



Desain vaksin *In Silico* berdasarkan Epitope Protein *Mammalian Cell Entry Associated Membrane Rv1973* untuk *Tuberculosis* (TBC) paru-paru

Laurentius Ivan Tedjokusumo, Yohanes Alvin Goenawan, Mariana Wahjudi*

Program Studi Magister Bioteknologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Jl. Raya Kalirungkut, Surabaya 60293, Indonesia

*Corresponding Author: mariana_wahjudi@staff.ubaya.ac.id

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) disease caused by Mycobacterium tuberculosis bacteria is still a dangerous infectious disease until now. Indonesia is one of the countries that contributes the highest number of TB cases globally. The BCG vaccine that has been used so far still has weaknesses in preventing TB cases. This study presents an in-silico vaccine design, based on the Rv1973 protein, an outer membrane protein of M. tuberculosis H37Rv. The analysis was carried out with the following stages: prediction of protein structure and sub-cellular location, search for epitope presence, immunological analysis, determination and modelling of the epitope and their interaction with T cell and B cells receptors, and toxicity tests of the epitope. The result showed that the Rv1937 protein might be laid on a membrane and parts are over hanged outside the cell. There were several candidates epitopes on Rv1937 protein sequence which are potential as an alternative candidate epitope for TB vaccine. There are five linear epitopes, with the ERv105-118 epitope predicted to have the strongest interaction with T-cell and B-cell receptors. The ERv105-118 epitope has properties as antigen, non-allergenic, strong interaction with T-cell and B-cell receptors, and non-toxic. This epitope also has better characteristics than ESAT-6 protein epitope in antigenicity, allergenicity, and interaction with T-cell and B-cell receptors. Based on the result, the epitope might be used as an alternative candidate vaccine for controlling the infection process of TB.

Keywords: epitope, *Mycobacterium tuberculosis*, Rv1973, tuberculosis, vaccine

Abstrak

Penyakit TBC yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* masih menjadi penyakit infeksi yang berbahaya hingga saat ini. Indonesia menjadi salah satu negara yang menyumbang angka kasus TB terbanyak di dunia. Vaksin BCG yang telah digunakan selama ini juga masih memiliki kelemahan dalam pencegahan kasus infeksi TBC. Penelitian ini menyajikan desain vaksin secara *in silico* yang dirancang berdasarkan protein Rv1973, yang merupakan *outer membrane protein* dari *M. tuberculosis* H37Rv. Analisa dilakukan dengan tahapan sebagai berikut: prediksi struktur dan lokasi protein, pencarian kandidat epitope, analisa imunologi epitop, penentuan dan pemodelan kandidat epitope, dan interaksinya dengan reseptor sel T dan sel B, dan uji toksisitas epitop. Hasil studi *in silico* menunjukkan bahwa protein Rv1937 terletak pada membrane dan sebagian di sebelah luar sel. Pada protein Rv1937 terdapat beberapa epitope potensial. Protein Rv1973 memiliki lima jenis linear epitop, dengan epitop ERv105-118 terprediksi memiliki interaksi dengan reseptor sel T dan sel B tertinggi. Epitop ini terletak. Epitop ERv105-118 ini memiliki karakteristik sebagai antigen, non-alergenik, berinteraksi kuat dengan reseptor sel T dan sel B, dan non-toksik. Epitop ERv105-118 juga memiliki sifat antigenisitas, alergenisitas, dan interaksi dengan reseptor sel T dan sel B yang lebih baik dibandingkan dengan epitop dari protein ESAT-6 sebagai protein standar. Dapat disimpulkan bahwa kandidat epitop tersebut diprediksi dapat menjadi kandidat alternatif vaksin yang tepat bagi pencegahan proses infeksi TB.

Kata Kunci: *Mycobacterium tuberculosis*, Rv1973, tuberculosis, vaksin

PENDAHULUAN

Pulmonary tuberculosis atau yang lebih dikenal dengan TBC merupakan salah satu jenis penyakit infeksi yang hingga kini masih menjadi perhatian utama di bidang kesehatan. Pada tahun 2020, *World Health Organization* (WHO) melaporkan total kematian (mortalitas) yang disebabkan oleh TBC mencapai 1,5 juta jiwa. Secara global, TBC menjadi penyakit infeksi menular yang menyebabkan kematian nomor dua setelah Covid-19. Asia Tenggara menjadi wilayah dengan jumlah terbesar kasus TBC baru, dengan persentase mencapai 43% dari kasus TBC di seluruh dunia. Indonesia sendiri menjadi salah satu negara dari delapan negara yang menyumbang dua pertiga kasus TBC baru di dunia [1].

Vaksinasi menjadi salah satu upaya yang secara masif dilakukan untuk menekan angka kasus baru TBC. Vaksinasi merupakan suatu proses untuk memperkuat sistem imun tubuh manusia dalam melawan penyakit infeksi. *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) merupakan jenis vaksin primer yang hingga kini digunakan di banyak negara. Meskipun vaksin BCG dapat mencegah infeksi TBC pada bayi, pada prakteknya efikasi vaksin BCG pada orang dewasa sangat bervariasi dari 0% hingga 80%, pada daerah dan percobaan yang berbeda [2]. Pada beberapa hasil penelitian, pemberian vaksin BCG pada orang dewasa tidak terlalu efektif dalam mencegah infeksi TBC pada daerah tropis dan subtropis [3].

Vaksin BCG telah digunakan oleh WHO sebagai program imunisasi resmi sejak tahun 1960-an. Hingga kini vaksin BCG telah digunakan sebagai vaksin primer pencegahan TBC selama 60 tahun lebih, dimana saat ini efikasi vaksin BCG dipercaya telah mengalami penurunan. Beberapa penyebab utama menurunnya efikasi vaksin BCG antara lain adalah munculnya banyak strain baru dari *Mycobacterium tuberculosis* dan berkembangnya *multiresistant drug* TBC. Vaksin BCG juga memiliki beberapa kelemahan dan kekurangan dalam upaya pencegahan TBC, salah satunya disebabkan oleh faktor geografis yang memberikan pengaruh besar terhadap efektivitas vaksin BCG.

Sebagai upaya dalam menjawab permasalahan tersebut, kandidat vaksin TBC yang baru perlu dikembangkan. Kandidat vaksin juga perlu dipilih secara spesifik terhadap beberapa jenis strain bakteri di daerah geografis tertentu. Pendekatan dalam

pembuatan kandidat vaksin tidak hanya melibatkan bakteri utuh yang dilemahkan, melainkan juga dapat menggunakan bagian tertentu dari bakteri yang bertanggung jawab terhadap proses infeksi. Alternatif vaksin lain yang sering dikembangkan sebagai pengganti BCG adalah vaksin subunit yang memanfaatkan protein ESAT-6 (6 kDa *early secretory antigenic target*). Protein tersebut merupakan jenis antigen yang disekresikan oleh *Mycobacterium* saat berada dalam tubuh pasien, dan berperan dalam sifat virulensi *M. tuberculosis* [4]. Namun beberapa penelitian menunjukkan protein ESAT-6 yang diberikan secara tunggal sebagai vaksin tidak menunjukkan sifat imunogenisitas yang baik [5].

Bakteri *M. tuberculosis* strain H37Rv merupakan strain yang paling banyak diteliti saat ini. Strain ini mampu mempertahankan sifat virulensinya pada hewan model tuberkulosis. Selain itu, strain ini juga peka terhadap antibiotika untuk pengobatan TBC dan cukup stabil untuk dimodifikasi melalui rekayasa genetika [6].

Gen Rv1973 dari genom *M. tuberculosis* banyak diteliti karena berperan dalam proses infeksi [7]. Sekuens lokus tersebut mengkode protein Rv1973 yang merupakan suatu *outer membrane protein*, berperan dalam memfasilitasi proses pengenalan bakteri ke sel inang. Protein tersebut berperan dalam infeksi *M. tuberculosis* pada manusia dan sering kali ditemukan sebagai antigen dalam plasma darah penderita TBC. Berdasarkan hal ini, maka dilakukan analisa *in silico* protein Rv1973 sebagai kandidat vaksin. Kajian ini menjadi tahapan awal dalam proses pemilihan kandidat vaksin TBC yang potensial dan ideal. Analisa secara *in silico* akan memberikan gambaran dan data awal yang relevan bagi penelitian selanjutnya.

Perancangan vaksin TBC, akan melibatkan analisa protein Rv1937 dari *M. tuberculosis*. Secara umum, protein atau sel patogen yang masuk ke dalam tubuh manusia, didegradasi oleh makrofag maupun sel B, dan bagian epitopnya terpapar di permukaan sel antigen presenting cell. Epitop ini dapat membentuk kompleks dengan sel T *helper* dan sel B yang menginduksi produksi antibodi. Tujuan penelitian ini adalah melakukan analisa secara *in silico* potensi protein Rv1937 *M. tuberculosis* sebagai kandidat vaksin TBC. Pada studi ini sifat protein Rv1973 yang penting untuk kandidat vaksin diuraikan. Semua analisis dan perancangan dilakukan melalui pendekatan secara bioinformatika.

METODE PENELITIAN

Dasar penentuan potensi protein Rv1937 sebagai kandidat vaksin pertama-tama dilihat dari karakteristik molekuler protein dan interaksinya dengan sel T dan sel B.

Analisa sekuens asam amino dan karakteristik protein Rv1973 dan protein standar

Sekuen asam amino protein Rv1973 dan protein standar didapatkan dari *database GenPept NCBI* dengan nomer akses WP_003899110 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Berat molekul dan nilai pI protein ditentukan menggunakan software *Compute pI/Mw tool* pada *webserver ExPasy* (<https://www.expasy.org/>). Lokasi sub-seluler protein diprediksi menggunakan *webserver Softberry* (<http://www.softberry.com/>).

Pemodelan epitope protein

Konstruksi struktur tiga dimensi protein dilakukan dengan menggunakan *webserver Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>). Daerah yang menjadi epitop dieksplorasi dari residu asam amino protein Rv1973 menggunakan *webserver IEDB Analysis Resources* (<http://tools.iedb.org/main/>). Lokasi residu asam amino yang berperan sebagai epitop di dalam sel bakteri dianalisa dengan menggunakan *webserver DeepTMHMM* (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>).

Analisa sifat imunologi epitop

Parameter yang diuji dari sifat imunologi epitop antara lain adalah antigenisitas dan alergenitas. Pengujian antigenisitas dilakukan dengan menggunakan *webserver VaxiJen v2.0* (<http://www.ddg-pharmfac.net/VaxiJen.html>). Pengujian antigenisitas dilakukan dengan ambang batas sebesar 0,4. Sifat alergenitas epitop juga diuji menggunakan *webserver AllergenFP v1.0* (<https://ddg-pharmfac.net/AllergenFP/>).

Prediksi interaksi epitop dengan reseptor sel T dan sel B dengan menggunakan metode *molecular docking*

Interaksi antara epitop protein Rv1973 atau protein ESAT-6 dengan reseptor sel T dan sel B dilakukan dengan menggunakan metode *molecular docking*. Struktur tiga dimensi dari *predicted linear epitop* divisualisasi dengan menggunakan software *UCSF Chimera*. Struktur tiga dimensi dari reseptor

sel T dan sel B diperoleh dari *database Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>). Proses *molecular docking* antara reseptor limfosit (sel T dan sel B) dengan epitop target dilakukan dengan menggunakan software *PyRx* dengan program *AutoDock Vina*. Interaksi antara reseptor limfosit dengan epitop target dilakukan dengan pendekatan *blind docking*. Hasil interaksi divisualisasi menggunakan software *PyMOL*.

Analisa toksisitas epitop target

Epitop protein Rv1973 terpilih yang menunjukkan interaksi dengan reseptor sel T dan sel B selanjutnya dianalisa sifat toksisitasnya. Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan *webserver ToxinPred* (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/protein.php>). Uji dilakukan dengan panjang fragmen 10 residu asam amino dari epitop target.

HASIL PENELITIAN

Penentuan protein Rv1973

Protein target yang diharapkan dalam analisa lanjut secara *in silico* adalah protein yang berlokasi di membran luar dari *M. tuberculosis*. Hasil eksplorasi protein-protein membran luar dari *M. tuberculosis* didapatkan salah satunya adalah protein Rv1973 yang strukturnya kaya akan β -barrel structure. Protein Rv1973 merupakan *mce-associated protein*, yaitu protein yang berada pada membran luar dari *M. tuberculosis* H37Rv. Protein Rv1973 dipilih sebagai kandidat vaksin TBC karena protein tersebut secara spesifik berasal dari *M. tuberculosis* yang merupakan bakteri penyebab infeksi TBC.

Sekuen asam amino dan karakteristik protein Rv1973 dan protein standar

Protein Rv1973 tersusun dari 160 residu asam amino yang linier (WP_003899110.1). Berdasarkan *webserver GenPept NCBI*, protein Rv1973 memiliki berat molekul 16.693 Da. Sekuen residu asam amino dari protein Rv1973 adalah sebagai berikut:
MSWSRVIAYGLLPGLALALTCGAGLLKWQD
GAVRDAAVARAESVRAATDGTALLSYRPDT
VQHDLESARSRLTGTFDAYTQLTHDVVIPGA
QQKQISAVATVAAAASVSTSADRAVLLLFVN
QTITVGGDAPTTAASSVRVTLDNINGRWLISQ
FEPI

Nilai teoritis pH isoelektrik (nilai pI) protein Rv1973 adalah 6,71 dengan berat molekul berdasarkan *webserver ExPASy* adalah 16.824,11 Da. Hasil analisa *post-translation modification* dari protein Rv1973 menunjukkan adanya satu situs pemotongan sinyal peptida yang berada di antara residu asam amino ke-18 dan residu asam amino ke-19, tepatnya yaitu pada urutan residu asam amino ALA-LT. Analisa nilai pI dan berat molekul juga dilakukan terhadap sekuen protein Rv1973 yang telah dihilangkan sinyal peptidanya (residu asam amino ke-1 sampai dengan ke-18), dimana nilai pI yang diperoleh adalah 6,09 dengan berat molekul 14.923,8 Da. Protein Rv1973 merupakan protein yang terletak pada bagian membran sel.

Protein ESAT-6 sebagai protein standar tersusun dari 70 residu asam amino dengan berat molekul 7.394,08 Da dengan nilai teoritis pH isoelektrik (nilai pI) sebesar 4,49. Protein ESAT-6 merupakan protein yang disekresikan sepenuhnya ke luar sel bakteri.

Prediksi epitop protein Rv1973

Pencarian epitop diawali dengan pemodelan struktur tiga dimensi protein Rv1973 dengan menggunakan *webserver Swiss-Model* (Gambar 1A). Prediksi epitop protein menunjukkan bahwa protein Rv 1973 memiliki 5 model *linear epitop* dan 7 model *discontinuous epitop* (Tabel 1 dan Tabel 2). Skor tertinggi baik pada *predicted linear epitop* maupun *predicted discontinuous epitop* adalah 0,849 dimana epitop tersebut terletak pada residu asam amino ke-147 hingga residu asam amino ke-151 (Gambar 1B). Lokasi residu asam amino protein Rv1973 menunjukkan bahwa sebagian besar residu asam amino berada di sisi luar membran dan sisanya berada di sisi dalam membran sel.

Prediksi epitop protein standar

Prediksi epitop protein standar menunjukkan bahwa protein ESAT-6 memiliki 2 model linear epitop (Tabel 3).

Konstruksi epitop protein Rv1973 dan protein standar

Oligopeptida dari lima model *predicted linear epitope* protein Rv1973 (Gambar 2) dan dua model *predicted linear epitope* protein ESAT-6 (Gambar 3) divisualisasi struktur tiga dimensinya agar dapat diproses lebih lanjut dengan metode *molecular docking*.

Uji antigenisitas dan uji alergenitas

Uji antigenisitas dilakukan terhadap kandidat epitop untuk mengetahui kemampuan epitop dalam menstimulus proses pembentukan antibodi dalam tubuh. Nilai antigenisitas menunjukkan peran epitop target sebagai sebuah antigen. Seluruh epitope dari protein Rv1973 menunjukkan hasil kemungkinan bersifat sebagai antigen, kecuali ERv147-151 dikarenakan jumlah residu asam amino pada epitop tersebut terlalu sedikit sehingga tidak dapat dianalisa lebih lanjut (Tabel 3). Epitop ERv147-151 dan epitop ERv105-118 diprediksi tidak bersifat sebagai alergen, sedangkan epitop ERv130-138, epitop ERv91-98, dan epitop ERv57-64 diprediksi bersifat sebagai alergen (Tabel 4). Epitop ES65-70 dari protein ESAT-6 terprediksi tidak bersifat sebagai antigen. Kedua epitop protein standar juga terprediksi bersifat sebagai alergen (Tabel 5).

Molecular docking

Prediksi interaksi antara epitop dengan protein reseptor sel T dan sel B dianalisa dengan *molecular docking*. Reseptor sel T didapat dari *database* PDB 6JXR [8] (Gambar 4A), sedangkan reseptor sel B menggunakan *database* PDB 3KG5 [9] (Gambar 4B). Program *AutoDock Vina* digunakan dalam proses *molecular docking* didasarkan pada pendekatan empiris terhadap fungsi penilaian interaksi antara protein dengan ligan, yaitu dari konfirmasi energi minimum yang diperoleh dari proses *docking* [10]. Pendekatan secara *blind docking* diterapkan karena sisi aktif reseptor tidak diketahui. Pendekatan ini mengacu pada pemasangan ligan ke seluruh permukaan protein tanpa adanya informasi terkait sisi aktif protein. Program tersebut memperkirakan nilai aktifitas pengikatan antara protein (reseptor limfosit sel T dan reseptor limfosit sel B) dengan ligan (epitop).

Docking dilakukan terhadap lima model *predicted linear epitope* protein Rv1973 dengan reseptor sel T dan sel B. Prediksi interaksi antara kelima epitope dari protein Rv1973 dengan reseptor sel T memiliki nilai ΔG antara 11,3 – 12,9 kkal.mol⁻¹ dengan epitop ERv105-118 memiliki nilai *binding affinity* tertinggi, dengan nilai ΔG sebesar -12,9 kkal.mol⁻¹ (Tabel 6). Interaksi kelima epitope tersebut dengan reseptor sel B menunjukkan -9,8 - 11,4 kkal.mol⁻¹ dengan epitop ERv105-118 memiliki nilai ΔG sebesar -11,4 kkal.mol⁻¹ (Tabel 7). Nilai *binding affinity* yang baik ditunjukkan oleh nilai ΔG yang semakin kecil. Nilai negatif menunjukkan

besaran energi yang dikeluarkan atau dihasilkan ketika terjadi interaksi antara protein dengan ligan terjadi.

Tabel 1. Model *predicted linear epitop* pada protein Rv1973 dari *webserver IEDB Analysis Resources*

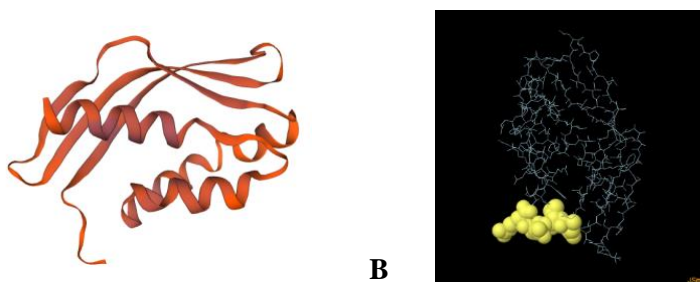
Rantai	Awal	Akhir	Peptida	Jumlah Residu Asam Amino	Nilai
A	147	151	NINGR	5	0,849
A	105	118	AAAASVSTSADRAV	14	0,741
A	130	138	GKDAPTTAA	9	0,742
A	91	98	PGAQQKQI	8	0,627
A	57	64	YRPDTVQH	8	0,575

Tabel 2. Model *predicted discontinuous epitop* pada protein Rv1973 dari *webserver IEDB Analysis Resources*

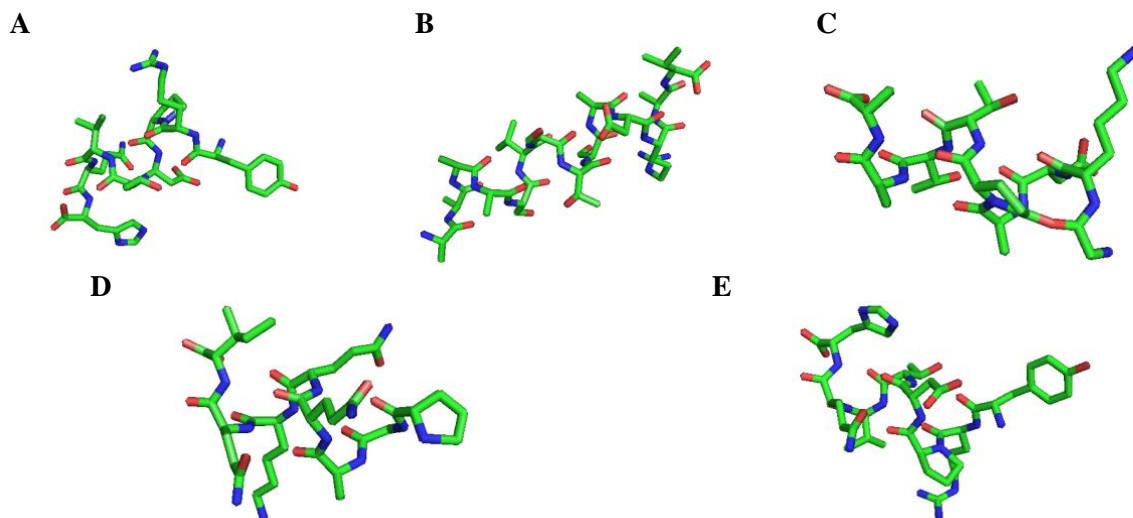
Residu Asam Amino	Jumlah Residu Asam Amino	Nilai
A:N147, A:I148, A:N149, A:G150, A:R151	5	0,849
A:A41, A:E42, A:R45	3	0,769
A:A105, A:A106, A:A107, A:A108, A:S109, A:V110, A:S111, A:T112, A:S113, A:A114, A:D115, A:R116, A:A117, A:V118, A:F122, A:N124, A:R142	17	0,706
A:R56, A:P59, A:D60, A:T61, A:Q63, A:H64, A:E67, A:Q94, A:Q97, A:I98, A:S99, A:G130, A:K131, A:D132, A:A133, A:P134, A:T135, A:T136	18	0,695
A:T74, A:G75, A:T76, A:D79	4	0,649
A:V89, A:P91, A:G92, A:Q95, A:Q96	5	0,616
A:H86, A:D87, A:V88	3	0,604

Tabel 3. Model *predicted linear epitop* pada protein ESAT-6 dari *webserver IEDB Analysis Resources*

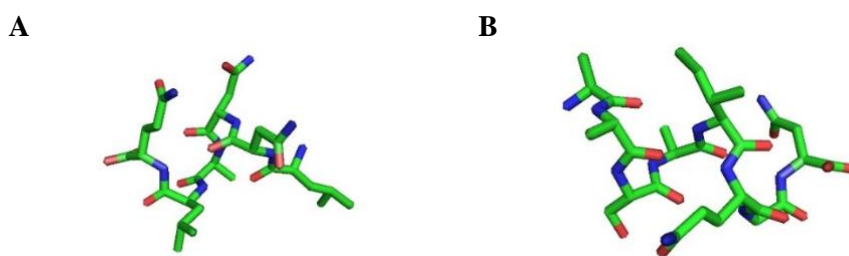
Rantai	Awal	Akhir	Peptida	Jumlah Residu Asam Amino	Nilai
B	65	70	LNNALQ	6	0,822
B	14	21	AASAIQGN	8	0,803



Gambar 1. Visualisasi protein Rv1973. (A) Struktur tiga dimensi protein Rv1973. (B) Lokasi residu asam amino yang menjadi epitop dengan nilai prediksi tertinggi, warna kuning menunjukkan *predicted linear epitop* dari protein Rv1973, sedangkan lipoprotein yang lainnya ditunjukkan oleh struktur batang berwarna abu-abu.



Gambar 2. Visualisasi lima model *predicted linear epitope* protein Rv1973 (A) Epitop dengan urutan residu asam amino 147-151, (B) Epitop dengan urutan residu asam amino 105-118, (C) Epitop dengan urutan residu asam amino 130-138, (D) Epitop dengan urutan residu asam amino 91-98, (E) Epitop dengan urutan residu asam amino 57-64.



Gambar 3. Visualisasi dua model *predicted linear epitope* protein ESAT-6 (A) Epitop dengan urutan residu asam amino 65-70, (B) Epitop dengan urutan residu asam amino 14-21.

Tabel 4. Hasil uji antigenisitas dan alergenisitas dari epitop protein Rv1973

Epitop	Antigenisitas	Alergenisitas
ERv147-151	-	0,81 <i>Probable Non-Allergen</i>
ERv105-118	1,0523 <i>Probable Antigen</i>	0,64 <i>Probable Non-Allergen</i>
ERv130-138	1,4727 <i>Probable Antigen</i>	0,74 <i>Probable Allergen</i>
ERv91-98	0,8351 <i>Probable Antigen</i>	0,73 <i>Probable Allergen</i>
ERv57-64	0,6984 <i>Probable Antigen</i>	0,74 <i>Probable Allergen</i>

Tabel 5. Hasil uji antigenisitas dan alergenisitas dari epitop protein ESAT-6

Epitop	Antigenisitas	Alergenisitas
ES65-70	-0,5099 <i>Probable Non-Antigen</i>	0,79 <i>Probable Allergen</i>
ES14-21	0,9808 <i>Probable Antigen</i>	0,77 <i>Probable Allergen</i>

Hasil *docking* terhadap dua model *predicted linear epitope* protein ESAT-6 dengan reseptor sel T dan sel B menunjukkan nilai *binding affinity* tertinggi ditunjukkan oleh epitop ES14-21 dengan nilai *binding affinity* masing-masing sebesar -6,6 dan

-8,4 kkal.mol⁻¹ (Tabel 8). Kedua epitop ini menunjukkan interaksi yang lebih lemah dibandingkan kelima epitop dari protein Rv1937.

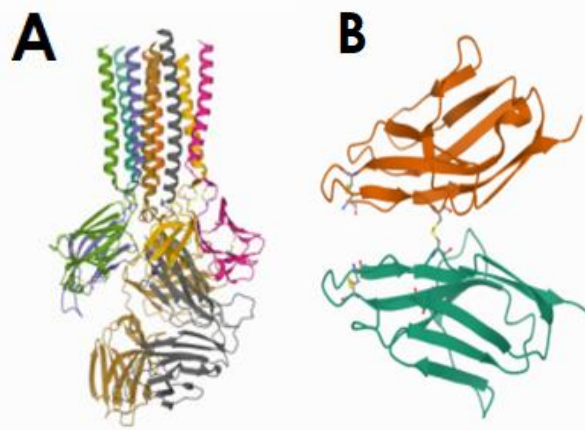
Interaksi antara reseptor sel T dan reseptor sel B dengan epitop ERv105-118 divisualisasi untuk

memperoleh prediksi gambaran interaksi yang terjadi antara protein dengan ligan (Gambar 5). Visualisasi juga memberikan gambaran residu asam amino protein reseptor yang secara langsung berikatan dengan epitop dari hasil proses *docking*. Epitop ERv105-118 berinteraksi secara langsung dengan 5 (lima) residu asam amino dari reseptor sel T, interaksi polar terjadi dengan residu asam amino asam aspartat-146, fenilalanin-203, prolin-223, asam glutamat-224, dan serine-225 (Gambar 6A-C). Epitop ERv105-118 berinteraksi secara langsung dengan 2 (dua) residu asam amino reseptor sel B, interaksi polar terjadi dengan residu asam amino sistein-43 dan asparagine-85 (Gambar 6D-E). Daerah residu asam amino yang berinteraksi secara langsung dengan epitop dapat disebut sebagai sisi aktif penempelan ligan dengan protein reseptor.

Uji toksisitas

Toksikitas dari epitop ERv105-118 diprediksi menggunakan *webserver ToxinPred* dengan Panjang

fragmen peptida epitop sebanyak 10 residu asam amino (Tabel 9). Hasil prediksi menunjukkan epitop ERv105-118 tidak bersifat sebagai toksik.



Gambar 4. Struktur tiga dimensi reseptor sel limfosit. (A) Reseptor sel T, dan (B) Reseptor sel B.

Tabel 6. *Molecular docking* antara reseptor sel T dengan lima model *predicted linear epitope* protein Rv1973 dengan menggunakan *software PyRx*, program *AutoDock Vina*.

Binding Affinity Epitope dengan T-Cell Reseptor (6JXR)
(kcal.mol^{-1})

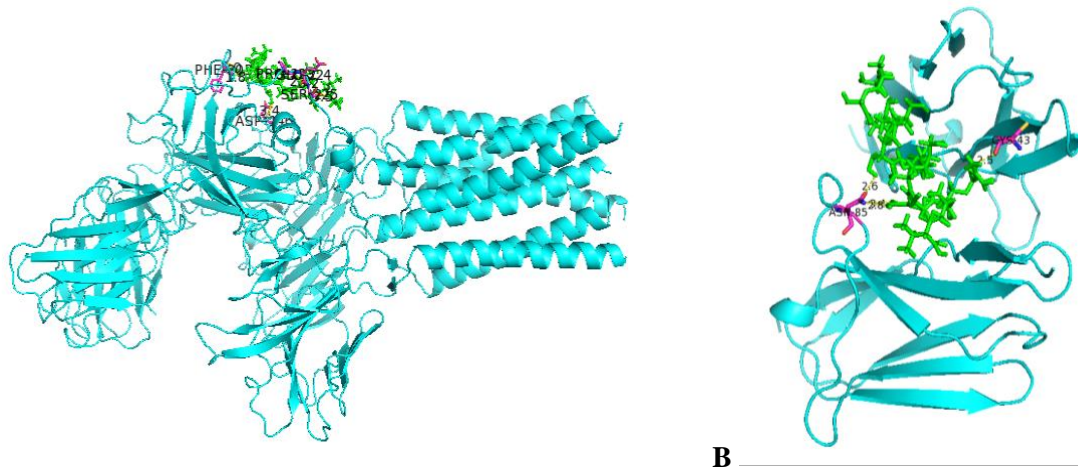
Mode	ERv147-151	ERv105-118	ERv130-138	ERv91-98	ERv57-64
0	-12,2	-12,9	-11,4	-11,3	-12,2
1	-12,0	-12,5	-10,9	-10,9	-12,0
2	-11,7	-12,1	-10,8	-10,9	-11,7
3	-11,5	-12,0	-10,5	-10,6	-11,5
4	-10,8	-11,9	-10,5	-10,3	-11,5
5	-10,8	-11,5	-10,5	-10,1	-11,5
6	-10,8	-11,3	-10,3	-10,0	-11,1
7	-10,6	-11,3	-10,0	-10,0	-11,1
8	-10,5	-11,3	-9,9	-9,9	-10,8

Tabel 7. *Molecular docking* antara reseptor sel B dengan lima model *predicted linear epitope* protein Rv1973 dengan menggunakan *software PyRx*, program *AutoDock Vina*.

Binding Affinity Epitope dengan B-Cell Reseptor (3KG5)
(kcal.mol^{-1})

Mode	ERv147-151	ERv105-118	ERv130-138	ERv91-98	ERv57-64
0	-9,8	-11,4	-9,8	-10,1	-9,8
1	-9,8	-11,4	-9,5	-9,9	-9,7
2	-9,7	-10,9	-9,4	-9,7	-9,6
3	-9,6	-10,7	-9,0	-9,6	-9,6
4	-9,5	-10,5	-8,9	-9,2	-9,6
5	-9,3	-10,4	-8,6	-9,1	-9,5

6	-9,2	-10,2	-8,5	-9,0	-9,4
7	-9,2	-10,1	-8,5	-8,7	-9,3
8	-9,0	-10,1	-8,5	-8,7	-9,3



A **B**
 Gambar 5. Visualisasi tiga dimensi dari interaksi antara reseptor sel limfosit dengan epitop ERv105-118. (A) Posisi interaksi antara epitop ERv105-118 dengan sel T dan (B) posisi interaksi antara epitop ERv105-118 dengan sel B. Epitop ERv105-118 ditunjukkan oleh warna hijau, reseptor sel limfosit ditunjukkan oleh warna biru kehijau-hijauan (cyan), dan sisi aktif penempelan ligan dari reseptor ditunjukkan oleh warna magenta.

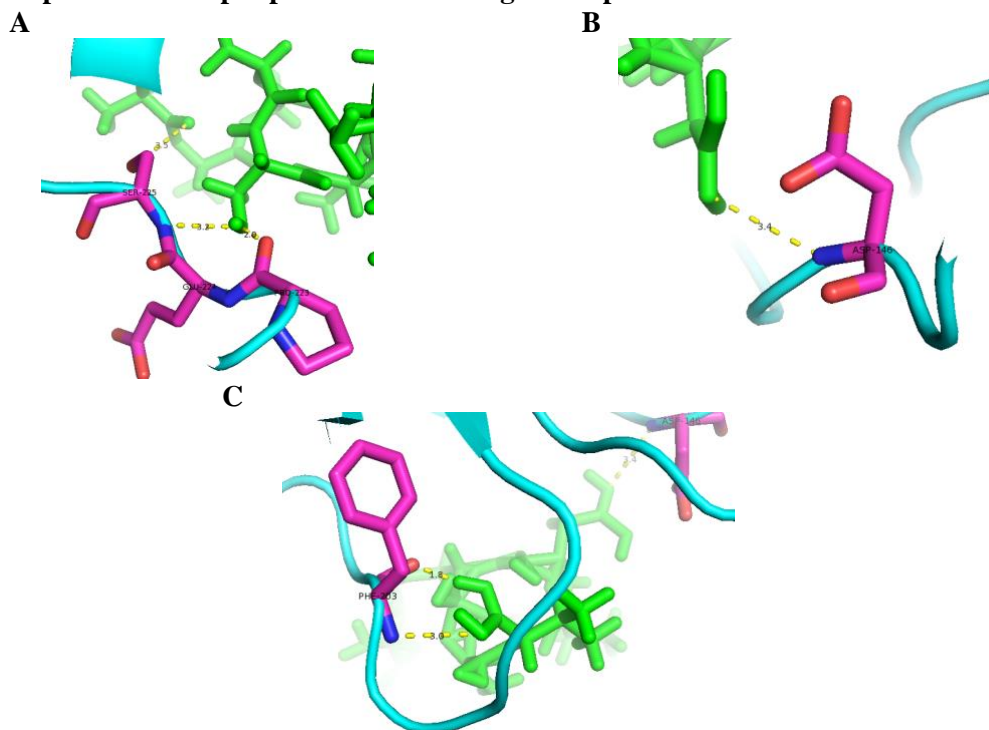
Tabel 8. *Molecular docking* antara reseptor sel T dan sel B dengan dua model *predicted linear epitope* protein ESAT-6 dengan menggunakan *software PyRx*, program *AutoDock Vina*

Mode	<i>Binding Affinity</i> (kcal.mol ⁻¹)			
	<i>T-Cell Receptor</i> (6JXR)		<i>B-Cell Receptor</i> (3KG5)	
	ES65-70	ES14-21	ES65-70	ES14-21
0	-6,5	-6,6	-8,3	-8,4
1	-6,4	-6,5	-8,1	
2	-6,4	-5,2	-7,9	
3	-6,3	-5,2	-7,8	
4	-6,3	-4,9	-7,6	
5	-6,3	-3,9	-7,6	
6	-6,2		-7,5	
7	-6,2		-7,5	
8	-6,1		-7,5	

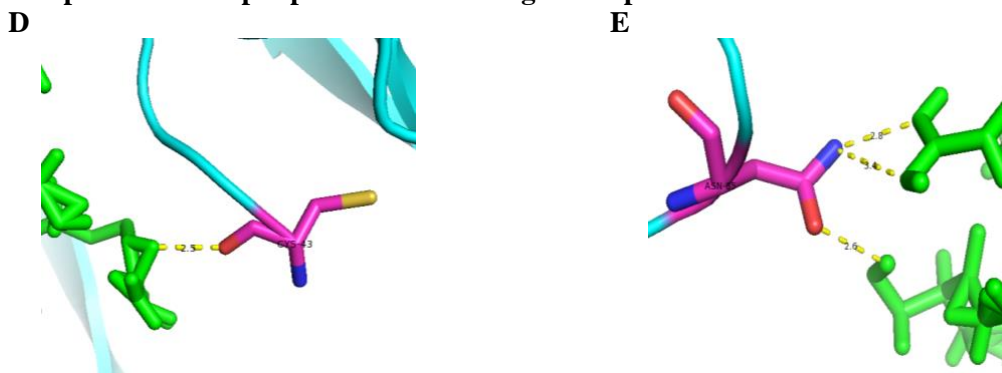
Tabel 9. Prediksi sifat toksisitas dari epitop ERv105-118

Urutan Sekuen Peptida	Prediksi
SVSTSADRAV	<i>Non-Toxin</i>
AASVSTSADR	<i>Non-Toxin</i>
ASVSTSADRA	<i>Non-Toxin</i>
AAASVSTSAD	<i>Non-Toxin</i>
AAAASVSTSA	<i>Non-Toxin</i>

Interaksi polar antara epitop ERv105-118 dengan reseptor sel T



Interaksi polar antara epitop ERv105-118 dengan reseptor sel B



Gambar 6. Visualisasi struktur tiga dimensi dari interaksi polar yang terjadi antara epitop ERv105-118 dengan residu asam amino reseptor sel limfosit. (A) Interaksi polar antara epitop ERv105-118 dengan residu asam amino prolin-223, asam glutamat-224, dan serine-225 dari reseptor sel T, (B) Interaksi polar antara epitop ERv105-118 dengan residu asam amino asam aspartat-146 dari reseptor sel T, (C) Interaksi polar antara epitop ERv105-118 dengan residu asam amino fenilalanin-203 dari reseptor sel T, (D) Interaksi polar antara epitop ERv105-118 dengan residu asam amino sistein-43 dari reseptor sel B, dan (E) Interaksi polar antara epitop EERv105-118 dengan residu asam amino asparagine-85 dari reseptor sel B.

PEMBAHASAN

Protein Rv1973 secara spesifik berasal dari *M. tuberculosis* dan berada pada membrane luar bakteri sehingga sangat cocok dipilih sebagai protein target. Protein yang terdapat pada membran luar berpotensi untuk dipresentasikan atau dipaparkan di permukaan makrofag dan sel B. Pada aplikasi protein ini sebagai

vaksin maka, protein membran luar akan mudah dikenali oleh antibodi. Hanya ada 2 protein membran luar pada *Mycobacterium* yang telah diteliti, salah satunya adalah *mspA* pada *M. smegmatis*. Pada hasil pembacaan urutan sekuen nukleotida, kodon pertama (*start codon*) yang terbaca adalah GUG, dimana urutan tersebut seharusnya terekspresi sebagai asam amino Valin. Hasil pembacaan urutan sekuen asam

amino justru menunjukkan bahwa asam amino pertama dalam protein tersebut adalah Methionin. Perbedaan ini disebabkan karena pada beberapa jenis organisme prokariotik *start codon* dapat digantikan dengan urutan selain AUG, seperti misalnya urutan GUG dan UUG [11]. Beberapa alternatif *start codon* tersebut akan terekspresi sebagai asam amino methionin.

Karakteristik protein Rv1973 meliputi nilai pI dan berat molekul akan memberikan informasi yang sangat berguna dalam proses pemurnian protein target, dimana pH pelarut dan proses elektroforesis membutuhkan kedua informasi tersebut. Langkah analisis berikutnya adalah menentukan *post-translation modification* yang mungkin terjadi pada protein target Rv1973. Pada proses sintesis protein, ada bagian protein yang menjadi *leader* (berupa peptida sinyal) yang akan mengarahkan protein untuk ditranspor ke daerah periplasma. Setelah protein melewati membran, pada umumnya peptida sinyal ini akan dipotong, sehingga protein yang keluar dari membran sudah tidak memiliki sinyal peptida lagi. Dengan demikian proses *fold*ing protein akan sempurna dan protein dapat terlarut. Apabila sinyal peptida ini tidak terpotong, maka proses *fold*ing protein tidak sempurna dan membentuk *inclusion body* [12]. Protein Rv1973 yang diketahui situs pemotongannya, dianalisa kembali karakteristik nilai pI dan berat molekulnya. Hasil prediksi lokasi protein Rv1973 menunjukkan bahwa protein terletak pada bagian membran sel bakteri. Untuk meyakinkan bahwa protein Rv1973 merupakan protein yang mudah diakses dari luar, Song *et al.* (2008) melakukan penelitian dengan mencampurkan kultur sel *M. tuberculosis* yang mengekspresikan gen Rv1973 dengan Proteinase-K [7]. Berdasarkan hasil *Western blot*, protein Rv1973 terdeteksi berupa pita protein berukuran ~15 kDa dalam campuran kultur sel tanpa Proteinase-K. Sedangkan pada campuran kultur sel dengan Proteinase-K, protein Rv1973 tidak didapati dalam kultur karena telah terdegradasi oleh Proteinase-K. Hal ini menunjukkan bahwa protein Rv1973 mudah diakses oleh Proteinase-K dari luar.

Pencarian epitop protein menggunakan prediksi dari IEDB Analysis Resources menunjukkan 2 jenis epitop yang berhasil diprediksi, yaitu 5 model *linear epitop* dan 7 model *discontinuous epitop*. *Linear epitop* adalah hasil prediksi dari residu asam amino-asam amino yang berurutan, sedangkan *discontinuous epitop* diprediksi dari residu asam amino yang mungkin

tidak berurutan namun lokasi pada struktur tersier atau struktur kuaternernya berdekatan karena interaksi-interaksi tertentu antar asam amino. Semua epitope yang diprediksikan oleh *software* menunjukkan bahwa daerah sekuen epitop tidak berada pada daerah peptida sinyal, sehingga epitop ini dapat diekspresikan dan terhindar dari pemotongan peptida sinyal ketika disekresikan.

Kuat lemahnya interaksi antara epitop dengan protein reseptornya dinilai dari skornya. Semakin besar skornya, maka epitop yang diprediksi akan semakin kuat berinteraksi dengan molekul lain, dalam hal ini yaitu reseptor sel B dan reseptor sel T yang kemudian merangsang produksi antibodi nantinya. Skor tertinggi baik pada *predicted linear epitop* adalah 0,849 di mana epitop terletak mulai asam amino ke-147 hingga 151. Pembacaan skor ini perlu dibandingkan dengan pembacaan prediksi metode *molecular docking* dengan reseptor yang spesifik untuk hasil yang lebih relevan. Meskipun epitop ERv147-151 memiliki pembacaan skor yang tinggi, namun ukuran epitop terlalu pendek (5 residu asam amino) sehingga epitop tersebut sulit untuk dianalisa lanjut.

Kandidat epitop selanjutnya diprediksi posisinya pada sisi protein. Tampak bahwa sebagian besar residu asam amino pada protein Rv1973 berpeluang berada pada membran dan sebagian berada di sisi luar sel. Peluang ini menunjukkan bahwa protein kemungkinan melebar posisinya dari dalam ke arah luar, atau menunjukkan bahwa bagian ini merupakan bagian dari protein transport yang dapat bergerak fleksibel di dalam membran. Protein Rv1973 merupakan *outer membrane protein* (OMP) dengan fungsi yang belum diketahui [7]. Protein ini memiliki skor tinggi untuk konten β -*strand* nya dan amfifilisitasnya. Karena dinyatakan sebagai *Mce-associated membrane protein* maka ada kemungkinan protein tersebut mudah diakses di permukaan sel. Protein ini disebut juga *mammalian cell entry* sehingga protein mudah diakses di permukaan. Sebagai tambahan, parameter yang digunakan untuk membedakan OMP dengan protein lainnya, biasanya adalah motif C-terminal fenilalanin. Sayangnya, Rv1973 tidak memiliki motif C-terminal fenilalanin, sehingga algoritma beberapa *software* tidak dapat memprediksi Rv1973 sebagai OMP [7]. Kemungkinan, epitop dari protein Rv1973 ini berada pada bagian luar dari sel sehingga tetap dapat dijadikan kandidat vaksin TBC.

Interaksi lima model *linear epitop* dengan reseptor sel B dan sel T diprediksi melalui metode *molecular docking*. Prediksi ini perlu dilakukan untuk memperoleh gambaran yang lebih baik terhadap interaksi antara reseptor dengan epitop, dimana interaksi tersebut menjadi salah satu proses penting dalam pengendalian infeksi bakteri dalam tubuh manusia [13]. Epitop ERv105-118 memiliki potensi sebagai epitop target karena memberikan pembacaan nilai ΔG yang paling kecil, baik pada prediksi interaksinya dengan reseptor sel T maupun reseptor sel B. Nilai ΔG yang negatif menunjukkan ikatan atau interaksi terjadi secara spontan. Nilai ΔG ini menunjukkan berapa besaran energi yang dikeluarkan atau dihasilkan ketika terjadi ikatan atau interaksi antara protein dengan ligan terjadi. Nilai ΔG dari epitop ERv105-118 juga menunjukkan hasil prediksi yang lebih kecil dibandingkan dengan nilai ΔG dari epitop protein standar (ESAT-6). Hal ini menunjukkan interaksi dari epitop ERv105-118 dengan reseptor sel T dan sel B lebih mudah terjadi dibandingkan dengan epitop dari protein ESAT-6. Epitop ERv105-118 juga terprediksi menunjukkan sifat sebagai antigen dan tidak bersifat sebagai alergen. Berbeda dengan epitop ES65-70 dari ESAT-6 yang tidak terprediksi sebagai antigen. Kedua epitop dari ESAT-6 juga terprediksi bersifat sebagai alergen, karena protein ESAT-6 yang diekskresikan oleh *Mycobacterium tuberculosis* diduga memberikan respon imun yang tinggi pada saat masuk ke dalam tubuh. Epitop ERv105-118 juga terprediksi sebagai peptida yang memiliki sifat non-toksik.

Bagian epitop ERv105-118 dari Rv1973 berpeluang sebagai calon komponen dasar vaksin TBC berbasis peptida epitop tunggal. Karakteristik epitop yang lebih baik dibandingkan dengan epitop dari protein ESAT-6 juga mendukung penggunaan epitop tersebut sebagai kandidat vaksin TBC. Namun analisa lebih jauh terhadap sifat imunologi protein rekombinan yang dihasilkan masih perlu dilakukan untuk dapat menghasilkan alternatif vaksin rekombinan baru dalam upaya pencegahan TBC. Selain itu analisa terhadap karakteristik epitop lainnya juga perlu dilakukan untuk memberikan gambaran dalam proses pembuatan desain vaksin rekombinan.

KESIMPULAN

Hasil studi desain *in silico* dari protein Rv1973 menunjukkan bahwa pada protein Rv1937 terdapat beberapa epitope potensial yang dapat digunakan sebagai alternatif kandidat epitop untuk vaksin TBC. Protein Rv1973 memiliki lima jenis linear epitop, dengan epitop ERv105-118 terprediksi memiliki interaksi dengan reseptor sel T dan sel B tertiggi. Epitop ERv105-118 ini memiliki karakteristik sebagai antigen, non-alergenik, berinteraksi kuat dengan reseptor sel T dan sel B, dan non-toksik. Epitop ERv105-118 juga memiliki sifat antigenisitas, alergenisitas, dan interaksi dengan reseptor sel T dan sel B yang lebih baik dibandingkan dengan epitop dari protein ESAT-6 sebagai protein standar. Kandidat epitop tersebut diprediksi dapat menjadi kandidat alternatif vaksin yang tepat bagi pencegahan infeksi TBC.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah World Class Research, 2021, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Republik Indonesia, 003 /AMD-SP2H/LT-MULTI-PDPK/LL7/2021,028/SP-Lit/AMD/ LPPM-01/Dikbudristek/Multi/FTB/VII/2021.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] "Global Tuberculosis Report 2020," Geneva, 2020.
- [2] T. Davenne and H. McShane, "Why don't we have an effective tuberculosis vaccine yet?," *Expert Rev Vaccines*, vol. 15, no. 8, pp. 1009–1013, Aug. 2016, doi: 10.1586/14760584.2016.1170599.
- [3] P. Andersen and T. M. Doherty, "The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine," *Nature Reviews*, vol. 3, pp. 656–662, Aug. 2005.
- [4] G. Sreejit *et al.*, "The ESAT-6 Protein of *Mycobacterium tuberculosis* Interacts with Beta-2-Microglobulin ($\beta 2M$) Affecting Antigen Presentation Function of Macrophage," *PLoS Pathog*, vol. 10, no. 10, Oct. 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004446.
- [5] H. Ning *et al.*, "Subunit Vaccine ESAT-6:c-di-AMP Delivered by Intranasal Route Elicits

- Immune Responses and Protects Against Mycobacterium tuberculosis Infection,” *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 11, Mar. 2021, doi: 10.3389/fcimb.2021.647220.
- [6] S. T. Cole *et al.*, “Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence,” *Nature*, vol. 393, pp. 537–544, Jun. 1998.
- [7] H. Song, R. Sandie, Y. Wang, M. A. Andrade-Navarro, and M. Niederweis, “Identification of outer membrane proteins of Mycobacterium tuberculosis,” *Tuberculosis*, vol. 88, no. 6, pp. 526–544, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.tube.2008.02.004.
- [8] D. Dong *et al.*, “Structural basis of assembly of the human T cell receptor–CD3 complex,” *Nature*, vol. 573, no. 7775, pp. 546–552, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1537-0.
- [9] S. Radaev *et al.*, “Structural and functional studies of Igαβ and its assembly with the B cell antigen receptor,” *Structure*, vol. 18, no. 8, pp. 934–943, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.str.2010.04.019.
- [10] N. M. Hassan, A. A. Alhossary, Y. Mu, and C. K. Kwok, “Protein-Ligand Blind Docking Using QuickVina-W with Inter-Process Spatio-Temporal Integration,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-15571-7.
- [11] F. Belinky, I. B. Rogozin, and E. V. Koonin, “Selection on start codons in prokaryotes and potential compensatory nucleotide substitutions,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-12619-6.
- [12] Y. Tsuchiya, K. Morioka, J. Shirai, Y. Yokomizo, and K. Yoshida, “Gene design of signal sequence for effective secretion of protein,” Oxford University Press, 2003. [Online]. Available: <http://nass.oxfordjournals.org/>
- [13] W. Fleri *et al.*, “The immune epitope database and analysis resource in epitope discovery and synthetic vaccine design,” *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. MAR. Frontiers Research Foundation, Mar. 14, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.00278.