

LAPORAN PENELITIAN

PENGEMBANGAN PROTEIN SUB-UNIT KANDIDAT VAKSIN TB
TAHAP I – Penyiapan Antigen, Uji Immunogenisitas dan Pembuatan Isolat *M.tuberculosis*
“dorman” in-vitro



DR. dr. Francisca Srioetami Tanoerahardjo, SpPK., MSi

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN LITBANG KESEHATAN
JAKARTA
2012

LAPORAN PENELITIAN

PENGEMBANGAN PROTEIN SUB-UNIT KANDIDAT VAKSIN TB
TAHAP I – Penyiapan Antigen, Uji Immunogenisitas dan Pembuatan Isolat *M.tuberculosis*
“dorman” in-vitro



DR. dr. Francisca Sriotami Tanoerahardjo, SpPK., MSi

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN LITBANG KESEHATAN
JAKARTA
2012

SUSUNAN TIM PENELITIAN

No	N a m a	Keahlian/Kesarjanaan	Kedudukan dalam Tim
1	Dr. Francisca Srioetami Tanoerahardjo, dr., SpPK., M.Si	Spesialis Patologi Klinik, Doktor Mikrobiologi Parasitologi	Ketua pelaksana
2	Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt	Apoteker	Peneliti Muda
3	dr. Roselinda, M.Epid	Dokter	Peneliti Muda
4	Dr. Vivi Lisdawati, M.Si., Apt	Dokter Biomedis	Peneliti Muda
5	dr. Krisna Nur Andriana Pangesti, M.Sc	Dokter	Peneliti Muda
6	Indri Rooslamiati, MSc., Apt	Apoteker	Peneliti Pertama
7	Lina Rustanti, SF., Apt., M. Mol. Biol.	Apoteker	Peneliti Pertama
8	Kambang Sariadji, S.Si, M.Biomed	Biologis	Peneliti Pertama
9	Sunarno, S.Kep., M.Biomed	Perawat	Peneliti Pertama
10	Novi Sulistyaningrum, M.Si	Biologis	Peneliti Pertama
11	Yuni Rukminiati, M.Biomed	Master Biologi	Peneliti Pertama
12	Ratih Dian Saraswati, SSI	Biologis	Pembantu Peneliti
13	dr. Natalie Laurencia	Dokter	Pembantu Peneliti
14	Kindi Adam, SSI	Biologi	Pembantu Peneliti
15	drh. Khariri, M.Biomed	Dokter hewan	Pembantu Peneliti
16	Fauzul Muna, MSi	Master Biologi	Pembantu Peneliti
17	Aulia Rizki, SSI	Biologis	Pembantu Peneliti
18	dr. Nelly Puspandari	Dokter	Pembantu Peneliti
19	Melatiwati, AMAK	Teknisi Litkayasa	Pembantu Peneliti
20	Syamsidar	Teknisi Litkayasa	Pembantu Peneliti
21	Novi Amalia	Teknisi Litkayasa	Pembantu Peneliti
22	Sundari Nursotiah	Teknisi Litkayasa	Pembantu Peneliti
23	Arifayu Addiena, S.Si	Biologis	Pembantu Peneliti
24	Nirfan		Pembantu Lapangan
25	Riyantiningsih		Sekretariat Penelitian
26	Dra. Hastini		Sekretariat Penelitian



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

KEPUTUSAN

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

NOMOR: HK.03.05/III/750/2012

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

MENIMBANG

- a. bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, perlu ditunjuk Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012;
- b. bahwa berdasarkan pertimbangan huruf a tersebut diatas, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 sejumlah tujuh belas penelitian;

MENGINGAT

1. Undang-Undang Nomor 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 1992 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3495);
2. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130);
3. Peraturan Pemerintah RI No. 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);
4. Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Alih Tehnologi Kekayaan Intelektual serta hasil Penelitian dan Pengembangan oleh Perguruan Tinggi dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara Tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4497);
5. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
6. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/Menkes/SK/X/1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
Peraturan Presiden Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara.
7. Peraturan Menteri Kesehatan No. 1144/Menkes/Per/VIII/2010 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;
8. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.HK.03.05/4/11675/2011 tanggal 30 Desember 2011 tentang Penetapan Kuasa Pengguna Anggaran, Pejabat Pembuat Komitmen, Pejabat Penguji dan Penandatanganan SPM, Bendahara Pengeluaran dan Bendahara Penerimaan pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan di Jakarta tahun anggaran 2012;

MEMPERHATIKAN

1. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2012 dengan No.0683/024-11.1.01/00/2012, tanggal 9 Desember 2011;



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

MEMUTUSKAN

MENETAPKAN

KESATU

- 1) Membentuk Tim Pelaksana Penelitian Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012 sebagaimana tercantum dalam lampiran keputusan ini;
- 2) Kepada Tim Pelaksana Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Tahun Anggaran 2012, dapat diberikan honorarium sebagaimana tersebut dalam lampiran 2 Keputusan ini;

KEDUA

- Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 mempunyai tugas sebagai berikut:
 - 1) Melaksanakan Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012, dengan susunan Tim seperti pada lampiran surat keputusan ini;
 - 2) Menyerahkan Laporan Kemajuan Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian dan Laporan Akhir Penelitian kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

KETIGA

- Dalam melaksanakan tugasnya, Tim bertanggungjawab kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan serta wajib menyampaikan laporan akhir penelitian sebagai pertanggungjawaban kegiatan;

KEEMPAT

- Biaya pelaksanaan kegiatan serta honor Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 dibebankan pada anggaran DIPA Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012;

KELIMA

- Keputusan ini mulai berlaku sejak bulan Januari sampai dengan Desember 2012 dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini akan diadakan perbaikan dan perubahan sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Jakarta

Pada tanggal : 6 Februari 2012



Drs. Onda Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP 19621119 198803 100 1

Tembusan Yth:

1. Sekretaris Jenderal Kemenkes RI;
2. Inspektur Jenderal Kemenkes RI
3. Ketua Badan Pemeriksa Keuangan;
4. Kepala Badan Pengawasan Keuangan dan Pembangunan;
5. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
6. Sekretaris Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
7. Kanwil Ditjen Anggaran Kemenkeu RI DKI Jakarta;
8. Para Kepala Pusat di Lingkungan Badan Litbang Kesehatan;
9. Kepala Bagian Tata Usaha Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
10. Kepala Bidang Biomedis, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
11. Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
12. Bendaharawan Pengeluaran Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
13. Masing-masing yang bersangkutan untuk dilaksanakan.



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax. (021) 42881754

Lampiran 1

Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

Nomor : HK.03.05/III/750/2012

Tanggal : 6 Februari 2012

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

PENGEMBANGAN PROTOTIPE VAKSIN TB TAHAP I - IDENTIFIKASI ISOLAT M. TUBERCULOSIS, PENYIAPAN ANTIGEN, UJI IMUNOGENITAS DAN PEMBUATAN ISOLAT M. TUBERCULOSIS "DORMAN" IN-VITRO.

- | | |
|--|----------------------------------|
| 1. Dr. Francisca Sriwetami Tanoerahardjo, dr., SpPK., M.Si | : Peneliti Adhoc/Ketua Pelaksana |
| 2. Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt | : Peneliti Muda |
| 3. dr. Roselinda, M.Epid | : Peneliti Muda |
| 4. Dr. Vivi Lisdawati, M.Si., Apt | : Peneliti Muda |
| 5. dr. KrisnaNur Andriana Pangesti, M.Sc | : Peneliti Muda |
| 6. Indri Rooslamiati, M.Sc., Apt | : Peneliti Pertama |
| 7. Lina Rustanti, SF., Apt., M.Mol.Bol. | : Peneliti Pertama |
| 8. Kambang Sariadji, S.Si., M.Biomed | : Peneliti Pertama |
| 9. Sunarno, S.Kep., M.Biomed | : Peneliti Pertama |
| 10. Novi Sulistyaningrum, M.Si | : Peneliti Pertama |
| 11. Yuni Rukminiati, M.Biomed | : Peneliti Pertama |
| 12. Ratih Dian Saraswati, S.Si | : Pembantu Peneliti |
| 13. dr. Natalie Laurencia | : Pembantu Peneliti |
| 14. Kindi Adam, S.Si | : Pembantu Peneliti |
| 15. drh. Khariri, M.Biomed | : Pembantu Peneliti |
| 16. Fauzul Muna, M.Si | : Pembantu Peneliti |
| 17. Aulia Rizki, S.Si | : Pembantu Peneliti |
| 18. dr. Nelly Puspandari | : Pembantu Peneliti |
| 19. Melatiwati, AlMAK | : Pembantu Peneliti |
| 20. Syamsidar | : Pembantu Peneliti |
| 21. Novi Amalia | : Pembantu Peneliti |
| 22. Sundari Nursufiah | : Pembantu Peneliti |
| 23. Arifayu Addiena, S.Si | : Pembantu Peneliti |
| 24. Nirfan | : Pembantu Lapangan |
| 25. Riyantiningsih | : Sekretariat Penelitian |
| 26. Dra. Hastini | : Sekretariat Penelitian |



Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP. 19621119 198803 100 1



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881765, 42881762, 42881745
Fax. (021) 42881754

Lampiran 2

Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

Nomor : HK.03.05/III/750/2012

Tanggal : 6 Februari 2012

JUDUL PENELITIAN : PENGEMBANGAN PROTOTIPE VAKSIN TB TAHAP I-IDENTIFIKASI ISOLAT M. TUBERCULOSIS, PENYIAPAN ANTIGEN, UJI IMUNOGENITAS DAN PEMBUATAN ISOLAT M. TUBERCULOSIS "DORMAN" IN-VITRO.

JUMLAH HONOR TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

1. Peneliti Adhoc/Ketua Pelaksana	Jumlah honor yang diterima per-bulan sebesar	=Rp.	650.000
2. Peneliti Muda	Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp.	40.000
3. Peneliti Pertama	Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp.	35.000
4. Peneliti Non Fungsional	Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp.	30.000
5. Pembantu Peneliti	Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp.	20.000
6. Pembantu Lapangan	Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp.	20.000
7. Sekretariat Penelitian	Jumlah honor yang diterima setiap bulan sebesar	=Rp.	300.000

4 Kepala



Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt.,
NIP. 19621119 198803 100 1

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena dengan perkenan dan pertolonganNYa kami dapat menyelesaikan laporan penelitian yang berjudul PENGEMBANGAN PROTEIN SUB-UNIT KANDIDAT VAKSIN TB TAHAP I _ Penyiapan Antigen, Uji Imunogenitas dan Pembuatan Isolat M.tuberculosis “dorman” in vitro.

Kami mengucapkan terima kasih kepada seluruh tim, baik di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan maupun Tim peneliti dari Universitas Brawijaya/Rumah Sakit Umum Saeful Nawar dan Rumah Sakit Wafa Husada Malang yang telah bekerjasama dengan baik untuk melaksanakan penelitian tahap I ini. Penelitian tahap I merupakan awal kerjasama yang telah dimulai dan memerlukan harmonisasi untuk pelaksanaan kegiatan selanjutnya.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan hasil maksimal untuk kepentingan masyarakat Indonesia terutama dalam Program Penanggulangan Tuberkulosis Nasional.

Jakarta, Desember 2012

Ketua Pelaksana

ABSTRAK

Tuberkulosis merupakan masalah kesehatan di dunia dan Indonesia merupakan salah satu dari 22 negara dengan beban TB yang besar. Vaksin BCG merupakan satu-satunya vaksin TB yang ada saat ini dan digunakan di seluruh dunia akan tetapi dirasakan kurang efektif karena efektivitasnya hanya berkisar antara 0-80%.

Penelitian Pengembangan Prototipe Sub Unit Protein Rekombinan Kandidat vaksin TB merupakan bagian dari Konsorsium Riset Vaksin TB yang terdiri dari 8 (delapan) Institusi Penelitian dan Perguruan Tinggi dengan tujuan mensinergikan dan mengintegrasikan seluruh penelitian tentang vaksin TB yang ada di Indonesia dan juga mengakselerasi kegiatan penelitian untuk menghasilkan satu produk kandidat vaksin TB dengan mengembangkan protein rekombinan kandidat Vaksin TB yang mempunyai kemampuan proteksi terhadap infeksi *M.tuberculosis*.

Pada penelitian tahap pertama ini telah dilaksanakan (tiga) kegiatan, yaitu (1) Pembuatan protein rekombinan Esat-6 dan Cfp10 sebagai kandidat vaksin, (2) Uji imunogenitas kandidat vaksin dan (3) penyiapan isolat *M.tuberculosis* "dormán" in vitro.

Hasil kegiatan pembuatan protein rekombinan Esat-6 dan Cfp10 dilakukan pada tempat *M.tuberculosis* referens H37Rv dan akan dipersiapkan untuk pembuatan menggunakan isolat klinik *M.tuberculosis* yang telah dikarakterisasi secara spoligotyping, baik galur Beijing maupun non Beijing untuk membandingkan dengan hasil pada isolat *M.tuberculosis* refrens.

Pelaksanaan uji imunogenitas akan dilaksanakan pada beberapa institusi anggota Konsorsium Riset Vaksin TB sehingga membutuhkan prosedur operasional baku. Optimasi kegiatan penyiapan limfosit T dari PBMC telah mendapatkan keadaan kultur optimum pada hari ke 5-8 setelah pajanan antigen dengan konsentrasi 8ug/ml dan 10ug/ml. Pengukuran produksi sitokin IFN- γ , TNF- α , IL6, IL12 dan IL4 akan dilakukan menggunakan flowsitometri dengan pewarnaan intraseluler. Penyiapan kelompok subjek penelitian melalui skiring klinis maupun laboratoris telah dilakukan. Perbandingan hasil pemeriksaan flowsitmetri pada ketiga kelompok penelitian akan dianalisis secara statistik.

Persiapan pelaksanaan pembuatan isolat *M.tuberculosis* "dorman" in vitro telah dilakukan subkultur isolat *M.tuberculosis* H37Rv pada medium Lowestein Jensen dan media Sauton. Pelaksanaan modifikasi medium kan dilaksanakan pada laboratorium BSL3 yang membutuhkan persiapan SDM dan shaking incubator serta dekontaminasi ruangan.

DAFTAR ISI

	Hal
Kata Pengantar	i
Abstrak	ii
Daftar Isi	iii
Daftar Tabel	v
Daftar Gambar	vi
Daftar Lampiran	vii
1. PENDAHULUAN	1
2. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	3
2.1. Tujuan Penelitian	3
2.2. Manfaat Penelitian	3
3. TINJAUAN PUSTAKA	4
3.1. Vaksin BCG	4
3.2. Antigen Kandidat Vaksin TB	6
3.3. Respon Imun pada Infeksi <i>M.tuberculosis</i> dan Implikasinya dalam Pengembangan Vaksin TB	11
4. METODOLOGI PENELITIAN	16
4.1. Kerangka Teori	16
4.2. Kerangka Konsep	17
4.3. Alur Kegiatan	19
4.4. Konstruksi Vektor Ekspresi untuk Antigen Esat-6 dan Cfp10	20
4.4.1. Desain Primer dan Rancangan Konstruksi Vektor Ekspresi	21
4.4.2. Isolasi Genom <i>M.tuberculosis</i> H37Rv	22
4.4.3. Isolasi Gen Pengkode Antigen Esat-6 dan CFP 10 dari <i>M.tuberculosis</i> H37Rv dengan Metode PCR	22
4.4.4. Purifikasi Produk PCR	23
4.4.5. Pembuatan Sel Kompeten <i>E.coli</i> TOP10 dan BL21(DE3)	24
4.4.6. Kloning pada Vektor pGEM-T easy	24
4.4.7. Isolasi Plasmid dan Analisis Restriksi	25
4.4.8. Analisis Sekuensing	27
4.4.9. Subkloning pada Vektor Ekspresi	27
4.5. Uji Immunogenitas	28
4.6. Penyiapan Isolat <i>M.tuberculosis</i> “dorman” in vitro	29

4.6.1.	Prosedur Operasional Baku Subkultur <i>M.tuberculosis</i> dari Media Lowenstein Jensen	29
4.6.2.	Subkultur <i>M.tuberculosis</i> dari TSB Gliserol atau Skim Milk	30
4.6.3.	Prosedur Operasional Baku Pembuatan Medium Sauton	31
4.6.4.	Prosedur Operasional Baku Kultur pada Medium Sauton	34
4.6.5.	Prosedur Ekstraksi RNA	35
4.6.6.	Penyiapan SDM untuk Bekerja pada Fasilitas BSL3	37
5.	HASIL PENELITIAN	39
5.1.	Penyiapan Antigen	39
5.1.1.	Isolasi Gen Pengkode Antigen Esat-6 dan CFPI0 dari <i>M.tuberculosis</i> H37Rv dengan Metode PCR	39
5.1.2.	Kloning pada Vektor pGEM-T easy	39
5.1.3.	Ekspresi Protein Esat-6 dan Cfp10 pada E.coli	41
5.1.4.	Purifikasi Antigen menggunakan Kolom Afinitas	42
5.2.	Persiapan Uji Imunogenitas	42
5.3.	Persiapan Pembuatan Isolat <i>M.tuberculosis</i> "dorman" in vitro	43
6.	PEMBAHASAN	44
7.	KESIMPULANDAN SARAN	45
8.	DAFTAR PUSTAKA	46
8.	BIODATA KETUA PELAKSANA	52
9.	PERSETUJUAN ATASAN	53
10.	LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

		Hal
Tabel 1.	Komposisi reagen PCR	22
Tabel 2.	Komposisi reagen reaksi ligasi	25
Tabel 3.	Komposisi reagen reaksi restriksi	26
Tabel 4.	Komposisi reagen reaksi restriksi pada subkloning	27
Tabel 5.	Komposisi reagen reaksi ligasi pada subkloning	28
Tabel 6.	Kriteria penentuan kelompok subjek penelitian	29
Tabel 7.	Rencana perlakuan modifikasi subkultur <i>M. tuberculosis</i> Pada berbagai konsentrasi gliserol	32
Tabel 8.	Alur Pengerjaan Spesimen H37Rv	33

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Model Sistem Sekresi <i>M.tuberculosis</i> yang dikode region RD1	7
Gambar 2. Spektrum Infeksi TB, siklus hidup <i>M.tuberculosis</i> dan Imunopatogenesis TB paru	13
Gambar 3. Skema Respon Imun Alamiah dan Adaptif Antimikobakteri pada Sel Bronkhoalveolar	15
Gambar 4. Patogenesis Infeksi Tuberkulosis Paru	16
Gambar 5. Kerangka Konsep Penelitian Mikrobiologi <i>M.tuberculosis</i> "dorman"	17
Gambar 6. Kerangka Konsep Penyiapan Antigen Kandidat Vaksin TB	18
Gambar 7. Alur Kerja Penelitian Menilai Ekspresi Gen pada Keadaan Stres	19
Gambar 8. Alur Kerja Penyiapan Antigen – protein rekombinan	20
Gambar 9. Rencana Konstruksi Vektor Ekspresi	21
Gambar 10. Output Tahap Konstruksi untuk Esat6 dan Cfp10	21
Gambar 11. Kondisi PCR yang digunakan untuk Esat6 dan Cfp10	23
Gambar 12. Elektroföregam hasil isolasi gen Esat6 dan cfp10	39
Gambar 13. Hasil skrining biru putih untuk gen esat6	40
Gambar 14. Hasil skrining biru putih untuk gen cfp10	40
Gambar 15. Ekspresi Protein Esat-6 dan Cfp10 pada E.coli CE4(DE3)..	41
Gambar 16. Penentuan Protein Esat-6 dan Cfp10 dalam supernatant atau pellet	41
Gambar 17. Hasil purifikasi protein Esat-6 dan Cfp10	42

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Hasil Sekuensing
- Lampiran 2. Prosedur Operasional Baku Uji Immunogenitas Antigen Kandidat Vaksin TB
- Lampiran 3. Sekuens gen esat6 dan cfp10
- Lampiran 4. Persetujuan Etik
- Lampiran 5. Clinical Report Form
- Lampiran 6. Format Seed History

1. PENDAHULUAN

Tuberkulosis di Indonesia masih merupakan masalah kesehatan masyarakat dan menduduki urutan ketiga terbanyak di dunia. Salah satu target MDGs adalah berkurangnya kasus TB sebanyak 50% pada tahun 2015 dibandingkan data TB pada tahun 1990. Target global penanggulangan TB dunia pada tahun 2050 adalah dunia bebas TB, yang diharapkan hanya terdapat 1 orang penderita TB per 1 juta penduduk.¹ Dalam mencapai target global tersebut, pencegahan merupakan satu-satunya cara penanggulangan TB yang paling *cost effective*. Vaksin BCG merupakan satu-satunya vaksin TB yang ada saat ini. Vaksin tersebut hanya dapat mencegah terjadinya penyakit TB berat pada anak-anak.

M.bovis yang dilemahkan sebagai vaksin BCG telah diketahui tidak mempunyai RD-1 yang mengkode beberapa protein yang bersifat imunodominan dan merupakan kandidat vaksin, antara lain ESAT6 dan CFPI0. Selain itu masih banyak terdapat protein maupun lipoprotein dinding sel *M.tuberculosis* yang berpotensi sebagai kandidat vaksin TB.^{2,3}

Mycobacterium tuberculosis (*M.tuberculosis*) telah menginfeksi sepertiga penduduk dunia dan 10% diantaranya berkembang menjadi penyakit tuberkulosis (TB).^{1,2,4,5} Patogenesis terjadinya penyakit TB dipengaruhi berbagai hal, yaitu faktor pejamu, bakteri penyebab dan lingkungan.⁶ Sifat *M.tuberculosis* yang merupakan patogen intraseluler, mempunyai dinding sel yang kaya lipid dan mampu hidup dorman bertahun-tahun sangat mempengaruhi perjalanan penyakit TB.⁷⁻⁹ *M.tuberculosis* merupakan anggota dari *M.tuberculosis complex* (MTBC) yang meliputi enam spesies lain yang terkait erat, yaitu *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.pinnipedii*, *M.caprae*, dan *M.canetti*.^{10,11} Genom *M.tuberculosis* menunjukkan perbedaan <0,05% dengan *M.bovis*, yang sering menginfeksi ternak tetapi juga dapat menyebabkan TB pada mamalia lain termasuk manusia.¹⁰⁻¹¹ Sekalipun seluruh genom *M.tuberculosis* telah diketahui, namun sebagian besar fungsi produk gen masih berupa protein hipotetikal.^{10,11}

Vaksin TB dapat bekerja dan mencegah berkembangnya penyakit TB pada beberapa tahap perjalanan penyakit. Patogenesis penyakit TB terjadi diawali dengan masuknya *droplet infection* yang mengandung *M.tuberculosis* yang masuk melalui saluran pernapasan dan peran makrofag alveolar pada tahap ini sangat penting. Penularan biasanya terjadi pada masa balita dan melalui vaksinasi BCG terlindung dari infeksi sebanyak 70%. Sisanya terjadi infeksi walaupun yang berkembang menjadi TB primer sejumlah 5% dalam kurun waktu 1-2 tahun. Sebagian besar akan menjadi TB laten yaitu

orang tersebut mengandung *M.tuberculosis* dalam tubuhnya tetapi tidak menjadi sakit dan tidak mempunyai gejala TB. Seringkali pada masa dewasa dan status imunologi menurun oleh karena berbagai sebab bakteri dorman akan menjadi reaktivasi TB laten. Proses *M.tuberculosis* dorman perlu dipelajari lebih mendalam untuk mendapatkan beberapa faktor yang mempengaruhi terjadinya reaktivasi maupun pencegahan terjadinya dorman. Dalam upaya mengetahui proses dorman yang terjadi diperlukan percontohan mimikri keadaan dorman terhadap *M.tuberculosis* in vitro dengan berbagai manipulasi di Laboratorium TB.

Keberadaan *M.tuberculosis* dalam tubuh manusia terutama dipengaruhi oleh sifat bakteri dan respon imun tubuh yang sangat kompleks.^{6,7} Saat ini program penanggulangan TB yang berupa pencegahan, penemuan dan pengobatan kasus TB belum dapat menjangkau bakteri *M.tuberculosis* dalam keadaan dorman.^{6,12,13}

TB laten banyak dipelajari baik in vitro maupun in vivo, namun sampai saat ini masih terdapat berbagai kelemahan. Model Wayne merupakan model yang paling banyak dilakukan terutama pada *Mycobacteria* galur apatogen.¹⁴⁻¹⁷

Dalam upaya untuk mengetahui patogenesis penyakit TB terutama dalam terjadinya *M.tuberculosis* persisten, diperlukan penelitian awal untuk melakukan optimasi laboratorium TB dengan kegiatan membiakkan, memelihara dan melakukan intervensi pada isolat *M.tuberculosis* galur reference maupun galur Beijing dan galur-galur yang telah diidentifikasi secara genotyping. Manipulasi dapat dilakukan untuk membuat keadaan yang menyerupai persisten seperti keadaan hipoksia dan kekurangan sumber karbon dan sumber nutrient lainnya.

Penyiapan antigen tentunya diawali dengan mempelajari kandidat antigen yang paling imunodominan dan paling memungkinkan untuk dilakukan pembuatan rekombinan proteinnya. Berbagai pertimbangan dalam pemilihan antigen kandidat vaksin TB dimulai dari yang paling mudah berdasarkan percobaan di laboratorium yang sudah pernah dilakukan. Respon imun terhadap antigen kandidat vaksin dipengaruhi oleh delivery system yang akan membawa antigen pada makrofag. Liposom merupakan salah satu dari jenis adjuvan yang sudah banyak dipelajari. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Konsorsium Riset Vaksin TB, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang melaksanakan (1) pembuatan protein sub-unit ESAT6, CFPI0, Rv1009, PPE41, (2) uji imunogenitas dan (3) penyiapan isolat *M.tuberculosis* "dorman" in vitro.

2. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan umum

Terdapatnya antigen kandidat vaksin TB yang telah dilakukan uji imunogenitas pada tahun 2014.

Tujuan khusus

1. Memperoleh data awal kondisi hasil optimasi dan hasil pengamatan pertumbuhan isolat *Mycobacterium* galur *reference* H37Rv, Beijing dan non-Beijing dalam keadaan stres.
2. Mendapatkan gambaran perbedaan ekspresi gen yang mengkode metabolisme lipid pada *M. tuberculosis* galur *reference* H37Rv, Beijing dan non-Beijing.
3. Konstruksi DNA rekombinan kandidat antigen, ekspresi protein dan pemurnian protein yang diharapkan sebagai kandidat antigen pada *E. coli*, *M. smegmatis* atau *B.cubtilis*.
4. Melakukan uji imunogenitas antigen kandidat vaksin secara *ex-vivo* untuk menilai respon imun humoral maupun seluler.

2.2. MANFAAT PENELITIAN

1. Terjadi inisiasi dan optimasi pelaksanaan biakan *M.tuberculosis* untuk studi metabolisme di Laboratorium Bakteriologi dengan SDM terlatih.
2. Terdapat antigen kandidat vaksin dari berbagai keadaan yang akan dilanjutkan untuk uji imunogenitas dan formulasi dengan *delivery system* yang dikembangkan oleh PT Bio Farma.
3. Terdapat berbagai model kontruksi DNA rekombinan termasuk vektor dan sel kompeten yang telah dimodifikasi yang akan digunakan untuk pengembangan selanjutnya, termasuk kandidat untuk tes diagnostik.

3. TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Vaksin BCG

Vaksin yang telah digunakan secara luas untuk imunisasi TB adalah vaksin BCG yang diperoleh dari *M. bovis* yang telah dilemahkan.³ Namun tetap tingginya penderita TB di dunia termasuk Indonesia menunjukkan bahwa efektivitas belum sesuai yang diharapkan. Studi meta-analisis menyatakan efikasi BCG terhadap TB berat pada anak seperti TB meningitis dan milier mencapai >80%, namun efikasi BCG untuk melindungi terhadap TB paru pada orang dewasa bervariasi antara 0-80%.³⁻⁵ Penyebab variasi efikasi BCG ini diduga dipengaruhi perbedaan galur BCG, paparan mikobakteria lingkungan, adanya infeksi cacing, perbedaan faktor nutrisi dan genetik dari populasi yang diteliti.¹⁸⁻²¹ Proses atenuasi *M. bovis* yang dimulai sejak tahun 1920 merupakan salah satu penyebab adanya perbedaan *M. bovis* galur BCG yang saat ini digunakan di seluruh dunia. Pada awal proses penyiapan vaksin BCG pada tahun 1920-1924, galur yang dihasilkan telah terjadi delesi pada *Region of Difference 1* (RD1). Lokus RD1 terdiri dari 9 gen, yang antara lain gen yang mengkode protein ukuran kecil yang disekresi dan bersifat imunodominan yaitu *culture filtrate protein 10* (CFP10) dan *early secretory antigenic 6-kDa protein* (ESAT6).^{22,23} Atenuasi setelah tahun 1924 ternyata menyebabkan delesi pada RD2, antara lain Rv1980c yang mengkode MPB64. Selain itu delesi RD2 mempengaruhi virulensi.⁹ *M. bovis* galur BCG selama proses atenuasi/pasasi teridentifikasi 6 urutan polimorfisme yang berupa delesi dan duplikasi pada beberapa regio yang menyebabkan efikasi vaksin bervariasi.^{24,25}

Respon imun yang efektif pada penyakit infeksi tergantung dari lokasi penyebab infeksi. Secara umum patogen ekstraseluler rentan terhadap mekanisme pertahanan tubuh berupa reaksi antigen-antibodi. *M. tuberculosis* merupakan bakteri intraseluler, dalam hal ini yang lebih berperan dalam respon imun seluler adalah sel limfosit T.²⁶⁻²⁸ Penilaian respon imun yang perbedaan antara pasien tuberkulosis, sehat dan orang yang telah divaksinasi meliputi penilaian antibodi dan produksi sitokin oleh sel limfosit T.²⁹

Selain faktor vaksin BCG yang telah dijelaskan di atas, beberapa penyebab lain yang dapat menerangkan kurang efektifnya vaksin BCG antara lain paparan mikobakteria lingkungan yang dapat memperpendek dan melemahkan respon imun yang disebabkan BCG, paparan infeksi cacing yang menyebabkan respon Th2 sehingga menghambat respon Th1 yang mempengaruhi efektivitas vaksin BCG, adanya faktor polimorfisme genetik dari pejamu, dan perbedaan galur *M. tuberculosis* sebagai penyebab infeksi.³⁰⁻³³

Berdasarkan perjalanan penyakit tuberkulosis, strategi vaksinasi dapat dibagi menjadi 2 kategori yaitu vaksin yang diberikan sebelum terpapar *Mycobacterium tuberculosis* untuk mencegah terjadinya infeksi dan vaksin yang digunakan bila telah terinfeksi. Kategori pertama merupakan perbaikan/penambahan vaksin BCG yang ada, melalui galur vaksin BCG rekombinan, yaitu rBCG30 yang berupa galur BCG dengan penambahan antigen *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B yang imunodominan, dan rBCGΔUreC:Hly yang tidak mengandung urease sehingga menyebabkan pH asam dalam fagosom serta mengekspresikan listeriolysin yang bermanfaat untuk perforasi membran fagosom.³⁴

Kategori kedua diberikan pada pasca infeksi yang lebih heterogen dan bertujuan sebagai booster dari pemberian vaksin dasar baik BCG atau rBCG. Jenis vaksin ini dapat dibagi menjadi 3 kelompok yaitu (1) kelompok “viral vectors” yang mengekspresi antigen imunodominan untuk menginisiasi respon imun limfosit menggunakan virus sebagai vektor. Contohnya MVA85A yang merupakan modifikasi galur vaksin, AERAS-402 dan AdAg85A yang menggunakan adenovirus.³⁵⁻³⁷ (2) kelompok yang menambahkan antigen imunodominan dengan menggunakan “adjuvant” baik untuk protein rekombinan tunggal maupun berupa fusi beberapa protein. Contohnya Hybrid I yang merupakan fusi antigen Ag85B dengan ESA T6 yang menggunakan IC-31 sebagai adjuvan.^{38,39} (3) kelompok yang menggunakan mikobakteria yang telah di inaktivasi. Contohnya *M.vaccae* dan *M.tuberculosis* fragmen RUT1. Kelompok ini lebih merupakan vaksin terapeutik.^{40,41}

Prioritas riset dasar dalam pengembangan vaksin TB bertujuan untuk menentukan komponen-komponen sistem respon imun pejamu yang penting untuk mengontrol dan mengeliminasi *M.tuberculosis*. Hal ini akan menentukan peran respon imun alamiah dan didapat dalam mencegah infeksi dan reaktivasi TB laten serta lebih mengerti respon imun pada berbagai tahap metabolisme patogen pada beberapa populasi yang berbeda.⁴²

Keberhasilan vaksinasi TB dapat diketahui melalui efek proteksi yang hingga saat ini belum diketahui biomarker yang dapat digunakan untuk menilainya.⁴³ Konsep barutentang peran penting dari sel T helper tipe 1 dan 2 dalam respon imun adaptif pada imunitas khususnya paru-paru merupakan dasar untuk mendapatnya biomarker imunitas proteksif yang bermanfaat untuk menilai hasil vaksinasi.^{44,45}

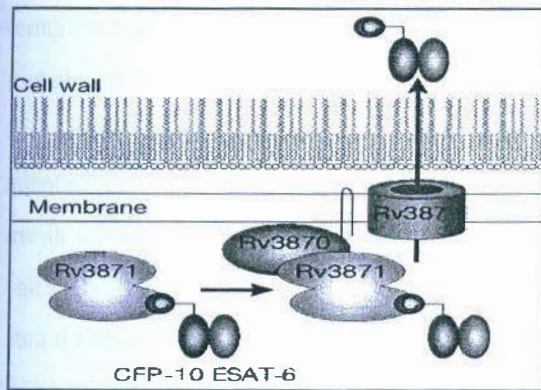
3.2. Antigen Kandidat Vaksin TB

Berdasarkan laporan WHO, jenis vaksin yang telah dikembangkan antara lain berupa *recombinant live*, protein rekombinan sub-unit, *viral vectored*, dan merupakan *whole cell (inactivated/disrupted)*. Pembahasan difokuskan pada protein rekombinan sub-unit sebagai antigen imunodominan kandidat vaksin.

Penentuan antigen kandidat vaksin TB dapat dikelompokkan dalam (1) kandidat antigen yang berfokus pada perbaikan vaksin BCG, dengan melakukan penambahan antigen yang telah diketahui tidak terdapat pada vaksin BCG seperti ESAT6, CFP10, Ag85 dan lainnya; (2) kandidat antigen yang belum banyak dikembangkan dan merupakan protein-protein hipotetikal baik yang disekresi maupun bagian dari protein dinding sel, misalnya dari keluarga gen *pe* dan *ppe*; (3) kandidat antigen yang berperan pada reseptor di dalam makrofag, seperti TLR2 maupun CCR5; (4) kandidat antigen yang kerjanya melakukan penghambatan (blockade) agar tidak terjadi reaktivasi bakteri dorman, misalnya protein Rpf; (5) kandidat antigen yang berpengaruh dalam metabolisme *M.tuberculosis* yang hidup anaerob di dalam granuloma dan (6) kandidat antigen yang berupa protein atau lipoprotein yang berperan dalam metabolisme lipid yang berperan selama bakteri hidup dorman.

ESAT-6 (*Early Secretory Antigenic Target ESX1*) merupakan suatu protein sekresi oleh *M.tuberculosis* yang berukuran 6 kDa. Famili ESAT-6 terdiri dari 22 protein dengan berat molekul rendah, beberapa diantaranya dapat dibagi menjadi subfamili berdasarkan keterkaitan sequence dari individual genes dan banyak diantaranya yang memiliki imunogenisitas yang tinggi.⁴⁶

ESAT 6 dan Culture filtrate Protein (CFP10) merupakan protein yang dikode dari RD1 (*region of difference 1*) yang terdapat pada *M.tuberculosis* dan *M. bovis*, namun tidak dapat ditemukan pada *M.bovis* BCG dan mikobakteria lingkungan. ESAT 6 merupakan antigen stimulator sel limfosit T yang imunodominan dan dikenali oleh sel limfosit T yang mensekresi IFN γ (*IFN γ -secreting T cells*) yang biasanya terdapat dalam jumlah yang lebih banyak pada pasien dengan TB aktif dibandingkan pada pasien yang tidak terinfeksi.



Gambar 1. Model sistem sekresi *M. tuberculosis* yang dikode oleh regio RD1.

Sumber : Mycobacterial virulence and specialized secretion: same story, different ending (nature medicine)

Protein ini telah dimanfaatkan sebagai dasar uji diagnostik TB IFN γ release assay (IGRA), dengan bentuk komersial seperti ESAT6 Quantiferon TB-2G dan T SPOT TB. Karena ESAT 6 dan CFP10 dapat menginduksi respon IFN γ sehingga dapat digunakan untuk membedakan individu yang terinfeksi dengan kontrol. Walaupun begitu terdapat laporan yang kontroversi dari daerah endemik. Di daerah endemic IFN γ dapat dimodulasi karena paparan *M.tuberculosis* dan non *M.tuberculosis* sama seperti dengan paparan vaksinasi BCG. Berdasarkan beberapa jurnal dikatakan bahwa sensitivitas IGRA dipengaruhi oleh etnik dan usia pasien yang diuji. Sensitivitas ESAT6 dan CFP10 yang diinduksi respon Mycobacterium-spesifik T cell akan lebih besar di daerah yang tidak divaksinasi BCG di daerah non endemic, sedangkan studi-studi yang dilakukan kebanyakan di daerah yang transmisi TBnya rendah. Berdasarkan penelitian ini disebutkan bahwa ESAT6 yang menginduksi respon IFN γ akan menurun pada pasien dengan *severe disseminated* TB dibandingkan pada pasien dengan TB spinal, meningeal, abdominal, dan dibandingkan juga dengan TB yang terlokalisir. Peningkatan respon IFN γ pada infeksi TB yang *less severe* berkorelasi dengan jumlah sel T dengan CD4 yang spesifik antigen yang ditemukan lebih banyak pada penderita TB laten dibandingkan dengan penderita infeksi TB minimal yang memiliki jumlah bacterial load yang lebih sedikit.⁴⁷

Vaksin subunit TB yang potensial telah diperoleh dengan menggunakan antigen TB imunodominan, seperti halnya ESAT-6, yang meningkatkan proteksi melawan infeksi *M.tuberculosis* pada mencit. Fusi protein ESAT-6, Ag85B dengan adjuvant kuat yang diberikan kepada mencit dapat menginduksi respon imun yang dipengaruhi dosis pemberian. Respon imun ini disertai dengan imunitas protektif yang dapat dibandingkan

terhadap perlindungan yang dipicu imunisasi BCG dengan dosis yang besar. Vaksin yang menginduksi respon memori imunologi tetap stabil hingga 30 minggu post-vaksinasi.

Pada vaksin *attenuated BCG* ratusan gen telah didelesi, sebagai konsekuensi dari adaptasi progresif dari BCG strain terhadap kondisi laboratorium, namun gen-gen ini masih terdapat dalam *M.tuberculosis*. Terdapat 6 (enam) antigen imunodominan *M.bovis* yaitu ESAT-6, CFP10, Ag85, MPB64, MPB70, MPB83. Lima diantaranya didelesi dari atau downregulated dalam beberapa atau semua BCG strain. Regio RD1 ada dalam semua BCG strain. Delesi meliputi 2 antigen imunodominan yaitu ESAT-6 dan CFP10 yang penting untuk proteksi Mtb challenge pada guinea pig model.

Terdapat penelitian yang berusaha mengevaluasi potensi TB10.4 sebagai substitute untuk ESAT-6 dalam fusion protein, Ag85-ESAT-6. Pada penelitian tersebut terlihat TB10.4 memiliki imunogenisitas yang tinggi dan menginduksi perlindungan melawan TB. Saat difusikan ke Ag85B, hasil konstruksi menunjukkan imunitas pada level yang sama dengan BCG atau Hybrid1 vaccination dan pada penelitian tersebut saat bersamaan digunakan juga ESAT-6, bukan hanya sebagai diagnostic reagent, tapi juga sebagai reagen yang memonitor efikasi vaksin.

Berdasarkan penelitian tersebut diperoleh hasil TB10.4 dan ESAT-6 (dalam ajuvan DDA/MPL) memiliki sifat imunogenisitas yang tinggi dan sangat mudah dikenali dalam limpa dan darah. Dalam hal imunogenisitas dan protective efficacy, TB10.4 setara dengan ESAT-6.⁴⁶

CFP 10, ESAT-6-like protein esxB atau secreted antigenic protein MTSA-10 atau 10 kDa culture filtrate antigen CFP-10 merupakan protein yang dikode oleh gen esxB.

ESAT-6 dan CFP-10 merupakan dua antigen yang disekresikan sebagai kompleks melalui replikasi *Mycobacterium tuberculosis complex (MTC)*.⁴⁸

CFP10 dan ESAT6 merupakan pasangan secretory protein yang penting dalam mengkode virulence determining factor. CFP10 dan ESAT6 membentuk kompleks heterodimeric 1:1 kuat, yang dikenali dan disekresi oleh system EsxI. Studi terbaru menunjukkan bahwa system EsxI merupakan kompleks alami dan terdiri atas beberapa protein yang berperan dalam sekresi substrat CFP10 dan ESAT6. Sekresi CFP10 dan ESAT6 sangat penting untuk menstimulasi imunogenisitas host selain memunculkan semua fenotip pada *M. tuberculosis*.⁴⁹

CFP-10 (Rv3874 or EsxB) dan ESAT-6 (Rv3875 or EsxA) merupakan golongan protein mycobacterial, yang terdiri atas 100 asam amino, dikarakterisasi berdasarkan susunan pasangannya dalam genome dan dari motif perlindungan central WYG. Beberapa

golongan protein mycobacterial telah diidentifikasi sebagai antigen potent T-cell. Genome *M. tuberculosis* terdiri atas 22 pasangan coding gen dari kelompok protein CFP-10/ESAT-6, yang terletak pada 11 genom lokus dan seringkali diawali dengan gen protein PE dan PPE. Gen dari CFP-10 dan ESAT-6 tersusun sebagai operon kecil, yang mudah ditranskripsi dan ditranslasi, sehingga terlihat menyerupai pasangan genom yang lain dalam satu kelompok membentuk operon yang serupa. Beberapa pasangan kelompok protein CFP-10/ESAT-6 terlihat membentuk kompleks yang kuat, termasuk CFP-10/ESAT-6, Rv0287/Rv0288 (EsxG/EsxH), dan Rv3019c/Rv3020c (EsxR/EsxS), menunjukkan bahwa kompleks yang terbentuk menjadi bentuk/formasi umum di seluruh kelompok/golongan. Pembentukan kompleks kedua protein CFP-10 dan ESAT-6 mengadopsi struktur tersier stabil, yang direfleksikan sebagai peningkatan signifikan resistensi pada denaturasi bahan kimia dan digesti protease dibandingkan dengan protein tunggal, sehingga menunjukkan bentuk fungsional dari CFP-10 and ESAT-6. CFP-10 and ESAT-6, ditemukan dalam filtrat kultur muda sel *M. tuberculosis*. Studi terbaru mengindikasikan sekresi dari kompleks CFP-10/ESAT-6 sebagai sebuah proses aktif termasuk sebuah sistem transport khusus yang terbentuk dari produk beberapa flanking genes, membran putative ATPase Rv3870 dan Rv3871 serta prediksi transmembrane protein Rv3877. Sekresi CFP-10 dan ESAT-6 tergantung pada protein yang dicoding oleh jarak operon *Rv3613c-Rv3616c*. Menariknya, genome dari *M. leprae*, yang kemungkinan memiliki jumlah minimal gen yang dibutuhkan untuk mycobacterium patogen, tetap memiliki salinan fungsional dari kelompok gen *CFP-10/ESAT-6* dan *Rv0287/Rv0288*, yang membuktikan pentingnya protein untuk mycobacterium patogen. Meskipun telah diketahui dengan jelas pentingnya peranan kelompok protein CFP-10/ESAT-6 dalam mycobacterial virulence and pathogenesis, pengertian tentang fungsi yang tepat dan mekanisme molekularnya masih sangat minim. Struktur dan bentuk permukaan kompleks CFP-10/ESAT-6, khususnya kemampuan untuk mengikat secara spesifik pada permukaan monocyte dan sel makrofag, menunjukkan peranan kunci patogen terhadap host cell signaling. Meskipun demikian, belum diketahui apakah kompleks yang dibentuk oleh kelompok protein CFP-10/ESAT-6 lainnya akan memiliki peranan yang sama, atau menjadi penengah berbagai fungsi berbeda.⁵⁰

Protein Rv1009 atau dikenal juga dengan protein faktor promosi resusitasi tipe B (*resuscitation-promoting factor/Rpf-B*) berperan dalam mengaktifkan kembali bakteri *M.tb* dari kondisi dorman yang lama. Protein RpfB memiliki berat molekuler 38,0784 kilodalton (kDa) dengan panjang protein 362 aa yang diekspresikan oleh gen sepanjang

1089 pb. Protein ini memiliki titik isoelektris 5,22 dan berada pada dinding sel serta berperan sebagai enzim pelisis lipid dalam pertumbuhan bakteri dalam kondisi dorman. Rv1009 mempunyai N-terminal yang mengikat lipid lipoprotein.^{51,52}

Rpf-B dan Rpf-E selalu berasosiasi dengan Rpf-A terlokalisasi bersama di dalam septa sel. Delesi antara Rpf-A dan Rpf-B dalam *M.tuberculosis* akan menyebabkan kecacatan dalam reaktivasi dormansi. Kehadiran makrofag yang terinfeksi mutan Rpf-A dan Rpf-B dalam sumsum tulang, meningkatkan produksi IL-6 dan TNF α dalam level dua kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan infeksi *M.tuberculosis* Wild Type.⁵³

Protein Rv1009 dapat menjadi kandidat vaksin untuk *M.tuberculosis* dorman, karena *M.tuberculosis* dorman memiliki permukaan sel yang mengandung protein Rv1009 yang dapat dideteksi sebagai antigen.⁵⁴

Analisis dari *M.tb* H37Rv mengungkapkan keberadaan dua gen (protein) baru yang belum terlalu banyak diketahui secara pasti tetapi memiliki kemampuan sebesar 10% dalam mengkode gen. Gen (protein) tersebut adalah dari genome PE dan PPE yang banyak mengandung glisin, dengan karakteristik dasar Proline-Glutamat dan Proline-Proline-Glutamate yang dekat dengan domain N-terminal. Protein PPE terdiri dari 69 protein yang dikarakterisasi melalui 180 domain N-terminal asam amino dan segmen C-terminal yang bervariasi urutan dan panjang segmen. Walaupun peran protein PPE dalam infeksi *M.tuberculosis* belum banyak diketahui, tetapi protein ini dianggap signifikan secara imunologis. Diperkirakan, protein PPE bersifat antigenik dan terlibat dalam variasi antigenik strain *M.tuberculosis* atau dalam proses inhibisi antigen, hal ini memungkinkan *M.tb* menyerang sistem imun host.⁵⁵

Penelitian dari gen Rv2770c yang sekarang disebut sebagai PPE44 merupakan *M.tb* H37Rv yang diekspresikan dari strain H37Ra yang dilemahkan. Baru-baru dilakukan penelitian yang berfokus pada PPE-SVP protein PPE44, dalam hal ini antigen PPE44 yang diberikan penambahan *M.bovis* BCG disuntikkan pada tikus. Untuk mengetahui peran PPE44 dalam menginfeksi pada manusia, studi kasus mengenai keragaman genetik PPE44 dalam isolasi klinik, variasi genetik memberikan potensi berbeda pada kemampuan isolat untuk menghindari sistem imun host. Tidak ada polimorfisme dari protein PPE44 yang ditemukan menggunakan uji PCR, panjangnya fragmen polimorfisme membutuhkan tiga enzim untuk melakukan uji ini. Sekuensing nukleotida dari isolat gen PPE44 berasal dari garis (keturunan) filogenetik *M.tuberculosis*, menunjukkan tidak ada substansi nukleotida, kecuali isolat dari genotipe

Beijing. PPE44 (Rv2770c) adalah protein dari *M.tb* dan merupakan kandidat potensial dari vaksin.^{56,57}

Hasil analisis genom *M.tuberculosis* H37Rv mendapatkan adanya 2 keluarga gen yang merupakan hampir 10% dari gen yang mengkode protein yaitu keluarga gen *pe* dan *ppe*. Kedua keluarga gen ini mempunyai urutan yang *highly conserved* pada N-terminal dengan 110 asam amino pada gen *pe* dan 180 asam amino pada gen *ppe*. Pada awalnya produk gen ini masih merupakan protein hipotetikal, namun pada literatur terbaru telah banyak diketahui perannya dalam meningkatkan ekskresi ESA T6, secara langsung dapat berikatan dengan TLR 2 dan menyebabkan apoptosis makrofag, mempengaruhi maturasi fagosom, mempengaruhi respon imun humoral dan sebagai pengatur kebutuhan energi.^{55,58}

Foamy macrophages yang terdapat dalam granuloma pasien TB ternyata mengandung lipid yang merupakan sumber nutrisi bagi *M.tuberculosis* pada saat berada di dalam granuloma.⁵⁹ Dalam keadaan *M.tuberculosis* persisten telah diketahui bahwa gen *mce4* yang mengkode sistem transport kolesterol mampu memberikan suplai karbon dan energi dari komponen pejamu.⁶⁰ Gen *igr* berperan dalam metabolisme kolesterol intraseluler.⁶¹ Peran gen *kstD* dalam menghambat pertumbuhan sel *M.tuberculosis* melalui inaktivasi jalur degradasi kolesterol membuktikan bahwa *M.tuberculosis* mampu mengakumulasi dan menggunakan kolesterol sebagai sumber karbon dan energi.^{62,63}

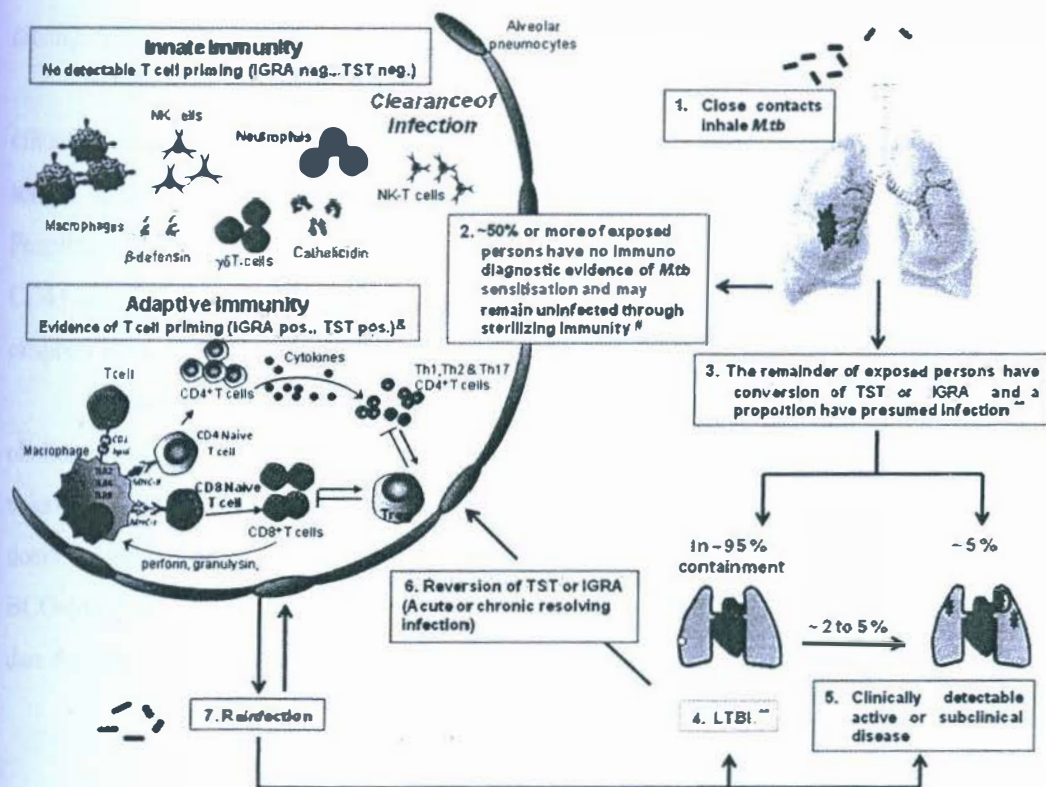
Genus *Mycobacteria* termasuk dalam kelompok bakteri Gram positif yang mengandung G dan C tinggi. Beberapa publikasi terakhir mendapatkan *M.bovis*, *M.marinum* dan *M.smegmatis* bila ditumbuhkan untuk waktu yang lama dan dalam fase stasioner membentuk "spora".^{62,64,65}

3.3. Respon Imun pada Infeksi *M.tuberculosis* dan Implikasinya dalam Pengembangan Vaksin TB

Secara garis besar, patogenesis TB dimulai dari masuknya *M.tuberculosis* yang terdapat dalam percikan dahak yang berukuran sangat kecil melalui saluran pernapasan sampai pada terminal alveolus dan selanjutnya difagositosis oleh makrofag alveolar, yang memproduksi sitokin inflamasi dan kimokin sebagai tanda adanya infeksi.⁴⁴ *M.tuberculosis* juga dapat menginfeksi sel nonfagositik seperti sel M, sel endotel alveolar, sel-sel epitel pneumosit tipe 1 dan 2.^{44,68-74} Pada fase awal infeksi ini terjadi replikasi intraseluler dan penyebaran bakteri ke kelenjar getah bening, alveolus dan bahkan organ

lain yang menyebabkan TB ekstraparu. Respon imun seluler terjadi dalam waktu 2-8 minggu setelah infeksi dan akan menghentikan multiplikasi *M.tuberculosis*. Sel limfosit T teraktivasi, makrofag dan sel imun lainnya akan membentuk granuloma yang membatasi penyebaran *M.tuberculosis*. Sebagian besar bakteri akan mati dan terdapat pada materi perkijuan di tengah granuloma, dan progresivitas penyakit terhenti. Namun demikian, tidak semua bakteri dapat dibasmi, yaitu *M.tuberculosis* yang mempunyai strategi efektif untuk menghindar dari proses imunologis dan dapat bertahan hidup serta persisten dalam keadaan nonreplikatif pada pejamu.^{75,76} Keberadaan *M.tuberculosis* dalam keadaan nonreplikatif dengan metabolisme minimal pada pejamu disebut sebagai infeksi TB laten. Berbagai penelitian telah menemukan bahwa banyak faktor yang berpengaruh dalam terjadinya infeksi TB laten, antara lain faktor pejamu yang meliputi mekanisme masuknya *M.tuberculosis*, respon imun pejamu terhadap *M.tuberculosis* (*innate* dan *adaptive immunity*) yang dipengaruhi komponen *M.tuberculosis* (mekanisme jalur presentasi antigen, fungsi makrofag, maturasi fagolisosom, apoptosis makrofag yang terinfeksi) dan faktor bakteri yang meliputi struktur dinding sel *M.tuberculosis* yang kaya lipid dan polisakarida, kemampuan *M.tuberculosis* menghindar dari fagosom /fagolisosome dan kemampuan toleransi atau mengubah metabolisme sesuai ketersediaan sumber karbon, oksigen dan perubahan pH.^{44,77-84}

Autofagi merupakan mekanisme awal yang terjadi pada infeksi *M.tuberculosis*, hal ini dipengaruhi respon imun alamiah dan didapat. IFN- γ yang merupakan sitokin dari jalur Th1 menginduksi terjadinya autofagi, sedangkan IL4 dan IL13 merupakan sitokin jalur Th2 menghambat autofagi pada murine dan makrofag manusia.⁶⁴ Imunitas terhadap TB terutama berhubungan dengan respon imun seluler Th1 yang ditandai dengan produksi dan pengeluaran IFN- γ , IL12 dan TNF- α . Defek genetik pada reseptor untuk IL12 dan IFN- γ meningkatkan kerentanan terhadap infeksi mikobakteri secara progresif. Pengobatan dengan antibodi monoclonal TNF- α pada penyakit rheumatoid arthritis dan penyakit Crohn menyebabkan reaktivasi TB laten.⁶⁴ Mice yang secara genetik defek dalam produksi IFN- γ (*gko mice*), walaupun dapat membentuk granuloma tetapi gagal memproduksi *nitric oxide* (NO) dan tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri intraseluler.⁸⁵



Gambar 2. Spektrum infeksi TB, siklus hidup *M.tuberculosis* dan imunopatogenesis TB paru⁴⁴

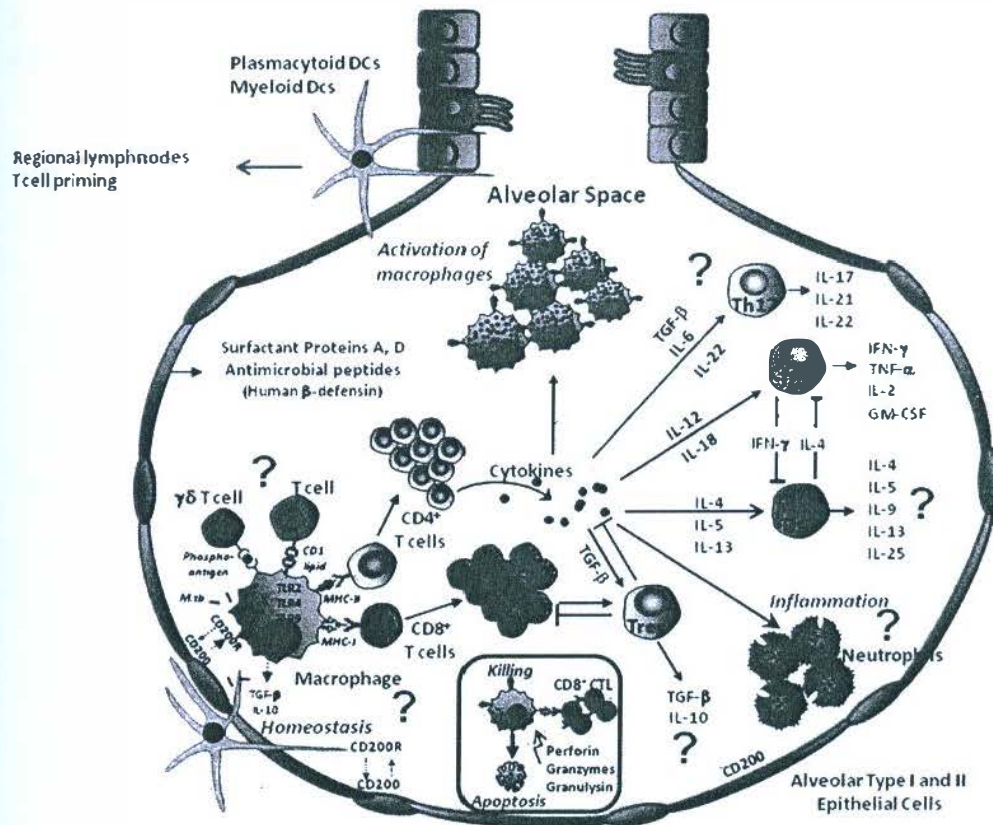
IL12 juga meningkatkan proteksi terhadap infeksi mikobakteri pada BALB/c yang rentan tetapi tidak terjadi pada gko mice. Hal ini membuktikan bahwa efek protektif dari IL12 tergantung dari IFN- γ . Hal yang sama juga terjadi pada cattle bahwa IL12 menginduksi imunitas protektif terhadap infeksi *M.bovis* hanya terjadi bila didapat kadar IFN- γ yang tinggi. In vitro, *M.bovis* menginduksi IL12 pada sel dendritik bovine berhubungan dengan respon dari stimulasi TH1-biased CD4+ T lymphocyte dan sekresi IFN- γ oleh sel NK dan limfosit $\gamma\delta$.⁸⁶⁻⁸⁸

Pada manusia, sel dendritik juga menghasilkan IFN- γ dari NK T cell, sumber utama IFN- γ pada awal pleuritis TB. Pada mice yang terinfeksi BCG, IL17 terdeteksi setelah 1 hari pada paru-paru. Sel $\gamma\delta$ merupakan sumber utama IL17, diikuti aktivasi IL23 yang diproduksi oleh makrofag dan sel dendritik. Sekresi IL17 oleh sel $\gamma\delta$ merupakan respon dari upregulasi Th1, respon netrofil inflamasi dan produksi IFN- γ oleh sel T. Limfosit paru2 pasien TB tipikal merupakan fenotipe Th1, menghasilkan IFN-

y walaupun Th2 subset telah diobservasi pada paru-paru pasien TB dengan kavitas dibandingkan dengan Th1 subset pada yang non kavitas.⁸⁶⁻⁸⁸

BCG merupakan satu-satunya vaksin tuberkulosis yang mempunyai berbagai efikasi dalam mencegah penyakit paru. Respon imun terhadap vaksinasi BCG belum semua terkarakterisasi dan pengetahuan tentang vaksinasi BCG juga belum lengkap. Penelitian yang ada menunjukkan bahwa vaksinasi BCG pada neonatal merangsang CD4+ dan CD8+ spesifik yang memproduksi sitokin. Vaksinasi BCG juga merangsang ekspresi IL-4 dan IL-10 dalam jumlah yang sedikit.⁸⁹

Efektifitas perlindungan pada imunisasi BCG pada penelitian tentang BCG challenge tidak hanya pada dosis tunggal namun juga dari interval imunisasi. Booster vaksin subunit MVA85A dan Ad85A gagal untuk menimbulkan efek proteksi pada BCG dosis tunggal. Bagaimanapun, efikasi pada skin produced oleh BCG dosis tunggal dan BCG-MVA 85A/Ad85A berkorelasi dengan respon pre-challenge CD4+ T cell pada PPD dan Ag85A.⁹⁰

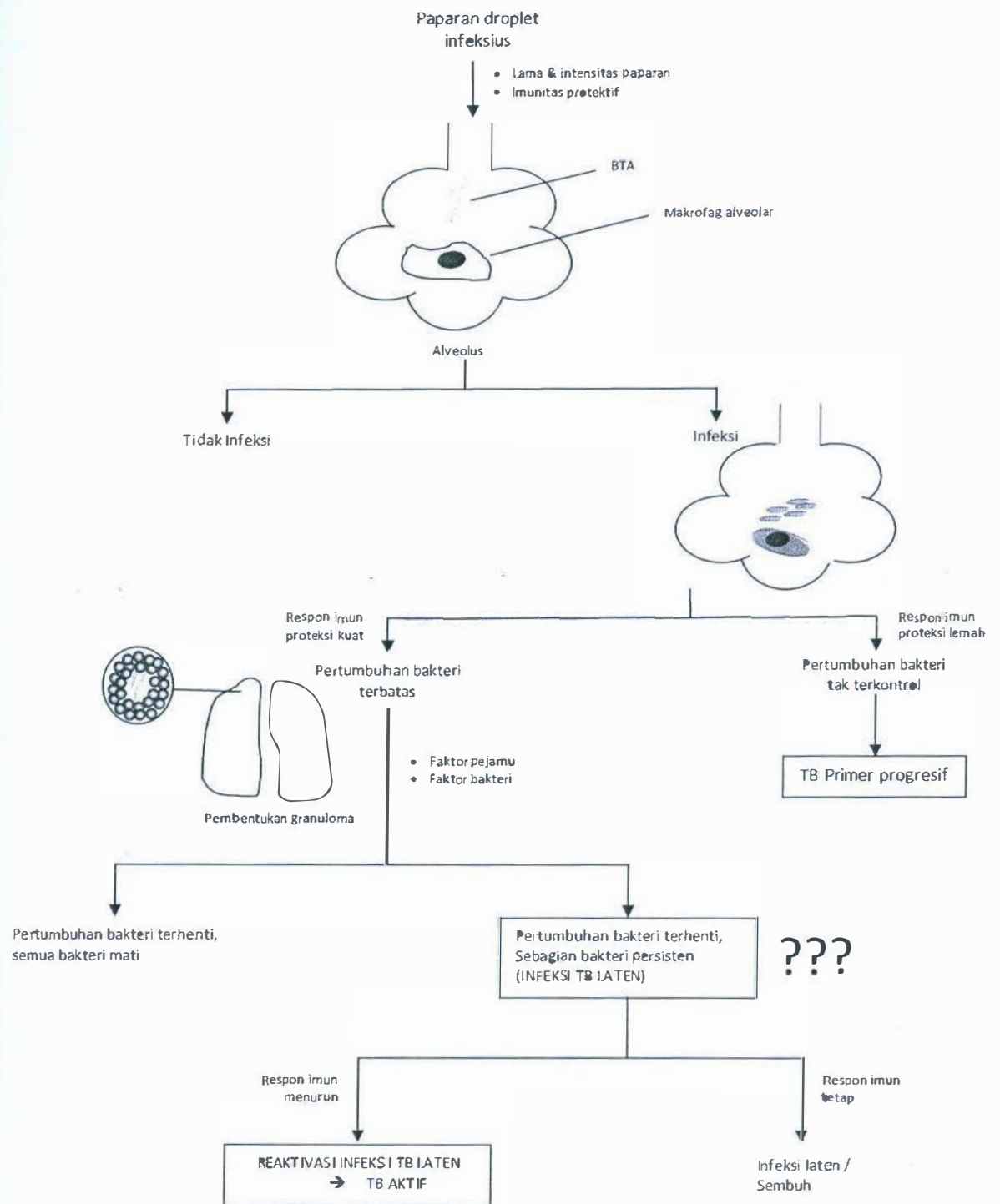


Gambar 3. Skema respon imun alamiah dan adaptif antimikobakteri pada sel bronkhoalveolar.⁴⁴

Peran sel B dalam sistem imun untuk mengatasi Mtb belum banyak diketahui. PPD spesifik MBCs (*mycobacteria-specific memory B-cells*) terdapat pada donor yang divaksinasi BCG tanpa menunjukkan adanya respon spesifik terhadap ESAT 6 dan CFP 10. Vaksinasi BCG dapat memicu respon MBC yang berjangka panjang. Sel B pada cairan pleura yang diambil dari pasien Tb aktif merespon antigen spesifik Mtb. Sel B dipertimbangkan membentuk respon imun terhadap Mtb melalui mekanisme APC, sitotoksicity, produksi sitokin dan *antibody dependent cell mediated cytotoxicity*.⁹¹

4. METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Kerangka Teori

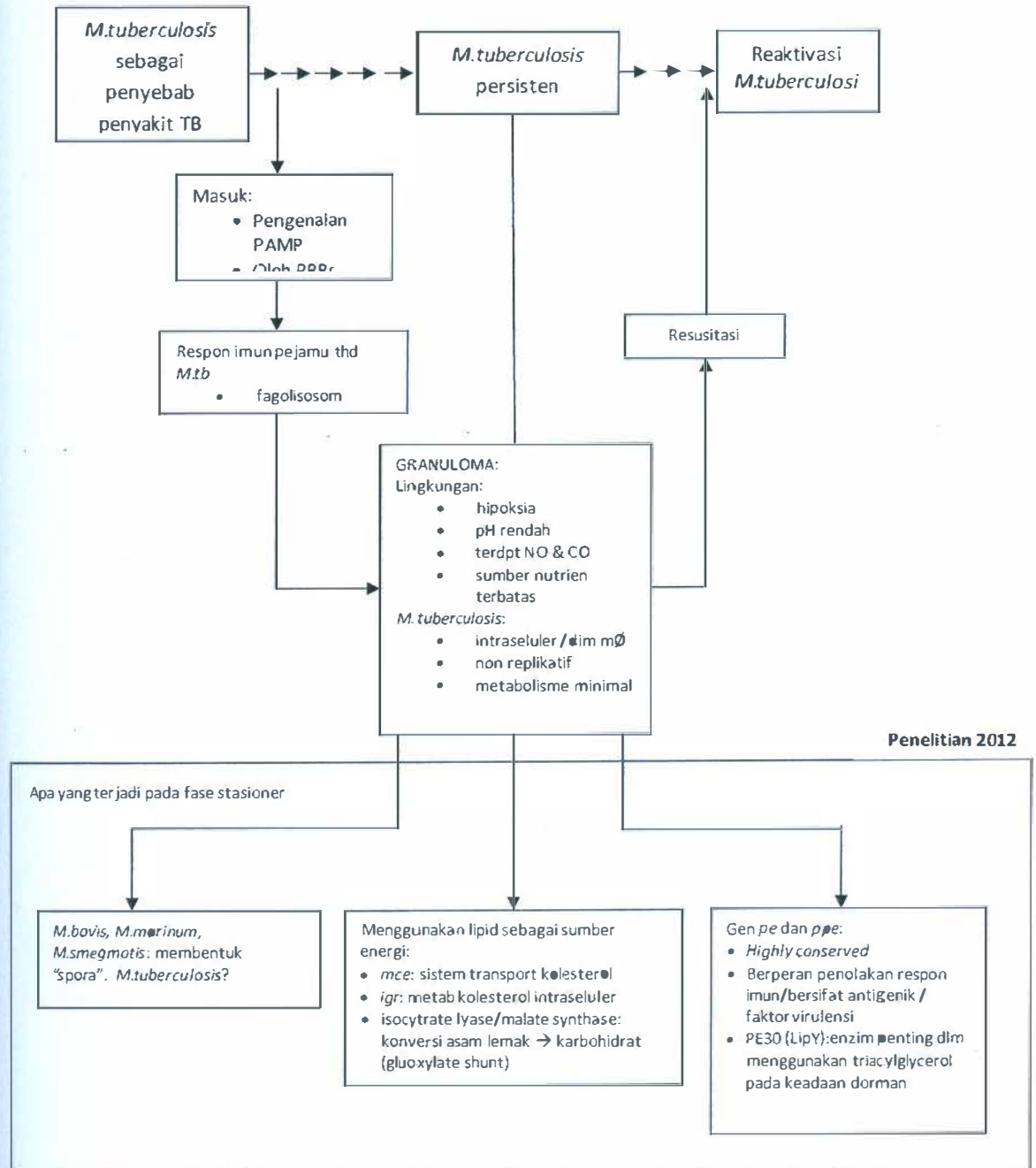


Gambar 4. Patogenesis infeksi tuberkulosis laten.

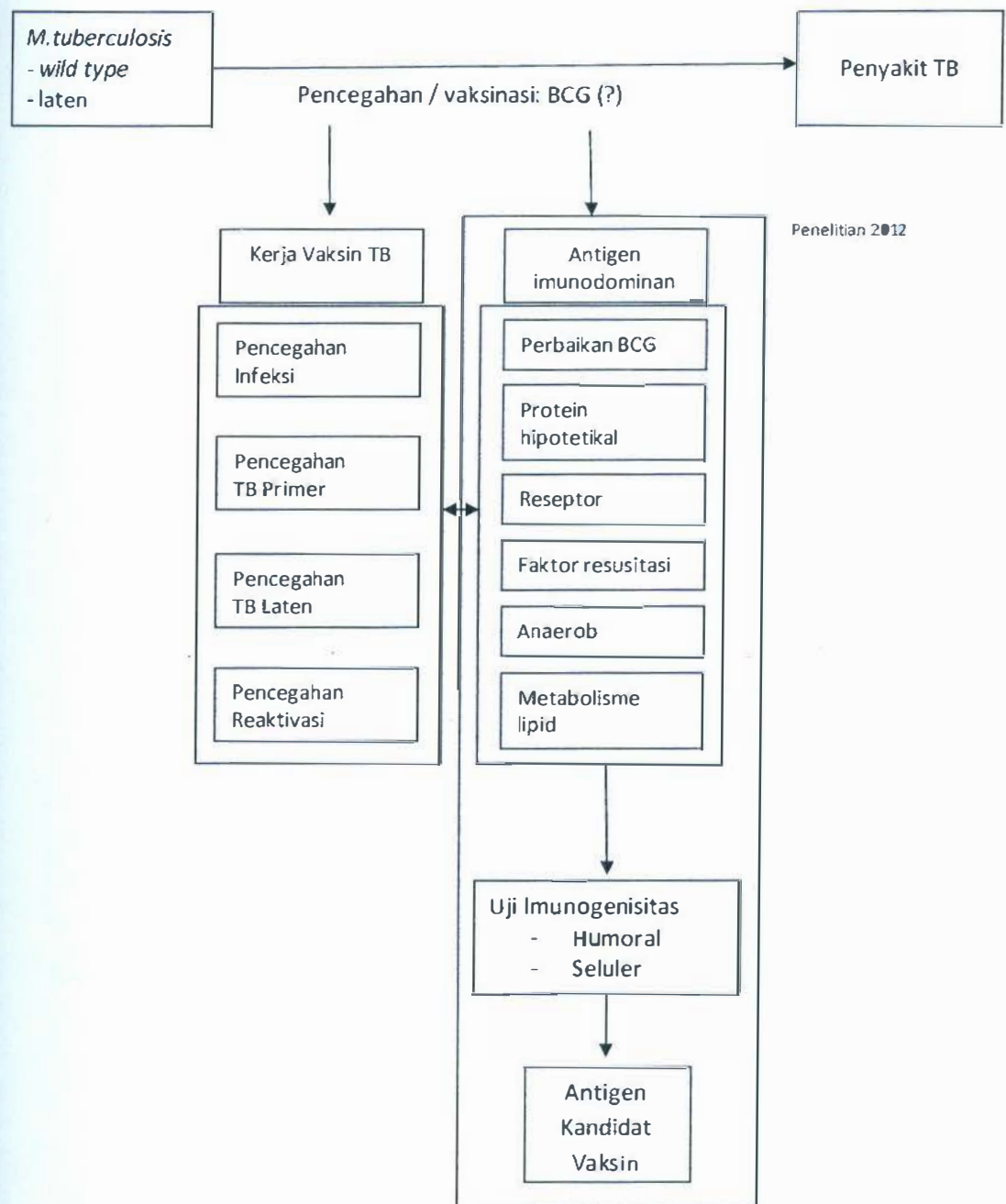
4.2. Kerangka Konsep

Kerangka konsep penyiapan kandidat antigen yang berpengaruh pada 4 (empat) sasaran vaksinasi, dengan pekerjaan laboratorium yang paralel yaitu kegiatan secara mikrobiologi dan biomolekuler.

Mikrobiologi

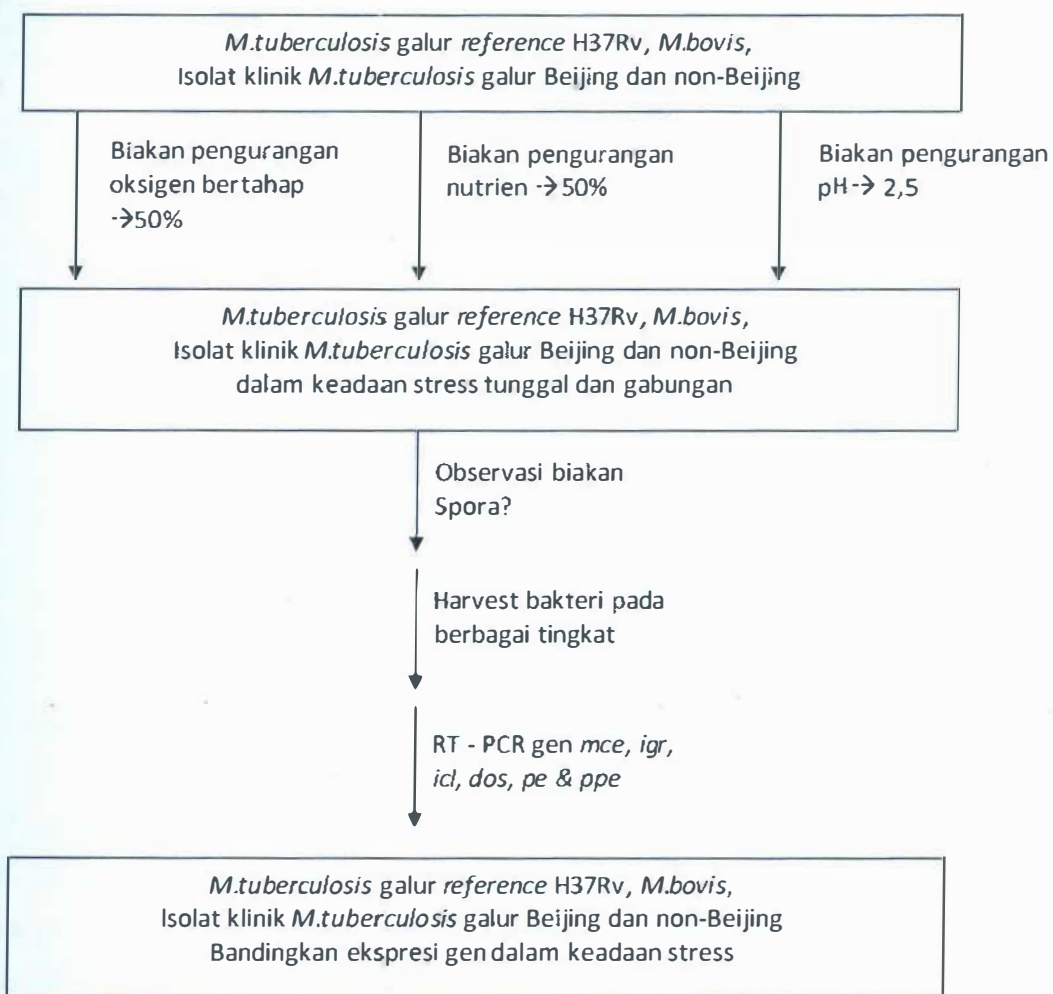


Gambar 5. Kerangka konsep penelitian Mikrobiologi *M.tuberculosis* dorman.

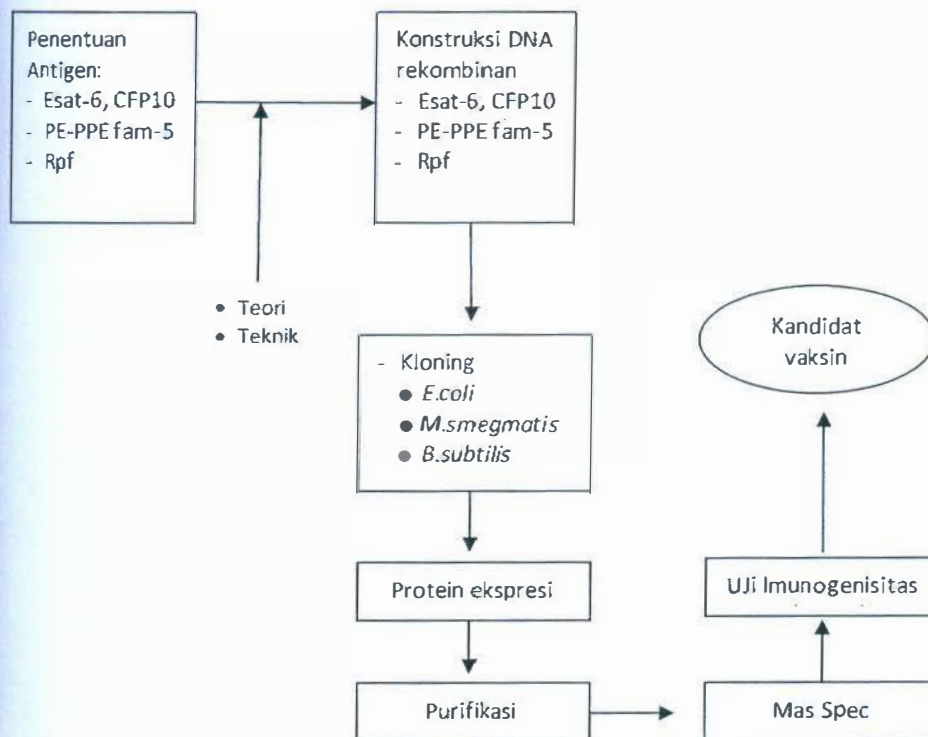


Gambar 6. Kerangka konsep penyiapan kandidat antigen vaksin TB

4.3. Alur Kerja



Gambar 7. Alur kerja penelitian menilai ekspresi gen pada keadaan stres

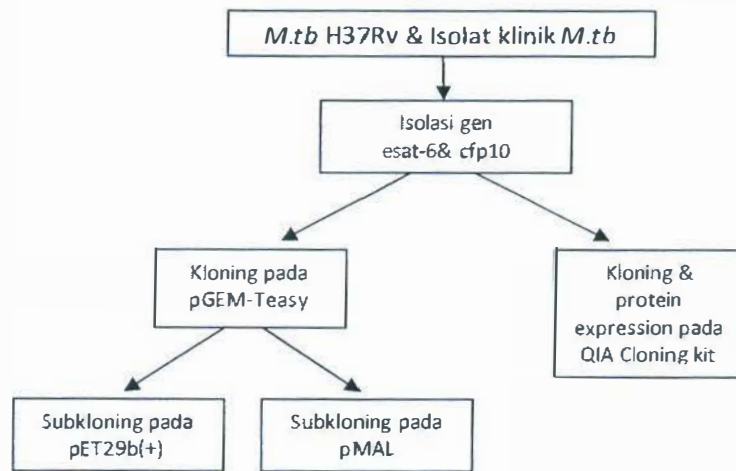


Gambar 8. Alur kerja penyiapan antigen - protein rekombinan

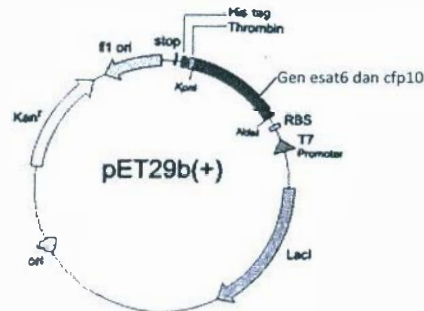
Tahap awal dalam kegiatan penelitian ini dilakukan penyiapan dua macam antigen yang diketahui merupakan antigen imunodominan yakni antigen Esat-6 dan CFP10. Gen pengkode kedua antigen ini akan diisolasi dari genom *M. tuberculosis reference strain* (H37Rv) sebagai pembanding dan dari isolat klinik *M. tuberculosis*. Gen Esat-6 dan CFP10 selanjutnya akan dikonstruksi pada vektor ekspresi sehingga dapat diproduksi sebagai protein rekombinan pada bakteri *E.coli*. Konstruksi vektor ekspresi akan dilakukan melalui dua tahapan yakni kloning pada vektor pGEM-T easy dan subkloning pada vektor ekspresi. Konstruksi-konstruksi yang dibuat ini selanjutnya akan digunakan untuk memproduksi antigen Esat-6 dan CFP10 untuk penelitian uji immunogenitas antigen lebih lanjut.

4.4. Konstruksi Vektor Ekspresi untuk Antigen Esat-6 dan CFP10

Rencana penelitian tahap konstruksi vektor ekspresi dapat dilihat secara sistematis pada gambar 7. Luaran penelitian dari tahap konstruksi vektor ekspresi ini berupa tiga macam konstruk (gen esat-6 pada vektor pET29b(+), gen cfp10 pada vektor pET29b(+)) dan gen esat-6 serta cfp10 pada vektor pMAL) seperti pada gambar 8.



Gambar 9. Rencana konstruksi vektor ekspresi untuk penyiapan antigen



Gambar 8. Output penelitian tahap konstruksi berupa konstruk yang digunakan untuk produksi antigen Esat-6 dan CFP10 pada bakteri *E.coli*

4.4.1 Desain Primer dan Rancangan Konstruksi Vektor Ekspresi

Sebagai langkah awal penyiapan antigen Esat-6 dan CFP10 dari *M. tuberculosis* H37Rv maupun dari isolat lokal dilakukan desain primer dan perancangan konstruksi vektor ekspresi. Desain primer mengacu pada beberapa penelitian produksi antigen rekombinan Esat-6 maupun CFP10 yang pernah dilakukan oleh peneliti sebelumnya. Calculator yang dapat diakses pada situs <http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>. Desain primer dilakukan dengan bantuan perangkat lunak. Pada ujung 5' primer *forward* maupun primer *reverse* ditambahkan sisi-sisi restriksi yang sesuai dengan vektor ekspresi yang akan digunakan yakni pET29b(+) untuk Esat-6 dan CFP10.

4.4.2. Isolasi Genom *M.tuberculosis* H37Rv

Genom *M.tuberculosis* strain H37Rv diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Patogenesis Klinik, Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung. Isolasi genom dilakukan dengan metode *baling lysis*. Koloni *M.tuberculosis* H37Rv yang tumbuh pada medium Ogawa diinokulasi ke dalam 400 μ L buffer AE di dalam *microtube* dan selanjutnya dipanaskan pada suhu 90°C selama 30 menit. Setelah itu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000g selama 15 menit. Supernatan yang berisi DNA genom *M. tuberculosis* H37Rv kemudian dipindahkan ke *microtube* baru.

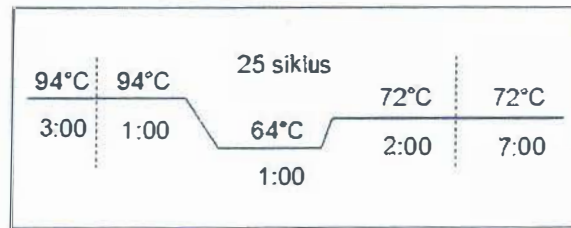
4.4.3. Isolasi Gen Pengkode Antigen Esat-6 dan CFP10 dari *M. tuberculosis* H37Rv dengan Metode PCR

Gen pengkode antigen Esat-6 dan CFP10 diisolasi dari DNA genom *M. tuberculosis* H37Rv dengan metode PCR. PCR dilakukan menggunakan alat *thermal cycler* menggunakan primer spesifik yang telah didesain. Komposisi reagen dan kondisi PCR yang digunakan untuk mengisolasi gen pengkode antigen Esat-6 dan CFP10 dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 9. Kontrol negatif digunakan untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi dalam campuran reaksi PCR. Komponen dan kondisi PCR yang digunakan ini mengacu pada penelitian-penelitian isolasi beberapa gen lain dari *M. tuberculosis* H37Rv yang pernah dilakukan sebelumnya.

Tabel 1. Komposisi Reagen PCR

Komponen	Konsentrasi Awal	Volume (μ L)	Konsentrasi Akhir
Cetakan DNA (Genom <i>Mtb</i> H37Rv)		1	
Dream Taq buffer*	10x	2.5	1x
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer forward	20 μ M	0.625	0.5 μ M
Primer reverse	20 μ M	0.625	0.5 μ M
Dream Taq polimerase	5 unit/ μ L	0.5	2.5 unit
Deion		19.25	
Total Reaksi PCR		25	

* Dream Taq buffer yang digunakan mengandung 20 mM MgCl₂



Gambar 11. Kondisi PCR yang digunakan

Hasil PCR dianalisis menggunakan metode elektroforesis pada gel agarosa 0.8%. Produk PCR dicampurkan dengan *loading dye* 6x menggunakan perbandingan 1 : 6. Campuran ini kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa yang telah dicetak dan direndam dalam *running buffer* TAE 1x. Elektroforesis dilakukan selama sekitar 45 menit dengan tegangan listrik konstan sebesar 90 Volt. GeneRuler 100 bp digunakan sebagai penanda ukuran DNA. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan di bawah lampu UV setelah gel agarosa direndam dalam larutan pewarna Etidium Bromida 10 mg/mL selama sekitar 10 menit.

4.4.4. Purifikasi Produk PCR

Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan QIAquick Gel Extraction Kit dari Qiagen. Tahapan purifikasi dilakukan sesuai manual dari Qiagen. Pita DNA yang memiliki ukuran yang sesuai dengan gen pengkode antigen Esat-6 dan CFPI0 dipotong dari gel agarosa dan dimasukkan ke dalam *microtube* 1.5 mL steril. Potongan gel agarosa ditimbang dan kemudian dicampur dengan 3x volum buffer QX1. Campuran dipanaskan dalam *waterbath* dengan temperatur 50°C selama 10 menit atau sampai gel larut sempurna. *Microtube* dibolak-balik setiap 2-3 menit selama pemanasan. Setelah gel larut sempurna, ditambahkan 1x volum isopropanol. Campuran ini kemudian dipindahkan ke kolom QIAquick spin yang telah dipasang pada tabung koleksi dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000g selama 1 menit. Cairan di dalam tabung koleksi dibuang, 750 µL buffer PE ditambahkan ke dalam kolom DF dan kolom disentrifugasi dengan kecepatan 14.000g selama 1 menit. Cairan di dalam tabung koleksi dibuang, kemudian dilakukan sentrifugasi kembali selama 3 menit untuk mengeringkan membran. Kolom QIAquick dipindahkan ke *microtube* steril yang baru. Pada bagian tengah membran kolom ditambahkan 30 µL *elution buffer* dan tabung diinkubasi pada temperatur ruang selama 5 menit. Kolom DF dipindahkan ke *microtube* 1.5 mL steril yang baru dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000g selama 1 menit untuk memperoleh DNA murni.

4.4.5 Pembuatan Sel Kompeten *E.coli* TOP10 dan BL21(DE3)

Untuk keperluan kloning maupun produksi antigen, sel kompeten *E.coli* strain TOP10 maupun BL21(DE3) dibuat terlebih dahulu dengan metode CaCl_2 (Sambrook dan Russell, 2001) yang dimodifikasi. Sel kompeten dibuat dari stok sel kompeten *E. coli* TOP10 maupun BL21(DE3). Sel *E.coli* diinokulasikan dengan teknik *four-way streak* pada medium LB padat kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 16-20 jam. Koloni tunggal *E. coli* yang tumbuh pada medium LB padat kemudian disubkultur pada medium LB cair sebanyak 2.5 mL di dalam tabung falcon. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 16-20 jam. Hasil kultur ini ditambah dengan 7.5 mL medium LB cair steril dan dikocok menggunakan *shaker* pada temperatur 37°C selama kurang lebih 1.5 jam.

Setelah nilai *optical density* pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) mencapai 0.35-0.45, kultur didistribusikan ke *microtube* sehingga masing-masing *microtube* berisi 1.5 mL kultur. Kultur di dalam *microtube* diletakkan di dalam es selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000g selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet diresuspensikan dengan 300 μL larutan CaCl_2 dingin yang mengandung 20% gliserol. Suspensi di dalam *microtube* disentrifugasi dengan kecepatan 4000g selama 10 menit dan supernatan yang terbentuk kembali dibuang. Pelet kemudian diresuspensikan dengan 50 μL larutan CaCl_2 dingin yang mengandung 20% gliserol dan disimpan pada freezer -80°C sampai digunakan.

4.4.6 Kloning pada Vektor pGEM-T easy

Gen Esat-6 dan CFPI0 kemudian dikloning pada vektor kloning pGEM-T easy. Ligasi dilakukan menggunakan kit ligasi dari Promega. Komposisi reagen reaksi ligasi dapat dilihat pada tabel 2. Semua komponen reaksi ligasi dimasukkan ke dalam *microtube* sehingga didapat volume akhir larutan 10 μL dan campuran diinkubasi pada temperatur 4°C selama 16-18 jam. Hasil ligasi ini akan menghasilkan plasmid rekombinan pGEM-T Esat-6 dan CFPI0.

Tabel 2. Komposisi reagen reaksi ligasi

Komponen	Konsentrasi Awal	Volume (µL.)	Konsentrasi Akhir
Buffer T4 DNA Ligase	10x	1	1x
Vektor pGEM-T easy	50 ng/µL	1	50 ng
Hasil purifikasi produk PCR	10 ng/µL	5	50 ng
T4 DNA Ligase	400 unit/µL	1	400 unit
Deion		2	

E.coli TOP10 kompeten yang telah dibuat dengan metode CaCl_2 selanjutnya ditransformasi menggunakan plasmid hasil ligasi. Transformasi dilakukan dengan metode *heat shock* berdasarkan protokol dari Sambrook dan Russell (2001) yang dimodifikasi. Sebanyak 5 µL DNA hasil ligasi dimasukkan ke dalam 50 µL suspensi sel kompeten *E.coli* TOP10. DNA hasil ligasi dan sel kompeten dicampur secara perlahan dan diinkubasi selama 30 menit di dalam es. Transformasi dilakukan dengan cara memberikan kejutan panas pada campuran sel kompeten dan DNA hasil ligasi di dalam *waterbath* temperatur 42°C selama 90 detik. Sel yang telah ditransformasi kemudian dimasukkan ke dalam es selama 2 menit, ditambah dengan 600 µL medium LB cair dan diinkubasi pada temperatur 37°C sambil dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100-200 rpm selama 2 jam hingga larutan menjadi keruh. Suspensi sel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000g selama 5 menit untuk mengumpulkan sel. Sebagian supernatan dibuang dengan mikropipet sehingga tersisa sekitar 100 µL cairan untuk meresuspensikan pelet.

Skrining biru putih dilakukan pada medium LB padat yang mengandung antibiotik ampisilin, IPTG dan X-gal. Sebanyak 2 µL IPTG dan 4 µL X-gal ditambahkan dengan teknik *spread* pada medium LB padat yang mengandung 100 µg/mL antibiotik ampisilin. 50 µL dari suspensi sel hasil transformasi kemudian dikultur dengan teknik *spread* pada medium yang telah disiapkan. Cawan petri yang berisi kultur diinkubasi pada temperatur 37°C selama 12-18 jam. Transforman yang membawa plasmid rekombinan pGEM-T Esat-6 atau CFP10 akan berwarna putih sehingga dapat dibedakan dari transforman yang membawa plasmid pGEM-T easy tanpa insersi gen (berwarna biru).

4.4.7. Isolasi Plasmid dan Analisis Restriksi

Isolasi plasmid dilakukan menggunakan *High Speed Plasmid Mini Kit* dari Fermentas. Transforman *E.coli* TOP10/pGEM-T Esat-6 maupun *E.coli* TOP10/pGEM-T CFP10 dikultur dalam 5 mL medium LB yang mengandung 100 mg/mL ampisilin dan

dikocok dengan kecepatan 200 rpm pada temperatur 37°C. Suspensi sel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000g selama 5 menit untuk mengumpulkan sel. Pelet sel diresuspensi menggunakan 200 µL larutan PD1, kemudian ditambahkan 300 µL larutan PD2 dan 300 µL larutan PD3. Campuran tersebut dibolak balik selama 10 kali, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000g selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam kolom PD, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000g selama 30 detik. Cairan di dalam tabung koleksi dibuang. Kemudian sebanyak 600 µL larutan W1 ditambahkan ke dalam kolom PD. Kolom PD disentrifugasi dengan kecepatan 14.000g selama 30 detik dan elusinya dibuang. Sebanyak 600 µL larutan wash buffer ditambahkan ke dalam kolom PD, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000g selama 30 detik dan cairan di dalam tabung koleksi kembali dibuang. Kolom PD kembali disentrifugasi dengan kecepatan 14.000g selama 3 menit dan elusinya dibuang. Sebanyak 30 µL elution buffer kemudian ditambahkan pada membran kolom PD dan diinkubasi selama 2 menit. Kolom PD dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 mL baru dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000g selama 2 menit.

Analisis restriksi dilakukan untuk memeriksa berhasil atau tidaknya ligasi gen Esat-6 dan CFP10 pada vektor pGEM-T easy. Restriksi dilakukan menggunakan enzim *EcoRI*. Plasmid pGEM-T easy memiliki 2 sisi restriksi enzim *EcoRI* yang mengapit daerah insersi DNA sisipan. Plasmid dipotong menggunakan enzim *EcoRI* mengikuti komposisi reagen reaksi restriksi pada tabel 3. *Microtube* yang berisi campuran reagen reaksi restriksi diinkubasi selama 12-16 jam pada temperatur 37°C dan hasil restriksi dianalisis dengan cara elektroforesis pada gel agarosa 1% menggunakan marka DNA 1 kb.

Tabel 3. Komposisi Reagen Reaksi Restriksi

Komponen	Konsentrasi Awal	Volume (µL)	Konsentrasi Akhir
<i>Buffer EcoRI</i>	10x	2	1x
Plasmid rekombinan pGEM-T	100 ng/µL	10	1 µg
Enzim <i>EcoRI</i>	20 unit/µL	1	20 unit
Deion		7	

4.4.8. Analisis Sekuensing

Plasmid yang diduga memiliki DNA sisipan gen Esat-6 dan CFPI0 disekuensing di Pusat Penelitian Nasional Penyakit Infeksi Badan Litbangkes. Plasmid pGEM-T Esat-6 maupun CFPI0 dapat disekuensing menggunakan primer-primer PCR atau menggunakan primer universal seperti T7 promoter dan SP6. Urutan nukleotida hasil sekuensing dianalisis menggunakan program-program bioinformatik seperti BLAST serta perangkat lunak Genetyx (Genetyx Corp, Japan).

4.4.9. Subkloning pada Vektor Ekspresi

Gen Esat-6 dan CFPI0 yang telah berhasil dikloning pada pGEM-T easy selanjutnya disubkloning pada vektor ekspresi pET29b(+) maupun pMAL. Plasmid pGEM-T easy Esat-6, pGEM-T easy CFPI0 dan pET 29b(+) dipotong menggunakan enzim *KpnI* dan *NdeI* mengikuti komposisi reagen reaksi restriksi pada tabel 4.

Tabel 4. Komposisi Reagen Reaksi Restriksi

Komponen	Konsentrasi Awal	Volume (μL)	Konsentrasi Akhir
Buffer 4	10x	2	1x
Plasmid rekombinan pGEM-T serta Plasmid pET 29b(+)	50 ng/μL	15	
Enzim <i>KpnI</i>		3.5	
Enzim <i>NdeI</i>		1.5	

Micronube yang berisi campuran reagen reaksi restriksi diinkubasi selama 16 jam pada temperatur 37°C dan hasil restriksi dianalisis dengan cara elektroforesis pada gel agarosa 0.8% menggunakan marka DNA 1 kb. Pita DNA hasil potongan pGEM-T easy Esat-6 dan pGEM-T easy CFPI0 dipotong dari gel dan dipurifikasi. Pita DNA pET 29b(+) yang telah dipotong enzim *KpnI* dan *NdeI* juga dipotong dari gel dan dipurifikasi. Hasil purifikasi vektor pET 29b(+) selanjutnya diligasikan dengan DNA sisipan Esat-6 dan CFPI0 sesuai komposisi ligasi pada tabel 5.

Tabel 5. Komposisi reagen reaksi ligasi

Komponen	Konsentrasi Awal	Volume (μL)	Konsentrasi Akhir
Buffer T4 DNA Ligase	10x	2	1x
Hasil purifikasi pET 29b(+)	50 ng/μL	2	100 ng
Hasil purifikasi DNA sisipan	10 ng/μL	10	100 ng
T4 DNA Ligase	400 unit/μL	2	400 unit
Deion		4	

Semua komponen reaksi ligasi dimasukkan ke dalam *microtube* sehingga didapat volume akhir larutan 20 μL dan campuran diinkubasi pada temperatur 4°C selama 16-18 jam. Hasil ligasi ini akan menghasilkan plasmid rekombinan pET 29b(+)Esat-6 dan pET 29b(+)CFP10. Hasil ligasi ini digunakan untuk mentransformasi *E.coli* TOP10 kompeten yang dibuat metode CaCl₂ sesuai metode transformasi pada subbab 4.4.7.

Hasil transformasi kemudian dikultur dengan teknik *spread* pada medium LB yang mengandung kanamycin 30 ng/μL. Cawan petri yang berisi kultur diinkubasi pada temperatur 37°C selama 12-18 jam. Transforman-transforman yang tumbuh kemudian disubkultur pada medium LB cair yang mengandung kanamycin 30 ng/μL dan selanjutnya dilakukan isolasi plasmid serta analisis restriksi menggunakan enzim *KpnI* dan *NdeI* sesuai subbab 4.4.8. Plasmid yang diduga positif mengandung gen Esat-6 maupun CFP10 selanjutnya disekuensing dengan primer T7 promotor untuk memastikan keberhasilan konstruksi.

4.5. Uji Immunogenitas

Uji imunogenitas protein rekombinan kandidat vaksin TB dilakukan secara bertahap, meliputi (1) pemeriksaan adanya antibodi terhadap antigen yang dibuat, (2) uji proliferasi splenosit dan (3) pemeriksaan produksi sitokin yang dihasilkan oleh sel limfosit T yang diinduksi dengan antigen. Ketiga jenis pemeriksaan tersebut dilakukan terhadap 3 (tiga) kelompok subjek penelitian yaitu kelompok kasus TB, kontak TB dan sehat.

Skrining untuk menentukan ketiga kelompok subjek penelitian berdasar beberapa parameter pada tabel 6.

Pemeriksaan awal meliputi pemeriksaan foto toraks, pemeriksaan Mantoux, pewarnaan BTA, dan biakan *M.tuberculosis*. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan laboratorium untuk menilai beberapa faktor yang dapat mempengaruhi respon imun,

seperti pemeriksaan pemeriksaan HIV, pemeriksaan darah lengkap, pemeriksaan urin lengkap, ureum, kreatinin, SGOT dan SGPT.

Tabel 6. Kriteria penentuan kelompok subjek penelitian

Skrining	Kasus TB paru	Kontak TB	Kontrol sehat
Klinis	Klinis sesuai TB	Tidak ada gejala	Tidak ada gejala
Foto toraks	Sesuai gambaran TB	Gambaran parenkhim paru dan pleura normal	Gambaran parenkhim paru dan pleura normal
PPD test		Positif (>15 mm)	Negatif (<15mm)
BTA	Positif	Negatif	Negatif
Kultur	Positif	Negatif	Negatif
Kontak TB (min 6 bulan)	?	Ada kontak dg kasus TB BTA pos	Negatif
Th/kurang 1 bulan	+		
Kesimpulan : Berdasarkan klinisi			

Prosedur operasional baku dalam pengambilan spesimen PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) dan pemeriksaan uji imunogenitas dapat dilihat pada lampiran.

Adapun pemeriksaan sitokin yang akan dinilai meliputi IFN- γ , TNF- α , IL12, IL6, IL2 dan IL4.

4.6. Penyiapan Isolat *M.tuberculosis* “dorman” in vitro

4.6.1. Prosedur operasional baku Subkultur *Mycobacterium tuberculosis* dari media Lowenstein Jensen.

Persiapan : Sebelum melakukan prosedur, semua petugas yang terlibat harus menggunakan jas lab, masker, dan sarung tangan. Semua prosedur dilakukan didalam laboratorium Biosafety Level 3.

Alat :

1. Botol Mc Cartney + glass beads yang sudah disteril
2. Ose Disposable 10 ul
3. Vorteks
4. Rak

5. Inkubator
6. Mikropipet
7. Pipettips

Bahan :

1. Isolat *Mycobacterium tuberculosis*
2. Aquadest steril

Cara kerja:

1. Petugas mempersiapkan botol mccartney + glassbead sejumlah strain yang ingin disubkultur
2. Petugas mengambil 1 sengkeli penuh koloni dari botol LJ, kemudian masukkan dalam botol Mccartney yang sudah berisi glassbead.
3. Vorteks tabung tersebut selama 1 menit
4. Diamkan selama 10 menit.
5. Dengan tindakan aseptik, tambahkan dengan aqudest steril 1 ml
6. Vorteks kembali tabung selama 1 menit
7. Diamkan tabung selama 10 menit
8. Ambil 100 ul supernatan kemudian inokulasi ke permukaan LJ
9. Tutup rapat botol LJ, ratakan inokulum dipermukaan LJ, longgarkan tutup botol LJ
10. Inkubasi botol pada kemiringan 30 °C dalam incubator pada suhu 35 – 37 °C
11. Setelah inkubasi 24 jam, kencangkan kembali tutup dan tegakkan botol LJ.
12. Lanjutkan inkubasi dan amati pertumbuhannya setiap minggu, hingga minggu ke 8 (delapan).

4.6.2. Subkultur *M. tuberculosis* dari TSB Gliserol atau skim milk.

1. Lakukan thawing pada isolat TB di TSB gliserol.
2. Vortex tabung yang berisi isolat, diamkan selama 10 menit.
3. Dengan menggunakan micropipet ambil 100 ul isolat *Mycobacterium tuberculosis* kemudian inokulasi ke permukaan medium Lowenstein Jensen. Setiap isolat di subkultur pada 10 medium Lowenstein Jensen.
4. Tutup rapat botol Lowenstein Jensen, ratakan inokulum dipermukaan Lowenstein Jensen, longgarkan tutup botol Lowenstein Jensen.

5. Inkubasi botol pada kemiringan 30 °C dalam incubator pada suhu 35 – 37 °C
6. Setelah inkubasi 24 jam, kencangkan kembali tutup dan tegakkan botol LJ.
7. Lanjutkan inkubasi dan amati pertumbuhannya setiap minggu hingga minggu ke 8.

4.6.3. Prosedur operasiona baku Pembuatan Medium Sauton

Alat :

1. Labu ukuran 30 ml
2. Autoclave
3. Pipet dispenser
4. Pipet volume 10 ml

Bahan :

- | | |
|------------------------------------|--------|
| 1. L-Aspargin | 4,0 g |
| 2. Citric acid | 2,0 g |
| 3. K ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| 4. MgSO ₄ | 0,5 g |
| 5. Triton WR 1339 | 0,25 g |
| 6. Ferric ammonium citrate | 0,05 g |
| 7. Glycerol | 40,0 g |

Persiapan Medium:

1. Campurkan kesemua bahan
2. Tambahkan distilled water atau aquabidest hingga volume mencapai 1.0 L.
3. Campur dengan baik
4. Masukkan 9 ml larutan medium ke dalam labu ukuran 30 cc.
5. Autoclave pada tekanan 15 psi suhu 121 °C selama 15 menit

Sumber: Handbook of medium clinical microbiology

Rencana kegiatan

Catatan: Untuk modifikasi sumber karbon yang terkait dengan Dormant TB, pada medium akan dilakukan modifikasi, dengan membuat medium sauthon yang memiliki gliserol 4gr, 8gr, 12gr, 16gr, 20gr, 24gr, 28gr, 32gr, 36gr, 40gr (modifikasi 1/10 dari kebutuhan)

Tabel 7. Rencana perlakuan modifikasi sub-kultur *M.tuberculosis* pada berbagai konsentrasi gliserol

H a r v e s t	← Modifikasi gliserol gr/L →									
	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
	1									
	2									
	3									
	4									
	5									

Tabel 8. Alur Pengerjaan Spesimen H37RV

Langkah kerja	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	Keterangan
Persiapan medium LJ	X													Di Labdu
Cek persiapan BSL3	X													alat, bahan, SOP, APD, spill kit, limbah
Kultur Isolat di LJ		X	X	X	X	X	X							Isolat dari skim milk, kultur di 30 LJ
Persiapan medium sauthon						X								Di Labdu, Dibuat 60 medium sauthon
Cek persiapan BSL3							X							alat, bahan, SOP, APD, spill kit, limbah
Kultur di medium sauthon								X						Sehari sebelumnya latihan alur kerja
Harvest I + ekstraksi mRNA									X					10 botol
Harvest II+ ekstraksi mRNA										X				10 botol
Harvest III+ ekstraksi mRNA											X			10 botol
Harvest IV + ekstraksi mRNA												X		10 botol
Harvest V + ekstraksi mRNA													X	10 botol

4.6.4. **Prosedur operasinal baku Kultur di Sauton Medium**

Prinsip kerja: Kultur dilakukan di dalam BSL3. Petugas menggunakan APD yang lengkap sesuai dengan kultur *Mycobacterium tuberculosis*. Pengerjaan kultur memperhatikan prinsip-prinsip Biosafety.

Alat :

1. Mikropipet
2. Pipet tip
3. Shaking inkubator
4. Secondary containment
5. Nephelometer
6. Vortex
7. Ose disposable
8. Plastik berklip
9. Absorben pad
10. Tabung kaca screw cap
11. Pipet Dispenser
12. Pipet Volume ukuran 10 ml

Bahan :

1. Kultur *Mycobacterium* dalam media L.J
2. Labu kultur berisi medium sauthon 9 ml dengan tutup karet
3. NaCl 0,1%
4. Methylene Blue

Cara Kerja :

1. Persiapkan 10 ml NaCl 0,5% ke dalam tabung kaca.
2. Tambahkan 1,5ug/ml Methylene blue, ke dalam medium sauthon.
3. Dengan menggunakan ose, ambil 1 ose penuh isolat *Mycobacterium tuberculosis* yang tumbuh dari medium L.J.
4. Masukkan ke dalam tabung kaca, dengan bantuan Nephelometer, buatlah larutan menjadi 0,5 McFarland
5. Vortex larutan tersebut.
6. Diamkan selama 10 menit.

7. Dengan menggunakan pipet dispenser ambil 1 ml larutan kemudian masukkan ke dalam labu yang berisi medium sauthon.
8. Vortex labu.
9. Diamkan selama 10 menit
10. Inkubasi kultur *Mycobacterium tuberculosis* di media sauthon dalam shaking inkubator pada suhu 37°C.
11. Amati pertumbuhan setiap minggu hingga 5 minggu.

Sumber dimodifikasi dari : *In Vivo Adaptation of the Wayne Model of Latent Tuberculosis*

4.6.5. Prosedur Ekstraksi RNA (Versi 1)

Bahan :

1. Trizol solution (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).
2. Lysing matrix B supplied in 2-mL screw-cap tubes (QBiogene, Inc., Irvine, CA) (see Note 2).
3. Fastprep 120 homogenizer (Qbiogene).
4. Phase lock gel (Eppendorf North America, nc., Westbury, NY).
5. Chloroform/isoamyl alcohol 24:1 (CIA).
6. Isopropanol.
7. High Salt Solution; 0.8M Na citrate, 1.2M NaCl.
8. RNase-free water.
9. 75% ethanol solution; make up with RNase-free water.

Cara Kerja:

1. Sentrifuge kultur selama 5 menit dengan kecepatan 2000 g pada temperature ruang.
2. Buang supernatant, dan segera proses RNA atau bekukan pada dry ice.
3. Tambahkan 1 mL Trizol pada pellet sel, letakkan dalam es
4. Larutkan kembali pellet dengan memvortex hingga tidak terdapat gumpalan
5. Tambahkan suspensi ke dalam tabung screw yang sudah berisi Lysing matrix (Buffer lisis) dan letakkan dalam es
6. Untuk menghancurkan sel dan mengeluarkan RNA, goyang selama 30 menit dengan menggunakan mesin Fastprep
7. Letakkan dalam es selama 30 detik untuk mendinginkan sampel.

8. Ulangi langkah 3 dan 4 hingga 2 kali.
9. Sentrifuge sampel selama 1 menit pada kecepatan 16.000 g
10. Buang larutan trizol ke dalam 2mL Heavy Phase Lock Gel 1 snap cap tube yang berisi 300 ul chloroform/isoamyl alcohol
11. Campurkan dengan membalik secara cepat selama 15 detik, dan letakkan dalam es. Sekali sampel ditransfer lakukan membalikkan tabung secara periodic selama 2 menit
12. Sentrifuge selama 10 menit pada suhu 4°C dan buang isopropanol
13. Tambahkan 1 mL 75% etOH, dan bolak balik beberapa kali, sentrifuge selama 5 menit pada kecepatan 16.000g dan tuangkan etanol
14. Tambahkan 100 uL RNase free water

Sumber : Isolation of Mycobacterial RNA

Tige R. Rustad, David M. Roberts, Reiling P. Liao and David R. Sherman

Prosedur operasional baku Ekstraksi mRNA *Mycobacterium tuberculosis* (alternatif Versi II by Kindi)

Ekstraksi RNA dilakukan dengan menggunakan prosedur yang disarankan oleh WHO. Isolasi RNA *M.tuberculosis* diambil dari kultur *M.tuberculosis* pada media Sauton. Sebanyak 200µl kultur *M.tuberculosis* pada media sauthon disiapkan kemudian dilakukan isolasi RNA dengan langkah utama sebagai berikut:

- 1) Kultur pada media sauthon yang disiapkan ditambahkan dengan 200 µl RNA *lysis solution* dan 2 µl 2-mercaptoetanol. Campuran tersebut kemudian divorteks.
- 2) Hasil pencampuran disentrifugasi pada 12000 g selama 2 menit pada suhu kamar.
- 3) Hasil sentrifugasi yang berupa supernatan dipindahkan ke tabung 1,5 ml yang bersih.
- 4) kedalam tabung ditambahkan 200 µl etanol 100% kemudian dilakukan resuspensi agar etanol tercampur dengan baik.
- 5) supernatan dan etanol dipindahkan ke dalam RNA *spin cartridge* tube untuk disentrifugasi pada 12000 g pada suhu kamar selama 15 detik. Setelah disentrifugasi, cairan yang ada di dalam *collection tube* di dalam spin cartridge dibuang lalu *collection tube* dipasang kembali.
- 6) ke dalam *spin cartridge* ditambahkan 700 µl *wash buffer 1* untuk mencuci. Lalu dilakukan sentrifugasi pada 12000G selama 15 detik dalam suhu kamar. Langkah 6, cairan dan *collection tube* nya dibuang.

- 7) Kemudian *spin cartridge* diletakan pada *RNA wash tube* yang bersih dan ditambahkan 500 μ l *wash buffer II* dan etanol ke dalam *spin cartridge*, lalu dilakukan sentrifugasi pada 12000G selama 15 detik dalam suhu kamar. Setelah disentrifugasi, cairan di dalam *wash tube* dibuang dan *wash tube* dipasang kembali. Kemudian langkah 8 diulang kembali.
- 8) kemudian dilakukan *spin cartridge* pada 12000 g selama 1 menit di dalam suhu kamar dengan tujuan mengeringkan membran pada *spin cartridge*.
- 9) Selanjutnya *collection tube* dibuang dan *spin cartridge* dimasukan ke dalam *recovery tube*.
- 10) dilakukan penambahan *RNAse free water* sebanyak 50 μ l ke dalam *spin cartridge*, diarahkan tegak lurus ke arah membran *cartridgelalu* diinkubasi selama 1 menit pada suhu kamar lalu dilakukan sentrifugasi pada 12000 g selama 2 menit pada suhu kamar.
- 11) Setelah sentrifugasi, *spin cartridge* dibuang sedangkan cairan yang ada di dalam *recovery tube* berisi RNA yang akan digunakan dalam penelitian dapat disimpan dalam *freezer* pada suhu -70°C .

4.6.6. Persiapan SDM untuk Bekerja pada Fasilitas BSL3

Tujuan Training :

1. Mempersiapkan tenaga laboratorium agar terampil dan siap bekerja di Biosafety Laboratorium Level 3 (BSL3).
2. Mengetahui APD yang dipergunakan untuk bekerja di BSL3, terampil mempergunakan dan melepaskan APD
3. Memahami cara masuk dan keluar BSL3
4. Memahami penanganan tumpahan yang mungkin terjadi di BSL3
5. Memahami penanganan limbah di BSL3
6. Mengetahui cara menghadapi bencana jika sedang bekerja di BSL3

Uraian :

Training persiapan masuk ke BSL3 difasilitasi oleh Penanggung jawab BSL3, dr Ni Ketut Susilarini, pada tanggal 27-29 November 2012. Training ini dipandu oleh Mr. Felix Gmuender dari Bessler&Hoffman, Singapura, perusahaan yang memberikan lisensi sertifikasi BSL3 Laboratorium Nasional Sri Oemijati.

Training dilakukan dengan metode teori dan praktek. Peserta diminta untuk membuat Risk assesment terhadap agen yang akan dikerjakan pada BSL3, SOP menggunakan alat pelindung diri dan melepaskan alat pelindung diri, cara masuk dan keluar BSL3 sesuai alur, SOP penanganan tumpahan, SOP penanganan limbah, dan SOP menghadapi bencana kebakaran dan gempa bumi. Pada hari terakhir peserta diminta melakukan uji coba pekerjaan laboratorium terkait dengan agen yang digunakan. Dari praktek tersebut diperoleh hal-hal yang perlu diperbaiki untuk menghindari bahaya agen infeksius saat bekerja. Fasilitator juga memberikan saran-saran perbaikan terhadap praktek yang dilakukan. Hal terpenting yang diharapkan adalah latihan berulang kali sebelum bekerja dengan agen infeksius di dalam BSL3, hingga petugas terampil dan siap bekerja di BSL3.

3. Pelaksanaan kegiatan dalam BSL3:

1. Selalu gunakan secondary container untuk membawa bahan yang infeksius
2. Disarankan menggunakan peralatan dari plastik, hindari menggunakan tabung dari kaca.
3. Jika terpaksa menggunakan tabung kaca, lappisi dengan plastik berklip.
4. Membersihkan peralatan yang akan masuk ke BSC dengan desinfektan boleh dilakukan atau tidak
5. Desinfeksi peralatan yang berada di BSC saat akan dikeluarkan dengan melapp permukaan peralatan dengan larutan desinfektan, tidak menyemprotnya.
6. Persiapkan spill kit sebelum bekerja
7. Dibutuhkan 10 L desinfektan saat bekerja
8. Untuk pekerjaan TB tidak perlukan mandi setelah bekerja di BSL3.

5. HASIL PENELITIAN

5.1. Penyiapan Antigen

5.1.1. Isolasi Gen Pengkode Antigen Esat-6 dan CFP10 dari *M. tuberculosis* H37Rv dengan Metode PCR

Gen *esat-6* dan *cfp10* diisolasi menggunakan primer yang telah ditentukan sebelumnya. Produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa dan hasilnya dapat dilihat pada gambar 12. Suhu *annealing* ini ditentukan berdasarkan T_m dari primer PCR yang digunakan. Hasil elektroforesis produk PCR gen *esat-6* menunjukkan adanya pita DNA berukuran antara 288bp, sesuai dengan panjang gen *esat-6*. Sementara itu produk PCR gen *cfp10* menunjukkan adanya pita DNA berukuran 303bp.



Gambar 12. Elektroforegram hasil isolasi gen *esat6* dan *cfp10* dari genom *M. tuberculosis* H37Rv menggunakan metode PCR yang dianalisis pada gel agarosa 1%. M:marker

Sebagai konfirmasi hasil PCR dilakukan sekuensing (Lampiran 1)

5.1.2. Kloning pada Vektor pGEM-T easy

Untuk konstruksi vektor ekspresi, gen *esx* dan *cfp10* yang telah diisolasi dengan metode PCR dari genom *M. tuberculosis* H37Rv selanjutnya dikloning pada vektor pGEM-T easy. Tahapan vektor yang dilakukan adalah seperti pada diagram di bawah

ini. Sel kompeten *E.coli* TOP10 dibuat sendiri menggunakan metode CaCl_2 . Hasil skrining biru putih transforman dapat dilihat pada gambar di bawah.



Gambar 13. Hasil skrining biru putih transforman pada medium LB padat yang mengandung ampisilin, IPTG dan X-gal. Untuk gen *esat-6* didapatkan 6 koloni biru dan 7 koloni putih

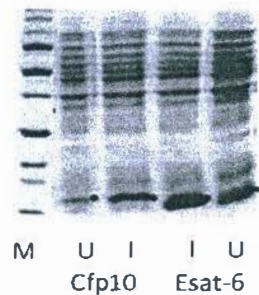


Gambar 14. Hasil skrining biru putih transforman pada medium LB padat yang mengandung ampisilin, IPTG dan X-gal. Untuk gen *CFP10* didapatkan 12 koloni biru dan 15 koloni putih

Koloni putih kemungkinan merupakan koloni *E.coli* TOP10 yang membawa plasmid pGEM-T easy dengan insersi sementara koloni biru kemungkinan merupakan koloni yang membawa plasmid pGEM-T easy tanpa insersi. Untuk mengkonfirmasi keberhasilan vector, dilakukan isolasi plasmid dari koloni-koloni yang berwarna putih. Plasmid yang diisolasi ini selanjutnya dianalisis restriksi dan disekuensing. Untuk gen *esx* maupun *cfp10* dipilih masing-masing 6 koloni putih untuk diisolasi plasmidnya. Analisis restriksi dilakukan menggunakan enzim *EcoRI*. Pada vector pGEM-T easy terdapat 2 sisi pengenalan *EcoRI* yang mengapit sisi insersi, sehingga analisis restriksi dengan enzim *EcoRI* dapat memberikan gambaran ada tidaknya DNA sisipan.

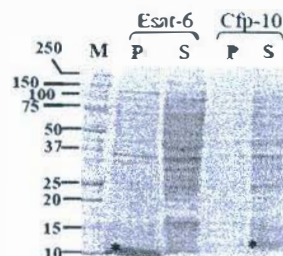
5.1.3. Ekspresi Protein Esat-6 dan Cfp10 pada *E.coli*

Sistem ekspresi protein yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan T7 Lac pada *E.coli* CE41(DE3) menggunakan plasmid pET29b+. Induksi dilakukan menggunakan larutan IPTG 1mM hingga densitas kultur mencapai OD 0,6 pada pembacaan spektrofotometri OD600. Hasil ekspresi protein dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 15. Ekspresi protein Esat-6 dan Cfp10 pada *E.coli* CE41(DE3) dari plasmid pET. I, induksi. U, tidak diinduksi (kontrol).

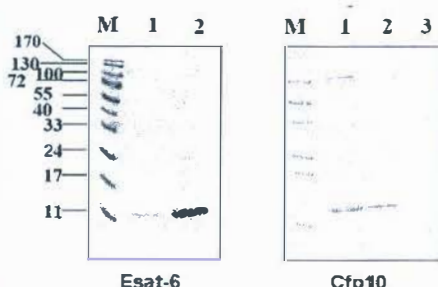
Selanjutnya dilakukan penilaian solubilitas protein rekombinan yang diproduksi dengan menumbuhkan dan melakukan induksi *E.coli* dengan IPTG. Setelah 4 jam induksi, dilakukan panen sel dengan sentrifugasi 10.000g dan dilisiskan menggunakan French Pressure Cell. Kemudian sel yang telah dilisiskan melalui tekanan tersebut di sentrifugasi 16.000g untuk memisahkan pellet dengan supernatant. Supernatan maupun pellet dilakukan SDS PAGE menggunakan gel poliakrilamid 12% untuk menilai protein rekombinan yang dihasilkan terdapat dalam supernatant atau pellet. Protein Cpf10 terdapat dalam supernatant yang menggambarkan bahwa protein tersebut merupakan protein yang disekresi, sedangkan protein Esat-6 terdapat dalam pellet yang merupakan protein inclusion bodies.



Gambar 16. Penentuan protein Esat-6 dan Cfp10 dalam pellet atau supernatant. M, marker; P, pellet; S, supernatant

5.1.4. Purifikasi Antigen menggunakan kolom afinitas

Pellet yang mengandung protein Esat-6 dilarutkan menggunakan larutan buffer solubilisasi dengan komposisi sebagai berikut: 8M urea, 100mM NaH₂PO₄ dan buffer 10mM Tris Cl, pH 8,0. Selanjutnya digunakan Ni-NTA column (Qiagen) untuk purifikasi protein Esat-6. Persiapan kolom 1 ml Ni NTA diberi buffer solubilisasi (8M urea, 100mM NaH₂PO₄ dan buffer 10mM Tris Cl, pH 8,0), kemudian diberi buffer pencuci (8M urea, 100mM NaH₂PO₄ dan 10 mM Tris Cl, pH 5,9). Selanjutnya protein dielusi menggunakan buffer elusi (8M urea, 100mM NaH₂PO₄ dan 10 mM Tris Cl, pH 4,5)



Gambar 17. Hasil purifikasi protein Esat-6 dan Cfp10
M, marker; 1,2,3 fraksi elusi yang berisi 1 ml

Protein Cfp10 yang terdapat dalam supernatant, dimasukkan dalam kolom Ni NTA yang telah diekuilibrasi dengan 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl dan 10 mM imidazole, pH 8,0. Kemudian dicuci dengan buffer 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl dan 20 mM imidazole, pH 8,0 dan protein Cfp10 di elusi menggunakan buffer 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl dan 250 mM imidazole, pH 8,0.

5.2. Persiapan Uji Immunogenitas

Persiapan Uji Immunogenitas dilakukan dengan pembuatan Prosedur Operasional Baku yang bertahap (dapat dilihat pada lampiran 2).

Penyiapan subjek penelitian dilakukan di RS Wafa Husada-Malang, meliputi skrining untuk mendapatkan kelompok Kasus TB, KONTAK TB dan Sehat melalui pemeriksaan klinis maupun laboratories. Hasil pemeriksaan terdapat dalam lampiran 3.

Optimasi biakan sel limfosit T yang diambil dari subjek penelitian telah dilakukan dengan berbagai kondisi dan didapatkan hasil optimum adalah inkubasi selama 5-8 hari dengan paparan dosis antigen sebesar 8 ug/ml dan 10 ug/ml.

Optimasi biakan sel limfosit T yang diambil dari subjek penelitian telah dilakukan dengan berbagai kondisi dan didapatkan hasil optimum adalah inkubasi selama 5-8 hari dengan paparan dosis antigen sebesar 8 ug/ml dan 10 ug/ml.

Pelaksanaan pemeriksaan flowsitometri dengan pewarnaan intraseluler akan dilaksanakan setelah didapat antigen dalam volume yang cukup dan dibuat dari isolat klinik *M.tuberculosis* yang telah dilakukan karakterisasi.

5.3. Persiapan pembuatan Isolat *M.tuberculosis* “dorman” in vitro

Persiapan awal berupa melakukan subkultur isolat *M.tuberculosis* H37Rv dan isolat klinik *M.tuberculosis* pada media Lowenstein Jensen yang telah dikarakterisasi.

Kursus petugas laboratorium yang akan masuk dalam laboratorium dengan fasilitas BSL3 telah dilaksanakan.

Persiapan media Sauton yang akan digunakan untuk melaksanakan biakan dalam kondisi media yang dimodifikasi dengan pengurangan kadar gliserol sebagai sumber nutrient esensial. Subkultur akan dilakukan dalam shaking incubator dan akan dilakukan pemantauan secara ketat, pengamatan dan pemanenan serta isolasi mRNA untuk dilakukan pemeriksaan Reverse Transcriptase PCR untuk menilai ekspresi gen yang berperan pada keadaan dorman.

6. PEMBAHASAN

Pembuatan protein rekombinan Esat-6 dan Cfp10 dilaksanakan menggunakan templat isolat *M.tuberculosis* H37Rv, pembuatan dengan isolat klinik *M.tuberculosis* yang telah dikarakterisasi diharapkan memberikan hasil serupa yang menyatakan bahwa kedua gen tersebut conserved.

Pelaksanaan uji imunogenitas telah mendapatkan metode yang optimum, segera dilaksanakan pemeriksaan produksi sitokin IFN- γ , TNF- α , IL4, IL12 dan IL6 menggunakan flowsitometri dengan pewarnaan intraseluler. Perbandingan hasil pada ketiga kelompok penelitian Kasus TB, Kontak TB dan Sehat akan memberikan gambaran sitokin yang dapat merupakan data dasar dari keadaan ketiga kelompok studi. Profile sitokin yang diperiksa pada kontak TB lebih menggambarkan keadaan TB laten, yaitu pernah terpapar *M.tuberculosis* namun tidak mempunyai gejala TB. Data dasar ini akan digunakan sebagai nilai rujukan untuk penelitian selanjutnya.

Pembuatan isolat *M.tuberculosis* "dorman" in vitro dilaksanakan setelah mendapat ijin pelaksanaan pada fasilitas BSL3 setelah selesai dilakukan dekontaminasi dan persiapan pengadaan shaking incubator. Hasil optimasi/subkultur pada isolat *M.tuberculosis* H37Rv pada media Lowenstein Jensen akan dilakukan subkultur pada medium Sauton. Observasi turbiditas tabung biakan akan dilakukan menggunakan nephelometer.

7. KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian Pengembangan Prototipe Sub-Unit Protein Kandidat Vaksin TB Tahap I tahun 2012, merupakan kegiatan awal sebagai persiapan dari kegiatan penelitian tahap selanjutnya. Pelaksanaan Tahap I sebagian besar meliputi pengadaan sarana prasarana dan kebutuhan reagen serta persiapan SDM pelaksana penelitian. Penelitian ini merupakan bagian dari Konsorsium Riset Vaksin TB yang terdiri dari 8 Institusi. Sinkronisasi dan harmonisasi kegiatan riset ini mempunyai nilai yang sangat berharga untuk pelaksanaan kegiatan selanjutnya.

Hasil kegiatan berupa : (1) protein rekombinan Esat-6 dan Cfp10 dari template isolat *M.tuberculosis* referens H37Rv yang akan diulang dan dibandingkan hasilnya dengan isolat klinik yang telah dikarakterisasi secara spoligotyping sebagai galur Beijing dan non Beijing; (2) pembuatan prosedur operasional standar untuk uji imunogenitas, skrining kelompok subjek penelitian, optimasi persiapan kultur limfosit T dari PBMC kelompok penelitian; (3) persiapan dan optimasi pelaksanaan pembuatan isolat *M.tuberculosis* "dorman" in vitro dengan melakukan subkultur isolat *M.tuberculosis* H37Rv pada medium Lowenstein Jensen dan medium Sauton.

Kegiatan Riset Vaksin TB merupakan penelitian yang bertujuan untuk menghasilkan suatu produk yang dapat dimanfaatkan oleh produsen vaksin berupa protein sub-unit merupakan kegiatan yang panjang dan terstandarisasi. Dukungan untuk kontinuitas penelitian ini sangat diharapkan termasuk kerjakeras bagi anggota Tim Peneliti yang masih memerlukan banyak bimbingan dan pembelajaran baik di dalam maupun di luar negeri. Kerjasama dengan berbagai pihak untuk meningkatkan kemampuan dan keterampilan sangat diharapkan dapat dilaksanakan dengan bantuan dan fasilitasi dari Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar kesehatan maupun Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

8. DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization, "Global tuberculosis control: surveillance, planning and financing," WHO/HTM/TB/2010.411, WHO, Geneva, Switzerland, 2010.
2. Jordao L, Vieira V. Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease. International Journal of Cell Biology. 2011. Article ID 403623, 13 pages. doi: 10.1155/2011/403623.
3. Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. BCG vaccines. Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protection efficacy. Human Vaccines. 2009;5:70-8.
4. Trunz BB, Fine B, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculosis meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. Lancet. 2006;367:1173-80.
5. Brewer TF. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccines: a meta-analysis of the literature. Clin Infect Dis. 2000;31:64-7.
6. Ahmad S. Pathogenesis, Immunology, and diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. Clinical and Developmental Immunology. 2011. Article ID 814943, 17 pages. doi: 10.1155/2011/814943.
7. Cardora PJ. New Insights on the Nature of Latent Tuberculosis Infection and its Treatment. Inflammation & Allergy – Drug Targets. 2006;6:27-39.
8. Russell DG, VanderVen BC, Lee W, Abramovitch RB, Kim M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* wears what it eats. Cell Host Microbe. 2010;8:68-76.
9. Manabe YC, Bishai WR. Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience, and winning by waiting. Nature Medicine. 2000;6:1327-9.
10. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998;393:537-44.
11. Garnier T, Eiglmeier K, Camus J-C, et al., "The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 100, no. 13, pp. 7877-7882, 2003.
12. Lalvani A. Diagnosing Tuberculosis Infection in the 21st Century. New Tools to Tackle on Old Enemy. Chest. 2007;131:1898-1906.
13. Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Growth at the Cavity Surface: a Microenvironment with Failed Immunity. Infection and Immunity. 2003;71:7099-108.
14. Wayne LG, Hayes LG. An In Vitro Model for Sequential Study of Shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through Two Stages of Nonreplicating Persistence. Infection and Immunity. 1996;64:2062-9.
15. Woolhiser L, Tamayo MH, Wang B, Gruppo V, Belisle JT, et al. In Vivo Adaptation of the Wayne Model for Latent Tuberculosis. Infection and Immunity. 2007;75:2621-5.
16. Hussain S, Malik M, Shi L, Gennaro ML, Drlica K. In Vitro Model of Mycobacterial Growth Arrest Using Nitric Oxide with Limited Air. Antimicrob. Agents Chemother. 2009;53:157-61.
17. Boon C, Li R, Qi R, Dick T. Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG Induced in the Wayne Dormancy Model. J of Bacteriol. 2001;183:2672-6.
18. Fine PE. Variation in protection by BCG: implication of and for heterologous immunity. Lancet. 1985;346:1339-45.

19. Brandt L, Feino CJ, Weinreich OA, Chilima B, Hirsch H, et al. Failure of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun*. 2002;70:672-8.
20. Demangel C, Garnier T, Rosenkrands I, Cole ST. Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. *Infect Immun*. 2005;73:2190-6
21. Hatherill M, Adams V, Hughes J. The potential impact of helminth infection on trial of novel tuberculosis vaccines. *Vaccine*. 2009;27:4743-4.
22. Sorensen AI, Nagai S, Housen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995;63:1710-7.
23. Berthet FX, Ramussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 1998;144:3195-203.
24. Kovak RA, Alexander DC, Liao R, Sherman DR, Beho MA. Region of Difference 2 Contribute to Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect and Immun*. 2011;79:54-60.
25. Leung AS, Tran V, Wu Z, Yu X, Alexander DDC, Gao GF, et al. Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. *BMC Genomics*. 2008;9:413. 12 pages. Doi:10.1186/1471-2164-9-413.
26. Bronck R, Gordon SV, Garnier T, Eigimeier K, Frigui W, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *PNAS*. 2007;104:5596-5601.
27. Nagata T, Koide Y. Induction of Specific CD8+ T Cells against Intracellular Bacteria by CD8+ T-Cell_Oriented Immunization Approaches. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;ID764542, 11 pages. Hindawi Publishing Corporation. doi:10.1155/2010/764542.
28. Torrado E, Cooper AM. What Do We Really Know about How CD4 T Cells Control *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos Pathogens*. www.plospathogens.org. 2011;7:e1002196.
29. Gilbert SC. T-Cell-inducing vaccine – what's the future. *Immunology*. 2011;135:19-26.
30. Sebire I, Cliff JM, Smith SG, Nogaro S, Webb EL, et al. Long-Lived Memory B-Cell Responses following BCG Vaccination. *PLOS ONE*. www.plosone.org. 2012;7:e51381.
31. Weir RE, Black GF, Nazareth B. The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to bacilli Calmette-Guerin vaccination in southern England and northern Malawi. *ClinExpImmunol*. 2006;146:390-9.
32. Hatherill M, Adams V, Hughes J. The potential impact of helminth infection on trial of novel tuberculosis vaccines. *Vaccine*. 2009;27:4743-4.
33. Dye C, Williams BG. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science*. 2010;328:856-61.)
34. Caws M, Thwaites G, Dunstan S. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoSPathog*. 2008;4:e1000034.

35. Grode L, Seiler P, Baumann S, et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest.* 2005;115:2472-9.
36. Abel B, Tameris M, Mansoor N, Gelderbloem S, Hughes J, Abrahams D, et al. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010;181:1407-17. doi: 10.1164/rccm.200910-1484OC.
37. Wang J, Santosuosso M, Ngai P, Zganiacz A, Xing Z. Activation of CD8 T cells by mycobacterial vaccination protects against pulmonary tuberculosis in the absence of CD4 T cells. *J. Immunol.* 2004; 173:4590-7.
38. Aagaard C, Hoang T, Dietrich J, Cardona PJ, Izzo A, Dolganov G, et al. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat Med.* 2011;17:189-94. doi: 10.1038/nm.2285.
39. Billeskov R, Elvang TT, Andersen PL, Dietrich J. The HyVac4 Subunit Vaccine Efficiently Boosts BCG Primed Anti-Mycobacterial Protective Immunity. *PLoS ONE* 7(6): e39909. doi:10.1371/journal.pone.0039909.
40. von Reyn CF, Bakari M, Arbeit RD, Lahey T, Ramadhani A, Egwaga S. New vaccines for the prevention of tuberculosis in human immunodeficiency virus infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16:718-23.
41. Vilaplana C, Gil O, Caceres N, Pinto S, Diaz J, Cardona PJ. Prophylactic effect of a therapeutic vaccine against TB based on fragments of *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos ONE.* 2011;6:e20404. doi:10.1371/journal.pone.0020404.
42. Lienhardt C, Fruth U, Grego M. The blueprint for vaccine research and development: Walking the path for better TB vaccines. *Tuberculosis.* 2012;92S1:533-5.
43. Ottenhoff THM, Elinor JJ, Kaufmann SHE. Ten challenges for TB biomarkers. *Tuberculosis.* 2012;92S1:517-20.
44. Schwander S, Dheda K. Human Lung Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* Insights into Pathogenesis and Protection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:696-707.
45. Gilbert SC. T-cell-inducing vaccines – what's the future. *Immunology.* 2011;135:19-26.
46. Dietrich J, Aagaard C, Leah R, Olsen AW, Stryhn A, Doherty MT, Andersen P. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B Fusion Molecule-Based Tuberculosis Subunit Vaccine: Efficient Protection and ESAT6-Based Sensitive Monitoring of Vaccine Efficacy. *J Immunol.* 2005;174:6332-6339.
47. Hasan Z, Jamil B, Ashraf M, Islam M, Yusuf MS, Khan JA, et al. ESAT6-Induced IFN γ and CXCL9 Can Differentiate Severity of Tuberculosis.....)
48. Shen GH, Chiou CS, Hu ST, Wu KM, Chen JH. Rapid Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Combining the ESAT-6/CFP-10 Immunochromatographic Assay and Smear Morphology. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011;49: 902-7.
49. Tharad M, Samuchiwal SK, Bhalla K, Ghosh A, Kumar K, Kumar S, Ranganathan A. A Three-Hybrid System to Probe In Vivo Protein-Protein Interactions: Application to the Essential Proteins of the RDI Complex of *M. tuberculosis*. *Plos One.* 2011; 6:11.
50. Lightbody KL, Ilghari D, Waters LC, Carey G, Bailey MA, Williamson RA, Renshaw PS, Carr MD. Molecular Features Governing the Stability and Specificity of

- Functional Complex Formation by *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10/ESAT-6 Family Proteins. The Journal of Biological Chemistry. 2008; 283:17681–90.
51. Yermeev Y, Kondratieva TK, Rubakov EI, Petrovskaya SN, Kazarin KA, Telkov MV et al. Proteins of the Rpf Family: Immune Cell Reactivity and Vaccination Efficacy against Tuberculosis in Mice. Infect. Immun. 2003;58: 4789-94.
 52. Davandra KB & Mizhari V. Mini Review: Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling, FEMS Immunol Med Microbiol. 2010;58:39-50.
 53. Kana BD, Gordhan BG, Downing KJ, Sung N, Vostroktunova G, Machowski EE et al. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. Molecular Microbiology. 2008; 67: 672-84.
 54. Zvi A, Ariel N, Fulkerson J, Sadoff JC, Shafferman A. Whole genome identification of *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates by comprehensive data mining and bioinformatic analyses. BMC Medical Genomics. 2008; 1:18.
 55. Sampson SL. Mycobacterial PE/PPE Proteins at the Host-Pathogen Interface. Clinical and Development Immunology. 2011. Article ID 497203, 11 pages. Doi:10.1155/2011/497203.
 56. Cuccu B, Freer G, Genovesi A, Garzelli C, Rindi L. Identification of a human immunodominant T-cell epitope of mycobacterium tuberculosis antigen PPE44. BMC Microbiology 2011, 11:167. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/167>
 57. Bonanni D, Rindi L, Lari N, Garzelli C. Immunogenicity of mycobacterial PPE44 (Rv2770c) in *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. Journal of Medical Microbiology. 2005;54:443–448
 58. Mishra KC, deChastellier C, Natayana Y, Bifani P, Brown AK, et. Al. Functional Role of the PE Domain and Immunogenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* Triacylglycerol Hydrolase LipY. Infection and Immunity. 2008;76:127-40.
 59. Peyron P, Vaubourgeix, Poguët Y, Levillain F, Botanch C, et.al. Foamy Macrophages from Tuberculous Patients' Granulomas Constitutes a Nutrient-Rich Reservoir for *M. tuberculosis* persistence. Plos Pathogen 2008;4:e1000204. www.plospathogen.org.
 60. Pandey AK, Sasseti CM. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. PNAS 2008;105:4376-80.
 61. Chang JC, Miner MD, Pandey AK, Gill WP, Harik NS, et.al. *igr* Genes and *Mycobacterium tuberculosis* Cholesterol Metabolism. J of Bacteriol. 2009;191:5232–9.
 62. Brzostek A, Pawelczyk J, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B, Dziadek J. *Mycobacterium tuberculosis* Is Able To Accumulate and Utilize Cholesterol. J of Bacteriol 2009;191:6584–91.
 63. Yam KC, D'Angelo I, Kalschauer R, Zhu H, Wang JX, et.al. Studies of a Ring-Cleaving Dioxygenase Illuminate the Role of Cholesterol Metabolism in the Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. Plos Pathogen 2009;5:e1000344. www.plospathogen.org.
 64. Harris J, Master SS, DeHaro SA, Delgado M, Robert EA, Hope JC, et al. Th1-Th2 polarisation and autophagy in the control of intracellular mycobacteria by macrophages. Vet. Immunopathol. 2009;128:37-43.
 65. Singh B, Ghosh J, Islam NM, Dasgupta S, Kirsebom LA. Growth, cell division and sporulation in mycobacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 2010;98:165-77.

66. Ghosh J, Larsson P, Singh B, Pettersson BMF, Islam NM, et al. Sporulation in mycobacteria. 2009;106:10781-6.
67. Wayne LG, Hayes LG. An In Vitro Model for Sequential Study of Shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through Two Stages of Nonreplicating Persistence. *Infection and Immunity*. 1996;64:2062-9.
68. Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infection and Immunity*. 1996;64:1400-06.
69. Teitelbaum R, Schubert W, Gunther L, et al. The M cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*. 1999;10:641-50.
70. Bermudez LE, Sangari FJ, Kolonoski P, Petrofsky M, Goodman J. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infection and Immunity*. 2002;70:140-6.
71. Danelishvili L, McGarvey J, Li Y-J, Bermudez LE. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cellular Microbiology*. 2003;5:649-60.
72. Garcia-Perez BE, Mondragon-Flores R, Luna- Herrera J. Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells. *Microbial Pathogenesis*. 2003;35: 49-55.
73. Mehta PK, Karls RK, White EH, Ades EW, Quinn FD. Entry and intracellular replication of *Mycobacterium tuberculosis* in cultured human microvascular endothelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 2006;41:119-24.
74. Kinhikar AG, Verma I, Chandra D, et al. Potential role for ESAT6 in dissemination of *M. tuberculosis* via human lung epithelial cells. *Molecular Microbiology*. 2010;75:92-106.
75. Dye C, Williams BG. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science*. 2010;328:856-61.
76. Caws M, Thwaites G, Dunstan S. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000034.
77. Ann M. Kerrigan and Gordon D. Brown. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology*. 2009;214:562-75
78. Clemens DL, Horwitz MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* Phagosome and Evidence that Phagosomal Maturation Is Inhibited. *J. Exp. Med*. 1995;181:257-270.
79. Galhardo RS, Hastings PJ, Roseberg SM. Mutation as a Stress Response and the Regulation of Evolvability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2007;42:399-435.
80. Boshoff HIM, Barry CE. Tuberculosis – metabolism and respiration in the absence of growth. *Nature Rev Microbiol*. 2005;3:70-80.
81. McKinney JD, Bentrup KH, Elias EJM, Miczak A, Chen B, Chan WT, et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*. 2000;406:735-738.
82. Muñoz-Elías EJ, Timm J, Botha T, Chan W-T, Gomez JE, McKinney JD. Replication Dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Chronically Infected Mice. *Infection and Immunity*. 2005;73:546-551.

83. Raman S, Song T, Puyang X, Bardarov S, Jr WRJ, Husson RN. The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress response in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 2001;183:6119-25...
84. Boshoff H, Lun DA. System Biology approaches to understanding mycobacterial survival mechanisms. Drug Discov Today Dis Mech. 2010;7:e75-e82. doi:10.1016/j.ddmec.2010.09.008.
85. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J. Exp. Med. 1993;178:2249-54.
86. Deretic V, Delgado M, Vergne I, Master S, DeLlano S, Ponpuak M, Singh S. Autophagy in Immunity Against *Mycobacterium tuberculosis*: a Model System to Dissect Immunological Roles of Autophagy. Curr Top Microbial Immunol. 2009;335:169-88. doi:10.1007/978-3-642-00302-8_8.
87. Saitoh T, Akira S. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. J. Cell Biol. 2010;189:925-35.
88. Meraviglia S, Daker SE, Dieli F, Martini F, Martino A. $\gamma\delta$ T Cells Cross-Link Innate and Adaptive Immunity in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Clinical and Developmental Immunology. 2011;article ID 587315, 11 pages. doi:10.1155/2011/587315.
89. Soares AP, Thomas JS, Sarah J, et al. Bacille Calmette Guerin Vaccination of Human Newborns Induces T Cells With Complex Cytokine and Phenotypic Profiles. J. Immunol. 2008;180(5):3569-3577.
90. Minassian AM, Edward O R, Hazel P, Adrian V S H, Helen M, Preclinical Development of an In Vivo BCG Challenge Model for Testing candidate Tb Vaccine Efficacy. Plos ONE 6(5): e19840. doi:10.1371/2011/0019840
91. Sebina I, Jacqueline M C, Steven G S, et al. Long-Lived Memory B-Cell Responses following BCG Vaccination. Plos ONE 7(12):e51381. doi:10.1371/2012/0051381.

BIODATA KETUA PELAKSANA

NAMA PENGUSUL (lengkap dengan gelar kesarjanaan dan keahlian) DR. Francisca Srioetami Tanoerahardjo, dr., SpPK., M.Si
ALAMAT (yang mudah dihubungi lewat pos, faks, telepon dan e-mail) Apartemen Cityloft Sudirman Unit 2721. Jalan KH Mas Mansyur Jakarta Pusat HP: 08112211615, e-mail: srioetami@gmail.com
PENDIDIKAN PROFESIONAL (Gelar Akademis, nama institusi/lambaga dan tempat serta waktu/tanggal/tahun diperoleh) Profesi Dokter Spesialis Patologi Klinik, Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran, Bandung. 9 Januari 1996. Doktor Ilmu Kedokteran dengan konsentrasi Mikrobiologi dan Parasitologi, Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran, Bandung. 30 Nopember 2009.
RIWAYAT PEKERJAAN (mulai dari dijabat sekarang, diutamakan yang berhubungan dengan penelitian). 2010 – sekarang: Peneliti Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes 2011 – sekarang: Kepala Instalasi Penelitian dan Pengembangan RS Paru Dr. H.A. Rotinsulu – Bandung 1998 – 2011: Kepala Instalasi Laboratorium RS Paru Dr. H.A. Rotinsulu – Bandung 1996 - 1998 : Kepala Instalasi Laboratorium RSUD Dr. Slamet – Garut 1991 - 1996 : Residen Patologi Klinik RSHS/Universitas Padjadjaran 1983 – 1991 : Dokter RS Sariningsih, KESDAM III/Siliwangi
PUBLIKASI : • Polymerase Chain Reaction of Pleural Fluid is a Useful Method for Diagnosis of Tuberculous Pleural Effusion, 2004. • Application of a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Insertion Sequence, IS6110 and MPB64 as a Diagnosis Method for Pulmonary Tuberculosis in Bandung, Indonesia, 2006. • Detection of Drug Resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> using Low-Cost Colorimetric Method, 2007. • Hubungan Pemanfaatan Epidemiologi Molekuler dalam Patogenesis Penyakit Tuberkulosis dengan Upaya Eradikasi Tuberkulosis di Kota Bandung, 2008 • Detection of Rifampicin and Isoniazid in Clinical Isolates of MDR-TB cases by Two Colorimetric Methods Resazurin and Nitrate Reductase Assays. RS Paru Dr. H.A. Rotinsulu, 2009

BIODATA KETUA PELAKSANA

NAMA PENGUSUL (lengkap dengan gelar kesarjanaan dan keahlian) DR. Francisca Srioetami Tanoerahardjo, dr., SpPK., M.Si
ALAMAT (yang mudah dihubungi lewat pos, faks, telepon dan e-mail) Apartemen Cityloft Sudirman Unit 272 I. Jalan KH Mas Mansyur Jakarta Pusat HP: 08112211615, e-mail: srioetami@gmail.com
PENDIDIKAN PROFESIONAL (Gelar Akademis, nama institusi/lambaga dan tempat serta waktu/tanggal/tahun diperoleh) Profesi Dokter Spesialis Patologi Klinik, Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran, Bandung. 9 Januari 1996. Doktor Ilmu Kedokteran dengan konsentrasi Mikrobiologi dan Parasitologi, Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran, Bandung. 30 Nopember 2009.
RIWAYAT PEKERJAAN (mulai dari dijabat sekarang, diutamakan yang berhubungan dengan penelitian). 2010 – sekarang: Peneliti Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes 2011 – sekarang: Kepala Instalasi Penelitian dan Pengembangan RS Paru Dr. H.A. Rotinsulu – Bandung 1998 – 2011: Kepala Instalasi Laboratorium RS Paru Dr. H.A. Rotinsulu – Bandung 1996 - 1998 : Kepala Instalasi Laboratorium RSUD Dr. Slamet – Garut 1991 - 1996 : Residen Patologi Klinik RSHS/Universitas Padjadjaran 1983 – 1991 : Dokter RS Sariningsih, KESDAM III/Siliwangi
PUBLIKASI : • Polymerase Chain Reaction of Pleural Fluid is a Useful Method for Diagnosis of Tuberculous Pleural Effusion, 2004. • Application of a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Insertion Sequence, IS6110 and MPB64 as a Diagnosis Method for Pulmonary Tuberculosis in Bandung, Indonesia, 2006. • Detection of Drug Resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> using Low-Cost Colorimetric Method, 2007. • Hubungan Pemanfaatan Epidemiologi Molekuler dalam Patogenesis Penyakit Tuberkulosis dengan Upaya Eradikasi Tuberkulosis di Kota Bandung, 2008 • Detection of Rifampicin and Isoniazid in Clinical Isolates of MDR-TB cases by Two Colorimetric Methods Resazurin and Nitrate Reductase Assays. RS Paru Dr. H.A. Rotinsulu, 2009

PERSETUJUAN ATASAN

Mengetahui,

Kepala Bidang Biomedis

Ketua Pelaksana

dr. Roselinda, M Epid.
NIP. 19580701 1987012001

Dr. Francisca S Tanoerahardjo, dr., SpPK., MSi
NIP. 195501251983112001

Ketua Panitia Pembina Ilmiah
Pusat Biomedis dan Teknologi
Dasar Kesehatan

Kepala Pusat Biomedis dan
Teknologi Dasar Kesehatan

Dr. drg. Magdarina Destri Agtini, MSc
NIP. 195012061984022001

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP. 196211191988031001

PERSETUJUAN ATASAN

Mengetahui,

Kepala Bidang Biomedis



dr. Roselinda, M Epid.
NIP. 195807011987012001

Ketua Pelaksana



Dr. Francisca S Tanoerahardjo, dr., SpPK., MSi
NIP. 195501251983112001

Ketua Panitia Pembina Ilmiah
Pusat Biomedis dan Teknologi
Dasar Kesehatan



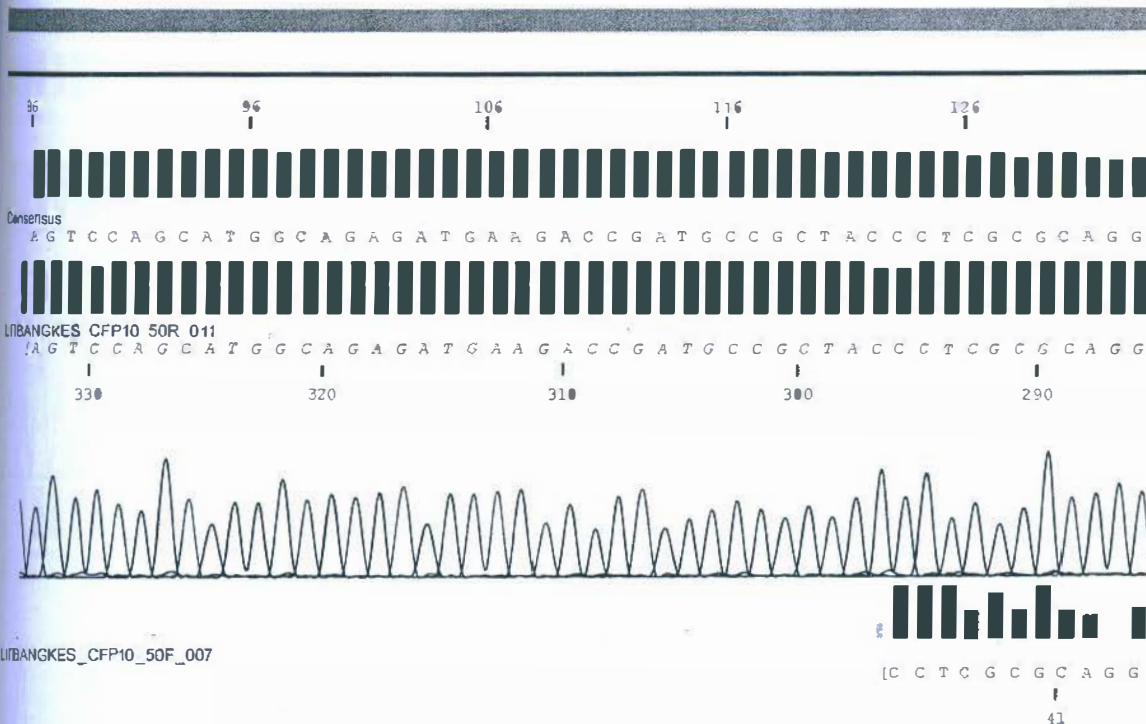
Dr. drg. Magdarina Destri Agtini, MSc
NIP. 195012061984022001

Kepala Pusat Biomedis dan
Teknologi Dasar Kesehatan

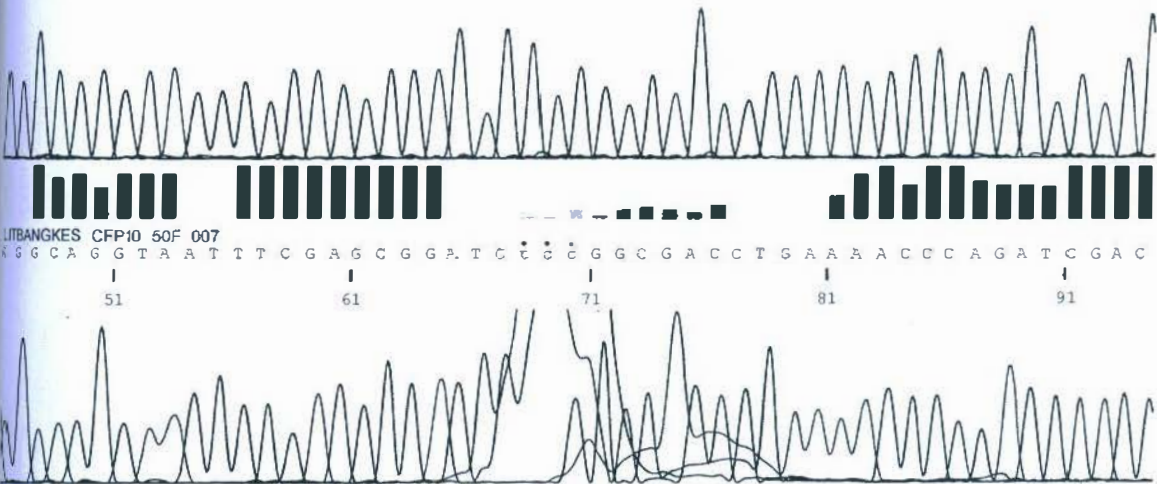
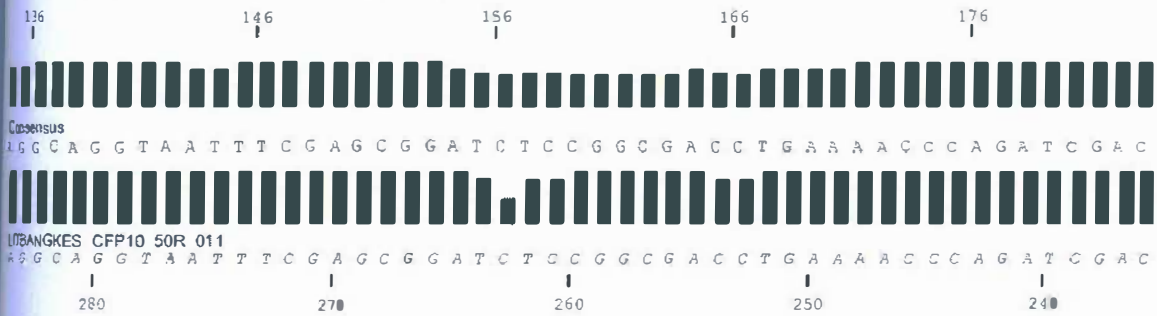


Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP. 196211191988031001

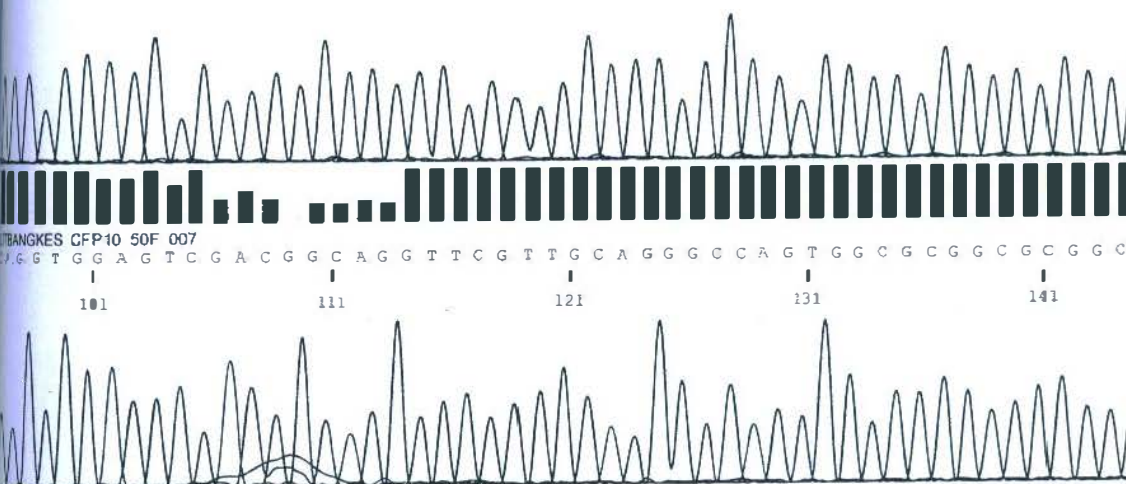
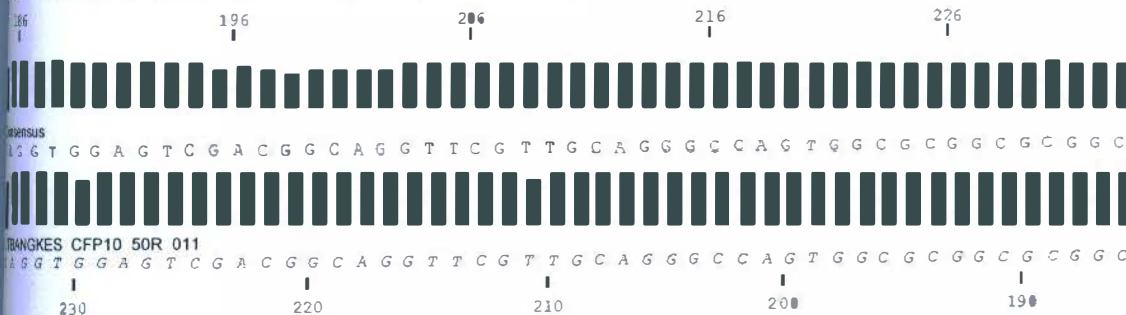
Project: libbangkes_0702 Specimen: Specimen2 Segment: cfp10-esat6 Assembly



Project: litbangkes_0702 Specimen: Specimen2 Segment: cfp10-esat6 Assembly



libbangkes_0702 Specimen: Specimen2 Segment: cfp10-esat6 Assembly



Project: litbangkes_0702 Specimen: Specimen2 Segment: cfp10-esat6 Assembly



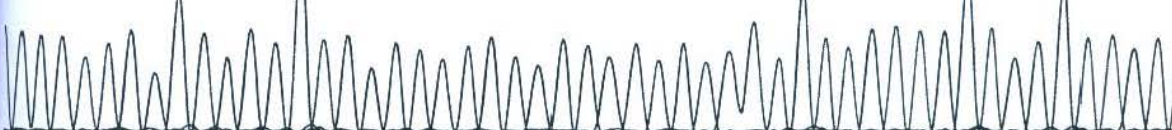
Consensus

GGGGACGGCCGCCCAAGGCCGCGGTGGTGCGCTTCCAAAGAACAGCCCAATA



UTBANGKES CFP10 50R 011

GGGGACGGCCGCCCAAGGCCGCGGTGGTGCGCTTCCAAAGAACAGCCCAATA

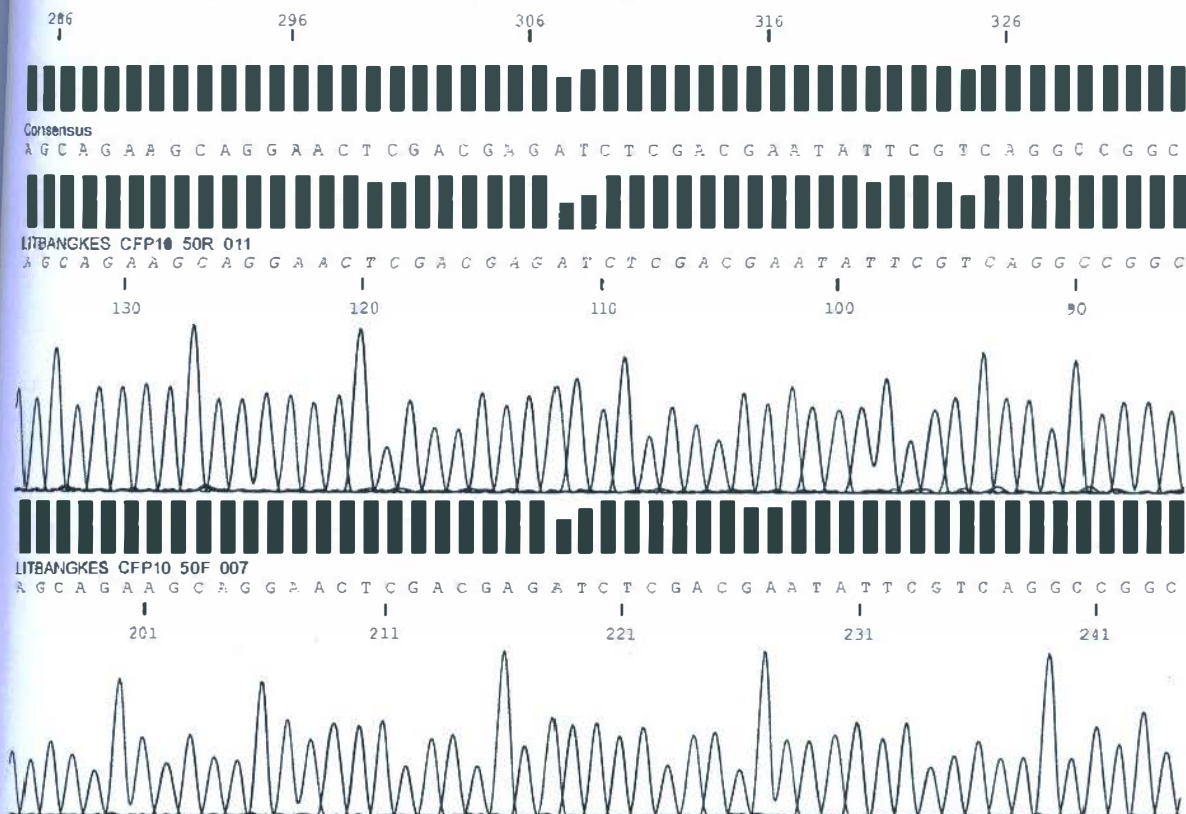


UTBANGKES CFP10 50F 007

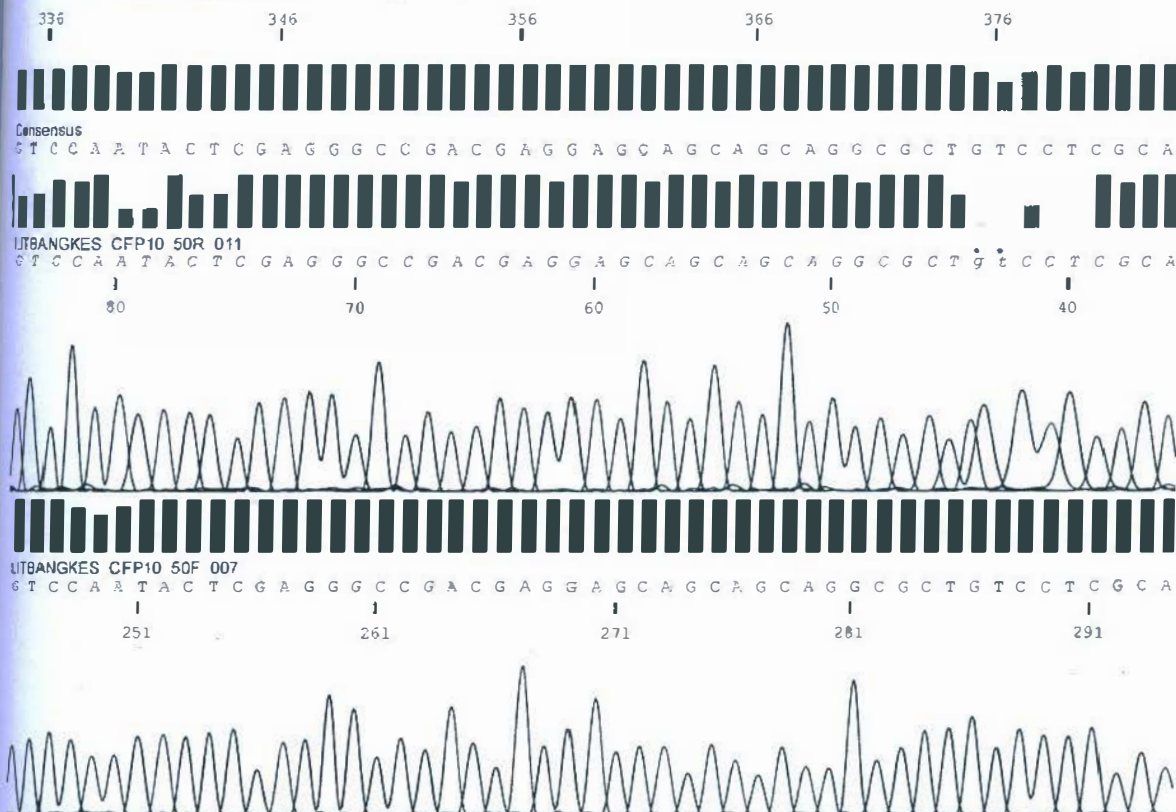
GGGGACGGCCGCCCAAGGCCGCGGTGGTGCGCTTCCAAAGAACAGCCCAATA



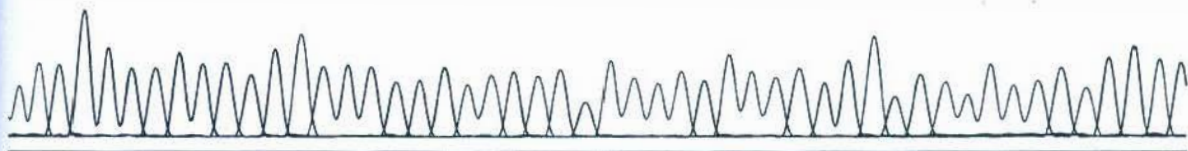
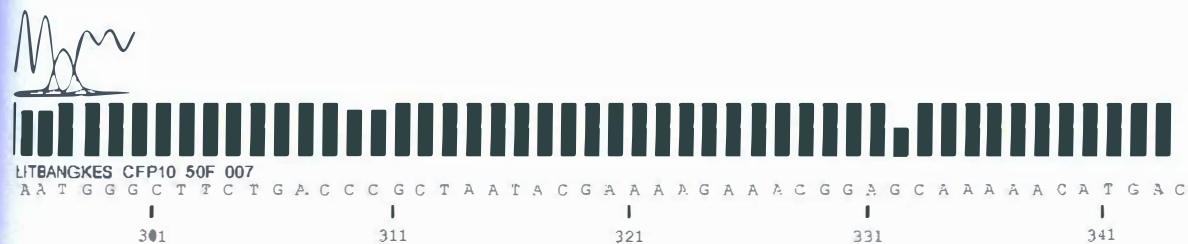
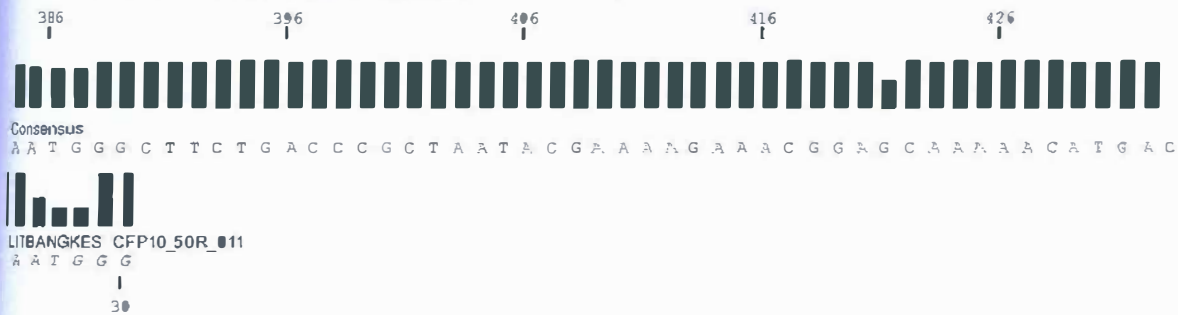
Project: litbangkes_0702 Specimen: Specimen2 Segment: cfp10-esat6 Assembly



Project: litbangkes_0702 Specimen: Specimen2 Segment: cfp10-esat6 Assembly



Project: LITBANGKES_0702 Specimen: Specimen2 Segment: cfp10-esat6 Assembly



Consensus
A

LITBANGKES_CFP10_50F_007
A

Lampiran 2.

PROSEDUR OPERASIONAL BAKU UJI IMUNOGENITAS ANTIGEN KANDIDAT VAKSIN TB

Prosedur Operasional Baku Uji Imunogenitas Antigen Kandidat Vaksin TB meliputi:

1. Prosedur Isolasi PBMC
2. Prosedur Pemeriksaan Antibodi metode Dotblot
3. Prosedur Pemeriksaan Antibodi Metode Western blot
4. Prosedur Uji Proliferasi Splenosit
5. Prosedur Pemeriksaan Sitokin metode Elisa
6. Prosedur Pemeriksaan Flowsitometri dengan pewarnaan intraseluler

1. PROSEDUR ISOLASI PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

Alat:

1. Botol sentrifus 15 ml
2. Micropipette
3. Swing Centrifugated

Bahan:

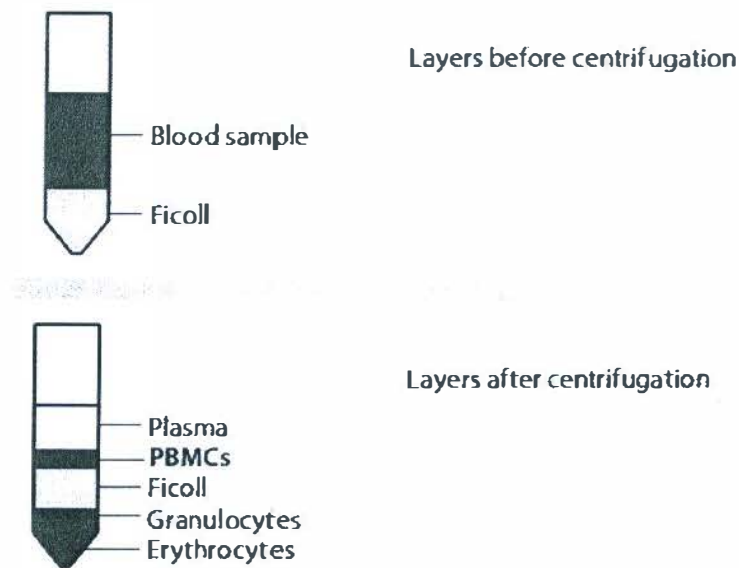
1. Ficoll-Hipaque $d=1.077$ g/mL
2. *Phosphat Buffer Saline* (PBS)
3. Sampel darah yang dimasukkan dalam vacutainer EDTA

Instruksi Rinci

Cara kerja:

1. Semua bahan yang diperlukan dikeluarkan dari lemari pendingin dan dibiarkan sampai suhu ruang.
2. Disiapkan botol sentrifus 15 ml dan diisi dengan Ficoll-Hipaque $d=1.077$ g/mL
3. Sampel darah dalam vacutainer EDTA yang akan diuji dibolak-balik perlahan agar homogen kemudian dicampur 1:1 dengan PBS. Kemudian diambil dengan micropipette dan disalurkan secara perlahan pada dinding falcon yang sudah diisi Ficoll-Hipaque $d=1.077$ g/mL. Perbandingan volume antara ficoll-hipaque dengan sampel darah adalah 1:1. Akan terbentuk 2 lapisan.
4. kemudian disentrifuge suhu ruang dengan kecepatan 1000 rpm selama 30 menit.

5. Setelah disentrifuge akan terpisah menjadi 5 lapisan, yaitu plasma, PBMC, Ficoll-Hipaque, granulosit dan sel darah merah.



Gambar .. Hasil separasi larutan sebelum dan setelah sentrifugasi

6. Cincin PBMC yang terbentuk diambil secara perlahan menggunakan micropipette dan diletakkan dalam Botol sentrifus 15 ml yang baru.
7. Larutan PBMC kemudian dicuci dengan PBS 10 ml dan disentrifuge suhu ruang dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit.
8. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk dicuci kembali dengan PBS dan disentrifuge kembali pada suhu ruang 1200 rpm selama 10 menit, dilakukan dua kali.
9. Setelah disentrifuge maka akan terbentuk pelet (sel PBMCs) pada dasar Botol sentrifus 15 ml.

2. PROSEDUR PEMERIKSAAN ANTIBODI METODE DOTBLOT

Metode *dot blot* dilakukan dengan cara merendam membran *nitrocellulose* dalam *aquadest* selama 30 menit. Membran *nitrocellulose* selanjutnya dirangkaikan pada alat *Bio-dot apparatus Bio-Rad*. Protein rekombinan M tb yang digunakan diencerkan dalam TBS-Sodium Azida (NaN_3) 1% dengan perbandingan sampel dan pengencer 1 : 4, kemudian ditetaskan pada tiap sumuran masing-masing 50 μl . Selanjutnya dilakukan degas selama 30 menit. *Blocking* dilakukan dengan meneteskan TBS-Skim

Milk 5% pada tiap sumuran kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. *Washing* atau pencucian dilakukan dengan TBS-Tween 0,05% sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit. Antibodi primer (serum ketiga kelompok penelitian) yang digunakan diencerkan dalam TBS-Skim 1% dengan perbandingan sampel dan pengencer 1 : 200, selanjutnya diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Setelah pencucian dilakukan inkubasi dengan antibodi sekunder (*IgG Anti human AP Conjugate*) yang telah diencerkan dalam TBS dengan perbandingan sampel dan pengencer 1 : 2500, selama 1 jam sambil digoyang pelan. Pencucian dilakukan kembali untuk selanjutnya diberikan *substrat Western blue alkaline phosphatase* dalam ruang gelap dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang sambil digoyang pelan. Penghentian reaksi dilakukan dengan menambahkan *aquadest* sebanyak 50 µl pada tiap sumuran.

Pembacaan, Pencatatan dan Pelaporan

Hasil yang diperoleh diolah dengan program *Corel photopaint 11* untuk mendapatkan data kuantitatif.

3. PROSEDUR PEMERIKSAAN ANTIBODI METODE WESTERN BLOT

Western blot dilakukan dengan cara Towbin untuk membuktikan adanya ikatan antigen dengan antibodi yang spesifik. Protein rekombinan *M.tuberculosis* yang diperoleh ditransfer pada membran nitroselulosa. Sebelum dilakukan transfer protein, gel hasil elektroforesis dan membran nitroselulosa direndam dalam larutan *transfer buffer* selama 40 menit. Filter dan kertas saring yang akan digunakan untuk *sandwich* dibasahi dengan larutan transfer buffer. Transfer dilakukan dengan menyusun filter tebal, kertas saring, membran nitroselulosa dan gel elektroforesis seperti roti sandwich pada alat *Transblot SD Semi Dry Biorad* pada arus 0,3 A dan tegangan 20 V selama 2 jam. Untuk mengetahui sempurna tidaknya proses transfer, keberadaan protein pada membran nitroselulosa dapat dilihat dengan merendam membran pada pewarna *Ponceau 3%* beberapa menit. Petanda protein pada membran kemudian dipotong untuk protein petanda. Pemblokasi antibodi non spesifik dilakukan dengan menghilangkan pewarna terlebih dahulu dengan *aquadest*, selanjutnya membran diinkubasi di dalam TBS-BSA 3% semalam pada suhu 4°C. Sebelum perlakuan dengan antibodi primer maupun sekunder, dilakukan *washing* dengan TBS-Tween 0,05% sebanyak 2 kali masing-masing selama 10 menit sambil digoyang pelan. Antibodi primer (*human antibody* = serum subyek penelitian dari 3 kelompok) yang digunakan diencerkan di dalam TBS-BSA 1% dengan perbandingan sampel dan pengencer 1 : 500, selanjutnya

diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Inkubasi dengan antibodi sekunder (*IgG anti-human AP conjugate*) dilakukan dengan mengencerkan antibodi di dalam TBS dengan perbandingan sampel dan pengencer 1 : 2500 selama 1 jam sambil digoyang pelan pada suhu ruang. Substrat yang diberikan, yaitu *Western Blue Alkaline Phosphatase* yang ditetaskan pada membran di dalam ruang gelap selama lebih kurang 20 menit. Penghentian reaksi dilakukan dengan merendam membran menggunakan *aquadest* beberapa saat. Band protein yang muncul selanjutnya dicocokkan dengan petanda yang sesuai dengan berat molekulnya.

4. UJI PROLIFERASI SPLENOSIT MENCIT

Prosedur operasional baku ini menjelaskan prosedur pemeriksaan uji proliferasi splenosit mencit untuk menentukan kemampuan antigen calon vaksin TB dalam menstimulasi proliferasi splenosit.

Prinsip

Limpa mencit sehat diisolasi, dicacah dalam medium untuk mendapatkan splenosit. Splenosit yang diperoleh dicuci 3 (tiga) kali dengan medium RPMI1640 yang mengandung antibiotik, HEPES, FBS dan asam amino. Kemudian splenosit dalam jumlah 1×10^5 splenosit/ml dikultur/diinkubasi dengan antigen kandidat vaksin selama minimal 48 jam dalam inkubator CO₂. Kemudian ditambah MTT dan dikultur lebih lanjut selama 4 jam dalam inkubator CO₂ 5%. Kristal formasan yang terbentuk dalam larutan isopropanol/asam dan selanjutnya diukur pada panjang gelombang 540 nm.

Bahan Pemeriksaan

1. Antigen kandidat vaksin TB
2. LPS
3. ConA
4. PHA (sebagai pembanding)

Alat dan Bahan

1. Mencit bobot 20 gr
2. Arginin
3. MTT
4. RPMI 1640
5. Inkubator CO₂

6. LAF
7. Alat bedah
8. Mikropipet
9. Sentrifuge
10. Plat kultur
11. Filter steril 0,22 μm
12. ELISA reader
13. Mikroskop

Instruksi Rinci

1. Mencit diaklimatisasi di laboratorium pengujian.
2. Pada hari pengujian, mencit dibius dengan ketamin.
3. Limpa diisolasi secara aseptik, dicacah, dicuci dengan medium komplit (RPMI dll).
4. Siapkan splenosit dalam jumlah 10^5 sel/ml.
5. Sejumlah 100 μl suspensi splenosit dari stok dicampur dengan tripton biru.
6. Jumlah splenosit yang hidup dihitung dengan mikroskop.
7. Splenosit yang hidup kemudian dibuat suspensi 10^5 sel/ml.
8. Sejumlah 100 μl suspensi splenosit hidup tersebut dimasukkan ke dalam sumur-sumur dari lempeng sumur mikro
9. Tambahkan 10 μl antigen kandidat vaksin, LPS, ConA, PHA
10. Kultur dalam inkubator CO₂ selama 48 jam
11. Setiap sediaan diuji triplo
12. Kedalam kultur selanjutnya ditambahkan larutan MTT (10 μl) dan dikultur lebih lanjut selama 4 jam dalam inkubator CO₂ 5%.
13. Kristal formasan yang terbentuk dilarutkan dalam isopropanol/asam.
14. Serapan masing-masing sumuran dibaca pada panjang gelombang 540 nm.

Pembacaan, Pencatatan dan Pelaporan

1. Hasil uji diukur pada panjang gelombang 540 nm
2. Data yang diperoleh ditampilkan dalam tabel $\bar{x} \pm 5$ dengan $n \geq 5$
3. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dan ditentukan kebermaknaan dengan $p < 0,05$.
4. Laporan memuat prinsip pengujian, prosedur, hasil dan kesimpulan.

Quality Control

1. Kontrol suhu inkubator CO₂ 37 C $\pm$ 1%
2. Kontrol konsentrasi CO₂ 3 – 5 %
3. Kontrol sterilitas LAF
4. Kontrol kesehatan mencit dari perkembangan bobot badannya

Manajemen Limbah

1. Limbah berupa hewan ditampung dalam freezer penampung untuk diambil oleh petugas khusus.
2. Limbah medium dan bahan kimia lain ditampung dalam wadah khusus limbah kimia untuk diambil oleh petugas khusus

5. PROSEDUR PEMERIKSAAN SITOKIN METODE ELISA

Bahan pemeriksaan

Sampel Darah

- 3 mL untuk *EDTA blood tube*, untuk pemeriksaan darah rutin
- 5 mL untuk *heparin blood tube*,
 - Darah dalam *heparin blood tube* (berisi *wholeblood*) sesegera mungkin (dalam 30 menit) disentrifuge pada 3.000 G selama 15 menit dan suhu 25°C lalu diambil plasmanya dan disimpan pada suhu -80°C.
 - PBMC
- 3 mL *plain blood tube*,

Darah dalam *plain blood tube*, disentrifuge 4.000 rpm selama 15 menit. Ambil sebanyak 1 mL menggunakan pipet mikro dan tips steril, kemudian masukkan kedalam *criotube*. Simpan di suhu -80°C.

Prosedur Kerja

Lain-lain sesuai dengan standar pemeriksaan di klinik

Membuat PBMC dari pasien TB, TB kontak dan kontrol sehat.

- Darah heparin dimasukkan dalam tabung 15ml, disentrifuge 2300 rpm 10 menit RT untuk diambil plasmanya. Plasma disimpan dalam suhu -80C untuk pemeriksaan IFN- γ dalam plasma lebih lanjut.
- Sisa darah dipindahkan kedalam tabung 50ml dicampur dengan PBS 30 ml,

- Tambahkan 1.077 g/mL Ficoll Hypaque 10 ml RT, spin pada 1500 rpm 30 menit RT no brake.
- Ambil PBMC dari interphase PBS/Ficoll dengan transfer pipette, masukkan ke dalam tabung 50ml yang baru dan tambahkan 40ml PBS
- Spindown pada 1000rpm 8menit RT
- Buang supernatant, tambahkan 5mL RBC Lysis solution, inkubasi dengan mixing inversi 5 menit RT
- Buang supernatant, resuspend dengan 10ml PBS
- Ambil 125 ul untuk dihitung selnya
- Sisanya dispin down 1000 rpm 8 menit RT
- Buang supernatant, resuspend dengan 10ml PBS untuk final wash
- Spindown 1000 rpm 8 menit RT
- Transfer ke dalam microtube masukkan ke dalam liquid N2

Kultur antigen dengan PBMC dari pasien TB, TB kontak dan kontrol sehat.

- Sebanyak 10^5 sel PBMC (setelah dihitung) dalam 100 ul IMDM dikultur dengan antigen Mtb. Ada 5 perlakuan yaitu: sebagai control negative sel dikultur tanpa antigen, sebagai control positive sel dikultur dengan PHA, sel dikultur dengan BCG buatan Biofarma, sel dikultur dengan LPS dan sel dikultur dengan kandidat antigen hasil buatan ITB/UI dan lainnya. Konsentrasi yang digunakan perlu dioptimasi dulu.
- PBMC dikultur selama 4 hari (darah pasien diproses hari Kamis dan Jumat) dan dipanen hari Senin dan Selasa. PBMC dikultur dalam incubator 37C 5% CO2. PBMC dikultur masing-masing in triplicate supaya mendapatkan hasil supernatant yang banyak (karena untuk pemeriksaan berbagai sitokine: IFN γ , IL12, IL4, IL2?) Supernatant diambil dan dimasukkan dalam 96 V bottom plate dan disimpan dalam -20C.

Pemeriksaan ELISA IFN- γ , IL12, IL2 dan IL4.

- Pemeriksaan ELISA sesuai dengan standard protocol kit. Perlu dilakukan optimasi dahulu apakah supernatant perlu diencerkan supaya mendapatkan hasil yang optimal.

6. PROSEDUR PEMERIKSAAN FLOWSITOMETRI DENGAN PEWARNAAN INTRASELULER

Prosedur operasional baku ini menjelaskan prosedur untuk pemeriksaan jenis dan jumlah sel yang memproduksi sitokin intrasitoplasma menggunakan flowsitometri BD FACS™ Calibur

Staining dengan Intracellular (Nuclear) Marker

PBMC yang diisolasi dari darah tiga kelompok subyek (pasien, kontak positif, normal sehat)

Alat:

1. Tabung eppendorf 1,5 ml
2. Sentrifuge suhu dingin
3. Micropipette

Bahan:

1. Cell staining buffer
2. Larutan fox fix perm buffer
3. Larutan fox perm buffer
4. Antibodi intracellular Fox P3

Cara Kerja:

1. Pelet kultur PBMC yang telah diinkubasi dengan antibodi sel surface marker kemudian dicuci dengan 500 µl sel staining buffer, disentrifuge pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
2. Supernatan dibuang, kemudian pelet yang terbentuk dicuci dengan 500 µl larutan fox fix buffer, dihomogenkan dan disentrifuge pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit. Larutan fox fix perm buffer tersedia dalam 4x konsentrasi. Jadi apabila akan digunakan harus diencerkan terlebih dahulu dengan PBS.
3. Supernatan dibuang, kemudian pelet difiksasi dengan 500 µl fox fix perm buffer lalu diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.
4. Setelah inkubasi selesai, larutan disentrifuge pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
5. Supernatan dibuang, pelet yang terbentuk dicuci dengan larutan fox perm buffer disentrifuge pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.

Larutan fox perm wash buffer tersedia dalam 10x konsentrasi, jadi apabila akan digunakan harus diencerkan terlebih dahulu dengan PBS.

6. Supernatan dibuang, kemudian pelet ditambahkan dengan 500 μ l fox perm buffer lalu diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.
7. Setelah inkubasi selesai, larutan disentrifuge pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
8. Supernatan dibuang, kemudian pelet siap untuk distaining dengan antibodi intraselluler (yang telah diencerkan dalam fox perm buffer dengan perbandingan tertentu).
9. Masing-masing larutan di staining dengan 50 μ l antibodi yang telah diencerkan, kemudian diinkubasi dalam gelap di suhu ruang selama 20 menit.
10. Setelah diinkubasi dicuci dengan menambahkan 500 μ l larutan perm wash buffer dan disentrifuge pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
11. Supernatan dibuang dan ditambahkan 350 μ l sel staining buffer, dihomogenkan
12. Kemudian dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca dengan Flowcytometry.

Resep Phosphat Buffer Saline (PBS) untuk 1 Liter larutan

- | | |
|--|----------|
| 1. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2,4 gram |
| 2. Na_2HPO_4 | 1,2 gram |
| 3. KH_2PO_4 | 0,7 gram |
| 4. KCl | 6,8 gram |

Pembuatan:

1. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 dan KCl dilarutkan dalam aquades sampai lebih kurang 800 ml.
2. Setelah homogen diukur pada pH 7,4
3. Ditambahkan aquades sampai 1000 ml, disterilkan dengan autoclave kemudian disimpan dalam suhu 4°C.

Resep Sel Staining Buffer untuk 50 ml larutan (2% FBS dalam PBS)

- | | |
|---------------------------------|-------|
| 1. Fetal Bovine Serum (FBS) | 1 ml |
| 2. Phosphat Buffer Saline (PBS) | 49 ml |

Pembuatan:

1. Pembuatan larutan dilakukan dalam kondisi steril di Laminair Air Flow (LAF)
2. Diambil 1 ml FBS kemudian ditambahkan dengan 49 ml PBS ditempatkan dalam tabung sentrifus 50 ml.
3. Larutan sel staining buffer yang baru saja dibuat divortex agar homogen.

Lampiran 3. Sekuens gen esat-6 dan cfp10

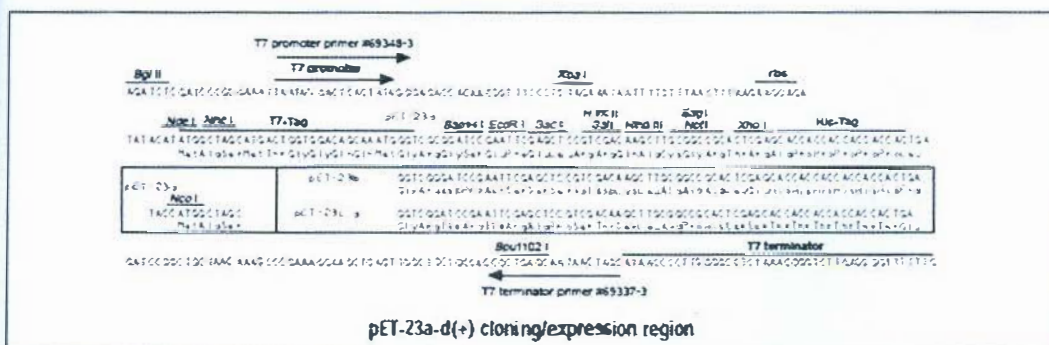
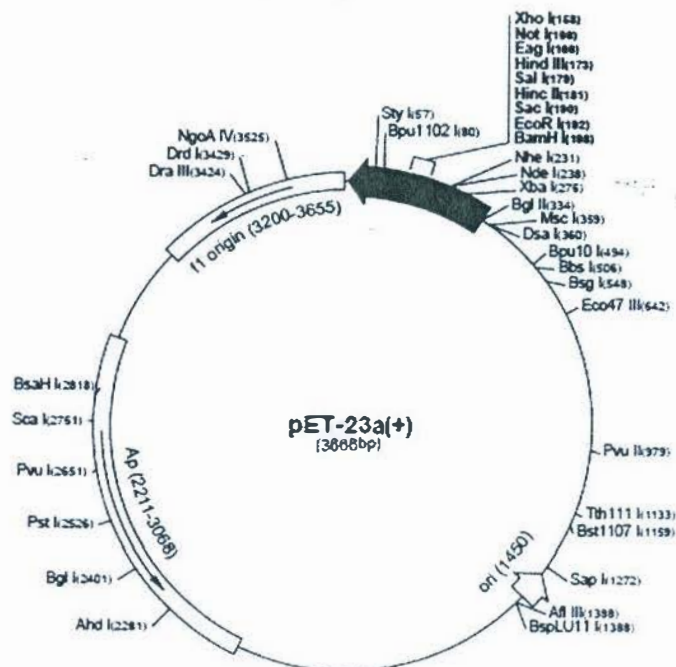
Sekuens gen esat6 *M.tuberculosis* H37Rv

GTGACAGAGCAGCAGTGGAAATTCGCGGGTATCGAGGCCGCGGCAAGCGCAATCCAGGGAAATGTCACGTCCATTCA
 TTCCCTCCTTGACGAGGGGGAAGCAGTCCCTGACCAAGCTCGCAGCGGCCTGGGGCGGTAGCGGTTCCGAGGCGTACC
 AGGGTGTCCAGCAAAAAATGGGACGCCACGGCTACCGAGCTGAACAACGCGCTGCAGAACCTGGCGCGGACGATCAGC
 GAGCCGGTCAGGCAATGGCTTCGACCGAAGGCAACGTCACCTGGGATGTTTCGCATAG

Sekuens gen cfp10 *M.tuberculosis* H37Rv

ATGGCAGAGATGAAGACCGATGCCGCTACCCCTCGCGCAGGAGGCAGGTAATTTTCGAGCGGATCTCCGGCGACCTGAA
 AACCCAGATCGACCAGGTGGAGTCGACGGCAGGTTCTGTTGCAGGGCCAGTGGCGCGCGCGGCGGGGACGGCCGCCC
 AGGCCGCGGTGGTGCCTTCCAAGAAGCAGCCAATAAGCAGAAACAGGAACCTCGACGAGATCTCGACGAATATTCTGT
 CAGGCCGGCGTCCAATACTCGAGGGCCGACGAGGAGCAGCAGCAGGCGCTGTCTTCGCAAATGGGCTTCTGA

Plasmid pET23a



Ref: Novagen website



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933
E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: <http://www.litbang.depkes.go.id>

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Nomor : KE.01.05/EC/ 345/2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

***"Pengembangan Protein Sub-Unit Kandidat Vaksin TB (Tahap I -
Penyiapan Antigen, Uji Immunogenisitas dan Pembuatan Isolat M.
tuberculosis "dorman" in-vitro)"***

yang mengikutsertakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

Dr. Fransisca Sriwetami Tanoerahardjo, dr., SpPK., MSI

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 4 Mei 2012

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,



IDENTIFIKASI RESPONDEN / RESPONDEN IDENTIFICATION

No. Studi : _____ Medrec klinik : _____ Klinik : 1. PPTI
 Tanggal : ____/____/____ Interviewer : _____ 2. RSHS
 3. BP4
 4. lainnya

IDENTITAS / IDENTITY

Nama : _____ Nama Panggilan: _____ Usia/Gender : _____
 Alamat : _____ RT/RW: _____ Kelurahan : _____
 Kecamatan _____ Kota _____ Kode Pos: _____
 Telepon _____ HP _____ Dikirim oleh: _____
 Wilayah kerja Puskesmas : _____ Supervisor lapangan: _____

II. ANAMNESIS**a. Keluhan**

1. Keluhan Utama : 1. Batuk 3. Batuk darah 5. Nyeri dada 7. tidak ada keluhan
 2. Panas badan 4. Sesak nafas 6. Lain-lain _____
 2. Berapa lama merasa tidak sehat / sakit _____ bulan + _____ minggu

Gejala lain yang dikeluhkan :

3. Batuk 1. ya 2. tidak
 4. Dahak 1. ya 2. tidak
 Jika iya 1. sedikit 2. sedang 3. banyak
 5. Batuk darah 1. ya 2. tidak
 6. Sesak nafas 1. ya 2. tidak
 7. Panas badan 1. ya 2. tidak
 8. Keringat malam 1. Ya 2. tidak
 9. Berat badan turun 1. ya 2. tidak 3. tidak tahu
 → berapa kg? _____ kg dalam berapa lama _____ bulan + _____ minggu
 10. nafsu makan berkurang 1. Ya 2. tidak
 11. Keterangan / Keluhan lain 1. ya 2. tidak
 Jika iya, jelaskan : _____

b. Riwayat penyakit lain selain yang diderita sekarang

12. Sakit gula / kencing manis 1. ya 2. tidak 3. tidak tahu
 13. ada resiko untuk HIV 1. ya 2. tidak 3. tidak tahu
 14. Hamil (pasien wanita) 1. ya 2. tidak 3. tidak tahu
 15. Riwayat perawatan di RS 1. ya 2. tidak
 16. Meminum obat untuk penyakit kronik 1. ya 2. tidak
 17. Jika iya (salah satu di atas), jelaskan _____

c. Riwayat Obat-obatan

18. Minum obat dalam jangka waktu lama/sering, termasuk jamu, KB hormonal 1. ya 2. tidak
19. minum steroid (seperti prednison) atau immunosupresif 1. ya 2. tidak
20. Apakah anda biasa merokok sebelum sakit ? 1. ya 2. tidak 3. pernah
Jika ya / pernah : berapa lama anda merokok _____ tahun
Berapa banyak anda merokok 1. < 1 batang/hari 2. ____batang/hari
21. Apakah anda pernah menggunakan narkoba suntikan? 1. ya 2. tidak
22. Apakah anda pernah menggunakan obat-obatan lain/alkohol 1. ya 2. tidak
23. Keterangan : jelaskan jika iya (salah satu di atas) _____

III. RIWAYAT PENYAKIT TB YANG LALU

24. Apakah sudah pernah mendapatkan pengobatan TBC ?
1. ya 2. Tidak 3. Mungkin 4. Tidak tahu
25. Bila ya/mungkin, kapan terakhir kali makan obat anti TBC? (*sejak saat berhenti makan obat s/d sekarang*)
1. $\leq$ 2 bulan yang lalu. 2. 2 bulan s/d 1 tahun yang lalu 3. $\geq$ 1 tahun yang lalu
26. Berapa lama makan obat anti tuberkulosis ?
1. $\leq$ 1 bulan 2. 1bulan s/d 5 bulan 3. $\geq$ 5 bulan
27. Berapa macam obat yang diminum dalam 1 saat?
1. 1 macam 2. 2 macam 3. 3 macam 4. 4 macam
28. Apakah obat yang dimakan (*jelaskan dan cari petunjuk dengan jumlah dan bentuk obat*)
Rifampisin 1. Ya 2. Tidak 3. Tidak tahu
Suntikan tiap hari 1. Ya 2. Tidak 3. Tidak tahu
29. Dimana dapat obat TBC? _____
30. Adakah penderita TBC di sekitar anda? 1. ada 2. tidak 3. tidak tahu
Jika ada: Dimana? 1. di rumah 2. tetangga 3. tempat kerja 4. lainnya
Hubungan keluarga? 1. keluarga dekat 2. keluarga lain 3. bukan keluarga
Siapa? _____
Berapa orang? _____ orang

IV. SOSIOEKONOMI

31. Pendidikan: 1. s/d 6 tahun 3. > 9 – 12 tahun
2. 6 -9 tahun 4. > 12 tahun
32. Pekerjaan : (lihat guideline) _____
33. Penghasilan: 1. < Rp. 10.000/hari
2. Rp. 10.000 – 20.000/hari
3. > Rp. 20.000/hari
34. Agama : 1. islam 2. kristen 3. budha 4. hindu
35. Suku: 1. sunda 2. jawa 3. sumatera 4. cina 5. Betawi 6. Lainnya: _____
36. Status perkawinan: 1. menikah 2. belum menikah 3. duda/janda
37. Jumlah anak kandung: _____ orang 38. jumlah balita (< 5 tahun) yang hidup: _____ orang

VI. PEMERIKSAAN FISIK

39. a) Keadaan umum: 1. tidak tampak sakit (masih dapat bekerja)

2. sakit ringan (tidak dapat pergi bekerja/di rumah saja)

3. sakit sedang (di rumah dan perlu bantuan)

4. sakit berat (perlu perawatan di RS)

39. b) Karnofsky _____ %

40. Berat badan _____ kg

45. Skar BCG

1. tidak ada

2. ada

41. Tinggi Badan _____ cm

Jika ada

→ Ø : _____ cm x _____ cm

42. Nadi _____ / menit

46. Kemungkinan ekstrapulmonal

1. ada 2. tidak

43. Respirasi _____ / menit

47. Catatan _____

44. Suhu _____ °C

VII. PEMERIKSAAN PENUNJANG**Foto thoraks (diisi oleh petugas yang berkompeten)**

48. Apakah foto thoraks ada kelainan 1. tidak (normal) → lanjutkan ke 57

2. Ya (ada lesi lama, kalsifikasi, fibrosis) → lanjutkan ke 49

3. ya (ada lesi aktif, infiltrat, cavitas) → lanjutkan ke 49

49. Infiltrat

1. Ya

2. tidak

50. Tebal infiltrat

1. tipis

2. sedang

3. tebal

51. fibrosis extensif

1. Ya

2. tidak

52. Milier

1. Ya

2. tidak

53. Pleural effusion (marked)

1. Ya

2. tidak

54. Kalsifikasi / garis keras

1. Ya

2. tidak

55. Luas lesi secara keseluruhan

1. luasnya kurang dari 5 vertebrae

2. luasnya antara 5 – 9 Vertebrae

3. luasnya lebih dari 9 vertebrae

56. Ada kavitas

0. tidak ada

1. ada, luasnya kurang dari 4 cm

2. ada, kecil multipel atau soliter > 4

57. Kesimpulan

0. Chest X-ray normal

1. lesi ringan

3. lesi lanjut

2. lesi sedang

4. gambaran foto dgn lesi lama

58. Kelainan lain pada foto thoraks _____

59. Sputum BTA

: 1. (-) 2. (+) 3. (++) 4. (+++) 5. tidak dilakukan

(jika sampel diambil > 1 : ambil yang paling tinggi densitasnya)

60. PPD-5TU

: 1. reaktif (Ø _____ mm)

2. tidak reaktif

3. tidak dilakukan

VIII. KESIMPULAN

61. → Kalau KONTROL :

1. bukan TB 2. kalsifikasi 3. suspek TB 4. TB aktif 5. riwayat TB

lanjutkan ke No. 67

62. → Kalau PASIEN, manifestasi klinik

1. predominan TB paru (PTB)
2. predominan TB ekstra paru (EPTB) :

63. Bila TB ekstra paru : 1. meningitis TB 3. Limfadenitis TB
2. Pleuritis TB 4. Aqbdominal TB 5. Lainnya: _____

64. Kategori T B Paru (PTB):

1. baru 3. gagal 5. pindahan
2. kambuh 4. putus obat 6. lainnya

65. Pengobatan : kategori 1 / 2 / 3 / lainnya

66. Mulai pengobatan : ____ / ____ / ____ (tgl / bln / tahun)

67. Kriteria DM 1. DM 2. Tidak DM 3. Tidak dapat ditentukan 4. GDP terganggu
5. Akan ditentukan 6. GDP<110 kemudian GDP>126 7. GDP>126 kemudian FBG<110

68. Penyakit lain: _____

69. **suspected cluster** 1. ya 2. tidak 3. mungkin70. **positive family** 1. ya 2. tidak 3. mungkin

71. masuk ke dalam penelitian: (bisa lebih dari satu)

1. immunogenetic study 3. rifampicin trial
2. adherence study 4. lainnya : _____

72. follow – up 1. ya 2. tidak jika iya, dimana: _____

73. KETERANGAN TAMBAHAN

1. tidak ada _____
2. ada _____

Untuk pasien yang akan di follow-up (sebagai data dasar adanya kemungkinan terjadi Efek Samping)

74. Mual-mual / enek 1. ya 2. tidak
75. Muntah 1. ya 2. tidak
76. Perih lambung/gastritis 1. ya 2. tidak
77. Gatal-gatal/bruntusan di kulit 1. ya 2. tidak
78. Nyeri sendi 1. ya 2. tidak
79. Sakit kepala/pusing 1. ya 2. tidak
80. Kesemutan/baal-baal di kaki/tangan 1. ya 2. tidak

Untuk Adherence Study

81. Dengan siapa anda tinggal di rumah ? 1. sendiri 3. teman
2. keluarga 4. _____
82. Dengan apa anda ke sini ? _____
83. Berapa lama perjalanan dari rumah ke klinik ini ? _____ jam _____ menit
84. Apakah ada yang bisa mengantarkan anda kesini ? 1. ya 3. Kadang-kadang
2. hampir selalu 4. tidak

Untuk Immunogenetic Study:

FAMILY AND ETHNIC

85. jumlah kamar tidur dalam rumah: _____ buah
86. jumlah penghuni dalam rumah tersebut _____ orang
87. Berapa jumlah saudara sekandung laki-laki ____ orang perempuan ____ orang
88. Dimanakah anda dilahirkan dan berasal dari suku apa

	Kota	Pulau	Suku Bangsa
Responden			
Ayah			
Kakek dari Ayah			
Nenek dari Ayah			
Ibu			
Kakek dari Ibu			
Nenek dari Ibu			

89. Apakah orang tua, saudara kandung atau anak kandung ada yang sakit TBC ?
1. ya, siapa? _____ 2. Tidak

Untuk *clinical trial* :

Allocation random number : _____ Medication package number : _____

Alocator Name : _____ Signature : _____

91. TLK (Tebal Lipatan Kulit) : a. _____ mm b. _____ mm c. _____ mm

FORMAT SEED HISTORY - Guideline (ICHQ5D)

I. FORMAT SEED HISTORY (ISOLATE)

No	DaftarPenilaian	Keterangan
A	History Description	
A.1	General history (Description of the Original Isolate)	
a.	Asal isolate (spesies, strain, asal dari mana)	Jenis kelamin, umur, etnik, status HIV, lokasi spesimen awal diambil dan pertama kali diisolasi
b.	Tanggal mulai kultur	
c.	Tanggal isolasi	
d.	Phenotypic characteristic dari isolat	Bentuk, warna, jumlah, Biokimia test (niasin dan PNB test)
f.	Genotypic characteristic	Method: spoligotyping, Hasil?
g.	Informasi medium/komposisi	Medium awal culture? (tanggal pembuatan medium → per batch, komposisi medium)
h.	Referensi logbook	Log book penelitian
i.	Nomor dan jumlah isolate	
j.	Tempat penyimpanan isolate	
k.	Informasi tempat penyimpanan isolate (sertifikat/kalibrasi/validasi)	
l.	Informasi hasil uji identitas/karakterisasi isolate	
A.2	Passage history	
a.	Passage 1	Harus dari 1 koloni agar seragam
1	Tanggal perlakuan	
2	Alat pendukung dan pernyataan sertifikat validasi/kalibrasi	
3	Informasi medium/komposisi	
4	Asal medium	
5	Pernyataan akreditasi pembuat medium	
6	Metode passage	
7	Referensi logbook	
8	Tempat penyimpanan cell bank	
9	Informasi container/tube/vial dari cell bank	
10	Informasi tempat penyimpanan cell bank (sertifikat/kalibrasi/validasi)	
11	Informasi hasil uji identitas/karakterisasi cell bank	
B	Lampiran	
1	Dokumen history isolate asal (jika diperoleh dari lembaga lain)	
2	R&D logbook references	
3	Uji sterilitas medium	25 ° →jamur, 37 ° →bakteri aerob dan anaerob; pakai FTM/SCDM; kontrol: B. subtilis; lama inkubasi 14 hari
4	CoA bahan baku medium	Dapat di download asalkan ada no lot
5	Akreditasi lab pembuat medium	
6	Hasil uji karakterisasi isolate dan cell bank	
7	Sertif.kat kalibrasi/validasi alat-alat pendukung	

II. FORMAT SEED HISTORY (CLONE)

No	Daftar Penilaian	Keterangan
A	History description	
A.1	Vektor ekspresi dan sel inang	
a	Origin dan identitas dari gen	
b	Desain konstruk	
c	Genetic dan struktur dari vektor ekspresi	
d	Fungsi dari bagian-bagian vektor: ORI, promotor, antibiotik resistant marker, RE digestion map	
e	Keterangan mengenai vektor: apakah integrasi atau ekstrakromosomal, copy number	
f	Genetic stability dari host vektor kombinasi	Pasage 20; tiap 3 atau 4 disequensing DNA
g	Referensi logbook	
A.2	Sekuens dari gen yang di clone	
a	Sequence urutan nukleotida dari gen insert	
b	Flanking control region dari vektor ekspresi	
c	Sequence dari gene ekspresi	
A.3	Ekspresi	
a	Parameter ekspresi dan kontrolnya dari gen yang di-clon dalam sel inang selama proses produksi harus di jelaskan secara detail	
B	Lampiran	
1	Dokumen history isolate asal (jika diperoleh dari lembaga lain)	
2	R&D logbook references	
3	Uji sterilitas medium	
4	CoA bahan baku medium	
5	Akreditasi lab pembuat medium	
6	Hasil uji karakterisasi isolate dan cell bank	
7	Sertifikat kalibrasi/validasi alat-alat pendukung	