

**113. Biologi (dan Bioteknologi Umum)
Pengembangan Teknologi Kesehatan dan
Obat**

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**



**ISOLASI, KARAKTERISASI DAN PRODUKSI
PROTEIN REKOMBINAN *Mycobacterium tuberculosis*
ISOLAT MAKASSAR SEBAGAI ANTIGEN
IMUNODIAGNOTIK TUBERKULOSIS LATEN**

**Dr. Rosana Agus M.Si / NIDN 0005096502
Prof. Dr. Mochammad Hatta, Ph.D, SpMK (K) NIDN 0014045703
Dr. Sjafaraenan M.Si/ NIDN 0018065804**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN
NOPEMBER 2019**

**HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**

Judul Penelitian : Isolasi, karakterisasi dan produksi protein rekombinan *Mycobacterium tuberculosis* isolat Makassar sebagai antigen imunodiagnostik tuberculosis laten

Kode>Nama Rumpun Ilmu : 113/ Biologi (dan Bioteknologi Umum)

Bidang Unggulan Perguruan Tinggi : Pengembangan Teknologi Kesehatan dan Obat

Topik Unggulan : Kit Diagnostik

Ketua Peneliti

A. Nama Lengkap : Dr. Rosana Agus M.Si P

B. NIDN : 0005096502

C. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala

D. Program Studi : Biologi

E. Nomor HP : 08124136912

F. Surel (e-mail) : rosanagus65@gmail.com

Anggota Peneliti (1)

A. Nama Lengkap : Prof. Dr. Mochammad Hatta, Ph.D, SpMK (K)

B. NIDN : 0014045703

C. Perguruan Tinggi : Universitas Hasanuddin

Anggota Peneliti (2)

A. Nama Lengkap : Dr. Sjafaraenan M.Si

B. NIDN : 0018065804

C. Perguruan Tinggi : Universitas Hasanuddin

Lama Penelitian Keseluruhan : 2 Tahun

Penelitian Tahun ke : 2

Biaya Tahun Berjalan

- Diusulkan ke DIKTI : Rp 195.000.000,-
- Disetujui : Rp 189.000.000,-

Makassar, 12 Nopember 2019

Mengetahui
Dekan Fak.MIPA UNHAS

Ketua Peneliti



Dr. Eng. Amiruddin
NIP. 19720515 199702 1 002

Dr. Rosana Agus, M.Si
NIP. 19650905 199103 2 003

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Di negara berkembang seperti Indonesia, diagnostik tuberkulosis dilakukan secara mikroskopik pada sputum untuk melihat keberadaan dan jumlah basil tahan asam (BTA) dan secara radiologi. Namun tantangan utama dalam pengendalian TB adalah diagnosis dan penatalaksanaan infeksi TB laten. Menurut Flynn and Chan, 2001 bahwa penduduk dengan TB laten, sekitar 5-10% diantaranya akan menjadi TB aktif. Deteksi infeksi TB laten tidak memiliki standar baku, namun saat ini dilakukan dengan uji *tuberculin skin test* (TST) (Menzies *et al.*, 2007).

Prinsip uji tuberkulin adalah timbulnya hipersensitivitas pada seseorang yang terinfeksi *M. tuberculosis* terhadap komponen tuberkulin dari bakteri tersebut yaitu *purified protein derivative* (PPD). Uji tersebut dilakukan dengan menyuntikan 0,1 ml (5 tuberkulin unit) PPD secara intrakutan. Hasil dapat dilihat 48-72 jam setelah penyuntikan dengan mengamati ada atau tidaknya indurasi pada kulit dengan mengukur diameter indurasi (Jasmer *et al.*, 2002).

PPD mengandung 200 antigen mikobakteri, antara lain *M.tuberculosis* kompleks (*M. tuberculosis*, *M. bovis* dan *M.africanum*), mikobakteri bukan tuberkulosa (NTM) dan *M. bovis* BCG (Pinxteren *et.al*, 2000). Akibatnya uji tuberkulin mempunyai beberapa keterbatasan yaitu terjadi reaksi positif palsu karena adanya reaksi silang antara PPD dan antibodi yang dihasilkan oleh vaksinasi BCG atau infeksi dengan mikobakteria bukan TB (Diel *et al.*, 2009).

Adanya keterbatasan dari uji TST, maka saat ini penelitian diarahkan untuk menemukan antigen spesifik yang akan digunakan sebagai imunodiagnostik maupun sebagai vaksin TB. Salah satu antigen yang banyak diteliti untuk pengembangan kit diagnostik TB dan kandidat vaksin TB adalah *Early secreted antigenic target- 6 kDa* (ESAT-6) dan *Culture Filtrate Protein- 10* (CFP

10) Kedua antigen ini dikode oleh gen yang terletak dalam wilayah perbedaan 1 (RD 1 = *Region of Difference*) dari genom *M. tuberculosis*, dan tidak terdapat dalam *M. tuberculosis* galur BCG (Majlessi L, *et al.*, 2005).

Walaupun ESAT-6 dan CFP-10 merupakan antigen sel T yang berpotensi sebagai diagnostik, namun dikenali oleh populasi yang heterogen. Hal ini didukung oleh penelitian yang meneliti respon sel T manusia terhadap ESAT-6 pada pasien TB dari wilayah berbeda yaitu Denmark dan Ethiopia. Kesimpulan dari penelitian ini bahwa ESAT-6 dikenali oleh penderita TB dari wilayah geografi berbeda. Hal ini disebabkan karena pengenalan daerah spesifisitas epitope ESAT-6 dipengaruhi oleh ekspresi molekul *Human Leukocyte Antigen (HLA)* yang berbeda pada setiap populasi (Ravn *et al.*, 1999).

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa uji sensitivitas dan spesifisitas dari *Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)* dari penderita TB dalam mengenali antigen ESAT-6 dan CFP-10 dari setiap negara berbeda. Hal ini berarti bahwa pencarian antigen yang spesifik untuk pengembangan reagen diagnostik TB masih sangat diperlukan. Terutama ketersediaan reagen diagnostik TB yang dapat mengidentifikasi individu terinfeksi baru dan laten dengan resiko tinggi untuk berkembang menjadi tuberkulosis aktif.

Beberapa protein rekombinan yang peneliti telah diperoleh adalah ESAT-6 dan 38 kDa untuk diagnostik TB dan protein chaperonin 60-1, protein PPE 41 (Rv 2430c) dan PPE 17 (Rv 1168c) untuk vaksin TB. Pada penelitian ini akan dilakukan pencarian antigen spesifik yang imunodominan untuk TB laten dengan mengisolasi dan mengkarakterisasi protein dari isolat *M.tuberculosis* asal Makassar. Diharapkan dalam penelitian ini akan diperoleh protein rekombinan yang spesifik untuk diagnostik TB laten.

Tujuan

1. Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi protein rekombinan *Mycobacterium tuberculosis* asal Makassar sebagai antigen imunodiagnostik TB

2. Tujuan khusus

- kloning gen pengkode protein pada vektor ekspresi
- karakterisasi klon rekombinan
- produksi protein rekombinan target
- pemurnian protein rekombinan target
- uji imunoreaktivitas dengan serum penderita TB dan sehat

BAB III

TINJAUAN PUSTAKA

III.1 Tuberkulosis Laten

Tuberkulosis (TB) adalah suatu penyakit infeksi menular yang disebabkan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang dapat menyerang organ, terutama paru-paru. Penyakit ini bila tidak diobati atau pengobatannya tidak tuntas dapat menimbulkan komplikasi berbahaya hingga kematian (Kemenkes RI, 2015).

Semakin sulitnya penanganan TB disebabkan oleh munculnya strain *M. tuberculosis* yang resisten terhadap obat TB atau *multi-drug resistant M. tuberculosis* (MDR-TB). Strain ini diketahui resisten terhadap dua antibiotik utama yang sering digunakan yaitu isoniazid dan rifampisin. Lebih jauh lagi ditemukan strain *M. tuberculosis* yang menunjukkan resistensi terhadap lebih banyak obat TB atau *Extensively drug resistant Mycobacterium tuberculosis* (XDR-TB). Selain resisten terhadap isoniazid and rifampicin, strain ini juga resisten terhadap fluoroquinolone dan obat injeksi seperti kanamisin, capreomicin atau amikacin (WHO, 2012).

Tantangan utama dalam pengendalian TB adalah diagnosis dan penatalaksanaan infeksi TB laten. Penduduk dengan TB laten, 5-10% diantaranya akan menjadi TB aktif (Flynn and Chan, 2001). Deteksi infeksi TB laten tidak memiliki standar baku, namun saat ini dilakukan dengan uji *tuberculin skin test* (TST) (Menzies *et al.*, 2007).

Prinsip uji tuberkulin adalah timbulnya hipersensitivitas pada seseorang yang terinfeksi *M. tuberculosis* terhadap komponen tuberkulin dari bakteri tersebut yaitu *purified protein derivative* (PPD). Uji tersebut dilakukan dengan menyuntikan 0,1 ml (5 tuberkulin unit) PPD secara

intrakutan. Hasil dapat dilihat 48-72 jam setelah penyuntikan dengan mengamati ada atau tidaknya indurasi pada kulit dengan mengukur diameter indurasi (Jasmer *et al.*, 2002).

PPD mengandung banyak antigen mikobakteri, antara lain *M.tuberculosis* kompleks (*M. tuberculosis*, *M. bovis* dan *M.africanum*), mikobakteri bukan tuberkulosa (NTM) dan *M. bovis* BCG (Pinxteren *et.al*, 2000). Akibatnya uji tuberkulin mempunyai beberapa keterbatasan yaitu terjadi reaksi positif palsu karena adanya reaksi silang antara PPD dan antibodi yang dihasilkan oleh vaksinasi BCG atau infeksi dengan mikobakteria bukan TB (Diel *et al.*, 2009).

Adanya keterbatasan dari uji TST, maka saat ini penelitian diarahkan untuk menemukan antigen spesifik yang akan digunakan sebagai imunodiagnostik maupun sebagai vaksin TB.

Saat ini ada beberapa uji diagnostik TB laten komersil yang telah digunakan di berbagai negara yaitu uji *Interferon gamma release assays* (IGRAs). Diketahui ada 2 jenis uji IGRAs yaitu QuantiFERON (QFT)-TB Gold (Cellestis, Victoria, Australia) dan T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, United Kingdom) (Diel *et.al*, 2009). Uji QFT-TB Gold mendeteksi IFN- γ dari seluruh bagian darah secara *in-vitro* setelah diinkubasi dengan protein spesifik dari *M.tuberculosis* yaitu ESAT-6 dan CFP-10 (Mazurek *et al.*, 2009).

Walaupun ESAT-6 dan CFP-10 merupakan antigen sel T yang berpotensi sebagai diagnostik, namun dikenali oleh populasi yang heterogen (Shams *et al.*, 2004). Hal ini didukung oleh penelitian yang meneliti respon sel T manusia terhadap ESAT-6 pada pasien TB dari wilayah berbeda yaitu Denmark dan Ethiopia. Kesimpulan dari penelitian ini bahwa ESAT-6 dikenali oleh penderita TB dari wilayah geografi berbeda. Hal ini disebabkan karena pengenalan daerah spesifisitas epitope ESAT-6 dipengaruhi oleh ekspresi molekul *Human Leukocyte Antigen* (HLA) yang berbeda pada setiap populasi (Ravn *et al.*, 1999).

Beberapa hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa uji sensitivitas dan spesifisitas dari *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) dari penderita TB dalam mengenali antigen ESAT-6 dan CFP-10 dari setiap negara berbeda.

III.2 DIAGNOSIS TUBERKULOSIS PARU

Standar baku untuk mendiagnosa TB dapat dilakukan dengan kombinasi pemeriksaan klinis dan radiologi, investigasi epidemiologi, respon yang sesuai terhadap terapi anti tuberkulosis dan uji mikrobiologi (kultur dan bacilscopy) (Van-Lume, 2008). Berikut adalah tabel yang menjelaskan tentang kelebihan dan kekurangan dari setiap metode untuk mendiagnosis TB (Palomino *et al.*, 2007).

Tabel 2. Metode untuk diagnosis TB (Palomino *et al.*, 2007)

Metode	Kelebihan	Kekurangan
Pemeriksaan klinis	Diagnosis cepat	Tidak spesifik, tidak selalu tersedia
X-Ray	Dapat dibaca	Tidak spesifik
Mikroskopi (pemeriksaan BTA)	Diagnosis cepat	Sensitivitas rendah (2/3 TB paru negative, sulit mengumpulkan sampel
Kultur	Spesifik	Waktu lama (4-8 minggu)
PCR	Relatif cepat, sangat spesifik	Mahal, butuh keterampilan tinggi, peralatan mahal, dapat mendeteksi TB laten

Adanya keterbatasan dan waktu yang lama dalam menentukan diagnosis pasti TB paru, maka dibutuhkan alat diagnostik yang cepat dan mempunyai sensitivitas dan spesivisitas yang tinggi untuk memperbaiki metoda diagnostik yang konvensional. Beberapa teknik telah dikembangkan untuk mempermudah dalam mendiagnosis TB paru antara lain *polymerase chain reaction* (PCR), *becton dickinson diagnostic instrument system* (BACTEC), *restrictive fragment length polymorphism* (RFLP) dan uji serologik (Palomino *et al.*, 2007).

Uji serologik diperlukan apabila pasien tidak dapat menghasilkan sputum yang cukup untuk pemeriksaan, pewarnaan sputumnya negatif dan TB di luar paru. Uji serologik berdasarkan deteksi respons humoral, yaitu proses interaksi antara antigen dan antibodi yang digunakan secara *in vitro* untuk tujuan diagnostik.

Beberapa teknik pada uji serologik antara lain teknik Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), mycodot, uji peroksidase anti peroksidase (PAP) dan rapid test (immunochromatographic assay/ ICT), yang dikenal juga sebagai lateral-flow test atau simply strip tests (Palomino et.al, 2007).

Walaupun secara garis besar belum ada uji yang sempurna, tetapi penelitian uji serologik ini masih terus dibutuhkan untuk mendapatkan hasil yang lebih baik terhadap sensitivitas maupun spesivitasnya dalam mendiagnosis penyakit tuberkulosis paru secara cepat dan seefektif mungkin .

Syarat ideal uji serologik untuk TB adalah mampu membedakan respon antibodi karena infeksi alami atau karena vaksinasi, dapat dipakai untuk *case finding survey* dan memantau hasil terapi serta berguna untuk diagnosis TB di luar paru maupun dari mikobakterium lain. Tersedianya antigen dengan spesivitas tinggi serta reaksi silang yang minimal terhadap mikobakterium lain menunjukkan bahwa uji serodiagnostik tersebut baik.

BAB IV

METODE PENELITIAN

Penelitian sebelumnya telah diperoleh 3 macam kandidat protein yang diisolasi dari *M.tuberculosis* yang bersifat imunogenik. Protein tersebut adalah protein berukuran 11 kDa, 13 kDa dan 18 kDa. Adapun protein tersebut adalah MPT 63 yang dikode oleh Rv 1926, MTSP 11 yang dikode oleh Rv 3204 dan sMTL13 yang dikode oleh Rv 1419. Protein tersebut telah diisolasi gen pengkode masing-masing dan telah dikloning pada vektor kloning pGEM-T.

Tahapan selanjutnya adalah sub kloning gen pengkode protein tersebut pada vektor ekspresi, produksi dan pemurnian dari protein rekombinan tersebut.

Tahapan selanjutnya dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Subklon gen target ke vektor ekspresi pET-32b pada *E.coli* BL21 (DE3)

Klon rekombinan yang telah diuji kebenarannya, selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi yang sesuai. Hasil pemotongan dikarakterisasi menggunakan analisis elektroforesis gel agarosa. DNA sisipan dimurnikan dari gel agarosa dan diligasikan ke vektor ekspresi pET-32b yang telah dipotong dengan enzim restriksi yang sama. Hasil ligasi kemudian di transformasi ke *E.coli* BL21 (DE3), sehingga dihasilkan transforman *E.coli* BL 21 (DE3) yang mengandung plasmid rekombinan. Transforman diseleksi pada media yang mengandung ampisilin.

2. Karakterisasi klon rekombinan

Plasmid rekombinan yang diisolasi dari koloni yang resisten ampisilin, selanjutnya dikarakterisasi dengan metode karakterisasi plasmid, yaitu dengan PCR pada koloni putih dan plasmid rekombinan hasil isolasi dengan kit.

3. Overproduksi protein rekombinan

Overproduksi dilakukan menggunakan transforman *E.coli* BL21 (DE3) yang telah diuji kebenarannya. Selanjutnya transforman *E.coli* tersebut ditumbuhkan pada media cair dan diinduksi menggunakan IPTG. Sebagai control negative, dilakukan penumbuhan *E.coli* yang tidak diinduksi. Setelah diinduksi beberapa jam, sel kedua transforman *E.coli* tersebut dipecah menggunakan sonikator. Supernatan yang mengandung hasil overproduksi di sitoplasma, selanjutnya dianalisis dengan SDS-PAGE dan pewarnaan *Coomasie Blue*. Overproduksi dinyatakan berhasil bila terdapat pita protein tebal yang ukurannya sesuai dengan ukuran protein secara teoritis .

4. Pemurnian protein rekombinan

Pemurnian protein rekombinan dilakukan dengan kromatografi afinitas menggunakan kolom nikel. Protein yang merupakan hasil overekspresi, akan diikat pada kolom nikel melalui interaksi antara His(6) dan Ni²⁺. Selanjutnya kolom dicuci dengan larutan imidazole berkonsentrasi rendah untuk menghilangkan protein kontaminan yang terikat secara non spesifik pada kolom.

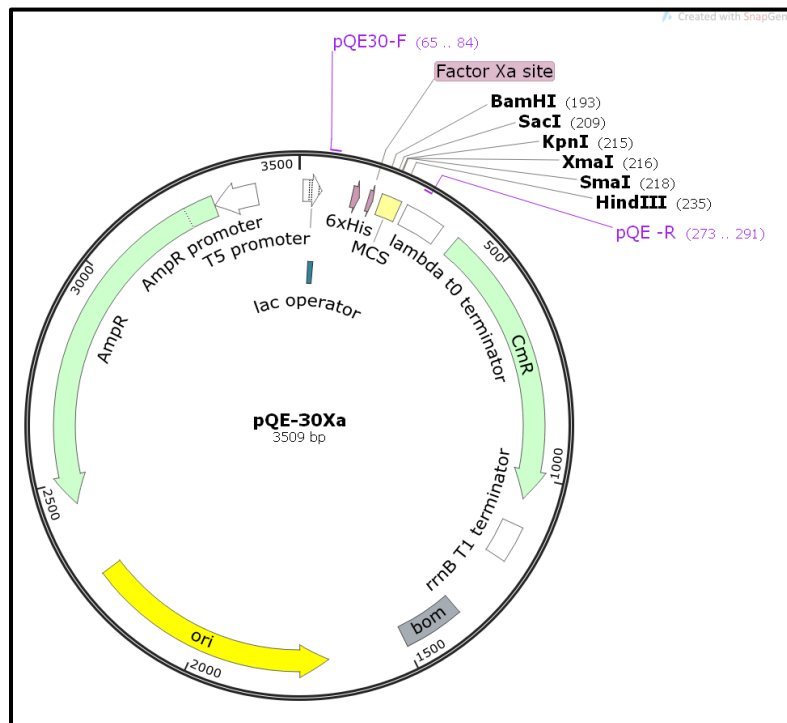
5. Uji imunoreaktivitas protein rekombinan dengan serum

Sebanyak 30 serum penderita TB aktif dan 30 serum orang sehat dikumpulkan dengan cara sentrifugasi darah vena cubiti sebanyak 3 cc. Serum ini akan digunakan sebagai antibodi primer pada uji Dot Blot.

HASIL DAN PEMBAHASAN

V.1. Subkloning target ke vektor ekspresi pET-32b pada *E.coli* BL21 (DE3)

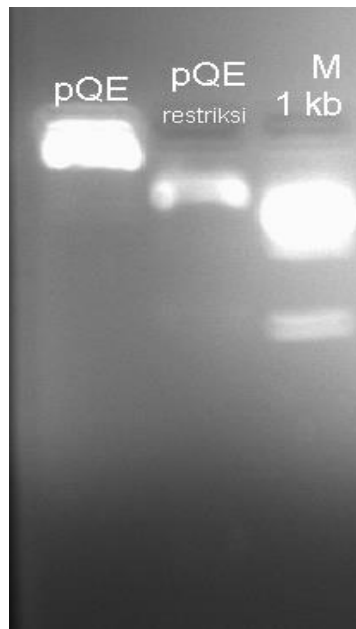
Vektor ekspresi yang digunakan adalah pQE-30 Xa seperti terlihat pada gambar 1. Pada gambar terlihat daerah MCS yaitu sisi pemotongan enzim restriksi. Pada penelitian ini digunakan enzim restriksi BamHI dan HindIII. Kedua daerah pengenalan enzim restriksi ini telah disisipkan pada primer spesifik yang digunakan.



Gambar 1. Peta vektor ekspresi pQE 30-Xa

Selanjutnya dilakukan pemotongan plasmid dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII seperti pada gambar 2. Plasmid yang terpotong akan tampak sebagai pita yang linier. Hasil pemotongan tersebut dapat dilihat pada gambar 2.

Pada gambar 2 terlihat vektor pQE sebelum dan sesudah dipotong enzim restriksi. Vektor yang sudah linier siap untuk disisipi DNA sisipan yaitu gen Rv 1419, Rv 1926c dan Rv 3204.



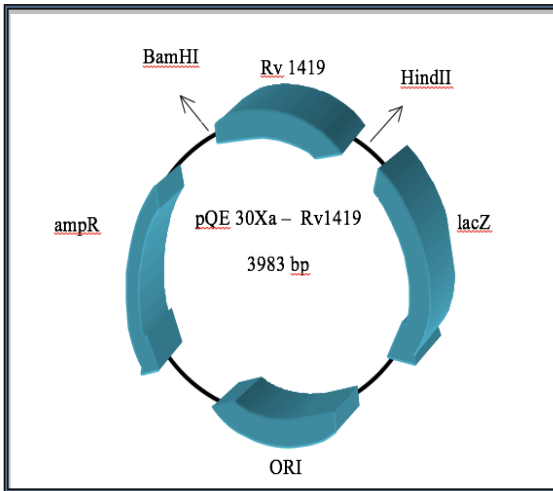
Gambar 2. Vektor ekspresi pQE-30Xa dipotong enzim restriksi

Ligasi bertujuan untuk menggabungkan DNA sisipan dengan vektor. Vektor ini dipilih selain karena memiliki syarat sebagai plasmid vektor yaitu memiliki origin replikasi, gen resistan terhadap antibiotik dan memiliki wilayah eksogen fragmen DNA untuk disisipi (Gambar 1). Hal lain adalah dapat mengekspresikan protein yang ditandai dengan 6xHis yang pada banyak kasus tidak akan mengganggu pemurnian protein baik struktur atau fungsinya seperti enzim,

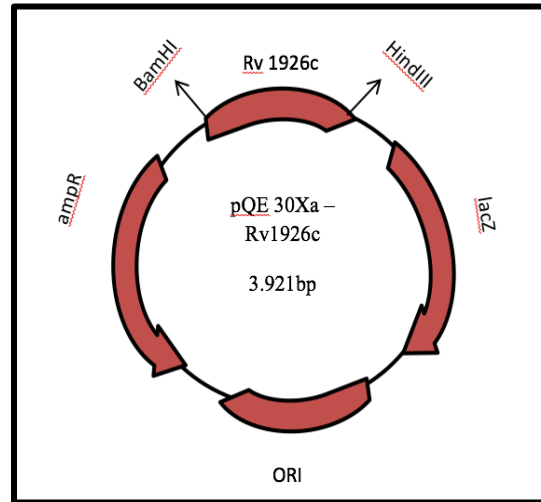
transkripsi dan vaksin. Ligasi dilakukan menggunakan enzim T4 DNA ligase. Enzim ini mengkatalisis menggabungkan dua strand DNA antara 5'-fosfat dan 3'-gugus hidroksil dari nukleotida yang berdekatan dengan kohesif-end ataupun blunt-end.

Perbandingan antara jumlah DNA sisipan dan plasmid pQE-30 Xa (vektor ekspresi) dibuat 3 : 2, untuk memperbesar peluang ligasi DNA sisipan ke vektor. Hasil ligasi dari 3 gen target ke

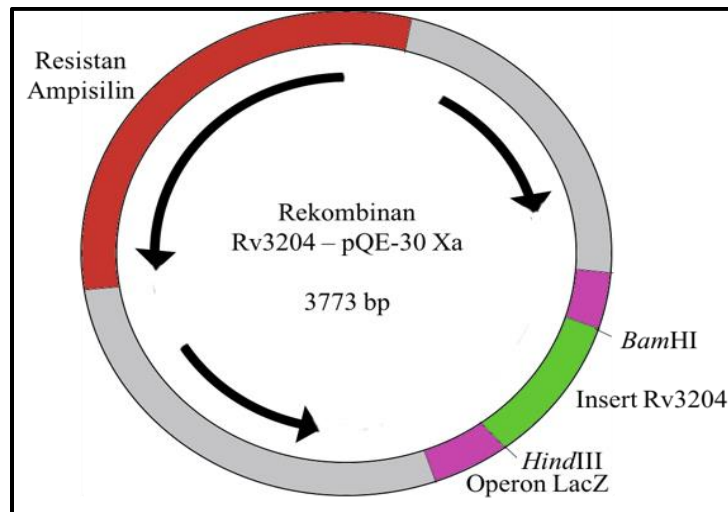
vektor ekspresi pET-32b akan dirancang seperti konstruksi plasmid rekombinan yang dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3.A



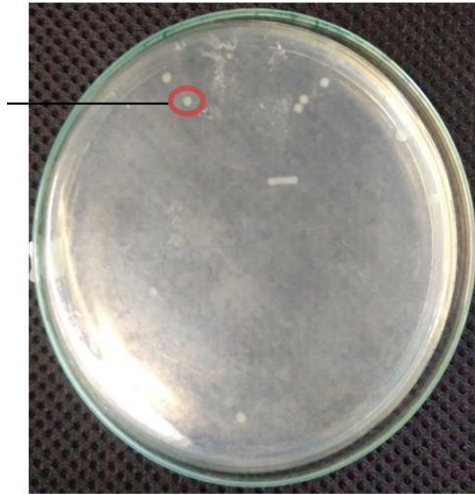
Gambar 3.B



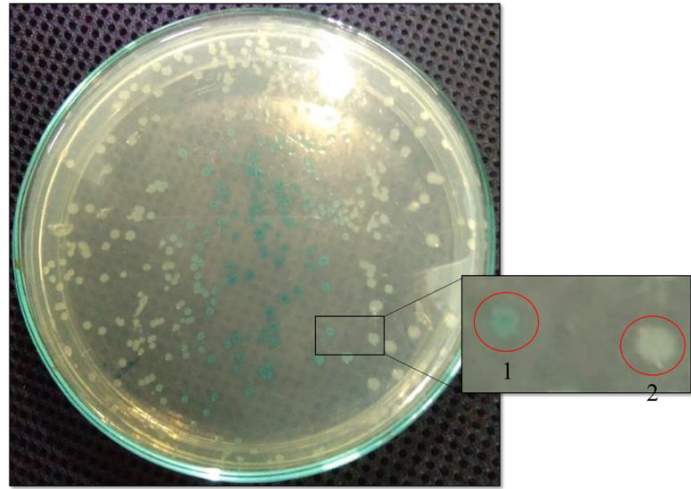
Gambar 3.C

Gambar 3A, 3B dan 3C. Konstruksi plasmid rekombinan

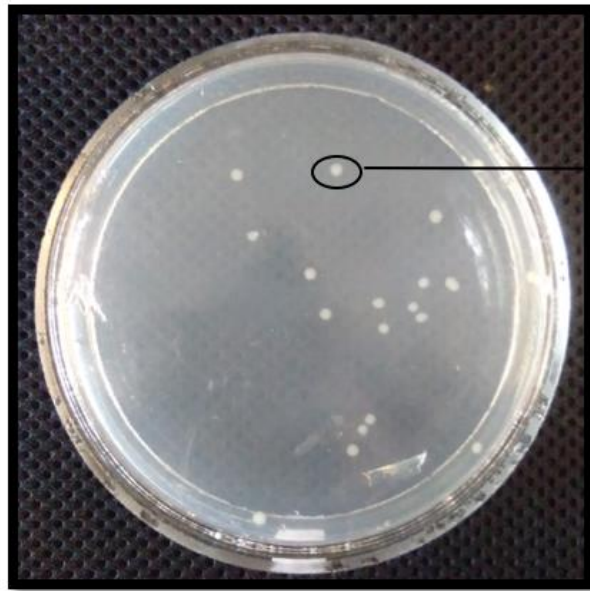
Pada gambar 3A, 3B dan 3C tampak lokasi gen target Rv 1926c, Rv 1419 dan Rv 3204 yang akan diligasi ke vektor ekspresi pQE 30 Xa. Selanjutnya dilakukan transformasi ke sel *E.coli* BI 21 yang telah dibuat kompeten. Hasil transformasi dari ketiga gen dapat dilihat pada gambar 4.



4.A



4.B



4.C

Gambar 4.A, 4.B dan 4.C. Transformasi plasmid rekombinan ke sel host *E.coli* BL 21

Hasil transformasi ini yang akan menghasilkan salinan yang banyak dari DNA rekombinan. Ada empat tahap penting dari transformasi, yaitu preparasi sel kompeten, transformasi, pemulihan dan plating. Secara normal, molekul DNA bersifat sangat hidrofilik sehingga tidak bisa melewati

membran sel bakteri. Oleh karena itu, bakteri yang digunakan harus bersifat kompeten. Pada penelitian ini, sel kompeten tersebut adalah sel *E. coli* yang diberi perlakuan secara kimia dengan penambahan CaCl_2 agar transformasi berlangsung efisien.

Perlakuan yang diberikan pada transformasi yaitu inkubasi pada suhu dingin lalu dikejutkan dengan panas $42\text{ }^\circ\text{C}$ (metode *heat shock*). Perlakuan ini akan secara kuat menciptakan depolarisasi membran sel juga dikarenakan adanya penambahan CaCl_2 . Potensial membran menjadi lebih negatif daripada di dalam sel sehingga mengizinkan DNA yang negatif melalui membran masuk ke dalam sel, dalam hal ini membran sel menjadi tidak permeabel. Bakteri diinkubasi kembali dalam es untuk pemulihan sebelum ditumbuhkan di media LB. Hasil transformasi diinokulasikan pada media Luria Bertani (LB) padat dengan yang telah diberi ampisilin, X-Gal dan IPTG. Hasil ini terlihat dengan terbentuknya koloni putih dan biru (Gambar 4).

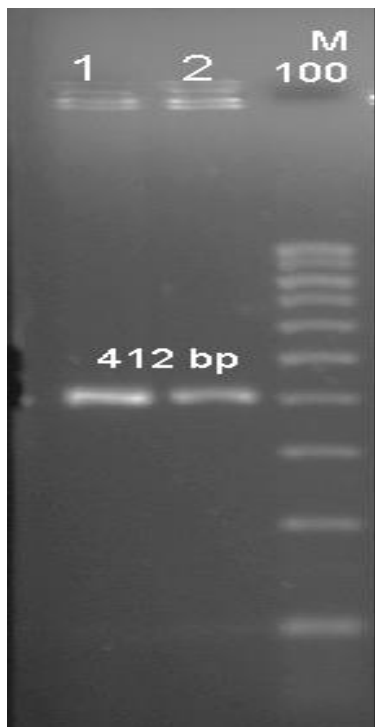
Fungsi ampisilin menjadikan LB sebagai media selektif yang hanya dapat ditumbuhi oleh bakteri berplasmid (transformasi berhasil), hal ini dikarenakan plasmid yang digunakan memiliki fragmen gen resistan ampisilin. X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactoside) adalah substrat kromogenik untuk β -galactosidase yang menghasilkan endapan biru setelah proses hidrolisis.

Penambahan X-Gal akan membuat 2 warna berbeda dari koloni yang tumbuh pada media LB. Walaupun semua koloni yang tumbuh memiliki plasmid, tapi akan berbeda warna koloni bakteri dengan plasmid rekombinan dan plasmid tidak rekombinan. Plasmid memiliki fragmen gen *lac-Z* untuk menyintesis enzim β -galactosidase yang menghidrolisis senyawa laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Sedangkan IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) merupakan analog kimiawi dari galaktosa yang tidak dapat dihidrolisis oleh enzim β -Galactosidase sehingga dapat menginduksi aktivitas operon *lac* *E. coli* melalui pengikatan dan penghambatan repressor

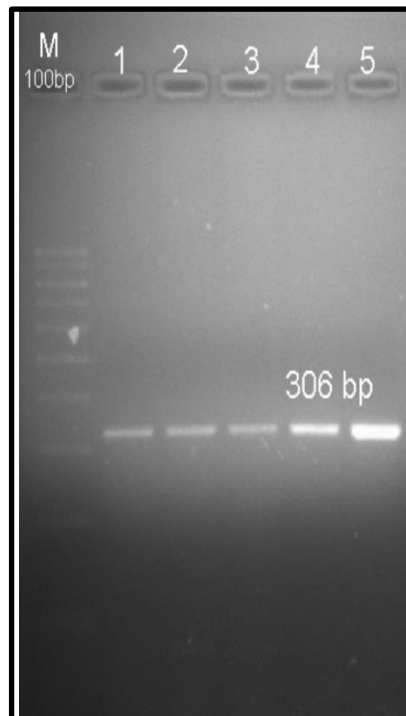
lac tanpa terdegradasi. Penambahan IPTG sebagai induser yang digunakan bersama X-gal untuk screening putih biru. Keberadaan X-gal akan dihidrolisis oleh enzim β -galactosidase menghasilkan endapan biru sehingga koloni menjadi biru. Namun, keberadaan DNA sisipan akan mengganggu gen lac-Z sehingga sintesis enzim β -galactosidase tidak terjadi dan koloni yang tumbuh berwarna putih.

V.2. Karakterisasi plasmid rekombinan

Karakterisasi plasmid rekombinan dilakukan dengan PCR pada koloni putih dan pada hasil isolasi plasmid rekombinan. Hasil karakterisasi dengan PCR koloni putih dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5A. PCR koloni Rv1926c -pQE30Xa



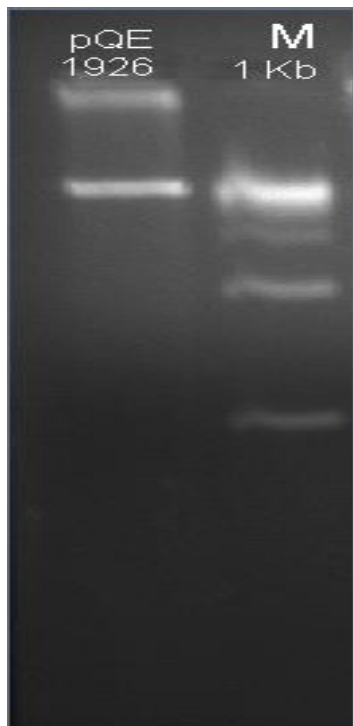
Gambar 5B. PCR koloni Rv 3204-pQE30Xa



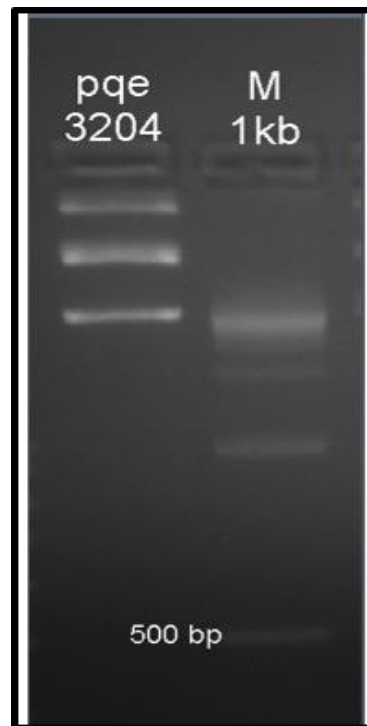
Gambar 5C. PCR koloni Rv 1419-pQE30Xa

Pada gambar 5 terlihat bahwa hasil PCR koloni putih dari plasmid rekombinan untuk ketiga gen diperoleh pita sesuai dengan yang diharapkan. Adapun ketiga gen target tersebut adalah Rv 1926c berukuran 412 bp, Rv 3204 berukuran 306 bp dan Rv 1419 berukuran 474 bp.

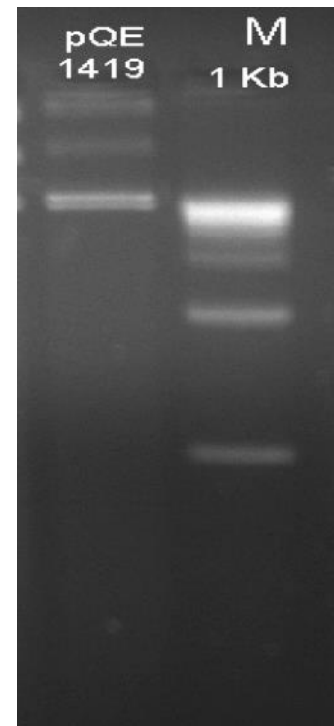
Karakterisasi klon rekombinan dilakukan pula dengan mengisolasi plasmid rekombinan untuk mengetahui adanya DNA sisipan pada vector ekspresi pQE 30 Xa. Hal ini dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6A. Plasmid rekombinan Rv 1926-pQE30Xa



Gambar 6 B. Plasmid rekombinan Rv3204-pOE30Xa



Gambar 6c. Plasmid rekombinan Rv 1419-pOE30Xa

Pada gambar 6 tampak hasil isolasi plasmid memperlihatkan empat band pada visualisasi elektroforesis. DNA supercoil adalah jenis DNA yang diharapkan. Band lainnya yaitu DNA sirkuler nicked yang berpindah paling lambat pada gel agarosa. Plasmid linear berpindah antara

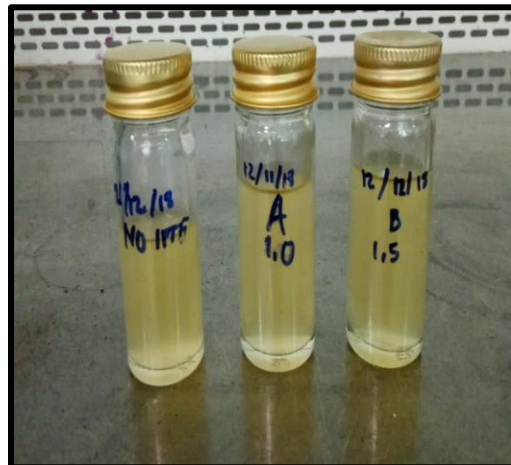
DNA sirkuler nicked dan DNA supercoil. Sedangkan plasmid single strand sirkuler berpindah paling depan daripada yang lain pada gel agarosa.

V.3. Overproduksi protein rekombinan

Penelitian ini dimulai dengan menumbuhkan *Escherichia coli* BL21 yang membawa plasmid rekombinan yang berwarna putih. Adanya koloni putih yang terbentuk merupakan bukti bahwa bakteri berhasil disisipkan gen dengan gen target. Koloni putih ditumbuhkan kedalam media LB (Luria Bertani) cair dengan penambahan ampisilin. Media LB merupakan media yang digunakan dalam peremajaan dan kultur *Escherichia coli*. Penambahan ampisilin berfungsi sebagai indikator pertumbuhan sel *Escherichia coli* BL21 yang membawa plasmid rekombinan, karena sel kompeten *Escherichia coli* yang tidak membawa vektor ekspresi tidak dapat tumbuh pada medium yang ditambahkan dengan ampisilin (Langden *et al.*, 2017). Tumbuhnya *Escherichia coli* BL21 pembawa plasmid rekombinan ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada media menjadi keruh dan terdapatnya beberapa substansi didalam media LB cair.



A



B

Gambar 7. Hasil kultur sel *E.coli* BL21 pembawa plasmid rekombinan pQE30 Xa –MPT63 (A)
Hasil kultur sel *E.coli* BL21 pembawa plasmid rekombinan pQE30 Xa – sMTL-13 (B)

Proses regulasi pada prokariot khususnya *Escherichia coli* BL21 membutuhkan induser untuk menginaktivasi repressor. Induser yang digunakan pada penelitian ini yaitu IPTG, karena IPTG lebih efektif dibandingkan dengan Laktosa, selain itu IPTG juga tidak dimetabolisme (Smith, 1994). Pada penelitian ini dilakukan penambahan IPTG (Gambar 7) dengan dua konsentrasi berbeda yakni 1,0 mM dan 1,5 mM untuk mengetahui konsentrasi IPTG yang mana yang paling efektif dalam produksi protein rekombinan MPT63 dan sMTL-13.

Produksi Protein rekombinan

Produksi protein rekombinan dimulai dengan memisahkan protein dari sumbernya melalui proses lisis sel. Lisis sel dilakukan dengan metode *freeze thaw* dan sonikasi. *Freeze thaw* adalah metode yang digunakan untuk menghancurkan dinding sel bakteri melalui beku cair atau permainan suhu, sedangkan sonikasi merupakan metode pemecahan sel yang memanfaatkan getaran dari gelombang suara dengan frekuensi tinggi (Thenawidjaja *et al.* 2017). Sebelum metode sonikasi dilakukan sampel terlebih dahulu ditambahkan PBS 1X. Larutan PBS berfungsi sebagai pelarut dari protein yang diperoleh selama proses sonikasi, sehingga protein yang diperoleh mudah untuk diekstraksi.

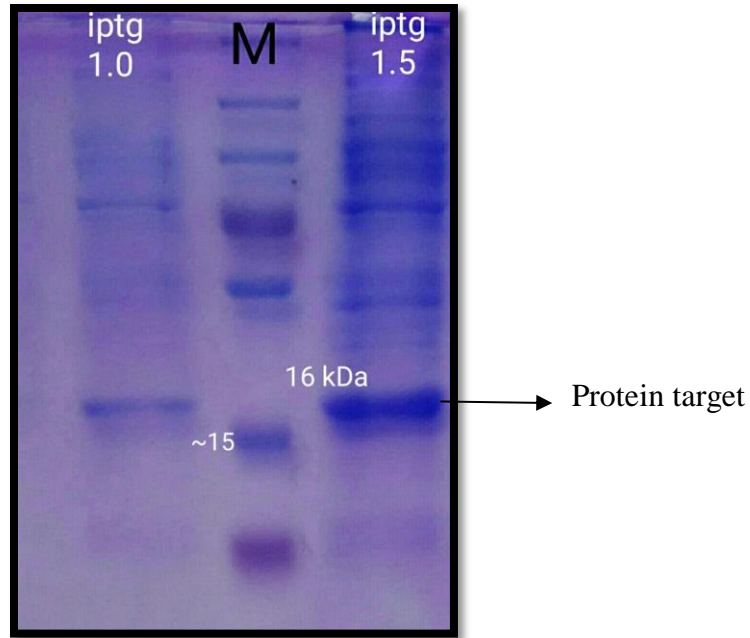
Sentrifugasi merupakan proses pemisahan partikel padat dari cairan dengan menggunakan prinsip gravitasi. Sentifugasi dilakukan pada penelitian ini untuk memisahkan protein rekombinan dan dinding sel bakteri atau endapan sel sebagai fraksi insoluble dan supernatan mengandung protein soluble. Supernatan yang mengandung protein soluble kemudian dielektroforesis menggunakan SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphete-polyacrilamide gel) yang merupakan elektroforesis khusus untuk protein.

Karakterisasi Protein target dengan SDS-PAGE

SDS-PAGE merupakan metode yang dapat diandalkan untuk menentukan berat molekul dari protein yang tidak diketahui, karena tingkat migrasi dari protein dilapisi dengan SDS berbanding terbalik dengan logaritma dari berat molekul. SDS-PAGE dapat digunakan tidak hanya untuk pemisahan dari berbagai protein, tetapi juga untuk membandingkan berat molekulnya. Analisis dengan SDS-PAGE ini, menggunakan gel poliakrilamid yang terdiri dari stacking gel dan separating gel. Stacking gel terdapat well yang berfungsi sebagai tempat meletakkan sampel sedangkan separating gel merupakan tempat protein akan bergerak ke arah anoda.

Hasil dari elektroforesis kemudian direndam dalam larutan staining (Commassie brilliant blue R-250). Commassie brilliant blue R-250 berfungsi memberikan warna biru pada gel hasil elektroforesis. Commassie brilliant blue R250 bermuatan negatif akan berikatan dengan protein yang bermuatan positif melalui gaya elektrostatis. Protein rekombinan MPT63 dengan induksi 16-18 jam (Gambar 8) memperlihatkan dengan jelas adanya pita protein dari sampel dengan penambahan IPTG 1,5 mM yang berwarna biru dengan berat molekul 16 kDa, sedangkan pada IPTG 1,0 mM warna serta berat molekul protein 16 kDa namun pita yang lebih tipis.

Dari percobaan Siromolot (2018) MPT63 memiliki massa 16 kDa, sehingga protein yang diproduksi dengan penambahan IPTG 1,5 mM tersebut merupakan protein rekombinan MPT63. Perbedaan hasil dari perlakuan penambahan IPTG membuktikan bahwa konsentrasi induser (IPTG) sangat menentukan optimasi ekspresi protein rekombinan, sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan IPTG dengan konsentrasi 1,5 mM merupakan konsentrasi yang sangat membantu dalam proses protein rekombinan MPT63.

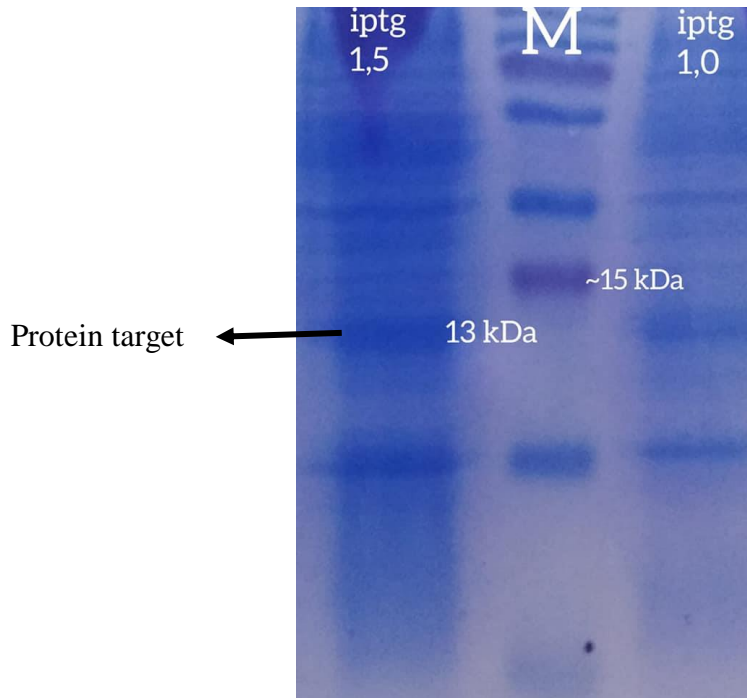


Gambar 8. Hasil SDS-PAGE protein MPT63.

Selanjutnya hasil penelitian pada Gambar 9 terlihat jelas adanya pita protein dari sampel penambahan IPTG (*isoprophyl- β -D-thiogalactopyranoside*) pada inkubasi *overnight* yang berwarna biru dan terlihat lebih tebal. Pita protein yang paling tebal terletak di antara pita marker protein berukuran 11 kDa dan 15 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa berat molekul protein rekombinan sMTL-13 adalah sekitar 13 kDa. Hal ini sesuai dengan penelitian Nogueira, *et al.* 2010 yang mengatakan *Mycobacterium tuberculosis* protein rekombinan sMTL-13 merupakan protein yang berukuran 13 kDa. Penelitian oleh Souza pada tahun 2012, protein yang dihasilkan dari Rv1419 dengan induksi 6 jam IPTG 1 mM memiliki berat molekul sekitar 13 kDa.

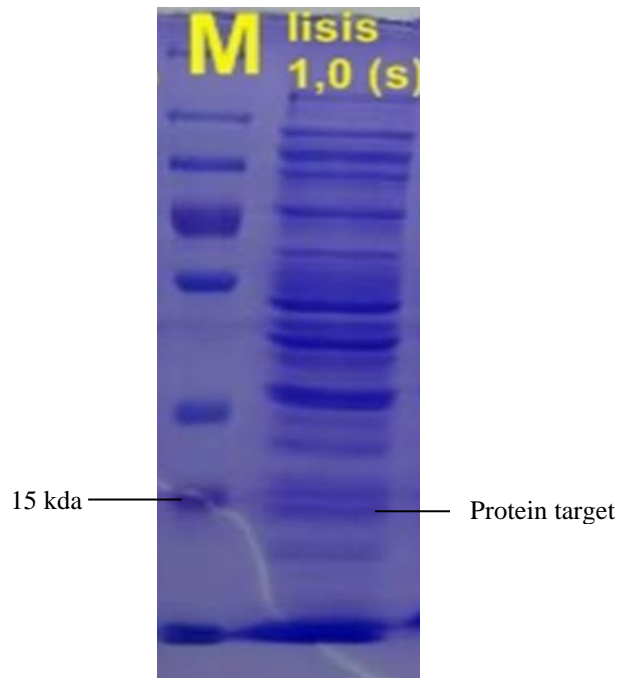
Hasil dari penelitian ini sama dengan penelitian yang menunjukkan peningkatan produksi protein rekombinan dipengaruhi oleh pertumbuhan sel ketika diinduksi dengan IPTG. Konsentrasi induser yang rendah menyebabkan ekspresi tidak optimum seiring dengan penambahan jumlah sel setiap satuan waktu sedangkan konsentrasi yang tinggi akan menyebabkan kematian sel.

Pada penelitian ini protein rekombinan sMTL-13 dari *Mycobacterium tuberculosis* pada bakteri *E.coli* BL21 berhasil diproduksi dengan berat molekul 13 kDa.



Gambar 9. Hasil SDS-PAGE protein sMTL-13

Selanjutnya dilakukan pula produksi protein rekombinan MTSP-11 dari *Mycobacterium tuberculosis* pada bakteri *E.coli* BL21 dengan berat molekul 11 kDa (gambar 10). Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ha Lim *et al*,2019. Penelitian yang dilakukan oleh Ha Lim *et al*. telah memperoleh protein baru pada *M.tuberculosis* yaitu MTSP 11 yang dikode oleh gen Rv 3204 dengan ukuran 11 kda.



Gambar 10. Hasil SDS-PAGE protein MTSP11

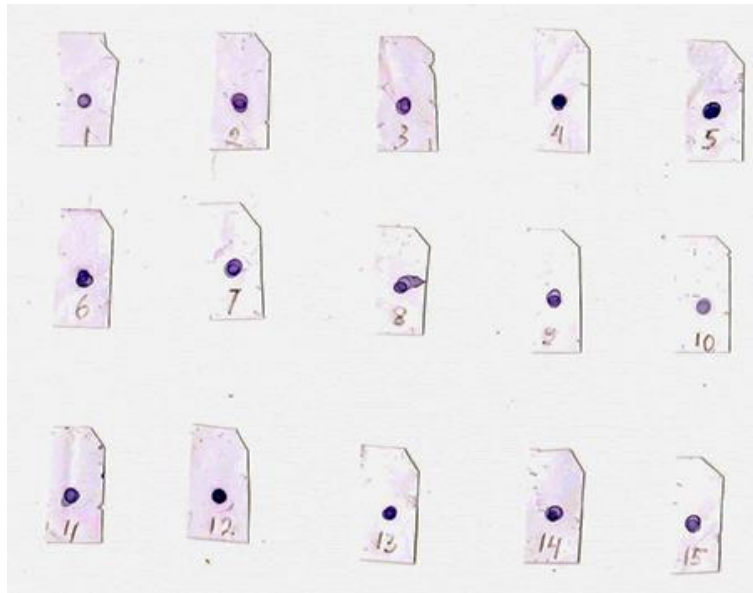
Uji imunoreaktivitas protein rekombinan dan serum

Uji reaktivitas protein rekombinan dengan serum penderita TB dan serum normal dilakukan dengan analisis dot blot. Dot blot merupakan teknik untuk mendeteksi, menganalisa dan mengidentifikasi protein. Metode ini serupa dengan Western blot, namun protein tidak dipisahkan dengan SDS-PAGE (Catalog No: IMI-KIT-10)

Protein yang akan diuji ditotolkan langsung ke membran nitroselulosa. Tahapan penting dari dot blot adalah tahap memblokir agar antibodi tidak menempel pada protein non spesifik. Biasanya pemblokiran dilakukan dengan menempatkan membran dalam susu skim atau bovine serum albumin. Selanjutnya membran direaksikan dengan antibodi primer yang spesifik untuk protein tertentu. Kemudian dilakukan pencucian yang bertujuan untuk membuang yang tidak berikatan dengan antibodi. Berikutnya adalah direaksikan dengan antibodi sekunder yang dikonjugasikan dengan enzim alkaline fosfatase. Keberadaan antibodi ditampakkan dengan warna reaksi enzim substrat pada tahap akhir. Sebagai substrat adalah BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-

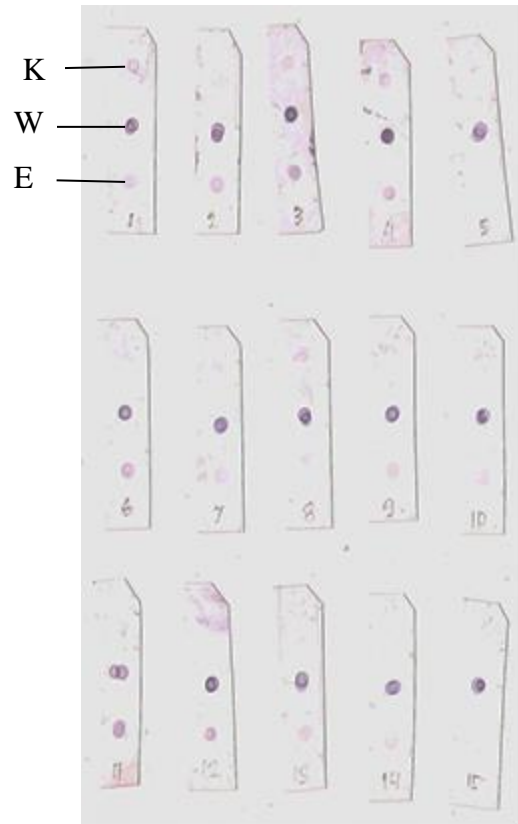
Indolyphosphate) yang akan dihidrolisis oleh alkaline fosfatase membentuk intermediate yang berwarna ungu. NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) akan direduksi menjadi NBT-formazan yang akan berwarna ungu apabila terdapat enzim.

Analisis dot blot dilakukan terhadap serum penderita TB, dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. Uji reaktivitas protein rekombinan MPT 63 dengan serum penderita TB aktif.

Pada gambar 11 terlihat bahwa reaksi antara protein rekombinan MPT 63 dengan serum penderita TB menunjukkan noktah yang lebih tebal dan lebih jelas. Hal ini disebabkan karena penderita TB aktif memiliki titer antibodi yang tinggi dibandingkan orang sehat. Jadi reaksi yang ditimbulkan antara antigen MPT 63 dan antibodi menghasilkan noktah lebih tebal.



Gambar 12. Uji reaktivitas protein rekombinan MPT 63 dengan serum normal
 Keterangan : K = kontrol negatif W = protein hasil pencucian
 E = protein hasil elusi

Dari gambar 12 tampak bahwa reaksi antara serum normal dengan kontrol negatif yang menggunakan dapar elusi, tidak menunjukkan adanya noktah. Hal ini disebabkan karena dalam dapar elusi tidak terdapat protein yang dapat dikenali oleh serum.

Pada reaksi antara serum orang sehat dengan protein hasil pencucian (W) menunjukkan noktah yang hampir sama tebalnya. Hal ini berarti bahwa protein tersebut belum murni sehingga dapat dikenali oleh serum.

Pada saat pencucian ditambahkan dapar LEW (Lysis-Equilibration-Wash) yang bertujuan untuk melisis, ekuilibrasi dan pencucian. Resin dicuci dengan dapar fosfat untuk menghilangkan protein tidak spesifik yang berinteraksi dengan ion nikel. Protein yang diperoleh dari tahap

pencucian dapat terdiri dari protein yang tidak spesifik yang tidak terikat pada kolom, sehingga pada waktu direaksikan dengan serum akan dikenali oleh antibodi menyebabkan noktah akan tampak lebih tebal.

Namun pada reaksi antara serum dan protein hasil elusi (E), menampakkan noktah yang berbeda-beda. Pada protein tahap elusi dilakukan dengan 250mM imidazole sehingga protein spesifik akan terlepas dari resin menyebabkan protein yang diperoleh lebih murni. Pada saat protein E direaksikan dengan serum normal, maka noktah akan tampak lebih tipis. Hal ini bergantung dari titer antibodi yang dihasilkan seseorang.

BAB V

KESIMPULAN

Pada penelitian ini telah berhasil dilakukan sub kloning gen target Rv 1419, Rv 1926c dan Rv 3204 ke vektor ekspresi pQE-30Xa dan produksi protein rekombinan MPT63 (16 kda) dan sMTL-13 (13 kda) dan MTSP 11 (11 kda). Uji reaksi protein rekombinan (MPT 63) dengan serum penderita TB aktif dan serum orang sehat dengan Dot blot menunjukkan bahwa serum penderita TB menampakkan noktah lebih jelas dan lebih terang dari serum orang sehat.

DAFTAR PUSTAKA

Catalog No: IMI-KIT-1003, User Manual Dot Blot Assay Teaching Kit, Imgenex India Pvt, Ltd

Diel R., Robert Loddenkemper, Karen Meywald-Walter, Rene Gottschalk, and Albert Nienhaus, 2009, Comparative Performance of Tuberculin Skin Test, QuantiFERON-TB-Gold In Tube Assay, and T-Spot.TB Test in contact Investigations for Tuberculosis, American College of C Chest Physicians, *Chest*, 135 :1010-1018

Ha Lim Jong, Kyung Shik Lee, HJ Kim and Ek Jo, 2019, Identification of the new T-cell-stimulating antigens from Mycobacterium tuberculosis culture filtrate, *FEMS Microbiology Letters*, 232 (1).

Jasmer R.M, Payam Nahid, and Philip C.Hopewell, 2002, Latent Tuberculosis Infection, *The New England Journal of Medicine*, Vol.347

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2015, Pengendalian TB di Indonesia Mendekati Target MDG (Millenium Development Goals)

Langden, S.S.S., Anto B., Wijanarka, dan Wien K., 2017. Transformasi dan Kloning Plasmid PJ804: 77539 pada Escherichia coli TOP'10. *Jurnal Biologi*. Vol. 6(1):65-70.

Majlessi, L, Priscille Brodin, Roland Brosch, Marie-Je'sus Rojas, Huot Khun, Michel Huerre, Stewart T. Cole, and Claude Leclerc, 2005, Influence of ESAT-6 Secretion System 1 (RD1) of *Mycobacterium tuberculosis* on the Interaction between Mycobacteria and the Host Immune System, *The Journal of Immunology*, 174: 3570–3579

Mazurek GH, Lobue PA, Daley CL, Bernardo J, Lardizabal AA, Bishai WR, 2001, Comparison of a whole-blood interferon g assay with tuberculin skin testing for detecting laten *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JAMA* 286:1740-7

Menzies D, Madhukar Pai, and George Comstock, Meta-analysis: New Tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: Areas of Uncertainty and Recommendations for Research, *Ann Intern Med*. 2007; 146 : 340-354

Nogueira L., Fernanda C. Cardoso, Ana M. Mattos, Juliano Bordignon, Cla'udia P. Figueiredo, Pedro Dahlstrom, Cristiane C. Frota, Cla'udia N. Duarte dos Santos, Marcelo Chalhoub, Benildo S. Cavada, Henrique C. Teixeira, Se'rgio C. Oliveira, Manoel Barral-Netto and Andre' Ba'fica, 2010, *Eur. J. Immunol*, 40: 744–753

Palomino, Leao, Ritacco, 2007, Tuberculosis from Basic Science to Patient Care, Bourcillier Kamps Pinxteren L.A.H, Pernille Ravn, Else Marie Agger, John Pollock and Peter Andersen, Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10, 2000, Clinical and Diagnostic Laboratory *Immunology*, Vol 7 No 2, p.155-160

Pinxteren L.A.H, Pernille Ravn, Else Marie Agger, John Pollock and Peter Andersen, Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10, 2000, Clinical and Diagnostic Laboratory *Immunology*, Vol 7 No 2, p.155-160

Ravn P., Abebech Demissie, Tewodros Eguale, Hailu Wondwosson, David Lein, Hanady A. Amoudy, Abu S. Mustafa, Axel Kok Jensen, Arne Holm, Ida Rosenkrands, Fredrik Oftung, Joseph Olobo, Fordham von Reyn, and Peter Andersen, 1999, Human T Cell Responses to the ESAT-6 Antigen from *Mycobacterium tuberculosis*, *The Journal of Infectious Diseases* 179:637–45

Siromolot, A.A. dan Denis V.K., 2018. Putative Target Cells of *Mycobacterium tuberculosis* Antigens MPT63 and MPT83. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*. Vol. 9(2):367-378.

Smith, A., 1994. *Gene Expression in Recombinans Microorganism*. CRC Press. Florida

Thenawidjaja, M., Wangsa T.I., dan Debbie S.R., 2017. *Protein Serial Biokimia Mudah dan Menggugah*. Gramedia Widiasarana. Jakarta.