

**UJI IMUNOREAKTIVITAS PROTEIN REKOMBINAN sMTL-13  
SEBAGAI BIOMARKER TUBERKULOSIS AKTIF**

**PRAMEGITA CAHYANI  
H411 16 004**



**DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2020**

HALAMAN PENGESAHAN  
UJI IMUNOREAKTIVITAS PROTEIN REKOMBINAN sMTL-13  
SEBAGAI BIOMARKER TUBERKULOSIS AKTIF

Disusun dan diajukan oleh:

PRAMEGITA CAHYANI

H411 16 004

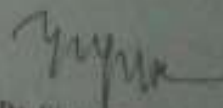
Disetujui oleh

Pembimbing Utama



Dr. Roscha Agus, M.Si  
NIP. 196509051991032003

Pembimbing Pertama



Dr. Sufarman, M.Si  
NIP. 195808161987032001

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur Atas Kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penulis akhirnya dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Uji Imunoreaktivitas Protein Rekombinan sMTL-13 sebagai Biomarker Tuberkulosis Aktif”** sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan karena menyadari segala keterbatasan yang ada. Untuk itu demi penyusunan yang lebih baik dari skripsi ini, penulis sangat membutuhkan dukungan dan sumbangsih pikiran yang berupa kritik dan saran yang bersifat membangun.

Selama proses perwujudan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan doa yang tulus untuk penulis. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan kepada pihak yang dengan penuh suka cita memberikan semangat, motivasi dan bantuan selama proses pencapaian gelar sarjana. Oleh sebab itu dengan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada keluarga terkhusus kepada kedua orang tua, Ibunda Wahira dan Ayahanda Andi Iswadi. Terima kasih atas dukungan yang telah diberikan kepada penulis baik moril maupun materil. Terima kasih untuk segala pengertian dan dukungan. Terima kasih karena selalu menjadi motivasi dan alasan utama penulis untuk segera menyelesaikan skripsi ini, semoga ini bisa membuat ayahanda dan ibunda bahagia dan bangga.

Kepada ibu Dr.Rosana Agus , M.Si. selaku pembimbing utama dan ibu Dr.Sjafaraenan, M.Si. selaku pembimbing pertama, penulis mengucapkan banyak

terimakasih atas bimbingan dan arahnya berupa kritik dan saran yang membangun dan memotivasi yang telah diberikan selama penulis melaksanakan proposal, penelitian, hingga ke tahap penyusunan skripsi ini. Terima kasih karena telah meluangkan waktu untuk terus memberi bimbingan dan arahan demi arahan yang sangat membantu hingga selesainya skripsi ini.

Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi. Kepada bapak Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si. selaku Wakil Dekan 3 yang banyak membantu mahasiswa dalam kegiatan organisasi kampus
2. Ibu Dr. Nur Haedar M.Si. selaku ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin serta selaku Pembimbing Akademik.
3. Bapak Drs. Munif S. Hassan,, M.S. selaku pembimbing akademik sekaligus penguji dan bapak Dody Priosambodo, S.Si., M. Si. selaku penguji sidang sarjana terima kasih atas segala saran dan ilmunya. Kepada seluruh dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses perkuliahan. Kepada staf pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis baik dalam menyelesaikan administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.
4. Seluruh analis HUM-RC beserta staff RS. Universitas Hasanuddin yan telah memberi bimbingan dan pengarahan selama proses penelitian

5. Adik-adik saya yang teramat saya sayangi dan cintai yaitu si kembar Iksan dan Irwan, Widya Astuti, Yusriana dan Wahyu yang selalu menjadi penyemangat saya setelah ibunda saya Wahira dan nenek saya Sitti Arfah.
6. Sahabat seperjuangan, khususnya kepada Sri Sulastriani, Sitti Hasmirawati Bashir, Nurhikmah dan Ian Immanuel Fidatami, terima kasih selalu mengingatkan, mendorong dan selalu menemani penulis hingga selesainya skripsi ini.
7. Atika sahabat saya yang selalu memberikan dorongan motivasi serta waktu sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
8. Teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2016; terima kasih atas kebersamaan, canda tawa, dukungan, motivasi, serta bantuan yang tidak dapat penulis jabarkan satu persatu.

Dengan ini saya mengucapkan terima kasih banyak untuk semua pihak yang terlibat, semoga kedepannya skripsi ini dapat berguna sebagai referensi tambahan bagi banyak orang

Makassar, Februari 2020

Penulis

## ABSTRAK

Penelitian ini berjudul “Uji Imunoreaktivitas Protein Rekombinan sMTL-13 sebagai Biomarker Tuberculosis Aktif”. Penelitian ini bertujuan mengetahui imunoreaktivitas protein rekombinan sMTL-13 terhadap serum penderita TB aktif dengan menggunakan metode Uji ELISA. Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Oktober 2019-Januari 2020 di Laboratorium *Hasanuddin Medical Research Center* (HUM-RC) Rumah Sakit Universitas Hasanuddin. Salah satu parameter protein rekombinan dapat dijadikan biomarker TB aktif adalah dapat mendeteksi serta menstimulasi produksi IFN gamma. Uji imunoreaktivitas dilakukan dengan mereaksikan serum penderita TB aktif dan serum sehat dengan protein rekombinan sMTL-13 kemudian mengukur konsentrasi IFN gamma melalui uji ELISA. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi IFN gamma pada sampel serum penderita TB aktif lebih tinggi yaitu 38,4 µg/ml dibandingkan dengan sampel serum sehat yaitu 37,5 µg/ml., perbedaan tersebut menunjukkan bahwa adanya pengaruh signifikan protein rekombinan terhadap kuman TB dan dapat dijadikan sebagai biomarker.

Kata Kunci: sMTL-13, Uji ELISA, IFN gamma, Biomarker.

ABSTRACT

The research is "The Immunoreactivity Test for Recombinant sMTL-13 Proteins as an Active Tuberculosis Biomarker". The aim of this study was to determine the immunoreactivity of the recombinant sMTL-13 protein against the serum of active TB patients using the ELISA Test method. This research was conducted in October 2019-January 2020 at the Hasanuddin Medical Research Center (HUM-RC) Laboratory of Hasanuddin University Hospital. One of the parameters of recombinant proteins that can be used as active TB biomarkers is to be able to detect and stimulate gamma IFN production. Immunoreactivity test is carried out by reacting serum of active TB patients and healthy serum with recombinant protein sMTL-13 and then measuring the concentration of gamma IFN through the ELISA test. The results showed that gamma IFN concentration in serum samples of active TB patients was higher at 38.4  $\mu\text{g} / \text{ml}$  compared to healthy serum samples which were 37.5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . These differences showed that there was a significant effect of recombinant proteins on TB germs and could be made as a biomarker.

Keywords: sMTL-13, ELISA Test, IFN gamma, Biomarkers.

## **DAFTAR ISI**

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	5
1.3 Manfaat Penelitian .....	5
1.4 Waktu dan Tempat Penelitian .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
II.1 Morfologi dan Klasifikasi Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
II.1.1 Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strain H37RV .....	6
II.1.2 Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV .....	7
II.1.3 Patogenesis Tuberculosis .....	9
II.1.4 sMTL-13 sebagai Biomarker Tuberculosis Aktif .....	13
II.1.5 Metode ELISA .....	19
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	21
III.1 Alat .....	21
III.2 Bahan .....	21
III.3 Prosedur Kerja .....	22



III.3.1 Kriteria Sampel.....	22
III.3.2 Penyiapan Protein Rekombinan sMTL-13 sebagai Atigen .....	22
III.3.2.1 Perbanyakkan sel <i>E.coli</i> BL21 yang Membawa Plasmid Rekombinan PQE30XA-sMTL-13 <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> .....	22
III.3.2.2 Produksi Protein Rekombinan sMTL-13.....	22
III.3.2.3 Purifikasi Protein Menggunakan Kit Qiagen Ni-NTA .....	23
III.3.3 Uji Immunoreaktivitas dengan Uji ELISA.....	24
III.3.3.1 Mengukur Konsentrasi Protein sMTL-13 .....	24
III.3.3.2 Coating (Pelapisan) Protein.....	25
III.3.3.3 Uji ELISA .....	25
III. 4 Analisis Data .....	26
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>27</b>
IV.1 Kultur Sel <i>E. coli</i> BL21 yang membawa Plasmid Raekombinan pQE30XA-sMTL-13 <i>Mycobacteriu tuberculosis</i> .....	27
IV.2 Produksi Protein Rekombinan sMTL-13 .....	39
IV.2.1 Lisis Bakteri .....	29
IV.2.2 Purifikasi Protein Rekombinan sMTL-13 .....	31
IV.3. Karakterisasi Protein dengan Metode SDS PAGE.....	32
IV.4 ELISA .....	35
IV.4.1 Tabel Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein smTL-13.....	35
IV.4.2 <i>Coating</i> (Pelapisan) Protein Rekombinan sMTL-13.....	35
IV.4.3 Uji ELISA.....	41
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>44</b>
V.1 Kesimpulan .....	44

V.2 Saran.....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>45</b>

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1.	Hasil Uji ELISA sampel Serum Penderita .....	36
2.	Hasil Uji ELISA sampel Serum Sehat .....	38
3.	Nilai Signifikan Sampel .....	40
4.	Nilai Perbedaan Kelompok Sampel Terhadap Protein Rekombinan sMTL-13 .....	40

\

**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1.	<i>Mycobacteriu tuberculosis</i> .....	7
2.	Genom H37RV.....	8
3.	Patofisiologi Tuberculosis.....	13
4.	Hasil Transformasi gen Rv 1419 pQE30Xa ke <i>E.coli</i> .....	27
5.	Hasil SDS PAGE sMTL-13 .....	34
6.	Grafik Hasil Nilai OT Stnadar Uji ELISA .....	39

#### **DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
-----------------	--------------	----------------

1. Skema Kerja .....	48
2. Komposisi Pembuatan Media .....	49
3. Gambar Bahan.....	51
4. Tabel statistik .....	52

**BAB I**  
**PENDAHULUAN**

## I.1 LATAR BELAKANG

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Terdapat beberapa spesies *Mycobacterium*, antara lain: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. Leprae* yang juga dikenal sebagai Bakteri Tahan Asam (BTA) (Kemenkes, 2018). TB saat ini tetap menjadi penyebab kematian terbesar dari penyakit menular, dengan sekitar 10,5 juta kasus baru dan 1,5 juta kematian setiap tahun. Patogen penyebab TB manusia adalah *Mycobacterium tuberculosis* (Bloom, 2018).

Menurut WHO (*World Health Organization*), tuberkulosis merupakan salah satu penyebab utama kematian dan agen menular tunggal (selain HIV/AIDS). Jutaan orang terinfeksi penyakit ini setiap tahunnya. Pada tahun 2017, tuberkulosis diperkirakan menyebabkan kematian sebanyak 1,3 juta kematian. Secara global penyakit tuberkulosis sudah menginfeksi sekitar 10 juta orang 5,8 juta diantaranya pria, 3,2 juta wanita dan 1 juta anak-anak. Infeksi tuberkulosis dapat menyebar di semua negara dan tidak memandang usia, namun 90% diantara para penderita semuanya berada pada usia produktif yakni  $\geq 15$  tahun, 9 % diantaranya merupakan penderita HIV dan 2/3 berada di 8 negara yakni India (27%), Cina (9%), Indonesia (8%), Filipina (6%), Pakistan (5%), Nigeria (4%) dan Afrika Selatan (3%) (WHO, 2018).

Jumlah kasus baru TB di Indonesia sebanyak 420.994 kasus pada tahun 2017 (data per 17 Mei 2018). Berdasarkan jenis kelamin, jumlah kasus baru TB tahun 2017 berdasarkan survei prevalensi tuberkulosis pada laki-laki 3 kali lebih tinggi dibandingkan pada perempuan. Begitu juga yang terjadi di negara-negara lain. Hal ini terjadi diduga karena laki-laki lebih terpapar pada faktor risiko TB misalnya merokok dan kurangnya ketidapatuhan minum obat. Survei ini

menemukan bahwa dari seluruh partisipan laki-laki yang merokok sebanyak 68,5% dan hanya 3,7% partisipan perempuan yang merokok (Kemenkes, 2018).

Berdasarkan data yang diperoleh dari Bidang Bina P2PL Dinas Kesehatan Kota Makassar, kasus baru penderita TB Paru di Puskesmas dan Rumah Sakit tahun 2015 yaitu 1.928 penderita dari 2600 perkiraan sasaran sehingga didapatkan Angka Penemuan Kasus Baru TB yaitu 74,15%. Angka ini meningkat dari tahun 2014 yaitu 73,76% (ditemukan 1.918 penderita dari 2.600 sasaran) dan tahun 2013 yaitu 72,44 % (ditemukan penderita 1.811 dari 2500 sasaran). Prevalensi (seluruh kasus) penyakit TB per 100.000 penduduk selama 3 tahun terakhir mengalami peningkatan yaitu tahun 2015 diperoleh 249/100.000 penduduk meningkat dari tahun 2014 yaitu 247/100.000 penduduk dan tahun 2013 yaitu 243/100.000 penduduk (Dinas Kesehatan Kota Makassar, 2015). Dalam langkah pencegahan TB, mengetahui apakah suatu individu terdeteksi mengidap TB merupakan hal yang sangat penting dalam langkah pencegahan dan pengobatan TB selama ini memanfaatkan beberapa metode. Salah satu cara untuk mendeteksinya adalah dengan menggunakan biomarker. Biomarker didefinisikan sebagai parameter dapat diukur secara objektif sebagai indikator proses biologis normal atau patogen, atau sebagai indikator respons farmakologis terhadap intervensi terapeutik (Tucci *et al*, 2014).

Analisis mengungkapkan bahwa sMTL-13 termasuk dalam kelompok protein tipe-b b-trefoil risin mengandung peptida yang ada pada spesies kompleks *Mtb*. rekombinan sMTL-13 (rec-sMTL- 13) mampu menginduksi aglutinasi eritrosit kelinci *in vitro*, menunjukkan bahwa protein ini menampilkan aktivitas lektin. sMTL-13 mengarah pada peningkatan produksi IFN gamma oleh PBMC dari pasien aktif tuberkulosis (BTA). lektin risin 13 kDa yang disekresikan dari

Mtb, yang secara imunologis berperan selama BTA dan dapat berfungsi sebagai biomarker dari pengobatan penyakit. Diduga pasien BTA memiliki titer tinggi IgG Ab terhadap sMTL-13. (Nogueira, 2010).

Lektin didefinisikan sebagai kelompok protein yang memiliki kemampuan untuk secara spesifik mengikat bagian karbohidrat. Sejumlah patogen seperti MTB menunjukkan kemampuan untuk mengekspresikan lektin, yang terlibat dalam proses invasi. lektin yang diekspresikan dan disekresikan berpartisipasi dalam interaksi sel inang-mikroba. Molekul ini diduga merupakan komponen penting dari interaksi sel inang-mikobakteri yang dapat menimbulkan respons imun spesifik. Lektin yang disekresikan Mtb memiliki aktivitas antigenik pada TB manusia dan berpotensi sebagai biomarker terapi penyakit. (Nogueira, 2010)

sMTL-13 terdeteksi dalam biopsi pleura dari pasien BTA dan menyebabkan peningkatan produksi IFN-g oleh PBMC dari pasien selama penyakit aktif dan menunjukkan pasien BTA menampilkan titer serum yang tinggi IgG terhadap sMTL-13. Selain itu pasien TB juga menampilkan respons imun adaptif terhadap sMTL-13 selama penyakit aktif dan anti sMTL-13 antibodi menurun setelah kontrol terapeutik Mtb in vivo. sMTL-13 Titer IgG menampilkan spesifisitas tinggi (90%) serta sensitivitas (93%) untuk diagnosis TB. Menariknya, titer anti-sMTL-13 IgG menurun dengan cepat dalam 2 bulan dan menunjukkan bahwa titer IgG anti sMTL-13 dapat digunakan sebagai biomarker tuberculosis (Nogueira, 2010).

Dalam penelitian uji immunoreaktifitas protein sMTL-13 sebagai biomarker tuberculosis aktif akan digunakan metode yaitu uji ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) merupakan uji serologis yang bertujuan untuk



menganalisis adanya interaksi antigen dengan antibodi didalam suatu sampel dengan menggunakan enzim.

## **I.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan dilakukan penelitian ini yaitu untuk menguji immunoreaktivitas protein rekombinan sMTL-13(*secreted Micobacterium tuberculosis lectin 13*) terhadap penderita tuberculosis aktif sebagai biomarker TB aktif

## **I.3 Manfaat**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi efektivitas protein rekombinan sMTL-13 sebagai biomarker dalam deteksi tuberculosis aktif.

## **1.4 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2019- Januari 2020 di Laboratorium Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC) Rumah Sakit Universitas Hasanuddin.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

## **II.1 Morfologi Dan Klasifikasi Genom *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

### **II.1.1 Morfologi *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv**

*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv merupakan bakteri yang bersifat patogen pada manusia, termasuk bakteri gram positif, memiliki bentuk basil (batang), tidak memiliki motilitas, hidup pada lingkungan aerobik, memiliki temperatur optimum 37 °C, termasuk bakteri mesofilik dan merupakan penyebab penyakit tuberculosis (NCBI, 2019). Publikasi seluruh urutan genom H37Rv strain *Mycobacterium tuberculosis* oleh Stewart Cole dan rekannya pada tahun 1998 memberikan terobosan dalam penelitian tuberculosis (TB) yang mengarah ke wawasan biologi, metabolisme, dan evolusi patogen infeksius. H37Rv awalnya berasal dari isolat klinis yang diperoleh dari pasien dengan TB paru di Indonesia. H37Rv terletak pada clade T dan nukleotida tunggal kelompok gugus polimorfisme (SNP) SCG-6b (Loerger *et al*, , 2019).

*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv telah mengembangkan sejumlah strategi bertahan hidup yang sangat efektif yaitu dengan melakukan penghambatan fusi *phagosome-lysosome*; penghambatan pengasaman *phagosome*; perekrutan dan retensi *tryptophanaspartate* yang mengandung protein mantel pada fagosom untuk mencegah proses eliminasi yang akan dilakukan oleh lisosom (Meena and Rajni, 2010).

### **Klasifikasi *Mycobacterium tuberculosis***

Kingdom : Bacteria  
Subkingdom : Posibacteria  
Phylum : Actinobacteria  
Subclass : Actinobacteridae  
Order : Actinomycetales  
Suborder : Corynebacterineae  
Family : Mycobacteriaceae  
Genus : *Mycobacterium*  
Species : *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*  
Sumber : Integrated Taxonomic Information System (ITIS) Report,  
2019.



**Gambar 1.** : *Mycobacterium tuberculosis* (Notoatmodjo, 2007)

### **II.1.2 Genom *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

Genom pada bakteri *Mycobacterium tuberculosis* memiliki ukuran 4,4 Mb (mega base) dengan kandungan guanin (G) dan sitosin (C) yang paling banyak. Berdasarkan hasil pemetaan gen, telah diketahui lebih dari 165 gen dan penanda genetik yang dibagi dalam 3 kelompok. Kelompok yang pertama yaitu gen yang merupakan sekuen DNA mikobakteria yang selalu ada (*conserved*)



Tuberkulosis disebabkan oleh dua faktor yaitu infeksi *human immunodeficiency virus* (HIV) dan hubungannya dengan penyakit TB aktif, peningkatan resistensi strain *Mycobacterium tuberculosis* terhadap obat anti-TB. Penyebab lainnya yakni termasuk faktor ekspansi populasi, deteksi kasus yang buruk dan tingkat kesembuhan di negara-negara miskin, penularan aktif di rumah sakit yang penuh sesak, penjara, dan tempat-tempat umum lainnya, migrasi individu dari negara-negara dengan insiden tinggi karena perang atau kelaparan, penyalahgunaan narkoba dan tunawisma. Penderita penyakit aktif dengan smear positive dahak TB paru adalah sumber utama infeksi di sebuah komunitas. Infeksi primer dengan *M. tuberculosis* menyebabkan penyakit klinis pada 10% individu (Ahmad, 2011).

Selain itu, kasus respon imun yang berhasil melawan patogen penyebab TB dari *M. Tuberculosis* tidak terjadi secara maksimal pada setiap orang, patogen sepenuhnya diberantas hanya pada 10% , sedangkan respon imun di 90% sisanya individu hanya berhasil dalam penahanan infeksi karena beberapa basil lolos dari pembunuhan dengan menumpulkan mekanisme mikrobisida sel imun (seperti fagosom-lisosom, presentasi antigen oleh MHC molekul kelas I, kelas II, dan CD1, produksi nitratoksida, dan zat antara nitrogen reaktif lainnya) dan tetap ada dalam keadaan tidak mereplikasi (tidak aktif atau laten) pada lesi lama. Proses ini disebut sebagai infeksi TB laten (LTBI), dan basil aktif mempertahankan kemampuan untuk mengaktifkan dan menyebabkan TB aktif jika gangguan respon imun terjadi (misalnya pada infeksi HIV) (Ahmad, 2011).

Tuberkulosis adalah penyakit menular dan pasien dengan TB paru adalah sumber infeksi terpenting. Infeksi dimulai oleh inhalasi nuklei, merupakan partikel dengan diameter 1-5  $\mu\text{m}$  yang mengandung *M. tuberculosis*,

didelektasikan oleh pasien dengan TB paru aktif (terbuka TB), biasanya ketika pasien batuk. Inti tetesan, karena ukurannya yang kecil, bisa tetap menggantung di udara selama beberapa menit hingga berjam-jam. Risiko infeksi tergantung pada beberapa faktor seperti infeksi dari sumber kasus, kedekatan kontak, basiler memuat inhalasi, dan status kekebalan inang potensial. Rute utama infeksi melibatkan paru-paru. Inti tetesan inhalasi menghindari pertahanan bronkus karena ukurannya yang kecil dan menembus ke terminal alveoli di mana mereka ditelan oleh kekebalan fagosit sel (makrofag dan sel dendritik). *M. Tuberculosis* juga dapat menginfeksi sel nonfagosit dalam ruang alveolar termasuk sel M, endotel alveolar, dan tipe 1 dan sel epitel tipe 2 (pneumosit). Di awal fase infeksi, *M. tuberculosis*, diinternalisasi oleh fagosit sel-sel imun, bereplikasi secara intraseluler, dan bakterialaden sel-sel imun dapat melintasi penghalang alveolar untuk menyebabkan diseminasi sistemik. Replikasi intraseluler dan penyebaran patogen ke paru secara simultan ke kelenjar getah bening dan ke berbagai luar paru lainnya, terjadi sebelum perkembangan imun adaptif memberi tanggapan. Ini menunjukkan kemampuan luar biasa *M. tuberculosis* untuk membangun ceruk yang dilindungi di mana mereka bisa menghindari eliminasi oleh sistem kekebalan tubuh dan untuk bertahan tanpa batas (Ahmad, 2011).

Di sebagian besar individu yang terinfeksi, suatu respons imun yang dimediasi sel yang efektif berkembang 2-8 minggu setelah infeksi yang menghentikan penggandaan lebih lanjut dibasil tuberkulum. Limfosit T teraktivasi, makrofag, dan sel-sel kekebalan lainnya membentuk granuloma dinding dari jaringan nekrotik yang tumbuh semakin membatasi replikasi dan penyebaran basil tuberkel. Sebagian besar Mtb terbunuh dalam granuloma caseating dan perkembangan penyakit ditangkap. Namun, patogennya tidak

sepenuhnya diberantas, pada beberapa individu sebagian Mtb telah mengembangkan strategi yang efektif untuk menghindari respons imun mengakibatkan kelangsungan hidup dan kegigihan beberapa basil dan tidak mereplikasi di host (LTBI). Dalam dukungan dari hipotesis ini, Mtb telah dikultur dan keberadaan DNA Mtb telah ditunjukkan dari jaringan paru-paru individu yang meninggal karena penyakit lain dan tidak menunjukkan tanda patologis penyakit TB. Selanjutnya, laporan terbaru menunjukkan transmisi infeksi dari ayah ke anak di Denmark pada tahun 1961 dan reaktivasi infeksi laten pada anak lebih dari 30 tahun kemudian (didokumentasikan oleh sidik jari molekuler mereka masing-masing isolat *M. tuberculosis*) telah menunjukkan bahwa bacillimay tetap tidak aktif untuk waktu yang lama (abadi hingga seumur hidup) . Cacat berikutnya dalam mediasi sel imunitas dapat menyebabkan reaktivasi yang menyebabkan basil aktif sehingga penyakit aktif bertahun-tahun setelah infeksi (reaktivasi TB) (Ahmad, 2011).

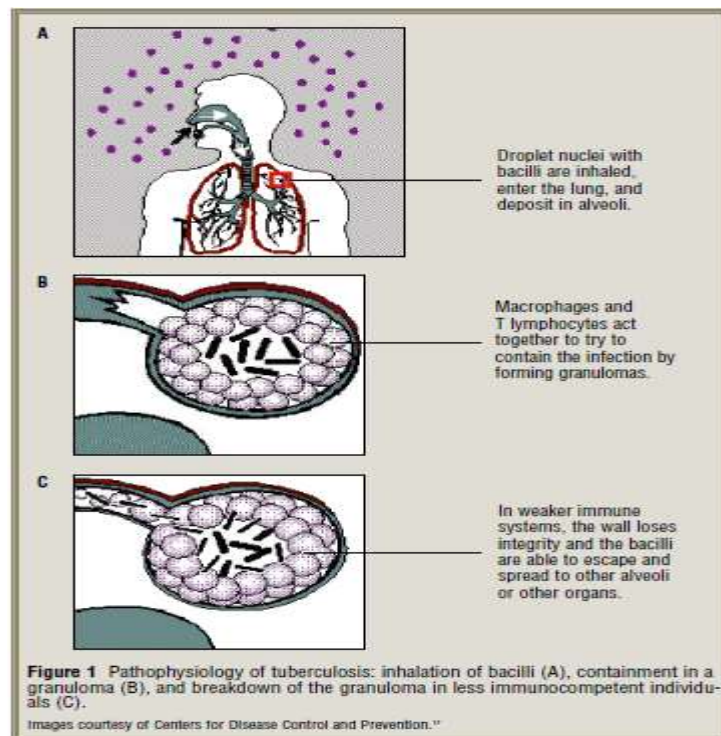
*M.tuberculosis* memulai reaksi imun hipersensitivitas di dalam paru-paru dan merusak jaringan paru-paru serta membunuh mikroorganisme asing. Manifestasi patologis TB seperti *caseing granuloma* dan kavitas adalah hasil dari hipersensitivitas yang berkembang seiring dengan perlindungan respon imun sel inang. Makrofag adalah sel primer terinfeksi oleh *M.tuberculosis* (Sharma *et al*, 2018). Setelah dicerna oleh makrofag, mycobacteria berlanjut berkembang biak dengan melakukan pembelahan sel yang terjadi setiap 25 hingga 32 jam. Terlepas dari apakah infeksi menjadi terkontrol atau berkembang, pengembangan awal melibatkan produksi enzim proteolitik dan sitokin oleh makrofag dalam upaya untuk menurunkan bakteri. Sitokin yang dilepaskan memicu produksi limfosit T yang merupakan kekebalan yang dimediasi oleh sel. Makrofag kemudian

menyajikan myco-antigen bakteri di permukaannya ke sel T yang merupakan kekebalan awal, proses berlanjut selama 2 hingga 12 minggu, mikroorganisme terus tumbuh sampai mereka mencapai angka yang cukup untuk sepenuhnya memperoleh sel yang dimediasi oleh sel sebagai respon imun, yang bisa jadi terdeteksi oleh tes kulit. Untuk orang dengan system kekebalan seluler, pertahanan berikutnya adalah pembentukan granuloma disekitar organisme TB. Tipe nodulari lesi ini terbentuk dari akumulasi limfosit T yang teraktivasi dan makrofag yang menciptakan lingkungan mikro yang membatasi replikasi dan penyebaran mikobakteri. Lingkungan ini hancur oleh fagositosis makro dan menghasilkan lebih awal nekrosis padat di pusat luka. Namun, basil bisa beradaptasi agar selamat (Knechel, 2009)

*Mycobacterium tuberculosis* dapat mengubah ekspresi fenotipik mereka, seperti regulasi protein, untuk meningkatkan kelangsungan hidup. Pada 2 atau 3 minggu, nekrotik lingkungan menyerupai keju lunak, sering disebut *nekrosis caseous* dan ditandai dengan kadar oksigen rendah, pH rendah, dan nutrisi terbatas. Kondisi ini semakin membatasi pertumbuhan dan membangun latensi. Lesi pada orang dengan sistem kekebalan tubuh yang baik umumnya mengalami fibrosis dan kalsifikasi, sehingga berhasil mengendalikan infeksi basil yang terkandung dalam lesi aktif. Lesi pada orang dengan kekebalan tubuh kurang efektif menyebabkan proses infeksi berkembang ke primer TB. Untuk orang yang kurang imunokompeten, pembentukan granuloma dimulai namun pada akhirnya tidak berhasil dalam mengandung basil. Nekrotik jaringan mengalami pencairan, dan dinding berserat kehilangan struktur integritas. Nekrotik semiliquid material kemudian dapat mengalir ke dalam bronkus atau pembuluh darah terdekat, meninggalkan rongga berisi udara di situs asli. Pada pasien yang terinfeksi dengan



*M tuberculosis*, tetesannya bisa batuk dari bronkus dan menginfeksi orang lain. Basil juga bisa berkembang dan menginfeksi ke system limfatik dan kelenjar getah bening serta paru-paru dan membentuk *granuloma* caseous baru (Knechel, 2009).



**Gambar 3.**Patofisiologi tuberculosis (Knechel, 2009)

### II.1.5 sMTL-13 sebagai Biomarker Tuberculosis Aktif

Infeksi tuberkulosis aktif adalah tuberkulosis yang dapat menularkan, penyakit tuberkulosis pada umumnya mengenai paru paru, yang menyebar melalui udara ketika penderita tubekculosis tersebut bersin, batuk yang tidak ditutup dan berbicara (Jordao, 2011). Basil tuberkulosis dapat tetap diudara selama beberapa jam, terutama di daerah padat, kurang ventilasi udara, kurang cahaya dan lembab. Tuberkulosis aktif semakin berkembang pada penderita dengan stress fisik, malnutrisi, kurang higienis, manula, HIV/AIDS serta penyakit dengan defisiensi imun lainnya. Kuman tuberkulosis dapat menyebar melalui pembuluh darah,

kelenjar getah bening, sehingga dapat menginfeksi hampir seluruh organ tubuh seperti paru-paru, otak, ginjal, saluran pencernaan, tulang, kelenjar getah bening (Zhang, 2011).

Teknik saat ini digunakan dalam mendiagnosis TB memiliki beberapa kelemahan. Misalnya, apusan dahak mikroskopi cepat dan murah, tetapi sensitivitas dan spesifisitasnya rendah. Isolasi mikobakteri dianggap sebagai standar yang baik tetapi memakan waktu dan memiliki sensitivitas yang rendah. Selain itu, isolasi mikobakteri membutuhkan fasilitas biosafety tingkat tinggi. Demikian pula, diagnosis berdasarkan gambar dada (radiologi) memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang rendah dan memiliki biaya tinggi. Tes kulit tuberkulin (TST) sangat sensitif, tetapi spesifisitas rendah, yang tidak dapat membedakan *Bacille Calmette- Vaksinasii Guerin* (BCG) dari infeksi alam. Uji pelepasan in vitro IFN- $\gamma$  (IGRA) juga tidak memiliki konsistensi dan reproduktifitas. Uji Xpert MTB / RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) dapat mendeteksi TB dan rifampisin resistensi dalam 2 jam, tetapi biaya yang lebih tinggi membuatnya sulit untuk dipopulerkan di seluruh dunia, terutama di negara terbelakang dan negara-negara berkembang (Ren *et al*, 2018). Karena itu, metode diagnostik TB memerlukan perbaikan yang lebih lanjut. Biomarker protein seroreaktif digunakan untuk diagnosis TB merupakan salah satu metode yang dapat dipertimbangkan. Biomarker didefinisikan sebagai parameter dapat diukur secara objektif sebagai indikator proses biologis normal atau patogen, atau sebagai indikator respons farmakologis terhadap intervensi terapeutik (Tucci *et al*, 2014). Selain itu, hasil diagnosis bersifat retrospektif, dan metode pengujian dapat disederhanakan dan otomatis. Beberapa protein *M. tuberculosis* dikodekan oleh daerah perbedaan (RD) berpotensi digunakan sebagai kandidat biomarker yang

mampu membedakan *M. tuberculosis* infeksi dari vaksinasi BCG. Genom komparatif Analisis mengungkapkan bahwa ada 16 RD termasuk 129 bingkai pembacaan terbuka diferensial (ORFs) antara *M. tuberculosis* dan BCG namun sebagian besar dari penanda diagnostik yang diidentifikasi ini menunjukkan sensitivitas tinggi pada pasien TB paru BTA-positif, tetapi sensitivitas rendah pada PTB-SN dan tuberkulosis ekstra paru (EPTB) (Ren *et al*, 2018).

Analisis mengungkapkan bahwa sMTL-13 termasuk dalam kelompok protein tipe-b b-trefoil risin mengandung peptida yang ada pada spesies kompleks *Mtb*. Rekombinan sMTL-13 (rec-sMTL- 13) mampu menginduksi aglutinasi eritrosit kelinci *in vitro*, menunjukkan bahwa protein ini menampilkan aktivitas lektin. sMTL-13 mengarah pada peningkatan produksi IFN gamma oleh PBMC dari pasien aktif tuberkulosis (BTA) (Nogueira, 2010).

Lektin didefinisikan sebagai kelompok protein yang memiliki kemampuan untuk secara spesifik mengikat bagian karbohidrat. Sejumlah patogen seperti MTB menunjukkan kemampuan untuk mengekspresikan lektin, yang terlibat dalam proses invasi. lektin yang diekspresikan dan disekresikan berpartisipasi dalam interaksi sel inang-mikroba. Molekul ini diduga merupakan komponen penting dari interaksi sel inang-mikobakteri yang dapat menimbulkan respons imun spesifik. Lektin yang disekresikan *Mtb* memiliki aktivitas antigenik pada TB manusia dan berpotensi sebagai biomarker terapi penyakit. (Nogueira, 2010)

sMTL-13 merupakan protein yang dikode oleh gen Rv1419. Kerangka baca terbuka (ORF) nya berisi 474 nukleotida dan sekuens aa diduga mengkodekan protein dari 157 residu yang mengandung peptida sinyal dan memiliki prediksi massa molekul 16,8 kDa. Analisis urutan utama dari protein yang dikode Rv1419 mengungkapkan sinyal residu 33aa peptida, dengan situs

pembelahan sinyal tipe I antara Ala33 dan Asp34. Analisis protein matang memprediksi molekul massa berat 13,6 kDa. Posisi 31 dan 32 dari prekursor protein mengandung urutan Ala-x-Ala, yang biasa ditemukan sebelum situs pembelahan. Rv1419p berisi a domain ricin B-chain yang mengikat karbohidrat dan termasuk dalam sejenis protein b-trefoil tipe ricin, yang terdiri dari tiga subdomain homolog serta keberadaan pola Q-W. Domain risin rantai-B telah ditunjukkan untuk mengikat sel glikolipid permukaan dan glikoprotein yang mengandung galaktosa b-1,4 dan *mannose moieties*. Selain itu, pencarian basis data telah menunjukkan bahwa ORF Rv1419 menampilkan identitas 100% homolog dari strain klinis Mtb CDC1551 (GenBank nomor tambahan: AE000516.2) serta M. bovis BCG (Nomor akses GenBank: AM408590.1) dan 78% identitas untuk M. marinum (nomor akses GenBank: CP000854.1) juga sebagai M. ulcerans (Nomor tambahan Genbank: CP000325.1). Selain itu Rv1419 memiliki aktivitas lektin berdasarkan Uji aglutinasi eritrosi (Nogueira, 2010).

sMTL-13 terdeteksi dalam biopsi pleura dari pasien BTA dan menyebabkan peningkatan produksi IFN-g oleh PBMC dari pasien selama penyakit aktif dan menunjukkan pasien BTA menampilkan titer serum yang tinggi IgG terhadap sMTL-13, selain itu pasien TB juga menampilkan respons imun adaptif terhadap sMTL-13 selama penyakit aktif dan anti-sMTL-13 Ab menurun setelah kontrol terapeutik Mtb in vivo. TB aktif pasien menunjukkan titer tinggi anti-sMTL-13 IgG. sMTL-13 Titer IgG menampilkan spesifisitas tinggi (90%) serta sensitivitas (93%) untuk diagnosis TB. Menariknya, titer anti-sMTL-13 IgG menurun dengan cepat dalam 2 bulan. bahwa titer IgG anti-sMTL-13 dapat digunakan sebagai biomarker serum dari kemanjuran pengobatan (Nogueira, 2010).

Pada penderita TB aktif menunjukkan produksi IFN- $\gamma$  yang tinggi. IFN merupakan jenis protein yang tergabung ke dalam keluarga besar sitokin. Interferon dibagi ke dalam 2 jenis berdasarkan struktur, fungsi, dan stimulus yang merangsang ekspresi protein ini, yaitu: (i) IFN tipe I yang muncul saat merespon adanya infeksi virus, terbagi ke dalam beberapa kelas yaitu IFN ( $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\epsilon$ ,  $-\kappa$ ,  $-\omega$ ,  $-\delta$ ,  $-\tau$ ). (ii) IFN tipe II, yang disebut juga dengan IFN- $\gamma$ , yang disekresikan oleh sel-sel yang telah mendapatkan rangsangan dari berbagai stimulus inflamasi maupun reaksi imun lainnya (Schreiber. 2003 and Czarniecki *et al.*, 2006). Interferon gamma di produksi oleh limfosit sel T helper dan bekerja pada sel makrofag, sel endotel, fibroblast, sel T sitotoksik dan limfosit B anti-viral (Jalius, 2012). Interferon gamma di hasilkan selama respons imun berlangsung oleh adanya antigen spesifik sel T dan *natural killer cells* (sel NK) yang di stimulasi oleh IL-2.(Roostati, 2008). Pengaruhnya mengaktifkan makrofag untuk meningkatkan fagositosis dan kemampuan membunuh sel tumor, meningkatkan pertumbuhan sel T sitolitik dan sel NK. Aktivitas IFN- $\gamma$  lainnya yakni meningkatkan presentasi antigen oleh makrofag, mengaktifkan aktivitas lisosom di dalam makrofag, meningkatkan aktivitas Th2, mempengaruhi sel normal untuk meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I, mempromosikan adesi dan mengikat leukosit yang bermigrasi, mempromosikan aktivitas sel NK dan mengaktifkan APCs, merangsang diferensiasi Th1 dengan pengaturan transkripsi faktor T (Widjaja, 2010).

IFN- $\gamma$  merupakan produk dari gen tunggal yang berasal kromosom 12 (pada manusia) dan kromosom 10 (pada mencit) (Schreiber. 2003 and Naylor *et al.*, 1983 ). IFN- $\gamma$  manusia merupakan suatu *glycosylated* protein dengan panjang 143 asam amino dan memiliki sedikit sequence homology dengan kelas IFN- $\alpha$

dan IFN- $\beta$ . Meskipun IFN- $\gamma$  memiliki sejumlah aktifitas biologis yang sama dengan IFN tipe I, namun IFN- $\gamma$  juga memperlihatkan adanya berbagai aktifitas lain, hal ini menunjukkan bahwa peran alami yang dimainkan oleh IFN- $\gamma$  adalah sebagai modulator sistem imun (Czarniecki *et al.*, 2006 and Gallin *et al.*, 1995).

IFN- $\gamma$  terutama dihasilkan secara endogen oleh sel limfosit T (CD4+ dan CD8+) dan sel *Natural Killer* (NK) yang telah teraktivasi akibat adanya respon terhadap stimulus antigen spesifik. IFN- $\gamma$  merupakan sitokin yang menjadi tanda khas subset TH1. IFN- $\gamma$  merupakan sitokin utama yang berperan dalam aktivasi makrofag dan memiliki fungsi yang sangat penting dalam *cell mediated immunity* terhadap mikroba intraseluler (Abbas *et al.*, 2012 ., Young and Bream. 2007).

Sifat khas yang dimiliki oleh bakteri intraseluler fakultatif seperti *Mycobacterium tuberculosis* adalah kemampuannya untuk dapat bertahan hidup bahkan dapat melakukan multiplikasi di dalam sel fagosit. Oleh karena mikroba ini mampu bersembunyi dari antibodi host yang bersirkulasi, maka proses eliminasi mikroba ini membutuhkan mekanisme *cell-mediated immunity*. *Cell-mediated immunity* terdiri dari 2 tipe reaksi: (i) sel T CD4+ merekrut sel fagosit dan mengaktivasi mereka melalui CD4 ligand dan IFN- $\gamma$  yang akan membunuh mikroba yang telah difagositosis, (ii) *cytotoxic T lymphocytes* CD8+ membunuh sel host yang telah terinfeksi. IFN- $\gamma$  juga menstimulasi produksi isotypes antibodi (seperti IgG2a pada mencit) yang akan mengaktivasi komplemen dan mengopsonisasi bakteri untuk difagositosis, yang mana hal ini akan membantu fungsi efektor makrofag. (Abbas *et al.*, 2012).

### **II.1.6 Metode ELISA**

Metode ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) merupakan uji serologis yang bertujuan untuk menganalisis adanya interaksi antigen dengan

antibodi didalam suatu sampel dengan menggunakan enzim sebagai pelapor. Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Engvall dan Pedman pada tahun 1972, dan pada tahun 1976 Nassau dan rekan-rekannya menggunakan metode ini terhadap serodiagnosis tuberculosis yang mencapai sensitivitas 57% dan spesifitas 98% pada 45 pasien dan 48 kontrol (Bhatia *et al*, 2003).

Metode ELISA merupakan suatu metode sederhana dan sangat cepat yang dapat mendeteksi Tanggapan IgG terhadap beberapa antigen yang dapat digunakan untuk diagnosis TB. MTBE menyediakan yang sederhana penambahan sampel (sample-in) ke sistem berbasis deteksi kolorimetri (jawab-keluar) untuk membedakan dari TB aktif kontrol sehat / infeksi TB laten dengan hasil tersedia dalam waktu kurang dari lima belas menit. Diagnosis serologis menggunakan antibodi anti-TBGL (Tuberculosis glycolipid) tidak dipengaruhi oleh sebelum vaksinasi BCG. Selain itu, MTBE menawarkan keuntungan menjadi lebih cepat, lebih sederhana, dan lebih murah cocok untuk skrining awal pasien TB potensial yang nantinya dapat diverifikasi dengan tes berbasis PCR. uji ELISA berbasis manik digunakan dalam microchip memiliki keunggulan spesifik yaitu Konsentrasi lokal yang tinggi dari antigen yang terikat pada permukaan manik memperlihatkan pengikatan antigen-antibodi yang efisien, di mana pengikatan difasilitasi oleh difusi lambat, dan membutuhkan beberapa jam untuk mencapai saturasi. Ini menerjemahkan waktu reaksi yang lebih cepat untuk setiap langkah dalam MTBE, secara signifikan mengurangi waktu keseluruhan pengujian hingga 15 menit menggunakan matriks sampel plasma, tetapi tetap bekerja seefisien ELISA klasik standar. Selain itu, pengujian berbasis plasma yang disajikan mudah dilakukan karena pengumpulan sampelnya yang sederhana (darah lengkap, tusukan vena / jari) dibandingkan dengan sampel dahak (batuk dalam, beberapa

upaya diperlukan). Ini adalah khususnya relevan untuk pengumpulan sampel dari anak-anak yang (Mani *et al*, 2016).

### **BAB III**

## **METODE PENELITIAN**



### **III.1 Alat**

Alat yang digunakan adalah inkubator shaker (Heidolph Duomax 1030), sentrifus (Profuge), sonikator, *Mini Protean II Bio Rad*, Elektroforesis (Bio-rad), autoklaf (Hirayama), *laminar air flow* (Esco Ductless Fume Cabinet), timbangan (Kern 440-47N), mikropipet (Bio rad), erlenmeyer (Pyrex), gelas kimia (Pyrex), tabung eppendorf (Axygen), rak tabung eppendorf (Biocision), tabung falcon (BD), Freezer (GEA), Gelas ukur (Iwaki Pyrex), botol McCartney, dan waterbath (Mettler), ELISA reader, microtiter plate.

### **III.2 Bahan**

Bahan yang digunakan adalah klon *Escherichia coli* BL21 yang membawa plasmid rekombinan pQE30XA-sMTL-13, media LB (Luria Bertani), ampicilin 100 µg/ml, lysozim, buffer lysis (NPI-10), wash buffer (NPI-20), buffer elution (NPI-500), 0,5 M Tris HCl pH 8,8, 0,5 M Tris HCl pH 6,8, IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 1.0 mM, IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 1,5 mM, benzonase, 40% Acrylamide/bis solution 4 ml (Bio-rad), Sodium dodecylsulfate (SDS) 10% (Sigma), NaCl 0.8 gr, KCl 0.02 gr, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.144 gr, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.024 gr, aquades 5 L, *Loading buffer* 1 ml, 40% Acrylamide/bis solution 4 ml (Bio-rad), Tris Base 39.3 gr (Calbiochem), HCl pH 8.8, HCl pH 6.8, Ammonium Persulfate 0.1 gr (Sigma), Tetramethylethylenediamine 10 µl (Sigma), Glisine 14.4 gr (Sigma), protein marker 1 ml (Thermo Scientific), Metanol 550 ml (Merck), Glacial Acetic Acid 200 ml, *commissie brilliant blue* 1 gr (Bio-rad), Filter tip (Genfollower), Barrier tips (Multiguard), Phosphate Buffered Saline (PBS), ELISA KIT.

### **III.3 Prosedur Kerja**

#### **III.3.1 Kriteria sampel**

Subyek penelitian adalah sampel darah penderita TB aktif sebanyak 20 sampel, sehat sebanyak 7 sampel dengan BTA negatif yang diperoleh dari Laboratorium HUM-RC.

### **III.3.2 Penyiapan Protein sMTL-13 sebagai Antigen**

#### **III.3.2.1 Perbanyak Sel *Escherichia coli* BL21 yang Membawa Plasmid Rekombinan pQE30XA-sMTL-13 *Mycobacterium tuberculosis***

Klon *Escherichia coli* BL21 yang membawa plasmid rekombinan pQE30-sMTL-13 dalam stok gliserol diperbanyak dengan cara ditumbuhkan pada media LB (Luria Bertani). Klon *E. coli* diinokulasi ke dalam 15 ml media LB yang mengandung 100 µg/ml ampicilin. Di inkubasi selama *overnight* dalam inkubator *shaker* pada suhu 37°C. Kemudian kultur *Escherichia coli* BL21 dipindahkan sebanyak masing-masing 5 ml ke dalam 3 botol McCartney media LB baru, inkubasi selama 2 jam. Masing-masing kultur bakteri ditambahkan konsentrasi IPTG untuk ekspresi protein induksi yaitu sebanyak 3 ml untuk IPTG 1.0 mM, sampel lalu diinkubasi selama 16-18 jam dalam inkubator *shaker* pada suhu 37°C. Setelah inkubasi sampel dipindahkan masing-masing kedalam beberapa tabung ependorf.

#### **III.3.2.2 Produksi Protein sMTL-13**

Kultur bakteri dalam tabung ependorf di sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit untuk memisahkan supernatan (dibuang) dan pelet sel, dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan. Protein diekstraksi dari pelet sel kemudian diberi perlakuan *freeze and thaw* yang bertujuan untuk menstimulasi sel untuk memproduksi protein. *Freeze and thaw* dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Sampel kemudian diresuspensi dalam buffer PBS 1X pH 7.4. Pemecahan dinding bakteri dengan teknik sonikasi berulang berdurasi 30 detik dengan kekuatan 20 kHz. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 13.000

rpm selama 1 menit dilakukan untuk memisahkan protein rekombinan dan dinding sel bakteri. Memisahkan pelet sel sebagai fraksi *insoluble* dan supernatan mengandung protein *soluble*.

### **III.3.4 Purifikasi Protein menggunakan Kit Qiagen Ni-NTA**

Purifikasi protein menggunakan kolom afinitas kromatografi Ni-NTA resin. Massa sel *E.coli* rekombinan masing-masing 20 µl dan 4 µl ampisilin ditambahkan 25 pada LB cair lalu dishaker inkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Selanjutnya sebanyak 15 µl hasil inkubasi ditambahkan pada 15 ml LB cair lalu dishaker inkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Setelah itu 225 µl IPTG 100 mM ditambahkan pada 15 mL LB lalu diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi dibagi 2 (7,5 ml (tabung 1) disimpan dan 7,5 ml (tabung 2) diinkubasi selama semalam pada suhu 37°C. Kemudian tabung 1 dan 2 disentrifus untuk memisahkan supernatan dan pelet, supernatan kemudian dibuang dan pelet disimpan pada suhu -20°C. Setelah itu, ambil pelet dari suhu -20°C dan didiamkan selama 15 menit lalu ditambahkan 600 µl buffer lisis NPI-10 pH 8.0 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl dan 10 mM imidazol) dan 1 µg/µl stok lisosim sebanyak 70 µl, lalu diinkubasi selama 30 menit didalam es. Selanjutnya, disentrifus selama 15 menit pada kecepatan 12000 rpm untuk memisahkan supernatan dan pelet. Hasil sentrifugasi yang berupa soluble (supernatan) dan resin Ni-NTA dimasukkan kedalam kolom. Kemudian ditambahkan NPI-10 pH 8.0 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl dan 10 mM imidazol) kedalam kolom. Kemudian disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 12000 rpm, dilakukan pencucian dengan menambahkan wash buffer NPI-20 pH 8.0 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole). Protein di elusi dengan elution buffer NPI-500

pH 8.0 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole). Protein rekombinan MTSP11 murni kemudian dianalisis menggunakan SDS-PAGE.

### **III.3.3 Uji Immunoreaktivitas dengan Menggunakan Metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)**

Sumuran polystyrene microplate diisi dengan 50 ml antigen *M. tuberculosis* dengan beberapa macam pengenceran yang berbeda dalam coating buffer dan diinkubasi semalam dalam waterbath 37°C. Plate dicuci empat kali dengan PBST (50 mM PBS pH 7,2 dan 0,1% Tween 20), kemudian sumuran diblok dengan 100 ml blocking solution, BPS + 1% BSA, diinkubasi dalam waterbath selama 1 jam. Plate dikosongkan, lalu diletakkan dalam posisi terbalik. Masukkan serum yang dilarutkan dalam PBS Tween + 10% NGS dengan pengenceran yang berbeda ke dalam plate sebanyak 500 µl, kemudian diinkubasi dalam waterbath selama 1 jam. Plate di cuci empat kali dengan PBST. Peroxidase-conjugated anti-human IgG di tambahkan ke dalam plate sebanyak 50 µl (pengenceran 1:2000 dan 1:1000 dalam PBST), diinkubasi dalam waterbath selama 1 jam. Plate dicuci empat kali dengan PBST. Substrat TMB ditambahkan kedalam sumuran dan diinkubasi dalam ruangan gelap sampai terdapat warna biru (5-10-15 menit). Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 µl 0,1 M NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pembacaan dilakukan dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm.

### **III.4 Uji Immunoreaktivitas dengan Menggunakan Metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)**

#### **III.4.1 Mengukur konsentrasi protein sMTL-13**

Pengukuran konsentrasi protein menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Dilakukan kalibrasi alat menggunakan PBS, kemudian sampel protein dimasukkan sebanyak 100 µl kemudian dicatat nilai absorbansi yang diperoleh.

### **III.4.2 Pelapisan (*Coating*) Protein**

Protein sMTL-13 (Elusi) 30,3  $\mu$ l dimasukkan kedalam tabung ependorf kemudian ditambah 19,7  $\mu$ l PBS sehingga diperoleh volume 50  $\mu$ l. Hasil delusi tersebut diambil 45,8  $\mu$ l dimasukkan kedalam tabung falcon dan ditambah 5,5 ml coating buffer. Kemudian ditambahkan 50  $\mu$ l pada setiap sumuran plate. Pastikan bahwa sampel terisi pada setiap sumuran plate. Plate diinkubasi selama 2 hari pada suhu 4°C. Plate dicuci menggunakan wash buffer 300  $\mu$ l untuk setiap sumuran sebanyak 4 kali pengulangan. Kemudian ditambahkan blocking solution 75  $\mu$ l pada setiap sumuran plate dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.

### **III.4.3 Uji ELISA**

Plate dicuci dengan wash buffer 300  $\mu$ l pada setiap sumuran plate, dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan. Pembuatan standar dilakukan dengan pengenceran bertingkat OT standar sebanyak 500  $\mu$ l pada reference standar solution sehingga diperoleh standar  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ . Standar dimasukkan kedalam sumuran plate sebanyak 50  $\mu$ l (A1, B1, C1, dan D1). Sampel serum sehat masing-masing 50  $\mu$ l dimasukkan pada sumuran plate (E1, F1, G1, H1, A2, B2, C2, D2) dan sampel serum sakit masing-masing 50  $\mu$ l dimasukkan kedalam sumuran plate yang tersisa. Ditambahkan 50  $\mu$ l Biotynilated Detection Ab pada setiap sumuran dan diinkubasi dalam inkubator shaker selama 45 menit pada suhu 37°C. Plate dicuci dengan wash buffer 300  $\mu$ l sebanyak 3 kali pengulangan. Ditambahkan 100  $\mu$ l HRP Conjugate pada setiap sumuran plate, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Plate dicuci dengan wash buffer 300  $\mu$ l sebanyak 5 kali pengulangan. Ditambahkan 90  $\mu$ l Substrate reagent pada setiap sumuran plate, kemudian plate diinkubasi dalam kondisi gelap selama 15 menit pada suhu 37°C. Ditambahkan 50  $\mu$ l Stop solution pada setiap sumuran plate kemudian

plate dimasukkan kedalam Elisa reader untuk menghitung OD dengan panjang gelombang 450 nm.

#### **III.3.4 Analisis Data**

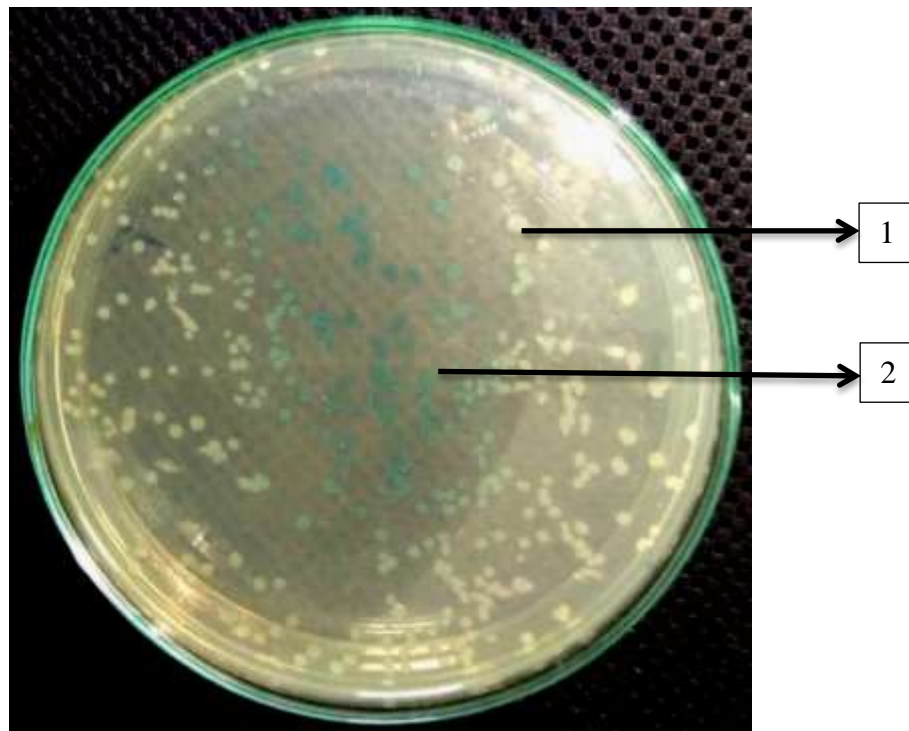
Membandingkan data hasil uji ELISA pada sampel penderita Tuberkulosis aktif dan orang sehat.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### IV.1. Kultur Sel *E. coli* BL21 yang Membawa Plasmid Rekombinan pQE30XA-sMTL-13 *Mycobacterium tuberculosis*

Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi keberhasilan transformasi pada penelitian sebelumnya yaitu metode seleksi putih biru yang didasarkan berdasarkan perubahan warna pada koloni. Koloni biru menunjukkan tidak adanya DNA sisipan didalam plasmid vector sedangkan koloni putih merupakan sel yang tidak memiliki aktivitas enzim  $\beta$ -galaktosidase. Hal ini disebabkan adanya sisipan fragmen DNA yang terletak antara gen lac Z sehingga fragmen DNA akan menginaktifkan ekspresi dari gen lac Z (Madigan dan martinko, 2005).



**Gambar 4.** Hasil transformasi gen Rv 1419 pQE 30 Xa ke *E. coli* BL21  
Keterangan:1. Koloni putih (pQE 30 Xa-Rv 1419), 2. Koloni biru (pQE 30 Xa)(Agus *et al*, 2019)

Hasil transformasi menunjukkan adanya koloni putih yang terbentuk pada media Luria Bertani (LB) padat yang menandakan bahwa bakteri telah berhasil disisipi gen. Koloni putih tersebut merupakan protein rekombinan sMTL-13 yang