

Efek Protein rekombinan MPT64 *Mycobacterium Tuberculosis* terhadap Proliferasi Sel T dan Sel B secara In Vitro

Fihiruddin¹, Nurul Inayati¹, Lalu Unsun Nidhal^{2,3}, Raudatul Jannah⁴

¹ Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Mataram, Indonesia

² Program Studi Ilmu Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pangan dan Agroindustri, Universitas Mataram, Indonesia

³ Program Studi Ilmu Keperawatan, STIKES Yarsi Mataram, Indonesia

⁴ Program Studi Kebidanan, STIKES Yarsi Mataram, Indonesia

Article Info

Article history:

Received, Aug 04th 2022

Revised, Aug 11th 2022

Accepted, Sept 09th 2022

Keyword:

Protein MPT64,
Proliferasi limfosit,
M.tuberculosis

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis protein (MPT) 64 is an immunogenic protein that is encoded by the Rv1980c gene and is located at the Regions of Differences (RD) location 2. MPT64 protein is predicted as an antigen from *M. tuberculosis* which first interacts with the host's immune system. This study aims to know the proliferation of T and B lymphocytes stimulated by MPT64 protein in vitro. This research is an experimental study that is examining the proliferation of T and B lymphocytes on RPMI medium. The purification of MPT 64 proteins was carried out using the Protino™ Ni-NTA System column. Proliferation of T and B lymphocytes tests were carried out using the MTT method, where the (OD) results of it,s were read using an ELISA reader instrument at a wavelength of 595 nm. Data of optical density value from the MTT test were analyzed by the One Way Anova statistical test. The average results of T lymphocytes proliferation induced with each of MPT64 proteins of 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml and 1.25 µg/ml were 0.276, 0.202, 0.184 and 0.178, respectively. The average optical density of B lymphocytes proliferation induced with MPT64 proteins of 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml and 1.25 µg/ml were 0.434, 0.380, 0.285 and 0.251, respectively. The results of statistical tests obtained a significant difference between treatment group with a probability value of $p=0.011 < 0.05$. The MPT64 proteins concentration of 10 µg/ml showed the most optimal results in inducing the proliferation of T and B lymphocytes in vitro.

ABSTRAK

Mycobacterium protein tuberculosis (MPT) 64 merupakan protein imunogenik yang di sandi oleh gen Rv1980c dan berada pada lokasi *Regions of Differences (RD)* 2. Protein MPT64 di prediksi sebagai antigen dari *M. tuberculosis* yang pertama kali berinteraksi dengan sistem pertahanan tubuh *host*. Tujuan dari penelitian adalah mengetahui proliferasi limfosit T dan limfosit B yang di induksi dengan protein MPT64 secara *in vitro*. Penelitian ini merupakan penelitian ekperimental yaitu melakukan uji proliferasi terhadap limfosit T dan limfosit B pada media RPMI. Purifikasi protein MPT 64 dilakukan dengan kolom *Protino™ Ni-NTA System*. Uji proliferasi sel T dan sel B dilakukan dengan Metode MTT, dimana hasil optical dency nya (OD) di baca menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Data nilai Optical dency hasil uji MTT di analisis dengan uji statistik One Way Anova. Rata-rata hasil OD proliferasi limfosit T yang di induksi dengan protein MPT64 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml dan 1,25 µg/ml masing-masing adalah 0.276, 0.202, 0.184 dan 0.178. Rata-rata OD proliferasi limfosit B yang di induksi dengan protein MPT64 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml dan 1,25 µg/ml masing-masing adalah 0.434, 0.380, 0.285 dan 0.251. Hasil uji statistik diperoleh perbedaan yang signifikan diantara kelompok perlakuan dengan nilai probabilitas $p=0,011 < 0,05$. Protein MPT64 konsentrasi 10 µg/ml menunjukkan hasil yang paling optimal dalam menginduksi proliferasi limfosit T dan limfosit B secara *in vitro*.

Kata Kunci : Protein MPT64, Proliferasi limfosit, *M.tuberculosis*

Pendahuluan

Penyakit tuberkulosis (TB) pada manusia merupakan penyakit yang menyerang organ paru dan bersifat menular yang disebabkan oleh kuman *M. tuberculosis*. Tuberkulosis ditularkan melalui udara yang membawa percikan dahak atau ludah penderita tuberkulosis yang mengandung bakteri *M. tuberculosis* (Jonen-Lopez *et al.*, 2015; WHO, 2018). Data dari WHO menunjukkan 10,0 juta penduduk dunia terinfeksi oleh *M. tuberculosis*, 5,8 juta (58%) diantaranya adalah laki-laki dewasa, 3,2 juta (32%) perempuan dan 1 juta (10%) pada anak-anak. Pada tahun 2017 secara global diperkirakan penderita TB yang positif HIV adalah 0,9 juta (9%) jiwa dari semua kasus TB dengan kasus kematian sebanyak 0,3 juta jiwa. Kasus kematian penderita tuberkulosis sebesar 1.3 juta jiwa dan 1.0 juta kematian HIV negatif. Kasus tuberkulosis 62% banyak ditemukan di Asia Tenggara dan kawasan Pasifik bagian selatan serta 25% dikawasan Afrika. Kasus tuberkulosis di India, Cina dan Indonesia sendiri dilaporkan masing-masing sebesar 27%, 9% dan 8% dari total kasus tuberkulosis di dunia (WHO, 2018). Indonesia merupakan negara dengan angka kesakitan TB terbesar ketiga di dunia setelah India dan China dengan jumlah kasus tuberkulosis sebesar 319 per 100.000 penduduk dan angka kematian sebesar 40 per 100.000 penduduk pada tahun 2017. Angka kesakitan tuberkulosis pada tahun 2018 dilaporkan sebanyak 566.623 kasus, lebih tinggi dibandingkan angka kesakitan yang dilaporkan pada tahun 2017 yaitu 446.732 kasus (WHO, 2018; Kemenkes RI, 2018).

Penanganan dan pencegahan tuberkulosis sampai sekarang ini masih menggunakan program DOTS (*Directed Observed Treatment Serves*) dan pemberian vaksin BCG (*Bacille Calmette-Guérin*). Pelaksanaan program DOTS untuk penanggulangan kasus tuberkulosis masih belum terlaksana secara optimal karena pasien tidak konsisten dalam pengobatan, sehingga sering terhenti sebelum pengobatan tuntas. Dampak lain yang ditimbulkan oleh pengobatan tuberkulosis dalam jangka waktu yang lama adalah timbulnya gejala-gejala mual, pusing dan gejala-gejala klinik lainnya sehingga pasien tidak mau melanjutkan pengobatan (Otu, 2013; Kemenkes RI, 2015). Pemberian vaksin BCG sebagai tindakan pencegahan tuberkulosis tidak memberikan hasil yang optimal dan mempunyai efikasi 0-80 % serta hanya efektif melindungi bayi dan anak-anak. Proteksi vaksin BCG pada orang dewasa dan kasus reinfeksi tidak memberikan hasil yang signifikan (Piubelli *et al.*, 2013). Hambatan dalam pengendalian penyakit TB adalah keunikan karakteristik dari bakteri *M. tuberculosis* seperti strain yang sangat bervariasi, sifat pertumbuhan yang lambat, lamanya waktu yang diperlukan untuk pengobatan, adanya strain yang mengalami resistensi (*Multidrug resistens of tuberculosis* (MDR-TB)), perkembangan infeksi *Human Immunodeficiency Virus* (HIV/AIDS), adanya infeksi laten yang mencapai 40-50% kasus infeksi, adanya variasi strain, efektifitas vaksin TBC yang semakin menurun serta metode diagnosis yang belum optimal. Hambatan lain dalam penanganan TB adalah belum terintegrasinya layanan publik dan swasta, kasus *latent TB infection* (LTBI), serta kasus baru tuberkulosis yang belum ternotifikasi dan ditemukan (Yuen *et al.*, 2014; WHO, 2018).

Pemeriksaan laboratorium untuk mendeteksi *M. tuberculosis* sampai saat ini masih menggunakan pemeriksaan kultur, mikroskopik dan genexpert (TCM). Pemeriksaan menggunakan kultur masih menjadi *gold*

standar untuk menegakkan diagnosis tuberkulosis. Pemeriksaan Tuberkulosis dengan kultur memerlukan waktu 2 sampai 8 minggu dan harus dilakukan pengolahan sampel dengan baik. Lamanaya waktu pemeriksaan tuberkulosis dengan kultur ini mengakibatkan diagnosis tuberkulosis menjadi tidak efektif. Pemeriksaan mikroskopis basil tahan asam (AFB) memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang rendah. Deteksi *M.tuberculosis* dengan mikroskopis tidak dapat membedakan antara bakteri Tuberkulosis dan Non-Tuberkulosis (NTM) meskipun pemeriksaan ini cepat dan murah. Beberapa tes lain yang digunakan untuk diagnosis tuberkulosis adalah serologis test, Mantoux test, dan test PCR (Nair *et al.*, 2017; Pope *et al.*, 2018). Tehnik amplifikasi asam nukleat pada test PCR memiliki banyak keunggulan, terutama dapat mendeteksi *M.tuberculosis* meskipun jumlah kuman sedikit, akan tetapi biaya mahal sehingga tidak terjangkau oleh masyarakat dengan penghasilan rendah (Pope *et al.*, 2018). Pengembangan alat diagnostik sebagai salah satu pilar utama untuk mengatasi masalah TB sangat diperlukan. Alat diagnostik yang optimal, hendaknya dapat mendeteksi semua bentuk TB lebih awal, dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dan hasil dapat diketahui secara cepat, tepat, murah dan mudah untuk diaplikasikan (Martin *et al.*, 2021). Uji serodiagnostik untuk deteksi antibodi *M.tuberculosis* merupakan metode deteksi yang cepat dan mudah sehingga dapat menjadi pilihan yang tepat untuk uji diagnostik (Sulman *et al.*, 2021).

Mycobacterium protein tuberkulosis (MPT) 64 merupakan protein yang mempunyai peranan yang penting dan antigen yang spesifik dari *M. tuberculosis*. Protein ini disandi oleh gen Rv1980c yang berada pada lokasi *Regions of Diffrences (RD) 2* dan bersifat imunogenik. Studi imunoreaktivitas terhadap berbagai hewan uji menunjukkan antigen MPT64 bersifat imunodominant dan dapat meningkatkan reaksi hipersensitivitas. Pada penderita tuberkulosis antigen MPT 64 memicu ekspresi INF- γ (Gong *et al.*, 2022). Protein MPT64 di prediksi sebagai antigen dari *M. tuberculosis* yang pertama kali berinteraksi dengan sistem imun tubuh dari *host* dan merupakan protein yang sangat penting dalam merangsang respon imun pada individu yang terinfeksi oleh *M. tuberculosis*. Protein ini dikenal oleh sel Th melalui molekul MHC yang dipresentasikan oleh sel makrofag yang selanjutnya terdifferensiasi menjadi sel Th1 dan Th2 sehingga bisa digunakan sebagai alat diagnostik atau sebagai kandidat vaksin baru terhadap tuberkulosis (Jiang *at al.*, 2013). Penelitian ini memanfaatkan protein rekombinan MPT 64 *M. tuberculosis* untuk mengetahui proliferasi limfosit T dan limfosit B secara invitro.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian ekperimental yaitu melakukan uji proliferasi limfosit T dan limfosit B secara *in vitro*. Protein rekombinan MPT64 *M.tuberculosis* yang uji pada penelitian ini diperoleh dari hasil penelitian peneliti sebelumnya, dimana kloning dan ekspresi gen penyandi protein MPT64 *M.tuberculosis* berasal dari sampel isolat klinik. Protein rekombinan MPT64 dilakukan pemurnian terlebih dahulu sebelum dilakukan pengujian proliferasi limfosit T dan limfosit B. Pemurnian dilakukan dengan kolom kromatografi (Ni-NTA Purification System) karena MPT64 merupakan protein fusi yang mengandung poli histidin pada ujung asam aminonya. Prosedur purifikasi dilakukan sesuai dengan protokol kit kolom *Protino™ Ni-NTA System* (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Hasil pemurnian dikarakterisasi dengan SDS-PAGE.

Selanjutnya, konsentrasi protein rekombinan MPT64 ditentukan menggunakan metode *Biuret*, larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan sebagai standar. Sampel protein sebanyak 50 μ l ditambahkan ke dalam 2,5 ml pewarna *Bradford* dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis (EMCLAB Instruments GmbH, Germany) dengan panjang gelombang 595 nm. Blanko yang digunakan adalah buffer LEW. Konstruksi struktur 3D protein MPT64 *M.tuberculosis* dilakukan dengan program Swiss-model.

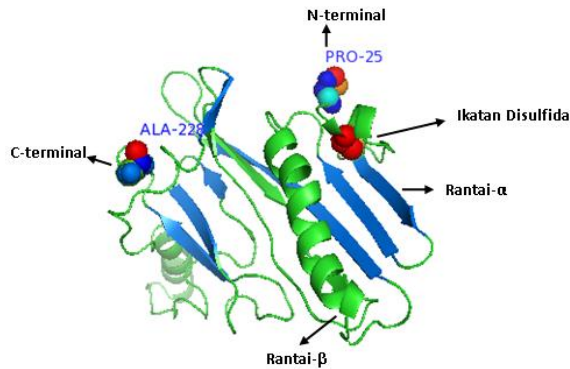
Isolasi limfosit dilakukan dari organ limpa hewan coba (mencit *Balb/c*). Tahap awal, mencit dianestesi dengan menggunakan kethamin (1:5) sebanyak 0,2 ml secara intrakutan, dibiarkan 10-20 menit, kemudian mencit dikorbakan dengan metode *servical dislocation*, dilakukan pembedahan dan di ambil jaringan limpanya. Sel-sel limfosit di isolasi dari jaringan limpa secara aseptis yang dilakukan pada *petri dish* berdiameter 50 mm yang telah di isi dengan medium RPMI steril sebanyak 10 mL. Sel-sel limfosit dikeluarkan dari jaringan limpa dengan cara menyemprotkan media RPMI secara berulang menggunakan syringe sampai jaringan limpa menjadi pucat. Suspensi sel dikumpulkan dalam tabung konikel 10 mL dan di sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Hasil sentrifugasi berupa pellet yang masih mengandung sel darah merah selanjutnya dilisiskan dengan penambahan larutan *buffer tris ammonium klorida* (NH_4Cl) sebanyak 1 mL selama 5 menit. Sel di campur sampai homogen dan di sentrifuge selama 6000 rpm selama 5 menit dan supernatannya di buang. Pellet ditambahkan 10 mL media RPMI, kemudian sel dihitung dengan *hemocytometer*. Sel-sel limfosit selanjutnya di kultur dengan media RPMI dan di inkubasi dalam inkubator anaerob yang mengandung CO_2 5% pada suhu 37°C (Memmert, CO_2 incubator Model INC108Med,) dan di uji aktivitasnya (Hay and Westwood, 2002).

Limfosit (10^5 sel/mL) sebanyak 100 μ L masing-masing dimasukkan ke dalam *well microplate* 96 wells. Kelompok perlakuan dibagi menjadi 3, Kelompok pertama ditambahkan *Phytoheamagglutinin* (PHA) (Kontrol), kelompok kedua ditambahkan PHA dan protein MPT64 (proliferasi limfosit T) dan kelompok ketiga ditambahkan *lippopolysaccharide* (LPS) dan protein MPT64 (proliferasi limfosit B). PHA dan LPS ditambahkan masing-masing sebanyak 2 μ g setiap sumuran. Kelompok perlakuan ditambahkan 100 μ L protein MPT64 masing-masing dengan konsentrasi 1.25 μ g/ml, 2.5 μ g/ml, 5 μ g/ml dan 10 μ g/ml, kemudian di inkubasi dalam inkubator CO_2 5% selama 48 jam pada suhu 37°C . Setelah inkubasi 48 jam, setiap well ditambahkan larutan MTT (5 mg/mL) sebanyak 10 μ L, kemudian di inkubasi 4 jam pada suhu 37°C . Limfosit yang masih hidup akan bereaksi dengan senyawa MTT yang menghasilkan warna ungu. Reaksi limfosit T dan limfosit B dengan MTT dihentikan dengan penambahan 100 μ L larutan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10% dalam asam klorida 0,01N (*reagent stopper*) pada masing-masing well dan didiamkan sampai 24 jam pada suhu ruangan. Optical dencity yang terbentuk selanjutnya di ukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader* (mrc, Auto Microplate Reader) pada panjang gelombang 595 nm.

Hasil Penelitian dan Pembahasan

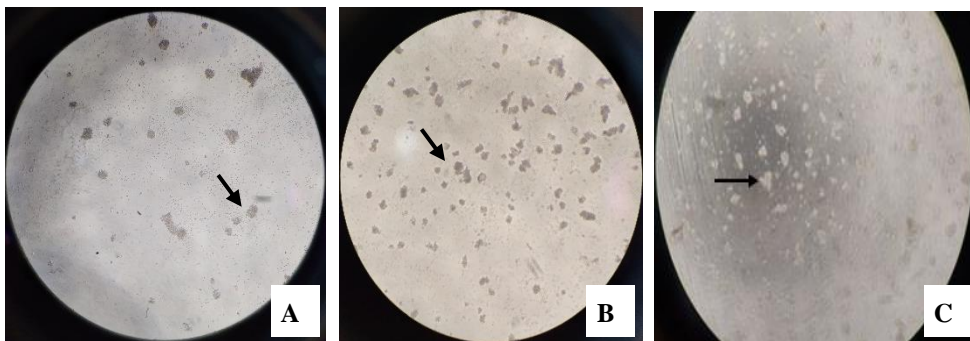
Struktur sekunder protein MPT64 *M.tuberculosis* ditentukan oleh susunan rantai asam amino yang mempengaruhi sifat dan struktur protein yang di bentuk. Struktur 3D protein MPT64 terlihat seperti pada Gambar 1. Protein MPT64 yang diekspresikan oleh *M. tuberculosis H37Rv* mempunyai berat molekul 24.8

kDa. Struktur sekunder protein MPT64 terbentuk karena adanya ikatan hidrogen antara atom O dari gugus karbonil (C=O) dengan atom H dari gugus amino (N-H) dalam satu rantai peptida.



Gambar 1. Struktur 3D Protein MPT64 *M.tuberculosis*

Bentuk tersier dari struktur protein MPT 64 ditentukan oleh reaksi yang terjadi antara gugus R (rantai samping) dari asam-asam amino penyusunnya sehingga membentuk struktur tiga dimensi yang kompak dan padat pada protein tersebut. Struktur tiga dimensi protein MPT64 distabilkan oleh beberapa jenis ikatan yang terbentuk, yakni ikatan ionik, ikatan hidrofobik, ikatan hidrogen, dan ikatan kovalen. Ikatan hidrofobik sangat penting bagi protein MPT64 karena akan mempengaruhi sifat antigenitas yang terbentuk terhadap sistem imun. Asam-asam amino yang bersifat hidrofobik akan membentuk ikatan dengan asam amino dari bagian dalam protein globuler yang tidak berikatan dengan air. Sedangkan asam-asam amino yang mempunyai sifat hidrofilik pada umumnya terdapat di bagian permukaan luar dari protein tersebut dan membentuk ikatan dengan air yang berada di sekelilingnya (Murray *et al.*, 2009; Lehninger *et al.*, 2004).

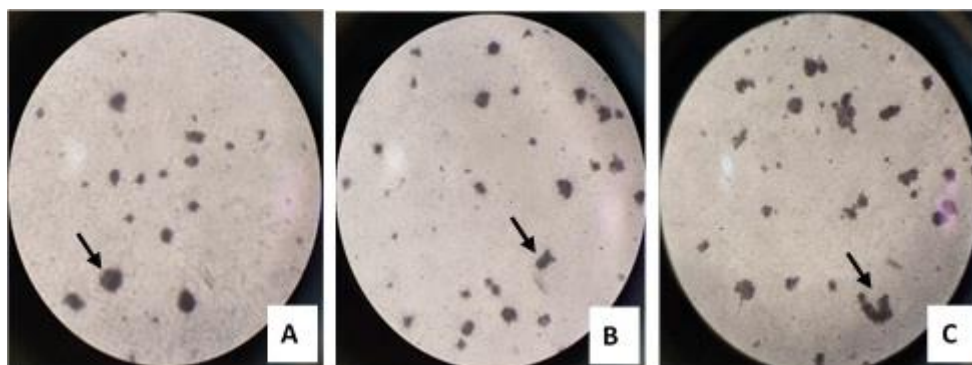


Gambar 2. Hasil pemeriksaan mikroskopis (p:400x) Proliferasi sel limfosit pada media RPMI. Proliferasi limfosit T yang di induksi PHA (A), proliferasi limfosit T yang di induksi PHA dan MPT64 (B), Proliferasi Limfosit B yang di induksi LPS dan MPT64 (C).

Proliferasi limfosit T dan B pada medium RPMI dilakukan selama 48 jam pada suhu 37°C dalam suasana anaerob dengan konsentrasi CO₂ 10%. Pertumbuhan limfosit T dan B setelah 48 jam pada medium

RPMI dengan berbagai perlakuan terlihat pada Gambar 2 (Perbesaran 400x). Pertumbuhan limfosit T pada medium RPMI yang mengandung PHA menunjukkan jumlah limfosit T lebih sedikit dibandingkan pertumbuhan limfosit pada media yang mengandung PHA yang dikombinasikan dengan protein MPT64 atau LPS yang dikombinasikan dengan protein MPT64. Pada Gambar 3 terlihat bahwa pertumbuhan limfosit B pada medium RPMI yang mengandung LPS yang dikombinasikan dengan MPT64 lebih tinggi dibandingkan dengan pertumbuhan limfosit T yang di induksi dengan PHA dan MPT64. Hasil pewarnaan limfosit T dan B dengan MTT selama 4 jam pada suhu ruangan menunjukkan bahwa pertumbuhan sel T dan sel B yang dikombinasikan dengan protein MPT64 lebih banyak.

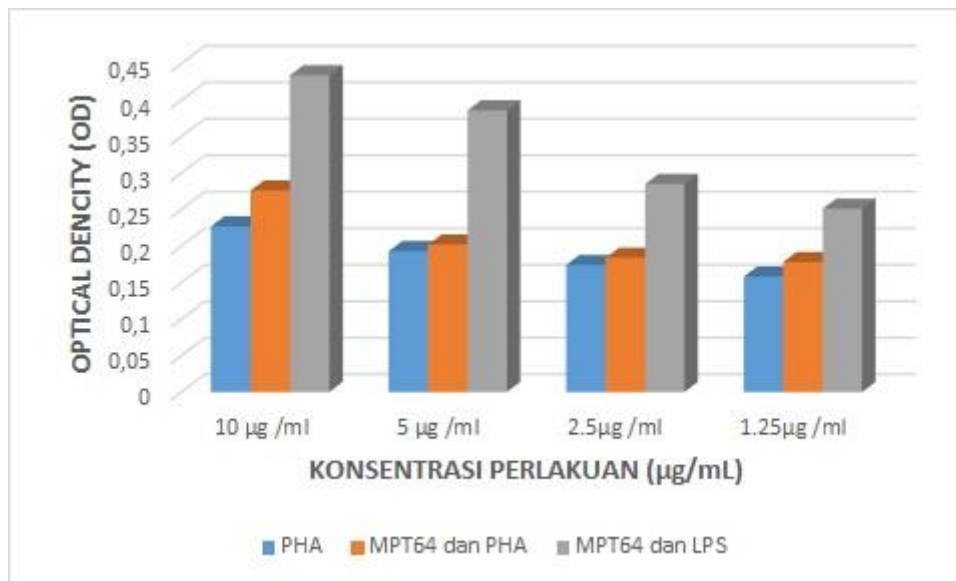
Pengujian antigenitas protein MPT64 *M.tuberculosis* terhadap proliferasi limfosit T dan B dilakukan dengan menggunakan metode (3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT). Metode ini didasarkan pada prinsip reaksi redoks yang berlangsung di dalam sel. MTT akan mengalami reaksi reduksi di dalam mitokondria sel hidup oleh enzim *suksinat dehidrogenase* membentuk garam formazan. Semakin banyak ditemukan sel yang hidup (viabilitas sel tinggi) akan menyebabkan semakin tinggi absorbansi yang dihasilkan. Jumlah limfosit yang hidup dan berproliferasi setara dengan optical density warna kristal formazan yang terdeteksi dengan alat ELISA reader, sehingga nilai *optical density* (OD) yang terbentuk dapat digunakan untuk mengukur aktivitas proliferasi limfosit T dan limfosit B. Uji proliferasi limfosit T dan B terhadap protein MPT64 *M.tuberculosis* dilakukan secara *in vitro* pada media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI 1640). Penentuan aktivitas antigenik protein MPT64 *M.tuberculosis* terhadap pertumbuhan limfosit T dan B pada media RPMI di inkubasi selama dua hari (48 jam). Uji proliferasi limfosit T pada penelitian ini di induksi menggunakan mitogen *Phytohaemagglutinin* (PHA), sedangkan proliferasi terhadap limfosit B di induksi dengan *lipopolisakarida* (LPS) (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil pemeriksaan mikroskopis (p:400x) Uji MTT proliferasi Limfosit T dan B. Uji MTT Limfosit T yang di induksi PHA (A), Uji MTT Limfosit T yang di induksi PHA dan MPT64 (B), Uji MTT Limfosit B yang di induksi LPS dan MPT64 (C).

Nilai *optical density* (OD) hasil uji MTT proliferasi limfosit T dan B terhadap protein MPT64 terlihat pada Gambar 4. Hasil uji proliferasi sel B pada Gambar 4 menunjukkan bahwa OD tertinggi diperoleh dari perlakuan kombinasi LPS dan protein MPT64 yang diberikan dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$ yaitu dengan nilai OD 0.434, sedangkan pada konsentrasi 5 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 dan 1.25 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan nilai OD masing-masing

adalah 0.386, 0.285 dan 0.251. Hasil uji proliferasi limfosit T dari kombinasi PHA dan protein MPT64 dengan konsentrasi 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml dan 1.25 µg/ml menunjukkan nilai OD masing-masing adalah 0.276, 0.202, 0.184 dan 0.178. Berdasarkan pengukuran nilai OD tersebut didapatkan nilai terendah pada perlakuan kombinasi PHA dengan protein MPT64 pada konsentrasi 1.25 µg/ml yaitu 0.178, namun nilai OD tersebut masih lebih besar bila dibandingkan dengan nilai OD dari perlakuan pemberian PHA saja yaitu 0.158.



Grafik 4. Optical density (OD) hasil pewarnaan MTT proliferasi Limfosit T dan B yang di induksi PHA (Kontrol), PHA dan MPT64 (Limfosit T), serta LPS dan MPT64 (Limfosit B) dengan berbagai konsentrasasi.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Gong *et al.*, (2022) menunjukkan bahwa protein MPT64 dapat menginduksi sel B untuk menghasilkan antibodi yang sangat tinggi apabila dikombinasikan dengan vaksin BCG, di samping itu dapat meningkatkan aktivitas imunitas seluler dan berperan dalam menghasilkan berbagai sitokin. Respon antibodi yang dihasilkan oleh sel B sangat penting terhadap infeksi *M. tuberculosis* karena dapat saling bersinergi dengan imunitas seluler. Antibodi mempunyai berperan dalam opsonisasi, netralisasi, aktivasi komplemen dan toksisitas terhadap patogen (*antibody dependent cell cytotoxicity*). Mekanisme imunitas sel B terhadap *M. tuberculosis* melalui produksi sitokin, APC, dan mempengaruhi sel leukosit untuk membunuh bakteri secara intraseluler (Maglione and Chan, 2009).

Pengujian proliferasi limfosit T dan B terhadap protein rekombinan MPT64 di uji menggunakan metode MTT yaitu pewarnaan terhadap sel-sel yang masih hidup. Pewarnaan ini didasarkan pada reaksi senyawa 3-[4,5-dimetilthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) dengan enzim suksinat dehidrogenase yang dihasilkan oleh sel. Enzim suksinat dehidrogenase akan menghidrolisis garam tetrazolium yang berwarna kuning menjadi warna kristal biru formazan yang kemudian di baca menggunakan ELISA reader. Sintesis enzim suksinat dehidrogenase dalam sel hidup terjadi pada bagian mitokondria sel. Banyaknya warna formazan yang terbentuk mengindikasikan banyaknya jumlah enzim yang menghidrolisis garam tetrazolium (Harti *et al.*, 2018). Kondisi ini menunjukkan bahwa banyaknya sel yang hidup sesuai

dengan banyaknya warna formazan yang dihasilkan. Penelitian ini menggunakan senyawa mitogen *Phytohaemagglutinin* (PHA) dan lipopolisakarida (LPS) untuk proliferasi limfosit T dan limfosit B. Induksi proliferasi limfosit T dengan mitogen PHA terjadi karena protein lektin mitogen PHA yang berasal dari tumbuhan mengandung gula terikat dapat berfungsi sebagai triger proliferasi limfosit T. Lektin dapat mengenali setiap karakteristik glikoprotein yang terdapat pada lapisan luar setiap sel, termasuk limfosit. Mitogen LPS berasal dari bakteri *Salmonella typhi* dan *Eschericia sp* yaitu merupakan komponen dinding sel dari bakteri tersebut. LPS merupakan bagian lipid dari dinding sel bakteri yang berinteraksi dengan membran plasma sehingga menghasilkan aktivitas seluler dari LPS yang dapat memicu proliferasi limfosit B dan mempunyai aktivitas mitogenik.

Pengamatan hasil proliferasi limfosit T dan limfosit B pada penelitian ini dilakukan selama 2 hari (48 jam) karena disesuaikan dengan kandungan nutrisi yang terdapat dalam media RPMI yang digunakan untuk pertumbuhan limfosit selama proses pengkulturan. Glukosa merupakan salah satu sumber energi yang sangat diperlukan oleh limfosit untuk tumbuh dan berproliferasi. Kandungan glukosa yang terdapat pada media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) komplit mempunyai fungsi yang sangat vital sebagai sumber energi untuk proliferasi limfosit. Keterbatasan jumlah glukosa pada media RPMI yang diakibatkan karena masa inkubasi yang lebih dari dua hari (48 jam) dapat menyebabkan proliferasi limfosit tidak berjalan secara baik dan optimal, sehingga berdampak terhadap jumlah sel yang hidup pada media RPMI. Kandungan nutrisi yang tinggi seperti glukosa, asam amino, vitamin, dan garam-garam organik yang terdapat pada media RPMI sangat baik untuk kultur limfosit (Maclever *et al.*, 2008).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian protein MPT64 yang dikombinasikan dengan PHA (pertumbuhan sel T) dan LPS (pertumbuhan sel B) menunjukkan nilai optical density yang lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian PHA saja. MPT64 merupakan protein yang pertama kali bereaksi dengan sistem imun host, dan dapat meningkatkan aktivasi sistem imun pada seseorang yang terinfeksi tuberkulosis. MPT dapat mengaktivasi sel makrofag untuk menghasilkan respon imun yang kuat (Zare *et al.*, 2019; Xiao *et al.*, 2019). MPT64 adalah Immunodominant antigen sekretori dan sangat penting untuk interaksi dengan sel host, berperan dalam pengaturan sistem imun, proliferasi sel serta berperan dalam menentukan kemampuan hidup bakteri dalam sel host. Protein ini di hasilkan selama proses infeksi dan menentukan jalur aktivasi sistem imun adaptif, seperti aktivasi sel T efektor. MPT64 dapat menginduksi INF- γ dan meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi melalui aktivasi NF- κ B dan ROS. Protein MPT64 dapat berinteraksi dengan beberapa protein host seperti Heksokinase 2 (HK2), TBK1, protein kinase Ca dan TNF receptor associated factor 6 (TRAF 6). Interaksi protein MPT64 dengan protein-protein tersebut dapat memicu aktivasi sistem imun seluler maupun humoral (Kim *et al.*, 2019). Kombinasi vaksin BCG dengan protein MPT64 menunjukkan pembentukan antibodi spesifik dan INF- γ yang sangat tinggi (Gong *et al.*, 2022). Mekanisme terjadinya proses proliferasi limfosit disebabkan karena terjadinya ikatan senyawa aktif pada lapisan luar limfosit T dan B. Adanya ikatan antara antigen dengan protein reseptor yang terdapat pada lapisan luar limfosit T bersama dengan interleukin 1 (IL-1) yang dihasilkan oleh APC (*Antigen Presenting Cell*) dapat menstimulasi aktivasi G-protein pada permukaan sel yang selanjutnya akan menghasilkan enzim fosfolipase C. Fosfolipase C merupakan enzim yang dapat menghidrolisis fosfatidil inositol bifosfat (PIP2) menjadi diasil gliserol (DAG)

dan *inositol trifosfat* (IP₃). Proses hidrolisis oleh *enzim fosfolipase C* ini berlangsung dalam membran plasma. Inositol trifosfat selanjutnya akan menstimulasi sekresi Ca²⁺ ke dalam sitoplasma sehingga konsentrasinya meningkat. Peningkatan konsentrasi Ca²⁺ dalam sitoplasma akan menstimulasi aktivitas enzim protein *kinase C* dan *5-lipooxygenase*. Protein *kinase C* yang teraktivasi menyebabkan peningkatan sekresi interleukin-2 (IL-2), yang merangsang aktivasi limfosit T dan B untuk berproliferasi (Roitt & Delves, 2001). IL-2 memiliki peranan besar dalam menstimulus limfosit T untuk berproliferasi. Proliferasi limfosit T yang di rangsang oleh antigen, diatur oleh ikatan antara IL-2 dengan reseptornya. Selain itu, IL-2 juga dapat merangsang proliferasi dan diferensiasi limfosit B (Baratawidjaja, 2012).

Kesimpulan

Protein rekombinan MPT64 *M.tuberculosis* bersifat antigenik yang dapat merangsang proliferasi Limfosit T dan B secara in vitro dengan konsentrasi yang paling optimal adalah 10 µg/ml.

Daftar Pustaka

- Baratawidjaja, K.G. (2012). *Imunologi Dasar*. Eds.10. Fakultas Kedokteran UI. Jakarta.
- Gong, W., Pan, C., Cheng, P., Wang, J., Zhao, G., and Wu, X. (2022). Peptide-Based Vaccines for Tuberculosis. *Frontiers in immunology*, 13, 830497. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.830497>
- Hay, F.C., and Westwood, O.M.R. (2002). *Practical Immunology*. Fourth. Edition. Blackwell Science Ltd. UK.
- Harti, S.H., Murharyati, A., Sulisetyawati, D., and Oktariani, M. (2018). The effectiveness of snail mucus (*Achatina fulica*) and chitosan toward limfosit proliferation in vitro. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(15):85. doi:10.22159/ajpcr.2018.v11s3.30041
- Jiang, Y., Liu, H., Wang, H., Dou, X., Zhao, X., Bai, Y., Wan, L., Li, G., Zhang, W., Chen, C., and Wan, K. (2013). Polymorphism of antigen MPT64 in Mycobacterium tuberculosis strains. *Journal of clinical microbiology*, 51(5), 1558–1562. <https://doi.org/10.1128/JCM.02955-12>
- Jonez-Lopez, E. C., Namungga, O., Mumbowa, F., Ssebidandi, S., Mbabazi, O., Moine, S., Mboowa, G., Fox, M. P., Reilly, N., Ayakaka, I., Kim, S., Okwera, A., Joloo, M., and Fennely, K.P. (2013). Cough aerosols of Mycobacterium tuberculosis predict new infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 187 (9): 1007-1015.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia., 2018. Profil Kesehatan Indonesia. Kemenkes RI, Jakarta.
- Kim, J.S., Cho, E., Mun, S.J., Kim, S., Kim, S.Y., Kim, D. G., Son, W., Jeon, H.I., Kim, H.K., Jeong, Y.J., Jang, S., Kim, H. S., and Yang, C.S. (2021). Multi-Functional MPT Protein as a Therapeutic Agent against *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomedicines*, 9(5), 545. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050545>
- Kusuma, S., Parwati, I., Rostinawati, T., Yusuf, M., Fadhlillah, M., Ahyudanari, R.R., Rukayadi, Y., and Subroto, T. (2019). Optimization of culture conditions for *Mpt64* synthetic gene expression

-
- in *Escherichia coli* BL21 (DE3) using surface response methodology. *Heliyon*, 5(11), e02741. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02741>
- Lehninger, A. L. (2004). *Principles of Biochemistry*. Amhrest: Elsevier Science.
- Maglione, P.J., and Chan, J. (2009). How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Immunology*, 39(3): 676-686. <http://doi.org/10.1002/eji.200839148>
- Maclver, N.J., Jacobs, S.R., Wieman, H.L., Wofford, J.A., Coloff, J.L., and Rathmell, J.C. (2008). Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *Journal of Leukocyte Biology*, 84, 949-957.
- Martin, D. R., Sibuyi, N. R., Dube, P., Fadaka, A. O., Cloete, R., Onani, M., Madiehe, A. M., and Meyer, M. (2021). Aptamer-Based Diagnostic Systems for the Rapid Screening of TB at the Point-of-Care. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(8), 1352. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081352>
- Murray, *et al.* (2009). *Harper's illustrated biochemistry*. Twenty-Eighth Ed. New York: Mc Graw Hill Medical.
- Nair, P.K., and Chourasia, E. (2017). Use of genexpert assay for diagnosis of tuberculosis from body fluid specimens, a 2 years study. *J Microbiol Biotechnol*. 1(1):105
- Otu, A.A. (2013). Is the directly observed therapy short course (DOTS) an effective strategy for tuberculosis control in a developing country. *Asian. Pac. J. trop Dis*, 3(3):227-231.
- Piubelli, L., Campa, M., Temporini, C., Binda, E., Mangione, F., Amicosante, M., and Pollegioni, L. (2013). Optimizing *Escherichia coli* as a protein expression platform to produce *Mycobacterium tuberculosis* immunogenic proteins. *Microbial Cell Factories*, 12:115.
- Pope, V., Sacksteder, K. A., Herrera, J. C., Gilman, R. H., Vargas-Prada, S., Lopez Romero, S., Yafac, J., Sanchez Rios, E., and Moore, D. (2018). MPT64 patch test for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis: a randomised controlled trial in Peru. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 22(6), 622–627. <https://doi.org/10.5588/ijtld.17.0716>
- Roitt, I.M., and Delves, P.J. (2001). *Essential immunology*, eds. 10. Oxford. Wiley-Blackwell Science.
- Song, S., Zhang, Q., Yang, H., Guo, J., Xu, M., Yang, N., Yi, J., Wang, Z., & Chen, C. (2022). A combined application of molecular docking technology and indirect ELISA for the serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of veterinary science*, 23(3), e50. <https://doi.org/10.4142/jvs.21270>
- Sulman, S., Shahid, S., Khalid, A., Ambreen, A., Khan, I.H., *et al.* (2021). Enhanced serodiagnostic potential of a fusion molecule consisting of Rv1793, Rv2628 and a truncated Rv2608 of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE*, 16(11):e0258389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258389>
- World Health Organization. (2018). *Global Tuberculosis Control: WHO Report*. World Health Organization Press, Geneva, Switzerland.
- Xiao, T., Jiang, Y., Li, G., Pang, H., Zhao, L., Zhao, X., and Wan, K. (2019). Polymorphism of MPT64 and PstS1 in *Mycobacterium tuberculosis* is not likely to affect relative immune reaction in human. *Medicine*, 98(49), e18073. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018073>

- Yuen, C.M., Weyenga, H.O., Kim, A.A. (2014). Comparison of trends in tuberculosis incidence among adults living with HIV and adults without HIV – Kenya 1998–2012. *Plos One*, 9: e99880.
- Zare, H., Aryan, E., Alami, S., Yaghoubi, A., Teimourpour, R., & Meshkat, Z. (2018). Designing and Construction of a Cloning Vector Containing *mpt64* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tanaffos*, 17(3), 198–202.