

**KLONING GEN Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* KE
Escherichia coli BL21 SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN TUBERKULOSIS**

UNZIA SAGITA PUTRI

H411 15 301



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

**KLONING GEN Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* KE
Escherichia coli BL21 SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN TUBERKULOSIS**

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

**UNZIA SAGITA PUTRI
H41115301**

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



HALAMAN PENGESAHAN

**KLONING GEN Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* KE
Escherichia coli BL21 SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN TUBERKULOSIS**

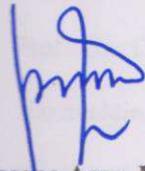
Disusun dan diajukan oleh

UNZIA SAGITA PUTRI

H41115301

Disetujui oleh:

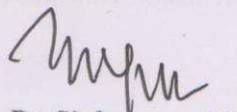
Pembimbing Utama,



Dr. Rosana Agus, M.Si.

NIP. 19650905 199103 2 003

Pembimbing Pertama,



Dr. Sjafarhenan, M.Si

NIP. 195808161987032001



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas segala nikmat yang telah tercurah sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi yang telah disusun ini berjudul “**Kloning Gen Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* ke *Escherichia coli* BL21 sebagai Kandidat Vaksin Tuberkulosis**” disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari banyaknya pihak-pihak yang telah membantu selama masa perkuliahan, penelitian, hingga penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada Dr. Rosana Agus, M.Si., dan Dr. Sjafaraenan, M.Si., selaku pembimbing yang telah membantu dan membimbing penulis dalam melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi.

Selain itu, perkenankanlah penulis menghaturkan terima kasih dan penghargaan setinggi tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhhu M.A selaku rektor Universitas Hasanuddin.
2. Dr. Eng Amiruddin, M.Si. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si. selaku ketua departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin



4. Dr. Elis Tambaru, M.Si. selaku penasehat akademik yang senantiasa memberikan masukan dan motivasi kepada penulis.
5. Staf pengajar dan pegawai Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Unhas atas segala ilmu, masukan dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis.
6. Kepada sahabat-sahabatku sejak SMP (SBS2), sahabatku Sukmawati, Afryani, Eka Pratiwi Sahib, teman-teman IPA5, dan sahabatku Femes (Putri, Miftha, Tri, Asmin, Nurul, Deby, Winis) yang selalu memberi dukungan hingga saat ini.
7. Teman-teman seperjuangan skripsi Reski Rahmawati Anwar, Musdalifah, Nurhidayah Haruna, Wa Ode Kamilah, Nurul Padhilah, Jessica Dea Rapar, Risa Dengan Parura, Wa Ode Siti Purnamasari, Rosdiana Marzuki, St. Nurkhalisa Syam, dan teman-teman Biologi Unhas 2015 terima kasih untuk bantuan dan motivasinya. Terkhusus kepada Asnidar yang selalu ada dan menjadi tempat keluh kesahku, terima kasih.
8. Teman-teman Pengurus BEM FMIPA Unhas periode 2018-2019 terimakasih atas partisipasi dan support kalian.
9. Semua pihak yang tidak sempat disebutkan satu persatu yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari penyelesaian skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Akhirnya dengan segala kerendahan hati, penulis berharap skripsi ini bermanfaat bagi kalangan akademis, mahasiswa biologi dan bagi pengembangan ilmu pengetahuan kelak.

Terkhusus kepada orang tuaku ayahanda Haeruddin, Irmawati dan adik-adikku yang tak henti-hentinya memberikan dukungan, doa, nasehat,



dan motivasi hingga penulis tetap kuat dan bersemangat dalam menyelesaikan studi.

Makassar, Januari 2019

Penulis



ABSTRAK

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen *Mycobacterium tuberculosis*. Semakin meningkatnya populasi penderita tuberkulosis membuktikan bahwa pemberian vaksin BCG kurang efektif sehingga diperlukan inovasi baru untuk mengurangi insiden TB. Salah satu yang dapat menjadi kandidat vaksin tuberkulosis ialah gen Rv1926c. Gen tersebut mengkode protein MPT63 yang bersifat imunogenik, berarti dapat merangsang respon imun baik yang humoral maupun seluler. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan kloning gen Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* ke *Escherichia coli* BL21 sehingga diperoleh plasmid rekombinan. Prosedur untuk melakukan kloning ke *Escherichia coli* BL21 yaitu, persiapan insert pGEM-T Easy- Rv1926c, purifikasi DNA sisipan, selanjutnya pembuatan sel kompeten *Escherichia coli* BL21, ligasi gen Rv1926c ke vektor ekspresi pQE 30Xa, kemudian mentransformasikan plasmid rekombinan ke *Escherichia coli* BL21. Karakterisasi dilakukan dengan PCR koloni dan isolasi plasmid rekombinan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen Rv1926c telah berhasil dikloning ke *Escherichia coli* BL21 sehingga diperoleh plasmid rekombinan dengan terbentuknya koloni putih. Kata Kunci: Rv1926c, pQE 30Xa, *E.coli* BL 21.



ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a disease caused by pathogenic bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. The increasing population of tuberculosis patients proves that the BCG vaccine is less effective so that new innovations are needed to reduce incidents TB. One of the candidates for tuberculosis vaccine candidates is the Rv1926c gene. The gene codes for MPT63 protein which is immunogenic, meaning it can stimulate immune responses both humorally and cellular. This study aims to clone the Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* gene to the *Escherichia coli* BL21 so that recombinant plasmids are obtained. The procedure for cloning the *Escherichia coli* BL21 is, preparation of insert pGEM-T Easy-Rv1926c, purification of DNA insert, then making *Escherichia coli* BL21 competent cell, ligation of Rv 1926c gene to pQE 30Xa expression vector, then transforming recombinant plasmid to *Escherichia coli* BL21 . Characterization was carried out by colony PCR and isolation of recombinant plasmids. The results showed that the Rv1926c gene was successfully cloned to the *Escherichia coli* BL21 so that recombinant plasmids were obtained by the formation of white colonies.

Keywords: Rv1926c, pQE 30Xa, *E. coli* BL 21.



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Tujuan Penelitian.....	3
I.3 Manfaat Penelitian.....	3
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Karakteristik <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
II.1.1 Taksonomi.....	4
II.1.2 Morfologi.....	4
II.1.3 Genom.....	6
II.2 Penyakit Tuberkulosis.....	7
II.2.1 Gejala.....	9
II.2.2 Patogenesis dan Imunitas.....	11
BCG (<i>Bacille Calmettae Guerin</i>).....	14
Rv1926c.....	17



II.5 Kloning.....	17
II.6 Sel Inang.....	21
BAB III METODE PENELITIAN.....	23
III.1 Alat dan Bahan.....	23
III.1.1 Alat.....	23
III.1.2 Bahan.....	23
III. 2 Prosedur Kerja.....	24
III.2.1 Persiapan DNA Sisipan Rv 1926c dari Klon rekombinan pGEM-T <i>Easy</i>	24
III.2.2 Purifikasi DNA Sisipan.....	24
III.2.3 Pembuatan Sel Komptoten <i>E.coli</i> BL21.....	24
III.2.4 Ligasi gen Rv 1926c ke Vektor ekspresi pQE 30Xa.....	25
III.2.5 Transformasi Plasmid Rekombinan ke <i>E.coli</i> BL21.....	25
III.2.6 PCR Koloni.....	26
III.2.7 Isolasi Plasmid Rekombinan.....	27
III.2.8 Elektroforesis.....	27
III.3 Analisis Data.....	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
IV.1 Persiapan DNA Sisipan Rv 1926c dari Klon Rekombinan pGEM-T <i>Easy</i>	29
IV.2 Ligasi Gen Rv 1926c ke Vektor Ekspresi pQE 30Xa.....	31
IV.3 Transformasi Plasmid Rekombinan ke Host <i>E.coli</i> BL21.....	33
IV.4 Karakterisasi Klon Rekombinan.....	34
IV.4.1 PCR Koloni.....	34
IV.4.2 Isolasi Plasmid Rekombinan.....	36



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	37
V.1 Kesimpulan.....	37
V.2 Saran.....	37
DAFTAR PUSTAKA.....	38
LAMPIRAN.....	41



DAFTAR TABEL

Tabel 1 Komposisi Luria Bertani (LB) Padat.....	42
Tabel 2. Komposisi Luria Bertani (LB) Cair.....	43
Tabel 3. Komposisi Reagen Purifikasi.....	43
Tabel 4. Komposisi Reagen Ligasi.....	44
Tabel 5. Komposisi Reagen Transformasi ke Sel <i>E.coli</i> BL21.....	45
Tabel 6. Reagen PCR Koloni.....	45
Tabel 7. Reagen Isolasi Plasmid.....	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
Gambar 2. Genom Sirkuler <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv..... (Cole, <i>et al.</i> , 1998)	6
Gambar 3. Peta Genom <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Sampson, <i>et al.</i> , 2001)	7
Gambar 4. Makrofag yang terinfeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv..... (Mc.Donough, 1993)	14
Gambar 5. <i>Sequence</i> gen Rv1926c - MPT63 <i>M. tuberculosis</i> (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	17
Gambar 6. Vektor QE 30Xa dalam Sistem Ekspresi Protein..... (Qiagen, 2008)	20
Gambar 7. Hasil Elektroforesis Restriksi pQE 30Xa.....	29
Gambar 8. Hasil Elektroforesis Insert Rv 1926c.....	30
Gambar 9. Hasil Transformasi gen Rv 1926c – pQE 30Xa ke <i>E.coli</i> BL21.....	32
Gambar 10. Hasil Elektroforesis PCR Koloni.....	33
Gambar 11. Hasil Elektroforesis Isolasi Plasmid.....	35
Gambar 12. Peta Marka pQE30Xa – Rv 1926c.....	36
Gambar 13. Persiapan Insert Rv 1926c dari pGEM-T <i>Easy</i>	38
Gambar 14. Komposisi LB.....	43
Gambar 15. Reagen Purifikasi.....	44
Gambar 16. Pembuatan Media Luria Bertani.....	48
Gambar 17. Pembuatan Sel Kompeten.....	49
Gambar 18. Transformasi Plasmid Rekombinan.....	49
Gambar 19. Karakterisasi Klon Rekombinan.....	50
Gambar 20. Elektroforesis Gel Agarosa.....	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian.....	41
Lampiran 2. Skema Pembuatan Gel Agarosa.....	42
Lampiran 3. Komposisi Pembuatan media Luria Bertani (LB).....	42
Lampiran 4. Komposisi Reagen Purifikasi.....	43
Lampiran 5. Komposisi Reagen Ligasi.....	44
Lampiran 6. Reagen Transformasi ke Sel <i>E.coli</i> BL21.....	45
Lampiran 7. Reagen PCR Koloni.....	45
Lampiran 8. Reagen Isolasi Plasmid.....	45
Lampiran 9. Full Genom MPT 63.....	46
Lampiran 10. Vektor pQE 30Xa.....	47
Lampiran 11. Foto Prosedur Kerja.....	48



BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tuberkulosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri ini bersifat aerob (menyukai oksigen), sehingga umumnya terdapat dibagian apeks paru-paru yang kaya oksigen. Selain menyerang paru-paru, *Mycobacterium tuberculosis* dapat pula menyerang organ lain seperti tulang maupun ginjal. Tuberkulosis termasuk penyakit menular yang penularannya melalui udara atau melalui cairan yang keluar dari tenggorokan.

Penderita tuberkulosis pada tahun 2002 dan 2009 mencapai 100.000 populasi dan meningkat pada tahun 2013. WHO telah menerbitkan laporan TB global setiap tahun sejak 1997. Di negara Asia sejak tahun 2013 hingga 2017 penderita tuberkulosis mengalami peningkatan drastis khususnya di negara-negara berkembang. Saat ini, Indonesia berada pada urutan kedua dengan populasi penderita tuberkulosis terbanyak di dunia setelah India. Tuberkulosis adalah penyebab kematian kesembilan di seluruh dunia dan penyebab utama dari satu agen infeksius, dibawah HIV/AIDS. Pada tahun 2016, diperkirakan ada 1,3 juta kematian TB di antara orang HIV-negatif (turun dari 1,7 juta pada tahun 2000) dan tambahan 374.000 kematian di antara orang HIV-positif. Sekitar 10,4 juta orang (90% orang dewasa; 65% laki-laki; 10 % orang yang hidup dengan HIV)

t dengan TB pada tahun 2016 (yaitu kasus insiden) (WHO, 2017).

upaya pencegahan penyakit tuberkulosis dilakukan dengan vaksinasi individu sejak kecil. Vaksinasi merupakan pemberian antigen untuk



menstimulasi respon imun di dalam tubuh sehingga nantinya kebal terhadap antigen tersebut. Adapun vaksin yang digunakan saat ini ialah vaksin BCG (*Bacillus Calmette Guerin*). Pemberian BCG lebih efektif pada bayi atau anak-anak dan hanya diberikan satu kali saja. Imunisasi BCG untuk menimbulkan kekebalan aktif terhadap penyakit tuberkulosis. BCG terdiri dari *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan dan mulai dikembangkan sejak tahun 1906 serta diperkenalkan mulai tahun 1920. WHO merekomendasikan pemberian vaksin BCG yang diberikan saat lahir atau beberapa saat setelah lahir. imunisasi BCG telah dilakukan lebih dari 90% negara di dunia pada tahun 2002. Sekitar 100.5 juta anak (76%) dari total 132.8 juta anak telah mendapatkan imunisasi BCG (Suharti dan Putra, 2011)

Pemberian vaksin BCG ternyata tidak berdampak sama pada setiap orang. Hampir semua negara terkhusus di Indonesia setelah pemberian BCG tidak semua dapat terhindar dari penyakit tuberkulosis. Hal ini karena BCG tidak mutlak mencegah tuberkulosis. Selain itu, bakteri *Mycobacterium tuberculosis* semakin lama juga semakin kebal terhadap BCG. Namun, di Indonesia saat ini masih menggunakan BCG sebagai pencegah tuberkulosis. Semakin meningkatnya populasi penderita tuberkulosis di Indonesia membuktikan bahwa pemberian vaksin BCG kurang efektif seiring berlalunya waktu, yaitu hanya dalam waktu 5-15 tahun. Oleh karena itu, diperlukan inovasi baru yang lebih efektif dalam mencegah tuberkulosis. Salah satu yang dapat menjadi kandidat vaksin tuberkulosis ialah gen Rv1926c.

Gen Rv1926c mengkode protein MPT63 yang bersifat imunogenik yang dapat merangsang respon imun baik yang humoral maupun seluler. Penelitian, Rv1926c memiliki keterlibatan dalam interaksi inang-sel dan



memiliki kemampuan untuk mempengaruhi fagositosis. Gen Rv1926c dari *Mycobacterium tuberculosis* strain H37RV berukuran 412 bp (Horwitz, *et al.*, 1995).

Kelebihan dari MPT63 adalah termasuk salah satu protein disekresikan paling melimpah dari patogen *M. tuberculosis*. Selain itu, studi imunologi telah dilakukan pada MPT63 terbukti merangsang respon imun humoral pada babi guinea yang terinfeksi virulen *Mycobacterium tuberculosis* (Manca *et al.*, 1997). MPT63 menginduksi reaktivitas sel Th1 dan juga menginduksi proliferasi IFN γ (Werninghaus *et al.*, 2003). Dengan demikian, Protein MPT63 bisa menjadi salah satu kandidat vaksin tuberkulosis.

I.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan kloning gen Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* ke *Escherichia coli* BL21 sehingga diperoleh plasmid rekombinan (pQE 30Xa – Rv1926c).

I.3 Manfaat Penelitian

Menghasilkan plasmid rekombinan pQE 30 Xa – Rv1926c sebagai kandidat vaksin untuk tuberkulosis.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada November-Desember 2018, di Unit Tuberkulosis *Hasanuddin University Medical-Research Center (HUM – RC)*

Hasanuddin, Makassar. Dan analisis data dilakukan di Laboratorium Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam, Hasanuddin, Makassar.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Karakteristik *Mycobacterium tuberculosis*

II.1.1 Taksonomi

Taksonomi *mycobacterium tuberculosis* (Vasanthakumari , 2007):

Kingdom : Bacteria

Phylum : Actinobacteria

Classis : Scizomycetes

Ordo : Actynomicetales

Familia : Mycobacteriaceae

Genus : *Mycobacterium*

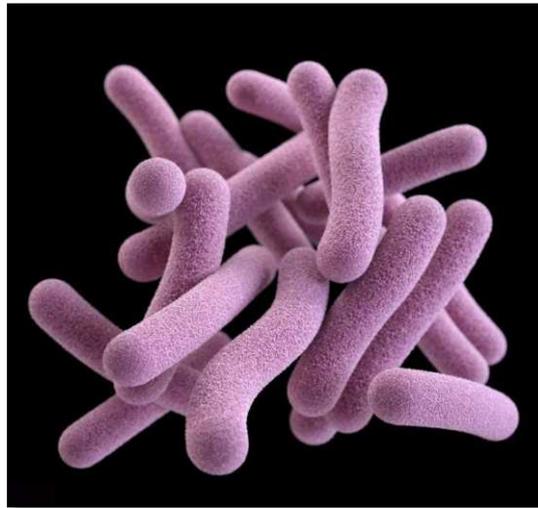
Species : *Mycobacterium tuberculosis*

II.1.2 Morfologi

Pertumbuhan *M. tuberculosis* bervariasi dalam ukuran dan bentuk dari *cocco* basil ke batang panjang, dengan ukuran sel pada strain H37 subkultur di Columbia University bervariasi dari 4,3x0,4 μm dan 1,0x0,2 μm . *M. tuberculosis* menjadi lebih pendek dalam kultur yang lebih tua dan bulat telur saat kondisi kekurangan nutrisi. Selubung pada *M. tuberculosis* memiliki tiga komponen penyusun yaitu struktur plasma membran, dinding dan kapsul. Plasma membran memainkan peran dalam proses patologis, dinding menyerupai dinding gram negatif tetapi memiliki lapisan lipid ester mikolat yang semua komponennya memiliki peran penting dalam fisiologi dan patogenesis (Widodo, dkk, 2016).



Komponen dinding sel seperti asam mycolic, asam mycocerosic, phenolthiocerol, lipoarabinomannan dan arabinogalactan, dan beberapa di antaranya dapat berkontribusi pada umur mikobakteri, memicu reaksi inang dan bertindak dalam patogenesis (Cole, *et al*, 1998).



Gambar 1. *Mycobacterium tuberculosis* (CDC, 2014).

Bakteri *M.tuberculosis* berbentuk batang Basil Tahan Asam (BTA). Bakteri ini pertama kali ditemukan oleh Robert Koch pada tanggal 24 maret 1882, sehingga untuk mengenang jasanya bakteri tersebut diberi nama baksil Koch. Bahkan, penyakit TBC pada paru-paru kadang disebut Koch Pulmonum (KP). Pada media pertumbuhan, *M. tuberculosis* berbentuk kokoid, berfilamen, tidak berspora dan tidak bersimpai. Pada pewarnaan cara Zielh-Neelsen, *M. tuberculosis* berwarna merah dengan latar belakang berwarna biru dan pada pewarnaan fluorokhrom, berfluoresensi dengan warna kuning orange (Rostinawati, 2009).

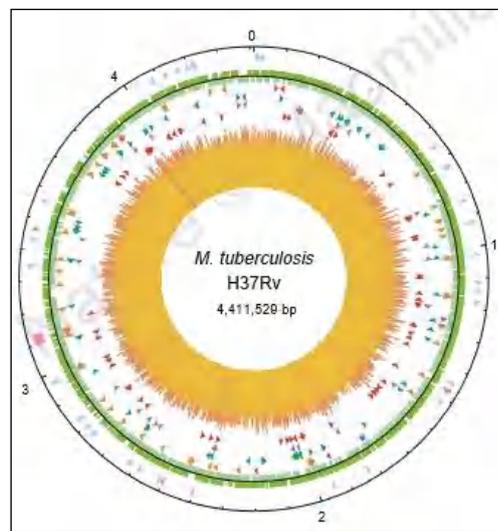
Mycobacterium tuberculosis adalah patogen intraseluler dan berada di makrofag, yang dianggap sebagai komponen terpenting dari sistem imun. *M. tuberculosis* memiliki dua set gen yang sangat polimorfik disebut



sebagai PE dan PPE. Dua set gen ini menyumbang sekitar 10% genom mikobakteri dan telah menarik minat yang besar dari berbagai studi yang berbeda di seluruh dunia (Agus, *et al*, 2016).

II.1.3 Genom

Perkembangan baru dalam biologi molekuler dan genomik telah mendorong kemajuan besar dalam pemahaman tentang variabilitas genetik. Informasi urutan genom telah diteliti untuk *Mycobacterium tuberculosis* yang membuka pandangan baru dalam diagnosis, epidemiologi, dan pengembangan vaksin. Sekuensing DNA otomatis memungkinkan untuk perbandingan langsung gen spesifik di antara populasi isolat, dan penentuan urutan genom lengkap dari dua strain (Cole, *et al*, 1998)



Gambar 2. Genom sirkuler *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Cole, *et al*, 1998)



danya Genom bakteri digunakan sebagai perbandingan genom antara bakteri atau isolat yang berbeda dengan menggunakan teknik amplifikasi.

ke bagian tubuh lainnya melalui sistem peredaran darah, sistem saluran limfe, saluran nafas, atau penyebaran langsung ke bagian-bagian tubuh lainnya. Penyakit tuberkulosis (Tb) ini merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Orang yang pertama kali membuktikan bahwa tuberkulosis merupakan suatu penyakit yang dapat ditularkan, yaitu Villemin yang hidup pada tahun (1827-1894) (Rostinawati, 2008).

Menurut Robbins (1957) dalam Rostinawati (2008) tuberkulosis juga merupakan penyakit infeksi kronis dan biasa terdapat pada paru-paru, tetapi mungkin juga pada organ lain seperti kelenjar getah bening (*nodus lymphaticus*). Bakteri tuberkulosis yang terdapat di dalam kelenjar getah bening akan tersangkut dan akan dimakan oleh sel-sel fagosit. Apabila jumlahnya sedikit maka biasanya mereka segera dihancurkan. Akan tetapi bila jumlah bakterinya cukup banyak yang tersangkut didalam suatu jaringan atau apabila virulensinya tinggi, serta jika daya tahan tubuh atau imunitas orang yang diserang rendah maka orang tersebut akan menjadi sakit.

Tuberkulosis (TB) adalah salah satu penyakit paling penting di dunia dan telah dinyatakan sebagai keadaan darurat global oleh *World Health Organization*. Pengendalian TB membutuhkan vaksin yang efektif dan aman yang mampu melindungi terhadap TB di seluruh dunia. Vaksin yang saat ini tersedia untuk digunakan pada manusia melawan TB adalah *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) (Mustafa, 2009).

Dari hasil Riskesdas 2007, diketahui bahwa prevalensi TB paru cenderung sesuai dengan bertambahnya umur dan prevalensi tertinggi pada usia di 65 tahun. Prevalensi TB paru pada laki-laki 20% lebih tinggi dari , selain itu prevalensi tiga kali lebih tinggi di pedesaan dibanding



perkotaan serta empat kali lebih tinggi pada pendidikan rendah dibandingkan pendidikan tinggi (Manalu, 2010).

Keterpaparan penyakit TB pada seseorang dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti : status sosial ekonomi, status gizi, umur, jenis kelamin dan faktor sosial lainnya, untuk lebih jelasnya diuraikan yaitu: faktor Sosial Ekonomi: Disini sangat erat dengan keadaan rumah, kepadatan hunian, lingkungan perumahan, lingkungan dan sanitasi tempat kerja yang buruk dapat memudahkan penularan TBC. Pendapatan keluarga sangat erat juga dengan penularan TBC, karena pendapatan yang kecil membuat orang tidak dapat layak dengan memenuhi syarat-syarat kesehatan. Keadaan malnutrisi atau kekurangan kalori, protein, vitamin, zat besi dan lain-lain, akan mempengaruhi daya tahan tubuh seseorang sehingga rentan terhadap penyakit termasuk TB paru. Keadaan ini merupakan faktor penting yang berpengaruh di negara miskin, baik pada orang dewasa maupun anak-anak. Penyakit TB paru paling sering ditemukan pada usia muda atau usia produktif 15-50 tahun . Penderita TB-paru cenderung lebih tinggi pada laki-laki dibandingkan perempuan karena pada laki-laki merokok tembakau dan minum alkohol dapat menurunkan sistem pertahanan tubuh, sehingga lebih mudah terpapar dengan agent penyebab TB-paru (Manalu, 2010).

II.2.1 Gejala

Faktor–faktor yang mempengaruhi kesehatan baik individu, kelompok, dan masyarakat dikelompokkan menjadi 4, yaitu: lingkungan (mencakup lingkungan fisik, sosial, budaya, politik, ekonomi, dan sebagainya), perilaku, keturunan, dan ketahanan kesehatan, dan keturunan. Ke-empat faktor tersebut dalam mempengaruhi kesehatan tidak berdiri sendiri, namun masing–masing saling



mempengaruhi satu sama lain. Faktor lingkungan selain langsung mempengaruhi kesehatan juga mempengaruhi perilaku, dan sebaliknya perilaku juga mempengaruhi lingkungan (Suharyo, 2013).

Sumber penularan adalah penderita tuberkulosis BTA positif, pada waktu batuk atau bersin, penderita menyebarkan kuman ke udara dalam bentuk droplet (percikan dahak). Beberapa faktor yang mengakibatkan menularnya penyakit itu adalah kebiasaan buruk pasien tuberkulosis paru yang meludah sembarangan (Anton, (2008); Currie, (2005) dalam Suharyo, 2013). Selain itu, kebersihan lingkungan juga dapat mempengaruhi penyebaran virus. Misalnya, rumah yang kurang baik dalam pengaturan ventilasi. Orang sehat yang serumah dengan penderita TB paru merupakan kelompok sangat rentan terhadap penularan penyakit tersebut. Lingkungan rumah, lama kontak serumah dan perilaku pencegahan baik oleh penderita maupun orang yang rentan sangat mempengaruhi proses penularan penyakit tuberkulosis paru. (Fortun (2005); Mitnick (2008), Randy (2011) dalam Suharyo, 2013).

Gejala TB pada orang dewasa umumnya penderita mengalami batuk dan berdahak terus-menerus selama 3 minggu atau lebih, batuk darah atau pernah batuk darah. Adapun gejala-gejala lain dari TB pada orang dewasa adalah sesak nafas dan nyeri dada, badan lemah, nafsu makan dan berat badan menurun, rasa kurang enak badan (malaise), berkeringat malam, walaupun tanpa kegiatan, demam meriang lebih dari sebulan (Depkes, 2005).

Pada anak-anak gejala TB terbagi 2, yakni gejala umum dan gejala khusus.

umum meliputi: Berat badan turun selama 3 bulan berturut-turut tanpa
yang jelas dan tidak naik dalam 1 bulan meskipun sudah dengan
an gizi yang baik, demam lama atau berulang tanpa sebab yang jelas



(bukan tifus, malaria atau infeksi saluran nafas akut) dapat disertai dengan keringat malam, pembesaran kelenjar limfe superfisialis yang tidak sakit, paling sering di daerah leher, ketiak dan lipatan paha, gejala dari saluran nafas, misalnya batuk lebih dari 30 hari (setelah disingkirkan sebab lain dari batuk), tanda cairan di dada dan nyeri dada, gejala dari saluran cerna, misalnya diare berulang yang tidak sembuh dengan pengobatan diare, benjolan (massa) di abdomen, dan tanda-tanda cairan dalam abdomen (Depkes, 2005).

Gejala khusus, sesuai dengan bagian tubuh yang diserang yaitu: TB kulit atau skrofuloderma, TB tulang dan sendi, meliputi tulang punggung (spondilitis): gibbus, tulang panggul (koksitis): pincang, pembengkakan di pinggul, tulang lutut: pincang dan atau bengkak. TB otak dan saraf Meningitis dengan gejala kaku kuduk, muntah-muntah dan kesadaran menurun. Gejala mata yaitu, Conjunctivitis phlyctenularis, tuberkel koroid (hanya terlihat dengan funduskopi). Seorang anak juga patut dicurigai menderita TB apabila, mempunyai sejarah kontak erat (serumah) dengan penderita TB BTA positif, terdapat reaksi kemerahan cepat setelah penyuntikkan BCG (dalam 3-7 hari) (Depkes, 2005).

II.2.2 Patogenesis dan Imunitas

Setelah kuman TB masuk ke dalam tubuh manusia melalui pernafasan, kuman TB tersebut dapat menyebar dari paru ke bagian tubuh lainnya, melalui sistem peredaran darah, sistem saluran limfe, saluran nafas, atau penyebaran langsung ke bagian-bagian tubuh lainnya. Daya penularan dari seorang penderita TB ditentukan oleh banyaknya kuman yang dikeluarkan dari parunya. Makin tinggi jumlah kuman yang dikeluarkan, makin banyak penderita yang terinfeksi. Bila pemeriksaan dahak positif hasil pemeriksaan dahak, makin menular penderita tersebut. Bila pemeriksaan dahak negatif (tidak terlihat kuman), maka penderita tersebut



dianggap tidak menular. Kemungkinan seseorang terinfeksi TB ditentukan oleh konsentrasi droplet dalam udara dan lamanya menghirup udara (Depkes, 2005).

Secara klinis, TB dapat terjadi melalui infeksi primer dan paska primer. Infeksi primer terjadi saat seseorang terkena kuman TB untuk pertama kalinya. Setelah terjadi infeksi melalui saluran pernafasan, di dalam alveoli (gelembung paru) terjadi peradangan. Hal ini disebabkan oleh kuman TB yang berkembang biak dengan cara pembelahan diri di paru. Waktu terjadinya infeksi hingga pembentukan kompleks primer adalah sekitar 4-6 minggu. Kelanjutan infeksi primer tergantung dari banyaknya kuman yang masuk dan respon daya tahan tubuh dapat menghentikan perkembangan kuman TB dengan cara menyelubungi kuman dengan jaringan pengikat (Depkes, 2005).

Ada beberapa kuman yang menetap sebagai “persister” atau “dormant”, sehingga daya tahan tubuh tidak dapat menghentikan perkembangbiakan kuman, akibatnya yang bersangkutan akan menjadi penderita TB dalam beberapa bulan. Pada infeksi primer ini biasanya berlangsung tanpa gejala, hanya batuk dan nafas berbunyi. Tetapi pada orang-orang dengan sistem imun lemah dapat timbul radang paru hebat, ciri-cirinya batuk kronik dan bersifat sangat menular. Masa inkubasi sekitar 6 bulan. Infeksi paska primer terjadi setelah beberapa bulan atau tahun setelah infeksi primer. Ciri khas TB paska primer adalah kerusakan paru yang luas dengan terjadinya kavitas atau efusi pleura. (Depkes, 2005).

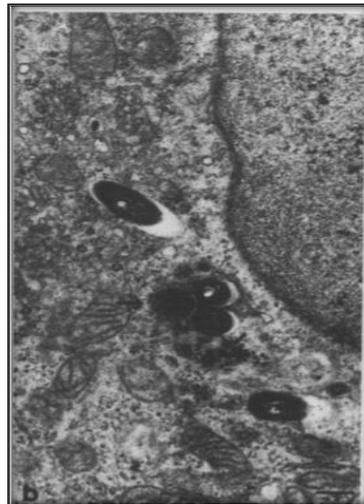
Keberadaan beberapa efektor *M. tuberculosis* yang dapat memodulasi pematangan *phagosome* tampaknya menunjukkan efek yang cukup besar. *M.*

tuberculosis ini memiliki kemampuan untuk bertahan hidup di makrofag sehingga tidak dikirim lagi ke lisosom. Selain itu, pengiriman ke lisosom tidak selalu berhasil untuk mengganggu replikasi bakteri tersebut. *M. tuberculosis* dapat



tumbuh di setidaknya beberapa kompartemen asam, vacuolar. Sebagai contoh, Armstrong & Hart dalam Philips and Ernst (2012) menunjukkan *M. tuberculosis* yang dilapis dengan serum imun, yang menghasilkan serapan melalui reseptor, dikirimkan ke lisosom dan tumbuh tanpa hambatan di kompartemen ini (Philips and Ernst, 2012).

Mycobacterium tuberculosis, agen etiologi TB, adalah agen infeksi mortalitas yang paling mematikan di seluruh dunia. Pusat untuk memahami patogenesis tuberkulosis adalah interaksi antara patogen dan fagosit mononuklear apakah *Mycobacterium tuberculosis* memberikan efek pada *fagolysosome fusion*. Dalam semua kasus, dengan 2 jam infeksi, sekitar 85% dari bakteri jelas tinggal di sekitar vakuola. Dalam beberapa kasus, tidak ada membran yang terlihat dan bakteri tampak tersebar di sitoplasma. Hanya H37Rv yang menunjukkan peningkatan signifikan dalam jumlah bakteri selama infeksi (McDonough, *et al*, 1993).



Gambar 4. Makrofag yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
Sumber: McDonough, *et al*, 1993.



perkembangan imunologi yang masih dipegang hingga saat sekarang ini
banyaknya respon imun seluler yang diperantarai oleh Interferon (IFN) γ dan

Interleukin 2 (IL-2) yang dihasilkan oleh sel CD4+ Limfosit T, baik pada hewan model maupun pada manusia. Proses selanjutnya, IFN γ ini akan mengaktivasi makrofag. Sebaliknya, peran sel T CD8 masih belum banyak diketahui, hal yang jelas adalah adanya antigen *M. tuberculosis* pada sitoplasma APC akan dipresentasikan melalui jalur MHC klas I pada sel T CD8. Dalam hal ini antigen difragmentasi oleh proteasome menjadi peptida-peptida dan selanjutnya ditranspor ke dalam RE. Disini peptida berikatan dengan MHC klas I, membentuk kompleks dan ditranspor ke permukaan sel untuk dipresentasikan. Mekanisme ini dapat dihambat oleh Brefeldin A, sebagai inhibitor transpor RE – Apparatus golgi (Suharti dan Putra, 2011).

Fagosom (makrofag) tidak dipecah menjadi peptida, dalam hal ini adanya antigen terlarut di dalam sitoplasma menyebabkan induksi MHC klas I, sehingga pada keadaan ini tidak terdapat peran proteasome dan sirkulasi RE. Ini merupakan salah satu mekanisme alternatif dalam presentasi antigen pada MHC kelas I. Peranan antibodi terhadap infeksi *M. tuberculosis* secara umum sangat kecil, mengingat infeksi bakteri ini bersifat intraseluler sehingga fungsi opsonin, netralisasi atau aktivasi komplemen yang umumnya diperantarai oleh antibodi terhadap bakteri ekstraseluler atau toksin menjadi sulit dilakukan. Beberapa penelitian memperlihatkan bahwa antibodi dapat meningkatkan kemampuan fungsional makrofag dalam membunuh bakteri *M. tuberculosis*. Dalam perkembangannya, penelitian antibodi lebih banyak ditujukan untuk kepentingan diagnostik (Suharti dan Putra, 2011).



II.3. BCG (*Bacille Calmatte Guerin*)

Bacille Calmette-Guerin (BCG) merupakan vaksin yang umum digunakan untuk penyakit tuberkulosis, mulai dikembangkan pada tahun 1906 oleh Albert Calmette dan Camilla Guerin. Vaksin ini dibuat dari *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan dan pertama kali diberikan secara oral pada tahun 1921 pada bayi yang baru lahir dengan ibu yang meninggal akibat TB Paru. Vaksin ini mampu melindungi bayi hingga dewasa dalam rangka pencegahan terhadap penyakit tuberkulosis. WHO merekomendasikan pemberian vaksin BCG yang diberikan saat lahir atau beberapa saat setelah lahir. Tahun 2002, imunisasi BCG telah dilakukan lebih dari 90% negara di dunia. Diperkirakan 100.5 juta anak (76%) dari total 132.8 juta anak telah mendapatkan imunisasi BCG (Suharti dan Putra, 2011).

BCG adalah strain *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan yang berasal dari strain virulen pada awal abad terakhir. Studi klinis pertama berlangsung dari tahun 1921 hingga 1927 di Prancis dan Belgia, dan menunjukkan bahwa BCG sangat efisien dalam melindungi TB pada anak-anak. Di Prancis, BCG segera diperkenalkan sebagai vaksin oral yang diberikan dalam susu, tetapi penyebaran vaksin lebih lanjut dihentikan pada tahun 1930 sebagai konsekuensi dari bencana Lubeck, di mana 67 dari 249 bayi yang diberi vaksin meninggal karena kontaminasi yang tidak disengaja dari vaksin dengan *Mycobacterium tuberculosis* yang mematikan. Setelah Perang Dunia Kedua, vaksin BCG ditawarkan kepada anak-anak di seluruh Eropa. Pada awal 1950-an, WHO merekomendasikan bahwa

ke vaksinasi diperluas untuk mencakup daerah endemik TB di luar Eropa (Suharti dan Doherty, 2005).



Awalnya, vaksin itu dibatasi untuk anak-anak tuberkulin-negatif, karena tidak diharapkan memiliki efek positif (dan awalnya dikhawatirkan memiliki efek negatif) pada individu yang sudah terinfeksi *M. tuberculosis*. Tanggapan hipersensitivitas (DTH), terdeteksi sebagai pembengkakan dan kemerahan di tempat injeksi setelah 24-48 jam, menunjukkan sensitisasi mikobakteri. WHO merekomendasikan bahwa bayi harus diimunisasi segera setelah kelahiran mungkin dengan dosis tunggal BCG intradermal di semua negara dengan risiko tinggi infeksi TB (Andersen and Doherty, 2005).

Lebih dari tiga miliar orang telah menerima BCG, yang menjadikannya vaksin yang paling banyak digunakan di seluruh dunia. Namun di Eropa, kemanjuran vaksin ini secara umum mengecewakan dalam uji coba yang dilakukan di negara berkembang. Meskipun konsensus sedang mengembangkan bahwa BCG melindungi anak-anak secara efisien terhadap manifestasi awal TB, perkiraan perlindungan terhadap rentang TB paru dewasa dari 0–80% berdasarkan uji lapangan yang besar dan terkontrol dengan baik. Dampak global variasi ini ditekankan oleh fakta bahwa, secara umum tingkat perlindungan terendah telah ditemukan di negara-negara dengan insiden TB tertinggi. Ini menunjukkan bahwa, secara global, BCG mencegah hanya sekitar 5% dari semua kematian yang berpotensi dicegah oleh vaksin karena TB. Saat ini, TB tidak hanya mempengaruhi dunia berkembang, di mana koinfeksi HIV secara dramatis telah meningkatkan kejadiannya, tetapi kejadiannya juga meningkat di beberapa bagian Eropa. Di beberapa negara (misalnya, Rusia dan anggota lain dari Uni Soviet),

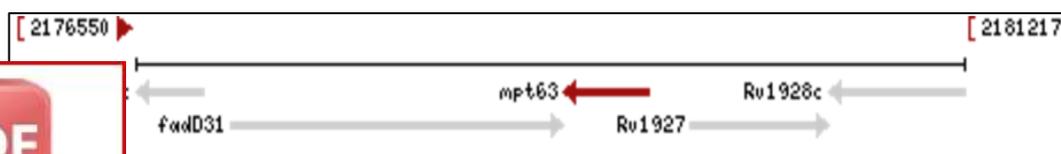
terhadap kesehatan masyarakat dan masalah sosial yang terkait dengan diperlukan tindakan segera (Andersen and Doherty, 2005).



Vaksinasi dengan BCG memberikan perlindungan terhadap manifestasi masa kanak-kanak yang paling parah dari penyakit, seperti meningitis TB. Namun, seperti kebanyakan vaksin lainnya, perlindungan yang diberikan oleh vaksinasi BCG tidak seumur hidup. Sebagian besar penelitian telah melaporkan bahwa BCG bersifat melindungi hanya selama 10-20 tahun. Oleh karena itu, alasan utama ketidakefektifan vaksin BCG terhadap TB paru dewasa adalah bahwa vaksinasi hanya memberikan perlindungan untuk jangka waktu pada masa kanak-kanak. Vaksinasi BCG merupakan metode pencegahan infeksi *M. tuberculosis* dengan rentang efektivitas antara 0 – 80%. Pola proteksi seperti ini menunjukkan bahwa vaksin ini masih mempunyai banyak kelemahan, dan dibutuhkan perbaikan segera (Andersen and Doherty, 2005).

II.4 Rv1926c

Rv1926c mengkode protein MPT63 yang disekresikan paling melimpah dari bakteri patogen *M. Bovis* atau *M.tuberculosis*, serta *M. bovis* strain BCG. MPT63 adalah kandidat yang masuk akal untuk kompleks *M. Tuberculosis*. Menurut Horwitz dkk. (1995) dalam Samal (2012) melaporkan protein MPT63 sebagai target untuk respon kekebalan tubuh pada inang yang terinfeksi dan dapat menjadi penting untuk patogenesis TB. Mereka melaporkan protein rekombinan MPT63 dari Rv1926c dimurnikan dari sel *E. coli* dan dapat meningkatkan tanggapan kekebalan humoral (Samal, 2012).



5. Sequence gen Rv1926c – protein imunogenik MPT63 *M. tuberculosis*

Sumber: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



Kesamaan struktural MPT63 dengan lipatan immunoglobulin mengisyaratkan keterlibatannya dalam interaksi sel inang dan kemampuannya untuk mempengaruhi fagositosis. Sifat imunogenik MPT63 bisa memiliki kepadatan tinggi T-epitop di wilayah imunodominan N-terminalnya. Oleh karena itu, MPT63 telah diusulkan sebagai target untuk desain kandidat vaksin. Rv1926c (Protein MPT63) imunoreaktif dalam tes antibodi pada manusia dan hewan dan memberikan perlindungan sebagai kandidat vaksin yang menimbulkan respons pelindung. MPT63 menginduksi reaktivitas sel Th1 dan menginduksi proliferasi serta pelepasan IFN γ dari mononuklear darah perifer pada pasien TB tetapi tidak pada pasien yang terinfeksi *M. avium* (Samal, 2012).

Protein MPT63 hanya ditemukan dikompleks *Mycobacterium tuberculosis*, termasuk *M. tuberculosis* dan *M. Bovis*. Deteksi sel T yang mensekresi IFN- γ secara khusus dapat berguna untuk diagnosis penyakit tuberkulosis (TB). Epitop sel T CD8⁺ yang diinduksi MPT63 ini memungkinkan akan berkontribusi terhadap diagnosis imunologi infeksi *M. tuberculosis* dan dapat menyediakan komponen untuk merancang vaksin TB yang efektif (Duan, et al., 2015). Kompleks multiantigen yang terdiri dari CFP-21, ESAT-6, MPT-63 dan MPT-64 diduga berguna dalam diagnosis TB (Wang, et al, 2005).

II.5 Kloning

Secara umum kloning merupakan sejumlah proses yang dapat digunakan untuk menghasilkan salinan suatu kesatuan biologik yang secara identik tanpa melalui reproduksi seksual. Bahan salinan ini disebut (kopi) dan mempunyai genetik yang sama dengan asalnya. Secara lebih lanjut, teknologi menjelaskan kloning sebagai proses untuk menghasilkan



salinan fragmen DNA (kloning molekular), sel (kloning sel), atau organisme (kloning organisme) (Wangko dan Kristanto, 2010).

Kloning dilakukan dengan menggunakan bakteri dan plasmid. Plasmid merupakan molekul DNA sirkular berukuran kecil, tetapi mempunyai ukuran sama atau bahkan lebih besar dari ukuran bahan genetik utamanya (kromosom bakteri), dan bereplikasi di dalam sel bakteri. Dalam hal melakukan kloning gen atau potongan DNA, plasmid asal (*cloning vector*) diisolasi dari sel bakteri. Gen sel tertentu disisipkan ke dalam plasmid, sehingga terbentuk plasmid dengan DNA rekombinan (Wangko dan Kristanto, 2010).

Komponen penting dalam tahap kloning (Ekawati, 2008) yaitu:

a. Sumber DNA

Sumber DNA untuk pengerjaan kloning dapat berupa DNA kromosom yang diisolasi dari inti sel ataupun DNA komplementer yang diperoleh dari penyalinan mRNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*, disebut *complementary DNA* (cDNA).

b. Vektor

Vektor merupakan molekul DNA pembawa fragmen gen target ke dalam suatu sel inang. Persyaratan utama suatu molekul DNA dapat digunakan sebagai vektor, antara lain harus mampu disisipi DNA asing, dapat diintroduksi ke dalam sel inang, dapat bereplikasi secara independen di dalam sel inang, dan memiliki penanda seleksi (Brown, 2006).

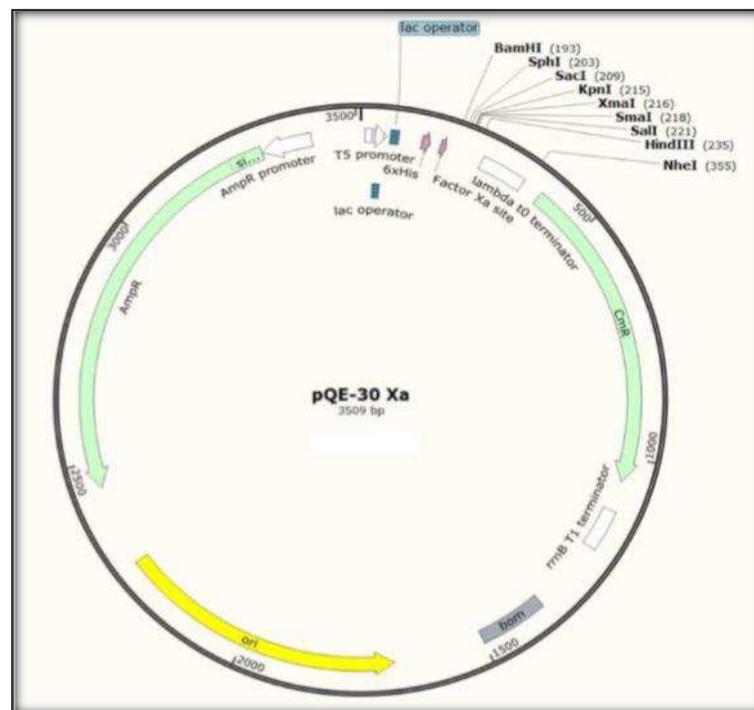
Salah satu tipe vektor yang sering digunakan dalam teknik kloning

plasmid. Plasmid merupakan molekul DNA yang berbentuk lingkaran beruntai ganda di luar kromosom yang dapat melakukan replikasi di dalam sel bakteri (Snustad and Simmon, 2003).



Berdasarkan fungsinya, vektor terdiri atas dua jenis yaitu vektor kloning dan vektor ekspresi. Vektor kloning adalah vektor yang digunakan untuk perbanyakkan atau kloning gen. Vektor ekspresi merupakan vektor yang tidak hanya bereplikasi sendiri, tetapi juga mengandung sinyal-sinyal ekspresi, sehingga gen yang dikloning juga dapat ditranskripsi menjadi mRNA dan ditranslasi menjadi protein (Brown, 1987).

Vektor ekspresi memiliki promoter pada daerah *upstream multiple cloning site*. Konstruksi ini dimaksudkan agar vektor mempunyai kemampuan untuk mentranskripsi dan mentranslasi insert DNA yang lengkap *dengan open reading frame* (ORF). Pemilihan sel kompeten yang digunakan harus disesuaikan agar diperoleh ekspresi protein oleh plasmid secara optimal (Wong, 2006).



Gambar 6. Vektor pQE-30 Xa dalam Sistem Ekspresi Protein (Qiagen, 2008)



Salah satu contoh vektor ekspresi adalah vektor pQE-30Xa. Penggunaan primer pQE-30Xa *Sequencing-Primer Set* dapat digunakan untuk penyisipan runutan pada vektor pQE-30 Xa. Primer yang dimasukkan dalam reaksi PCR mengandung vektor untuk diseku. *Eschericia coli* strain BL21 membawa plasmid konstitutif sehingga memungkinkan ekspresi protein. Plasmid pQE-30Xa berukuran sekitar 3.5 kb yang memiliki promotor T5, lacO, *synthetic ribosome-binding site* (RBSII), ATG (start codon), *sekuen 6xHis tag*, *multicloning site* (MCS) dan *stop codons* (Qiagen, 2008).

Vektor ekspresi pQE 30Xa memiliki beberapa fitur (Qiagen, 2008) yaitu:

1. Elemen operator promotor yang dioptimalkan terdiri dari promotor T5 (dikenali oleh RNA polimerase *E. coli*) dan dua rangkaian operator *lac* yang meningkatkan pengikatan represor *lac* dan memastikan penindakan yang efisien dari promotor T5 yang kuat.
2. Situs pengikatan sintesis ribosomal, RBSII, untuk tingkat terjemahan yang tinggi
3. 6xHis-tag mengkode sequence baik 5' atau 3' ke daerah kloning
4. Beberapa situs kloning dan kodon stop translasi di semua bingkai bacaan untuk persiapan konstruksi ekspresi yang mudah digunakan.

II.6 Sel Inang

Bakteri *Escherichia coli* merupakan mikroorganisme yang sangat penting dalam kloning karena memiliki karakteristik ideal sebagai sel inang yang akan dikloning, antara lain mudah dimanipulasi, mampu



tumbuh dengan cepat dan stabil pada medium kultur biasa, non-patogen, serta dapat ditransformasi DNA asing (Sambrook and Russell, 2001).

Escherichia coli BL21 dikonstruksi khusus untuk mengekspresikan suatu protein. Protein asing yang diproduksi oleh organisme lain kemungkinan memiliki sifat toksik. Maka dari itu untuk menghindari sifat toksik yang dapat membahayakan bagi kelangsungan hidup bakteri diperlukan suatu pengontrolan sistem regulasi ekspresi protein (Wong, 2006).

Escherichia coli BL21 menggunakan sistem kerja operon regulator laktose (lac). Operon laktosa terdiri dari promotor (lacP1), operator (lacO) dan gen struktural (RNA polimerase T7). Operon regulator laktosa terdiri dari satu gen struktural (lacUV5) dan situs pengontrol (lacP2). Gen struktural mengkodekan represor laktosa, sedangkan situs pengontrol merupakan situs pengikatan RNA polimerase (suatu promotor) (Wong, 2006).

Kelebihan *E. coli* BL21 sebagai host ekspresi membawa mutasi gen *rne* (*rne131*) yang mengkode enzim RNase E yang memiliki kemampuan untuk mencegah degradasi mRNA, sehingga dapat meningkatkan stabilitas mRNA sebelum ditranslasi menjadi protein (Kusumaningsih, 2010).

