

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) masih menjadi penyakit yang sangat umum dan menular. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang ditularkan melalui percikan udara atau dikenal sebagai droplet udara. *Mycobacterium tuberculosis* dapat hidup selama beberapa jam di lingkungan yang gelap dan lembab, tetapi dapat cepat mati di bawah sinar matahari langsung (Making *et al.*, 2023).

Angka insiden tuberkulosis global yang melonjak selama pandemi COVID-19 kini mulai melambat dan menunjukkan kecenderungan stabil. Pada tahun 2023, kasus insiden TB tercatat sebanyak terdapat 10,8 juta, menunjukkan peningkatan yang tidak terlalu besar dari 10,7 juta kasus pada tahun 2022, meskipun masih jauh lebih tinggi daripada 10,4 juta kasus yang tercatat pada tahun 2021 dan 10,1 juta kasus pada tahun 2020. Sebagian besar kasus tuberkulosis tahunan terjadi di 30 negara dengan beban tuberkulosis tertinggi, yang secara keseluruhan mewakili 87% dari seluruh kasus di seluruh dunia pada tahun 2023. Terdapat lima dari negara yang menyumbang 56% dari total kasus TB di seluruh dunia yaitu India (26%), Indonesia (10%), Cina (6,8%), Filipina (6,8%), dan Pakistan (6,3%) (WHO, 2024). Total kasus penderita TB di Indonesia menurut data WHO (2024) adalah 1.090.000 kasus dan untuk wilayah Sulawesi Selatan tercatat 27.256 kasus (Kemenkes RI, 2024).

Vaksin *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) adalah satu-satunya vaksin yang disetujui untuk pencegahan TB. Namun, vaksinasi BCG memiliki efektivitas pertahanan dari 0% hingga 80% pada orang dewasa (Jiang *et al.*, 2023). Vaksin BCG efektif dalam mencegah tuberkulosis pada bayi hingga berusia anak-anak, namun tidak efektif dalam mencegah tuberkulosis pada remaja dan orang dewasa dalam beberapa uji klinis. Selain itu, BCG tidak efektif dalam mengendalikan epidemi tuberkulosis di seluruh dunia (Scriba *et al.*, 2020). Untuk mengatasi kekurangan dan kegagalan BCG, banyak vaksin TB baru telah dikembangkan. Sebagian besar vaksin baru ini berada di tahap pra-klinis, dan lebih dari 16 vaksin telah dievaluasi dalam uji klinis (Jiang *et al.*, 2023). Vaksin Subunit adalah salah satu kandidat vaksin TB. Jika dibandingkan dengan vaksin berbasis sel penuh dan berbasis virus, vaksin subunit protein yang terdiri dari antigen pelindung mungkin lebih aman dan menarik. Namun, masalah utama dengan vaksin subunit protein adalah imunogenisitas yang lemah. Oleh karena itu, untuk memicu respons kekebalan yang kuat dan berkepanjangan, sangat penting untuk mengoptimalkan komposisi vaksin. Imunogenesis subunit



dapat diatasi dengan vaksin adjuvant baru (Zhang *et al.*, 2023). *ESAT-6* (Antigenic Target 6 kDa) adalah protein imunogenik dikeluarkan oleh bakteri yang menyebabkan tuberkulosis yaitu, *M. tuberculosis*. Protein ini dikode oleh gen Rv3875 yang terletak di bagian yang tinggi dan spesifik terhadap *M. tuberculosis*, protein ini sebagai vaksin untuk mencegah tuberkulosis dan mendiagnosis

penyakit aktif atau laten (Mustafa, 2023). MPT63 adalah protein khusus *Mycobacterium tuberculosis* yang telah terbukti memiliki sifat imunogenik dan telah terlibat dalam virulensi. Protein ini dikode oleh gen Rv1926c. Dengan demikian, MPT63 bisa menjadi sasaran obat yang sangat baik terhadap TB atau calon vaksin yang menjanjikan (Goulding *et al.*, 2002). Fusi gen dapat dirancang untuk mencapai sifat yang lebih baik atau fungsionalitas baru melalui penggabungan beberapa protein secara sinergis ke dalam satu kompleks. Kombinasi dua atau lebih *domain* protein telah terbukti meningkatkan bioaktivitas atau menghasilkan kombinasi fungsional baru dengan berbagai aplikasi bioteknologi (Yu *et al.*, 2014).

Dilakukan penelitian pengembangan kandidat vaksin subunit menggunakan fusi gen Rv3875 dan Rv1926c untuk menghasilkan kandidat vaksin yang lebih unggul dari vaksin BCG yang dapat berfungsi untuk mendorong reaksi kekebalan tubuh dan melindungi terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* karena ada kebutuhan mendesak untuk memberantas tuberkulosis.

1.2 Teori

1.2.1 Tuberkulosis

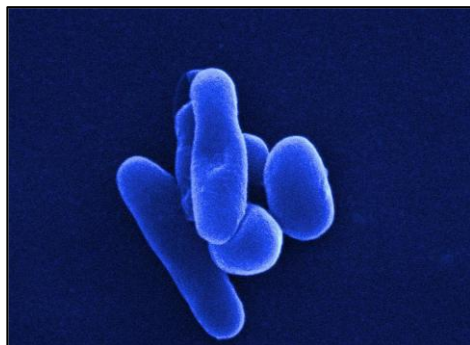
Tuberkulosis (TB) adalah salah satu penyakit menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Penyakit infeksi tersebut dapat ditularkan melalui udara, atau penyakit menular udara. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dapat menular ke orang lain melalui percikan dahak, juga dikenal sebagai droplet, ketika seseorang yang menderita TB aktif batuk atau bersin (Making *et al.*, 2023). Berdasarkan laporan WHO (2024), pada tahun 2023 jumlah kasus tuberkulosis (TB) secara global mencapai sekitar 10,8 juta orang. Angka ini meningkat dari 10,7 juta kasus pada tahun 2022 dan jauh lebih tinggi dibandingkan dengan 10,4 juta kasus pada tahun 2021 maupun 10,1 juta pada tahun 2020, meskipun laju peningkatannya telah melambat sejak puncak gangguan akibat pandemi COVID-19. Insiden global setara dengan kira-kira 134 kasus per 100.000 penduduk, dengan sebagian besar peningkatan ditemui di 30 negara berisiko tinggi yang menyumbang 87 % dari total beban TB dunia. Indonesia menempati peringkat kedua sebagai negara dengan jumlah kasus TB tertinggi di dunia, menyumbang sekitar 10 % dari total kasus global pada 2023 atau setara hampir 1,1 juta kasus TB baru di seluruh Nusantara dan untuk wilayah Sulawesi Selatan tercatat 27.256 kasus (Kemenkes RI, 2024).

Tuberkulosis adalah penyakit yang disebabkan oleh basil tuberkulum, yang biasanya identik dengan *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* biasanya berbentuk batang lurus atau sedikit melengkung dengan sisi-sisi yang kurang lebih sejajar yang tersusun secara tunggal atau dalam kelompok-kelompok



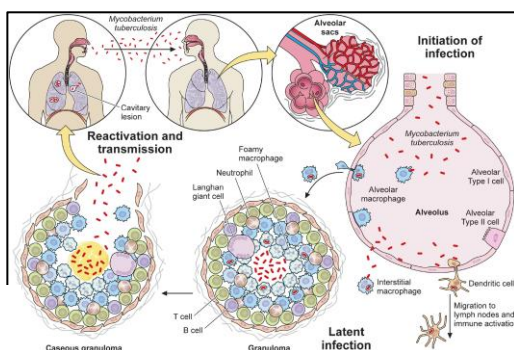
um panjangnya dan 0,2-0,8 μm lebarnya. *Mycobacteria* tidak obat, bakteri gram positif, tidak berspora, dan tidak berkapsul. *Mycobacteria* pada jaringan yang terinfeksi atau dahak menunjukkan panjang dan melengkung, kadang-kadang lebih banyak manik-manik yang ditemukan dalam kultur. Sel-sel bakteri yang ditemukan lebih pendek. Pengamatan langsung terhadap mikobakteri peritoneum pada kultur jaringan dan kasus yang terinfeksi ketika

diwarnai dengan metode *Ziehl-Neelsen* menunjukkan sel *M. tuberculosis* yang lebih panjang dari 4 μm , lebih melengkung, dan basil yang terbentuk seperti tali (basil yang saling menempel menyebabkan penampilan seperti tali). Tali ini (trehalosa-6,6'-dimikolat) adalah glikolipid yang ditemukan pada dinding sel mikobakteri, yang menyebabkan sel tumbuh dalam bentuk tali berkelok-kelok. Glikolipid ini terkait dengan strain Mtb yang ganas (Sunnam *et al.*, 2023).



Gambar 1. Pemindaian Mikroskop Elektron dari Morfologi *M. tuberculosis*
Sumber: (Cardona, 2012)

Mycobacterium tuberculosis telah menjadi patogen manusia sejak lebih dari 70 ribu tahun lalu. Infeksi dimulai ketika *M. tuberculosis* masuk lewat hidung atau mulut, lalu melewati epitel mukosa saluran napas atas dan menginfeksi sel epitel sebagai langkah awal transmigrasi ke paru-paru (Yang *et al.*, 2023). Setelah mencapai alveolus, *M. tuberculosis* berinteraksi dengan makrofag alveolar dan sel dendritik interstitial, yang berperan sebagai garis pertahanan imun bawaan. Sel epitel alveolar tipe II juga dapat terinfeksi, tetapi karena kematiannya yang cepat, mereka kurang efektif menahan bakteri (Rahlwes *et al.*, 2023).



Gambar 2. Gambaran Umum Infeksi *M. tuberculosis*
Sumber: (Rahlwes *et al.*, 2023).



alveolar yang terinfeksi bergerak dari kantung alveolar ke ruang bersama sel dendritik mampu bermigrasi ke kelenjar getah

bening untuk mengaktifkan sel T dan B, atau menetap di jaringan paru untuk menelan bakteri ekstraseluler yang lolos fagositosis awal. Proses ini memicu rekrutmen berbagai sel imun termasuk monosit inflamasi, neutrofil, dan sel T yang akhirnya membentuk granuloma TB. Struktur multiseluler ini berfungsi ganda, membatasi penyebaran *Mycobacterium tuberculosis* sambil menjaga keseimbangan dormansi, yang memungkinkan bakteri tetap bertahan hidup dalam keadaan dorman. Sebagian besar infeksi primer berakhir dengan kontrol bakteri, baik lewat eliminasi penuh maupun granuloma stabil, sehingga individu tidak menunjukkan gejala klinis. Namun, granuloma juga memungkinkan *Mycobacterium tuberculosis* bertahan dalam keadaan laten sering kali hanya terdeteksi dengan TST (*Tuberculin Skin Test*) dan IGRA (*Interferon-Gamma Release Assay*) (Rahlwes *et al.*, 2023).

1.2.2 Vaksin Subunit

Vaksin subunit didefinisikan sebagai sediaan imunologi yang secara eksklusif mengandung komponen antigenik patogen yang diperlukan untuk menimbulkan respons imun yang efektif. (Heidary *et al.*, 2023). Strategi vaksin berbasis antigen spesifik memanfaatkan berbagai bentuk antigen seperti protein murni, polisakarida, peptida sintesis, asam nukleat, dan vektor virus yang mengekspresikan antigen (Ashfield *et al.*, 2022). Jenis vaksinasi ini melibatkan penggunaan satu atau lebih antigen yang memiliki imunogenisitas tinggi, sehingga memfasilitasi pengembangan sistem kekebalan tubuh pada penerima vaksin (Suryaningsih *et al.*, 2022).

Pendekatan ini memiliki keunggulan karena mampu menstimulasi respons imun yang terarah dan menetralkan patogen. Namun, tantangan utamanya adalah memilih antigen yang efektif, karena beberapa antigen meskipun sangat ekspresif di permukaan patogen, bisa sangat bervariasi sehingga sulit dikenali oleh antibodi yang dihasilkan vaksin (Ashfield *et al.*, 2022). Meskipun demikian, vaksin subunit dianggap lebih aman dan lebih mudah untuk diproduksi. Akan tetapi, sangat penting untuk memasukkan bahan aktif yang dapat menimbulkan respons imun yang lebih kuat (Suryaningsih *et al.*, 2022). Contoh vaksin subunit adalah OspA (*Braun's lipoproteins*) sebuah lipoprotein dari bakteri *Borrelia burgdorferi*. (Hasija, 2021).

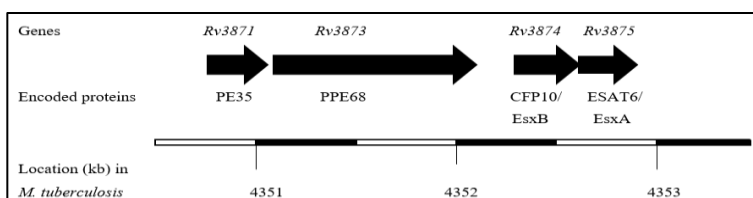
1.2.3 Gen Rv3875

Early Secreted Antigenic Target 6 kDa (ESAT-6) adalah protein dengan berat molekul rendah dari *Mycobacterium tuberculosis* yang sangat imunogenik dan relevan untuk diagnosis tuberkulosis dan pengembangan vaksin subunit. Gen yang mengkode protein ESAT-6 adalah Rv3875 yang telah diidentifikasi terletak di dalam



ntu dari *Mycobacterium tuberculosis*, yang dikenal sebagai RD1 (Mustafa, 2021). Dalam percobaan pada tikus yang telah terinfeksi, ESAT-6 dapat memicu respons imun sel T yang kuat, meningkatkan kekebalan memori (ingatan imun terhadap infeksi). Oleh karena itu, ESAT-6 sangat imunogenik dan berpotensi digunakan untuk diagnosis atau vaksin (Harboe *et al.*, 1996).

ESAT-6 telah dievaluasi sebagai kandidat vaksin untuk melindungi terhadap tuberkulosis (TB). Protein ini mampu menginduksi respons imun sel T yang kuat dan luas, terutama ketika digunakan dalam bentuk vaksin DNA multigenik pada model tikus. ESAT-6 terbukti mampu memicu respons memori imun dan memberikan perlindungan jangka panjang terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Selain itu, protein ini telah digunakan dalam vaksin subunit ID93 yang menunjukkan keunggulan penting, yaitu tidak menyebabkan reaktivitas terhadap PPD (*purified protein derivative*), sehingga tidak mengganggu uji tuberkulin yang digunakan untuk diagnosis TB (Mustafa, 2023).

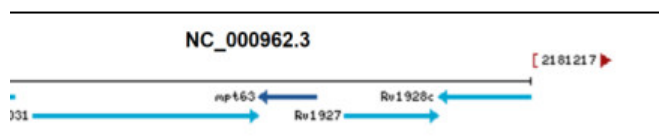


Gambar 3. Lokasi Rv3875 Dalam Genom *M. tuberculosis*
Sumber: (Mustafa, 2021).

1.2.4 Gen Rv1926c

MPT63 adalah protein kecil yang disekresikan secara dominan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Protein ini dikode oleh gen Rv1926c. Meskipun fungsi pastinya belum diketahui, protein ini diketahui bersifat imunogenik, artinya mampu merangsang respon imun dalam tubuh. Selain itu, MPT63 juga diduga berperan dalam proses virulensi, yaitu kemampuan bakteri untuk menyebabkan penyakit. Studi menunjukkan bahwa MPT63 memicu respon humoral pada babi guinea yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Goulding, 2002).

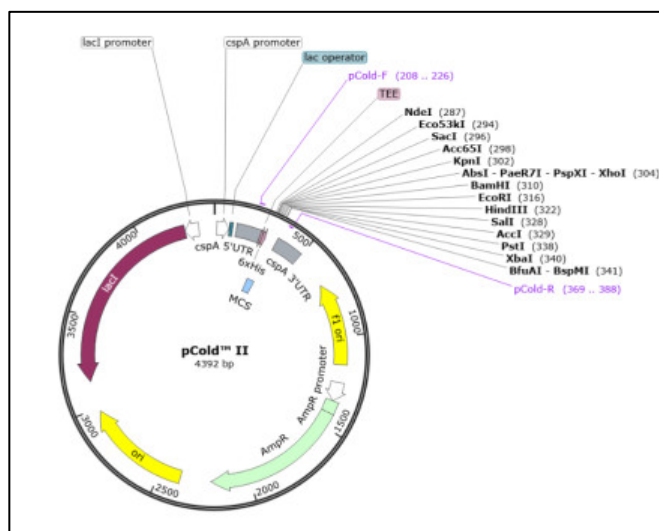
Pemetaan epitop sel T mengidentifikasi 30 residu N-terminal sebagai domain imunodominan. Selain itu, sistem transposisi *in vitro* Tn552phoA menegaskan MPT63 sebagai protein sekresi yang terkait permukaan sel dan berpotensi mendukung virulensi (Goulding, 2002). MPT63 tidak menunjukkan reaktivitas silang secara serologis dengan protein dari spesies *Mycobacterium* lain. Artinya, antibodi yang mengenali MPT63 tidak akan bereaksi dengan protein dari bakteri *Mycobacterium* selain anggota kompleks *Mycobacterium tuberculosis*. Karena sifat spesifik ini, MPT63 dianggap sebagai kandidat yang potensial untuk digunakan dalam diagnosis spesifik infeksi *M. tuberculosis* serta dalam pengembangan vaksin terhadap penyakit tuberkulosis. (Agus *et al.*, 2021).



4. Lokasi Rv1926c Dalam Genom *M. tuberculosis*
Sumber: (NCBI, 2024)

1.2.5 Vektor

Vektor DNA adalah suatu alat atau sistem penyimpanan asam nukleat yang digunakan untuk membawa potongan DNA tertentu ke dalam sel, biasanya sel bakteri. Vektor ini memiliki dua karakteristik utama, yaitu kemampuannya untuk mereplikasi diri secara mandiri di dalam sel inang, serta kemampuannya untuk bergabung atau disisipi oleh potongan DNA lain. Potongan DNA yang disisipkan biasanya berasal dari organisme yang berbeda dengan vektor itu sendiri. Ketika DNA asing ini digabungkan dengan DNA vektor, terbentuklah suatu struktur yang dikenal sebagai DNA rekombinan (*recombinant DNA*), yang sangat penting dalam teknik rekayasa genetika. Vektor DNA memiliki tiga elemen utama. Pertama, *origin of replication*, yaitu urutan DNA spesifik tempat dimulainya replikasi, yang penting agar vektor dapat memperbanyak diri di dalam sel bakteri. Kedua, situs enzim restriksi, yaitu lokasi pemotongan DNA yang memungkinkan penyisipan DNA target ke dalam vektor. Banyak vektor memiliki *multiple cloning site* (MCS), yaitu kumpulan situs enzim restriksi yang mempermudah penyambungan DNA menggunakan enzim ligase setelah pemotongan dengan enzim yang sama. Ketiga, penanda seleksi (*selectable marker*), biasanya berupa gen resistensi antibiotik seperti ampicilin yang memungkinkan hanya bakteri dengan vektor berhasil tumbuh saat diberi antibiotik, sehingga memudahkan proses identifikasi (Carter dan Shieh, 2015).



Gambar 5. Peta Skematik Vektor pCold II

Sumber: (Snappgene)



ah vektor ekspresi protein berukuran 4392 bp berbasis *E. coli* k meningkatkan produksi protein rekombinan yang larut dan ar. Vektor ini menggunakan teknologi *Cold Shock* dengan mengaktifkan ekspresi protein secara efisien pada suhu rendah unan suhu ini menekan pertumbuhan sel dan ekspresi protein

inang, sehingga meningkatkan hasil dan kemurnian protein target. pCold II dilengkapi dengan elemen seperti 5' UTR, lac operator, gen resistensi ampisilin, *Origin of Replication* ColE1, *Multiple Cloning Site* (MCS), serta His-tag (Qing *et al.*, 2004).

1.2.6 Fusi Gen

Fusi gen didefinisikan sebagai hasil penggabungan dua atau lebih gen yang pada awalnya mengkode protein yang berbeda. Fusi gen memiliki banyak aplikasi dalam bioteknologi, mulai dari metode analitik hingga rekayasa metabolisme (Monterrey, 2022). Sejumlah besar protein fusi yang terbentuk secara alami telah berhasil dikarakterisasi dan diteliti, menunjukkan beragam struktur atau arsitektur yang dirancang secara khusus untuk menjalankan fungsi-fungsi penting dalam tubuh organisme hidup pada tingkat molekuler. Penggabungan domain-domain dalam satu protein, seperti yang terlihat pada protein fusi alami, dianggap sebagai bagian penting dari proses evolusi (Yu *et al.*, 2014).

Teknik fusi gen yang umum digunakan adalah teknik yang melibatkan penggunaan enzim restriksi bersama dengan reaksi ligasi DNA, yang sering disebut sebagai reaksi potong dan tempel. Teknik ini telah digunakan sebagai prosedur standar untuk menghasilkan gen hibrida. Namun, prosedur seperti itu sering meninggalkan urutan tambahan (situs restriksi) di bagian sambungan DNA. Urutan yang tidak diinginkan ini bisa mengubah jarak antar bagian DNA dan menambahkan asam amino ekstra di titik sambungan. Hal ini bisa memengaruhi bentuk dan fungsi protein gabungan (Lu, 2005).

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan fusi gen Rv3875 ke dalam plasmid rekombinan Rv1926c-pCold II. dan mengkarakterisasi klon rekombinan Rv3875-Rv1926c-pCold II.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan vaksin subunit yang lebih efektif dan aman terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, melalui pendekatan rekayasa genetika dengan melakukan fusi gen. Secara lebih luas, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar ilmiah untuk riset lanjutan dalam bidang imunologi molekuler dan pengembangan produk bioteknologi.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2025 – April 2025, bertempat di Laboratorium Molekuler *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUMRC), Makassar.

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mikropipet, vortex, timbangan analitik, rak tabung, botol reagen (100 mL dan 250 mL), *reagen reservoir*, *syringe*, gelas ukur, sendok tanduk, cawan petri, ose lurus, ose bulat, batang L, Bio-Rad PCR, elektroforesis, *gel documentation*, *waterbath*, *microwave*, *autoclave*, *bio-safety cabinet*, inkubator, *incubator shaker*, kulkas 4°C, *freezer -20°C*, *freezer -80°C*, dan *cooler box*.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain plasmid rekombinan Rv1926c-pColdII, pasangan primer spesifik (*forward dan reverse*) [Integrated DNA Technology], kit enzim BamHI [Thermo Scientific], kit enzim HindIII [Thermo Scientific], kit enzim XbaI [Thermo Scientific], kit enzim T4 DNA Ligase [Thermo Scientific], enzim *2x MyTaq HS Red Mix* [Bioline], *High Pure Plasmid Isolation kit* [Roche], *QIAquick PCR Purification Kit* [Qiagen], *LB Broth* (Lennox) [Sigma-Aldrich], *Nuclease free water* [Sigma-Aldrich], *Water One* [One Med], *DNA Ladder* (100 bp dan 1 kb) [Vivantis], *DNA Loading Dye 5x* [Bioline], Agarosa [1st Base], Ethidium Bromida [Merck], *Bacteriological Agar* [Sigma-Aldrich], *TBE Buffer 10x* [Sigma Aldrich], CaCl₂, X-Gal [Thermo Scientific], IPTG, Dimethyl Formamide, Ampicilin, *E.coli strain BL21 chemically competent cells* [Sigma-Aldrich], gliserol 80%, Ethanol 80%, tabung eppendorf (0,2 mL dan 1,5 mL), tabung falcon (15 mL dan 50 mL), *syringe filter* 0,2 µL, aluminium foil, es kristal, dan *micropippet tips* (1000 µL, 200 µL, dan 10 µL).

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Amplifikasi Gen Rv3875

DNA genomik (gDNA) dari *Mycobacterium tuberculosis* digunakan sebagai cetakan (*template*) pada proses amplifikasi gen Rv3875 menggunakan metode *reaction* (PCR) dengan sepasang primer spesifik seperti pada disiapkan dalam total volume 25 µL, terdiri dari 12,5 µL enzim (*Red Mix*), 1 µL primer 3875-F, 1 µL primer 3875-R, 5,5 µL dan 5 µL gDNA *Mycobacterium tuberculosis*. Kondisi PCR denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit. Selanjutnya siklus sebanyak 35 siklus dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 1



menit, *annealing* pada suhu 60°C selama 50 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Ekstensi terakhir dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit, dan sampel disimpan pada suhu 12°C. Hasil PCR gen Rv3875 dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis pada gel agarosa 1%. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit dengan tegangan listrik sebesar 100 volt.

Tabel 1. Rancangan Primer Gen Rv3875

Antigen	Primer	Sekuens	Sisi Restriksi
Rv3875	3875-F	GCG C GG ATC CAT GAC AGA GCA GCA GTG G	BamHI
	3875-R	GCG C AA GCT TTG CGA ACA TCC CAG TGA C	HindIII
Keterangan: Huruf bercetak merah dan ungu menunjukkan sisi restriksi yang ditambahkan			

2.3.2 Visualisasi Menggunakan Elektroforesis Gel Agarosa

Gel agarosa yang digunakan memiliki konsentrasi sebesar 1%, yang disiapkan dengan melarutkan 1 g bubuk agarosa ke dalam 100 mL larutan TBE 0,5x. Larutan tersebut kemudian dipanaskan menggunakan microwave selama 2 hingga 3 menit hingga agarosa larut sempurna, lalu didinginkan hingga mencapai suhu yang memungkinkan untuk dituangkan ke dalam cetakan. Setelah itu, ditambahkan 3 µL etidium bromida (EtBr) ke dalam larutan gel. Gel yang mulai mendingin kemudian dituangkan ke dalam cetakan, dan setelah mengeras, *comb* diangkat dan gel ditempatkan ke dalam aparatus elektroforesis yang telah diisi dengan larutan TBE 0,5x. Sampel DNA beserta marka *DNA Ladder* 100 bp kemudian dimasukkan ke dalam sumur pada gel. Aparatus elektroforesis dihubungkan dengan sumber listrik bertegangan 100 V, dan proses running elektroforesis dilakukan selama 60 menit. Pita DNA yang terbentuk selanjutnya divisualisasikan menggunakan perangkat *gel documentation*.

2.3.3 Purifikasi Produk PCR Gen Rv3875

Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan *QIAquick PCR Purification Kit* [Qiagen]. Produk PCR gen Rv3875 sebanyak 20 µL dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf, kemudian ditambahkan *PB Buffer* sebanyak 100 µL (5× volume produk PCR). Campuran tersebut dipindahkan ke dalam kolom filter dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 60 detik. Supernatan yang terkumpul di tabung koleksi dibuang, kemudian kolom filter ditambah dengan 750 µL *PE Buffer* dan kembali disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 60 detik. Setelah pembuangan supernatan, kolom filter dipindahkan ke tabung Eppendorf baru, lalu ditambahkan 50 µL *EB Buffer* ke dalam tabung. Hasil DNA dilakukan dengan sentrifugasi pada 13.000 rpm selama 60 detik, lalu dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan kolom filter dapat dibuang. Hasil PCR gen Rv3875 dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis pada gel agarosa 1%. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit dengan tegangan listrik sebesar 100 volt.



2.3.4 Digesti Gen Rv3875 dan Plasmid Rekombinan Rv1926c-pCold II

Digesti gen Rv3875 dan plasmid rekombinan Rv1926c-pCold II dilakukan secara terpisah menggunakan enzim restriksi *FastDigest* BamHI dan HindIII serta XbaI. Untuk Gen Rv3875, campuran digesti disiapkan dalam total volume 30 μL , terdiri dari 10 μL *insert* (Rv3875), 2 μL *FastDigest Buffer* 10 $\times$, 1 μL *FastDigest* BamHI, 1 μL *FastDigest* HindIII, dan 16 μL *nuclease free water*. Inkubasi berlangsung pada suhu 37 °C selama 15 menit. Untuk plasmid Rv1926c-pCold II dibuat sebanyak 2 *tube*, total volume setiap *tube* nantinya yakni sebanyak 20 μL , *tube* pertama terdiri atas 5 μL plasmid, 2 μL *FastDigest Buffer* 10 $\times$, 1 μL *FastDigest Restriction Enzyme* BamHI, 1 μL *FastDigest Restriction Enzyme* HindIII, dan 11 μL *nuclease free water*. *Tube* kedua terdiri atas 5 μL plasmid, 2 μL *FastDigest Buffer* 10 $\times$, 1 μL *FastDigest Restriction Enzyme* BamHI, 1 μL *FastDigest Restriction Enzyme* XbaI, dan 11 μL *nuclease free water*, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Setelah inkubasi, enzim restriksi dinaktivasi pada suhu 80 °C selama 10 menit. Konfirmasi produk restriksi dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1%, selama 60 menit dengan tegangan 100 volt.

2.3.5 Ligasi Gen Rv3875 ke Plasmid Rekombinan Rv1926c-pCold II

Ligasi gen Rv3875 ke plasmid rekombinan Rv1926c-pCold II dilakukan setelah kedua fragmen didigesti dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII. Campuran ligasi disiapkan dalam total volume 20 μL , yang terdiri dari 2 μL DNA plasmid rekombinan Rv1926c-pCold II, 5 μL gen Rv3875, 2 μL 10X *T4 DNA Ligase Buffer*, 1 μL *T4 DNA Ligase*, dan 10 μL *nuclease free water*. Campuran ligasi kemudian dihomogenkan dan disentrifugasi singkat (3–5 detik). Setelah itu, diinkubasi pada suhu 22 °C selama 35 menit.

2.3.6 Penyiapan Sel Kompeten

Bakteri *E. coli* BL21 dikompetenkan dengan perlakuan CaCl_2 0,1 M. Sebanyak satu koloni murni *E. coli* BL21 diinokulasikan ke dalam 10 mL medium LB cair, kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* pada suhu 37 °C dan kecepatan 175 rpm selama 18 jam. Setelah masa inkubasi awal, 1,5 mL kultur dipindahkan ke 40 mL medium LB cair baru, dilanjutkan inkubasi selama 2 jam pada suhu 37 °C dan kecepatan 175 rpm. Kultur kemudian ditempatkan dalam es selama 30 menit untuk mendinginkan sel, lalu disentrifugasi pada 4.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang hingga sisa volume kira-kira 3 mL, suspensi sel dibagi ke dalam tiga tabung Eppendorf dan kembali diinkubasi di atas es selama 5 menit. Ketiga tabung tersebut disentrifugasi lagi pada 4.000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatan hanya pelet sel yang tertinggal. Setiap pelet diresuspensi 0,1 M, diinkubasi di atas es selama 10 menit, lalu disentrifugasi selama 10 menit. Setelah pembuangan supernatan, pelet akhir 50 μL CaCl_2 0,1 M dan disimpan pada *freezer* –20 °C hingga sformasi produk ligasi.



2.3.7 Transformasi ke *Escherichia coli* BL21

Transformasi plasmid ligasi ke dalam sel kompeten *E. coli* BL21 dilakukan dengan menambahkan 10 μ L produk ligasi ke dalam 50 μ L sel kompeten. Campuran sel dan ligasi diinkubasi pada es selama 30 menit, kemudian dilakukan *heat shock* pada 42 °C selama 45 detik dan segera diinkubasi dengan es selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 500 μ L medium LB cair, lalu kultur diinkubasi pada *shaker incubator* pada suhu 37 °C dengan kecepatan 175 rpm selama 1 jam untuk pemulihan. Setelah pemulihan, sel disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 1 menit, dan supernatan dibuang hingga tersisa sekitar 50 μ L yang mengandung sel transforman. Kultur transforman kemudian diinokulasikan dengan metode sebar pada 20 ml medium LB agar yang mengandung 20 uL ampicilin, 22.4 uL IPTG. Cawan petri yang berisi klon transforman diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam.

2.3.8 Karakterisasi Klon Rekombinan

2.3.8.1 PCR Koloni

Proses analisis dilakukan untuk mengevaluasi keberhasilan ligasi gen Rv3875 ke dalam plasmid rekombinan Rv1926c-pColdII. Amplifikasi DNA *insert* dilakukan menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan menggunakan koloni putih yang tumbuh dan primer spesifik seperti pada Tabel 1. Reaksi PCR disiapkan dalam volume total 25 μ L, terdiri atas 12,5 μ L enzim PCR (2 $\times$ MyTaq HS Red Mix), 1 μ L primer *forward*, 1 μ L primer *reverse*, 5,5 μ L *nuclease free water*, dan 5 μ L DNA hasil transformasi. Kondisi PCR diawali dengan pra-denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, diikuti dengan 35 siklus reaksi yang meliputi denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 60°C selama 50 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Reaksi diakhiri dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit dan penyimpanan sampel pada suhu 12°C. Hasil amplifikasi dianalisis melalui elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% untuk mengonfirmasi keberadaan fragmen gen Rv3875.

2.3.8.2 Isolasi Plasmid dan Analisis Sekuensing

Plasmid rekombinan diisolasi dari koloni putih *E. coli* BL21 yang telah tumbuh dan menunjukkan hasil positif pada PCR koloni. Proses isolasi dilakukan menggunakan kit *High Pure Plasmid Isolation* [Roche] sesuai petunjuk manual. Koloni putih dikultur dalam 4 mL media LB cair yang telah ditambahkan 4 μ L ampicilin, kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* pada suhu 37°C selama 16 jam. *Binding buffer* didinginkan di atas es sebelum digunakan. Setelah inkubasi, pada kecepatan 6.000 rpm selama 30 detik, dan supernatan terbentuk diresuspensi dengan 250 μ L *suspension buffer*, dan dikentalkan secara perlahan. Selanjutnya, 250 μ L *lysis buffer* dituangkan ke dalam tabung dan dikentalkan dengan cara memutar tabung dibalik secara perlahan sebanyak 3–6 kali untuk menghomogenkan. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit (tidak melebihi 30°C). Setelah inkubasi, 250 μ L *binding buffer* dingin ditambahkan dan



larutan dihomogenkan kembali dengan membalik tabung sebanyak 3–6 kali. Campuran kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung filter yang telah diletakkan pada tabung koleksi, lalu disentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan yang sama. Tabung filter pertama dibuang dan diganti dengan tabung filter baru pada tabung koleksi yang sama. Selanjutnya, 700 μ L *wash buffer II* ditambahkan ke tabung filter dan disentrifugasi selama 1 menit pada 13.000 rpm. Setelah supernatan dibuang, kembali disentrifugasi selama 1 menit. Tabung koleksi berikut supernatannya dibuang. Tabung filter dipindahkan ke tabung Eppendorf steril 1,5 mL, dan ditambahkan 100 μ L *elution buffer*, lalu disentrifugasi selama 1 menit pada 13.000 rpm untuk memperoleh plasmid hasil isolasi.

Plasmid rekombinan digunakan sebagai cetakan (*template*) pada proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan sepasang primer spesifik seperti pada Tabel 2. Reaksi PCR disiapkan dalam total volume 25 μ L, terdiri dari 12,5 μ L enzim PCR (2 $\times$ *MyTaq HS Red Mix*), 1 μ L primer 3875-F, 1 μ L primer 3875-R, 5,5 μ L *nuclease free water*, dan 5 μ L gDNA *Mycobacterium tuberculosis*. Kondisi PCR diawali dengan pra denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit. Selanjutnya siklus PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 60°C selama 50 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Ekstensi terakhir dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit, dan sampel disimpan pada suhu 12°C. Hasil PCR gen Rv3875 dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis pada gel agarosa 1%. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit dengan tegangan listrik sebesar 100 volt.

Tabel 2. Rancangan Primer Plasmid Rekombinan

Antigen	Primer	Sekuens	Sisi Restriksi
Fusi Gen	3875-F	GCG C GG ATC CAT GAC AGA GCA GCA GTG G	BamHI
	1926c-R	GCG C AA GCT TTG CGA ACA TCC CAG TGA C	XbaI
Keterangan: Huruf bercetak merah dan ungu menunjukkan sisi restriksi yang ditambahkan			

Plasmid rekombinan Rv3875-1926c-pColdII yang telah diisolasi, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf sebanyak 40 μ L dan sebanyak 15 μ L primer *forward* dimasukkan ke dalam tabung eppendorf terpisah. Kedua tabung tersebut kemudian dikirimkan ke perusahaan Genetika Science untuk dilakukan analisis sekuensing DNA.

