

VAKSI DNA *HEAT SHOCK PROTEIN 65* (HSP65) DENGAN KLK YANG TERENKAPSULASI NANOPARTIKEL PLGA SEBAGAI INOVASI TERAPI PREVENTIF DAN KURATIF TUBERKULOSIS

Jaya Firmansyah,¹ Hana Nafisah,¹ Nabila Rayhan Yasmin¹

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung, Bandar
Lampung

ABSTRAK

Korespondensi:

Jaya Firmansyah

Email Korespondensi:

jaya.firmansyah29@gmail.com

Riwayat Artikel

Diterima: 20 Maret 2021
Selesai revisi: 14 Juli 2021

DOI :

10.53366/jimki.v9i2.364

Pendahuluan: Tuberkulosis merupakan salah satu penyakit dengan angka mortalitas yang tinggi. Untuk mencegah penyebaran tuberkulosis adalah dengan pemberian vaksin BCG. Namun, efek perlindungan dari vaksin BCG bervariasi dari 0-80% dan menurun secara signifikan setelah 10-15 tahun. Jadi, dibutuhkan inovasi vaksin baru yang lebih protektif. Tujuan dari tinjauan pustaka ini adalah untuk mengetahui mekanisme kerja dan efektivitas vaksin DNA hsp65 dengan nanopartikel PLGA berkapsul dengan adjuvan KLK dalam meningkatkan respon imun terhadap tuberkulosis.

Metode: Makalah yang telah ditinjau diperoleh menggunakan mesin pencari seperti Google Scholar, Proquest, Science Direct, dan PubMed dengan rentang publikasi dari 2010 hingga 2021 dan makalah dipilih validitas dan reliabilitasnya. Kemudian dilakukan tinjauan pustaka dan penulisan artikel.

Pembahasan: Vaksin DNA hsp65 dapat memicu produksi sitokin, seperti IFN- γ , IL-2, aktivitas sel T CD4⁺ dan CD8⁺ yang lebih tinggi daripada vaksin BCG. Ada penurunan yang signifikan pada tingkat MTB pada tikus yang disuntik dengan vaksin hsp65. Kombinasi vaksin hsp65 + KLK menunjukkan kerusakan paru-paru dan area inflamasi paling sedikit dan respon Th1 dan produksi IL-10 tertinggi di antara vaksin lainnya. Untuk meningkatkan efisiensi vaksin DNA hsp65 + KLK, dilakukan pengurangan dosis menjadi dosis tunggal dengan menggunakan nanopartikel PLGA *biodegradable* sebagai sistem pembawa antigen.

Simpulan: Kombinasi vaksin DNA hsp65 dan KLK dapat memicu respon imun spesifik terhadap MTB dan dengan enkapsulasi PLGA dapat meningkatkan efisiensinya, sehingga berpotensi tinggi sebagai terapi preventif dan kuratif tuberkulosis.

Kata kunci: hsp65, KLK, Mycobacterium Tuberkulosis, Nanopartikel PLGA, Vaksin

DNA HEAT SHOCK PROTEIN 65 (HSP65) VACCINE WITH NANOPARTICLE PLGA ENCRYPTED KLK AS A PREVENTIVE AND CURATIVE TUBERCULOSIS THERAPY INNOVATION

ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis is a disease with a high mortality rate. To prevent the spread of tuberculosis is by giving the BCG vaccine. However, the protective effect of the BCG vaccine varies from 0-80% and decreases significantly after 10-15 years. So, new vaccine innovations that are more protective are needed. The purpose of this literature review is to determine the mechanism of action of the hsp65 DNA vaccine with PLGA nanoparticles in capsules with KLK adjuvants in increasing the immune response against tuberculosis.

Methods: The reviewed papers were obtained using search engines such as Google Scholar, Proquest, Science Direct, and PubMed with a publication range from 2010 to 2021 and the papers were selected for validity and reliability. Then carried out a literature review and article writing.

Discussion: DNA hsp65 vaccine can trigger the production of cytokines, such as IFN- γ , IL-2, higher CD4+ and CD8+ T cell activity than BCG vaccine. There was a significant reduction in MTB levels in mice injected with the hsp65 vaccine. The combination of hsp65 + KLK vaccine showed the least lung damage and areas of inflammation and the highest Th1 response and IL-10 production among the other vaccines. To increase the efficiency of the DNA hsp65 + KLK vaccine, the dose was reduced to a single dose using biodegradable PLGA nanoparticles as an antigen carrier system.

Conclusion: The combination of hsp65 DNA vaccine and KLK can trigger a specific immune response against MTB and with PLGA encapsulation can increase its efficiency, so it has high potential as a preventive and curative therapy for tuberculosis.

Keywords: hsp65, KLK, *Mycobacterium tuberculosis*, PLGA nanoparticles, vaccine

1. PENDAHULUAN

Penyakit Tuberkulosis atau yang lebih dikenal TBC merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*.^[1] *Global Tuberculosis Report 2019* melaporkan bahwa, secara global pada tahun 2018 diperkirakan terdapat 10 juta (kisaran 9-11,1 juta) kasus insiden TBC. Berdasarkan laporan *World Health Organization (WHO)* pada tahun 2016, TBC merupakan penyakit ke-10 penyebab kematian terbesar. Selain itu, berdasarkan laporan tuberkulosis global, Asia Tenggara merupakan regional dengan estimasi insidensi TBC tertinggi mencapai 45%.^[2] WHO telah mendefinisikan negara dengan beban tinggi/*high burden countries (HBC)* untuk TBC berdasarkan 3 indikator yaitu TBC, TBC-HIV, dan MDR-TBC. Indonesia bersama 13 negara lain, masuk dalam daftar HBC untuk ketiga indikator tersebut. Data jumlah kasus TBC di Indonesia berjumlah 420.994 kasus pada tahun 2017.^[1]

Permasalahan TBC menjadi permasalahan kesehatan yang sangat serius dan membutuhkan upaya penanganan yang tepat. WHO telah menetapkan 3 indikator dan target yang harus dicapai oleh seluruh negara dalam mengatasi permasalahan TBC yaitu 1) menurunkan jumlah kematian TBC sebanyak 70% pada tahun 2025 dibandingkan kematian pada tahun 2015, 2) menurunkan insidensi TBC sebanyak 50% pada tahun 2025 dibandingkan tahun 2015, 3) tidak ada keluarga pasien TBC yang terbebani pembiayaannya terkait pengobatan TBC pada tahun 2035. Indonesia sendiri pada Permenkes Nomor 67 Tahun 2016 tentang Penanggulangan Tuberkulosis menetapkan target program penanggulangan TBC nasional yaitu eliminasi pada tahun 2035 dan Indonesia Bebas TBC Tahun 2050. Eliminasi TBC adalah tercapainya jumlah kasus TBC 1 per 1 juta penduduk. Sementara tahun 2017 jumlah kasus TBC masih sebesar 254 per 100.000 atau 25,40 per 1 juta penduduk.^[1]

Penanganan kuratif untuk penyakit TBC dengan memberikan obat anti-tuberkulosis (OAT), namun ketidakpatuhan pasien dapat

menyebabkan *Mycobacterium tuberculosis (MTB)* menjadi resisten terhadap OAT. *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap isoniazid dan rifampisin disebut *Multi-drug Resistant Tuberculosis (MDR-TBC)*. Keadaan MDR-TBC yang tidak ditangani dengan tepat dapat berkembang menjadi *eXtensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR-TBC)* yang menyebabkan penyakit TBC makin sulit disembuhkan.^[3] Berdasarkan data, WHO memperkirakan terdapat 480.000 kasus TBC MDR di seluruh dunia, sedangkan kematian akibat TBC MDR diperkirakan 250.000 kasus pada tahun 2015. WHO dalam *Global Tuberculosis Report 2015* melaporkan bahwa Indonesia termasuk salah satu negara dari 27 negara lainnya di dunia dengan kasus TBC MDR yang cukup banyak yaitu terdapat 6800 kasus baru TBC MDR setiap tahunnya.^[4] Berdasarkan *Annual Report 2017*, Indonesia menempati posisi ke dua kasus TBC MDR tertinggi di Asia Tenggara.^[2] Artinya, Indonesia memiliki permasalahan besar dalam menghadapi penyakit TBC.

Pemerintah Indonesia telah menetapkan pedoman penanggulangan tuberkulosis yang salah satu komponennya, yaitu dengan program pengobatan pencegahan pada kelompok yang rentan dan berisiko serta pemberian vaksin TBC. Vaksinasi dengan BCG merupakan upaya yang saat ini masih digunakan dalam pencegahan TBC. Vaksin BCG terbukti protektif pada anak namun menurun signifikan setelah 10-15 tahun serta efek proteksi vaksin BCG bervariasi dari 0-80%, bergantung pada genetik dan kondisi geografis.^[5,6] Berdasarkan penelitian yang dilakukan Barreto *et al.*^[7] di Brazil juga menunjukkan bahwa efektivitas tertingginya hanya 12%.^[7] Vaksinasi ulang juga tidak akan meningkatkan proteksi terhadap TBC dan bahkan memberikan efek samping seperti pembengkakan kelenjar limfe, demam, muntah dan nyeri perut.^[5] Vaksin BCG merupakan vaksin hidup strain bakteri *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan yang berpotensi membahayakan bagi anak-anak dengan masalah gizi.^[8]

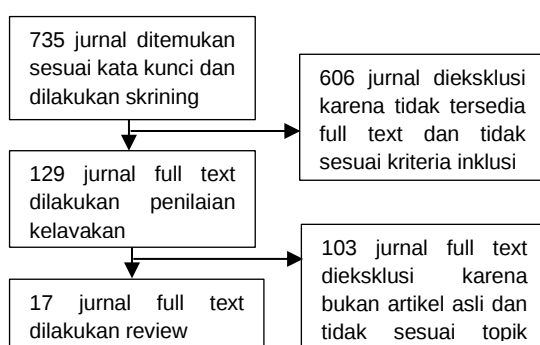
Berdasarkan studi Zufferey *et al.*,^[9] dengan makin bertambahnya umur, terjadi pergeseran peningkatan produksi limfosit T. Saat umur awal divaksinasi, limfosit yang banyak adalah sel T CD4+. Namun, seiring berjalannya waktu, konsentrasi sel T CD4+ menurun dan produksi sel T CD8+ meningkat. Hal ini justru menurunkan efek proteksi BCG karena respons imun sel T CD8+ terhadap antigen MTB tidak begitu kuat dibanding sel T CD4+.^[9]

Pada saat ini, salah satu pengembangan vaksin untuk TBC yaitu vaksin DNA. Penelitian yang pernah dilakukan mengenai vaksin DNA yaitu vaksin DNA yang mengkode *Mycobacterium leprae* protein heat-shock 65 kDa (DNA hsp65) yang telah terbukti protektif terhadap *Mycobacterium Tuberculosis* secara in vivo pada hewan coba.^[5] Selain efek preventif, vaksin DNA hsp65 juga memiliki efek kuratif, sehingga dapat digunakan untuk menyembuhkan penyakit TBC.^[10] Namun terapi tunggal kurang memberikan hasil yang maksimal untuk proteksi sehingga lebih disarankan untuk terapi kombinasi. Santos *et al.*,^[8] mengombinasikan vaksin hsp65 dengan KLK, dan hasilnya membuktikan bahwa kombinasi vaksin hsp65 dan KLK memiliki efikasi lebih tinggi.^[8] Permasalahan yang lain mengenai penggunaan vaksin adalah perlunya vaksinasi berulang karena perlindungan vaksin tidak dapat bertahan lama serta perlunya biaya yang besar untuk vaksin berulang terutama di negara berkembang. Solusi terhadap permasalahan tersebut dapat diatasi dengan penggunaan vaksin yang berbasis nanopartikel PLGA sehingga dosis, ketahanan vaksin dan penggunaannya dapat lebih sederhana. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa nanopartikel *polylactic polyglycolic acid* (PLGA) terbukti dapat mengantarkan antigen TBC menuju ke makrofag alveolar secara utuh.^[11] Selain itu, injeksi suatu antigen dengan PLGA dengan dosis tunggal saja sudah dapat memicu respons imun secara optimal.^[12] Oleh karena itu tujuan dalam *literature review* ini yaitu ingin membahas mengenai mekanisme kerja vaksin DNA hsp65 dengan adjuvan KLK

berbasis nanopartikel PLGA untuk perlindungan terhadap infeksi TBC.

2. METODE

Metode yang digunakan dalam penyusunan *literature review* ini dilakukan dengan pencarian literatur melalui penelusuran menggunakan pencarian *online* dengan instrumen Google Scholar, Proquest, Scencedirect, PubMed, WHO, dan Kemenkes. Kata kunci yang digunakan adalah *mycobacterium tuberculosis*, vaksin, hsp65, KLK, dan nanopartikel PLGA dengan publikasi bahasa Inggris dan Indonesia dalam rentang tahun 2010-2021. Dari hasil pencarian, didapat sebanyak 735 jurnal yang sesuai kata kunci pencarian tersebut dilakukan skrining berdasarkan beberapa kriteria inklusi dan kriteria eksklusi. Kriteria inklusi untuk pemilihan artikel yang relevan antara lain: 1) artikel asli yang ditulis dalam bahasa Inggris, 2) penelitian eksperimental, 3) penggunaan nanopartikel PLGA, 4) vaksin DNA hsp65, dan 5) *adjuvant* vaksin berupa KLK. Sedangkan untuk kriteria eksklusi antara lain: 1) abstrak dari sebuah artikel, 2) *review* artikel dan buku, 3) penelitian observasional, 4) jurnal yang duplikasi, dan 5) tidak tersedia artikel *full text*. Sebanyak 735 jurnal tersebut setelah dilakukan skrining berdasarkan judul didapatkan hasil 606 jurnal dieksklusi karena tidak tersedia *full text* dan tidak sesuai kriteria inklusi. Penilaian kelayakan terhadap 129 jurnal *full text* dilakukan, jurnal yang duplikasi, bukan artikel asli, dan tidak sesuai dengan topik bahasan dilakukan eksklusi sebanyak 103 jurnal. Sehingga diperoleh hasil akhir 17 jurnal *full text* yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi serta dianggap valid dan reliabel. Data yang telah terkumpul dianalisis secara ilmiah dan sistematis. Teknik analisis data yang digunakan yaitu deskriptif dan argumentative.



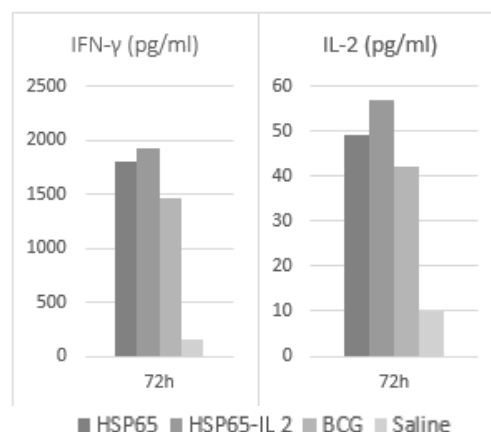
Gambar 1. Diagram Alur Review Jurnal

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Vaksin hsp65 dan Cara Kerjanya

Heat shock protein (hsp) merupakan jenis protein yang memiliki fungsi untuk meregulasi protein fungsional dalam respon terhadap stres, hipoksia, toksin, inflamasi dan panas. Hsp dapat memicu *antigen presenting cell* (APC) untuk bekerja, sehingga muncul respons imun adaptif. Hsp65 merupakan salah satu antigen hsp pada bakteri MTB yang paling banyak diekspresikan. Peran hsp65 adalah sebagai protein yang mengaktifasi monosit saat terjadi infeksi MTB, sehingga dapat meningkatkan produksi TNF, IL-6 dan IL-8 yang berfungsi dalam respon imun spesifik yang dimediasi oleh sel limfosit T.^[5]

Pada penelitian Santos *et al*.^[8], mengenai respon imun terhadap vaksin hsp65 memberikan hasil peningkatan antibodi IgG1 dan IgG2 setelah 30 dan 90 hari diimunisasi baik oleh vaksin tunggal hsp65 atau vaksin hsp65 yang dikombinasikan dengan adjuvan KLK.^[8] Wowk *et al*.^[13] juga melakukan penelitian mengenai respon imun individu sehat dan pasien TBC terhadap antigen hsp65 dan didapatkan hasil yang signifikan terhadap peningkatan produksi CD8+, CD4+ dan IFN- γ .^[13] Penelitian pada hewan percobaan untuk melihat efikasi dari vaksin DNA hsp65 tunggal dan vaksin hsp65+IL-2 memberikan hasil yang signifikan terhadap peningkatan jumlah CD4+, CD8+, IL-2 dan IFN- γ dibandingkan vaksin BCG.^[10]



Gambar 2. Jumlah Produksi IFN- γ dan IL-2 pada Tikus Setelah 72 Jam Divaksinasi.^[10]

Vaksin DNA hsp65 bekerja dengan cara mengekspresikan protein hsp65 yang akan meningkatkan produksi sel T, CD4+ dan CD8+ sebagai bentuk pertahanan adaptif. Penelitian vaksin hsp65+IL2 dan BCG pada hewan coba menunjukkan perbedaan signifikan terhadap produksi sitokin IFN- γ dan IL-2 dibandingkan dengan respon imun terhadap vaksin BCG tunggal (**Tabel 1**).^[10] Peningkatan jumlah sitokin IFN- γ dan IL-2 akan merangsang aktivasi dan proliferasi sel T CD4+ dan CD8+ yang berperan penting sebagai respon imun terhadap MTB.

Tabel 1. Kadar Sel T CD4+ dan CD8+ pada Tikus Setelah Divaksinasi.^[10]

Grup	CD4 (%)	CD8(%)
BCG	26.52 $\pm$ 1.30	13.51 $\pm$ 0.65
HSP65-IL2-DNA	25.36 $\pm$ 0.88	19.64 $\pm$ 1.01
HSP65-DNA	22.08 $\pm$ 1.03	12.22 $\pm$ 0.69

Selain berfungsi untuk mencegah penyakit TBC, penelitian Changhong *et al*.^[10] juga membuktikan bahwa vaksin hsp65 juga dapat berfungsi sebagai terapi kuratif terhadap penyakit TBC. Pada penelitian tersebut, tikus yang telah terinfeksi MTB diinjeksikan dengan vaksin hsp65 dan kemudian kadar bakteri dalam tubuh tikus tersebut diukur. Hasilnya menunjukkan bahwa terjadi penurunan

signifikan kadar bakteri MTB pada tikus yang diinjeksi dengan vaksin hsp65 (Tabel 2).

Tabel 2. Kadar Bakteri MTB pada Tikus yang Terinfeksi MTB Setelah Divaksinasi dengan Vaksin hsp65.^[10]

Grup	Jumlah biakan koloni <i>M. tuberculosis</i> ($\log_{10} \pm S.D.$)	
	Limfa	Paru-paru
Cairan salin	5.44 $\pm$ 0.23	5.94 $\pm$ 0.19
BCG	4.30 $\pm$ 0.38	4.44 $\pm$ 0.25
HSP65-IL2-DNA	4.35 $\pm$ 0.28	4.70 $\pm$ 0.20
HSP65-DNA	4.88 $\pm$ 0.30	4.82 $\pm$ 0.25

Penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya telah membuktikan bahwa vaksin atau antigen hsp65 merangsang peningkatan jumlah produksi sitokin dan antibodi sebagai respon imun terhadap infeksi TBC. Hal ini menunjukkan potensi hsp65 sebagai vaksin terhadap MTB sangat besar terutama karena sifatnya yang sangat antigenik.

3.1 KLK Meningkatkan Efek Proteksi Vaksin DNA Hsp65

Human kallikrein-related peptidase (KLK), peptida poli-kationik sintesis, merupakan bagian dari *serine protease* yang berperan dalam jalur proteolitik dan mengontrol kadar protein dalam fisiologi baik dalam kondisi normal maupun beberapa kondisi patologis.^[14,15] Rangsangan dan inhibisi pada KLK dapat memicu respon inflamasi serta berpengaruh terhadap fenotip neoplastik melalui regulasi beberapa proses seluler, seperti proliferasi, *survival*, migrasi, dan invasi.^[14] Selain itu, KLK juga memiliki sifat imunomodulator yaitu dengan mengaktifasi neutrofil dan monosit U937 untuk menghasilkan anion superoksida melalui pengikatan *calreticulin* di permukaan sel. Kombinasi KLK dengan antigen akan meningkatkan transpor antigen ke sel-sel APC dan memicu respon imun spesifik antigen Th2. Ketika KLK bercampur dengan antigen, KLK yang diberikan secara tunggal merupakan adjuvan yang buruk,

sehingga lebih baik dikombinasikan dengan zat lain.^[15]

Santos *et al.*^[8] melakukan penelitian mengenai hubungan KLK pada nanopartikel hsp65 rekombinan (rhsp65) yang bertujuan untuk meningkatkan respon imun yang ditimbulkan oleh vaksin subunit.^[8] Tikus divaksinasi melalui rute intramuskular dengan dosis tunggal dari nanopartikel rhsp65, rhsp65 + KLK atau rhsp65 + CPG dan kemudian setelah 30 hari divaksinasi, tikus tersebut diinfeksi dengan *M. tuberculosis* melalui rute intratekal. Kemudian dilakukan pemeriksaa kadar *Colony Forming Unit* (CFU) setelah 30 hari infeksi. Hasil penelitian histopatologis paru yang diambil dari tikus yang telah divaksin dan telah terinfeksi dengan *M. tuberculosis* menunjukkan bahwa hanya tikus yang mendapat vaksin hsp65 + KLK yang terlindungi dari infeksi *M. tuberculosis*. Hal tersebut dibuktikan dengan penurunan sekitar 2-log pada *bacterial load*.^[8]

Hasil analisis histopatologis paru pun sesuai dengan jumlah CFU. Kerusakan paru paling sedikit ditemukan pada kelompok dengan pemberian vaksinasi hsp65 + KLK. Gambaran yang terlihat yaitu struktur mirip granuloma dimana terdapat limfosit, makrofag, beberapa neutrofil, serta kadar basil terendah. Area inflamasi pada kelompok hsp65 + KLK pun berkurang jika dibandingkan dengan kelompok lain. Ditemukan jumlah basil yang tinggi pada area inflamasi di kelompok lain, hal tersebut berbeda dengan kelompok hsp65+. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa rHsp65 bersama dengan adjuvan KLK yang di enkapsulasi pada nanopartikel PLGA memiliki kemampuan proteksi terhadap strain *M. tuberculosis* H37Rv.^[8]

Pemberian vaksin dengan dosis tunggal dari nanopartikel akan memicu respon imun humoral dan selular. Nanopartikel dengan rHsp65 tidak

menginduksi respon Th1 dan tidak mampu mengurangi *bacil load*. Namun, formulasi vaksin Hsp65 + KLK dapat memicu respon Th1 dan produksi IL-10 tertinggi diantara vaksin yang diuji. Terjadi penurunan jumlah CFU yang signifikan dan kerusakan parenkim paru yang minimal setelah infeksi *M. tuberculosis*. Alasan hal tersebut terjadi diperkirakan karena tipe sel yang berkaitan dengan proses formulasi vaksin. Kemampuan tubuh juga berperan terhadap respon imun yang dipicu hsp65 + KLK, yaitu dengan mengaktifkan mekanisme antibakterial sehingga mengakibatkan penurunan *bacil load* dan perbaikan jaringan paru. Respon Th1 mengakibatkan terjadinya inflamasi berlebihan dan perburukan kerusakan jaringan karena rendahnya produksi IL-10, yang kemudian akan menginduksi terjadinya nekrosis pada sel yang terinfeksi dalam granuloma. Proses tersebut mengakibatkan penyebaran *mycobacterial* karena pecahnya membran granuloma, lalu terjadi pelepasan enzim lisosom dan adanya sitokin lain.^[8]

3.2 Nanopartikel PLGA sebagai Carrier Vaksin DNA hsp65 dan KLK

Kebutuhan untuk meningkatkan efisiensi vaksin DNA hsp65+KLK dengan cara menurunkan dosisnya menjadi dosis tunggal dilakukan dengan menggunakan nanopartikel *biodegradable Poly (lactic-co-glycolic acid)* (PLGA) sebagai sistem pembawa antigen. Nanopartikel adalah struktur padat dan bulat dengan ukuran sekitar 100 nm dan dibuat dari polimer alami atau sintetis. Berbagai macam obat dapat diberikan dengan menggunakan nanopartikel seperti obat kecil hidrofilik, obat kecil hidrofobik, vaksin dan makromolekul biologis.^[16] Sedangkan PLGA adalah salah satu nanopartikel sintesis yang merupakan polimer *biodegradable* yang paling berhasil digunakan karena hidrolisisnya menghasilkan monomer metabolit, asam laktat dan asam glikolat (**Gambar 4**). Penggunaan PLGA untuk pemberian vaksin, obat, atau aplikasi biomaterial

memiliki toksisitas sistemik minimal karena mudah dimetabolisme secara endogen oleh tubuh melalui siklus Krebs.^[17]

Secara umum nanopartikel PLGA memiliki beberapa keunggulan antara lain dapat melindungi obat dari degradasi dan meningkatkan stabilitasnya, dapat meningkatkan profil farmakokinetik dan farmakodinamik, dapat menembus jaringan yang spesifik melalui penetrasi pada endotelium kanker dan jaringan yang meradang atau melalui reseptor yang diekspresikan secara berlebihan oleh sel target. Nanopartikel PLGA memungkinkan pengiriman obat, protein, peptida atau asam nukleat tertentu ke jaringan target mereka. PLGA juga dapat meningkatkan efektivitas pengobatan karena pelepasan berkelanjutan dari agen terapeutik. Keuntungan utama lain dari PLGA dibandingkan polimer lain adalah bahwa PLGA disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) dan *European Medicine Agency* (EMA) dalam berbagai sistem pengiriman obat pada manusia sehingga dapat digunakan lebih lanjut pada penelitian klinis untuk terapi preventif dan kuratif baru di masa depan.^[18]

Polimer PLGA memiliki berat molekul dan komposisi kopolimer yang berbeda yang menyebabkan waktu degradasi PLGA dapat bervariasi dari beberapa bulan hingga beberapa tahun. Bentuk-bentuk PLGA biasanya diidentifikasi oleh rasio monomer yang digunakan. Misalnya, PLGA 50:50 menjelaskan suatu kopolimer yang komposisinya adalah 50% asam laktat dan 50% asam glikolat.^[19] Nanopartikel PLGA sebagian diinternalisasi dalam sel melalui fase cairan pinositosis dan juga melalui endositosis yang dimediasi clathrin. Nanopartikel PLGA dengan cepat keluar dari endolisosom dan memasuki sitoplasma dalam waktu 10 menit (**Gambar 2**).^[20] Sejumlah antigen seperti protein, peptida, lipopeptida, virus atau DNA plasmid telah berhasil diformulasikan dalam nanopartikel PLGA.^[21, 22]

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa pengiriman dalam formulasi nanopartikel dapat meningkatkan penyerapan antigen atau

adjuvan oleh APC dan dikaitkan dengan respon imun yang lebih baik daripada tanpa dikemas dalam nanopartikel.²³ Selain itu, dalam vaksin terenkapsulasi nanopartikel PLGA pelepasan antigen dalam waktu lama dapat memberikan respons imun yang lebih efektif. Hal tersebut juga dapat menghindari risiko toleransi dan menggantikan kebutuhan beberapa vaksinasi *booster* untuk meningkatkan imunitas. Nanopartikel PLGA mampu memberikan pelepasan antigen yang terperangkap *in vitro* secara terus-menerus untuk jangka waktu yang lama,^[24] juga dapat berfungsi sebagai sistem pengiriman yang merangkul antigen, kombinasi antigen yang berbeda, atau kombinasi antigen dan adjuvan dalam partikel yang sama. Kombinasi antigen dan adjuvan harus diberikan bersama dalam partikel yang sama untuk diinternalisasi secara bersamaan. Selain itu, nanopartikel PLGA yang mengandung antigen dan adjuvan dosis sangat rendah mampu memicu respons sel T yang kuat. Penggunaan dosis yang lebih rendah dari molekul-molekul ini akan menguntungkan, tidak hanya untuk meminimalkan potensi efek samping tetapi juga dari sudut pandang ekonomi.^[25]

Nanopartikel PLGA digunakan sebagai pembawa vaksin dapat memberikan antigen eksogen yang dipresentasikan secara silang melalui kompleks MHC I ke sel CD8+. Presentasi antigen melalui kompleks MHC I sangat penting untuk kontrol penyakit menular karena merupakan jalur yang dapat merangsang sel T CD8+ untuk memperoleh fenotipe sitotoksik. Nanopartikel PLGA memiliki kemampuan khusus untuk mencapai jalur MHC I setelah internalisasi oleh sel dendritik (DC).^[26]

Pada penelitian Santos S.A *et al.*^[8] vaksin DNA hsp65+KLK dienkapsulasi dalam nanopartikel *biodegradable* PLGA dengan teknik emulsi ganda dan penguapan pelarut. Secara singkat, 20 ml larutan diklorometana yang mengandung 200 mg polimer PLGA 50:50 diemulsi dengan 0,2 ml fase encer inner yang mengandung 3 mg rHsp65 yang digabungkan dengan 2 mg adjuvan KLK. Homogenizer T25 Ultraturax

digunakan untuk menghasilkan emulsi primer *water-in-oil*. Emulsi ini kemudian dicampur dengan 100 ml fase encer eksternal yang mengandung 3% poli-(vinil alkohol) Mowiol 40-88 sebagai surfaktan untuk membentuk emulsi *water-in-oil-in-water* yang stabil. Emulsi diaduk selama 6 jam dengan homogenizer eurostar agar terjadi penguapan pelarut. Nanopartikel dikumpulkan dengan sentrifugasi dan dicuci tiga kali dengan air steril, dibekukan dan disimpan pada suhu 4°C.^[8]

Tabel 3. Karakterisasi Nanopartikel (MS) / Nanopartikel.^[8]

Formulasi	Encapsulation rate (µg/mg)	Diameter rata-rata (µm)	Kadar endotoksin (UE/mg)
MS-empty	-	4,78	0,111
MS-rhsp65	1	3,89	0,304
MS-rhsp65+KLK	0,97	7,07	0,300

Dalam penelitian Santos S. A *et al.*,^[8] vaksin DNA hsp65+KLK dirancang memiliki diameter kurang dari 10 µm untuk memungkinkan pengambilan oleh APC. Kombinasi KLK dengan rhsp65 dalam nanopartikel PLGA memberikan ukuran partikel terbesar. Formulasi nanopartikel PLGA juga diuji untuk aktivitas endotoksin menggunakan uji *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). Nanopartikel PLGA disuspensikan kembali dalam *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan suspensi vortex sampai homogenisasi lengkap. Dan hasilnya menunjukkan bahwa konsentrasi endotoksin kurang dari 0,4 EU/mg dalam semua formulasi nanopartikel. Menurut European Pharmacopoeia, tingkat keamanan untuk pemberian endovena adalah 5 EU/kg/jam, setara dengan 0,1 EU per mouse (20 g) per jam. Dengan demikian, hewan yang diimunisasi dengan 5 mg setiap formulasi menerima kurang dari 2 EU endotoksin yang dilepaskan selama degradasi nanopartikel dengan pelepasan protein melalui desorpsi dan difusi. Profil rilis *in vitro* rhsp65 yang dienkapsulasi dalam nanopartikel PLGA dievaluasi selama lebih dari 30 hari. Sebagian besar protein yang terperangkap dilepaskan lebih awal: 20% di hari pertama, sekitar 40% di hari kedua dan sisa protein dilepaskan

secara menurun hingga 30 hari. Oleh karena itu, kadar endotoksin yang dilepaskan selama degradasi nanopartikel berada pada tingkat kisaran yang direkomendasikan untuk semua formulasi yang digunakan untuk imunisasi.^[8]

Pada penelitian Santos S.A *et al.*,^[8] tikus BALB/c dewasa muda menerima injeksi intramuskular tunggal 2,5 mg dari salah satu nanopartikel berbeda yang mengandung rhsp65 saja (MS-hsp65) atau dalam kombinasi dengan KLK (MS-rhsp65 + KLK) pada 50 µL saline di setiap paha depan. Kelompok hewan kontrol tambahan menerima nanopartikel kosong (MS), kemudian tikus diberikan 10⁵ CFU *M. tuberculosis* H37Rv melalui rute intratrakea. Hasil dari analisis statistik yang ditentukan oleh analisis satu arah dari uji varians dan post test Dunnett menunjukkan hasil yang signifikan yaitu $p < 0,05$, yang berarti formulasi vaksin DNA hsp65 + KLK terenkapsulasi PLGA menginduksi respon tipe Th1 dan produksi IL-10 tertinggi di antara vaksin lain yang diuji dan tikus dari kelompok ini menunjukkan penurunan jumlah CFU yang signifikan dan kerusakan parenkim paru minimal setelah diinfeksi *M. tuberculosis*.^[8]

4. KESIMPULAN

Kombinasi vaksin DNA hsp65 dan KLK dapat memicu respons imun spesifik terhadap bakteri MTB. Vaksin DNA hsp65 dapat memicu produksi sitokin, seperti IFN- γ dan IL-2, yang berperan penting dalam aktivasi dan proliferasi sel T CD4+ sebagai respons imun terhadap MTB. Selain itu, aktivitas sel T CD4+ dan CD8+ juga meningkat setelah diberi vaksin DNA hsp65. Peningkatan produksi IFN- γ , IL-2, sel T CD4+ dan CD8+ pada vaksin hsp65 lebih tinggi dibandingkan dengan BCG. Selain berfungsi untuk mencegah penyakit TBC, vaksin hsp65 juga dapat berfungsi sebagai terapi kuratif terhadap penyakit TBC. Terjadi penurunan signifikan kadar bakteri MTB pada tikus yang diinjeksi dengan vaksin hsp65 dibandingkan dengan vaksin BCG.

Untuk memaksimalkan efikasi vaksin DNA hsp65 dibutuhkan tambahan adjuvant. KLK memberikan solusi bagi keterbatasan tersebut.

Histopatologis paru yang diambil dari tikus yang telah divaksin dan telah terinfeksi dengan *M. tuberculosis* menunjukkan bahwa hanya tikus yang mendapat vaksin hsp65 + KLK yang terlindungi dari infeksi *M. tuberculosis*. Kerusakan paru dan area inflamasi paling sedikit juga ditemukan pada kelompok dengan pemberian vaksinasi hsp65 + KLK. Selain itu, formulasi vaksin hsp65 + KLK dapat memicu respon Th1 dan produksi IL-10 tertinggi diantara vaksin lain yang diuji.

Kebutuhan untuk meningkatkan efisiensi vaksin DNA hsp65+KLK dengan cara menurunkan dosisnya menjadi dosis tunggal dilakukan dengan menggunakan nanopartikel *biodegradable Poly (lactic-co-glycolic acid)* (PLGA) sebagai sistem pembawa antigen. PLGA disetujui oleh FDA dan EMA dalam berbagai sistem pengiriman obat pada manusia sehingga dapat digunakan lebih lanjut pada penelitian klinis untuk terapi preventif dan kuratif baru di masa depan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenkes RI. *Infodatin Tuberculosis Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*. 2018
<<https://pusdatin.kemkes.go.id/article/view/18101500001/infodatin-tuberculosis-2018.html>>
2. WHO. *Bending The Curve Ending TBC*. World Health Organization Regional Office for South-east Asia. 2016
<<https://apps.who.int/iris/handle/10665/258693>>
3. Prasad R, Srivastava DK. *Multi drug and extensively drug-resistant TBC (M/XDR-TBC) management: Current issues*. *Clin Epidemiol Glob Health*. 2013;1(3), 124–8
4. WHO. *Global Tuberculosis Report 2015*. Geneva. 2015
<<https://apps.who.int/iris/handle/10665/191102>>
5. Surbakti, C. A., Novitawati, S., & Billy, M. *Inovasi Vaksin DNA Heat Shock Protein 65 (hsp65) dengan Ubiquitin Terenkapsulasi Nanopartikel PLGA sebagai Terapi Preventif dan Kuratif*

- Tuberculosis. Cermin Dunia Kedokteran*, 2016; 43(3), 230-34.
6. Riani, R. E. S., & Machmud, P. B. *Kasus Kontrol Hubungan Imunisasi BCG dengan kejadian TBC Paru pada anak tahun 2015-2016*. *Sari Pediatri*, 2018;19(6), 321-27.
 7. Barreto ML, Pereira SM, Pilger D, Cruz AA, Cunha SS, Sant'Anna et al. *Evidence of an effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: second report of the BCG-REVAC cluster-randomised trial*. *Vaccine* 2011; 29, 4875-7.
 8. Santos S.A et al. A subunit vaccine based on biodegradable microspheres carrying rHsp65 protein and KLK protects BALB/c mice against tuberculosis infection. *Human Vaccines*. 2010; 6 (12), 1047-53.
 9. Zufferey C, Germano S, Dutta B, Ritz N, Curtis N. *The contribution of non-conventional T cells and NK cells in the mycobacterial-specific IFN γ response in bacille calmette-guerin (BCG)-immunized infants*. *PLOSOne*. 2013; 8(10).
 10. Changhong S, Hai Z, Limei W, Jiaze A, Li X, Tingfen Z, et al. *Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of Mycobacterium tuberculosis and the human interleukin 2 fusion gene*. *Tuberculosis*. 2009; 89(1), 54–61.
 11. Hirota K, Hasegawa T, Nakajima T, Inagawa H, Kohchi C, Soma G-I, et al. *Delivery of rifampicin-PLGA microspheres into alveolar macrophages is promising for treatment of tuberculosis*. *J Controlled Release*. 2010; 142(3), 339–46.
 12. Kalluru R, Fenaroli F, Westmoreland D, Ulanova L, Maleki A, Roos N, et al. *Poly(lactide-co-glycolide)-rifampicin nanoparticles efficiently clear Mycobacterium bovis BCG infection in macrophages and remain membrane-bound in phagolysosomes*. *J Cell Sci*. 2013; 126(14), 3043–54.
 13. Wowk, P. F., Franco, L. H., Fonseca, D. M. D., Paula, M. O., Vianna, É. D. S. O., Wendling, A. P., & Vinhas, S. A. *Mycobacterial Hsp65 antigen upregulates the cellular immune response of healthy individuals compared with tuberculosis patients*. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 2017; 13(5), 1040-50.
 14. Stefanini AC, da Cunha BR, Henrique T, Tajara EH. *Involvement of Kallikrein-Related Peptidases in Normal and Pathologic Processes*. *Dis Markers*. 2015;946572. doi:10.1155/2015/946572
 15. Chikh G, Luu R, Patel S, Davis HL, Weeratna RD. *Effects of KLK Peptide on Adjuvanticity of Different ODN Sequences*. *Vaccines (Basel)*. 2016; 4(2), 14. doi:10.3390/vaccines4020014
 16. H. Hillaireau, P. Couvreur. *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*. *Cell. Mol. Life Sci*. 2009; 66, 2873–2896
 17. A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2010; 75, 1–18.
 18. Danhier et al. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications*. *Journal of Controlled Release*. 2012; 161, 505–522
 19. J.K. Vasir, V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics*. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2010; 59, 718–728.
 20. S. Acharya, S.K. Sahoo, *PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect*, *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2011; 63, 170–183
 21. C. Clawson, C.T. Huang, D. Futalan, D.M. Seible, R. Saenz, M. Larsson, W. Ma, B. Minev, F. Zhang, M. Ozkan, C. Ozkan, S. Esener, D. Messmer, *Delivery of a peptide via poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles enhances its dendritic cell stimulatory capacity*. *Nanomedicine*. 2010; 6, 651–661.
 22. J. Tian, J. Yu, *Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) against lymphocystis disease virus*. *Fish*

- Shellfish Immunol. 2011; 30, 109–117.
23. B. Slutter, S. Bal, C. Keijzer, R. Mallants, N. Hagenaars, I. Que, E. Kaijzel, W. van Eden, P. Augustijns, C. Lowik, J. Bouwstra, F. Broere, W. Jiskoot, *Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen*. Vaccine. 2010; 28, 6282–6291
 24. C. Clawson, C.T. Huang, D. Futalan, D.M. Seible, R. Saenz, M. Larsson, W. Ma, B. Minev, F. Zhang, M. Ozkan, C. Ozkan, S. Esener, D. Messmer, *Delivery of a peptide via poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles enhances its dendritic cell stimulatory capacity*. Nanomedicine. 2010; 6, 651–661.
 25. R. Brunner, E. Jensen-Jarolim, I. Pali-Scholl, *The ABC of clinical and experimental adjuvants—a brief overview*. Immunol. Lett. 2010; 128, 29–35.
 26. R. Arens, S.P. Schoenberger, *Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation*. Immunol. Rev. 2010; 235, 190–205.