

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri patogen *Mycobacterium tuberculosis* yang mengancam nyawa di seluruh dunia (Nasution & Amalia, 2022). *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa TB adalah penyakit yang sudah lama dan telah menunjukkan peningkatan yang signifikan pada populasi manusia selama bertahun-tahun. Pada tahun 2023 terdapat sekitar 10,8 juta kasus TB baru di seluruh dunia. Dari jumlah tersebut, sebanyak 55% kasus terjadi pada laki-laki, 33% kasus pada perempuan dan 12 persen kasus pada anak-anak. Lima negara menyumbang kasus TB tertinggi di dunia pada tahun 2023 mencapai 56%, yaitu negara India (26%), Indonesia (10%), China (6,8%), Filipina (6,8%) dan Pakistan (6,3%) (WHO, 2024).

Laporan Kementerian Kesehatan RI tahun 2025, di Indonesia kasus TB tercatat lebih dari 1 juta dan kasus kematian lebih dari 125 ribu setiap tahunnya. Pada tahun 2024, kasus TB di Indonesia tercatat sebanyak 889 ribu kasus baru. Setiap jam tercatat sebanyak 14 orang meninggal karena TB. Jumlah ini menempatkan Indonesia sebagai negara dengan kasus tuberkulosis tertinggi kedua di dunia. Penyumbang kasus tertinggi di Indonesia, yaitu beberapa provinsi di pulau Jawa, provinsi Sumatera Utara dan provinsi Sulawesi Selatan yang masing-masing mencatat lebih dari 40 ribu kasus (Kemenkes RI, 2024).

Menurut laporan Dinas Kesehatan Provinsi Sulawesi Selatan tahun 2024, pada tahun 2024 terdapat sekitar 34.500 kasus tuberkulosis baru di Sulawesi Selatan. Jumlah ini menempatkan Sulawesi Selatan sebagai salah satu provinsi dengan beban tuberkulosis tertinggi di Indonesia. Dari jumlah kasus baru tersebut, sekitar 3.700 kasus terjadi pada anak-anak di bawah usia 15 tahun. Hal ini menjadi perhatian khusus dalam upaya pengendalian tuberkulosis di Sulawesi Selatan. Angka kematian akibat tuberkulosis di Sulawesi Selatan pada tahun 2024 diperkirakan mencapai 5.500 orang (Dinkes Sulsel, 2024).

Sulitnya memberantas kasus TB disebabkan oleh tingkat infeksi yang tinggi dalam menyerang paru-paru dan penyebaran TB yang cepat pada organ-organ lain, seperti kelenjar getah bening, kulit, tulang, hingga otak (Nabila *et al.*, 2024). Sementara itu, vaksin *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) masih menjadi satu-satunya vaksin yang disetujui secara komersil untuk digunakan dalam pengobatan TB (Singh, 2024). Vaksin BCG efektif sebagai perlindungan terhadap TB, khususnya pada anak-anak. Akan tetapi, kemampuan vaksin BCG menurun dalam melawan patogenitas TB pada orang dewasa (Martinez *et al.*, 2022).



Optimized using
trial version
www.balesio.com

nomena tersebut, fokus utama dalam memberantas dan mencegah ra global adalah penelitian berkelanjutan untuk mengembangkan (Singh, 2024). Karakterisasi protein spesifik dari *M. tuberculosis* apat menjadi alternatif untuk pengembangan vaksin maupun idin *et al.*, 2022). Salah satu protein pada *M. tuberculosis* yang genesis TB adalah protein ESAT-6 (*Early Secreted Antigenic Target*-en Rv3875 (Passos *et al.*, 2024).

Sebagai langkah awal produksi protein, kloning gen perlu dilakukan. Kloning terdiri atas ligasi gen ke vektor dan transformasi ke sel inang (Dewi et al., 2021). Vektor pTrcHis A dipilih karena merupakan vektor ekspresi yang memiliki *His tag* sehingga memiliki kemampuan ekspresi gen yang diinduksi oleh isopropil β -D-1-tiogalaktopiranosida (IPTG) (Chung et al., 2023). Sel inang yang digunakan harus memiliki kemampuan tumbuh dalam densitas yang tinggi sehingga dapat menghasilkan protein rekombinan dalam jumlah besar. *Eschericia coli* BL21 dipilih karena mampu menjadi sel inang untuk kloning gen Rv3875 dan produksi protein rekombinan (Yusuf et al., 2021).

Oleh karena itu, pada penelitian dilakukan ligasi gen Rv3875 ke vektor ekspresi pTrcHis A untuk memperoleh vektor rekombinan kemudian ditransformasi ke dalam *E. coli* sebagai sel inang untuk memperoleh vektor rekombinan pTrcHis A – 3875 dalam jumlah besar sebagai studi pendahuluan.

1.2 Teori

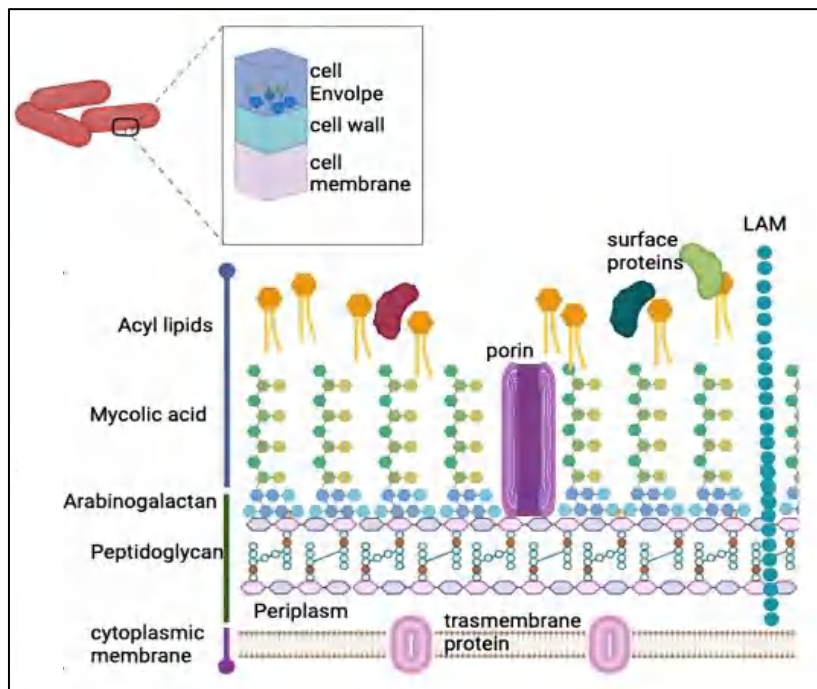
1.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri dari famili Mycobacteriaceae, genus *Mycobacterium*. Bakteri ini bersifat tahan asam yang dipengaruhi oleh struktur dinding sel yang kaya akan lipid dan peptidoglikan yang tebal, seperti asam mikolat, arabinogalaktan, dan lipoarabinomannan (Jacobo-Delgado et al., 2023). Asam mikolat merupakan asam lemak α -alkil β -hidroksi rantai sangat panjang, menyebabkan dinding sel *M. tuberculosis* menjadi hidrofobik dan sangat impermeabel terhadap banyak antibiotik (Pawelczyk & Kremer, 2015). Secara morfologi, *M. tuberculosis* adalah berbentuk batang dengan panjang 1-4 μ m dan lebar sekitar 0,3-0,6 μ m (Estela Karolina et al., 2024).



ambar 1. Morfologi *Mycobacterium tuberculosis*
Sumber: National Institute of Health, 2016





Gambar 2. Struktur Dinding Sel *Mycobacterium tuberculosis*
 Sumber: Jacobo-Delgado et al., 2023

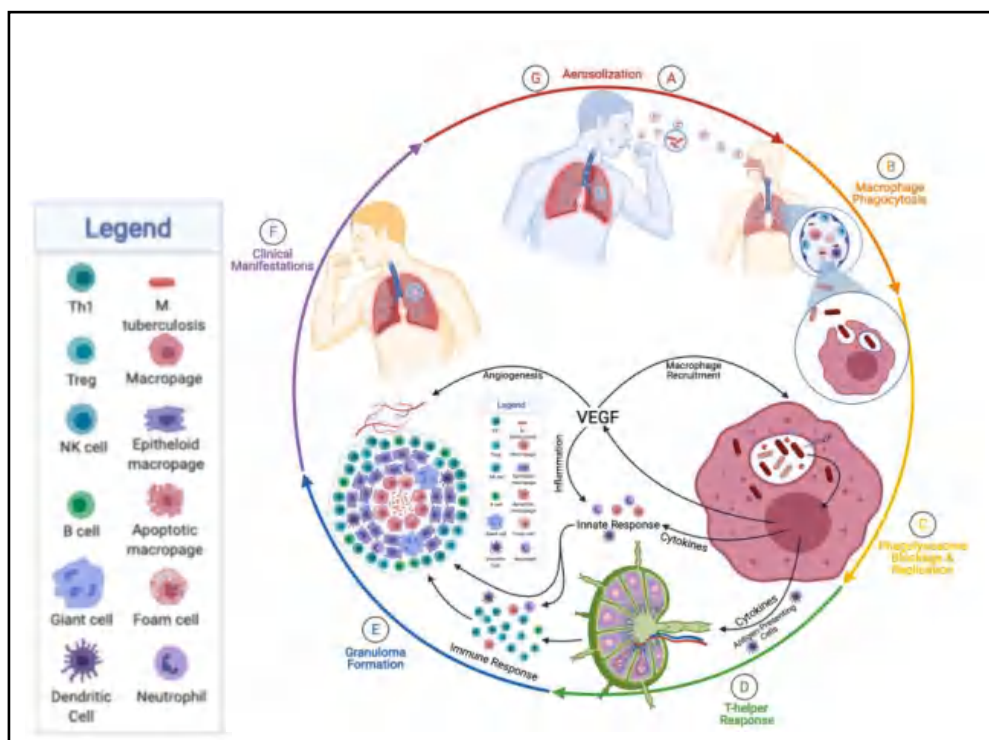
Adapun klasifikasi *M. tuberculosis* berdasarkan data dari NCBI sebagai berikut:

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Bacillati
Phylum	: Actinomycetota
Class	: Actinomycetes
Order	: Mycobacteriales
Family	: Mycobacteriaceae
Genus	: <i>Mycobacterium</i>
Species	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

TB adalah penyakit menular yang disebabkan oleh infeksi bakteri *M. tuberculosis*. Sebagai bakteri aerob obligat, *M. tuberculosis* berkembang dengan cepat ketika kondisi lingkungan kaya akan oksigen (Estela Karolina et al., 2024). Bakteri *M. tuberculosis* masuk ke dalam tubuh melalui saluran pernapasan, pencernaan, atau luka pada permukaan kulit. Kasus penularan bakteri ini paling banyak melalui inhalasi droplet dari penderita TB aktif. Bakteri yang masuk ke dalam tubuh akan berkembang dalam tubuh



yang lemah. Pada seseorang dengan daya tahan tubuh yang rendah, bakteri ini akan aktif menyerang dan berkembang. Bakteri yang masuk akan berkembang dan menyebar melalui pembuluh darah atau kelenjar getah bening. Infeksi hampir seluruh organ tubuh seperti organ-organ pada saluran pencernaan, ginjal, tulang, hingga otak (Sari et al., 2022).



Gambar 3. Mekanisme Infeksi TB Melalui Aerosol, (A) dan (G) Aerolisasi oleh penderita TB, (B) Peristiwa fagositosis oleh makrofag, (C) Pemblokiran fagolisosom dan replikasi bakteri, (D) Respon sel *T-helper*, (E) Formasi granuloma oleh sel imun adaptif, (F) Munculnya gejala klinis penderita TB
 Sumber: (Yogo et al., 2022)

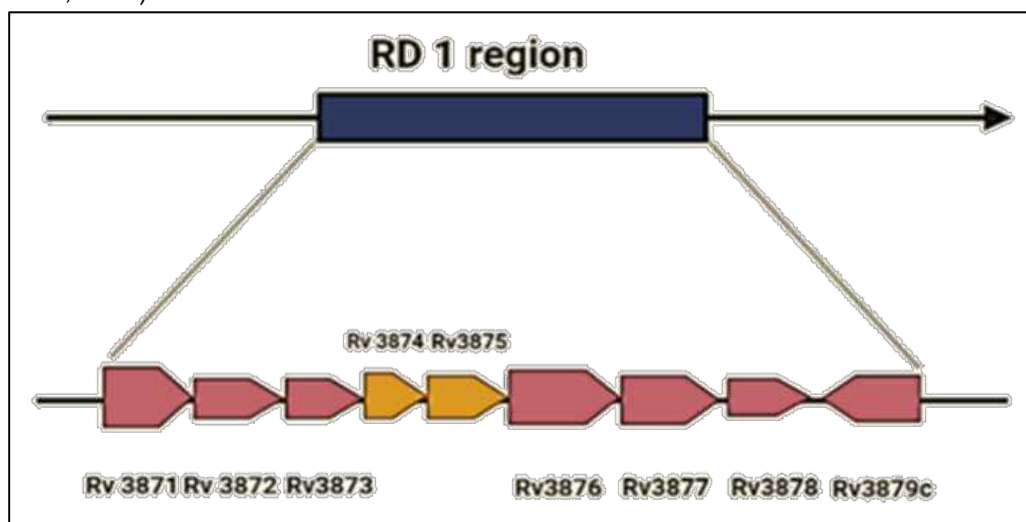
Pertahanan sistem imun tubuh bawaan dan adaptif berperan dalam melawan infeksi *M. tuberculosis*. Saat seorang penderita TB aktif mengeluarkan droplet karena batuk, maka droplet yang mengandung *M. tuberculosis* masuk melalui pernapasan seseorang. Droplet tersebut akan mencapai alveoli paru-paru. Di dalam alveoli, bakteri akan berinteraksi dengan sistem imun tubuh. Mekanisme fagositosis oleh makrofag dimulai untuk mencoba menghancurkan bakteri yang masuk. Sementara itu, sel dendritik akan menuju kelenjar getah bening untuk mengaktifkan kerja sel T helper. Namun, *M. tuberculosis* memiliki mekanisme pencegahan terhadap fagosome dan lisosom sehingga tidak dapat dihancurkan dan bakteri mulai bereplikasi. Selama replikasi, *M. tuberculosis* melepaskan materi genetik, seperti DNA, RNA, protease, maupun lipid. Sebagai respon, makrofag yang telah terinfeksi akan melepaskan senyawa sitokin yang dapat memulai respon imun bawaan yang diikuti dengan aktivasi sel *natural killer*, sel dendritik, dan kin, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dilepaskan, memicu peningkatan vaskularisasi ke area lesi (terinfeksi). Respon imun meliputi sel *T-helper*, sel *T-regulator* (treg), dan sel B dipicu ke pusat untuk granuloma. Granuloma berfungsi untuk mengisolasi *M. tuberculosis* mencegah penyebaran secara sistemik. Akan tetapi, pada sistem imun granuloma tidak dapat bekerja secara maksimal untuk menahan



infeksi bakteri. Akibatnya, bakteri akan terlepas dan berproliferasi menyebabkan seseorang memiliki gejala klinis menderita TB (Yogo *et al.*, 2022).

1.2.2 Gen Rv3875

Gen Rv3875 yang mengkode protein ESAT-6 pertama kali diidentifikasi pada tahun 1995 melalui penemuan antigen sel T potensial pada kultur *M. tuberculosis* (Anes *et al.*, 2023). Gen Rv3875 terletak pada lokus genetik yang dikenal sebagai *Region of Difference 1* (RD-1) (Passos *et al.*, 2024). RD-1 merupakan fragmen dari genom *M. tuberculosis* sepanjang 9,5 kilobase (Kb) yang tidak ditemukan pada seluruh strain vaksin BCG *M. bovis* yang telah dilemahkan, namun ditemukan pada strain *M. tuberculosis* yang virulen. RD-1 terdiri atas sembilan gen, mulai dari Rv3871 hingga Rv3879c (Jomehpour *et al.*, 2023).



Gambar 4. Gen Rv3875 pada Lokus RD1

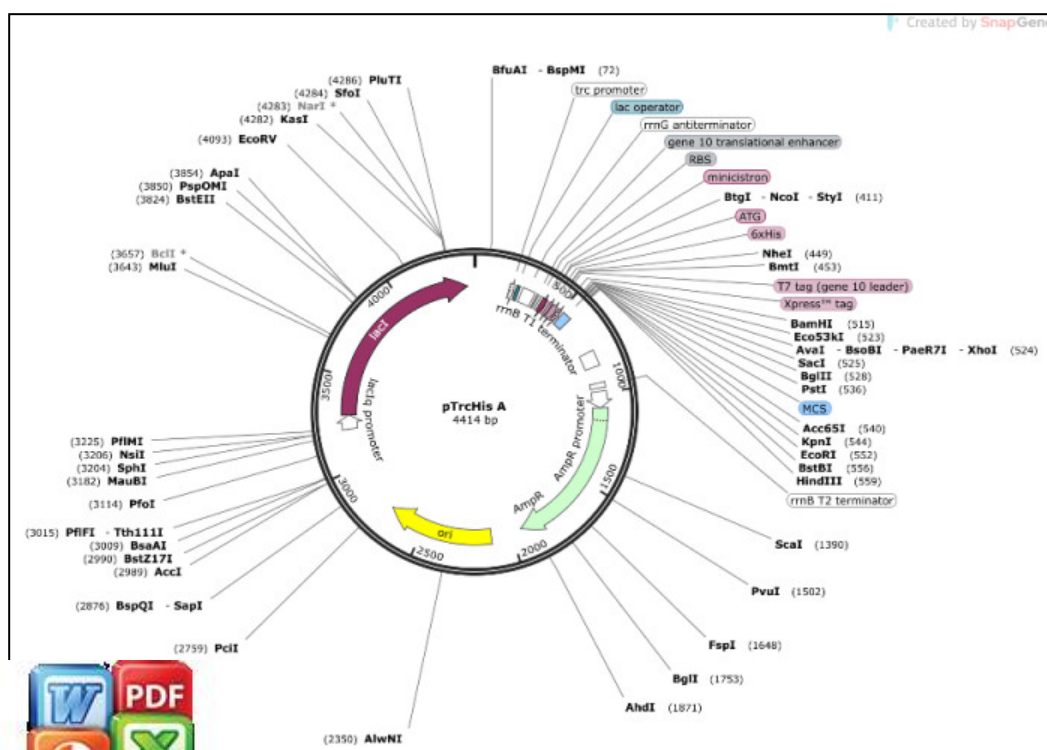
Sumber: Jomehpour *et al.*, 2023

Protein ESAT-6 memiliki berat molekul sebesar 6 kDa (Pratomo & Setyanto, 2013). Protein ESAT-6 disekresi oleh ESAT-6 *secretion system-1* (ESS-1), juga dikenal sebagai *type VII secretion system* (T7SS) (Passos *et al.*, 2024). ESAT-6 membantu proses translokasi *M. tuberculosis* dari fagosom dalam sitoplasma sel inang pada tahap akhir infeksi. *M. tuberculosis* mengganggu ekspresi molekul *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II melalui ESAT-6. ESAT-6 akan berinteraksi dengan *Toll-receptor like 2* (TLR2) dan menstimulasi respon imunitas pada inang. Pengenalan ESAT-6 oleh sel T yang diisolasi dari hewan terinfeksi *M. tuberculosis*, menunjukkan ESAT-6 merupakan antigen bagi sel T selama respon imunitas yang dimediasi sel (*cell-mediated immune* (ungkas J, 2017).



Rv3875 merupakan protein yang imunogenik dalam diagnostik dan unit TB (Jomehpour *et al.*, 2023). Pengembangan diagnostik TB *in vitro* menggunakan *interferon-gamma release assay* (IGRA) menjadi aplikasi protein ESAT-6 yang (2023). IGRA adalah tes darah yang dilakukan dengan mengukur respon sel T yang terpapar oleh *M. tuberculosis*. Prinsip dasar IGRA akan melibatkan pengukuran *interferon-gamma* (IFN- γ) sebagai respon terhadap antigen *M. tuberculosis*

Vektor ekspresi pTrcHis A adalah vektor yang dirancang untuk digunakan dalam kloning gen yang diikuti dengan kemampuan ekspresi protein rekombinan dalam sel inang seperti *E. coli*. Vektor pTrcHis A membawa gen yang resisten terhadap ampisilin (*AmpR*). Gen *AmpR* berperan dalam seleksi bakteri (yang berhasil membawa vektor) pada media yang ditambahkan ampisilin (Invitrogen, 2008). Vektor ekspresi pTrcHis A memiliki gen *LacZ* yang mengkode enzim β -galaktosidase yang dapat diinduksi untuk ekspresi gen *lacZ* oleh IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Dalam aktivitas enzim β -galaktosidase, perlu adanya penambahan X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) pada media sehingga Xgal berfungsi sebagai substrat kromogenik untuk dijadikan sebagai indikator (Sukaryawan, 2022).



ir 5. Skema Representasi Vektor Ekspresi pTrcHis A
Sumber: snapgene



Vektor ekspresi pTrcHis A juga dilengkapi dengan gen operator *lac* (*lacO*) dan gen represor *lacIq* yang memberikan sistem regulasi transkripsi protein yang terkontrol. *LacO* adalah urutan DNA spesifik pada promotor *trc* (pengendali transkripsi gen target pada vektor pTrcHis A) (Invitrogen, 2008). Ketika *lacO* mengikat represor *lacIq*, maka dapat menghalangi kerja RNA polimerase untuk memulai transkripsi gen target. Aktivitas *lac* dan *lacIq* membentuk sistem regulasi pada ekspresi gen target pTrcHis A yang dikontrol oleh IPTG. IPTG akan berikatan dengan represor *lacIq* sehingga protein represor mengalami perubahan bentuk dan kehilangan kemampuannya untuk berikatan dengan *lacO*. Transkripsi gen target akan dimulai oleh RNA polimerase hanya ketika vektor berhasil diinduksi oleh IPTG. Produksi protein gen target yang terkontrol akan menguntungkan bagi sel inang karena beberapa protein rekombinan dapat bersifat toksik bagi sel inang. Produksi protein yang tidak terkontrol menyebabkan metabolisme seluler sel inang dapat terganggu karena akumulasi protein toksik sebelum sel memiliki mekanisme pertahanan yang cukup, maka terjadi kerusakan membran sel atau menyebabkan kematian sel inang (Sukaryawan, 2022).

1.2.4 *Escherichia coli* BL21

E. coli adalah bakteri gram negatif yang berbentuk basil (batang) dengan koloni yang berbentuk bulat dan cembung. *E. coli* termasuk bakteri anaerob fakultatif, sehingga mampu hidup dengan baik ketika terdapat suplai oksigen maupun tidak ada suplai oksigen. Bakteri *E. coli* berukuran 2 μm , lebar 0,4 – 0,7 μm . Dinding sel *E. coli* terdiri atas biopolimer berlapis tunggal, peptidoglikan dan tersusun dari unit berulang disakarida (asam N-asetilglukosamin N-asetilmuramat). Unit disakarida berikatan silang dengan peptida pendek yang terdiri atas lipopolisakarida (LPS) dan fosfolipid. *E. coli* dikenal sebagai organisme komensal yang tidak berbahaya, tetapi juga merupakan organisme komensal patogen multipoten yang dapat menyebabkan berbagai penyakit bila menginfeksi manusia. Sebagai bakteri komensal, *E. coli* salah satu organisme yang sering digunakan sebagai inang karena pertumbuhannya yang cepat dan efisien (Umaruddin *et al.*, 2023).

Proses produksi protein rekombinan juga sering menggunakan *E. coli* BL21 karena dapat tumbuh dengan densitas tinggi sehingga dapat menghasilkan protein dalam jumlah yang besar dalam waktu singkat (Yusuf *et al.*, 2021). Karakteristik *E. coli* BL21, yaitu hilangnya proteinase OmpT dan Lon (Okshevsky *et al.*, 2023). Ketiadaan proteinase OmpT disebabkan oleh delesi, sehingga *E. coli* BL21 tidak memiliki gen untuk memproduksi proteinase tersebut. Sementara itu, produksi proteinase Lon dihambat oleh insersi urutan promotor gen lon, sehingga mencegah proses transkripsi gen lon. Ketiadaan dua proteinase OmpT dan Lon menguntungkan dalam produksi protein karena degradasi protein rekombinan di dalam sel berkurang. Oleh karena itu, protein menjadi lebih stabil dan menghasilkan *yield protein* yang lebih tinggi (Sukaryawan, 2018).



1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Melakukan ligasi gen Rv3875 ke vektor ekspresi pTrcHis A dan transformasi ke *Escherichia coli* BL21.
2. Melakukan karakterisasi klon rekombinan pTrcHis A – 3875.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi riset terkait kloning gen Rv3875 melalui prosedur ligasi dan transformasi.
2. Menghasilkan dan mengkarakterisasi plasmid rekombinan pTrcHis A – 3875 sebagai acuan pengembangan ilmu pengetahuan dan riset molekuler khususnya yang berkaitan dengan tuberkulosis.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2024 – Januari 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 yaitu Bio-Rad PCR, elektroforesis, *gel documentation*, inkubator, *bio-safety cabinet*, *autoclave*, *centrifuge*, *waterbath*, *microwave*, *incubator shaker*, *cooler box*, *freezer* -20°C dan -80°C, kulkas 4°C, vortex, timbangan analitik, mikropipet, ose bulat, ose lurus, batang L, cawan petri, tabung eppendorf (1,5 mL dan 0,2 mL), tabung falcon (50 mL dan 15 mL), gelas ukur, sendok tanduk, rak tabung (eppendorf dan falcon), botol reagen (100 mL dan 250 mL), *reagen reservoir*, spoit, dan *syringe filter* 0,2 µL.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat *Mycobacterium tuberculosis*, pasangan primer spesifik (forward dan reverse) [Integrated DNA Technology], vektor ekspresi pTrcHis A, kit enzim BamHI [Thermo Scientific], kit enzim HindIII [Thermo Scientific], kit enzim T4 DNA Ligase [Thermo Scientific], enzim 2x *MyTaq HS Red Mix* [Bioline], *GeneJET Gel Extraction kit* [Thermo Scientific], *High Pure Plasmid Isolation kit* [Roche], *GeneJET Genomic Purification kit* [Thermo scientific], *QI PCR Purification kit* [Qiagen], *LB Broth* (Lennox) [Sigma-Aldrich], *Nuclease free water* [Sigma-Aldrich], *Water One* [One Med], *Ethidium Bromida* [Merck], *DNA Ladder* (100 bp dan 1000 bp) [Vivantis], *DNA Loading Dye 5x* [Bioline], *Agarosa* [1st Base], *Bacteriological Agar* [Sigma-Aldrich], *TBE Buffer* 10x [Sigma Aldrich], CaCl_2 , X-gal [Thermo Scientific], *Dimethyl Formamide*, Ampisilin, *E.coli strain BL21 chemically competent cells* [Sigma-Aldrich], gliserol 80%, IPTG, Etanol 80%, aluminium foil, es kristal, dan *micropipette tips* (1000 µL, 200 µL, dan 10 µL).

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel *Mycobacterium tuberculosis* diperoleh dari isolat klinis Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

1 Genomik *Mycobacterium tuberculosis*

Genomik *Mycobacterium tuberculosis* mengikuti manual *GeneJET Gel Extraction Kit* [Thermo Scientific] yang dimulai dengan lisis sel. Sampel dimasukkan ke dalam *Lysis Solution* dan 20 µL *Proteinase K Solution* pada 200 µL sampel dimasukkan pada suhu 56°C selama 10 menit pada inkubator shaker hingga selesai. Kemudian ditambahkan 200 µL *Ethanol* 96% dan dihomogenkan menggunakan

mikropipet. Lisat sel yang diperoleh dipindahkan ke kolom purifikasi pada tabung koleksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 1 menit. Cairan (supernatan) dibuang bersama dengan tabung koleksi, lalu kolom purifikasi dipindahkan pada tabung koleksi yang baru kemudian ditambahkan 500 μL *Wash Buffer* I (dengan tambahan *Ethanol*), disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Cairan pada tabung koleksi dibuang, kemudian kolom purifikasi diletakkan kembali pada tabung koleksi, kemudian ditambahkan 500 μL *Wash Buffer* II (dengan tambahan *Ethanol*) ke tabung koleksi, lalu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Tabung koleksi beserta cairan dibuang lalu kolom purifikasi dipindahkan ke tabung eppendorf 1,5 mL baru, lalu ditambahkan 200 μL *Elution Buffer* tepat pada tengah kolom purifikasi untuk mengelusi DNA kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Terakhir, kolom sentrifugasi dipindahkan dari tabung eppendorf.

2.3.3 Amplifikasi Gen Rv3875

Genom *M. tuberculosis* digunakan sebagai cetakan DNA untuk amplifikasi gen Rv3875 dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan sepasang primer spesifik seperti pada Tabel 1. Amplifikasi gen Rv3875 (Tabel 2) dengan metode PCR menggunakan suhu pra denaturasi 94°C selama 5 menit, 35 siklus denaturasi (94°C selama 1 menit), *annealing* (57°C selama 50 detik), dan ekstensi (72°C selama 1 menit). Ekstensi terakhir dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit, dan sampel disimpan pada suhu 12°C. 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	Forward	GCG C GG ATC CAT GAC AGA GCA GCA GTG G	BamHI
	Reverse	GCG C AA GCT TTG CGA ACA TCC CAG TGA C	HindIII
Keterangan: Huruf bercetak merah dan biru menunjukkan sisi restriksi yang ditambahkan			

Tabel 2. Komposisi Mix PCR Gen Rv3875

Komponen	Volume
Enzim PCR (2x My Taq HS Red Mix)	12,5 μL
Primer – Forward	1 μL
Reverse	1 μL
<i>free water</i>	5,5 μL
NA	5 μL
total	25 μL



2.3.4 Purifikasi Produk PCR Gen Rv3875

Tahap purifikasi produk PCR dilakukan sesuai dengan manual *QIAquick PCR Purification Kit* [Qiagen]. Produk PCR gen Rv3875 dimasukkan ke tabung eppendorf sebanyak 20 μL , lalu ditambahkan PB Buffer sebanyak 100 μL (5 x volume produk PCR). Selanjutnya, larutan dipindahkan ke dalam kolom filter (memiliki matriks silika), disentrifugasi selama 60 detik, berkecepatan 13.000 rpm. Supernatan yang terdapat pada tabung koleksi dibuang, lalu ditambahkan 750 μL PE Buffer ke kolom filter, disentrifugasi selama 60 detik, berkecepatan 13.000 rpm, kemudian supernatan dibuang. Kolom filter dipindahkan ke tabung eppendorf baru, lalu ditambahkan 50 μL EB Buffer. Larutan disentrifugasi selama 60 detik, berkecepatan 13.000 rpm hingga cairan turun ke tabung eppendorf dan filter kolom dipisahkan dengan tabung eppendorf. Produk Purifikasi PCR gen Rv3875 dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis pada gel agarosa 1%. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit dengan tegangan listrik sebesar 100 volt.

2.3.5 Restriksi Gen Rv3875 dan Vektor Ekspresi pTrcHis A

Gen Rv3875 yang telah dipurifikasi selanjutnya direstriksi menggunakan *fast digest enzyme* BamHI dan HindIII (Tabel 3). Vektor ekspresi pTrcHis A juga direstriksi dengan enzim restriksi yang sama. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C, selama 20 menit untuk gen Rv3875 dan 15 menit untuk vektor ekspresi pTrcHis A. Selanjutnya, enzim diinaktivasi pada suhu 80°C, selama 10 menit. Konfirmasi produk restriksi dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1%, selama 60 menit dengan tegangan 100 volt.

Tabel 3. Komposisi Restriksi Gen Rv3875 dan Vektor Ekspresi pTrcHis A

Komponen	Volume untuk Rv3875	Volume untuk pTrcHis A
Insert	10 μL	5 μL
<i>Fast digest Buffer</i> 10x	2 μL	2 μL
<i>Fast digest</i> BamHI	1 μL	1 μL
<i>Fast digest</i> HindIII	1 μL	1 μL
<i>Nuclease free water</i>	16 μL	11 μL
Total	30 μL	20 μL

2.3.6 Ligasi Gen Rv3875 ke Vektor Ekspresi pTrcHis A

Gen Rv3875 yang telah direstriksi oleh BamHI dan HindIII kemudian diligasikan ke vektor ekspresi pTrcHis A menggunakan enzim Ligase, yaitu T4 DNA Ligase dan diinkubasi pada suhu 22°C selama 10 menit.

Tabel 4. Komposisi Ligasi Gen Rv3875 ke Vektor Ekspresi pTrcHis A

Komponen	Volume
Insert (Rv3875)	5 μL
pTrcHis A)	2 μL
10x fast buffer)	2 μL
T4 DNA ligase	1 μL
Nuclease free water	10 μL
Total	20 μL



2.3.7 Penyiapan Sel Kompeten

Bakteri *E.coli* BL21 dikompetenkan menggunakan CaCl_2 0,1 M. Kultur koloni bakteri *E.coli* BL21 diinokulasikan ke dalam media LB cair 10 mL, kemudian diinkubasi selama 18 jam pada *incubator shaker*, pada suhu 37°C, berkecepatan 175 rpm. Setelah 18 jam, bakteri diinokulasi kembali sebanyak 1,5 mL pada media LB cair 40 mL, lalu diinkubasi selama 2 jam. Setelah itu, kultur bakteri dimasukkan ke dalam es selama 30 menit, lalu disentrifugasi selama 10 menit, berkecepatan 4000 rpm. Supernatan yang terbentuk dibuang hingga tersisa ± 3 mL, kemudian dialiquot ke dalam 3 tabung eppendorf dan didiamkan kembali pada es selama 5 menit. 3 tabung eppendorf berisi kultur bakteri disentrifugasi selama 10 menit, berkecepatan 4000 rpm, lalu supernatan dibuang (tersisa pellet pada dasar tabung). Pellet diresuspensi dengan ditambahkan CaCl_2 0,1 M sebanyak 300 μL , lalu dimasukkan ke dalam es selama 10 menit, kemudian disentrifugasi selama 10 menit, berkecepatan 4000 rpm. Supernatan yang diperoleh dibuang hingga tersisa pellet pada dasar tabung eppendorf. Pellet diresuspensi dengan ditambahkan CaCl_2 0,1 M sebanyak 50 μL , kemudian disimpan pada -20°C sebelum dimasukkan produk ligasi.

2.3.8 Transformasi ke *Escherichia coli* dan Seleksi biru putih

Transformasi dilakukan pada bakteri yang telah dikompetenkan, yaitu *E.coli* BL21. Produk ligasi sebanyak 10 μL dimasukkan ke dalam sel kompeten yang telah tersedia, lalu diinkubasi pada es selama 30 menit. Setelah inkubasi, dilakukan *heat shock* menggunakan *water bath* pada suhu 42°C selama 45 detik, lalu diinkubasi kembali pada es selama 15 menit, kemudian bakteri transforman ditambahkan 500 μL media LB cair. Penambahan media LB diikuti dengan inkubasi pada *incubator shaker* dengan kecepatan 175 rpm, pada suhu 37°C selama satu jam. Setelah diinkubasi selama 1 jam, bakteri transforman disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang hingga tersisa ± 50 μL pada tabung eppendorf.

Seleksi biru putih dilakukan pada media LB padat yang mengandung antibiotik ampicilin, IPTG dan X-gal. Sebanyak 50 μL suspensi bakteri transforman diinokulasikan dengan metode sebar menggunakan batang L secara merata pada 20 μL medium LB padat yang telah ditambahkan 20 μL ampicilin, 22,4 μL IPTG dan 26,6 μL X-gal. Cawan petri yang berisi bakteri transforman diinkubasi pada temperatur 37°C selama 16-18 jam. Klon rekombinan yang membawa plasmid pTrcHis A – 3875 akan berwarna putih sehingga dapat dibedakan dari klon rekombinan yang membawa plasmid tanpa gen sisipan (berwarna biru).

2.3.9 Karakterisasi Klon Rekombinan

2.3.9.1 PCR Koloni



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Untuk memeriksa keberhasilan proses ligasi plasmid rekombinan yang 3875 pada vektor ekspresi pTrcHis A. DNA insersi dianalisis PCR. Parameter PCR untuk gen Rv3875 yang digunakan ialah 35 siklus: denaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi (94°C selama 1 menit), ekstensi (72°C selama 1 menit), dan ekstensi (72°C selama 1 menit). Ekstensi terakhir 72°C selama 5 menit, dan sampel disimpan pada suhu 12°C. Hasil analisis menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 1%.

Tabel 5. Komposisi Mix PCR Koloni

Komponen	Volume
Enzim PCR (2x My Taq HS Red Mix)	12,5 μ L
Primer – Forward	1 μ L
Primer – Reverse	1 μ L
<i>Nuclease free water</i>	5,5 μ L
DNA	5 μ L
Total	25 μ L

2.3.9.2 Isolasi dan Analisis Restriksi Plasmid Rekombinan

Plasmid rekombinan diisolasi dari koloni putih bakteri yang tumbuh. Isolasi plasmid dilakukan menggunakan manual *High Pure Plasmid Isolation* [Roche]. Koloni putih yang telah dikonfirmasi pada PCR koloni, selanjut ditumbuhkan pada media LB cair 4 mL + 4 μ L ampicilin. Kultur bakteri diinkubasi pada *incubator shaker* selama 16 jam pada suhu 37°C. *Binding buffer* diletakkan pada es. Setelah diinkubasi, kultur bakteri disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 30 detik, lalu supernatan dibuang. Pelet diresuspensi dengan ditambahkan 250 μ L *suspension buffer*, lalu dihomogenkan secara perlahan. Suspensi bakteri kemudian ditambahkan dengan 250 μ L *lysis buffer* dan dihomogenkan dengan cara membalikkan tabung sebanyak 3-6 kali, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit (tidak boleh lebih dari 5 menit). Suspensi yang telah diinkubasi selanjutnya ditambahkan dengan 350 μ L *binding buffer* dingin kemudian dihomogenkan secara perlahan dengan membalikkan tabung sebanyak 3-6 kali. Suspensi bakteri disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Tabung filter dan tabung koleksi disiapkan, lalu supernatan dipindahkan melalui tabung filter. Supernatan disentrifugasi kembali selama 10 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Tabung filter diangkat lalu supernatan dibuang, kemudian tabung filter diletakkan kembali pada tabung koleksi yang sama. *Wash buffer* I sebanyak 500 μ L ditambahkan melalui tabung filter, lalu disentrifugasi kembali selama 1 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Supernatan yang terbentuk dibuang, lalu ditambahkan *wash buffer* II sebanyak 700 μ L melalui tabung filter. Selanjutnya, larutan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Tabung koleksi dibuang bersama dengan supernatan yang diperoleh. Tabung filter dipindahkan ke tabung eppendorf steril 1,5 mL dan ditambahkan 100 μ L *elution buffer*, kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Tabung filter dipindahkan dari tabung eppendorf yang berisi 100 μ L produk isolasi plasmid.



mbinan pTrcHis A – 3875 yang telah diisolasi, selanjutnya direstriksi lindIII dan BamHI. Inkubasi dilakukan 15 menit pada suhu 37°C dan a suhu 80°C selama 10 menit. Hasil analisis restriksi plasmid iasi menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 1%.

Tabel 6. Komposisi Analisis Restriksi Plasmid Rekombinan pTrcHis A – 3875

Komponen	Volume
Insert (produk isolasi plasmid)	5 μ L
<i>Fast digest Buffer 10x</i>	2 μ L
<i>Fast digest BamHI</i>	1 μ L
<i>Fast digest HindIII</i>	1 μ L
<i>Nuclease free water</i>	11 μ L
Total	20 μ L

