

**KLONING GEN Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* ISOLAT
MAKASSAR KE *Escherichia coli* JM 109 SEBAGAI KANDIDAT
VAKSIN TUBERKULOSIS**

WA ODE KAMILLAH

H411 15 518



**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2019**



Optimization Software:
www.balesio.com

**KLONING GEN Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* ISOLAT
MAKASSAR KE *Escherichia coli* JM 109 SEBAGAI KANDIDAT
VAKSIN TUBERKULOSIS**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains*

WA ODE KAMILLAH

H411 15 518



**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2019**

HALAMAN PENGESAHAN

**KLONING GEN Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* ISOLAT
MAKASSAR KE *Escherichia coli* JM 109 SEBAGAI KANDIDAT
VAKSIN TUBERKULOSIS**

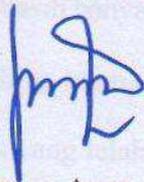
Disusun dan diajukan oleh :

WA ODE KAMILLAH

H411 15 518

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama



Dr. Rosana Agus, M.Si
NIP. 19651209 199008 2 001

Pembimbing Pertama



Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si
NIP. 196512091990082001



Januari 2019

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Kloning Gen Rv1926c Isolat Makassar ke *Escherichia coli* JM 109 Sebagai Kandidat Vaksin Tuberkulosis” yang merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan jenjang Strata Satu (S1) Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Dalam upaya perwujudan karya tulis ini, banyak kendala yang penulis hadapi, sejak dari merencanakan penelitian, jalannya penelitian hingga dalam tahap penyusunan laporan. Namun berkat doa, dukungan, kasih sayang yang tulus dan semangat dari berbagai pihak, penulis akhirnya dapat melewati kendala-kendala tersebut. Olehnya itu, dengan segala kerendahan hati yang tulu penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada kedua orang tua tercinta Ayahanda La Ode Abd. Muzakir dan Ibunda Wa Ode Tuty atas doa, motivasi dan kasih sayang yang tak terbatas yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan sampai di tingkat perguruan tinggi.

Terima kasih banyak penulis ucapkan kepada Ibu Dr. Rosana Agus, M.Si. selaku pembimbing utama dan Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si. selaku pembimbing pertama penulis yang telah meluangkan waktu untuk membimbing penulis dalam melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi. Terima kasih atas segala bimbingan, doa, semangat, dukungan dan saran dalam membantu penulis

penulisan skripsi.

Di sini itu tak lupa penulis haturkan terima kasih banyak dan penghargaan

dalamnya kepada:



1. Rektor Universitas Hasanuddin Makassar beserta jajarannya.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) UNHAS beserta jajarannya.
3. Ketua Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Makassar beserta jajarannya.
4. Tim Penguji skripsi Ibu Dr. Elis Tambaru, M.Si. dan Bapak Drs. Ambeng, M.Si., yang telah membantu penulis dalam menyempurnakan skripsi melalui kritik dan sarannya.
5. Penasihat akademik Bapak Dody Priosambodo, S.Si., M.Si. selaku penasihat akademik yang selalu memberikan arahan kepada penulis dari awal hingga akhir kuliah di Departemen Biologi.
6. Analisis Laboratorium HUM-RC Kakak Marina B. Ali yang telah banyak memberi bantuan dan saran dalam menyelesaikan penelitian.
7. Sahabat tersayang Nurfahmiatunnisa dan Nurul Padhilah yang selalu memberikan semangat baik dalam penyusunan skripsi maupun penelitian.

Penulis mengharapkan adanya saran dan kritik yang membangun dari para pembaca. Akhirnya semoga skripsi ini memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan kelak.

Makassar, Januari 2019

Penulis



ABSTRAK

Tuberkulosis merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*). Penyakit ini dapat dicegah dengan memberikan vaksin Bacille Calmette Guérin (BCG). Namun vaksin ini dinilai kurang efektif karena menunjukkan adanya efikasi variabel (0% hingga 80%). Salah satu protein yang disekresikan paling banyak dari *M. Tuberculosis* yaitu MPT63 yang dikode oleh gen Rv1926c. Gen Rv1926c merupakan gen yang mengkode protein MPT63 dan dikenal imunogenik karena mampu menginduksi respon imun humoral dan selular dan proliferasi IFN γ . Tujuan dari penelitian ini ialah untuk melakukan kloning gen Rv1926c dari *M.tb* ke sel *Escherichia coli* JM109 sebagai kandidat vaksin tuberkulosis. Metode yang digunakan ialah meligasi Rv1926c ke vektor kloning pGEM-T dan mentransformasi ke sel *E. coli* JM109. Karakterisasi klon rekombinan dilakukan dengan PCR koloni dan isolasi plasmid rekombinan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen Rv1926c berhasil diligasi ke vektor kloning pGEM-T yang ditunjukkan pada koloni putih dan setelah dikarakterisasi diketahui bahwa DNA yang berhasil disisipkan ialah gen Rv1926c berukuran 412 bp dan plasmid rekombinan yang diisolasi berukuran 3427 bp.

Kata Kunci : Rv1926c, kloning, pGEM-T, *Escherichia coli* JM109, tuberkulosis.



ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*). This disease can be prevented by giving Bacille Calmette Guérin (BCG) vaccine. However, this vaccine is considered less effective because it shows variable efficacy (0% to 80%). One of the most secreted proteins from *M. tuberculosis* is MPT63 which is encoded by the Rv1926c gene. The Rv1926c gene is a gene that encodes MPT63 protein and is known to be immunogenic because it can induce humoral and cellular immune responses and IFN γ proliferation. The purpose of this study was to perform recombinant cloning of the Rv1926c gene from *M.tb* to *Escherichia coli* JM109 cells as a tuberculosis vaccine candidate. The method used is to ligate Rv1926c to the clone pGEM-T vector and transform it to *E. coli* JM109 cells. Characterization of recombinant clones was carried out by colony PCR and isolation of recombinant plasmids. The results showed that the Rv1926c gene was successfully ligated to the pGEM-T cloning vector shown in the white colony and after being characterized it was known that the DNA successfully inserted was the 412 bp Rv1926c gene and 3427 bp insulated recombinant plasmid.

Keywords: Rv1926c, cloning, pGEM-T, *Escherichia coli* JM109, tuberculosis.



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Tujuan Penelitian.....	3
I.3 Manfaat Penelitian.....	4
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
II.2 Penyakit Tuberkulosis	7
II.2.1 Gejala.....	7
II.2.2 Patogenesis.....	7
II.2.2 Respon Imun terhadap Tuberkulosis.....	8
II.3 Vaksin.....	9
II.4 Kloning Gen	12
II.4.1 Komponen Kloning.....	12
II.4.1.1 DNA Sisipan.....	12



II.4.1.2 Vektor.....	13
II.4.1.3 Sel Inang.....	14
II.4.2 Tahapan Kloning.....	14
II.4.3 Karakterisasi Kloning.....	15
BAB III METODE PENELITIAN.....	18
III.1 Alat.....	18
III.2 Bahan.....	18
III.3 Prosedur Kerja.....	18
III.3.1 Ligasi Produk PCR Vektor Klonig pGEM-T <i>Easy</i>	18
III.3.1 Persiapan Sel Kompeten.....	19
III.3.1 Transformasi ke <i>Escherichia coli</i> JM109.....	20
III.3.1 Karakterisasi Klon Rekombinan.....	20
III.3.1 PCR Koloni.....	20
III.3.1 Isolasi Plasmid Rekombinan.....	21
III.4 Analisis Data.....	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
IV.1 Ligasi Produk PCR Vektor Klonig pGEM-T <i>Easy</i>	23
IV.2 Transformasi ke <i>Escherichia coli</i> JM109.....	24
IV.3 Karakterisasi Klon Rekombinan.....	27
IV.3.1 PCR Koloni.....	27
IV.3.1 Isolasi Plasmid Rekombinan.....	28
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
V.1 Kesimpulan.....	30
Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31



DAFTAR GAMBAR

1. Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2. Peta Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
3. Respon Selular terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
4. Posisi gen Rv1926c Protein Immunogenik MPT63 <i>M. tb</i>	12
5. Peta pGEM-T <i>Easy vector</i>	13
6. Ekspresi <i>Operlon Lac</i> pada <i>Escherichia coli</i>	18
7. Hasil Transfromasi Klon Rekombinan ke <i>E. Coli</i> JM109	26
8. Hasil Visulisasi PCR Koloni Melalui tehnik Elektroforesis	27
9. Hasil Visulisasi Isolasi Plasmid Rekombinan Melalui tehnik Elektroforesis ...	29



DAFTAR LAMPIRAN

1. Skema Kerja Penelitian.....	35
2. Kondisi PCR dan Primer Untuk Amplifikasi.....	36
3. Komposisi Bahan.....	37
4. Prosedur Kerja.....	41
5. Gen Rv1926c.....	42
6. Peta Vektor pGEM-T <i>Easy</i>	45
7. Hasil Blast dari Primer Forward dan Primer Reverse.....	46



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu dari 10 penyebab kematian terbanyak di dunia. Pada tahun 2016, *World Health Organization* (WHO) memperkirakan terdapat 6,3 juta kasus TB baru yang dilaporkan terjadi (angka ini naik dari 6,1 juta di tahun 2015), 10,4 juta orang sakit TB, dan 1,7 juta orang dinyatakan meninggal karena penyakit tuberkulosis. Indonesia merupakan salah satu negara dengan urutan kedua kasus TB tertinggi yang ada di dunia setelah negara India (WHO, 2017).

Di Indonesia pada tahun 2016 diperkirakan terdapat 298.128 kasus TB yang dilaporkan, 156.723 diantaranya merupakan penderita TB paru BTA positif. Jumlah kasus tuberkulosis di Sulawesi Selatan ditemukan sekitar 12.972 kasus, dengan jumlah penderita TB Paru 7.613 laki-laki dan 5.359 perempuan dan diantaranya merupakan TB paru BTA positif sebesar 7.139 orang yaitu 4.277 laki-laki dan 2.862 perempuan (Kemenkes, 2017).

Tuberkulosis disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* sebagian besar menyerang paru-paru, tetapi bakteri ini dapat juga menyerang organ tubuh yang lainnya seperti selaput otak, tulang, dan lain-lain. Penyakit ini dapat menular dari satu individu ke individu lain melalui udara ketika individu yang menderita tuberkulosis paru mengeluarkan

terium tuberculosis, misalnya dengan batuk atau bersin. Pada bayi lebih terinfeksi tuberkulosis. Hal ini disebabkan karena sistem imun pada bayi



yang belum sempurna, terjadi kontak dengan orang dewasa penderita tuberkulosis di sekitarnya dan kurangnya kesadaran orang tua untuk sedini mungkin melakukan imunisasi vaksin BCG pada bayi baru lahir.

Satu-satunya vaksin yang berlisensi saat ini yang digunakan untuk mencegah tuberkulosis ialah vaksin Bacille Calmette Guérin (BCG). Vaksin ini pertama kali diberikan pada tahun 1921 pada sebagian besar bayi baru lahir di seluruh dunia dengan harapan akan melindungi bayi terhadap tuberkulosis. Namun, perlindungan yang diberikan BCG terhadap tuberkulosis tidak sempurna dan ber (Colditz *et al.*, 1994).

Uji klinis vaksin BCG menunjukkan adanya efikasi variabel (0% hingga 80%) (Fine, 1995). Level perlindungan dari vaksin BCG sangat bervariasi. Terdapat banyak hipotesis yang menyebabkan variabilitas ini termasuk perbedaan dalam virulensi tuberkulosis, dipengaruhi oleh kasus penderita tuberkulosis dengan berbagai kelemahan imunitas serta juga faktor garis lintang geografis, misalnya BCG telah terbukti berkhasiat di Inggris dan Amerika Utara, tetapi tidak demikian di India dan Afrika (Colditz *et al.*, 1994), dan perbedaan dalam paparan mikobakteri non-TB juga dapat mengganggu efikasi BCG (Black *et al.*, 2002).

Indonesia merupakan salah satu negara dengan penderita tuberkulosis yang sangat tinggi. Walaupun pemberian vaksin BCG sudah termasuk dalam program imunisasi rutin nasional di Indonesia, tetapi vaksin BCG tidak bisa diandalkan lagi karena sudah lebih dari 90 tahun sejak vaksin ditemukan angka kematian akibat TB di Indonesia setiap tahun semakin meningkat.

Pencarian vaksin baru diperlukan untuk mencegah tuberkulosis. Kandidat vaksin baru ini diharapkan dapat menjadi alternatif vaksin yang digunakan saat ini, yaitu BCG. Penelitian tentang pengembangan efikasi vaksin BCG



terus dilakukan. Terdapat lebih dari 200 kandidat vaksin telah diusulkan, dan beberapa kandidat vaksin diantaranya telah memasuki tahap pengujian secara klinis. Pada hasil uji klinis fase IIB dari kandidat vaksin MVA85A ternyata tidak bisa memberikan perlindungan yang signifikan terhadap penyakit tuberkulosis (Tameris *et al.*, 2013).

Salah satu protein yang disekresikan paling banyak dari *Mycobacterium tuberculosis* yaitu MPT63 yang dikode oleh gen Rv1926c (Nagai *et al.*, 1991). Studi imunologi telah dilakukan pada MPT63 dan terbukti protein ini dapat merangsang respon imun humoral pada babi guinea yang telah terinfeksi virulen dari *Mycobacterium tuberculosis* (Manca *et al.*, 1997). MPT63 mampu menginduksi reaktivitas sel Th1 dan juga menginduksi proliferasi dan IFN γ (Werninghaus *et al.*, 2003). Hal ini yang menyebabkan MPT63 bisa menjadi salah satu kandidat vaksin tuberkulosis.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan isolasi gen Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* isolat Makassar. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan kloning gen Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* isolat makassar ke *Escherichia coli* JM109. Dihasilkannya klon rekombinan tersebut diharapkan dapat memberikan perlindungan sehingga mengurangi angka mortalitas yang disebabkan oleh TB.

II.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Untuk melakukan kloning gen Rv1926c dari *Mycobacterium tuberculosis* isolat makassar ke *Escherichia coli* JM109 sebagai kandidat vaksin tuberkulosis.



2. Untuk melakukan karakterisasi klon rekombinan (Rv1926c-pGEM-T) dengan PCR dan isolasi plasmid rekombinan

II.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini, yaitu sebagai berikut:

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan klon rekombinan Rv1926c – pGEM-T.
2. Hasil penelitian ini dapat menjadi referensi untuk pengembangan penelitian selanjutnya.

II.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November-Desember 2018, bertempat di Unit Tuberkulosis *Hasanuddin University Medical-Research Center* (HUM – RC), Universitas Hasanuddin, Makassar dan analisis data dilakukan di Laboratorium Genetika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam, Departemen Biologi, Universitas Hasanuddin, Makassar.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Menurut Vasanthakumari (2007) klasifikasi *Mycobacterium tuberculosis* yaitu sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Phylum : Actinobacteria
Class : Actinobacteria
Order : Actinomycetales
Family : Mycobacteriaceae
Genus : *Mycobacterium*
Species : *Mycobacterium tuberculosis*

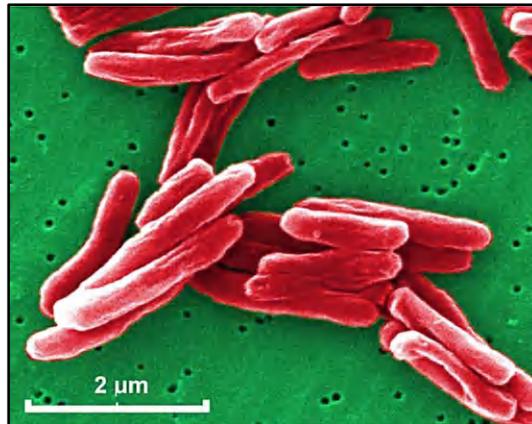
Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri penyebab penyakit tuberkulosis. Bakteri ini berbentuk batang, tidak berspora, tidak berkapsul, dan bersifat *aerob obligatif* (Todar, 2008). Dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* sebagian besar atas asam lemak (lipid), peptidoglikan dan arabiomanna. Kandungan lipid inilah yang menyebabkan *Mycobacterium tuberculosis* lebih tahan terhadap asam. Hal ini menyebabkan bakteri ini disebut juga sebagai bakteri tahan asam (BTA).

Mycobacterium tuberculosis memiliki kemampuan untuk dapat bertahan hidup di udara yang kering ataupun dalam keadaan yang dingin. Hal ini disebabkan

Mycobacterium tuberculosis berada dalam sifat dorman atau laten

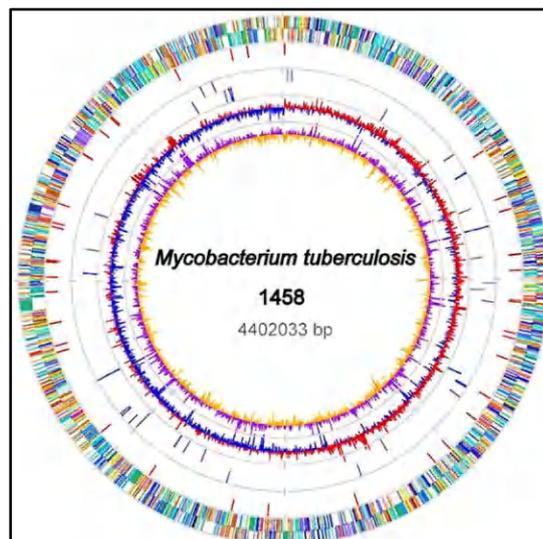


sehingga bakteri ini dapat hidup kembali dan menyebabkan penyakit tuberkulosis (Amin dan Bahar, 2009).



Gambar 1. Morfologi *Mycobacterium tuberculosis*
Sumber: CDC, 2013

Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv merupakan strain yang paling sering digunakan dalam laboratorium. Genom dari *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv merupakan genom yang sudah lengkap dan diterbitkan sejak tahun 1998. Genom dari *Mycobacterium tuberculosis* terdiri 4.411.529 pasangan basa, mengandung sekitar 4.000 gen (Cole *et al.*, 1998).



Gambar 2. Peta genom *Mycobacterium tuberculosis*
Sumber: Xiong *et al.*, 2017



II.2 Penyakit Tuberkulosis

II.2.1 Gejala

Adapun gejala klinik pada tuberkulosis dibagi menjadi 2 jenis, yaitu gejala respiratorik dan gejala sistemik (PDPI, 2002):

1. Gejala Respiratorik

Gejala respiratorik terjadi apabila organ yang terinfeksi adalah paru-paru. Ciri-ciri dari gejala yang ditimbulkan seperti batuk selama 2 minggu lebih, batuk darah, terasa nyeri di dada dan sesak napas.

2. Gejala Sistemik

Gejala sistemik yaitu jika organ yang terinfeksi dirasakan pada seluruh tubuh dan tidak hanya spesifik pada satu organ dan gejala yang timbul tergantung dari organ yang terlibat. Ciri-ciri dari gejala yang ditimbulkan yaitu demam, menurunnya berat badan, anoreksia serta keluarnya keringat di malam hari.

II.2.2 Patogenesis

Patogenesis dari tuberkulosis membahas mengenai seberapa efektifnya tuberkulosis sehingga mampu menyebabkan mikobakteri yang ada didalam tubuh menyebabkan terjadinya infeksi dan kemudian bisa hidup di dalam inang. Tuberkulosis dapat ditularkan dari inhalasi *droplet* yang dikeluarkan oleh penderita. Tiap *droplet* yang dikeluarkan oleh penderita bisa mengandung 1 hingga 400 basil (IVL, 2014).

Sebagian *Mycobacterium tuberculosis* akan difagositosis oleh makrofag

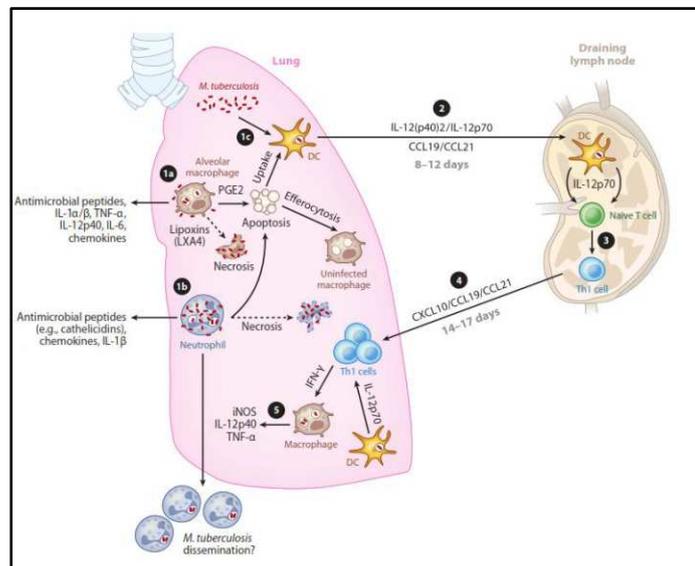
di dalam alveolus tetapi makrofag sepenuhnya belum mampu menelan semua bakteri tersebut. Hal ini menyebabkan bakteri yang ada



didalam makrofag tersebut umumnya akan tetap hidup dan berkembang biak (Sheffield, 1994). Makrofag yang terinfeksi bakteri tersebut lama kelamaan akan berubah menjadi granuloma dan seiring waktu, pusat-pusat dari granuloma ini akan mengalami nekrosis sehingga menyebabkan adanya campuran darah dan dahak di paru-paru (IVL, 2014).

II.2.3 Respon Imun Terhadap Tuberkulosis

Proses untuk menghilangkan atau mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis* didalam tubuh sangat bergantung pada keberhasilan interaksi antara sel makrofag dan sel limfosit T. Sel TCD4⁺ akan memproduksi sitokin utama yaitu IFN- γ setelah mendapat stimulasi dari antigen yaitu dalam hal ini *Mycobacterium tuberculosis*. Sedangkan sel TCD8⁺ akan mensekresikan sitokin dan melisis sel yang telah terinfeksi (Emoto *et al.*, 1999).



Gambar 3. Respon imun seluler terhadap *Mycobacterium tuberculosis*
Sumber: O'Garra *et al.*, 2013



Setelah *Mycobacterium tuberculosis* masuk kedalam paru-paru, maka sel (1a), neutrofil (1b) dan DC (1c) bisa menjadi terinfeksi, sehingga

menyebabkan adanya produksi antimikroba peptida, sitokin dan kemokin. Keseimbangan mediator lipid, seperti prostaglandin atau lipoxin, dalam makrofag yang terinfeksi berperan dalam menentukan jalur yang akan mengarah ke induksi apoptosis atau nekrosis. Sel-sel apoptosis yang telah terinfeksi akan diambil oleh DC dan kemudian akan bermigrasi ke kelenjar getah bening paru-paru pada 8-12 hari pasca infeksi di bawah pengaruh IL-12 (p40) 2 dan IL-12p70 serta kemokin seperti CCL19 dan CCL21 (2), akan mendorong diferensiasi sel T naif menjadi Th1 (3). Sel-sel Th1 akan bermigrasi kembali ke paru-paru dibawah pengaruh kemokin selama 14-17 hari setelah paparan (4) dan menghasilkan IFN- γ , yang mengarah ke aktivasi makrofag, produksi sitokin, induksi mikrobisida faktor termasuk iNOS (5), dan kontrol bakteri (O'Garra *et al.*, 2013).

II.3 Vaksin

Vaksin adalah salah satu zat yang merupakan suatu bentuk dari produk biologi yang diketahui berasal dari virus, bakteri atau kombinasi antara keduanya yang telah dilemahkan. Vaksin diberikan kepada individu yang sehat dengan tujuan untuk merangsang munculnya antibodi atau kekebalan tubuh untuk mencegah infeksi penyakit tertentu (Kemenkes, 2019).

Terdapat dua jenis dasar vaksin yaitu vaksin hidup yang telah dilemahkan dan vaksin yang sudah tidak aktif. Vaksin yang telah dilemahkan langsung diproduksi dengan cara memodifikasi virus atau bakteri penghasil penyakit.

Vaksin yang telah dilemahkan tetap mempertahankan kemampuannya untuk (tumbuh) dan menghasilkan kekebalan, tetapi biasanya tidak pkan penyakit. Vaksin virus yang dilemahkan langsung adalah campak,



rubella, gondong, vaccinia, rotavirus, dan influenza. Sedangkan vaksin dari bakteri adalah bacille Calmette-Guérin dan vaksin tifoid oral (CDC, 2015).

Vaksin BCG pertama kali digunakan pada manusia tahun 1921, selanjutnya vaksin ini penggunaannya meluas ke berbagai negara di dunia dengan tingkat protektivitas yang bervariasi. BCG dapat mendorong terjadinya efek stimulasi sistem imun. Selain vaksin ini mampu memacu respon imun yang diperantarai sel T, BCG juga diketahui dapat meningkatkan proliferasi dari limfosit. Secara *in vitro*, pemberian BCG dapat meningkatkan jumlah limfosit CD4⁺ yang terbukti dengan meningkatnya jumlah sel-sel CD4⁺ yang ada didalam kultur (Moliva *et al.*, 2017).

Keefektifan vaksin BCG terhadap tuberkulosis paru pada populasi manusia sangat bervariasi dan berkisar antara 0% hingga 80%. Penyebab variabilitas vaksin BCG dikaitkan dengan banyak faktor, termasuk genetika, paparan mikobakteri lingkungan dan lokasi geografis (Mori, 2001).

Paparan mikobakteri lain selain *Mycobacterium tuberculosis* dapat mengganggu efikasi dari vaksin BCG. Hipotesis ini dibuktikan dalam penelitian Black, *et al.* (2002) di mana anak-anak yang ada di London dan Malawi masing-masing diberi vaksin BCG. Anak-anak di London memiliki kekebalan mikobakteri dasar yang rendah sehingga secara signifikan meningkat setelah diberi vaksin BCG. Sebaliknya, anak-anak di Malawi memiliki respon latar belakang yang tinggi akibatnya sedikit saja peningkatan setelah divaksinasi. Data ini menunjukkan bahwa imunitas sebelumnya yang

an oleh mikobakteri selain *Myobacterium tuberculosis* ternyata



menutupi efek dari vaksin BCG atau memblokir BCG dengan cara menghambat replikasi vaksin BCG (Brandt *et al.*, 2002).

Tipe vaksin yang kedua yaitu vaksin yang tidak aktif. Vaksin yang tidak aktif berupa virus atau bakteri, atau komponen kecil dari keduanya. Vaksin ini diproduksi dengan cara menumbuhkan bakteri atau virus pada suatu medium, kemudian menonaktifkannya dengan cara dipanaskan dan atau diberi bahan kimia (biasanya formalin). Untuk vaksin fraksional, organisme diberi perlakuan lebih lanjut untuk dimurnikan agar hanya komponen-komponen saja yang akan dijadikan sebagai vaksin. Misalnya vaksin fraksional ialah vaksin subunit dan vaksin toksoid. Contoh vaksin yang tidak aktif untuk sel utuh ialah polio, hepatitis A, dan rabies. Vaksinasi fraksional termasuk toksoid contohnya vaksin untuk difteri, tetanus dan vaksin subunit contohnya vaksin untuk hepatitis B, influenza, pertusis aselular, human papillomavirus, antraks (CDC, 2013).

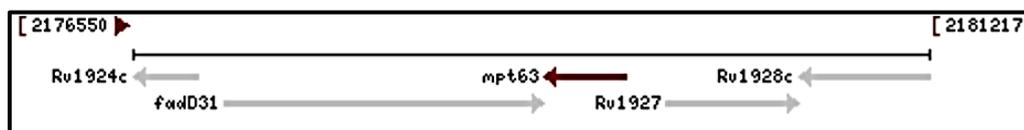
Vaksin subunit merupakan vaksin yang mengandung beberapa epitop dari suatu antigen. Pembuatan vaksin subunit salah satunya dapat dilakukan dengan cara rekayasa DNA rekombinan, menggunakan plasmid sebagai vektor dan diekspresikan pada berbagai sistem ekspresi misalnya pada *Escherichia coli* (Yuwono, 1995). Salah satu jenis protein yang akan dijadikan sebagai kandidat vaksin subunit untuk mencegah penyakit tuberkulosis yaitu protein imunogenik MP63. Protein ini dikode oleh salah satu jenis gen yang ada pada *Mycobacterium tuberculosis* yaitu gen Rv1926c (NCBI, 2018). MPT63 merupakan salah satu protein yang paling banyak disekresikan dari

Mycobacterium bovis atau *Mycobacterium tuberculosis*, termasuk *Mycobacterium bovis* strain BCG (Nagai *et al.*, 1991).



Horwitz *et al.* (1995) melaporkan bahwa protein MPT63 dijadikan sebagai target untuk respon imun pada individu yang terinfeksi tuberkulosis. Manca *et al.* (1997) melaporkan bahwa protein rekombinan MPT63, ketika dimurnikan dari sel *Escherichia coli*, dan MPT63 asli yang dimurnikan dari filtrat kultur *Mycobacterium tuberculosis*, keduanya tidak dapat dibedakan dalam tes serologis. MPT63 juga merangsang respon imun humoral pada babi guinea yang terinfeksi virulen *Mycobacterium tuberculosis*.

Pada percobaan McShane *et al.* (2001) mengenai vaksin DNA gabungan pada tikus menunjukkan bahwa MPT63 ternyata imunoreaktif dalam tes antibodi pada manusia dan hewan serta memberikan perlindungan. Vaksin DNA yang mengkodekan antigen MPT63 dan ESAT-6 ternyata menginduksi respons imun yang kuat. MPT63 juga menginduksi reaktivitas sel Th1 dan juga menginduksi proliferasi dari IFN γ (Werninghaus *et al.*, 2003).



Gambar 4. Posisi gen Rv1926c – protein imunogenik MPT63 *M. tuberculosis*
 Sumber: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

II.4 Kloning Gen

II.4.1 Komponen Kloning

Terdapat beberapa komponen kloning menurut Soekarno (2011) yaitu:

II.4.1.1 DNA Sisipan

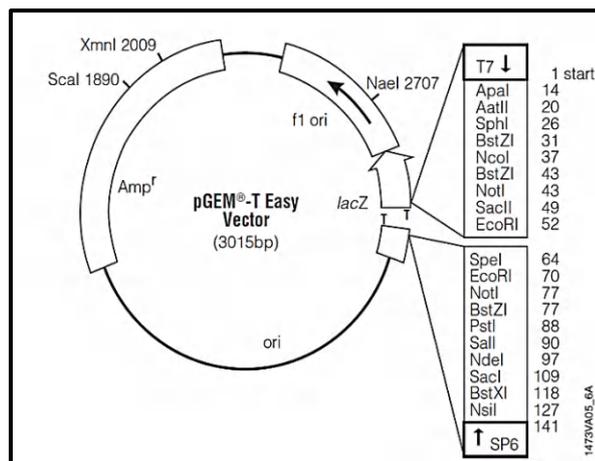
DNA sisipan merupakan sampel DNA yang mengandung ukuran target. Sisipan dapat berupa DNA genom atau DNA komplementer (Snustad dan Soekarno, 2003).



II.4.1.2 Vektor

Vektor merupakan DNA untai ganda sirkuler yang ukurannya kecil (2000-5000 pb) yang mampu membawa DNA asing masuk kedalam sel inang dan kemudian akan melakukan replikasi dirinya didalam sel inang (Campbell *et al.*, 2002). Terdapat beberapa syarat yang harus dipenuhi oleh suatu molekul DNA agar bisa dijadikan sebagai vektor yaitu harus memiliki penanda awal replikasi atau *origin of replication* (ORI), penanda seleksi (misalnya *antibiotic*), serta situs pengenalan retriksi yang unik (*multiple cloning sites/ MCS*) (Snustad & Simmons, 2003).

Berdasarkan fungsinya, vektor dibagi menjadi dua, yaitu vektor kloning dan vektor ekspresi. Vektor kloning ialah vektor yang digunakan untuk perbanyak gen saja. Sementara vektor ekspresi ialah vektor yang bukan hanya melakukan perbanyak tetapi vektor ini juga memiliki sinyal-sinyal ekspresi. Hal ini menyebabkan gen yang dikloning juga dapat menjadi mRNA dan kemudian ditranslasi menjadi sebuah protein (Brown, 1987). Salah satu jenis vektor yang digunakan dalam prosedur kloning ialah plasmid pGEM-T *Easy*.



Gambar 5. Peta pGEM®-T *Easy* Vector
Sumber: www.promega.com



pGEM-T *Easy* merupakan plasmid sirkular yang terbuka, memiliki dua ORF dan daerah penanda seleksi yaitu ampisilin (*Amp*) serta memiliki MCS. pGEM-T *Easy* memiliki ukuran sebesar 3015 bp. Ukuran ini relatif kecil sehingga pGEM-T *Easy* mampu membawa DNA sisipan cukup banyak dan lebih mudah dimasukkan ke dalam sel inang (Agus, 2017).

II.4.1.5 Sel Inang

Sel inang yang digunakan dalam prosedur kloning harus memiliki beberapa kriteria yaitu memiliki laju pertumbuhan yang cepat, tumbuh dalam jumlah banyak, nonpatogen, genomnya telah dipetakan, dapat menerima vektor, serta dapat mengekspresikan gen asing (Tamarin, 2002). Sel inang eukariot yang sering digunakan dalam prosedur kloning yaitu *Escherichia coli*. Sementara sel inang eukariot yaitu *Saccharomyces cerevisiae* (Davis *et al.*, 1994).

II.4.2 Tahapan Kloning

Tujuan utama dari kloning yaitu menghasilkan sejumlah besar molekul DNA rekombinan yang dihasilkan dari jumlah bahan awal yang terbatas. Pada awalnya hanya beberapa DNA rekombinan yang tersedia, tetapi setiap bakteri yang disisipi plasmid kemudian membelah beberapa kali untuk menghasilkan koloni (Brown, 2010).

Prosedur kloning gen dimulai dari pemotongan vektor dengan menggunakan enzim restriksi, sehingga DNA vektor yang awalnya sirkuler akan terbuka sehingga menjadi linier. DNA sisipan dan DNA vektor kemudian digabungkan sehingga

terbentuk DNA rekombinan (Snustad and Simmons, 2006). Proses penggabungan antara DNA sisipan dan DNA vektor dinamakan proses ligasi dalam



kloning. Proses ligasi berlangsung dengan menggunakan enzim DNA ligase (Ausubel *et al.*, 1995). DNA rekombinan selanjutnya dimasukkan kedalam sel inang atau proses ini disebut juga dengan transformasi (Grompe *et al.*, 1998).

Proses transformasi memiliki beberapa metode dan metode yang digunakan harus bergantung dari sel inang yang akan dipakai. Misalnya, metode yang dipakai dalam proses transformasi yaitu penggunaan CaCl_2 . CaCl_2 dipicu dengan *heat shock*. Hal ini menyebabkan DNA rekombinan ada pada membran luar dari sel kompeten dapat masuk ke dalam sel kompeten. Sel kompeten sel yang telah diberi perlakuan fisik atau kimia sehingga meningkatkan kemampuannya untuk menerima DNA rekombinan (Wong, 1997).

Kunci keberhasilan atau kegagalan suatu kloning adalah kemampuan melakukan seleksi terhadap gen target yang akan dikloning. Bila suatu gen berhasil diklon, maka mudah untuk memperoleh informasi tentang struktur, fungsi, dan ekspresi pada gen tersebut (Brown, 2010).

II.4.3 Karakterisasi Kloning

Tujuan karakterisasi kloning ialah untuk menyeleksi DNA rekombinan. Proses ini dapat dilakukan dengan menguji resistensinya terhadap antibiotik, ditumbuhkan di medium yang selektif, *blue-white screening*, dan analisis restriksi dari vektor.

Uji resistensi antibiotik dilakukan jika vektor kloning membawa gen penyebab resisten terhadap antibiotik. Misalnya resisten terhadap antibiotik

. Ampisilin mampu menghambat beberapa enzim yang bekerja dalam dinding sel. Vektor yang memiliki gen resisten terhadap ampisilin mengkode enzim β -laktamase. Enzim β -laktamase akan



mengkatalisis reaksi hidrolisis cincin β -laktam ampisilin. Hal ini menyebabkan bakteri resisten terhadap ampisilin (Sambrook dan Russell, 2001).

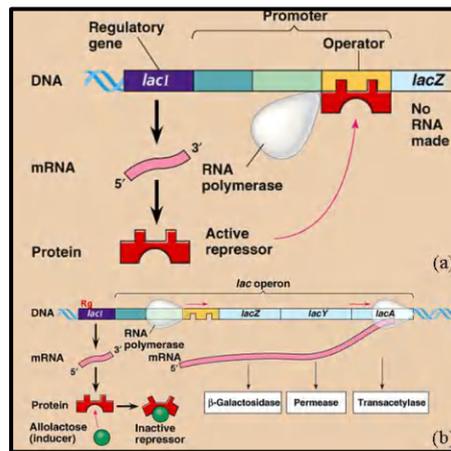
Seleksi biru putih yaitu metode yang digunakan untuk memisahkan sel yang mengandung plasmid rekombinan dengan sel mengandung plasmid tanpa DNA sisipan. Tujuan dilakukan seleksi ini yaitu untuk mengetahui apakah proses ligasi yang dilakukan itu berhasil atau untuk mengetahui keberadaan dari DNA sisipan.

Pada prosedur seleksi biru putih ini menggunakan media yang sudah mengandung 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside (X-gal) dan Isopropil-1-tio- β -galaktosidase (IPTG). Apabila sel bakteri yang mengandung plasmid tanpa DNA sisipan kemudian ditumbuhkan pada media yang telah diberi X-gal, IPTG dan ampisilin, maka gen *lac-Z* akan terekspresikan dan β -galaktosidase dihasilkan. β -galaktosidase adalah salah satu dari serangkaian enzim yang terlibat dalam pemecahan laktosa menjadi glukosa ditambah galaktosa dan dikode oleh gen *lacZ* yang berada pada kromosom *Escherichia coli* (Brown, 2010).

Aktivitas dari enzim β -galaktosidase dapat diuji menggunakan senyawa X-gal. X-gal akan dipecah oleh enzim β -galaktosidase sehingga menyebabkan warna biru pada medium (Brown, 2010). β -galaktosidase dikode oleh gen *lacZ*. IPTG digunakan sebagai *induser*. Bakteri yang memiliki DNA rekombinan tidak bisa menghasilkan enzim β -galaktosidase, sedangkan bakteri yang mengandung plasmid saja tanpa DNA sisipan akan menghasilkan enzim β -galaktosidase sehingga bakteri ini mampu memecah X-gal (Noviendri, 2007).



Jika X-gal (ditambah induser enzim seperti IPTG) ditambahkan ke agar, bersama dengan ampisilin, maka koloni yang non-rekombinan, sel-sel yang mensintesis β -galaktosidase, akan berwarna biru, sedangkan rekombinan dengan gen *lacZ* yang terganggu dan tidak dapat membuat β -galaktosidase, akan menyebabkan koloni berwarna putih (Brown, 2010).



Gambar 6. Ekspresi operon *Lac* pada *Escherichia coli* (a) Sistem operon *lac* tanpa inducer (b) Sistem operan *lac* dengan inducer
Sumber: Campbell, 2002.

