secara statistik tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$). Rerata absorbensi dari antibodi terhadap epitop EAAASA pada 4 subyek penelitian orang sehat adalah $0,385 \pm 0,165$. Bila rerata ini dibandingkan terhadap perawat sehat maka didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,01$).

Hasil analisis, bila diringkas akan tampak seperti pada tabel 5.10 di bawah

Tabel 5.10 Temuan jenis *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dengan antibodi dalam sera subyek penelitian yang memberikan absorbensi reaktif ($> \text{cutoff value}$).

Jenis Epitop	<i>Overlapping common sequence</i> asam amino (epitop)
- epitop infeksi berat	IHSLLD (25-30)
- epitop protektif	EAAASA (12-17)

I = Isoleucine : Nonpolar (*hydrophobic*)

H= Histidine : Positively charged (*basic*)

S= Serine : Uncharge polar

L = Leucine : Nonpolar (*hydrophobic*)

D = Aspartic acid : Negatively charged (*acidic*)

E = Glutamic acid : *Negatively charged (acidic)*
 A = Alanine : *Nonpolar (hydrophobic)*
 S = Serine : *Uncharged polar*

Hasil temuan kedua jenis epitop bila digambarkan pada urutan asam amino regio N-terminus antigen ESAT-6 sebagai berikut.

I MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLDEGKQS
 1 epitop infeksi berat 35

II MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLDEGKQS
 1 epitop protektif 35

Gambar 5.16

i. Urutan asam amino pada residu 1-35 dari antigen ESAT-6 *M. tuberculosis*. Residu yang digarisbawahi adalah *overlapping common sequence* asam amino (epitop) infeksi berat pada manusia (25-30).

ii. Urutan asam amino pada residu 1-35 dari antigen ESAT-6 *M. tuberculosis*. Residu yang digarisbawahi adalah *overlapping common sequence* asam amino (epitop) protektif pada manusia (12-17).

BAB 6

PEMBAHASAN

Sebaik apapun hasil suatu penelitian, namun bila reliabilitas metode yang dipakai tidak memadai atau penggunaannya tidak relevan, maka dari segi ilmiah hasil penelitian yang tampaknya baik tersebut tidak mempunyai nilai yang berarti. Berpijak pada landasan tersebut, maka sebelum membahas hasil penelitian ini, akan dibahas terlebih dahulu reliabilitas dan relevansi dari metode yang dipakai untuk mencapai tujuan penelitian ini.

Pelacak epitop yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelacak epitop untuk sel B, maka dalam membahas atau menilai suatu metode pelacak epitop (*epitope scanning*), ada beberapa unsur dari metode tersebut yang perlu dibahas atau dinilai. Dalam hal melakukan penelitian untuk identifikasi epitop dari antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* dengan menggunakan metode pelacak epitop (*epitope scanning*) sel B terhadap sera subyek penderita TB paru aktif, subyek sehat bebas TB dan perawat sehat terpapar TB, perlu diulas beberapa hal penting yang berhubungan dengan hasil penelitian yang diperoleh. Berpijak pada landasan tersebut, dalam bab ini akan diulas dua pokok bahasan sebagai berikut.

6.1. Reliabilitas metode *epitope scanning* yang dipakai untuk identifikasi epitop yang paling reaktif terhadap sera subyek penelitian, terdiri dari

1. reliabilitas (keandalan) dari metode yang digunakan,
2. relevansi dari peptida yang diuji,
3. reliabilitas uji ELISA mikro yang dipakai dalam penelitian,
4. relevansi sampel yang diuji dalam penelitian ini,
5. keabsahan / reliabilitas metode yang dipakai untuk menentukan *cut-off*,
6. landasan dan cara pembagian derajat reaktivitas dari sera terhadap peptida yang diuji, dan
7. cara menentukan atau identifikasi epitop.

6.2. Hasil pelacakan epitop (*epitope scanning*) dari antigen ESAT-6

M. tuberculosis dalam penelitian ini yang terdiri dari dua sub pokok bahasan berikut.

6.2.1. Hasil penelitian secara keseluruhan terhadap sera subyek penelitian

6.2.2. Pengelompokan epitop dari antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* sesuai dengan frekuensinya pada masing-masing subyek penelitian, yang terdiri dari

6.2.2.1. Epitop infeksi berat

6.2.2.2. Epitop protektif

6.1.1. Reliabilitas (keandalan) dari metode yang digunakan.

Untuk identifikasi atau pemetaan suatu epitop (*epitope mapping*) dari protein yang telah diketahui struktur primernya dapat digunakan metode *epitope scanning*. Metode ini telah diperkenalkan oleh Geysen et al (1987) yang dimulai dengan mensintesis beratus-ratus peptida secara sintetik pada *polyethylene rods* atau pin yang telah diaktifkan untuk mengenali suatu epitop antibodi linier.

Sampai saat ini, teknik dari Geysen ini telah berkembang, bahkan teknik dari Geysen yang disebut juga dengan metode PEPSCAN (Carter, 1996), merupakan teknik pilihan utama untuk identifikasi epitop antibodi linier. Teknik ini paling banyak digunakan oleh para peneliti karena metode yang digunakan sederhana dan peptida sintetik yang dilekatkan pada pin dapat dipakai secara berulang pada setiap asai dan telah diakui keandalannya secara internasional (Worthington dan Morgan, 1994). Pernyataan ini telah dibuktikan oleh beberapa peneliti yang menggunakan *epitope scanning* untuk mengenali epitop antibodi sel B seperti Okahashil et al (1993), Lachumanan et al (1993), Matsuhita et al (1994), Kelly et al (1995), Ogawa et al (1995), Panchanatan et al (1998); Harboe et al (1998) dan Anita (2000), yang semuanya mengidentifikasi epitop antibodi sel B terhadap peptida yang saling tumpang tindih dari suatu protein yang diketahui struktur primernya dan diikatkan pada permukaan pin plastik.

Berdasarkan alasan tersebut di atas, maka reliabilitas dari pelacakan epitop sel B seperti yang dilakukan pada penelitian ini tidak perlu diragukan lagi.

6.1.2. Relevansi Dari Peptida Yang diuji

a. Peptida yang Diuji

Pemilihan peptida yang digunakan didasarkan pada seleksi urutan asam amino dari peptida yang berfungsi sebagai imunogen. Seperti diketahui protein antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* merupakan antigen yang telah diakui oleh para peneliti sebagai antigen yang memiliki potensi baik untuk diagnostik maupun vaksinasi dan mampu membangkitkan respons imun yang protektif, dan juga telah diakui perannya pada virulensi dari kuman (van Pittius et al, 2001; Parsons et al, 2002).

Regio N terminus dari antigen ESAT-6, menurut Harboe (1998) dan van Pittius (2002) merupakan regio dari antigen ESAT-6 yang paling antigenik dan bersifat hidrofilik. Secara *in vivo*, bagian ini juga dikenali oleh antibodi monoklonal yang protektif (Harboe et al, 1998) sehingga penggunaan sikuen asam amino dari regio N-terminus sebagai sumber atau asal usul peptida yang diuji dalam penelitian ini dapat dipertanggung jawabkan.

Dalam penelitian ini, peptida yang digunakan sebagai antigen dibuat secara sintetik dan langsung diikatkan pada permukaan pin plastik yang dipesan dari pabrik *Chiron Mimotopes Australia*. Peptida tersebut mempunyai struktur kimia sama dengan sikuen asam amino dari regio N terminus antigen ESAT-6. *Chiron Mimotopes* merupakan pabrik yang memonopoli pembuatan (sintesis) peptida secara sintetik yang banyak dipakai untuk penelitian dengan menggunakan metode *epitope scanning*. Pada hasil sintesis peptida yang telah dipesan dan dibuat di pabrik pembuat kit tersebut telah diperlakukan pengendalian mutu yang ketat.

b. Penentuan sikuen asam amino

Analisis sikuen dari klon protein ESAT-6 *M. tuberculosis* telah dilakukan oleh Sorensen et al (1995) dan van Pittius (2001). Gen yang mengkode antigen ESAT-6 dinyatakan sebagai *esxA* dari regio locus RD1, dan merupakan segmen yang terkonservasi (Pym AS et al, 2003)

Data urutan lengkap DNA (*whole genome sequence*) untuk *M. tuberculosis* telah diselesaikan oleh Stewart Cole (1998). Isolasi dan

karakterisasi dari protein ESAT-6 juga telah banyak dilakukan oleh Nagal (1991) dan Harboe (1998). Analisis perbandingan genomik (*comparative genomic analysis*) juga telah dikerjakan oleh van Pittius (2001). Urutan asam amino dari antigen ESAT-6 dengan demikian telah ditentukan dan diketahui secara internasional. Penggunaan data urutan asam amino dari publikasi di atas sebagai sumber sikuen asam amino dari peptida yang dibuat secara sintetik dan dipakai dalam penelitian ini, amat relevan.

c. Dasar yang dipakai dalam pemilihan panjang peptida yang akan disintesis

Peptida dapat dipotong antara 3-15 asam amino dengan *offset* 1-15 asam amino dengan program komputer (Worthington dan Morgan, 1994; Carter, 1996). Untuk pemetaan epitop sel B, pabrik pembuat kit merekomendasikan untuk memotong 8 mer dengan tumpang tindih 7 mer yang ditampilkan pada satu set peptida yang akan diuji (Tribbick, 1997). Oktamer adalah panjang minimal peptida yang dibutuhkan untuk mendeteksi seluruh epitop antibodi sel B linier.

Pada penelitian ini peptida dipotong sebanyak 9 mer dengan tumpang tindih 8 mer dan *offset* 1 mer, sesuai yang dilakukan oleh Anita (2000). Rodda (1997) mengatakan untuk mendapatkan epitop sel B linier, pemilihan asam amino dapat dibuat tumpang tindih 8 mer. Pemotongan 9 mer asam amino dengan tumpang tindih 8 dan *offset* 1 yang dilakukan peneliti ini masih termasuk dalam rentangan yang diperbolehkan oleh Worthington dan Morgan (1994) dan Rodda (1997).

Bila peptida dipotong lebih panjang dengan tumpang tindih yang lebih pendek, memang akan menghemat biaya dalam melakukan sintesis peptida, dampaknya adalah (Worthington dan Morgan, 1994; Rodda, 1997):

1. pada bagian peptida yang mengandung *binding sequence* bila dipotong panjang kemungkinan akan kehilangan sifat resolusinya,
2. peptida yang panjang akan bersifat sebagai struktur sekunder yang akan berpengaruh pada pengenalan epitop sel B linier,

3. setiap melakukan *coupling* asam amino pada tahap sintesis peptida, efisiensi sintesisnya kurang dari 100%. Atas dasar ini, maka suatu peptida yang disintesis lebih panjang akan memberikan hasil akhir sintesis yang berkurang ketepatan sikuennya.

d. Pabrik pembuat peptida atau kit yang akan diuji

Dalam penelitian ini, antigen yang digunakan dalam bentuk peptida sintetik dan disintesis pada permukaan pin plastik dipesan secara khusus pada distributor pabrik yang memonopoli produksi teknologi sintesis peptida pada pin dalam bentuk kit di Australia.

Pembuatan peptida sintetik dapat dikerjakan sendiri bila mempunyai laboratorium sendiri yang representatif. Perlu diketahui bahwa bahan kimia yang digunakan dalam sintesis peptida ini sangat korosif dan berbahaya. Di samping itu pengendalian mutunya juga diragukan. Kit semacam ini dapat juga dipesan dari sumber yang lain, namun pengendalian mutunya masih belum diakui secara internasional, walaupun harganya lebih murah. Pengendalian mutu dari kit yang diproduksi oleh pabrik *Chiron Mimotopes* Australia, seperti yang dipakai dalam penelitian ini, telah diakui secara internasional sehingga tidak perlu diragukan lagi mutunya. Bahkan pabrik pembuat kit menyertakan juga sertifikat pengendalian mutu dari peptida yang dipesan (lihat lampiran).

Peptida yang dipesan dalam bentuk kit dikirim oleh pabrik pembuat kit dalam keadaan beku - 20°C yang selanjutnya disimpan dalam - 20°C sampai siap untuk dilakukan pengujian. Data tersebut di atas menunjukkan bahwa cara yang dipakai sejak pembuatan sikuen asam amino sampai pengiriman hasil peptida sintetik dalam bentuk kit sudah memenuhi persyaratan sesuai dengan standar internasional yang berlaku.

Sebelum dilakukan pengujian peptida, peptida tersebut dibiarkan dalam suhu ruangan kurang lebih dua jam (sesuai anjuran pabrik) dan selanjutnya siap untuk dilakukan pengujian dengan sampel sera subyek penelitian, baik penderita TB paru, orang sehat bebas TB maupun perawat sehat terpapar TB.

Setiap kali setelah dilakukan pengujian sampel, antigen (peptida) yang telah diikatkan pada pin plastik tersebut masih dapat digunakan secara berulang. Pin yang telah digunakan untuk menguji harus dibersihkan (dicuci) terlebih dahulu sebelum digunakan lagi. Tujuan dari pembersihan pin ini untuk menghilangkan sisa antibodi yang masih melekat pada pin dengan cara *disruption* dan *sonication* sesuai dengan anjuran pabrik pembuatannya. Menurut petunjuk pabrik pembuatannya pin ini dapat digunakan ulang lebih dari 50 kali (Tribbick, 1997). Setiap kali sesudah digunakan untuk pengujian sampel, pin sebaiknya dilakukan *disruption* tiga kali agar antibodi yang melekat pada pin yang telah digunakan tersebut sudah tidak ada sisanya lagi yang masih melekat pada pin. Dalam melakukan *disruption* dan *sonication* digunakan larutan *phosphat buffer saline* (PBS) yang mengandung *sodium dodecyl sulfate* (SDS) dan 2-merkaptotanol. SDS berfungsi sebagai deterjen dan merkaptotanol yang merusak ikatan disulfida akan melepaskan antibodi yang masih melekat pada pin dengan dibantu oleh getaran dari alat sonikasi sehingga antibodi yang masih melekat pada permukaan pin akan betul-betul lepas.

6.1.3. Reliabilitas uji ELISA mikro yang dipakai dalam penelitian

a. Cara optimasi kondisi tes

Untuk menentukan suatu epitop dari protein yang telah diketahui struktur primernya dalam rangka *epitope mapping*, pengujian dilakukan dengan menggunakan uji ELISA. Uji ELISA yang dipilih dalam penelitian ini adalah *indirect* ELISA, dengan alasan:

1. merupakan uji ELISA yang sederhana untuk menentukan kadar antibodi dengan sensitivitas yang dapat diandalkan untuk keperluan pelacakan epitop,
2. dianjurkan oleh pabrik pembuat kit. Di samping itu, para peneliti sebelumnya juga menggunakan uji tersebut untuk identifikasi suatu epitop sel-B.

Sebelum melakukan uji ELISA yang merupakan bagian dari cara pelacakan epitop dalam penelitian ini, dilakukan titrasi papan catur (*checkerboard titration*) terlebih dahulu untuk mengetahui berapa kombinasi optimal pengenceran sampel serum yang diuji dan pengenceran konjugat yang akan dipakai dengan antigen yang sudah standar dan dilekatkan pada pin. Kadar antigen yang digunakan tidak perlu ditentukan lagi karena antigen peptida yang diuji sudah dilekatkan pada permukaan pin plastik dalam kadar tertentu yang dibuat oleh pabrik dengan pengendalian mutu yang tinggi.

Hasil titrasi papan catur yang dilakukan dalam penelitian ini, menunjukkan bahwa pengenceran sera 1:800 (sesuai dengan yang didapatkan oleh Anita (2000) dan pengenceran konjugat 1:500 merupakan kombinasi yang paling optimal di mana didapatkan perbedaan absorben dari *Phosphate Buffer Saline* (PBS), sera kontrol negatif dan sera kontrol positif yang tajam (yaitu antara 3-5 kali) dengan syarat absorben PBS < 0,05 (Handojo, 1996). Waktu inkubasi sampel yang optimal dalam penelitian ini adalah semalam. Hal ini berbeda dengan yang didapat oleh Anita (2000). Waktu optimal untuk menunggu berubahnya warna kromogen di dalam substrat yang terbaik adalah sekitar lima menit. Teknik maupun hasil dari titrasi papan catur yang dipakai atau yang diperoleh dalam menentukan kondisi uji ELISA yang optimal dalam penelitian ini, dinilai amat reliabel.

Cara Meningkatkan Reprodusibilitas Tes

Untuk meningkatkan reproduksibilitas tes ELISA digunakan satu kontrol positif tertentu yang dipakai pada setiap seri pemeriksaan. Kontrol positif sudah disediakan oleh pabrik pembuat kit dengan urutan asam amino PLAQQGGG yang diikatkan pada permukaan pin plastik berwarna merah dan urutan asam amino GLAQQGGG yang juga diikatkan pada permukaan pin plastik berwarna hijau, juga kontrol serum positifnya. Bila kondisi optimal ELISA benar, maka antibodi kontrol harus dapat membedakan secara tajam absorben yang diberikan oleh pin positif dengan pin negatif, yang hanya berbeda urutan satu asam amino saja. Waktu inkubasi yang dilakukan pada setiap pemeriksaan adalah semalam

pada suhu 4° C, dan waktu untuk mengembangkan warna ditunggu sampai lima menit dan dibaca dengan *microElisa reader*.

6.1.4. Relevansi Sampel yang Diuji Dalam Penelitian

Sampel subyek penderita TB paru aktif diambil dari penderita yang berobat di Poliklinik Paru dan Ruang Paru RSUD Dr. Soetomo secara sukarela tanpa paksaan. Mereka yang memenuhi kriteria inklusi dan terpilih sebagai sampel diminta untuk menandatangani surat persetujuan sebagai sampel penelitian. Dari 38 orang yang terpilih, setelah dilakukan uji saring berupa kultur mikrobiologi dan uji laboratorium biokimianya, terseleksi 10 orang sebagai subyek penderita TB paru aktif yang memenuhi kriteria *gold standard* untuk infeksi aktif *M.tuberculosis* pada paru .

Sampel subyek orang sehat bebas TB diambil dari anak SD berusia 12 tahun ke bawah yang terseleksi menurut kriteria inklusi, dan yang bersedia ikut dalam penelitian ini. Akhirnya didapatkan sebanyak 10 orang sukarelawan sebagai subyek sehat bebas TB, dari 19 sampel yang diseleksi.

Sampel perawat sehat terpapar TB, dipilih dari 50 orang perawat di Rumah sakit Paru Batu dan Hasta Brata, yang merawat penderita TB paru paling sedikit dua tahun bekerja. Yang memenuhi kriteria inklusi dan bersedia ikut dalam penelitian ini ada 10 orang, yaitu mereka yang foto Thorax PA-nya bersih menurut dua orang pembaca berpengalaman, dan Uji Mantoux-nya positif.

6.1.5. Keabsahan / Reliabilitas Metode yang Dipakai Untuk Menentukan Nilai *Cut-off Value*

Dalam literatur yang terakhir disebutkan bahwa pada metode *epitope scanning* untuk menentukan nilai *cut-off* digunakan metode *plot algorithm* (Worthington dan Morgan, 1994). Metode *plot algorithm* ini digunakan untuk membedakan peptida yang memberikan reaktivitas yang signifikan dari yang memberi pengecatan latar belakang (*background staining*). Ambang atas nilai rujukan (*cut-off value*) ditentukan dengan cara menentukan rerata dari setengah nilai absorben terendah ditambah tiga kali simpang bakunya. Seluruh nilai yang

di atas *cut-off value* tersebut dinyatakan memberikan reaktivitas signifikan (Lachumanan et al, 1993; Panchanatan et al, 1998).

Cara ini ditempuh untuk mengatasi sukarnya interpretasi data dalam *epitope scanning* bila menggunakan sera manusia yang merupakan sera poliklonal. Mengingat bahwa sera manusia sering menunjukkan *background reactivity* yang tinggi terhadap peptida yang pendek dan relatif lemah dalam mengikat suatu epitop, maka akibatnya signal yang dihasilkan juga berkurang dan akan menambah kesukaran dalam identifikasi suatu epitop (Worthington dan Morgan, 1994).

Berdasarkan uraian di atas, cara yang dipakai untuk menentukan ambang atas nilai rujukan (*cut-off value*) dalam penelitian ini, merupakan cara yang sudah diakui dan banyak dipakai oleh para peneliti secara internasional untuk pelacakan epitop sehingga keabsahannya tidak perlu diragukan lagi.

6.1.7. Cara menentukan atau identifikasi epitop protein

Sampai sekarang berapa panjang minimal sikuen asam amino dari *continuous B-cell epitope* yang diijinkan masih kontroversial. Menurut Tam (1994) agar dapat berfungsi dengan baik, panjang sikuen asam amino dari suatu epitop sebaiknya tidak kurang dari 6 mer. Untuk *T-cell epitope* diperlukan panjang sikuen asam amino 9-11 mer. Jadi bila didapatkan peptida yang lebih panjang (sekitar 15 asam amino), peptida tersebut mengandung *overlapping B* dan *T-helper cell epitopes*. Atas dasar inilah maka, panjang minimal sikuen asam amino dari suatu epitop yang dipakai dalam penelitian ini adalah 6 mer. Untuk mendapatkan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) yang membentuk epitop sepanjang itu, maksimum hanya boleh digunakan 4 peptida dekamer (*overlapping 8 mer dan offset 1 mer*) yang berurutan (nomer peptida berurutan), misalnya peptida nomer 2,3,4 dan 5. Panjang maksimalnya tentunya sama dengan panjang peptida yang diuji dalam penelitian ini yaitu 9 mer. Hal ini baru terjadi bila peptida tersebut tidak mempunyai *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dengan peptida-peptida yang lain.

Cara di atas yang dipakai untuk menentukan *overlapping common sequence* asam amino (epitop) dalam penelitian ini, dengan menggunakan maksimal 4 peptida yang diuji merupakan cara yang dapat dipertanggungjawabkan secara internasional.

6.2. Hasil Pelacakan Epitop (*Epitope scanning*) Dalam Penelitian ini

6.2.1. Hasil pelacakan Epitop dari antigen ESAT-6 terhadap antibodi dalam sera subyek penderita TB paru aktif dibandingkan serum sehat bebas TB.

6.2.1.1 Hasil Penelitian Secara Keseluruhan

Telah diketahui bahwa respons imun seseorang sangat berpengaruh pada berhasil tidaknya kuman *M. tuberculosis* menyebabkan kejadian sakit pada orang tersebut. Hal ini tergantung antara lain dari beberapa faktor, di antaranya faktor host yaitu antara lain: genetik, sistim HLA, tipe polimorfi dari gen *nramp1*, *innate immunity* serta dominasi T helper 1 atau T helper 2 pada individu yang bersangkutan (van Crevel et al,2002). Faktor agent yaitu antara lain: jumlah kuman yang masuk, dan virulensi dari kuman. Termasuk dalam faktor lingkungan adalah kontak penderita misalnya pada perawat yang terus menerus mendapat paparan kuman, atau keluarga yang tinggal bersama. Resultante dari semua faktor di atas akhirnya menentukan hasil akhir dari perjalanan penyakitnya.

Sel Th1 memainkan peranan penting pada sistim pertahanan tubuh manusia terhadap *Mycobacterium*. Dikatakan bahwa dominasi dari respons imun sel Th1 ini menimbulkan respons imun yang protektif, yaitu ke arah imunitas mediasi seluler. Sebaliknya apabila respons imun Th1 ini tidak mampu menghadapi kuman *M. tuberculosis*, maka respons imun akan bergeser ke respons imun Th2, yang mengarah ke respons imun humoral. Berpijak pada landasan ini maka timbulnya antibodi terhadap kuman ini walaupun kurang protektif, tetapi menunjukkan keadaan patologis, yaitu keadaan sakit (Palilingan, 2003). Maka urutan peptida (epitop) terhadap antibodi spesifik pada penderita ini disebut sebagai marka TB aktif.

Protein ESAT-6 yang disekresi oleh *M. tuberculosis* telah diketahui memegang peran penting pada patogenesis TB paru. Protein ini disandi oleh gen

RD-1, yang hanya didapatkan pada *strain* yang virulen. Regio N-terminus yang terletak di bagian luar dari molekul ESAT-6, merupakan bagian immunogenik yang berinteraksi dengan berbagai sel imunokompeten. Telah diketahui bahwa paparan terhadap protein ESAT-6 ini dapat membangkitkan respons imun protektif (Pym et al, 2003).

Epitop infeksi berat, disebut demikian karena *overlapping common sequence* asam amino (epitop) reaktif terhadap antibodi yang terdapat pada sebagian besar subyek penderita TB paru aktif dan perawat sehat. *Overlapping common sequence* (epitop) IHSLLD (25-30) yang reaktif terhadap antibodi (IgG) yang terdapat pada 70% sera subyek penderita TB paru aktif dan hanya 20,0 % pada subyek bebas TB. Berdasarkan perhitungan uji statistik, epitop IHSLLD ini berbeda bermakna dengan Z hitung > Z tabel. Epitop infeksi TB yang reaktif terhadap antibodi (IgG) dalam sera bebas TB ditemukan pada beberapa kasus dalam penelitian ini, tetapi dengan absorbensi yang lebih rendah. Adanya antibodi ini pada sebagian kecil subyek bebas TB, mungkin disebabkan adanya infeksi sub-klinis, yang tak terdeteksi dengan uji Mantoux.

Ditinjau dari jenis asam aminonya di mana: I = Isoleucine bersifat nonpolar (*hydrophobic*), H= Histidine bersifat basa (*positively charged*), S= Serine bersifat polar (tak bermuatan), L = Leucine bersifat nonpolar (*hydrophobic*), D = Aspartic acid bersifat asam (bermuatan negatif), maka epitop IHSLLD ini tidak mempunyai sifat khusus karena jenis asam aminonya beragam.

Temuan epitop infeksi berat *overlapping common sequence* IHSLLD (25-30) ini, yang juga reaktif terhadap antibodi yang terdapat pada 70% perawat sehat, menunjukkan adanya kuman yang masuk dalam tubuh manusia dalam jumlah yang cukup banyak. Hal ini tampaknya sejalan dengan yang ditemukan oleh Ewer et al (2003), yang menyebutkan tes diagnostik menggunakan antigen ESAT-6 dengan metode *enzyme linked immunospot assay* sebagai *new test for latent tuberculosis infection*. Pada penelitiannya didapatkan korelasi dengan uji Mantoux menggunakan tuberculin (TST) sebesar 89%. Sekarang ini sedang dikembangkan uji prediksi positifnya pada berbagai tingkat perkembangan penyakit TB (Ewer et al, 2003).

Pada penelitian terdahulu, Brandt et al (1996) mendapatkan reaksi terhadap epitop baik sel B maupun sel T pada bagian hidrofilik dari antigen ESAT-6, yaitu pada urutan asam amino 1- 20. Pada penelitian ini yang memakai asam amino dengan *offset* 1 didapatkan hasil yang lebih spesifik yaitu pada asam amino urutan 25-30. dengan membandingkan antara penderita TB aktif dengan orang bebas TB.

Tidak berhasil ditemukannya epitop sel-B penanda TB aktif dalam penelitian ini dapat juga disebabkan karena :

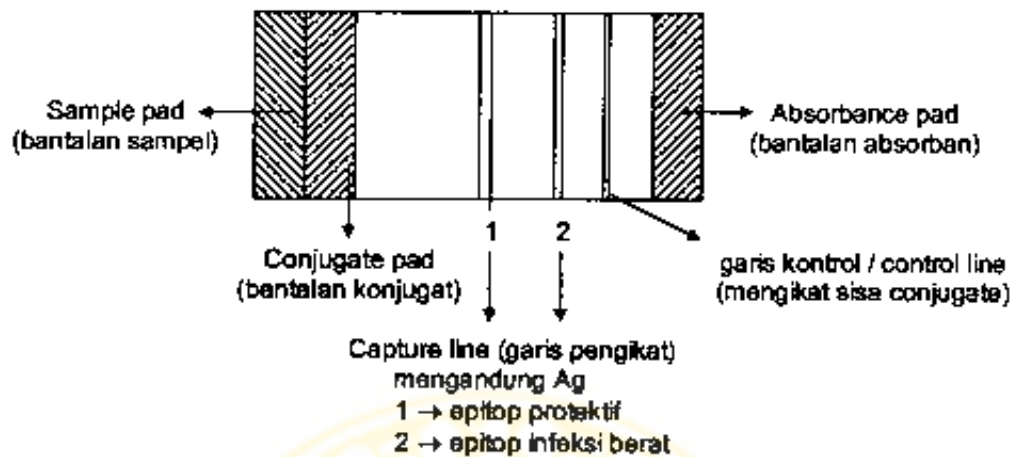
1. jumlah sampel kurang banyak.
2. regio area N-terminus yang dipilih dalam penelitian ini kurang sesuai untuk populasi Indonesia. Urutan asam amino 1-35 ditemukan sebagai epitop sel B pada hewan (Harboe et al, 1998) bisa berbeda pada manusia karena perbedaan HLA. Hal yang sama ditemukan oleh Anita (2000) yang mendapatkan perbedaan epitop yang teridentifikasi pada kelinci dengan pada manusia. Peneliti lain (Kanaujia et al, 2004) juga menemukan daerah yang berbeda pula pada hewan primata tuberkulosis yang bukan manusia.

Pada penelitian ini walaupun epitop marka TB aktif tidak ditemukan tetapi berhasil diidentifikasi dua epitop yang lain, yaitu:

1. epitop infeksi berat, bukan marka atau penanda yang spesifik karena tidak bisa membedakan mereka yang sehat dan sakit, tetapi masih bisa digunakan untuk keperluan diagnostik.
2. epitop protektif, yaitu yang mungkin dapat membangkitkan respons imun protektif dan hanya terdapat pada perawat sehat yang telah lama merawat penderita TB (terpapar TB), namun tidak sakit.

Epitop infeksi berat ini didapatkan baik pada penderita TB maupun pada perawat sehat terpapar TB, jadi menunjukkan adanya kuman TB yang masuk dalam jumlah banyak. Apabila dalam tubuh orang tersebut terdapat antibodi terhadap epitop protektif maka ia terlindung dari penyakit TB, sedangkan bila tidak terdapat antibodi terhadap epitop protektif maka ia jatuh sakit. Berdasarkan

kenyataan ini maka dapat didisain suatu tes diagnostik memakai cara imunokromatografik sebagai berikut:



Garis-1 diisi dengan epitop protektif dan garis-2 diisi dengan epitop infeksi berat.

Gambar 6.1 Uji imunokromatografi memakai 2 macam antigen

Pembacaan hasil tes dapat dilihat dengan kasat mata.

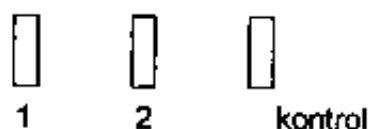
Bila garis-1 negatif dan garis-2 positif, maka berarti bahwa penderita tersebut menderita TB aktif.



Bila garis-1 positif dan garis-2 juga positif, maka berarti tertular tapi tidak sakit.



Bila *capture line 1* dan *2* negatif, sedangkan garis kontrol juga negatif, berarti teknik pemeriksaan salah atau reagens rusak.



Tentu penggunaan tes tersebut di atas masih memerlukan penelitian lebih lanjut, tetapi bila dikembangkan akan menjadi tes yang cepat, murah dapat dilakukan di Puskesmas.

6.2.2. Hasil pelacakan Epitop dari antigen ESAT-6 terhadap antibodi dalam sera subyek perawat sehat terpapar TB dibandingkan penderita TB paru aktif

Kuman *M. tuberculosis* merupakan kuman aerobik obligat tetapi *fakultatif intraseluler*. Multiplikasinya terjadi intraseluler, namun kuman harus juga keluar dari dalam sel bila akan berpindah ke sel yang lain. Di sinilah letak peran protektif parsial dari respons imun humoral. Peran dari imunitas humoral ini masih tetap kontroversial, walaupun secara umum diakui bahwa respons imun seluler lebih berperan (Kabat, 2003). Terapi serum dan peran imunitas humoral kembali dipelajari dan ditinjau ulang akhir-akhir ini dan didapatkan kesimpulan bahwa dalam sera manusia terdapat berbagai macam antibodi yang protektif, non-protektif dan bahkan ada yang memperberat penyakit (Freedman, 1998). Bila urutan asam amino yang spesifik ini ditemukan, maka dapat dikembangkan untuk menimbulkan antibodi yang berguna.

Epitop marka kekebalan, disebut demikian karena *overlapping common sequence* asam amino (epitop) hanya reaktif terhadap antibodi yang terdapat pada sebagian besar subyek perawat sehat terpapar TB dan hanya pada sebagian kecil subyek TB paru aktif. Ditinjau dari jenis asam aminonya di mana E = Glutamic acid, bersifat asam bermuatan negatif; A = Alanine bersifat nonpolar (*hydrophobic*); S = Serine bersifat polar tak bermuatan, maka epitop EAASA ini didominasi oleh asam amino alanin yang lebih bersifat hidrofobik. Hal ini agak berbeda dengan sifat umum epitop sel-B yang biasanya cenderung hidrofilik.

Overlapping common sequence (epitop) EAASA (12-17) reaktif terhadap antibodi (IgG) yang terdapat pada 90% sera subyek perawat sehat dan hanya 40,0 % pada subyek penderita TB paru aktif Berdasarkan perhitungan uji statistik, epitop EAASA ini berbeda bermakna dengan Z hitung 2.34 > Z tabel 1.96. Antibodi humoral ini dapat berperan bila kuman *M tuberculosis* berada ekstraseluler dan untuk eliminasinya masih dibutuhkan peran dari IFN- γ dan sel

T sitotoksik. Jadi bila seseorang mempunyai fungsi imunitas seluler yang baik, maka antibodi spesifik ini dapat membantu menangkap kuman yang masuk dan kemudian meng-eliminasiya.

Pada sebagian kecil penderita TB dijumpai juga antibodi terhadap epitop marka kekebalan ini, akan tetapi mungkin karena respons imun selulernya kurang optimal, sehingga tetap tidak mampu untuk dapat meng-eliminasi kuman *M. tuberculosis* ini.

Antibodi spesifik terhadap epitop marka kekebalan ini memang bukanlah satu-satunya faktor yang mempengaruhi tidak terjadinya penyakit TB aktif, namun keberadaannya perlu diteliti lebih lanjut pada studi populasi yang lebih luas. Faktor lain yang mempengaruhi tidak terjadinya penyakit adalah genetik, misalnya tipe HLA dan polimorfi gen *nramp* dari inang, dan jumlah kuman yang masuk. Jadi walaupun subyek penderita TB mempunyai antibodi protektif tersebut, namun bila jumlah kuman yang masuk cukup banyak dan virulensinya tinggi, serta imunitas selulernya kurang baik, maka penyakit TB paru aktif masih dapat terjadi (Cooper, 1995).

Berdasarkan hasil keseluruhan dari penelitian maka dapat digambarkan adanya epitop infeksi berat pada penderita TB paru aktif dan adanya epitop marka protektif pada perawat sehat terpapar TB. Temuan epitop infeksi berat ini dapat untuk dikembangkan menjadi suatu tes diagnostik untuk mendeteksi adanya proses TB. Temuan ke dua yaitu epitop marka kekebalan ini menarik untuk dievaluasi lebih lanjut tentang fungsi yang sebenarnya untuk dipertimbangkan sebagai calon vaksin. Vaksin imunitas humoral bagi kuman intraseluler, seperti telah kita ketahui juga dikembangkan misalnya terhadap *Salmonella typhi*, dan virus hepatitis B. Antibodi protektif ini walaupun tidak efektif untuk kuman yang sudah masuk, tetapi berguna untuk menangkap kuman yang baru masuk (yang berada ekstraseluler), sehingga dapat digunakan untuk vaksinasi bayi berusia 0 – 3 bulan atau bagi mereka yang belum pernah kemasukan kuman TB. Bila infeksiya berat maka perlu peran sistem imun seluler. Para peneliti telah menggunakan antigen ESAT-6 ini dengan ditambahkan (insert) pada BCG, dan diharapkan berguna untuk memperkuat

profeksi serta mencegah relaps Penggunaan ESAT-6 ini sebagai vaksin sub-unit dikatakan mempunyai efek sama seperti campuran peptida sintetik maupun BCG (Arend et al, 2000; Brandt et al, 2000)

Atas dasar sudah diketemukan urutan asam amino epitop protektif, maka urutan nukleotida yang menyandi epitop tersebut dapat ditentukan, untuk selanjutnya diinsersikan pada plasmid yang non-patogen. Plasmid yang telah mengandung nukleotida tersebut dapat digunakan sebagai vaksin DNA untuk menggantikan vaksin kuman hidup. Penggunaan vaksin DNA ini belakangan sangat populer untuk menanggulangi penyakit infeksi yang serius. Keuntungan lain dari vaksin DNA yaitu di samping dapat membangkitkan respons imun humoral, dapat juga menimbulkan respons imun seluler.

Epitop protektif ini kemungkinan besar merupakan juga bagian dari epitop sel-T, sebab ada *overlapping* dengan yang didapatkan oleh peneliti lain pada populasi di Jerman dan India (van Pittius et al, 2002) sedangkan populasi Ethiopia memiliki daerah (regio) yang berbeda untuk epitop sel-T nya. Epitop sel T ini dalam tubuh menimbulkan respons imun seluler (Th1) maupun humoral (Th2). Apakah *overlapping* ini juga sama di Indonesia (asam amino 1 – 32) seperti yang didapatkan di Jerman dan India? Hal ini perlu penelitian lebih lanjut, yaitu dicari pada regio yang lain dengan offset 4-5, sehingga didapat di mana kira-kira regio untuk manusia Indonesia. Bila benar ada *overlapping* antara epitop protektif ini dengan epitop sel-T untuk populasi Indonesia, maka regio ini bisa dipakai untuk vaksin DNA, dan keuntungannya vaksin DNA ini merangsang kedua respon imun seluler maupun humoral. Setelah uji coba penggunaan vaksin DNA pada beberapa patogen ternyata vaksin DNA ini ampuh daya proteksinya, karena:

1. plasmid yang dipakai juga merupakan *chemoattractant* bagi APC profesional, sehingga mampu membangkitkan respons imun protektif,
2. meningkatkan respons imun seluler terutama ke arah Th1 yang bersifat protektif bagi patogen intraseluler,
3. bila perlu dapat ditambahkan gen yang menyandi IL-12, sehingga mengarahkan respons imun ke arah Th-1.

Keuntungan penggunaan vaksin DNA ini dibandingkan vaksin tradisional yaitu tidak mengandung materi genetik non-protektif, sehingga tidak dikhawatirkan akan terjadinya replikasi atau mutasi menjadi virulen dan menimbulkan penyakit. Keuntungan lain yaitu tidak mengandung media atau kontaminan lain yang sering ikut serta pada vaksin tradisional, misalnya bahan otak kera yang terdapat dalam vaksin rabies, kadang bisa menimbulkan auto-antibodi terhadap otak manusia yang bersangkutan karena reaksi silang.

Daya proteksi yang ditimbulkan vaksin DNA ternyata cukup kuat dan diharapkan dapat menyamai vaksin hidup. Hal ini terungkap pada percobaan vaksin DNA untuk profilaksis TB pada tikus dengan menggunakan berbagai bagian kuman *M. tuberculosis*. Didapatkan daya proteksi yang baik pada penggunaan antigen: ESAT-6, MTB 8.4, Ag85B, 32-kDa mycolyl transferase, Ag85A, 38-kDa PstS-1, 65 kDa hsp (*M. leprae*), 70 kDa-hsp (Huygen, 2003). Penemuan ini menunjukkan titik terang ke arah penggunaan vaksin DNA untuk profilaksis TB, dengan mengaktifkan kedua jenis sel-T baik yang CD4⁺ maupun yang CD8⁺ (Lewinsohn, 2003). Di kemudian hari kombinasi vaksinasi BCG diikuti dengan ESAT-6 perlu dipertimbangkan untuk mencegah terjadinya relaps atau TB pasca primer pada penderita dan kombinasi vaksinasi ESAT-6 disusul dengan BCG untuk mengarahkan respons imun kepada antigen protektif yang utama (Huygen, 2003).

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Hasil penelitian secara keseluruhan pada penelitian ini memperlihatkan dua hal pokok sebagai berikut.

1. Reaktivitas sera penderita TB paru aktif terhadap bagian N-terminus antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* cukup bervariasi antar-individu, namun kesemuanya menunjukkan reaktivitas yang tinggi, yang ditunjukkan oleh hasil tingginya absorbensi pada reaksi ELISA indirek. Hal ini menunjukkan bahwa ke 27 peptida tersebut dapat berpotensi sebagai bagian yang imunogenik. Bila ke 27 peptida tersebut direaksikan dengan sera orang normal bebas TB, maka diperoleh hasil absorbensi yang lebih rendah, tetapi bila direaksikan dengan sera perawat sehat, maka didapatkan absorbensi yang juga tinggi seperti halnya pada penderita TB. Atas dasar penemuan tersebut di atas, maka urutan asam amino yang didapat dalam penelitian ini bukan epitop marka TB aktif, melainkan epitop infeksi berat, yang didapatkan positif pada mereka yang terpapar pada kuman TB secara intensif.
2. Temuan epitop dari antigen ESAT-6 khususnya regio N-terminus residu asam amino 1-35 yang paling reaktif terhadap antibodi dalam sera perawat sehat terpapar TB, tetapi yang tidak terdapat dalam sera penderita TB paru aktif dalam penelitian ini disebut sebagai epitop protektif, karena diperkirakan dapat membangkitkan respons imun protektif.

Ke dua epitop yang berhasil diidentifikasi dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Epitop infeksi TB dari antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* yang reaktif terhadap sebagian besar antibodi (IgG) dalam sera subyek penderita tuberkulosis paru aktif adalah epitop dengan *overlapping common sequence* IHSLLD (25-30).
- b. Epitop protektif dari antigen ESAT-6 *M. tuberculosis* yang reaktif terhadap sebagian besar antibodi (IgG) dalam sera subyek perawat sehat terpapar

TB adalah epitop dengan *overlapping common sequence* EAAASA (12-17).

Respons imun penderita TB dipengaruhi oleh faktor genetik antara lain tipe HLA penderita, polimorfi gen *nramp*. Jadi hasil di atas dapat berbeda bila diteliti di negara lain atau pada penduduk ras yang berbeda. Penggunaan epitop tersebut untuk dasar pembuatan sarana diagnostik harus disesuaikan dengan faktor genetik penderita dan tipe *strain* kuman yang ada di negara tersebut.

Fungsi dari epitop marka kekebalan yang berhasil diperoleh dari penelitian ini belum diketahui secara tepat, namun keberadaannya perlu dipertimbangkan untuk pembuatan vaksin sel-B dan vaksin DNA, terutama untuk mencegah masuknya kuman yang masih berada ekstraseluler. Bila ternyata pada penelitian lebih lanjut didapatkan *overlapping* dengan epitop sel T untuk populasi Indonesia, maka data ini dapat dipakai untuk pembuatan vaksin sub-unit dan vaksin DNA.

7.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disampaikan beberapa saran sebagai berikut.

1. Perlu dipikirkan untuk menggunakan jumlah sampel yang lebih besar daripada yang dipakai dalam penelitian ini agar perbedaan epitop yang ditemukan pada perhitungan uji statistik lebih nyata.
2. Hasil penelitian dasar seperti ini, agar bermanfaat bagi masyarakat, perlu dilanjutkan dengan pengembangan produk biomolekuler, seperti sarana diagnostik atau vaksin yang dapat dinikmati kegunaannya oleh masyarakat banyak. Sehubungan dengan hal tersebut di atas maka disarankan untuk melakukan penelitian pengembangan berikut.
 - a. Diteliti penggunaan uji diagnostik menggunakan antigen ESAT-6 regio N-terminus untuk mendeteksi adanya infeksi TB, dengan menggunakan cara asai imunokromatografis.
 - b. Perlu penelitian lebih lanjut tentang peranan urutan asam amino pada produksi antibodi yang protektif. Kegunaannya adalah sebagai vaksin

DNA, terutama untuk bayi baru lahir sampai tiga bulan pascanatal (belum pernah tertular TB), terutama bila epitop ini benar merupakan bagian atau *overlapping* dengan epitop sel-T dari antigen ESAT-6 pada orang Indonesia. Terlebih lagi bila dalam vaksin DNA tersebut ditambahkan gen yang menyandi IL-12 sehingga respons imun yang ditimbulkannya dapat diarahkan lebih ke dominasi Th-1 yang bersifat protektif.



DAFTAR PUSTAKA

- Aditama TY.** 1995. Perkembangan dalam diagnosis tuberkulosis paru. Dalam: Awaloedin M, Tanunihardja BY, Sudisa A, Sutarya O, eds. Laporan Konperensi Kerja Nasional VII PDPL Recent Advances in Respiratory Medicine. 1995.
- Amin M,** 2003. Kelainan residu akibat tuberkulosis paru. Dalam: Palilingan JF, Maranatha D, Winariani, Irawan A, eds. Naskah Lengkap Simposium Nasional TB Update-II, Surabaya. Hal: 97.
- Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, Heron I.** 1991. Protein released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun*; 59 (6): 1905-1910.
- Andersen P, Muuk ME, Pofock JM, Doherty TM.** 2000. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet Sep 23;356(9235):1048-1049.*
- Anita Y,** 2000. Epitop regio P (824-853) antigen VII *Streptococcus Mutans* serotipe C yang reaktif dalam patogenesis karies gigi di Surabaya. Desertasi. Program Pascasarjana Univ. Airlangga, hal:72-74.
- Arcud SM, Geluk A, et al, van Meljgaarden KE, van Dissel JT, Theisen M, Andersen P, Ottenhoff THM.,** 2000. Antigenic Equivalence of Human T-Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-Encoded Protein Antigen ESAT-6 and Culture Filtrate Protein 10 and to Mixture of Synthetic Peptides. *Infect.Immun*; 68: 3314-3321.
- Artifa MZ,** 2001, Perbandingan nilai diagnostik TB-Dot & uji ICT-TB. Karya Akhir brevet Patologi Klinik.
- Bally GVD, Narrain R, Mayurnath S, Vallikshayee RS, Guld S.,** 1980. Trial of BCG Vaccines in South India for Tuberculosis Prevention. *Indian J Med Res 72 (Suppl.): i – 74.*
- Baron EJD, Peterson LR, Fliegold SM.** 1990. Microorganism encountered in the respiratory tract. In: *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology.* 9th Ed. Missouri : Mosby-year Book Inc, 1990: 222-223.
- Brandt L, Oetlinger T, Holm A, Andersen AB and Andersen P,** 1996. Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Immunol* 157: 3527-3533.
- Brandt L, Elhay M, Rosenkrends I, Lindblad EB, Andersen P.,** 2000. ESAT-6 Subunit Vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect.Immun*; 68: 791-795.
- Carter JM,** 1996. Epitope mapping of a protein using the Geysen (PEPSCAN) procedure. The protein protocols handbook. Humana Press. Totowa, New Jersey, pp 35-50.
- Cheesbrough M.** 1984. Mycobacteria. In: *Medical Laboratory Manual for Tropical Country* vol. 2. 1st Ed. England The Thetford Press Ltd. pp: 289 – 309.

Cole S, Garbe., et al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.

Cooper AM, Flynn J.,1995. The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol* 7: 512-516.

Davies PDO., 1984. Pathogenesis of tuberculosis. *Postgraduate Doctor.* 4: 236-240.

Elhay MJ, Oettinger T, Andersen P., 1998. Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. *Infect.Immun* 66: 3454-3456.

Enarson DA, Chiang CY, Murray JF, 2004. Global epidemiology of tuberculosis. In: Rom WN, Garay SM (Eds). *Tuberculosis 2nd Ed.* Lippincott Williams & Wilkins pp 3-12.

Espitia C, Cervera I, Gonzales R & Mancilla R. 1989. A 38-kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp. Immunol* 77:373-377.

Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, Monk P, Lalwani A. 2003. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* Apr 5;361(9364): 1168-1173.

Fenton MJ , Vermeulen MW, 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect. Immun.* 65:5149-5156.

Freedman AG, Casadevall, 1998. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 11: 514-532.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, et al.,2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *ProcNatlAcadSci* June 24, Vol 100. No.13 pp 7877-7882.

Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G. 1987. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J.Immunol Methods* 102: 259-274.

Goers J, 1993. *Immunochemical Techniques Laboratory Manual.* Harcourt Brace Jovanovich, Publisher. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.:Academic Press, pp 126-133.

Grange JM. 1984. The humoral immune response in tuberculosis: its nature, biological role and diagnostic usefulness. *Adv.Tuberc.Res.* 21:1-78.

Grosset J, 1988. Bacteriologic basis of short-course chemotherapy for tuberculosis. *Clin Chest Med.* 1: 231-241.

Grosset J, Truffpt-Pernot, Cambau E, 2000. Bacteriology of tuberculosis. In: (Reichmann LB and Hershfield ES, eds.) *Tuberculosis – A comprehensive international approach.* 2nd edition. Marcel Dekker, Inc, pp 157 – 185.

Handojo I, 1988. Uji Peroksidase Anti Peroksidase (PAP) pada penyakit tuberkulosis paru. Surabaya, Indonesia: Universitas Airlangga. Desertasi pp.: 213.

- Handoyo I, 1996.** Perbandingan nilai diagnostik uji DOT-EIA-TB dan Pathozyme TB complex pada penyakit tuberkulosis paru. *Media IDI* 21:36-40.
- Handoyo I, 2001.** Perkembangan Diagnosis Laboratoris Tuberkulosis. *Konas IVPDS PatKlini* 22-24 Oktober 2001, Bandung.pp:1-47.
- Handoyo I, 2002.** Immunopatogenesis dari tuberkulosis paru. *Kuliah PPDS Patologi Klinik*.pp1-22.
- Handoyo I, 2003.** Pengembangan diagnosis dan pencegahan tuberkulosis melalui pemetaan epitop ESAT-6 *Mycobacterium tuberculosis*. *Pidato Pengukuhan Guru Besar dalam bidang Patologi Klinik pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga*, 8 Februari 2003.pp 2-10.
- Hanna BA, 2004.** Laboratory Diagnosis. In: Rom WN, Garay SM (Eds). *Tuberculosis*. 2nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins pp 163-176).
- Harboe M, Malin AS, Dockrell HS, Wiker HG, Ulvund G, Holm A, Andersen P., 1998.** B-Cell Epitopes and quantification of the ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 66: 717-723.
- Ho JL, Riley LW., 1997.** Defenses against tuberculosis. In (Crystal RG, West JB, Barnes PJ and Cherniack NS,eds) *The Lung- Scientific foundations*. Volume 1. Raven Press, 2nd edition pp.499 - 510.
- Huygen K., 2003.** On the use of DNA Vaccines for the Prophylaxis of Mycobacterial Diseases. *Infect Immun* 71 (5): 1613-1621.
- Ivanyi J, Sharp K, Jackett P, Bothamley G., 1988.** Immunological study of the defined constituents of Mycobacteria. *Springer Semin Immunopathol* 10: 279-300.
- Kabat , 2003.** Imun Protektif pada infeksi tuberkulosis. Dalam: *Palilingan JF, Maranatha D, Winariani, Irawan A, eds. Naskah Lengkap Simposium Nasional TB Update-II, Surabaya*. Hal: 1-16.
- Kanaujia GV, Motzel S, Garcia MA, Gennaro ML., 2004.** Recognition of ESAT-6 sequences by antibodies in sera of tuberculous nonhuman primates. *Clin Diag Lab Immunol* Vol 11, No.1p 222-226.
- Kardjito T, 1983.** *Immunology of tuberculosis: Humoral immune response and other serological changes in human pulmonary tuberculosis*. Disertasi Universitas Airlangga
- Kardjito T, 1996.** Host defense against tuberculosis. In :*Infection and Host Defense*. 2nd Indonesian-Dutch-Flemish Meeting
- Kaufmann SHE, 1999.** Immunity to intracellular bacteria. In (Paul WE, ed). *Fundamental Immunology*, 4th edition. Lippincott-Raven, pp 1335-1371.
- Kaufmann SHE, 2002.** Immune intervention in tuberculosis. In (Kaufmann, ed). *Immunology of Infectious Diseases*. ASM Press, pp:439-452.

- Kelly CG, Todryk S, Kendal HL, Munro GH, Lehner T, 1995. T Cell, adhesion, and B-cell epitopes of the cell surface *Streptococcus mutans* protein antigen I/II. *Infect Immun* 63: 3649-3658.
- Klela J, 1982. Immunology. The Science of self-nonself discrimination. John Wiley & Sons, USA. 1st Ed. pp:356
- Lachumans R, Devi S, Cheong Y-M, Rodda SJ, Pang T.,1993. Epitope mapping of the Sta58 Major Outer membrane protein of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immun* 61:4527-4531.
- Laurens AH, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P.2000. Diagnosis of Tuberculosis Based on Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7: 155 – 160.
- Lewinsohn DA, Heinzl AS, Gardner JM, Zhu L, Alderson MR, Lewinsohn DM, 2003. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8⁺ Tcells Preferentially Recognize Heavily Infected Cells. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1346-1352
- Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S.,1997. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine* 15 (8): 834-838
- Made NM, 2000. Deteksi mutasi regio gen *rpo B Mycobacterium tuberculosis* dengan teknik *Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism* untuk penentu resistensi terhadap rifampisin. Pp 1-41.
- Mahalras GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK., 1996. Molecular Analysis of Genetic Differences between *Mycobacterium bovis* BCG and Virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol* 176: 1274 – 1282.
- Matsushita K, Nisizawa Y, Nagaoka S, Kawagoe M, Koga T.,1994. Identification of antigenic epitops in surface protein antigen of *Streptococcus mutans* in human. *Infect Immun* 62:4034-4042.
- Minion FC, Menon SA, Mahalras GG, Wannemuehler MJ., 2003. Enhanced Murine Antigen-Specific Gamma Interferon and Immunoglobulin G2a Responses by Using Mycobacterial ESAT-6 Sequences in DNA Vaccines. *Infect Immun* 71 (4): 2239-2243.
- Ogawa T, Yasuda K, Yamada K, Mori H, Ochiai K, Hasegawa M, 1995. Immunochemical characterisation and epitope mapping of a novel fimbrial protein (Pg-II fimbria) of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol and Med Microbiol* 11: 247-256.
- Okahashi N, Takahashi I, Nakai M, Senpuku H, Nisizawa T, Koga T, 1993. Identification of antigenic epitopes in an alanine-rich repeating region of surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 61: 1306-1309.
- Palilungan JF, 2001. Sitokin Th1-Th2 dan subset limfosit dalam respons imun lokal dan sistemik pada pengobatan tuberkulosis paru pasca-primer. Desertasi Pascasarjana Univ.Airlangga; hal:19-40.
- Palilungan JF, 2003. Reaktivasi, latensi dan persistensi infeksi tuberkulosis. Dalam: Palilungan JF, Maranatha D, Winarjani, Irawan A, eds. Naskah Lengkap Simposium Nasional TB Update-II, Surabaya. Hal: 17-25.

Panchanatan V, Naidu BR, Devi S, DiPasquale A, Mason T, Pang T, 1998. Immunogenic epitopes of *Salmonella typhi* GroEL heat shock protein reactive with both monoclonal antibody and patient sera. *Immunology Letter* 62:105-109.

Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somokovi A, Brezel B, van Soolingen D, Hale YM and Salfinger M., 2002. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol* 40 (7): 2339-2345.

Pellequer J-L, Westhof E & Regenmortel MV, 1994. Epitope prediction from primary structure of proteins. Peptide antigen. A practical approach. By GB Wisdom. Oxford New York Tokyo : IRL Press at Oxford University Press, pp 7 -25.

Prihatni S. 1995. Epidemiologi penyakit tuberkulosis masalah dunia. Dalam: Awafoedin M, Tamunihardja BY, Sudisa A, Sutarya O, eds. Laporan Konperensi Kerja Nasional VII PDPL Recent Advances in Respiratory Medicine. 1995.

Pym AS, Brodin P, Majlessi L, Brosch R, Demangel C, Williams A, Griffiths KE, Marchal G, Leclere C and Cole ST, 2003. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* 9(5):533-539

Rodda SJ, 1997. Synthesis of multiple peptides on plastic pins. *Current Protocols in Immunology*. Supplement 22. 9.7.1-9.7.19.

Skjott, RLV, Oettinger, T, Rosenkrands I, Ravn P, Brock I, Andersen P, 2000. Comparative Evaluation of Low-Molecular-Mass Proteins from *Mycobacterium tuberculosis* Identifies Members of the ESAT-6 Family as Immunodominant T-Cell Antigens. *Infect.Immun.*68: 214-220.

Smith I, 2003. *Mycobacterium Tuberculosis*. Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin Microbiol Rev.*16 (3): 463-496.

Sofro AS, 1994. *Immunokimia*. Penerbit Andi Offset Jogjakarta, hlm 29-62.

Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB., 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-Cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*63: 1710-1717.

Subowo, 1993. *Imunobiologi*. Penerbit Angkasa Bandung, hlm 131-150.

Subronto YW, 2002. *Antigen Recognition and Immunopathogenesis of Tuberculosis*. Clinical Studies in Yogyakarta. Desertasi Leiden Univ; pp:22-29.

Sudjana, 1992. *Metoda Statistika*. Penerbit Tarsito Bandung. Hlm 246-247.

Sujudi A, 2000. Peran Dokter Spesialis Penyakit Dalam sebagai ujung tombak dalam upaya penanggulangan TBC di Indonesia dalam kaitannya dengan Gerdunas TB. Kongres Nasional Perhimpunan Dokter Spesialis Penyakit Dalam Indonesia Ke-XI di Surabaya.

Tam JP, 1994. Immunization with peptide-carrier complexes : traditional and multiple-antigen peptide systems. Peptide antigen. A practical approach. Edited by Wisdom GB. IRL: Press. Oxford New York Tokyo, pp 84 -115.

Toman K. 1979. Tuberculosis case finding and chemotherapy. WHO, Geneva: 3 - 79.

Tribbick G, 1997. Antibody epitope mapping with Multipin peptides. Chiron Mimotopes Pty, Ltd., Clayton, Victoria, Australia, pp 815-825.

Ulrichs T, Anding P, Porcelli S, Kaufmann SHE, Munk ME.,2000. Increased number of ESAT-6 and Purified Protein Derivative Specific Gamma Interferon-Producing Cells in Subclinical and Active Tuberculosis Infection.. *Infect.Immun* 68: 6073-6076.1995 Oct 15.

Van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM, 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 15(2): 294-309.

Van Pinxteren LAH, Ravn F, Agger EM, Pollock J and Andersen P, 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP 10. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:155-160

van Pittius NC, Gamielidien J, Hide W, Brown GD, Sizzen RJ and Bevers AD, 2001. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C gram positive bacteria. *Genome Biol* 2(10):0044.1-17

van Pittius NC, Warren RM, van Helden PD, 2002. ESAT-6 and CFP-10: What is the diagnosis? Letter to the Editor. *Infect Immun* 70 (11): 6509-6511

Van Regenmortel MHV, 1989. The concept and operational definition of protein epitopes. *Phil Trans R Soc Lond* 323: 451-466.

Weimar DB, Kennedy RC, 1999. Genetic Vaccines. *Scientific Am.* July 1999: 34-41.

WHO, 2000. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2000. Geneva

Widjajanti A., 1990. Perbandingan nilai diagnostik uji Elisa makro dan ELISA mikro untuk diagnosis tuberkulosis paru. Surabaya, Indonesia: Universitas Airangga.pp:94-97. Karya akhir.

Worthington J, Morgan K., 1994. Epitope mapping using synthetic peptides. Peptide antigens. A practical approach. Edited by Wisdom GB. IRL Press at Oxford University Press. Oxford New York Tokyo, pp 181-217.

Lampiran 1

Tabel 1. Sikuen asam amino dari peptida yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* dengan sera subyek penderita TB, subyek normal dan perawat sehat.

No Sampel	Peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i> dengan sera subyek penderita TB	Peptida yang memberikan sera absorbensi di atas <i>cut-off value</i> dengan sera subyek normal	Peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i> dengan sera perawat sehat
1	EQQWNFAGI (3) IEAAASAIQ (11) EAAASAIQG (12) ASAIQGNVT (15) SAIQGNVTS (16) NVTSHSLL (21) VTSIHSLLD (22) SHSLLDEG (24)	MTEQQWNFA (1) EQQWNFAGI (3) NFAGIEAAA (7) AAASAIQGN (13) GNVTSIHSL (20) NVTSHSLL (21)	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) AIQGNVTSI (17) GNVTSIHSL (20) NVTSHSLL (21) VTSIHSLLD (22) TSHSLLDE (23) HSLLDDEGK (25)
2	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) WNFAGIEAA (6) NFAGIEAAA (7) FAGIEAAAS (8) AGIEAAASA (9) SAIQGNVTS (16) AIQGNVTSI (17) IQGNVTSIH (18) GNVTSIHSL (20) SHSLLDEG (24) HSLLDDEGK (25)	FAGIEAAAS (8) ASAIQGNVT (15) SAIQGNVTS (16) AIQGNVTSI (17) QGNVTSIHS (19) GNVTSIHSL (20) NVTSHSLL (21) VTSIHSLLD (22)	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) NFAGIEAAA (7) FAGIEAAAS (8) AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) IEAAASAIQ (11) EAAASAIQG (12) NVTSHSLL (21) TSHSLLDE (23) SHSLLDEG (24) HSLLDDEGK (25) HSLLDDEGKQ (26)
3	QQWNFAGIE (4) AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) IEAAASAIQ (11) SAIQGNVTS (16)	QWNFAGIEA (5) WNFAGIEAA (6) NFAGIEAAA (7) FAGIEAAAS (8) GIEAAASAI (10) IEAAASAIQ (11) EAAASAIQG (12) GNVTSIHSL (20) HSLLDDEGKQ (26)	MTEQQWNFA (2) EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) WNFAGIEAA (6) NFAGIEAAA (7) FAGIEAAAS (8) AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) NVTSHSLL (21) HSLLDDEGK (25) HSLLDDEGKQ (26)

4.	EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) NFAGIEAAA (7) FAGIEAAAS (8) AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) IEAAASAIQ (11) EAAASAIQG (12) AAASAIQGN (13) AASAIQGNV (14) QGNVTSIHS (19) GNVTSIHS (20) NVTSHSLL (21) VTSIHSLLD (22) TSHSLLDE (23) IHSLLDEGK (25) HSLLEDEGKQ (26) SLLDEGKQS (27)	EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) WNFAGIEAA (6) NVTSHSLL (21)	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) EQQWNFAGI (3) QWNFAGIEA (5) NFAGIEAAA (7) AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) IEAAASAIQ (11) AAASAIQGN (13) ASAIQGNVT (15) SAIQGNVTS (16) AIQGNVTSI (17) IQGNVTSIH (18) QGNVTSIHS (19) GNVTSIHS (20) IHSLLDEGK (25) HSLLEDEGKQ (26) SLLDEGKQS (27)
5.	QWNFAGIEA (5) NFAGIEAAA (7) FAGIEAAAS (8) AGIEAAASA (9) AASAIQGNV (14) AIQGNVTSI (17) IQGNVTSIH (18)	EQQWNFAGI (3) QWNFAGIEA (5) SAIQGNVTS (16) IQGNVTSIH (18) SHSLLDEG (24) IHSLLDEGK (25)	TEQQWNFAG (2) EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) IEAAASAIQ (11) EAAASAIQG (12) HSLLEDEGKQ (26)
6.	QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) IEAAASAIQ (11) EAAASAIQG (12) AAASAIQGN (13) ASAIQGNVT (15) VTSIHSLLD (22) IHSLLDEGK (25)	EAAASAIQG (12) AAASAIQGN (13) AIQGNVTSI (17) IQGNVTSIH (18) QGNVTSIHS (19) GNVTSIHS (20) NVTSHSLL (21)	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) WNFAGIEAA (6) NFAGIEAAA (7) AGIEAAASA (9) IEAAASAIQ (11) SAIQGNVTS (16) AIQGNVTSI (17) IQGNVTSIH (18)
7.	TEQQWNFAG (2) WNFAGIEAA (6) NFAGIEAAA (7) AIQGNVTSI (17) GNVTSIHS (20) NVTSHSLL (21) VTSIHSLLD (22) TSHSLLDE (23) SHSLLDEG (24)	QWNFAGIEA (5) AIQGNVTSI (17)	QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) WNFAGIEAA (6) NFAGIEAAA (7) FAGIEAAAS (8) AGIEAAASA (9) EAAASAIQG (12) AAASAIQGN (13) ASAIQGNVT (15) SAIQGNVTS (16)

8	MTEQQWNFA (1) AGIEAAASA (9) SAIQGNVTS (16)	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) AGIEAAASA (9) AIQGNVTSI (17) IHSLLEDEGK (25)	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) EQQWNFAGI (3) QWNFAGIEA (5) NFAGIEAAA (7) AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) IEAAASAIQ (11) EAAASAIQG (12) AAASAIQGN (13) SAIQGNVTS (16) AIQGNVTSI (17) NVTSHSLL (21) VTSIHSLLD (22) TSHSLLDE (23) SHSLLDEG (24)
9	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) WNFAGIEAA (6) NFAGIEAAA (7) AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) IEAAASAIQ (11) EAAASAIQG (12) AAASAIQGN (13) AASAIQGNV (14) ASAIQGNVT (15) SAIQGNVTS (16) AIQGNVTSI (17) QGNVTSIHS (19) GNVTSIHSL (20) NVTSHSLL (21) VTSIHSLLD (22) SIHSLLEDEG (24) IHSLLEDEGK (25)	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) AGIEAAASA (10) GIEAAASAI (11) AIQGNVTSI (17) IQGNVTSIH (18) SHSLLDEG (24) IHSLLEDEGK (25) HSLLEDEGKQ (26)	WNFAGIEAA (6) FAGIEAAAS (8) SAIQGNVTS (16) IQGNVTSIH (18) VTSIHSLLD (22) SHSLLDEG (24) HSLLEDEGKQ (26)
10.	EQQWNFAGI (3) AIQGNVTSI (17) GNVTSIHSL (20) NVTSHSLL (21) VTSIHSLLD (22) TSHSLLDE (23) SHSLLDEG (24) IHSLLEDEGK (25) HSLLEDEGKQ (26)	QWNFAGIEA (5) WNFAGIEAA (6) NFAGIEAAA (7) NVTSHSLL (21)	AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) QGNVTSIHS (19) SHSLLDEG (24) IHSLLEDEGK (25)

Lampiran 2

Tabel 2. Pengelompokan sikuen asam amino dari peptida yang memberikan absorbensi di atas *cut-off value* dengan sera subyek penderita TB, subyek normal dan perawat sehat.

No Sampel	Peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i> dengan sera subyek penderita TB	Peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i> dengan sera subyek normal	Peptida yang memberikan absorbensi di atas <i>cut-off value</i> dengan sera perawat sehat
1.	EQQWNFAGI (3) EAAASAIQ (11,12) SAIQGNVT (15,16) VTSIHSL (21,22) SIHSLLEDEG (24)	MTEQQWNFA (1) EQQWNFAGI (3) NFAGIEAAA (7) AAASAIQGN (13) NVTSIHSL (20,21)	EQQWNFA (1,2,3) QWNFAGIF (4,5) GIEAAASA (9,10) AIQGNVTSI (17) NVTSIHSL (20,21) TSHSLLD (22,23) IHSLLEDEGK (25)
2.	EQQWNFA (1,2,3) WNFAGIE (4,5,6) AGIEAAA (7,8,9) IQGNVTS (16,17,18) GNVTSIHSL (20) IHSLLEDEG (24,25)	FAGIEAAAS (8) SAIQGNVT (15,16) AIQGNVTSI (17) GNVTSIHS (19,20) VTSIHSL (21,22)	EQQWNFA (1,2,3) QWNFAGIE (4,5) AGIEAAA (7,8,9) EAAASAI (10,11,12) NVTSIHSL (21) SIHSLLEDE (23,24) HSLLEDEGK (25,26)
3.	QQWNFAGIE (4) IEAAASA (9,10,11) SAIQGNVTS (16)	WNFAGIEA (5,6) FAGIEAAA (7,8) IEAAASAI (10,11) EAAASAIQG (12) GNVTSIHSL (20) HSLLEDEGKQ (26)	TEQQWNFA (2,3) WNFAGIE (4,5,6) FAGIEAAA (7,8) GIEAAASA (9,10) NVTSIHSL (21) HSLLEDEGK (25,26)
4.	QWNFAGI (3,4,5) AGIEAAA (7,8,9) EAAASAI (10,11,12) AASAIQGN (13,14) NVTSIHS (19,20,21) TSHSLLD (22,23) SLLDEGK (25,26,27)	QQWNFAGI (3,4) WNFAGIEA (5,6) NVTSIHSL (21)	EQQWNFA (1,2,3) QWNFAGIEA (5) NFAGIEAAA (7) IEAAASA (9,10,11) AAASAIQGN (13) AIQGNVT (15,16,17) GNVTSIH (18,19,20) SLLDEGK (25,26,27)
5.	QWNFAGIEA (5) AGIEAAA (7,8,9) AASAIQGNV (14) IQGNVTSI (17,18)	EQQWNFAGI (3) QWNFAGIEA (5) SAIQGNVTS (16) IQGNVTSIH (18) IHSLLEDEG (24,25)	EQQWNFAG (2,3) QWNFAGIE (4,5) GIFAAASA (9,10) EAAASAIQ (11,12) HSLLDEGKQ (26)
6.	QWNFAGIE (4,5) AAASAIQ (11,12,13) ASAIQGNVT (15) VTSIHSLLD (22) IHSLLEDEGK (25)	EAAASAIQG (12) AAASAIQGN (13) IQGNVTSI (17,18) GNVTSIHS (19,20) NVTSIHSL (21)	TEQQWNFA (1,2) QWNFAGIE (4,5) NFAGIEAA (6,7) AGIEAAASA (9) IEAAASAIQ (11) IQGNVTS (16,17,18)

7.	TEQQWNFAG (2) NFAGIEAA (6,7) AIQGNVTSI (17) NVTSIHSL (20,21) SIHSLLD (22,23,24)	QWNFAGIEA (5) AIQGNVTSI (17)	WNFAGIE (4,5,6) AGIEAAA (7,8,9) AAASAIQG (12,13) SAIQGNVT (15,16)
8.	MTEQQWNFA (1) AGIEAAASA (9) SAIQGNVTS (16)	TEQQWNFA (1,2) QWNFAGIE (4,5) AGIEAAASA (9) AIQGNVTSI (17) HSLLDDEGK (25)	EQQWNFA (1,2,3) QWNFAGIEA (5) NFAGIEAAA (7) GIEAAASA (9,10) AAASAIQ (11,12,13) AIQGNVTS (16,17) VTSIHSL (21,22) SIHSLLE (23,24)
9.	EQQWNFA (1,2,3) QWNFAGIE (4,5) NFAGIEAA (6,7) IEAAASA (9,10,11) AASAIQG (12,13,14) AIQGNVT (15,16,17) NVTSIHS (19,20,21) VTSIHSLD (22) IHSLLEDEG (24,25)	TEQQWNFA (1,2) QWNFAGIE (4,5) GIEAAASA (10,11) IQGNVTSI (17,18) IHSLLEDEG (24,25) HSLLEDEGK (26)	WNFAGIEAA (6) FAGIEAAAS (8) SAIQGNVTS (16) IQGNVTSIH (18) VTSIHSLD (22) SIHSLLEDEG (24) HSLLEDEGK (26)
10.	EQQWNFAGI (3) AIQGNVTSI (17) NVTSIHSL (20,21) SIHSLLD (22,23,24) HSLLEDEGK (25,26)	WNFAGIEA (5,6) NFAGIEAAA (7) NVTSIHSL (21)	GIEAAASA (9,10) QGNVTSIHS (19) IHSLLEDEG (24,25)

Lampiran 3

Tabel 3. Sikuen asam amino dari peptida yang memberikan absorbensi amat reaktif (>10%) dengan sera subyek penderita TB, subyek normal dan perawat sehat.

No Sampel	Peptida yang memberikan absorbensi amat reaktif (>10%) dengan sera subyek penderita TB	Peptida yang memberikan sera amat reaktif (>10%) dengan sera subyek normal	Peptida yang memberikan absorbensi amat reaktif (>10%) dengan sera perawat sehat
1	SAIQGNVTS (16) NVTSIHSL (21)	MTEQQWNFA (1) GNVTSIHSL (20) NVTSIHSL (21)	MTEQQWNFA (1) QQWNFAGIE (4) AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) AIQGNVTSI (17) NVTSIHSL (21)
2	EQQWNFAGI (3) WNFAGIEAA (6) FAGIEAAAS (8) AGIEAAASA (9) IQGNVTSIH (18) GNVTSIHSL (20) IHSLLEDEGK (25)	GNVTSIHSL (20) NVTSIHSL (21)	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) EQQWNFAGI (3) QWNFAGIEA (5) AGIEAAASA (9) EAAASAIQG (12) TSIHSLLEDE (23) SIHSLLEDEG (24) IHSLLEDEGK (25)
3	QQWNFAGIE (4)	QWNFAGIEA (5) GIEAAASAI (10)	MTEQQWNFA (2) EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) NFAGIEAAA (7) FAGIEAAAS (8) AGIEAAASA (9)
4	QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) NFAGIEAAA (7) FAGIEAAAS (8) AGIEAAASA (9) GIEAAASAI (10) GNVTSIHSL (20) VTSIHSLD (22) TSIHSLLEDE (23) IHSLLEDEGK (25) HSLLEDEGKQ (26)	EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) NVTSIHSL (21)	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) EQQWNFAGI (3) QWNFAGIEA (5) AGIEAAASA (9) AIQGNVTSI (17)
5	NFAGIEAAA (7) FAGIEAAAS (8)	SAIQGNVTS (16) SIHSLLEDEG (24) IHSLLEDEGK (25)	QWNFAGIEA (5) AGIEAAASA (9)

6.	IEAAASAIQ (11) AAASAIQGN (13) VTSIHSLLD (22)	EAAASAIQG (12) IQGNVTSIH (18) QGNVTSIHS (19) NVTSIHSLL (21)	QWNFAGIEA (5) WNFAGIEAA (6) NFAGIEAAA (7) IEAAASAIQ (11) IQGNVTSIH (18)
7.	TEQQWNFAG (2) AIQGNVTSI (17) NVTSIHSLL (21) TSHSLLDE (23) SIHSLLDEG (24)	AIQGNVTSI (17)	QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) NFAGIEAAA (7) AGIEAAASA (9) SAIQGNVTS (16)
8.	MTEQQWNFA (1) AGIEAAASA (9) SAIQGNVTS (16)	AGIEAAASA (9) AIQGNVTSI (17)	MTEQQWNFA (1) TEQQWNFAG (2) EQQWNFAGI (3) NFAGIEAAA (7) AGIEAAASA (9) EAAASAIQG (12) AIQGNVTSI (17) SIHSLLDEG (24)
9.	EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) QWNFAGIEA (5) NFAGIEAAA (7) IEAAASAIQ (11) AAASAIQGN (13) VTSIHSLLD (22)	QWNFAGIEA (5) AIQGNVTSI (17) IHSLLDEGK (25)	WNFAGIEAA (6)
10.	VTSIHSLLD (22) IHSLLDEGK (25) HLLDEGKQ (26)	QWNFAGIEA (5) WNFAGIEAA (6) NFAGIEAAA (7) NVTSIHSLL (21)	QGNVTSIHS (19)

Lampiran 4

Tabel 4. Pengelompokan sikuen asam amino dari peptida yang memberikan absorbensi amat reaktif (>10%) dengan sera subyek penderita TB, subyek normal dan perawat sehat.

No Sampel	Peptida yang memberikan absorbensi amat reaktif (>10%) dengan sera subyek penderita TB	Peptida yang memberikan sera amat reaktif (>10%) dengan sera subyek normal	Peptida yang memberikan absorbensi amat reaktif (>10%) dengan sera perawat sehat
1	SAIQGNVTS (16) NVTSIHSL (21)	MTEQQWNFA (1) NVTSIHSL (20,21)	MTEQQWNFA (1) QQWNFAGIE (4) GIEAAASA (9,10) AIQGNVTSI (17) NVTSIHSL (21)
2	EQQWNFAGI (3) WNFAGIEAA (6) AGIEAAAS (8,9) IQGNVTSIH (18) GNVTSIHSL (20) IHSLLEDEGK (25)	NVTSIHSL (20,21)	EQQWNFA (1,2,3) QWNFAGIEA (5) AGIEAAASA (9) EAAASAIQG (12) IHSLLEDE (23,24,25)
3	QQWNFAGIE (4)	QWNFAGIEA (5) GIEAAASAI (10)	EQQWNFAG (2,3) QWNFAGIE (4,5) NFAGIEAAA (7) FAGIEAAAS (8) AGIEAAASA (9)
4	QWNFAGIE (4,5) FAGIEAAA (7,8) GIEAAASA (9,10) GNVTSIHSL (20) TSIHSLIJD (22,23) HSLLEDEGK (25,26)	EQQWNFAGI (3) QQWNFAGIE (4) NVTSIHSL (21)	EQQWNFA (1,2,3) QWNFAGIEA (5) AGIEAAASA (9) AIQGNVTSI (17)
5	FAGIEAAA (7,8)	SAIQGNVTS (16) SIHSLLEDEG (24) IHSLLEDEGK (25)	QWNFAGIEA (5) AGIEAAASA (9)
6	IEAAASAIQ (11) AAASAIQGN (13) VTSIHSLD (22)	EAAASAIQG (12) IQGNVTSIH (18) QGNVTSIHS (19) NVTSIHSL (21)	NFAGIEA (5,6,7) IEAAASAIQ (11) IQGNVTSIH (18)
7	TEQQWNFAG (2) AIQGNVTSI (17) NVTSIHSL (21) SIHSLLEDE (23,24)	AIQGNVTSI (17)	QWNFAGIE (4,5) NFAGIEAAA (7) AGIEAAASA (9) SAIQGNVTS (16)

8	MTEQQWNFA (1) AGIEAAASA (9) SAIQGNVTS (16)	AGIEAAASA (9) AIQGNVTSI (17)	EQQWNFA (1,2,3) NFAGIEAAA (7) AGIEAAASA (9) EAAASAIQG (12) AIQGNVTSI (17) SIHSLLEDEG (24)
9	EQQWNFAGI (3) QWNFAGIE (4,5) NFAGIEAAA (7) TEAAASAIQ (11) AAASAIQGN (13) VTSIHSLLD (22)	QWNFAGIEA (5) AIQGNVTSI (17) IHSLLEDEGK (25)	WNFAGIEAA (6)
10.	VTSIHSLLD (22) HSLLEDEGK (25,26)	QWNFAGIEA (5) WNFAGIEAA (6) NFAGIEAAA (7) NVTSIHSLLD (21)	QGNVTSIHS (19)

Lampiran 5

Perhitungan uji proporsi (uji Z) yang menggunakan rumus Sudjana (1992) dengan derajat kemaknaan = 0,05 dan Z tabel = 1,96

$$Z = \frac{\frac{x_1}{n_1} - \frac{x_2}{n_2}}{\sqrt{pq \left\{ \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right] \right\}}}$$

$$p = \frac{x_1}{n_1} - \frac{x_2}{n_2}$$

$$q = 1 - p$$

Perbandingan frekuensi epitop kelompok sera subyek penderita TB dan subyek normal yang antibodinya memberikan absorbensi di atas *cut-off value*.

1. EQQWNFA

$$p = \frac{5 + 6}{10 + 10} = \frac{11}{20} = 0,55$$

$$q = 0,45$$

$$Z = \frac{\frac{1}{10}}{\sqrt{0,55 \cdot 0,45 \cdot 0,2}} = \frac{0,1}{\sqrt{0,0495}} = \frac{0,1}{0,22248} = 0,44947$$

2. WNFAGIE

$$p = \frac{8 + 6}{20} = \frac{14}{20} = 0,7$$

$$q = 0,3$$

$$Z = \frac{\frac{2}{10}}{\sqrt{0,7 \cdot 0,3 \cdot 0,2}} = \frac{0,2}{\sqrt{0,042}} = \frac{0,2}{0,20493} = 0,975$$

3. AGIEAA

$$p = \frac{11}{20} = 0,55 \quad q = 0,45$$

$$Z = \frac{0,1}{\sqrt{0,0495}} = 0,449$$

4. EAAASA

$$p = \frac{8}{20} = 0,4 \quad q = 0,6$$

$$Z = 0$$

5. AAASAIQ

$$p = \frac{6}{20} = \frac{3}{10} = 0,3 \quad q = 0,7$$

$$Z = \frac{\frac{2}{10}}{\sqrt{0,3 \cdot 0,7 \cdot 0,2}} = 0,975$$

6. AIQGNVT

$$p = \frac{9}{20} = 0,45 \quad q = 0,55$$

$$Z = \frac{\frac{1}{10}}{\sqrt{0,45 \cdot 0,55 \cdot 0,2}} = \frac{0,1}{\sqrt{0,0495}} = \frac{0,1}{0,22248} = 0,4494$$

7. IQGNVTS

$$p = \frac{7}{20} = 0,35 \quad q = 0,65$$

$$Z = \frac{\frac{1}{10}}{\sqrt{0,35 \cdot 0,65 \cdot 0,2}} = 0,468$$

8. NVTSIH

$$p = \frac{12}{20} = 0,6 \quad q = 0,4$$

$$Z = \frac{\frac{2}{10}}{\sqrt{0,6 \cdot 0,4 \cdot 0,2}} = \frac{0,2}{\sqrt{0,048}} = 0,9129$$

9. VTSIHSL

$$p = \frac{4}{20} = 0,2 \quad q = 0,8$$

$$Z = \frac{\frac{2}{10}}{\sqrt{0,2 \cdot 0,8 \cdot 0,2}} = \frac{0,2}{\sqrt{0,032}} = 1,12359$$

10. IHSLLD

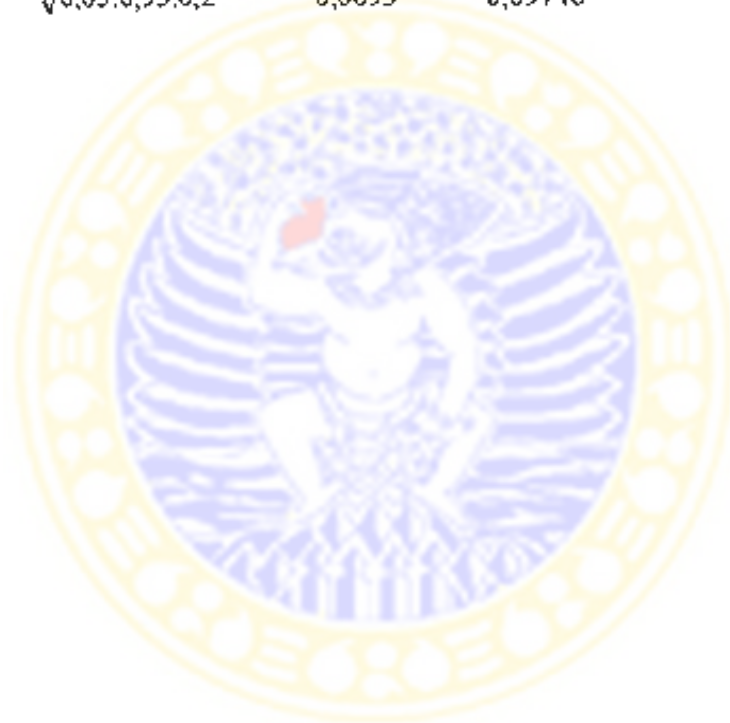
$$p = \frac{9}{20} = 0,45 \quad q = 0,55$$

$$Z = \frac{5}{\sqrt{0,45 \cdot 0,55 \cdot 0,2}} = \frac{0,5}{\sqrt{0,0495}} = \frac{0,5}{\sqrt{0,22248}} = 2,247939$$

11. SLLDEGK

$$p = \frac{1}{20} = 0,05 \quad q = 0,95$$

$$Z = \frac{\frac{1}{10}}{\sqrt{0,05 \cdot 0,95 \cdot 0,2}} = \frac{0,1}{0,0095} = \frac{0,1}{0,09746} = 1,02606$$



Lampiran 6

Perbandingan frekuensi epitop kelompok sera subyek perawat sehat dan penderita TB paru aktif.

1. EQQWNFA

$$p = \frac{6 + 7}{10 + 10} = \frac{13}{20} = 0,65$$

$$q = 1 - 0,65 = 0,35$$

$$Z = \frac{-\frac{1}{10} - 0,1}{\sqrt{0,65 \cdot 0,35 \cdot 0,2}} = \frac{-0,1}{0,2133} = -0,468$$

2. WNFAGIE

$$p = \frac{6 + 9}{10 + 10} = 0,75$$

$$q = 0,25$$

$$Z = \frac{0,10}{\sqrt{0,75 \cdot 0,25 \cdot 0,2}} = 0,516$$

3. AGIEAA

$$p = 0,65$$

$$q = 0,35$$

$$Z = \frac{-\frac{1}{10} - 0,1}{\sqrt{0,65 \cdot 0,35 \cdot 0,2}} = \frac{-0,1}{0,2133} = -0,468$$

4. EAAASA

$$p = \frac{4 + 9}{20} = 0,65$$

$$q = 0,35$$

$$Z = \frac{0,5}{\sqrt{0,65 \cdot 0,35 \cdot 0,2}} = 2,344$$

5. AAASAIQ

$$p = \frac{7}{20} = 0,35$$

$$q = 0,65$$

$$Z = \frac{+0,1}{\sqrt{0,35 \cdot 0,65 \cdot 0,2}} = \frac{+0,1}{0,26739} = +0,373$$

6. AIQGNVT

$$p = \frac{9}{20} = 0,45 \quad q = 0,55$$

$$Z = \frac{0,1}{\sqrt{0,45 \cdot 0,55 \cdot 0,2}} = \frac{0,1}{0,22248} = 0,449$$

7. IQGNVTS

$$p = 0,35 \quad q = 0,65$$

$$Z = \frac{0,1}{\sqrt{0,35 \cdot 0,65 \cdot 0,2}} = 0,373$$

8. NVTSIH

$$p = 0,5 \quad q = 0,5$$

$$Z = \frac{0}{\sqrt{\quad}} = 0$$

9. VTSIHSI.

$$p = 0,25 \quad q = 0,75$$

$$Z = \frac{0,1}{\sqrt{0,25 \cdot 0,75 \cdot 0,2}} = \frac{0,1}{0,1936} = 0,516$$

10. IHSLLD

$$p = 0,65 \quad q = 0,35$$

$$Z = \frac{0,1}{\sqrt{0,65 \cdot 0,35 \cdot 0,2}} = \frac{0,1}{0,26739} = 0,373$$

11. SLLDEGK

$$p = 0,35 \quad q = 0,65$$

$$Z = \frac{-0,3}{\sqrt{0,35 \cdot 0,65 \cdot 0,2}} = \frac{-0,3}{0,213} = -1,4084$$

Lampiran 7

Hasil analisis subyek penderita TB paru aktif yang diuji dengan ELISA

Serum TB	Pep-1	Pep-2	pep-3	pep-4	pep-5	pep-6	pep-7	pep-8	pep-9
No.	M	T	E	Q	Q	W	N	F	A
1	0,451	0,637	0,77	0,617	0,598	0,419	0,703	0,71	0,725
2	0,572	0,578	0,692	0,599	0,578	0,631	0,58	0,648	0,633
3	0,412	0,373	0,407	0,638	0,465	0,434	0,363	0,442	0,492
4	0,244	0,286	0,298	0,344	0,388	0,278	0,329	0,339	0,4
5	0,304	0,299	0,284	0,327	0,414	0,192	0,502	0,479	0,448
6	0,357	0,294	0,306	0,379	0,39	0,332	0,354	0,301	0,357
7	0,497	0,607	0,503	0,527	0,494	0,557	0,554	0,512	0,485
8	0,77	0,542	0,472	0,499	0,568	0,386	0,417	0,544	0,686
9	0,717	0,733	0,806	0,809	0,793	0,784	0,782	0,691	0,764
10	0,476	0,498	0,55	0,475	0,485	0,509	0,5	0,485	0,453
	pep-10	pep-11	pep-12	pep-13	pep-14	pep-15	pep-16	pep-17	pep-18
No.	G	I	E	A	A	A	S	A	I
1	0,705	0,82	0,793	0,623	0,535	0,767	0,873	0,698	0,708
2	0,542	0,496	0,465	0,461	0,429	0,45	0,565	0,547	0,61
3	0,489	0,497	0,259	0,256	0,456	0,424	0,474	0,447	0,42
4	0,404	0,314	0,31	0,31	0,308	0,257	0,297	0,251	0,33
5	0,368	0,393	0,354	0,364	0,414	0,368	0,397	0,448	0,436
6	0,346	0,407	0,393	0,426	0,339	0,382	0,324	0,332	0,327
7	0,46	0,457	0,482	0,473	0,457	0,46	0,479	0,624	0,494
8	0,454	0,422	0,584	0,376	0,482	0,528	0,748	0,489	0,352
9	0,754	0,778	0,747	0,782	0,717	0,74	0,712	0,712	0,703
10	0,464	0,465	0,473	0,46	0,423	0,415	0,461	0,576	0,408
	pep-19	pep-20	pep-21	pep-22	pep-23	pep-24	pep-25	pep-26	pep-27
No.	Q	G	N	V	T	S	I	H	S
1	0,43	0,698	0,858	0,82	0,723	0,762	0,521	0,499	0,473
2	0,474	0,613	0,55	0,457	0,512	0,533	0,684	0,466	0,503
3	0,395	0,271	0,291	0,225	0,336	0,383	0,398	0,499	0,473
4	0,295	0,324	0,308	0,375	0,333	0,258	0,346	0,351	0,319
5	0,329	0,407	0,38	0,391	0,35	0,348	0,382	0,321	0,404
6	0,319	0,297	0,301	0,552	0,324	0,302	0,39	0,352	0,317
7	0,228	0,55	0,597	0,547	0,616	0,636	0,503	0,385	0,506
8	0,418	0,392	0,44	0,405	0,342	0,364	0,363	0,352	0,427
9	0,749	0,738	0,73	0,785	0,674	0,735	0,752	0,684	0,693
10	0,44	0,542	0,544	0,608	0,572	0,55	0,702	0,586	0,439

Lampiran 8

Hasil analisis subyek normal yang diuji dengan ELISA

Serum No.	Pep-1 M	Pep-2 T	pep-3 E	pep-4 Q	pep-5 Q	pep-6 W	pep-7 N	pep-8 F	pep-9 A
1	0,439	0,319	0,431	0,37	0,358	0,277	0,399	0,309	0,384
2	0,289	0,175	0,279	0,31	0,327	0,295	0,258	0,333	0,251
3	0,213	0,219	0,296	0,29	0,346	0,296	0,305	0,301	0,279
4	0,394	0,288	0,451	0,456	0,425	0,418	0,389	0,187	0,406
5	0,083	0,043	0,08	0,076	0,093	0,074	0,077	0,082	0,085
6	0,17	0,145	0,192	0,134	0,138	0,15	0,142	0,158	0,179
7	0,088	0,085	0,057	0,062	0,095	0,068	0,057	0,071	0,058
8	0,212	0,215	0,181	0,212	0,226	0,185	0,163	0,144	0,25
9	0,689	0,639	0,536	0,669	0,675	0,517	0,582	0,562	0,545
10	0,264	0,27	0,23	0,282	0,362	0,337	0,338	0,294	0,256

No.	pep-10 G	pep-11 I	pep-12 E	pep-13 A	pep-14 A	pep-15 A	pep-16 S	pep-17 A	pep-18 I
1	0,362	0,341	0,381	0,434	0,301	0,217	0,299	0,37	0,389
2	0,273	0,22	0,264	0,31	0,325	0,333	0,343	0,347	0,324
3	0,366	0,296	0,296	0,268	0,197	0,265	0,264	0,266	0,23
4	0,323	0,335	0,394	0,273	0,299	0,286	0,324	0,176	0,274
5	0,079	0,08	0,072	0,059	0,074	0,078	0,103	0,079	0,088
6	0,16	0,187	0,249	0,225	0,189	0,15	0,172	0,22	0,237
7	0,072	0,089	0,041	0,053	0,032	0,082	0,048	0,141	0,058
8	0,186	0,2	0,157	0,187	0,141	0,138	0,152	0,259	0,201
9	0,618	0,622	0,5	0,527	0,493	0,428	0,609	0,607	0,647
10	0,271	0,274	0,243	0,245	0,228	0,213	0,187	0,251	0,243

No.	pep-19 Q	pep-20 G	pep-21 N	pep-22 V	pep-23 T	pep-24 S	pep-25 I	pep-26 H	pep-27 S
1	0,275	0,487	0,454	0,318	0,342	0,257	0,361	0,328	0,354
2	0,352	0,386	0,391	0,349	0,308	0,278	0,234	0,251	0,25
3	0,215	0,314	0,252	0,176	0,21	0,279	0,244	0,31	0,206
4	0,391	0,386	0,461	0,361	0,339	0,366	0,359	0,325	0,317
5	0,08	0,075	0,074	0,065	0,063	0,112	0,111	0,077	0,081
6	0,235	0,23	0,255	0,198	0,151	0,173	0,153	0,184	0,2
7	0,081	0,088	0,053	0,053	0,053	0,055	0,073	0,083	0,058
8	0,147	0,159	0,204	0,183	0,179	0,164	0,22	0,196	0,143
9	0,434	0,547	0,585	0,504	0,524	0,613	0,728	0,613	0,502
10	0,268	0,269	0,354	0,299	0,272	0,211	0,282	0,246	0,255

Lampiran 9

Hasil analisis subyek perawat sehat yang diuji dengan ELISA

	Pep-1	Pep-2	pep-3	pep-4	pep-5	pep-6	pep-7	pep-8	pep-9
No.	M	T	E	Q	Q	W	N	F	A
1	0,303	0,274	0,281	0,316	0,284	0,236	0,256	0,21	0,316
2	0,7	0,675	0,79	0,583	0,688	0,567	0,619	0,581	0,882
3	0,615	0,808	0,809	0,867	0,857	0,709	0,8	0,752	0,78
4	0,829	0,911	0,94	0,808	0,838	0,682	0,776	0,646	0,784
5	0,632	0,681	0,852	0,688	0,708	0,632	0,603	0,518	0,766
6	0,449	0,422	0,417	0,43	0,512	0,496	0,502	0,357	0,438
7	0,794	0,777	0,777	1,069	0,978	0,862	0,997	0,859	1,111
8	0,357	0,336	0,396	0,249	0,32	0,29	0,336	0,293	0,358
9	0,456	0,417	0,362	0,387	0,416	0,822	0,429	0,717	0,522
10	0,338	0,408	0,464	0,507	0,55	0,476	0,459	0,37	0,572

No.	pep-10	pep-11	pep-12	pep-13	pep-14	pep-15	pep-16	pep-17	pep-18
	G	I	E	A	A	A	S	A	I
1	0,297	0,23	0,248	0,252	0,248	0,229	0,25	0,297	0,236
2	0,623	0,59	0,681	0,532	0,506	0,538	0,518	0,463	0,523
3	0,691	0,811	0,587	0,615	0,537	0,615	0,658	0,829	0,587
4	0,724	0,737	0,642	0,691	0,59	0,678	0,691	0,781	0,766
5	0,696	0,694	0,652	0,61	0,549	0,541	0,59	0,625	0,538
6	0,417	0,466	0,409	0,358	0,326	0,349	0,437	0,435	0,481
7	0,93	0,829	0,906	0,866	0,838	0,895	1,006	0,655	0,67
8	0,313	0,328	0,423	0,309	0,281	0,285	0,322	0,339	0,287
9	0,384	0,612	0,413	0,44	0,488	0,556	0,726	0,434	0,736
10	0,56	0,498	0,488	0,44	0,393	0,436	0,424	0,551	0,533

	pep-19	pep-20	pep-21	pep-22	pep-23	pep-24	pep-25	pep-26	pep-27
	Q	G	N	V	T	S	I	H	S
1	0,233	0,262	0,298	0,281	0,26	0,249	0,261	0,245	0,238
2	0,449	0,558	0,625	0,492	0,644	0,638	0,629	0,621	0,508
3	0,552	0,561	0,682	0,627	0,645	0,675	0,709	0,719	0,682
4	0,716	0,724	0,711	0,708	0,669	0,657	0,789	0,749	0,686
5	0,544	0,61	0,509	0,418	0,441	0,529	0,563	0,64	0,575
6	0,382	0,372	0,396	0,365	0,364	0,396	0,395	0,407	0,306
7	0,625	0,657	0,748	0,652	0,7	0,757	0,746	0,679	0,611
8	0,282	0,275	0,317	0,316	0,313	0,337	0,301	0,251	0,283
9	0,334	0,603	0,466	0,714	0,669	0,713	0,644	0,717	0,522
10	0,701	0,508	0,545	0,461	0,481	0,582	0,575	0,501	0,518

Lampiran 10

Reagen yang digunakan dalam uji ELISA

1. Larutan PBS 0,1 M pH 7,2

13,425	g	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (Merck)
3,9	g	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (Merck)
85	g	NaCl
1	L	aquadest steril

2. Larutan *pre-coat buffer*

10	g	bovine serum albumin (BSA) (Sigma)
50	μl	tween 20 (Sigma)
500	ml	0,01M PBS pH 7,2

3. Larutan *conjugate diluent*

100	μl	tween 20 (Sigma)
0,1	g	sodium caseinate (USB) (Sigma)
100	ml	0,01M PBS pH 7,2

4. Larutan *buffer substrat*

17,8	g	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (Merck)
16,8	g	citric acid monohydrate (Ajax Chemical)
1	L	aquadest steril

6. Larutan substrat ABTS

500	ml	larutan <i>buffer substrat</i>
250	mg	3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonate] (ABTS) (Sigma, A-1888)


7. Larutan pembersih pin

2	L	0,01 M PBS pH 7,2
3	ml	2-mercaptoethanol (Merck)
20	g	sodium dodecyl sulphate (sigma)
300	ml	methanol (BDH)

Lampiran 11

Tabel 7. Daftar asam amino dan singkatannya (dikutip dari *Immunology, The Science of Self-Nonself Discrimination*. Jan Klein)

Asam Amino	Simbol tiga huruf	Simbol huruf tunggal
<i>Hydrophobic (Nonpolar)</i>		
Alanin	Ala	A
Valin	Val	V
Leusin	Leu	L
Isoleusin	Ile	I
Prolin	Pro	P
Fenilalanin	Phe	F
Triptofan	Trp	W
Methionine	Met	M
<i>Uncharged Polar</i>		
Glisin	Gly	G
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Cysteine	Cys	C
Tyrosine	Tyr	Y
Asparagin	Asn	N
Glutamin	Gln	Q
<i>Acidic</i>		
Asam aspartat	Asp	D
Asam glutamat	Glu	E
<i>Basic</i>		
Lisin	Lys	K
Arginin	Arg	R
Histidin	His	H

Lampiran 12: Sikuen asam amino dari antigen ESAT-6 *M. tuberculosis*


```

TB10.4: M G O I M Y N Y P A M I G H A G D M A U Y A Q T L Q S L G A
ESAT-6: H T E Q Q M D P A G I E A A A S A I Q Q N V T S I I S L L D
CFP10: M A E M K T D A A T L A Q E A G N F E R I S G D L K T O I D

TB10.4: E I A V E Q A A L Q S A W Q C D T G I T Y Q A M Q A Q W - -
ESAT-6: E G K Q S I T K L A A A W G G C G S E A T Q G V Q Q K W D A
CFP10: O V E S T A G S L O G Q W R C A A C T A A Q A A V V R F Q E

TB10.4: - - - - - N O A M E D L V R - - - - - A Y - - - - -
ESAT-6: T A T E L N N A L Q N L A R T I S E A G - - - - -
CFP10: A A N K Q K O E L D E I S T N I R Q A G V Q Y S R A D E E Q

TB10.4: - H A M G S T H E A N T M A M M A R D T A E A A K W G G .
ESAT-6: - Q A M A S T - E G N V T G K P A .
CFP10: O Q A L S S C - M G F .

```

FIG. 1. Alignment of the protein sequence of ESAT-6 with the two ESAT-6 family proteins TB10.4 and CFP10. Identical residues are marked by vertical lines.

LEMBAR INFORMASI

Judul Penelitian : Identifikasi epitop dari antigen ESAT-6 *Mycobacterium tuberculosis* yang dominan dalam patogenesis penyakit tuberkulosis paru aktif.

Peneliti : dr. Jusak Nugraha, MS, SpPK(K)

Alamat : Lab. Patologi Klinik FK Unair / RSUD Dr. Soetomo.

1. Tujuan dan latar belakang penelitian

Tuberkulosis paru merupakan penyakit yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis*. Diagnosis tuberkulosis paru aktif tidaklah selalu mudah ditegakkan dan memerlukan sarana canggih seperti foto rontgen paru, tes mantoux; biakan dahak dll. Untuk mendapatkan data dasar, epitop mana yang paling dominan pada diagnosis penyakit tuberkulosis paru aktif, maka diperlukan suatu penelitian pada penderita tuberkulosis paru di Indonesia. Dari hasil penelitian ini dapat dikembangkan menjadi suatu tes serologi yang spesifik dan sensitif untuk membantu menegakkan diagnosis tuberkulosis paru aktif.

2. Prosedur Penelitian

Untuk mendapatkan data tersebut akan dilakukan pengambilan darah sebanyak 5 cc dan pengambilan dahak (sputum) dari subyek TB dan non-TB di Surabaya.

3. Prosedur pengambilan dahak dan darah tidak akan menimbulkan resiko dan ketidaknyamanan pada subyek oleh karena tidak melakukan tindakan invasif.

4. Keikutsertaan dalam penelitian ini bersifat sukarela dan tanpa paksaan.

PERNYATAAN PERSETUJUAN

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama

Tempat lahir :

Umur :

Jenis kelamin :

No. Register :

Alamat :

Tujuan dari penelitian ini untuk identifikasi epitop dari antigen ESAT-6 *m.tuberculosis* yang dominan dalam patogenesis penyakit tuberkulosis paru.

Prosedur yang dilakukan adalah mengambil dahak dan darah dari subyek TB dan non-TB di Surabaya.

Sebagai penutup, saya telah membaca/dibacakan penjelasan pada lembar informasi diatas dan saya telah diberi kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan telah diberi jawaban yang memuaskan.

Dengan ini saya menyatakan secara sukarela untuk ikut sebagai subyek dalam penelitian ini. Dan saya tahu bahwa saya berhak untuk mengundurkan diri dari penelitian setiap waktu tanpa mempengaruhi perawatan medik saya selanjutnya.

Peneliti
Surabaya, 2002
Subyek penelitian

(Jusak Nugraha, dr, MS, SpPK)

()

Saksi

(Orang tua / Wali
(bagi yang berumur kurang dari 21 tahun)

()

()



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN
 JURUSAN ILMU KEDOKTERAN DASAR KLINIK
 LABORATORIUM PATOLOGI KLINIK

Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 6-8 Surabaya Telp. 5020089-5020079-5020062 Ps. 245

Telgr. : FDOK
 UNAIR
 Kode Pos : 60286

Surabaya, 11 Desember 2001

Kepada Yth.
 Kepala SMF/Lab.
 Ilmu Penyakit Paru
 RSUD Dr. Soetomo / FK Unair
 Surabaya

Dengan hormat,

Sehubungan dengan rencana penelitian kami yang berjudul "Urutan asam amino dari epitop regio N-terminus antigen ESAT-6 sebagai marka diagnostik penyakit tuberkulosis paru aktif", maka bersama ini kami mohon izin dan perkenan untuk dapat mengambil sampel di bagian Ilmu Penyakit Paru.

Atas bantuan, perkenan dan izinnya kami menyampaikan banyak terima kasih.

Hormat kami,

Jusak Nugraha, dr. MS
 NIM. 099813119D

Mengetahui,

Kapalok Patologi Klinik



Tembusan

- Dekan FK Unair
- Direktur Pasca Sarjana Unair

11/12/01
 130350714 - surat perkenan
 01/12
 izin sendiri sebagai bagian dari
 penelitian
 Edianto



**PANITIA KELAIKAN ETIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA**

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

No. 44/Panke.KKE/2001

PANITIA KELAIKAN ETIK FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA - RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

" Urutan Asam Amino Dari Epitop Regio
N - Terminus Antigen Esat - 6 Sebagai Marka
Diagnostik Penyakit Tuberkolosis Paru Aktif "

PENELITI UTAMA : dr. Jusak Nugraha

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN : RSUD Dr. Soetomo Surabaya

DINYATAKAN LAJK ETIK.

SURABAYA, 15 NOV 2001

KETUA I

(Prof.dr. H.B Hariadi, SpOGy-KEM)



PEMERINTAH PROPINSI JAWA TIMUR
RUMAH SAKIT UMUM DAERAH Dr. SOETOMO
JL. MAYJEN. PROF. Dr. MOESTOPO NO. 6 - 8 TELP. (031) 5501011 - 5501012
SURABAYA

130

29 509 2001

Nomor : 070/4384/308.3.XL/2001
Sifat :
Lamp. : 2 (dua) lembar keterangan
Kelaikan etik.
Hal. : Ethical Clearance

Kepada Yth.
Ass. Direktur Bidang Akademik
Program Pascasarjana UNAIR
Surabaya.

Selubungan dengan permintaan Ass. Direktur Bidang Akademik Program Pascasarjana UNAIR Surabaya tanggal 2 Oktober 2001 nomor : 3089 /103.4/PP/2001 perihal permohonan izin untuk penelitian dengan judul :

*" Urutan Asam Amino Dari Epitop Region N-Terminus
Antigen Esat - 6 Sebagai Marka Diagnostik
Penyakit Tuberkulosis Paru Aktif "*

dengan ini diberitahukan bahwa rancangan penelitian diatas oleh Panitia Kelaikan Etik RSUD Dr. Soetomo Surabaya dinyatakan LAIK ETIK dan kami mengizinkan kepada yang bersangkutan (Peneliti Utama) untuk melakukan / melaksanakan penelitian dengan syarat :

1. Tidak ada biaya tambahan yang dibebankan kepada pasien maupun pihak RSUD DR. Soetomo Surabaya.
2. Sebelum pelaksanaan penelitian, yang bersangkutan (Peneliti Utama) harap menghubungi Bidang LITBANG RSUD DR. Soetomo Surabaya.
3. 2 (dua) lembar sertifikat kelaikan etik dimaksud dapat diambil di Bidang LITBANG RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
1 (satu) lembar sertifikat asli untuk peneliti utama, sedangkan 1 (satu) lembar sertifikat sebagai turunannya untuk Ass. Direktur Bid. Akademik Program Pascasarjana FK UNAIR Surabaya

Atas perhatian Ass. Direktur Bidang Akademik Program Pascasarjana UNAIR Surabaya, kami sampaikan terima kasih.



A.n Direktur
Bidang Pendidikan & Penelitian,

Hatelan
Dr. Fatchur Rochman, SpRM (K)
NIP. 140 087 354

Tembusan : kepada Yth.

- Dekan Fakultas Kedokteran UNAIR Surabaya
- Direktur RSUD Dr. Soetomo Surabaya
- Ketua Pan. Kelaikan Etik RSUD Dr. Soetomo
- Kepala Bidang LITBANG RSUD Dr. Soetomo
- Dr. Jusak Nugraha, Peserta Program Doktor
Program Studi Ilmu Kedokteran
Program Pascasarjana UNAIR Surabaya

11 Quardin Street
Clayton Victoria 3168
Australia 131
+61 3 9585 1111
Fax +61 3 9565 1199
mimotopes@mimotopes.com
www.mimotopes.com

Certificate of Analysis

Order Number: 10775
Description: 27 peptides based on sequences provided
Scale: 50 nanomole
Peptide Length: 9 mer

Peptide Format:

Terminus	Terminus	Count	Count
H-	(N) Free amine	1	1
Ac-	(N) acetyl	26	2-27
-CROWN	(C) non-cleavable peptide	27	1-27

(N) : Amino terminus. (C) : Carboxy terminus.

Sequences are in standard single letter code (unless otherwise specified) with the amino terminus on the left. Peptide sequences are listed on the sequence sheet provided with this peptide. Note that any control peptides have been removed from each block and used for in-house QC evaluation.

Quality Control:

ELISA absorbance (405 nm)

Block	Peptide	Absorbance
28	PLAQGGGG	2.1
29	GLAQGGGG	0.2

The block of peptides will have a pungent odour associated with traces of reagent used to side-chain deprotect the peptides. These reagents are in very low concentrations and will not significantly affect the outcome of assays if the recommended ELISA procedure is used. The odour will disappear after the block has been passed through a few test cycles.

Signed Sonja Plomper, Quality Manager
26-March-2002

BLOCK LAYOUT FOR SYNTHESIS :

10775 : Block A

DESCRIPTION : 27 peptides based on sequences provided.

COMMENTS: Block layout when viewed with crowns facing down.
All controls have been removed for QC testing.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1	9	17	25								
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
2	10	18	26								
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
3	11	19	27								
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
4	12	20									
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
5	13	21									
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
6	14	22									
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
7	15	23									
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
8	16	24									

- 1: MTEQQWNEA
- 2: TEQQWNEAG
- 3: EQQWNEAGI
- 4: QQWNEAGIE
- 5: QWNEAGIEA
- 6: WNEAGIEAA
- 7: NEAGIEAAA
- 8: FAGIEAAAS
- 9: AGIEAAASA
- 10: GIEAAASAI
- 11: IEAAASAIQ
- 12: EAAASAIQG
- 13: AAASAIQGN
- 14: AASAIQGNV
- 15: ASAIQGNVT
- 16: SAIQGNVTS
- 17: AIQGNVTSI
- 18: IQGNVTSIH
- 19: QGNVTSIHS
- 20: GNVTSIHSL
- 21: NVTSIHSLL
- 22: VTSIHSLLD
- 23: TSIHSLLDE
- 24: SIHSLLDEG
- 25: IHSLLDEGK
- 26: HSLLEDEGKQ
- 27: SLLLEDEGQS

Certificate of Analysis

Freeze Dried Control Antibody

Stock Code : IMX-NC-C-ABY
Batch Number : 035C
Date of Preparation: 12 October 2000
Monoclonal Antibody: S165-11
Species : Mouse
Isotype: IgG1
Specificity: Anti Sperm Whale Myoglobin binding to the sequence PLAQ

Contents and final concentrations after reconstitution in the recommended volume:

Ascites	0.4 µl/ml
Bovine Serum Albumin	4 mg/ml
PBS	2 mM
Lactose	4 mg/ml
Azide	0.2 mg/ml


Storage: -20 degrees Celsius

Recommended reconstitution: 1 mL purified water

Results of ELISA testing of control peptides:

Positive peptide	Ac-PLAQGGGG-Gear	Absorbance 1.2
Negative peptide	Ac-GLAQGGGG-Gear	Absorbance 0.2

Test carried out in accordance with the procedure outlined in the accompanying procedure.


Sonja Plompen
Quality Manager

March 26, 2002

Products supplied for Research Purposes only

Products are not for use in research purposes only