

PENCARIAN KANDIDAT VAKSIN TBC DARI EPITOPE PROTEIN AGJ16802.1 (VIRULENCE FACTOR MCE FAMILY PROTEIN [MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STR. BEIJING/NITR203])

Herawati Dwi Prasetyaningtyas, Mariana Wahjudi, Yulanda Antonius

Universitas Surabaya, Indonesia

Email: herawatiprassetya@gmail.com, mariana_wahyudi@staff.ubaya.ac.id,
yulandaantonius@staff.ubaya.ac.id

Abstrak

Pada tahun 2022 beban TBC di dunia adalah 10.556.328. Insiden TBC di Indonesia tahun 2021 sebesar 969.000. Peningkatan insiden TBC pada tahun 2021 sebesar 18%. WHO telah menentukan target global dan milestone penurunan insiden TBC pada akhir 2030, demikian juga dengan Kemenkes RI. TBC dapat dicegah dengan vaksin BCG. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemungkinan epitope dari protein AGJ68032.1 menjadi vaksin TBC dengan cara membandingkan hasil docking epitope-TLR2 dengan TLR2-ESAT6. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah protein AGJ68032.1 virulence factor Mce family protein [Mycobacterium tuberculosis str. Beijing/NITR203]. Tahapan yang dilakukan: mencari fasta AGJ68032.1, uji similaritas protein terhadap protein Mycobacterium tuberculosis, menentukan letak protein, mencari karakteristik protein, mencari letak semua protein, mencari epitope Bcell, mencari epitope Tcell (MHC kelas 2), uji similaritas epitope dari MHC kelas 2 dengan homo sapiens, uji antigenecity, uji allergenicity, mencari bentuk 3D setiap epitope-TLR2-ESAT-6, molekular docking TLR2 dengan ESAT-6 dan TLR 2 dengan epitope dan membandingkan data hasil docking. Epitope protein AGJ68031.1 (FAGDDVRIRGVPGKIVKIEPQPLRAKVSFW) berpotensi tinggi untuk dijadikan kandidat vaksin TBC karena hasil docking dengan TLR memiliki HADDOCK score sebesar -152.5 +/- 7.3 dan nilai RMSD yang mendekati HADDOCK score dan nilai RMSD TLR2 dengan ESAT6. Penelitian ini memberikan kontribusi dalam pengembangan vaksin TBC baru yang lebih efektif dibandingkan BCG, khususnya untuk mengatasi strain Beijing yang resisten.

Kata Kunci: Vaksin TBC, Epitope, Molecular Docking, TLR2, Mycobacterium tuberculosis

Abstract

In 2022, the global burden of tuberculosis was 10,556,328. The incidence of tuberculosis in Indonesia in 2021 was 969,000. The increase in tuberculosis incidence in 2021 was 18%. The WHO has set global targets and milestones for reducing TB incidence by the end of 2030, as has the Indonesian Ministry of Health. TB can be prevented with the BCG vaccine. This study aims to determine the possibility of the AGJ68032.1 protein becoming a TB vaccine by comparing the

results of epitope-TLR2 docking with TLR2-ESAT6. The material used in this study was the AGJ68032.1 virulence factor Mce family protein [Mycobacterium tuberculosis str. Beijing/NITR203]. The steps taken were: searching for AGJ68032.1 fasta, testing protein similarity to Mycobacterium tuberculosis protein, determining protein location, searching for protein characteristics, searching for all protein locations, searching for B-cell epitopes, searching for T-cell epitopes (MHC class 2), testing the similarity of epitopes from MHC class 2 with homo sapiens, testing antigenicity, testing allergenicity, searching for the 3D shape of each epitope-TLR2-ESAT-6, molecular docking of TLR2 with ESAT-6 and TLR 2 with epitopes, and comparing the docking results. The AGJ68031. 1 (FAGDDVVRIRGVPGKIVKIEPQPLRAKVSFW) has high potential to be used as a TB vaccine candidate because the docking results with TLR have a HADDOCK score of -152.5 +/- 7.3 and an RMSD value that is close to the HADDOCK score and RMSD value of TLR2 with ESAT6. This study contributes to the development of a new, more effective TB vaccine compared to BCG, particularly for addressing Beijing strain resistance.

Keywords: TB Vaccine, Epitope, Molecular Docking, TLR2, Mycobacterium tuberculosis

Pendahuluan

Di dalam Laporan Program Penanggulangan Tuberkulosis Tahun (Kemenkes RI, 2023), kemenkes RI menyatakan jika TBC merupakan salah satu dari 10 penyebab kematian tertinggi di dunia dan penyebab utama kematian dari agen infeksius. Pada tahun 2022, diperkirakan 10.6 juta orang sakit TBC; 1,4 juta kasus kematian akibat TBC termasuk HIV-negatif dan 187.000 kematian termasuk HIV-positif. Pada tahun yang sama, kasus TBC terbanyak ada di Southeast Asia (45,6%), Afrika (23,3%) dan Western Pacific (17,8%). Indonesia merupakan negara dengan total kasus TBC dengan persentase 9,2% dari kasus global.

Berdasarkan Global TB Report tahun 2022 (WHO, 2023) beban TBC di dunia adalah 10.556.328; TBC resistan obat di dunia 449.682, sedangkan TBC HIV di dunia 701.459. Untuk Indonesia, estimasi insiden TBC tahun 2021 sebesar 969.000, TB-HIV 22.000 kasus, kematian karena TBC 144.000 dan kematian TBC-HIV sebesar 6.500 (Kemenkes RI, 2023). Terjadi peningkatan insiden TBC pada tahun 2021 sebesar 18% dan angka kematian TBC sebesar 55%.

WHO telah menentukan target global dan milestone untuk penurunan insiden TBC dan kematian TBC sebagai bagian dari SDGs dan End TBC Strategi TBC pada akhir tahun 2030 dengan target penurunan 90% kematian TBC dan 80% penurunan insiden TBC antara 2015 dan 2030.

Kementerian Kesehatan RI juga telah menyusun peta jalan eliminasi dengan target pada tahun 2030 insidensi turun 80% dan kematian turun menjadi 6 per 100.000 penduduk. Upaya eliminasi tuberkulosis di Indonesia pada tahun 2030 dinyatakan dalam RPJMN 2020-2024 dan Strategi Nasional Penanggulangan Tuberkulosis 2020-2024 & Rencana Interim 2025-2026; Epi Review dan Joint External Monitoring Mission (JEMM) pada tahun 2022; dan Joint External Monitoring Mission (JEMM) tahun 2022 (Kemenkes RI, 2023). Dasar hukum yang menguatkan upaya eliminasi adalah Peraturan Presiden No

67 tahun 2021 tentang Penanggulangan Tuberkulosis dan Peraturan Menteri Kesehatan No 67 tahun 2016 tentang Penanggulangan Tuberkulosis, Peraturan Presiden No.67 tahun 2021 yang mengatur tentang peningkatan penelitian, pengembangan dan inovasi di Bagian Keempat pada pasal 16 yang menyatakan bahwa penelitian, pengembangan dan inovasi di bidang penanggulangan TBC dilakukan melalui advokasi dan fasilitasi penelitian dan pengembangan untuk mendukung penanggulangan TBC yang meliputi dukungan terhadap alat diagnostik, obat dan vaksin yang diharapkan berkontribusi pada percepatan eliminasi TBC.

TBC merupakan penyakit yang menular melalui udara dan disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (Alcantara et al., 2023; Li et al., 2023; Rahlwes et al., 2023; Zhai et al., 2019). TBC diobati dengan antibiotik dan dicegah dengan vaksin BCG yang diberikan kepada bayi. Bayi dan anak-anak mempunyai risiko lebih tinggi, demikian juga penderita diabetes, AIDS, riwayat gizi buruk dan perokok. Gejala umum TBC adalah batuk berkepanjangan terkadang disertai darah, nyeri dada, kelelahan, penurunan berat badan, demam dan keringat malam.

Di Indonesia, vaksin TBC yang tersedia adalah vaksin BCG strain *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan. BCG memberikan perlindungan yang bervariasi terhadap anak-anak, namun tidak pada orang dewasa. BCG menghindari pematangan fagosom, autofagi, dan mengurangi ekspresi MHC-II dari sel penyaji antigen (APC) yang mempengaruhi aktivasi sel T. (Khan et al., 2019).

Menteri kesehatan RI menekankan pentingnya penemuan vaksin baru dan saat ini, sudah ada tiga uji klinis kandidat vaksin TBC meliputi: vaksin yang dikembangkan Bill & Melinda Gates Foundation (BMGF), perusahaan farmasi asal Inggris GSK, memanfaatkan protein rekombinan; perusahaan farmasi China, CanSinoBio dan biofarmasi asal Indonesia, Etana, menggunakan vektor virus dan sedang uji klinis fase pertama; dan perusahaan biotek Jerman, BioNTech, dan perusahaan farmasi Indonesia, Biofarma, menggunakan teknologi mRNA, uji klinis fase 2 di Indonesia.

Vaksin BCG memicu respons antibodi IgM, class-switched IgG, terhadap protein spesifik *Mtb*, ESAT6 dan CFP10. Setelah vaksinasi, monosit juga menunjukkan peningkatan ekspresi permukaan penanda aktivasi CD11b, CD14, CD206, TLR4 dan produksi sitokin. vaksinasi BCG saat lahir menyebabkan peningkatan produksi TNF- α , IL-1 β , dan IL-6 sebagai respons terhadap PPD dan agonis TLR2 Pam3CSK4 (Foster et al., 2021)

Vaksin subunit protein menjadi salah satu pilihan karena memiliki spesifisitas, keamanan, dan kemudahan produksi. Vaksin ini dapat menginduksi respons imun yang ditandai dengan produksi sitokin seperti gamma interferon (IFN- γ) yang bertanggung jawab untuk aktivasi makrofag; tumor necrosis factor alpha (TNF- α), yang penting untuk perkembangan dan pemeliharaan granuloma; dan interleukin 2 (IL-2), yang bertanggung jawab atas ekspansi klon limfosit T. Pemilihan komponen vaksin subunit protein perlu memperhatikan molekul mikroorganisme yang mampu menimbulkan respon imun. Antigen yang dikenali oleh sel inang selama infeksi laten dan yang terlibat dalam mekanisme penghindaran imunologi atau munculnya sel T spesifik CD4⁺ dan CD8⁺

merupakan target potensial untuk mengendalikan infeksi secara imunologis meskipun tidak mudah karena banyaknya polimorfisme MHC, maka perlu untuk memilih atau merancang protein yang menghadirkan epitop promiscuous. Salah satu pendekatan ini adalah penggabungan molekul yang mampu berinteraksi dengan reseptor pengenalan pola (PRRs) yang digunakan oleh sistem imun bawaan untuk mengenali pola molekuler terkait patogen (PAMPs).

TLR terdapat pada sel penyaji antigen (APC) dan sel lain yang tidak terkait dengan sistem kekebalan. Pensinyalan melalui TLR dapat menghasilkan dua kemungkinan kaskade: yang pertama bergantung pada molekul MYD88 dan terkait dengan TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, dan TLR9; yang kedua bergantung pada TIF dan dikaitkan dengan TLR3 dan TLR4. Pengenalan PAMPs oleh TLRs dapat menghasilkan ekspresi molekul ko-stimulasi seperti CD40, CD80, dan CD86 serta ekspresi sitokin proinflamasi, TNF- α , COX-2, dan interferon yang terkait dengan pengembangan respon imun adaptif oleh limfosit B dan T.

Urgensi penelitian ini sangat penting mengingat tingginya angka kejadian TBC di Indonesia yang menempati urutan kedua dunia, keterbatasan efektivitas vaksin BCG pada orang dewasa, dan munculnya strain Beijing yang resisten terhadap antibiotik dan mampu menghindari vaksinasi BCG. Pengembangan vaksin baru berbasis epitope protein AGJ68032.1 dari strain Beijing diharapkan dapat mengatasi keterbatasan vaksin BCG dan memberikan perlindungan yang lebih baik terhadap TBC.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui proses penemuan kandidat vaksin TBC dari epitope protein AGJ68032.1 dan mengetahui kemungkinan epitope dari protein AGJ68032.1 untuk menjadi vaksin TBC dengan cara membandingkan hasil docking epitope-TLR2 dengan TLR2-ESAT6. Manfaat penelitian ini adalah memberikan kontribusi dalam pengembangan vaksin TBC baru yang lebih efektif untuk mengatasi keterbatasan vaksin BCG, khususnya dalam menghadapi strain Beijing yang resisten, sehingga dapat mendukung program eliminasi TBC nasional dan global.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in silico* yang dilakukan dengan pendekatan bioinformatika untuk menganalisis potensi epitope protein AGJ68032.1 sebagai kandidat vaksin TBC. Populasi penelitian adalah seluruh protein virulence factor Mce family dari Mycobacterium tuberculosis strain Beijing. Teknik pengambilan sampel menggunakan purposive sampling dengan kriteria protein yang memiliki kemiripan dengan Mycobacterium tuberculosis dan memenuhi karakteristik untuk epitope prediction. Sumber data diperoleh dari database NCBI, IEDB, Swiss Model, dan HADDOCK. Teknik pengumpulan data dilakukan melalui akses database online dan software bioinformatika. Analisis data menggunakan molecular docking dan perbandingan HADDOCK score serta RMSD values. Penelitian dilakukan secara virtual menggunakan platform bioinformatika online.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laptop dan pengisi daya beserta beberapa web dan aplikasi untuk melakukan seluruh tahapan penelitian. Bahan

yang digunakan dalam penelitian ini adalah protein AGJ68032.1 virulence factor Mce family protein [*Mycobacterium tuberculosis* str. Beijing/NITR203] yang akan mengalami berbagai tahapan hingga akhir penelitian.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Dari Setiap Tahapan

Preparasi Protein Potensial untuk vaksin

Fasta protein AGJ68032.1 virulence factor Mce family protein [*Mycobacterium tuberculosis* str. Beijing/NITR203] yang dicari dengan menggunakan web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> >AGJ68032.1 virulence factor Mce family protein [*Mycobacterium tuberculosis* str. Beijing /NITR203]

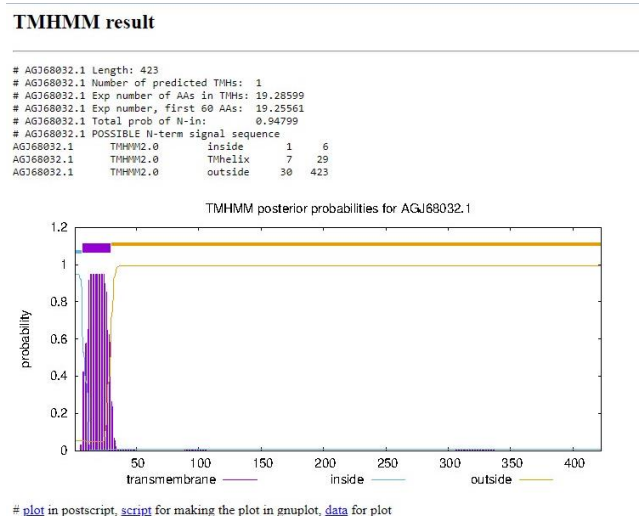
Hasil uji similaritas protein AGJ68032.1 virulence factor Mce family protein [*Mycobacterium tuberculosis* str. Beijing/NITR203] terhadap protein dari *Mycobacterium tuberculosis* dengan 250 parameter menggunakan web: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Hasilnya terdapat di link berikut: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/13mYBDmWuVIFuyIlg7KSFRYRqQKGmcANz/edit?usp=sharing&ouid=109866930129816825505&rtpof=true&sd=true>

Berdasarkan hasil uji tersebut, 1 kandidat protein memiliki kemiripan 100% dengan *Mycobacterium tuberculosis*, sehingga masih tersisa 249 kandidat protein untuk tahap selanjutnya. Data tersebut terdapat pada link google sheet di atas pada sheet “lolos similaritas”. Data lengkap perbedaan sekuens dari 250 protein tersebut dapat dilihat pada link berikut:

<https://drive.google.com/drive/folders/1EluWnsvw8hm3kTZXOI7BOqofftFkZgwe?usp=sharing>

*Menentukan letak protein >AGJ68032.1 virulence factor Mce family protein [*Mycobacterium tuberculosis* str. Beijing/NITR203]*

Letak protein AGJ68032.1 virulence factor Mce family protein [*Mycobacterium tuberculosis* str. Beijing/NITR203] pada sel yang dicari menggunakan web <https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> adalah seperti yang terdapat pada gambar berikut:



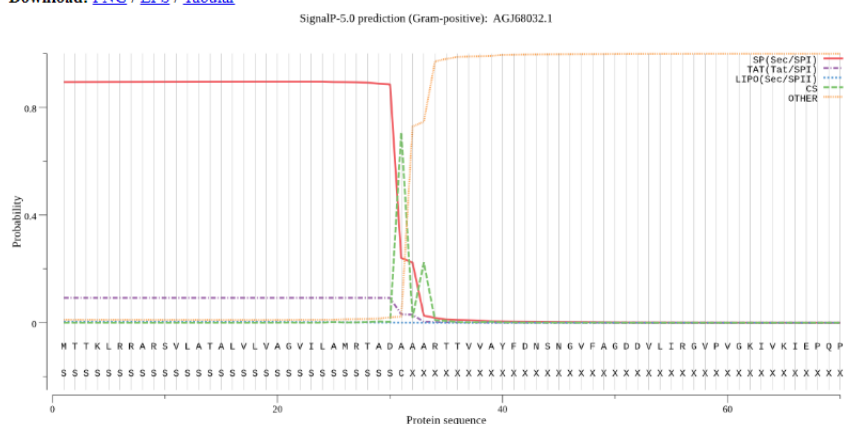
AGJ68032.1

Prediction: Signal peptide (Sec/SPI)

Cleavage site between pos. 31 and 32: ADA-AA. Probability: 0.7071

Protein type	Signal peptide (Sec/SPI)	TAT signal peptide (Tat/SPI)	Lipoprotein signal peptide (Sec/SPII)	Other
Likelihood	0.8951	0.0921	0.003	0.0098

Download: [PNG](#) / [EPS](#) / [Tabular](#)



Gambar 2. parameter gram positif

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1Yr1VN4XufTTC4n3TcMpXJhCSY-xmvxhJ/edit?usp=sharing&oid=109866930129816825505&rtpof=true&sd=true>

Berdasarkan data pada sheet letak protein dari tabel di link tersebut, lalu dipilih protein mana saja yang memenuhi kriteria memiliki bagian inside, transmembran dan outside. Hasil dari tahapan ini terdapat pada tabel di link di atas, pada sheet “lolos” dan menyisakan 215 kandidat protein.

Mencari epitope Bcell dari setiap protein yang memenuhi kualifikasi

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1FoXHJrB7LUgNWbfbG-uJRpvVdEjpw_/edit?usp=sharing&ouid=109866930129816825505&rtpof=true&sd=true

Terdapat 6 kandidat protein yang tidak memenuhi kualifikasi karena panjang epitopenya tidak mencapai 30 sekuens. Data kandidat yang lolos terdapat pada link di atas, pada sheet “lolos”.

Mencari epitope Tcell (MHC kelas 2) dari setiap protein yang memenuhi kualifikasi

Hasil pencarian epitope Tcell NHC kelas 2 dari semua protein yang memenuhi kandidat dengan parameter: select species/locus : Human, HLA-DR, select allele: DRB1*01:01 dan select length(s): 30, menggunakan web <https://www.iedb.org/> atau <http://tools.iedb.org/mhcii/> terdapat pada link berikut:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1WcaoBVrpCU-YKVd21hEbjofd_yj3Nb9k/edit?usp=sharing&ouid=109866930129816825505&rtpof=true&sd=true

Uji similaritas epitope dari MHC kelas 2 dengan homo sapiens

Hasil uji similaritas epitope dari MHC kelas 2 terhadap *homo sapiens* menggunakan web: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> terdapat pada link berikut ini:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1i4J10w0cPDfyIqsxphojP3_Kc9xoAkDw/edit?usp=sharing&ouid=109866930129816825505&rtpof=true&sd=true

Pada tahapan ini diperoleh hasil jika semua epitope memiliki kemiripan 100% dengan *homo sapiens*, sehingga dilakukan modifikasi dengan cara menambahkan 1 sekuens dari kandidat epitope lainnya dari protein yang sama. Pada tahap ini juga dilakukan pemilihan kandidat epitope dari protein-protein yang ada dengan cara memilih epitope yang memiliki score lebih dari 0,5 dan mewakili setiap strain yang berbeda. Hasilnya berupa 21 kandidat epitope dari 20 strain yang berbeda. Ketika dilakukan modifikasi pada epitope tersebut, hasil uji similaritasnya menunjukkan hasil 100% berbeda dengan *homo sapiens*. Datanya disajikan pada tabel berikut ini.

Tabel 1. Hasil Uji Similaritas

Assesion code	Start	End	Sekuens Yang Dimodifikasi	Similarity ke homo sapiens
WP_014001037.1	48	78	AGDDVLIRGVPVGKIVKI EPQPLRAKISFWF	Not significant
EGB28583.1	62	92	GDDVLIRGVPVGKIVKIE PQPLRAKISFWFD	Not significant
EFP47039.1	56	86	AGDDVLIRGVPVGKIVKI EPQPLRAKISFWF	Not significant
WP_068230948.1	51	81	AGDDVRIRGVPVGKIVKI EPQPLRSKISFWI	Not significant
WP_036469360.1	85	115	YKVPADAKAAILSPQLV SGRAIQLTPPYTGG	Not significant
GAQ39527.1	48	78	GDDVLIRGVPVGKIVKIE PQPLRSKISFWF	Not significant
MCV6987435.1	53	83	DDVLIRGVPVGKILSIEPQ PLRAKISFWFDR	Not significant
WP_142274896.1	52	82	GDDVLIRGVPVGKILKIE PQPLRSKISFWFD	Not significant

Pencarian Kandidat Vaksin TBC Dari Epitope Protein AGJ16802.1 (Virulence Factor Mce Family Protein [Mycobacterium Tuberculosis STR. BEIJING/NITR203])

WP_273573192.1	51	81	AGDDVLIRGVPVGKIVKI EPQPMRSKISFWF	Not significant
WP_158017048.1	53	83	DDVRIRGVPVGKILAVEP QPLRSKISLWFDR	Not significant
WP_011740765.1/W P_198965401.1	51	81	AGDDVLIRGVPVGKIVKI EPQPLRSKISFWF	Not significant
WP_330979022.1	88	118	PANATAAILSPQLVSGRA IQLTPPYAGGPTM	Not significant
WP_306276166.1	54	84	DVRIRGVPVGKIVKIEPQ PLRAKVSFWFDRK	Not significant
WP_306244830.1	50	50	FAGDDVRIRGVPVGKIV KIEPQPLRAKVSFW	Not significant
WP_065146489.1	51	81	AGDDVRIRGVPVGKIVKI EPQPLRSKITLWF	Not significant
WP_133449145.1	52	82	GDDIRIRGVPVGKIIKIEP QPLRSKITFWFD	Not significant
WP_205873146.1	48	78	AGDDIRIRGVPVGKIVKI EPQPLRSKITFWF	Not significant
WP_068212704.1	47	77	NGVFAGDEVIRGVPVG KIVKIEPQPLRSKV	Not significant
WP_204802845.1	54	84	DVRIRGVAVGKIVKIEPQ PLRSKISFWFDGK	Not significant
MDT5260429.1	51	81	VGDDVRIRGVPVGKVEK IEPQPLRAKIWFWD	Not significant
WP_099187431.1	52	82	GDDVRIRGVPVGKIIKIEP QPLRAKILFWFD	Not significant

Penambahan adjuvant

Setelah diseleksi beberapa kandidat dari strain yang berbeda dengan memperhatikan score epitope Tcell MHC kelas 2, maka epitope yang dipilih ditambah dengan adjuvant: “MPKRSE...KPAPQQ”. Sekuens epitope yang sudah ditambahi adjuvant lalu diuji smiliaritas dengan homo sapiens menggunakan web: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Hasil dari tahap ini terdapat pada tabel di bawah ini.

Tabel 2. uji smiliaritas adjuvant

Assesion code	Start	End	Setelah ditambah adjuvant	Similarity ke homo sapiens
WP_014001037.1	48	78	MPKRSEAGDDVLIRGVPVGKIVKIE PQPLRAKISFWFKPAPQQ	Not significant
EGB28583.1	62	92	MPKRSEGDDVLIRGVPVGKIVKIEP QPLRAKISFWFDKPAPQQ	Not significant
EFP47039.1	56	86	MPKRSEAGDDVLIRGVPVGKIVKIE PQPLRAKISFWFKPAPQQ	Not significant
WP_068230948.1	51	81	MPKRSEAGDDVRIRGVPVGKIVKIE PQPLRSKISFWIKPAPQQ	Not significant

WP_036469360.1	85	115	MPKRSEYKVPADAKAAILSPQLVSG RAIQLTPPYTGGKPAPQQ	Not significant
GAQ39527.1	48	78	MPKRSEGDDVLIRGVPVGKIVKIEP QPLRSKISFWFDKPAPQQ	Not significant
MCV6987435.1	53	83	MPKRSEDDVLIRGVPVGKILSIEPQP LRAKISFWFDRKPAPQQ	Not significant
WP_142274896.1	52	82	MPKRSEGDDVLIRGVPVGKILKIEPQ PLRSKISFWFDKPAPQQ	Not significant
WP_273573192.1	51	81	MPKRSEAGDDVLIRGVPVGKIVKIE PQPMRSKISFWFKPAPQQ	Not significant
WP_158017048.1	53	83	MPKRSEDDVRIRGVPVGKILAVEPQ PLRSKISLWFDKPAPQQ	100%
WP_011740765.1/W P_198965401.1	51	81	MPKRSEAGDDVLIRGVPVGKIVKIE PQPLRSKISFWFKPAPQQ	Not significant
WP_330979022.1	88	118	MPKRSEPANATAAILSPQLVSGRAIQ LTPPYAGGPTMKPAPQQ	Not significant
WP_306276166.1	54	84	MPKRSEDDVRIRGVPVGKIVKIEPQPL RAKVSFWFDRKKPAPQQ	Not significant
WP_306244830.1	50	50	MPKRSEFAGDDVRIRGVPVGKIVKI EPQPLRAKVSFWKPAPQQ	Not significant
WP_065146489.1	51	81	MPKRSEAGDDVRIRGVPVGKIVKIE PQPLRSKITLWFKPAPQQ	Not significant
WP_133449145.1	52	82	MPKRSEGDDIRIRGVPVGKIIKIEPQP LRSKITFWFDKPAPQQ	Not significant
WP_205873146.1	48	78	MPKRSEAGDDIRIRGVPVGKIVKIEP QPLRSKITFWFKPAPQQ	Not significant
WP_068212704.1	47	77	MPKRSENGVFAGDEVIRIRGVPVGKI VKIEPQPLRSKVKPAPQQ	Not significant
WP_204802845.1	54	84	MPKRSEDDVRIRGVAVGKIVKIEPQPL RSKISFWFDGKKPAPQQ	Not significant
MDT5260429.1	51	81	MPKRSEVGDDVRIRGVPVGKVEKIE PQPLRAKIWFVKPAPQQ	Not significant
WP_099187431.1	52	82	MPKRSEGDDVRIRGVPVGKIIKIEPQ PLRAKILFWFDKPAPQQ	Not significant

Data yang terdapat pada tabel menunjukkan jika terdapat 1 kandidat yang memiliki kemiripan 100% dengan homo sapiens sehingga tidak disertakan pada tahapan selanjutnya dan tersisa 20 yang menjadi kandidat untuk ke tahap selanjutnya.

Uji Antigenicity

Hasil uji antigenicity menggunakan web <http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/> terdapat pada tabel berikut ini.

Tabel 3. Hasil uji antigenicity

Assesion code	Start	End	Sekuens	Antigenicity
WP_014001037.1	48	78	AGDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPLRAKI SFWF	0.9296
EGB28583.1	62	92	GDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPLRAKIS FWFD	0.7751

Pencarian Kandidat Vaksin TBC Dari Epitope Protein AGJ16802.1 (Virulence Factor Mce Family Protein [Mycobacterium Tuberculosis STR. BEIJING/NITR203])

EFP47039.1	56	86	AGDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPLRAKI SFWF	0.9296
WP_068230948.1	51	81	AGDDVRIRGVPVGKIVKIEPQPLRSKI SFWI	1.0497
WP_036469360.1	85	115	YKVPADAKAAILSPQLVSGRAIQLTPP YTGG	0.9541
GAQ39527.1	48	78	GDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPLRSKISF WF	0.6531
MCV6987435.1	53	83	DDVLIRGVPVGKILSIEPQPLRAKISFW FDR	0.5594
WP_142274896.1	52	82	GDDVLIRGVPVGKILKIEPQPLRSKISF WFD	0.6821
WP_273573192.1	51	81	AGDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPMRSKI SFWF	0.7763
WP_011740765.1/W P_198965401.1	51	81	AGDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPLRSKI SFWF	0.8076
WP_330979022.1	88	118	PANATAAILSPQLVSGRAIQLTPPYAG GPTM	0.8764
WP_306276166.1	54	84	DVRIRGVPVGKIVKIEPQPLRAKVSFW FDRK	0.7035
WP_306244830.1	50	50	FAGDDVRIRGVPVGKIVKIEPQPLRAK VSFW	0.8237
WP_065146489.1	51	81	AGDDVRIRGVPVGKIVKIEPQPLRSKI TLWF	0.9880
WP_133449145.1	52	82	GDDIRIRGVPVGKIIKIEPQPLRSKITF WFD	0.9793
WP_205873146.1	48	78	AGDDIRIRGVPVGKIVKIEPQPLRSKIT FWF	1.0961
WP_068212704.1	47	77	NGVFAGDEVIRGVPVGKIVKIEPQPL RSKV	0.5019
WP_204802845.1	54	84	DVRIRGVAVGKIVKIEPQPLRSKISFW FDGK	0.8384
MDT5260429.1	51	81	VGDDVRIRGVPVGKVEKIEPQPLRAKI WFWF	1,4488
WP_099187431.1	52	82	GDDVRIRGVPVGKIIKIEPQPLRAKILF WFD	1,1580

Uji Allergenicity

Hasil uji toksisitas dari 20 kandidat tersebut menggunakan web: <https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/> memperlihatkan hasil seperti pada tabel berikut ini. Terdapat 3 kandidat epitope yang bersifat allergen sehingga tidak bisa digunakan untuk ke tahap selanjutnya dan ada 17 kandidat epitope yang akan digunakan untuk ke tahap selanjutnya.

Tabel 4. Hasil uji toksisitas

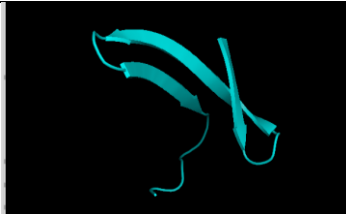
Assesion code	Sekuens	Allergenicity
WP_014001037.1	AGDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPLRAKISFWF	Non alergen
EGB28583.1	GDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPLRAKISFWFD	Non alergen

EFP47039.1	AGDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPLRAKISFWF	Non alergen
WP_068230948.1	AGDDVRIRGVPVGKIVKIEPQPLRSKISFWI	Non alergen
WP_036469360.1	YKVPADAKAAILSPQLVSGRAIQLTPPYTGG	Non alergen
GAQ39527.1	GDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPLRSKISFWF	Non alergen
MCV6987435.1	DDVLIRGVPVGKILSIEPQPLRAKISFWFDR	Non alergen
WP_142274896.1	GDDVLIRGVPVGKILKIEPQPLRSKISFWFD	Non alergen
WP_273573192.1	AGDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPMRSKISFWF	Non alergen
WP_011740765.1/W P_198965401.1	AGDDVLIRGVPVGKIVKIEPQPLRSKISFWF	Non alergen
WP_330979022.1	PANATAAILSPQLVSGRAIQLTPPYAGGPTM	Non alergen
WP_306276166.1	DVRIRGVPVGKIVKIEPQPLRAKVSFWFDRK	Alergen
WP_306244830.1	FAGDDVRIRGVPVGKIVKIEPQPLRAKVSFW	Non alergen
WP_065146489.1	AGDDVRIRGVPVGKIVKIEPQPLRSKITLWF	Alergen
WP_133449145.1	GDDIRIRGVPVGKIIKIEPQPLRSKITFWFD	Non alergen
WP_205873146.1	AGDDIRIRGVPVGKIVKIEPQPLRSKITFWF	Alergen
WP_068212704.1	NGVFAGDEVIRGVPVGKIVKIEPQPLRSKV	Non alergen
WP_204802845.1	DVRIRGVAVGKIVKIEPQPLRSKISFWFDGK	Non alergen
MDT5260429.1	VGDDVRIRGVPVGKVEKIEPQPLRAKIWFWF	Non alergen
WP_099187431.1	GDDVRIRGVPVGKIIKIEPQPLRAKILFWFD	Non alergen

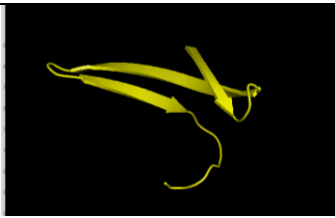
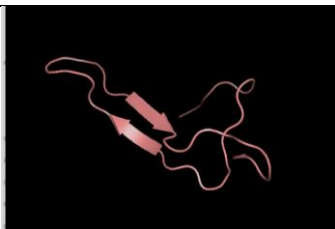
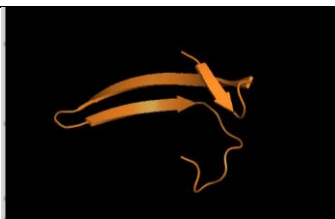
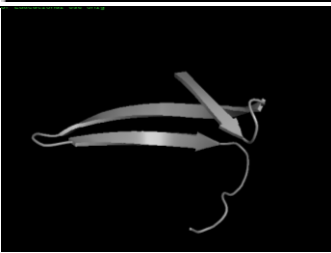
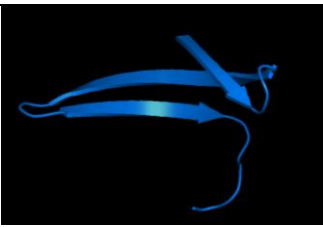
Mencari bentuk 3D dari setiap epitope

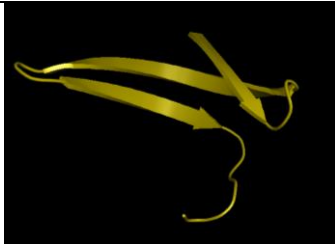
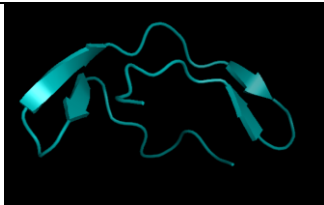
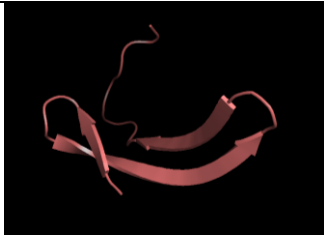
Berikut ini adalah bentuk 3D setiap epitope yang memenuhi kandidat beserta dengan persentasenya yang dibuat menggunakan web <https://swissmodel.expasy.org/>

Tabel 5. bentuk 3D setiap epitope

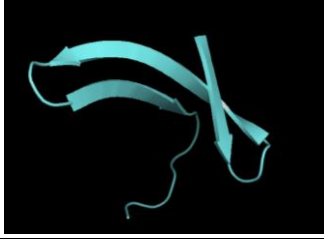
Assesion code	Sekuens	Model 3D	Persentase
WP_014001037.1	AGDDVLIRGVPVGKIVKI EPQPLRAKISFWF		75
EGB28583.1	GDDVLIRGVPVGKIVKIE PQPLRAKISFWFD		75,68

Pencarian Kandidat Vaksin TBC Dari Epitope Protein AGJ16802.1 (Virulence Factor Mce Family Protein [Mycobacterium Tuberculosis STR. BEIJING/NITR203])

EFP47039.1	AGDDVLIRGVPVGKIVKI EPQPLRAKISFWF		75
WP_068230948.1	AGDDVRIRGVPVGKIVKI EPQPLRSKISFWI		72,22
WP_036469360.1	YKVPADAKAAILSPQLV SGRAIQLTPPYTGG		51,22
GAQ39527.1	GDDVLIRGVPVGKIVKIE PQPLRSKISFWF		72,97
MCV6987435.1	DDVLIRGVPVGKILSIEPQ PLRAKISFWFDR		70,27
WP_142274896.1	GDDVLIRGVPVGKILKIE PQPLRSKISFWFD		72,97
WP_273573192.1	AGDDVLIRGVPVGKIVKI EPQPMRSKISFWF		72,22

WP_011740765.1/W P_198965401.1	AGDDVLIRGVPVGKIVKI EPQPLRSKISFWF		72,22
WP_330979022.1	PANATAAILSPQLVSGRA IQLTPPYAGGPTM		76,19 81,58
WP_306244830.1	FAGDDVRIRGVPVGKIV KIEPQPLRAKVSFW		70,27
WP_133449145.1	GDDIRIRGVPVGKIIKIEP QPLRSKITFWFD		80
WP_068212704.1	NGVFAGDEVIRGVPVG KIVKIEPQPLRSKV		71,05
WP_204802845.1	DVRIRGVAVGKIVKIEPQ PLRSKISFWFDGK		76,32
MDT5260429.1	VGDDVRIRGVPVGKVEK IEPQPLRAKIWFWF		

Pencarian Kandidat Vaksin TBC Dari Epitope Protein AGJ16802.1 (Virulence Factor Mce Family Protein [Mycobacterium Tuberculosis STR. BEIJING/NITR203])

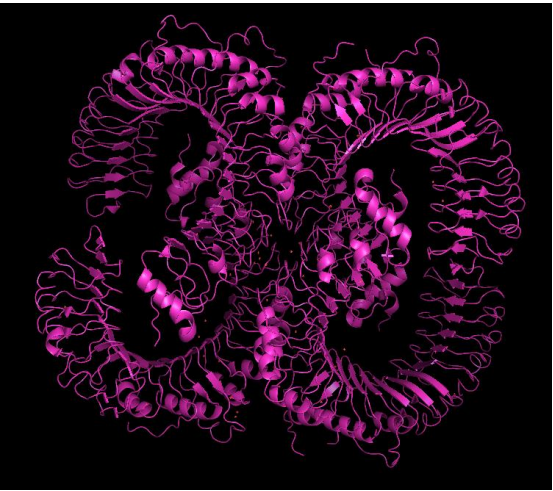
WP_099187431.1	GDDVRIRGVVPVGKIIKIEP QPLRAKILFWFD		78,38
----------------	--------------------------------------	--	-------

Dengan memperhatikan persentase yang terdapat pada tabel di atas, maka dipilih 5 yang memiliki persentase tertinggi yaitu epitor dari:

- 1 WP_014001037.1
- 2 EGB28583.1
- 3 WP_306244830.1
- 4 MDT5260429.1
- 5 WP_099187431.1

Mencari bentuk 3D TLR2

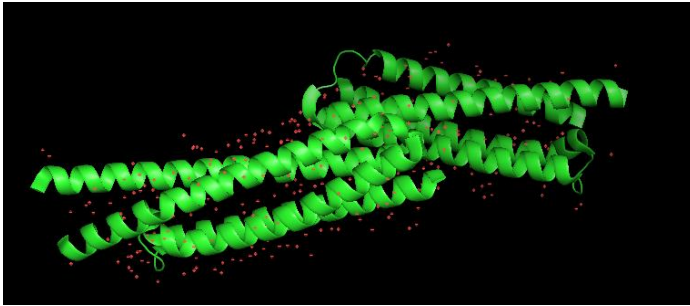
Berikut ini adalah model 3D TL2 dengan kode 6NIG Crystal structure of the human TLR2-Diprovocim complex yang diperoleh dengan menggunakan web <https://www.rcsb.org/>.



Gambar 3. bentuk 3D TLR2

Mencari bentuk 3D ESAT-6

Berikut ini adalah model 3D ESAT-6 dengan kode 3FAV Structure of the CFP10-ESAT6 complex from *Mycobacterium tuberculosis* yang diperoleh dengan menggunakan web <https://www.rcsb.org/>.

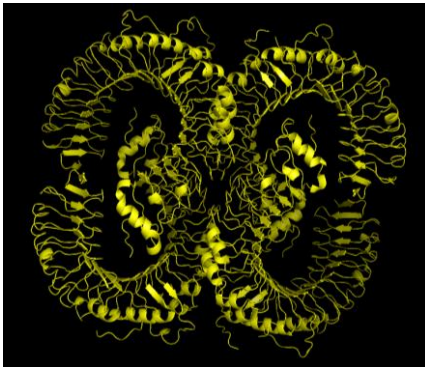


Gambar 4. bentuk 3D ESAT-6

Molekular docking

Preparasi TLR2

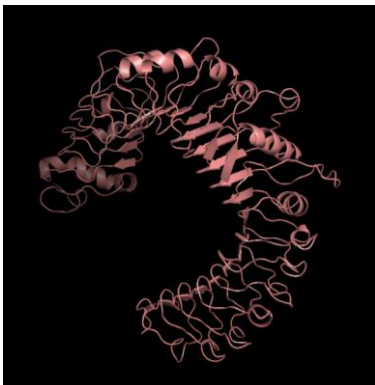
Berikut ini adalah model 3D TL2 dengan kode 6NIG Crystal structure of the human TLR2-Diprovocim complex yang sudah dihilangkan airnya dan ditambah polaritasnya menggunakan aplikasi pymol.



Gambar 5. Preparasi TLR2

Model 3D TLR2C bersih polar

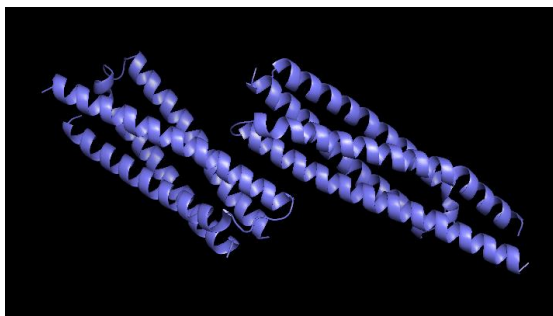
Karena sekuens dari TLR2 berulang dan merupakan cerminan satu dengan yang lain, maka digunakan sekuens dari rantai C. Hasil modifikasi TLR2C yang dibersihkan dari air dan ditambah polaritasnya nampak pada gambar di bawah ini.



Gambar 6. Model 3D TLR2C bersih polar

Preparasi ESAT6

Berikut ini adalah model 3D ESAT-6 dengan kode 3FAV Structure of the CFP10-ESAT6 complex from *Mycobacterium tuberculosis* yang sudah dihilangkan airnya dan ditambah polaritasnya menggunakan aplikasi pymol.



Gambar 7. Preparasi ESAT6

Docking TLR2 dengan ESAT6 dan TLR dengan epitope

Berikut ini hasil docking TLR2C dengan ESAT6 dan TL2C dengan epitope menggunakan web <https://rascar.science.uu.nl/haddock2.4/>.

Tabel 6. Membandingkan data hasil docking TLR2 dengan Esat6 dan TLR2 dengan epitope

Paramater	TLR2C- ESAT6	TLR2C- WP0140010 371	TLR2C- EGB285831	TLR2C- WP_306 2448301	TLR2C- MDT52 604291	TLR2C- WP0991 874311
HADDOCK score	-53,8+/-3,6	-96.2 +/- 7.9	-113.3 +/- 14.5	-152.5 +/- 7.3	-103.5 +/- 11.1	-118.0 +/- 10.3
Cluster size	47	7	6	16	12	4
RMSD from the overall lowest-energy structure	0,6+/-0,4	3.3 +/- 0.2	4.1 +/- 0.1	0.7 +/- 0.4	1.9 +/- 0.3	0.9 +/- 0.6
Van der Waals energy	-70,6+/-6,2	-51.6 +/- 4.1	-53.7 +/- 5.5	-80.7 +/- 0.1	-65.9 +/- 9.4	-76.3 +/- 8.7
Electrostatic energy	-188,6+/-20,3	-180.4 +/- 24.1	-266.8 +/- 23.7	-203.2 +/- 20.8	-141.9 +/- 35.0	-258.2 +/- 19.6
Desolvation energy	-66,9+/-3,0	-41.5 +/- 2.8	-30.5 +/- 1.4	-47.5 +/- 1.9	-46.5 +/- 8.5	-28.1 +/- 4.1
Restraints violation energy	1214,5+/-78,2	330.9 +/- 39.5	242.8 +/- 75.9	162.9 +/- 33.4	372.3 +/- 31.5	380.1 +/- 17.1
Buried Surface Area	2927,3+/-83,6	1874.4 +/- 104.8	1952.5 +/- 118.8	2580.5 +/- 51.1	2086.5 +/- 77.3	2501.0 +/- 71.6
Z-Score	-1,6	-1.5	-1.8	-2.4	-1.9	-2.1

Pembahasan

Project ini melibatkan Mycobacterium tuberculosis strain Beijing karena keluarga genotipe Mycobacterium tuberculosis Beijing/W telah menyebabkan wabah tuberculosis dalam jumlah besar, terkadang melibatkan resistensi multi-obat. Strain ini paling banyak di temukan di Asia. Proporsi TB akibat strain Beijing di Asia adalah >50%. Strain ini ditengarai menjadi penyebab tingginya kasus TBC di Asia juga Indonesia, karena strain Beijing lebih resistensi antibiotik dan punya kemampuan untuk lolos dari vaksinasi BCG, memiliki kemampuan penularan yang cepat dan kekambuhan tinggi, sehingga penemuan

vaksin baru menggunakan strain ini diharapkan lebih efektif dibandingkan vaksin BCG (Mahghani et al., 2022).

Berdasarkan data yang diperoleh dari docking epitope dengan TLR2 dapat disimpulkan jika epitope AGJ68032.1 dengan sekuens FAGDDVRIRGVPVGKIVKIEPQPLRAKVSFW berpotensi menjadi vaksin TBC karena memiliki HADDOCK score sebesar -152.5 +/- 7.3 dan nilai RSMD yang mendekati HADDOCK score dan nilai RSMD TLR2 dengan ESAT6. Analisa data perbandingan nilai dinyatakan dengan RMSD (Rate Mean Square Deviation). Metode docking dikatakan baik jika nilai RMSD-nya lebih kecil atau sama dengan 2,5 ($\leq 2,5$). (Rollando, 2018). Sumber yang lain juga menjelaskan jika: jika nilai RMSD (Root Mean Square Deviation) kurang dari 2 $\text{\AA}$, maka hasilnya dapat diterima dengan baik untuk menyatakan kemiripan koordinat (pose) antara dua atom (Zubair et al., 2020). Epitope tersebut juga berpotensi menjadi vaksin TBC karena tidak bersifat alergen dan berpotensi sebagai antigen

Hasil generate dari PDB sum menunjukkan hasil jika jumlah ikatan hidrogen antara TLR2-ESAT6 lebih banyak (8) dibandingkan dengan ikatan hidrogen TLR2-epitope terpilih (3), sedangkan jumlah residu yang berikatan pada TLR2-ESAT6 tidak berbeda jauh dengan jumlah residu yang berikatan pada TLR2-epitope terpilih. Ikatan hidrogen berperan untuk memfasilitasi interaksi molekuler. Ikatan H mengatur interaksi molekuler melalui mekanisme pasangan donor-akseptor yang meminimalkan persaingan dengan air. Ikatan H meningkatkan interaksi reseptor-ligan ketika donor dan akseptor memiliki kemampuan ikatan H yang jauh lebih kuat atau jauh lebih lemah daripada atom hidrogen dan oksigen dalam air. Oleh karena itu bisa dikatakan jika ikatan TLR2-ESAT6 lebih kuat dibandingkan dengan TLR2-epitope terpilih (Amelia, 2014; Chen et al., 2016; "Dengue NS3 Protease; Dengue NS2B Protein," 2013; Wu et al., 2015).

Mycobacterium tuberculosis, patogen intraseluler yang menginfeksi dan bertahan hidup di dalam sel inang khususnya makrofag. Eliminasi mikroorganisme ini dilakukan melalui apoptosis makrofag inang. Respon ini diatur oleh sitokin pro-inflamasi tipe T helper 1, yang disintesis oleh fagosit setelah pengenalan pola molekuler terkait patogen (PAMPs) pada Mycobacterium tuberculosis oleh reseptor pengenalan pola (PRRs). Mycobacterium tuberculosis ditelan oleh makrofag dan sel dendritik (DC), yang berfungsi sebagai sel inang untuk kelangsungan hidup dan penyebaran Mycobacterium tuberculosis. Pengikatan ligan Mycobacterium tuberculosis ke TLR-2 mengawali pelepasan mediator inflamasi, ekspresi molekul adhesi dan rekrutmen makrofag, DC, dan PMN lebih lanjut ke area yang terinfeksi Mycobacterium tuberculosis (Mortaz et al., 2015). Hal ini menjadi alasan epitope dari AGJ68032.1 di dockingkan ke TLR2 karena pengikatan epitope pada TLR2 diharapkan mampu mengawali pelepasan mediator inflamasi, ekspresi molekul adhesi dan rekrutmen makrofag, DC, dan PMN untuk mekanisme imunitas tubuh.

Reseptor pengenalan pola (PRR) adalah sekelompok reseptor yang merasakan keberadaan bakteri, jamur, dan virus. PRR bertanggung jawab untuk mengenali molekul endogen yang dilepaskan dari sel yang rusak, yang disebut pola molekuler terkait

kerusakan (DAMPs). Salah satu PRR adalah protein transmembran seperti TLR. TLR memainkan peran penting dalam resistensi bawaan dan inisiasi imunitas adaptif terhadap agen infeksi. Mereka bertindak dengan mengenali pola molekuler terkait patogen (PAMPs) atau molekul terkait peradangan endogen. Akibatnya aktivasi TLR meningkatkan regulasi transkripsi sitokin proinflamasi termasuk IL-1 β , TNF- α dan IL-6 yang penting untuk rekrutmen sel imun ke lokasi infeksi dan mengendalikan infeksi Mycobacterium tuberculosis. Salah satu TLR yang diketahui terlibat dalam pengenalan MTB adalah TLR2. TLR2 terlibat dalam pengenalan glikolipid dinding sel mikobakteri. Pengenalan Mycobacterium tuberculosis oleh TLR2 memicu berbagai kaskade sinyal intraseluler yang pada akhirnya menghasilkan produksi sitokin, kemokin, dan molekul antimikroba (Mortaz et al., 2015).

Vaksinasi dengan epitope AGJ68032.1 dengan sekuens FAGDDVRIRGVVPGKIVKIEPQPLRAKVSFW diharapkan juga dapat memicu respons imun adaptif untuk membendung infeksi. Imunitas adaptif terhadap infeksi Mycobacterium tuberculosis ditandai dengan munculnya sel T CD4+ spesifik antigen yang mensekresi IFN- γ , yang selanjutnya mengaktifkan makrofag dan sel penyaji antigen (APC) lainnya untuk membunuh bakteri intraseluler. Sel T CD8+ juga merupakan sel penting untuk mengendalikan Mycobacterium tuberculosis selama fase infeksi kronis. Selain itu, sel Th17 dan IL-17 telah dilaporkan terlibat dalam patogenesis Mycobacterium tuberculosis. IL-17 adalah sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh sel Th17 dan sel struktural saluran napas, yang memberikan perlindungan IFN- γ -dependent atau IFN- γ -independent terhadap infeksi Mycobacterium tuberculosis (Mortaz et al., 2015).

Dalam project ini, epitope dibandingkan dengan ESAT-6 karena mengandung peptida pengaktif TLR2 yang akan menginduksi autophagy. ESAT6 mampu mengikat laminin dan menyebabkan lisis sel epitel paru, pembentukan granuloma, mengatur produksi sitokin oleh sel imun. Sel-sel epitel paru menghasilkan peningkatan kadar IL-8 setelah infeksi oleh berbagai saluran pernapasan virus dan bakteri. Dengan menginduksi aktivasi kekebalan, ESAT-6 dapat membentuk respon imun host, mencapai proliferasi dan penyebaran Mycobacterium tuberculosis. ESAT6 berinteraksi dengan epitop sel T yang dikenali oleh kompleks histokompatibilitas utama (MHC) kelas II. Setelah mencapai saluran pernafasan dan menginfeksi makrofag alveolar, Mycobacterium tuberculosis menginduksi kaskade sinyal, yang kemudian memicu perekrutan dan masuknya sel imun lainnya, termasuk neutrofil dan granulosit. Respon imun yang diatur ini menentukan tahap aktivasi TLR, yang mengenali molekul terkait patogen tertentu pola (PAMPs) yang dihasilkan oleh Mycobacterium tuberculosis, sehingga memicu kuat reaksi kekebalan untuk melawan infeksi. Pengenalan PAMP selama infeksi dan aktivasi TLR menghasilkan induksi kaskade sinyal intraseluler yang berbeda, yang mendukung produksi dan sekresi inflamasi mediator penting untuk respons mikroba inang terhadap patogen. Selain itu, ESAT6 juga ditemukan pada isolat Mycobacterium tuberculosis di Beijing dan non-Beijing. Dengan demikian ikatan ESAT-6 terhadap TLR2 dapat menjadi pembandingan untuk TLR2 dengan epitope yang dibuat.

TLR2 berperan mengenali bakteri *M. tuberculosis*. Perubahan gen virulen seperti gen *esxA*, yang melepaskan ESAT-6. Gen *esxA* dianggap sebagai penentu patogen utama dan diketahui berperan penting dalam invasi *Mycobacterium tuberculosis* dan memodulasi aktivasi makrofag untuk mengurangi virulensi. ESAT-6 merupakan protein sekretorik dan antigen sel T yang kuat. ESAT-6 telah terbukti berikatan langsung dengan reseptor TLR2, menghambat transduksi sinyal hilir. ESAT-6 terbukti memblokir TLR2 di permukaan makrofag dan kompleks CFP-10/ESAT-6 terbukti menurunkan regulasi produksi spesies oksigen reaktif (ROS) (Blanc et al., 2017). ESAT-6 dapat masuk ke dalam retikulum endoplasma untuk menghambat ekspresi permukaan sel kompleks MHC-I- β 2M, yang mengakibatkan penurunan regulasi presentasi antigen yang dimediasi kelas I. ESAT-6 berinteraksi langsung dengan toll like receptor (TLR) 2 yang mengurangi sekresi interleukin di makrofag (Sreejit et al., 2014).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa epitop protein AGJ68032.1 (virulence factor Mce family protein) dari *Mycobacterium tuberculosis* strain Beijing dengan sekuens FAGDDVRIRGVPVGKIVKIEPQPLRAKVSFW berpotensi sebagai kandidat vaksin TBC baru, karena menunjukkan afinitas pengikatan yang tinggi terhadap TLR2 dengan nilai HADDOCK score $-152,5 \pm 7,3$ dan RMSD yang mendekati kontrol positif ESAT6, serta memenuhi kriteria non-alergenik dan antigenisitas yang baik. Namun, jumlah ikatan hidrogen antara epitop dan TLR2 masih lebih rendah dibandingkan dengan kompleks TLR2-ESAT6, menunjukkan bahwa interaksinya mungkin kurang stabil. Untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk melakukan modifikasi struktur epitop guna meningkatkan stabilitas pengikatan, validasi *in vitro* dan *in vivo* untuk menguji imunogenisitas dan efikasi protektif, serta mengeksplorasi kombinasi dengan adjuvant atau epitop lain untuk meningkatkan respons imun yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alcantara, C. A., Glassman, I., Nguyen, K. H., Parthasarathy, A., & Venketaraman, V. (2023). Neutrophils in *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccines*, 11(3), 631. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030631>
- Amelia, F. (2014). Studi interaksi ligan peptidoid dan peptida dengan enzim protease NS3/NS2B virus dengue. *Jurnal Sainstek*, 6(1), 24–29.
- Blanc, L., Gilleron, M., Prandi, J., Song, O. R., Jang, M. S., Gicquel, B., Drocourt, D., Neyrolles, O., Brodin, P., Tiraby, G., Vercellone, A., & Nigou, J. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* inhibits human innate immune responses via the production of TLR2 antagonist glycolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(42), 11205–11210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707840114>

- Chen, D., Oezguen, N., Urvil, P., Ferguson, C., Dann, S. M., & Savidge, T. C. (2016). Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Science Advances*, 2(3), e1501240. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501240>
- Dengue NS3 protease; dengue NS2B protein. (2013). *Science-Business EXchange*, 6(14), 338. <https://doi.org/10.1038/scibx.2013.338>
- Foster, M., Hill, P. C., Setiabudiawan, T. P., Koeken, V. A. C. M., Alisjahbana, B., & van Crevel, R. (2021). BCG-induced protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection: Evidence, mechanisms, and implications for next-generation vaccines. *Immunological Reviews*, 301(1), 122–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12965>
- Khan, A., Bakhru, P., Saikolappan, S., Das, K., Soudani, E., Singh, C. R., Estrella, J. L., Zhang, D., Pasare, C., Ma, Y., Sun, J., Wang, J., Hunter, R. L., Tony Eissa, N., Dhandayuthapani, S., & Jagannath, C. (2019). An autophagy-inducing and TLR-2 activating BCG vaccine induces a robust protection against tuberculosis in mice. *NPJ Vaccines*, 4(1), 34. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0122-8>
- Li, Y. Y., Cai, R. J., Talbot, E. A., & Wang, Y. T. (2023). *Mycobacterium tuberculosis*. In Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, & J. Schwartzman (Eds.), *Molecular medical microbiology* (3rd ed). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00010-1>
- Mahghani, G. A., Kargar, M., Ghaemi, E. A., Kafilzadeh, F., & Davoodi, H. (2022). Role of ESAT-6 in pathogenicity of Beijing and non-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbial Pathogenesis*, 162, 105366. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105366>
- Mortaz, E., Adcock, I. M., Tabarsi, P., Masjedi, M. R., Mansouri, D., Velayati, A. A., Casanova, J. L., & Barnes, P. J. (2015). Interaction of pattern recognition receptors with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Immunology*, 35(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0103-7>
- Rahlwes, K. C., Dias, B. R. S., Campos, P. C., Alvarez-Arguedas, S., & Shiloh, M. U. (2023). Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*, 14(1), 2150449. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150449>
- Sreejit, G., Ahmed, A., Parveen, N., Jha, V., Valluri, V. L., Ghosh, S., & Mukhopadhyay, S. (2014). The ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with beta-2-microglobulin (β 2M) affecting antigen presentation function of macrophage. *PLoS Pathogens*, 10(10), e1004446. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004446>
- Wu, H., Bock, S., Snitko, M., Berger, T., Weidner, T., Holloway, S., Kanitz, M., Diederich, W. E., Steuber, H., Walter, C., Hofmann, D., Weißbrich, B., Spannaus, R., Acosta, E. G., Bartenschlager, R., Engels, B., Schirmeister, T., & Bodem, J. (2015). Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 1106–1116. <https://doi.org/10.1128/AAC.03543-14>
- Zhai, W., Wu, F., Zhang, Y., Fu, Y., & Liu, Z. (2019). The immune escape mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 340. <https://doi.org/10.3390/ijms20020340>
- Zubair, M. S., Maulana, S., & Mukaddas, A. (2020). Penambatan molekuler dan simulasi dinamika molekuler senyawa dari genus *Nigella* terhadap penghambatan aktivitas enzim protease HIV-1. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy)*, 6(1), 132–140.