

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) hingga saat ini masih menjadi masalah kesehatan global. TB adalah penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). TB merupakan penyakit yang mudah menular melalui udara pada waktu bersin, batuk, dan berbicara. Penyebarannya dapat terjadi melalui udara dalam bentuk percikan dahak. Sekali batuk dapat menghasilkan sekitar 3000 percikan dahak (Zuraida dkk.,2021). Infeksi tuberkulosis menyebar dengan cepat melalui air droplet atau udara yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis*, dengan ukuran partikel 1 sampai 5 μm sehingga sangat mudah masuk ke paru-paru lalu menuju alveolus tempat bakteri tersebut bereplikasi (Pratama, 2021). *Mycobacterium tuberculosis* juga dikatakan dapat menyerang organ-organ tubuh yang berada di luar paru-paru (Tambuna dkk., 2023).

Menurut WHO (2023) TB merupakan penyakit dengan peningkatan signifikan yang telah tersebar hingga saat ini. Diseluruh dunia terdapat kurang lebih 10,4 juta orang yang terserang oleh penyakit TB setiap tahunnya, dimana penyakit TB ini lebih banyak menyerang orang dewasa dibandingkan anak-anak. TB juga merupakan salah satu penyebab utama kematian hingga saat ini dan berada diperingkat atas dari HIV/AIDS. Secara global terdapat 10,4 juta kasus insiden TB yang setara dengan 120 kasus per 1000.000 penduduk. Lima negara dengan insiden kasus TB tertinggi yaitu India, Indonesia, China, Philipina, dan Pakistan. Pada tahun 2017 TB mengalami penurunan menjadi 10 juta. Sebagian besar insiden TB pada tahun 2016-2017 terjadi pada kawasan Asia tenggara sebanyak (45%) dimana, Indonesia merupakan salah satunya yang memiliki permasalahan besar dalam menghadapi penyakit TBC (Kemenkes 2024).

Jumlah kasus TB di Indonesia sebanyak lebih dari 724.309 kasus pada tahun 2022, dan jumlahnya meningkat hingga 821.200 kasus pada tahun 2023. Dimana, jumlah ini jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan kasus sebelum adanya pandemi yang rata-rata penemuannya dibawah 600.000 per tahun. Menurut beberapa data menjelaskan bahwasannya prevelensi tuberkulosis pada laki-laki 3 kali lebih tinggi jika di bandingkan dengan perempuan. Begitu juga yang terjadi di negara-negara lain. Hal ini dikarenakan laki-laki lebih terpapar pada faktor risiko TB misalnya merokok serta kurangnya ketidapatuhan dalam mengonsumsi obat (Kemenkes 2024).

Sulawesi Selatan memiliki persentase jumlah kasus TB sebesar 0,4%. Kota Makassar memiliki jumlah kasus TB tertinggi, dimana total 5.418 kasus dilaporkan.



urunan menjadi 4.109 kasus pada tahun 2021, hanya sekitar terdaftar untuk pengobatan dengan obat anti-TB dari semua ehatan. Jumlah seluruh kasus TB di Kota Makassar pada sekitar 20.388 kasus. Laki-laki dengan persentase 57,49% dan ersentase 42,41%, sedangkan kasus TB pada anak umur 0-14 tase yang dimiliki yaitu 6,82% (Dinkes Prov Sulsel,2023).

Selama beberapa waktu belakangan penyakit infeksi seperti TB hanya di atasi dengan penggunaan antibiotik yakni, Rifampisin (RIF), Isoniazid (INH), etambunol (EMB), streptomisin, dan pirazinamid (PZA) telah digunakan selama bertahun-tahun sebagai anti TB. Namun banyak penderita yang resisten terhadap obat lini pertama tersebut. Sejak tahun 1980an, kasus TB di seluruh dunia mengalami peningkatan akibat munculnya MDR-TB (Multi Drug Resistance Tuberculosis) (Nur, 2021).

Vaksin-vaksin yang telah dikembangkan selama ini seperti vaksin BCG rekombinan. Dimana vaksin *Bacille Calmette Guerin* (BCG) dikatakan sebagai vaksin tuberculosis berlisensi yang diberikan secara intradermal ketika bayi lahir sebagai perlindungan dari penyebaran TB. Vaksin BCG dikatakan sangat efektif untuk menghambat perkembangan penyakit TB pada anak dimana anak yang sama sekali tidak melakukan vaksin BCG memiliki tingkat persentase 6,87% lebih tinggi terkena TB dibandingkan anak yang mendapatkan vaksin BCG (Nasution dan Amalia, 2022). Kekurangan dari vaksin BCG sendiri yaitu, efektivitasnya yang terbatas dalam mencegah TB pada orang dewasa, vaksin ini lebih efektif mencegah bentuk TB berat pada anak-anak. Selain itu, durasi perlindungan dari vaksin BCG juga terbatas, umumnya hanya bertahan hingga 15 tahun setelah vaksinasi. Rv1926c merupakan salah satu antigen potensial yang dapat berpotensi sebagai kandidat vaksin TB. Dimana, gen Rv1926 mampu menginduksi respon imun serta bersifat imonoreaktif sehingga memberikan perlindungan sebagai vaksin DNA. Rv1926c berhubungan langsung dengan sistem kekebalan tubuh suatu inang, sehingga sangat penting untuk mengaktifkan respon imun humoral pada suatu individu yang dinyatakan telah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Agus dkk.,2018). Protein MPT63 sendiri merupakan salah satu protein dari *Mycobacterium tuberculosis* yang disekresikan paling banyak, MPT63 dikode oleh gen Rv 1926c. MPT63 dapat menginduksi reaktivitas sel T-helpe tipe 1 (Th1) serta merangsang produksi interferon gamma (IFN γ) yang menunjukkan bahwa protein ini mampu meicu respon imun yang kuat terhadap TB. Hal ini mengakibatkan MPT63 oleh gen Rv1926c dapat menjadi salah satu kandidat vaksin tuberculosis (Agus dkk.,2018).

1.2 Dasar Teori

1.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis berasal dari genus *Mycobacterium* dan termasuk ke dalam famili *Mycobacteriaceae*. Bakteri yang tedapat dalam genus *Mycobacterium* memiliki ukuran antara 0.2 – 0.6 μm x 1-10 μm , memiliki bentuk seperti batang (basil) yang sedikit melengkung atau biasanya lurus, namun terkadang menampilkan bentuk berserabut dan bercabang. Dinding selnya kaya



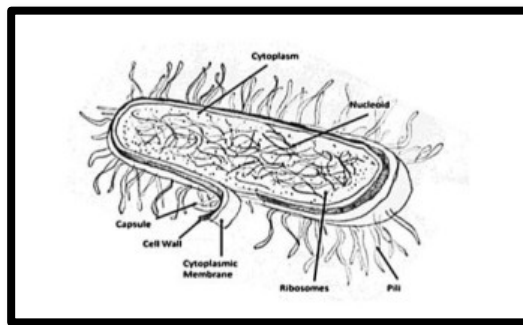
asam mikolat, yang memberikan sifat tahan asam (acid-fast). Koloni dari *Mycobacterium tuberculosis* yakni bervariasi antar kasar hingga halus mulai dari tidak mempunyai pigmen hingga biasanya disebut dengan pigmen karotenoid (Natarajan et al.,

dan dari *Mycobacterium tuberculosis* sendiri memiliki waktu inkubasi yang dikatakan panjang yakni sekitar 15-20 jam lamanya

(Yulendasari, 2022). Ukuran genomik dari *Mycobacterium tuberculosis* sendiri yakni 4,4 juta pasangan basa (*base pairs*) atau 4,4 Mb (*megabase*). Dimana, genom ini dikatakan mengandung lebih dari 4.000 gen yang nantinya berperan dalam berbagai fungsi seluler dan patogenesitas bakteri. Genom dari *Mycobacterium tuberculosis* sendiri dapat digunakan untuk mengembangkan vaksin yang nantinya dapat jauh lebih efektif melawan TB (Cole et al., 1998).

Klasifikasi dari *Mycobacterium tuberculosis* yakni:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Actinobacteria
Order	: Actinomycetales
Family	: Mycobacteriaceae
Genus	: <i>Mycobacterium</i>
Species	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>



Gambar 1. Struktur Morfologi *Mycobacterium tuberculosis*
Sumber : (Jabir et al., 2018)

Struktur utama dari dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* adalah lapisan luar yang terdiri atas cabang lipid alfa, seperti asam mikolat yang membentuk cangkang lipid di sekitar bakteri. Lapisan dalam yang terdiri atas dinding sel bagian dalam yang tumbuh ke dalam lapisan dinding sel luar yang tetap utuh. Lapisan selubung (Kapsul) yang terdiri dari polisakarida. Lapisan Wax-D (*Wax-D Layer*) terdiri dari komponen utama dari *Freund's Complete Adjuvant* (CFA) yang berperan dalam meningkatkan respon imun dan proteksi terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Asam mikolat adalah lipid dengan cabang alfa yang menyusun 50% dari berat kering glukosa pada sel mikobakteri. Struktur dinding sel yang kompleks menyebabkan *Mycobacterium tuberculosis* bersifat tahan asam, yaitu apabila sekali diwarnai akan tetap tahan terhadap upaya penghilangan zat warna tersebut dengan alkohol (Isbaniah dkk., 2021).

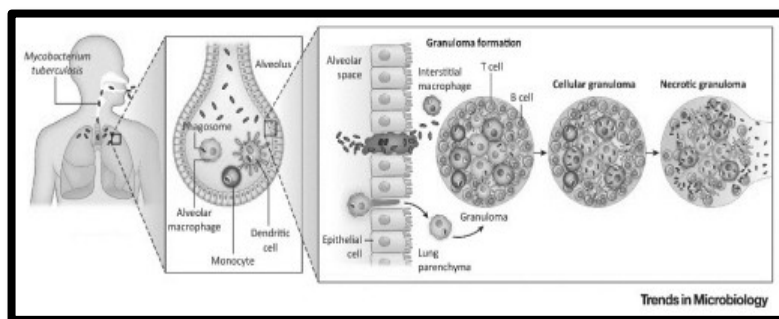


Mycobacterium tuberculosis

Penyakit TB dimulai dari adanya basil *Mycobacterium tuberculosis* yang tersebar pada lingkungan oleh orang yang terkena atau terinfeksi. Bakteri ini bersin yang mengakibatkan bakteri tersebar. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* kemudian secara tidak sengaja dihirup oleh orang-orang

terdekat, hingga akhirnya bakteri masuk melalui saluran pernafasan yang nantinya akan melekat pada bagian inang alveoli. Patogenesis TB sangat berkaitan dengan respon imun dari inangnya. Pada kebanyakan inang, sistem imun merespon invasi patogen TB dengan efektif, membatasi pertumbuhan bakteri dan mencegah infeksi. Namun, secara paradoks, sebagian besar kerusakan jaringan yang terjadi selama infeksi TB disebabkan oleh respon imun inang itu sendiri, seperti kavitas yang sering terlihat pada paru-paru pasien TB (Isbaniah, 2021).

Patogenesis infeksi TB dimulai ketika *Mycobacterium tuberculosis* yang terdapat dalam droplet kecil masuk ke dalam tubuh. Karena ukurannya yang sangat kecil ($<5\ \mu\text{m}$), bakteri ini dapat mencapai alveolus. Di sana, bakteri difagositosis oleh makrofag, di mana sebagian bakteri akan mati sementara yang lainnya terus berkembang biak di dalam makrofag hingga menyebabkan lisis makrofag. Setelah itu, *Mycobacterium tuberculosis* membentuk lesi yang disebut fokus primer atau Ghon. Dari fokus primer ini, *Mycobacterium tuberculosis* menyebar melalui saluran limfe menuju kelenjar limfe regional, menyebabkan inflamasi pada saluran limfe (limfangitis) dan di kelenjar limfe (limfadenitis) (Nasution dan Amalia, 2022).



Gambar 2. Mekanisme Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Koch and Valerie 2018).

Kombinasi antara fokus primer, limfangitis, dan limfadenitis disebut kompleks primer. Saat kompleks primer terbentuk, imunitas seluler juga berkembang, menandakan bahwa infeksi primer telah terjadi. Selama masa inkubasi, sebelum terbentuknya imunitas seluler, dapat terjadi penyebaran melalui saluran limfe dan darah. Penyebaran melalui darah yang paling umum adalah penyebaran hematogenik tersamar (*occult hematogenic spread*), di mana bakteri TB menyebar secara sporadis dan perlahan, sehingga tidak menimbulkan gejala klinis. Bakteri TB kemudian menetap di berbagai organ tubuh, paling sering di apeks paru, limpa, dan

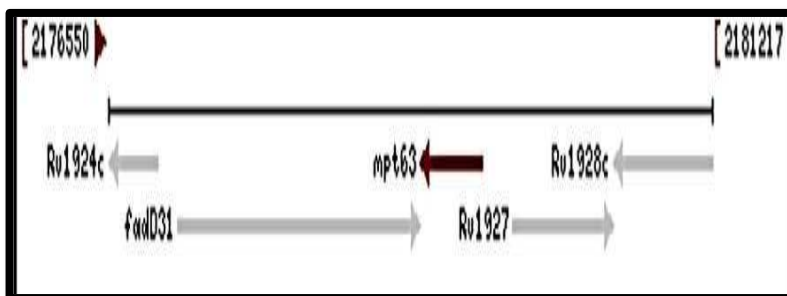
...ialis. Selain itu, bakteri juga dapat menetap di organ lain seperti ginjal, dan sebagainya. Umumnya, bakteri yang menetap tetap keadaan tidak aktif (*dormant*). Sarang di apeks paru disebut kavitasi, yang di kemudian hari dapat mengalami reaktivasi, apeks paru pada orang dewasa (Nasution dan Amalia, 2022).



1.2.3 Rv1926c (MPT63)

Salah satu upaya yang dilakukan untuk mencegah penyebaran TB yakni dengan pemberian vaksin, vaksin yang telah digunakan di seluruh dunia ialah vaksin *Bacille calmette Guerin* (BCG). Vaksin BCG sangat efektif dalam mencegah tuberkulosis pada anak, dimana anak yang tidak mendapatkan vaksin BCG memiliki risiko 6,87 kali lebih tinggi terkena tuberkulosis dibandingkan dengan anak yang mendapatkan vaksin BCG (Nasution dan Amalia.,2022). Namun BCG sendiri belum dapat menghentikan epidemi TB secara menyeluruh. Salah satu antigen dari *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat berpotensi sebagai kandidat vaksin TB yakni MPT63. MPT63 telah terbukti mampu merangsang respons imun humoral pada kelinci percobaan yang terinfeksi *M. tuberculosis* yang mematikan (Manca dkk., 1997).

Menurut Agus (2018) MPT63 merupakan salah satu antigen potensial yang dikode langsung oleh gen Rv1926c. Protein ini diketahui menginduksi sel Th1 dan menghasilkan IFN λ dari pasien yang terinfeksi TBC. MPT63 merupakan faktor virulensi yang dikeluarkan oleh MTB yang mengatur protein inang untuk kelangsungan hidup dan proliferasi MTB di inang (Kim et al.,2021). MPT63 dapat menstimulasi sel Th1, dengan kemampuan menginduksi. Selain itu pula, MPT63 terbukti mampu menginduksi sitokin seperti IL-2, Th1, serta melepaskan IFN- γ . (Duan et al., 2015). Menurut NCBI (2019), protein rekombinan MPT63 terletak di dalam lokus Rv1926c.



Gambar 3. Lokus Protein Rekombinan MPT63 (NCBI,2019).

Menurut Manca et al (1997) MPT63 memiliki massa molekul 18 kDa. MPT63 merupakan protein yang sangat imunogenik, artinya dapat merangsang respon imun yang kuat. Sehingga menjadikannya kandidat potensial untuk vaksin dan diagnosis Tuberkulosis karena tubuh manusia dapat mengenali serta merespons antigen ini dengan antibodi. Selain itu, antibodi poliklonal terhadap MPT63 tidak akan protein dari spesies mikobakteri lingkungan yang umum, 1.

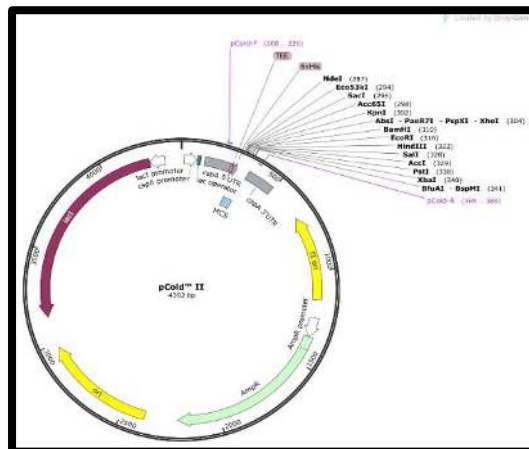


esi pCold II

l adalah salah satu sistem ekspresi rekombinan yang sering uksi protein-protein rekombinan, termasuk antigen MPT63 dari

Mycobacterium tuberculosis (Sreejit et al., 2014). MPT63 merupakan salah satu antigen kunci dari *Mycobacterium tuberculosis* yang berperan penting dalam patogenesis dan imunogenisitas pada tuberkulosis (Passos et al., 2024). Vektor pCold II memiliki beberapa kelebihan dalam pengekspresian protein rekombinan. Vektor ini menggunakan promotor *cspA* yang dapat diinduksi oleh suhu rendah (Patel & Dave, 2022). Vektor pCold II memiliki tag His (dalam sekuens asam amino yang mengandung beberapa residu histidin (biasanya 6 histidin) yang ditambahkan pada ujung N-terminal atau C-terminal protein rekombinan) yang dapat memudahkan purifikasi protein rekombinan (Kimple et al., 2013).

Di sisi lain, vektor pCold II juga memiliki kekurangan, yaitu penggunaan suhu rendah untuk induksi ekspresi dapat memperlambat laju produksi protein (Bortolotto-Aguilar et al., 2022). Pada pemurnian protein rekombinan yang mengandung tag His dapat menghadapi tantangan, seperti kontaminasi oleh protein sel inang. Oleh karena itu, optimalisasi protokol purifikasi diperlukan untuk mendapatkan protein rekombinan yang murni dan fungsional (Bhatwa et al., 2021).



Gambar 4. Peta struktur vektor ekspresi pCold II

1.2.5 *Escherichia coli* BL21

Escherichia coli BL21 adalah strain bakteri yang paling banyak digunakan sebagai inang dalam transformasi dan ekspresi protein rekombinan karena memiliki beberapa keunggulan genetik yang mendukung stabilitas dan efisiensi produksi protein. Salah satu karakteristik utama BL21 adalah defisiensi enzim protease seperti Lon dan OmpT, sehingga protein target yang dihasilkan tidak mudah terdegradasi, yang sangat penting dalam produksi protein rekombinan yang stabil dan berkualitas.



Strain ini membawa profage λ DE3 yang mengkode T7 RNA polimerase yang memungkinkan ekspresi gen target di bawah kontrol promotor T7 yang sangat tinggi setelah induksi menggunakan IPTG atau sangat efisien untuk produksi protein dalam jumlah besar (Hadi

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 yang diproduksi menjadi lebih stabil dan menghasilkan *yield protein* yang lebih tinggi (Hausjell et al., 2018).

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Melakukan ligasi gen Rv1926c *Mycobacterium tuberculosis* ke vektor ekspresi pCold II dan transformasi ke bakteri *Escherichia coli* BL21.
2. Melakukan Karakterisasi klon rekombinan Rv1926c – pCold II dengan metode PCR koloni dan isolasi plasmid rekominan.

1.4 Manfaat

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi riset terkait ligasi gen Rv1926c pada vektor ekspresi pCold II dan transformasi gen.
2. Memberikan hasil karakterisasi klon rekombinan dan hasil restriksi plasmid rekombinan Rv1926c – pCold II sebagai acuan pengembangan ilmu pengetahuan dan riset terkait kloning gen pada *Mycobacterium tuberculosis*.



BAB 2 METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2024 – Januari 2025, bertempat di Laboratorium Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC), Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

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, freezer -80°C, kulkas 4°C, vortex, timbangan analitik, mikropipet, ose bulat, 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, spuit, 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), vektor ekspresi pTrcHisA, kit enzim XbaI [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, Ethidium Bromida, DNA Ladder (100 bp dan 1000 bp), DNA Loading Dye 5x, Agarosa, Bacteriological Agar [Sigma-Aldrich], TBE Buffer 10x, CaCl₂, X-Gal [thermo scientific], Dimethyl Formamide, Ampicilin, *E.coli strain* DH5α chemically competent cells [Sigma-Aldrich], *E.coli strain* BL21 chemically competent cells [Sigma-Aldrich], gliserol 80%, IPTG, Ethanol 80%, aluminium foil, es kristal, dan micropipet tips (1000 µL, 200 µL, dan 10 µL).

2.3 Metode Kerja

2.2.1 Teknik Pengambilan Sampel

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

2.2.2 Ekstraksi DNA Genomik *Mycobacterium tuberculosis*



A genomik dilakukan dengan melisis sel untuk memperoleh *acteria tuberculosis* H37Rv). Tahapan ekstraksi DNA dimulai 400 µL Lysis Solution dan 20 µL Proteinase K Solution pada , lalu sampel diinkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit pada ga sel lisis. Setelah sel lisis, ditambahkan 200 µL Ethanol 96% menggunakan mikropipet. Lisat sel yang diperoleh dipindahkan da 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 μ L 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. Ditambahkan 500 μ L 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, kemudian ditambahkan 200 μ L Elution Buffer tepat pada tengah kolom purifikasi untuk mengelusi DNA. Setelah itu, diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit, lalu disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit, kemudian kolom sentrifugasi dipindahkan dari tabung eppendorf.

2.2.3 Amplifikasi Gen Rv1926c

Genom *M. tuberculosis* digunakan sebagai cetakan DNA untuk amplifikasi gen Rv1926c dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan sepasang primer spesifik seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan Primer Gen Rv1926c

Antigen	Primer	Sekuens	Sisi Restriksi
Rv1926c	Forward	GCG CAA GCT TAT GAA GCT CAC CAC AAT G	HindIII
	Reverse	GCG CTC TAG ACT ACG GCT CCC AAA TCA G	XbaI
Keterangan: Huruf bercetak merah dan biru menunjukkan sisi restriksi yang ditambahkan			

Tabel 1. Komposisi Mix PCR Gen Rv1926c

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



Gen Rv1926c (Tabel 2) dengan metode PCR menggunakan suhu selama 5 menit, 30 siklus denaturasi (94°C selama 1 menit), annealing (55°C selama 1 menit), dan ekstensi (72°C selama 1 menit). Ekstensi dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit, dan sampel disimpan pada suhu

Hasil PCR gen Rv1926c dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis pada gel agarosa 1%, terdiri atas 1 gram agarosa, 50 mL TBE buffer 0,5 x, dan 3 uL etidium bromida (EtBr). Sampel dimasukkan sebanyak 5 uL dan marker DNA 100 bp sebanyak 3 uL ke dalam masing-masing sumur gel agarosa yang telah dicetak dan direndam pada running TBE buffer 0,5x. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit dengan tegangan listrik sebesar 100 volt. Marker DNA 100 bp digunakan untuk memperkirakan ukuran DNA yang telah diamplifikasi. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan menggunakan *Gel Documentation* dengan sumber cahaya UV.

2.2.4 Purifikasi Produk PCR Gen Rv1926c

Tahap purifikasi produk PCR dilakukan sesuai dengan manual QIAquick PCR Purification KIT. Produk PCR gen Rv1926c dimasukkan dipindahkan ke tabung eppendorf sebanyak 20 uL, lalu ditambahkan PB Buffer sebanyak 100 uL (5 : volume produk PCR). Selanjutnya, larutan dipindahkan ke dalam kolom filter, disentrifugasi selama 60 detik, berkecepatan 13.000 rpm, lalu dibuang supernatan yang terdapat pada tabung koleksi. Setelah itu, ditambahkan 750 uL PE Buffer ke kolom filter, disentrifugasi selama 60 detik, berkecepatan 13.000 rpm, lalu dibuang supernatan. Kolom filter dipindahkan ke tabung eppendorf baru, kemudian ditambahkan 50 uL EB Buffer. Larutan disentrifugasi selama 60 detik, berkecepatan 13.000 rpm, sehingga cairan turun ke tabung eppendorf dan filter kolom dipisahkan dengan tabung eppendorf.

2.2.5 Restriksi Gen Rv1926c

Gen Rv1926c yang telah dipurifikasi selanjutnya direstriksi menggunakan *fast digest enzyme* HindIII dan Xba. Dalam proses restriksi, vektor ekspresi pCold II juga disisipi dengan enzim restriksi yang sama.

Tabel 3. Komposisi Reaksi Restriksi

	Rv1926c	pCold II
Insert	10 uL	5 uL
<i>Fast digest 10x Buffer</i>	2 uL	2 uL
XbaI	1 uL	1 uL
HindIII	1 uL	1 uL
NFW	16 uL	11 uL
Total	30 uL	20 uL
	37°C, 20 menit	37°C, 15 menit
	80°C, 20 menit	80°C, 10 menit



Produk restriksi dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1% produk restriksi + 2 uL loading dye dan 3 uL marker 100 bp dan kan menggunakan gel documentation.

2.2.6 Ligasi Gen Rv1926c ke Vektor pCold II

Gen Rv1926c yang telah direstriksi oleh HindIII dan Xba kemudian diligasikan ke vektor ekspresi pCold II. Untuk meligasi gen ke vektor ekspresi, digunakan enzim Ligasi, yaitu T4 DNA Ligase. Adapun komposisi reaksi ligasi terdiri atas 1 μ L T4 DNA Ligase, 5 μ L produk restriksi Rv1926c, 2 μ L produk restriksi vektor, 2 μ L 10x *buffer*, dan penambahan 10 μ L *nuclease free water* (air bebas nuklease) untuk mencukupkan reaksi ligasi dengan total volume 20 μ L. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 22°C selama 10 menit. Hasil dari ligasi gen Rv1926c ke vektor ekspresi pCold II membentuk plasmid pCold II-1926c.

Tabel 2. Komposisi Ligasi Gen Rv1926c ke Vektor Ekspresi pCold II

Komponen	Volume
DNA Insert (Rv1926c)	5 μ L
Vektor (pCold II)	2 μ L
Buffer (10x <i>fast buffer</i>)	2 μ L
Enzim Ligase	1 μ L
<i>Nuclease free water</i>	10 μ L
Total	20 μ L

2.2.7 Penyiapan Sel Kompeten dan Transformasi *Escherechia coli* BL21

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 menggunakan *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 dimasukkan ke dalam es selama 30 menit, lalu disentrifugasi selama 10 menit, berkecepatan 4000 rpm, supernatan dibuang hingga tersisa $\pm$ 3 mL, kemudian dialiqout ke dalam 3 tabung eppendorf dan didiamkan kembali pada es selama 5 menit. Selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit, berkecepatan 4000 rpm, lalu supernatan dibuang (tersisa pellet pada dasar tabung eppendorf), lalu ditambahkan CaCl_2 0,1 M sebanyak 300 μ L, kemudian dimasukkan ke dalam es selama 10 menit. Disentrifugasi selama 10 menit, 4000 rpm, lalu dibuang supernatan, ditambahkan CaCl_2 0,5 M sebanyak 50 μ L, kemudian disimpan pada es.

Setelah bakteri *E.coli* BL21 siap digunakan sebagai sel kompeten, dimasukkan produk ligasi sebanyak 10 μ L, lalu dimasukkan ke dalam es selama 30 menit, dilakukan *heat shock* selama 45 detik, pada suhu 42°C, n ke dalam es selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 500 μ L peremajaan sel kompeten, lalu diinkubasi selama 1 jam pada tatan 175 rpm. Setelah itu, disentrifugasi selama 1 menit, pm, lalu supernatan dibuang (tersisa $\pm$ 50 μ L supernatan dan ung).



2.2.8 Seleksi Biru Putih

Seleksi biru putih dilakukan pada media LB padat yang mengandung antibiotik ampicilin, IPTG dan X-gal. Sebanyak 50 μ l suspensi sel hasil transformasi diinokulasikan dengan metode sebar menggunakan batang L secara merata pada 20 μ l medium LB padat yang telah ditambahkan 0,4 μ l X-Gal 5%, 0,4 μ l IPTG 1 M. dan 800 μ l ampicilin (2,5 mg/ml). Cawan petri yang berisi kultur diinkubasi pada temperatur 37°C selama 16-18 jam. Koloni transforman yang membawa plasmid pCold II-Rv1926c akan berwarna putih sehingga dapat dibedakan dari koloni transforman yang membawa plasmid pCold II tanpa insersi gen (berwarna biru).

2.2.9 Karakterisasi Klon Rekombinan

2.3.9.1 PCR Koloni

Analisis dilakukan untuk memeriksa keberhasilan proses ligasi plamid rekombinan yang membawa gen Rv1926c pada vektor ekspresi pCold II. DNA insersi dianalisis menggunakan teknik PCR. Parameter PCR untuk gen Rv1926c yang digunakan ialah 30 siklus, dengan pra denaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi (94°C selama 1 menit), annealing (56°C selama 1 menit), dan ekstensi (72°C selama 1 menit). Ekstensi terakhir dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit, dan sampel disimpan pada suhu 12°C. Hasil PCR koloni dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 1%.

Tabel 3. 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



Binding buffer diletakkan pada es. Setelah diinkubasi, kultur pada kecepatan 6.000 rpm selama 30 detik, lalu supernatan suspensi dengan ditambahkan 250 μ L *suspension buffer*, lalu a perlahan. Suspensi bakteri kemudian ditambahkan dengan an dihomogenkan dengan cara membalikkan tabung sebanyak nkubasi pada suhu ruang selama 5 menit (tidak boleh lebih dari ng telah diinkubasi selanjutnya ditambahkan dengan *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 dipindahkan supernatan melalui tabung filter. Supernatan disentrifugasi kembali selama 10 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Tabung filter dibuang lalu diganti dengan tabung filter yang diletakkan pada tabung koleksi yang sama. *wash buffer* I sebanyak 500 uL 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 uL 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 1,5 mL steril dan ditambahkan 100 uL *elution buffer*, kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Tabung filter dipindahkan dari tabung eppendorf yang berisi 100 uL produk isolasi plasmid.

Plasmid rekombinan pCold II-Rv1926c yang telah diisolasi, selanjutnya direstriksi menggunakan enzim HindIII dan XbaI. Inkubasi dilakukan 15 menit pada suhu 37°C dan inaktivasi enzim pada suhu 80°C selama 10 menit. Hasil analisis restriksi plasmid rekombinan dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 1%.

Tabel 4. Komposisi Analisis Restriksi Plasmid Rekombinan pCold II – Rv1926c

Komponen	pCold II – Rv1926c
Insert (produk isolasi plasmid)	5 uL
<i>Fast digest Buffer</i> 10x	2 uL
<i>Fast digest</i> XbaI	1 uL
<i>Fast digest</i> HindIII	1 uL
NFW	11 uL
Total	20 uL

