

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri tersebut menginfeksi paru-paru melalui tetesan aerosol diudara yang menyebabkan kematian dan tersebar luas di seluruh dunia (Bouzeyen & Javid, 2022). Bakteri *M.tb* akan menginfeksi seseorang dan tidak langsung menunjukkan gejala infeksi. Bakteri ini akan tetap diam di dalam tubuh dan kemudian aktif menimbulkan gejala TB. TB dapat menyebar dan menginfeksi ke organ lain, seperti otak, perut, dan tulang, bahkan pada beberapa kasus dapat menyebabkan kematian (Srivastava et al., 2023).

Berdasarkan sejarahnya, TB dikenal dengan istilah “wabah putih” di Eropa pada abad 17 hingga abad 18. Pada kala itu hampir seluruh penduduk Eropa terinfeksi *M.tb* sampai mengakibatkan sekitar seperempatnya meninggal dunia. Seorang ahli mikrobiologi di Jerman yaitu Robert Koch pada tahun 1882, menyatakan bahwa *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) sebagai faktor etiologi penyebab TB, sehingga dilakukannya penelitian terkait diagnosis, pengobatan, dan pencegahan terhadap penyakit TB. Setelah masa tersebut, angka kematian yang disebabkan oleh tuberkulosis (TB) mengalami penurunan yang cukup signifikan. Meskipun demikian, sejak awal tahun 1990-an, penyebaran TB secara global kembali mengalami peningkatan dan memperlihatkan kecenderungan memburuk. Kondisi ini disebabkan oleh sejumlah faktor seperti penggunaan obat immunosupresif, munculnya strain *M.tb* yang resisten terhadap obat, serta berbagai faktor sosial lainnya seperti adanya ketergantungan obat-obatan, kemiskinan, dan meningkatnya arus imigrasi. Akhirnya TB menjadi masalah kesehatan global yang serius dan menjadi penyakit menular utama yang kembali muncul (Zhuang et al., 2023).

TB masih menjadi salah satu masalah kesehatan global paling serius menurut *Global tuberculosis report 2025*. Pada tahun 2024, jumlah kematian akibat TB sekitar 1,23 juta jiwa. Pada tahun yang sama, diperkirakan ada sekitar 10,7 juta kasus TB di seluruh dunia, dengan sekitar 8,3 juta dilaporkan sebagai kasus yang baru didiagnosis dan diberitahukan (*case notifications*). Sebagian besar kasus TB (87%) terkonsentrasi di 30 negara dengan beban penyakit yang tinggi, di mana lima negara utama yang paling banyak menyumbang kasus (67% dari total global) adalah India (25%), Indonesia (10%), Filipina (6,8%), Tiongkok (6,5%), dan Pakistan (6,3%). Selain itu, terdapat sekitar 390.000 kasus rifampicin-resistant TB (RR-TB) pada tahun 2024, namun hanya 164.545 pasien yang mendapatkan pengobatan (WHO, 2025). Menurut Bouzeyen & Javid (2022), meningkatnya kasus drug-resistant tuberculosis (DR-TB) menimbulkan tantangan baru dalam upaya pemberantasan TB. Pemberantasan TB masih menghadapi tantangan, meskipun adanya obat anti TB yang efektif (Zhuang et al., 2023).

Vaksinasi *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) memainkan peran penting dalam program pengendalian tuberkulosis (TB) dan telah digunakan secara global selama lebih dari satu abad sejak diperkenalkan pada tahun 1921 (Zhuang et al., 2023). BCG merupakan vaksin yang dilemahkan selama 13 tahun dilakukan uji *in vitro* terus menerus. BCG adalah vaksin TB yang berasal dari *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan (Fatima et al., 2020). Vaksin BCG memberikan perlindungan secara signifikan pada bayi dan anak kecil terhadap TB parah seperti TB diseminata dan TB meningeal, namun BCG masih terbatas dalam perlindungannya terhadap TB paru dewasa (PTB) dan tidak efektif dalam melindungi pasien dari infeksi TB primer atau laten. Sekitar seperempat populasi di dunia mengidap infeksi TB laten (LTBI) tanpa gejala. Tuberkulosis laten dapat berkembang menjadi infeksi aktif, dan hal ini menjadi hambatan yang utama dalam program pemberantasan tuberkulosis (Zhuang et al., 2023).

Vaksinasi BCG tidak memiliki kemampuan dalam mengembangkan respon imun seluler yang bervariasi. Selain itu, terdapat strain *M.tb* yang

resisten terhadap obat yang menjadi tantangan serta ancaman bagi kesehatan. Kasus tersebut mengakibatkan buruknya tingkat kesembuhan dan biaya pengobatan juga tinggi (Srivastava et al., 2023). Semua pertimbangan ini telah memunculkan pembaharuan akan pengobatan untuk TB. Oleh karena itu, penanganan TB tidak hanya memerlukan terapi dan vaksinasi, tetapi juga sistem diagnosis dini yang cepat, spesifik, dan sensitif untuk mendeteksi infeksi aktif maupun laten secara tepat (Bouzeyen & Javid, 2022).

Selain keterbatasan vaksin BCG, diagnosis tuberkulosis (TB) juga menjadi salah satu tantangan utama dalam mengendalikan TB. Metode konvensional seperti pewarnaan Ziehl-Neelsen dan kultur Lowenstein-Jensen memiliki sensitivitas yang rendah dan memerlukan waktu yang cukup lama untuk mendapatkan hasil yang akurat. Meskipun metode molekuler seperti Xpert MTB/RIF telah merevolusi deteksi TB dengan cepat mengidentifikasi DNA *Mycobacterium tuberculosis*, pendekatan ini tidak dapat membedakan antara infeksi aktif dan laten karena hanya mendeteksi materi genetik tanpa memperhitungkan viabilitas bakteri (H. Li et al., 2023). Oleh sebab itu, muncul pendekatan baru berbasis imunologi yang memanfaatkan respon imun tubuh terhadap antigen spesifik *M. tuberculosis* sebagai strategi yang lebih menjanjikan untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi penyakit ini. Pendekatan imunodiagnostik yang berfokus pada interaksi antigen-spesifik dengan sel T dan B telah terbukti memberikan gambaran yang lebih representatif terhadap status infeksi dibandingkan metode deteksi langsung terhadap DNA atau bakteri (Panda et al., 2024).

Salah satu kelompok antigen yang berpotensi tinggi dalam imunodiagnostik adalah antigen sekretori yang dilepaskan oleh *Mycobacterium tuberculosis* selama fase infeksi. 10 kDa culture filtrate protein (CFP10) mengkode gen Rv3874 yang berada pada RD1. CFP10 merupakan protein sekretori yang meningkatkan kadar IFN- γ , IL-4, dan IL-2 pada imun tubuh. CFP10 bersifat imunogenik dan berpotensi sebagai kandidat antigen untuk imunodiagnostik maupun vaksinasi subunit

TB. Protein CFP-10 telah digunakan dalam berbagai tes diagnostik seperti interferon gamma release assay (IGRA) karena kemampuannya memicu respons imun spesifik terhadap tuberkulosis aktif (TB) (Valizadeh et al., 2022). Resuscitation Promoting Factors D (rpfD) merupakan protein yang diproduksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb) dan dikodekan oleh gen Rv2389c. Protein ini memainkan peran penting dalam reaktivasi M.tb dari keadaan dorman ke fase aktif infeksi. Selain itu, RpfD memiliki sifat imunogenik yang mampu memicu respons interferon-gamma (IFN- γ) (Van Loon et al., 2020). Berdasarkan karakteristik dan peran biologisnya, CFP-10 dan RpfD dianggap sebagai kandidat potensial untuk penelitian lebih lanjut.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengarakterisasi antigen Rv3874 dan Rv2389c melalui proses konstruksi, kloning, dan ekspresi protein rekombinan, serta analisis prediksi epitop potensial sel T dan B menggunakan pendekatan *in silico*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dasar yang berharga mengenai karakterisasi potensi imunodiagnostik kedua antigen tersebut, yang dapat dijadikan dasar bagi penelitian lanjutan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana proses konstruksi dan kloning antigen Rv3874 dan Rv2389c sebagai protein subunit rekombinan dari *Mycobacterium tuberculosis*?
2. Bagaimana karakterisasi dasar dan potensi imunodiagnostik CFP-10 dan rpfD melalui analisis epitop sel T dan B menggunakan pendekatan *in silico*?

1.3 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu:

1. Antigen Rv3874 dan Rv2389c dari *Mycobacterium tuberculosis* dapat berhasil dikonstruksi dan dikloning dalam sistem ekspresi *E.coli* menggunakan vektor pCold II.

2. Protein rekombinan CFP-10 dan rpfD menunjukkan epitop potensial yang mendukung perannya sebagai kandidat imunodiagnostik karena memiliki sifat imunogenik yang tinggi dan keterlibatan dalam fase infeksi aktif maupun laten.

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan umum

Tujuan umum dalam penelitian ini yaitu mengkarakterisasi antigen Rv3874 dan Rv2389c dari *Mycobacterium tuberculosis* melalui proses konstruksi, kloning, ekspresi protein rekombinan, serta prediksi epitop potensial sel T dan B menggunakan pendekatan *in silico*.

1.4.2 Tujuan khusus

Tujuan khusus dalam penelitian ini yaitu:

1. Melakukan konstruksi dan kloning Rv3874 dan Rv2389c ke dalam vektor ekspresi pCold II.
2. Mengekspresikan dan memurnikan protein rekombinan CFP-10 dan rpfD dalam *E. coli* BL21 (DE3).
3. Menganalisis karakterisasi dasar serta memprediksi epitop sel T dan B dari protein rekombinan CFP-10 dan rpfD menggunakan pendekatan *in silico*.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Praktis

Penelitian ini memberikan informasi dasar mengenai konstruksi dan karakterisasi protein rekombinan CFP-10 dan rpfD yang dapat dijadikan dasar awal pengembangan imunodiagnostik tuberkulosis berbasis antigen rekombinan.

1.5.2 Manfaat teoritis

Penelitian ini memberikan kontribusi teoritis dalam pengembangan kajian bioinformatika khususnya dalam prediksi epitop imun potensial dari antigen *Mycobacterium tuberculosis* sebagai dasar teori untuk studi imunodiagnostik lebih lanjut.

1.5.3 Manfaat Klinis

Penelitian ini memberikan dasar ilmiah bagi penelitian lanjutan dalam pengembangan imunodiagnostik berbasis antigen rekombinan Rv3874 dan Rv2389c yang berpotensi mendukung inovasi diagnosis dan vaksinasi TB.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2024-Juni 2025 bertempat di Laboratorium HUMRC Rumah Sakit Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Mikromolekuler LPPM Unhas.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini mencakup mikropipet ukuran 10, 100, dan 1000 μL beserta tips steril, tabung mikrocentrifuge 1,5 mL, tabung Falcon ukuran 15 mL dan 50 mL, jarum ose, batang L, cawan petri steril, inkubator, inkubator shaker, autoklaf, timbangan analitik, laminar air flow, PCR thermal cycler, spektrofotometer, sonikator, waterbath, centrifuge, refrigerated centrifuge (4°C), ice box, pisau bedah, vortex mixer, electrophoresis chamber, Gel Documentation System (GelDoc BioRad), freezer bersuhu -20°C, -80°C, ProtParam (ExPASy), SignalP 6.0 (DTU Health Tech), SecretomeP 2.0 (DTU Health Tech), DeepTMHMM 1.0 (DTU Health Tech), PSORTb 3.0, VaxiJen v2.0, IEDB Next-Generation Tools (T-cell Class I pipeline), Next-Generation Tools (T-cell Class II pipeline), BepiPred 2.0 (DTU Health Tech), AlgPred 2.0, AllerTOP v2.0, AllerCatPro, dan ToxinPred.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pasangan primer Rv3874 (Forward dan Reverse), pasangan primer Rv2389c (Forward dan Reverse) spesifik BamHI dan HindIII, enzim restriksi BamHI dan HindIII, isolat *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, plasmid pCold II, microtube 1.5 mL, gel agarosa, loading dye 6x, running buffer TAE 1X, marker DNA 1kb, marker protein, larutan pewarna etidium bromida, gene ruler vivantis, ethanol 96%, sel kompeten *E.coli* DH5 α , BL21 (DE3) Chemically Competent Cells (SIGMA ; CMC0014-4X40UL), IPTG, X-gal, T4 DNA Ligase Thermo Scientific,

Ampicillin sodium salt (SIGMA ; A0155-5G), LB Broth (Lennox) (SIGMA ; L3022-250G), GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific ; Catalog number:K0691), High Pure Plasmid Isolation Kit Roche (SIGMA, 11754777001) (Thermo Scientific ; Catalog number: ER0301), gSYNC DNA Extraction Kit (Geneaid), QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), PBS 1x pH 7,4, larutan CaCl₂ 0,1 M dan 0,5 M, etanol absolut, etidium bromida, Laemmli Sample Buffer 2x, Wash Buffer, larutan CaCl₂ dingin, Binding Buffer, larutan natrium asetat, 2x Rapid Ligation Buffer, air bebas nuclease, Elution Buffer, Lysis Buffer, Wash Buffer I, Wash Buffer II, double dist. water, gel SDS-PAGE 12%, sekuens protein CFP-10 (FASTA), sekuens protein rpfD (FASTA), dan alel HLA target.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Pengambilan Sampel dan Ekstraksi DNA Genomik *M.Tuberculosis* H37Rv

Sampel *Mycobacterium tuberculosis* diperoleh dari stok kultur HUM-RC. Ekstraksi DNA genomik *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dilakukan menggunakan gSYNC DNA Extraction Kit (Geneaid) sesuai dengan prosedur standar manual kit. Kultur *M. tuberculosis* H37Rv disentrifugasi pada 10.000 x g selama 5 menit untuk mendapatkan pellet sel. Pellet kemudian disuspensikan dalam 200 µL PBS dan ditambahkan 200 µL GS buffer. Campuran dhomogenkan dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit untuk memaksimalkan lisis sel. Kemudian ditambahkan 200 µL GSB buffer dan di vortex hingga homogen. Ditambahkan 200 µL absolute ethanol kedalam campuran kemudian dipindahkan ke dalam gSYNC column. Kolom disentrifugas pada 14.000 x g selama 1 menit lalu buang flowthrough. Kemudian dilakukan pencucian berturut-turut dengan 400 µL W1 buffer dan 600 µL Wash buffer (telah ditambahkan etanol), masing-masing disentrifugasi selama 30 detik. Kemudian dilakukan sentifugasi kering untuk mengeringkan membran kolom selama 3 menit pada 14.000 x g. Kolom dipindahkan ke tabung Eppendorf 1,5 mL steril. Ditambahkan elution buffer

100 µL yang dipanaskan pada 60-65°C tepat di tengah membran kolom, Didiamkan selama 3-5 menit lalu dilanjutkan sentrifugasi pada 14.000 x g selama 30 detik. Hasil Ekstraksi DNA genomic *Mycobacterium tuberculosis* di simpan pada -20°C untuk dilanjutkan pada amplifikasi.

2.3.2 Amplifikasi Gen Rv3874 dan Rv2389c

Genom *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dan genom dari isolat lokal digunakan sebagai cetakan DNA untuk isolasi gen Rv3874 dan Rv2389c. Rv3874 dan Rv2389c diisolasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang menggunakan masing-masing sepasang primer spesifik seperti pada **Tabel 1**.

Table 1. Rancangan Primer untuk Isolasi Gen Rv3874 dan Rv2389c

Antigen	Primer	Sekuens	Sisi Restriksi	Panjang Sekuens Target
Rv3874	F	5'-GCGC GGATCC ATG GCA GAG ATG AAG ACC-3'	BamHI	303 bp
	R	5'-CGCG AAGCTT TCA GAA GCC CAT TTG CGA-3'	HindIII	
Rv2389c	F	5'-GCGC GGATCC ATG ACA CCG GGT TTG CTT-3'	BamHI	465 bp
	R	5'-CGCG AAGCTT TCA ATC GTC CCT GCT CCC-3'	HindIII	
Keterangan : Huruf yang dicetak tebal menunjukkan sisi restriksi yang ditambahkan F : Primer Forward R : Primer Reverse				

Parameter PCR untuk gen Rv3874 digunakan adalah 35 siklus predenaturasi (94°C selama 5 menit), denaturasi (94°C selama 1 menit), annealing (60°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 4°C. Sedangkan parameter PCR untuk gen Rv2389c yaitu 30 siklus dengan predenaturasi (94°C selama 5 menit), denaturasi (94°C selama 30 detik), annealing (58°C selama 30 detik), dan ekstensi (72°C selama 1 menit). Ekstensi terakhir dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit.

Hasil PCR dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis pada gel agarose 2%. Produk PCR dicampurkan dengan *loading dye* 6x menggunakan perbandingan 1 : 5. Campuran ini ditambahkan 3 μ L pewarna etidium bromida kemudian dimasukkan ke dalam cetakan sumur gel agarose. Gel agarose yang telah dicetak kemudian direndam dalam *running buffer* TAE 1x. Elektroforesis dilakukan selama kurang lebih 50-60 menit dengan tegangan listrik konstan sebesar 100 Volt. Marker DNA 1 kb digunakan sebagai penanda ukuran DNA. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan di atas lampu UV menggunakan alat GelDoc (BioRad).

2.3.3 Purifikasi Produk PCR yang Diikuti dengan Tahap Restriksi

Purifikasi produk PCR dilakukan dengan menggunakan QIAquick PCR Purification Kit sesuai dengan manual kit. Setelah melakukan amplifikasi gen target, 1 volume produk PCR ditambahkan 5 volume Buffer PB kemudian dihomogenkan. Kemudian dipindahkan ke kolom QIAquick Spin Column yang sudah diletakkan pada tabung koleksi dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 60 detik. Kemudian kolom dicuci dengan menambahkan 750 μ L Buffer PE (yang sudah ditambahkan etanol sebelumnya) dan disentrifugasi kembali selama 60 detik. Setelah flowthrough di buang, kolom disentrifugasi kering untuk memastikan buffer sisa sudah terbuang maksimal. Kolom dipindahkan ke tabung eppendorf baru dan dimasukkan 50 μ L Buffer EB ditengah membran kolom untuk melulusi DNA. Kemudian disentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit.

Restriksi dilakukan menggunakan enzim BamHI dan HindIII baik untuk produk PCR maupun plasmid. Komposisi untuk restriksi produk PCR yaitu nuclease free water 16 μ L, fastdigest buffer (10x) 2 μ L, produk PCR (DNA) 10 μ L (Konsentrasi hingga 0,2 μ g), enzim BamHI 1 μ L, dan enzim HindIII 1 μ L dengan total komposisi 30 μ L. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit (Produk PCR) dengan heat block atau water thermostat dan diinaktif pada suhu 80°C selama 10 menit. Kemudian untuk komposisi restriksi plasmid DNA yaitu nuclease free water 14 μ L, fastdigest

buffer (10x) 2 μ L, plasmid DNA 2 μ L (Konsentrasi hingga 1 μ g), enzim BamHI 1 μ L, dan enzim HindIII 1 μ L dengan total komposisi 20 μ L. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit (plasmid DNA) dengan heat block atau water thermostat dan diinaktif pada suhu 80°C selama 10 menit.

2.3.4 Ligasi Gen Rv3874 dan Rv2389c ke Vektor pCold II

Gen Rv3874 dan Rv2389c yang sudah direstriksi dengan BamHI dan HindIII kemudian masing-masing diligasikan dengan vektor kloning pCold II. Untuk mengikat DNA, digunakan enzim Ligasi DNA T4. Ligasi Rv3874 dan Rv2389c ke vektor ekspresi masing-masing (pCold II) dengan komposisi reaksi ligasi setiap reaksi memerlukan 1 μ L T4 DNA Ligase, 10 μ L air bebas nuklease, 5 μ L DNA Insert, 2 μ L vektor, dan 2 μ L Ligation Buffer. Kemudian masing-masing campuran dimasukkan ke dalam tabung PCR dan dihomogenisasi. Setelah itu, campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu 22°C. Hasil ligasi ini akan menghasilkan plasmid pCold II–Rv3874 dan pCold II–Rv2389c.

2.3.5 Penyiapan Sel Kompeten

Disiapkan sel kompeten *Escherichia coli* strain BL21 dan DH5 α . Dibuat pre kultur dengan menanam bakteri ke media LB agar menggunakan metode streak. Inokulum diambil dari stok kultu, lalu digoreskan pada permukaan agar ose steril untuk mendapatkan koloni tunggal. Cawan diinkubasi terbalik pada suhu 37°C selama 16–18 jam. Koloni tunggal yang tumbuh kemudian digunakan untuk pembuatan kultur cair pada kultur day 1. Pembuatan kultur sel kompeten Day 1 diawali dengan menuangkan 10 mL media LB cair tanpa antibiotik ke dalam tabung falcon 15 mL. Satu koloni bakteri diambil dari cawan petri menggunakan jarum ose steril, kemudian diinokulasikan ke dalam media LB cair tersebut. Tabung kemudian diinkubasi dalam inkubator shaker pada suhu 35°C dengan kecepatan 150 rpm selama 18 jam.

Pembuatan sel kompeten Day 2 diawali dengan penambahan 40 mL media LB cair ke dalam tabung falcon 50 mL, kemudian diinokulasi dengan 1,5 mL suspensi sel dari kultur Day 1. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 175 rpm selama 2 jam untuk memungkinkan pertumbuhan dan aktivasi sel. Setelah inkubasi, tabung didinginkan di atas es selama 30 menit untuk mempersiapkan sel memasuki fase perlakuan kimiawi. Selanjutnya, suspensi disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, dan supernatan dibuang hingga tersisa sekitar 5 mL yang mengandung pelet dan sebagian medium. Sisa suspensi ini kemudian dibagi secara merata ke dalam tiga tabung mikrocentrifuge (eppendorf), lalu diinkubasi kembali di atas es selama 5 menit.

Tabung eppendorf kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan sel, dan supernatan dibuang hingga hanya menyisakan pelet pada dasar tabung. Pelet sel kemudian diresuspensi menggunakan 300 µL larutan CaCl₂ 0,5 M dingin, lalu diinkubasi kembali di es selama 10 menit. Setelah itu, dilakukan sentrifugasi lanjutan selama 10 menit pada kecepatan yang sama, dan supernatan kembali dibuang. Pelet akhir yang diperoleh kemudian diresuspensi dengan 50 µL CaCl₂ 0,5 M, dan suspensi ini disimpan dalam kondisi dingin (di es) untuk digunakan pada tahap transformasi berikutnya dengan hasil ligasi DNA.

2.3.6 Transformasi Hasil Ligasi ke Sel Kompeten

Transformasi hasil ligasi dilakukan dengan menambahkan sebanyak 10 µL campuran ligasi ke dalam masing-masing satu tabung sel kompeten *Escherichia coli* DH5α dan BL21. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 0°C (es) selama 30 menit untuk memungkinkan DNA berikatan dengan permukaan sel. Perlakuan heat shock dilakukan dengan memindahkan tabung ke dalam water bath bersuhu 42°C selama 30 detik, kemudian segera dikembalikan ke es dan diinkubasi kembali selama 15 menit guna menstabilkan membran sel. Selanjutnya, sebanyak 100 µL media LB cair tanpa antibiotik ditambahkan ke masing-masing tabung, lalu diinkubasi

pada suhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam. Setelah inkubasi, seluruh volume kultur disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang sebagian dan disisakan ±50 µL suspensi sel untuk tahap penanaman ke media agar dengan ampisilin.

2.3.7 Seleksi Biru Putih

Seleksi biru putih dilakukan pada medium LB padat yang mengandung antibiotik ampisilin, IPTG dan X-gal. Sebanyak 50 µl suspensi sel hasil transformasi diinokulasikan dengan metode sebar menggunakan batang L secara merata pada 20 ml medium LB padat yang telah ditambahkan xGal sebanyak 1,33 uL / 1 mL LB agar, IPTG sebanyak 1,12 uL / 1 mL LB agar, dan ampisilin sebanyak 1 uL/1 mL LB agar. Cawan petri yang berisi kultur diinkubasi pada temperatur 37°C selama 16-18 jam. Koloni transforman yang membawa plasmid pCold II–Rv3874 dan pCold II–Rv2389c akan berwarna putih sehingga dapat dibedakan dari koloni transforman yang membawa plasmid pCold II tanpa insersi gen (berwarna biru).

2.3.8 Isolasi Plasmid

Isolasi plasmid dilakukan sesuai manual menggunakan *High Pure Plasmid Isolation Kit Roche* (SIGMA, 11754777001). Diletakkan *Binding Buffer* di atas es. Siapkan bahan awal yakni pelet sel dari 0,5 – 4,0 ml kultur *E.coli* (sel harus memiliki kepadatan 1,5 – 5,0 A600 unit/ml). Dibuang supernatannya kemudian ditambahkan 250 µl *Suspension Buffer* + RNase ke dalam tabung *centrifuge* yang berisi pelet. Disuspensikan kembali pelet dan aduk rata. Kemudian ditambahkan 250 µl *Lysis Buffer*, diaduk perlahan dengan membalik tabung 3 sampai 6 kali (untuk menghindari pemotongan DNA genom, jangan dilakukan vortex). Diinkubasi selama 5 menit pada suhu berapa pun antara +15 dan +25°C (inkubasi tidak lebih dari 5 menit). Larutan yang telah dilisiskan kemudian ditambahkan 350 µl *Binding Buffer* dingin, diaduk perlahan dengan membalik tabung 3 sampai 6 kali. Lalu diinkubasi dalam es selama 5 menit. Larutannya akan menjadi keruh dan endapan flokulan akan terbentuk. Disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan

kira-kira $13.000 \times g$ (kecepatan penuh) dalam *tabletop microcentrifuge* standar. Setelah disentrifugasi, dimasukkan satu *High Pure Filter Tube* ke dalam satu *Collection Tube*. Dipindahkan seluruh supernatan dari langkah sebelumnya ke *upper buffer reservoir* dari *Filter Tube*. Dimasukkan seluruh rakitan *High Pure Tube* ke dalam *tabletop microcentrifuge* standar. Disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan penuh.

Setelah disentrifugasi, dikeluarkan *Filter Tube* dari *Collection tube*, dibuang cairan *flow-through*, dan dimasukkan kembali *Filter Tube* ke dalam *Collection Tube* yang sama. Untuk strain *E. coli* yang memiliki kandungan nuklease yang tinggi (seperti strain HB101 atau JM), dilakukan langkah pencucian opsional terlebih dahulu sebelum masuk pada langkah berikutnya. Jika strain *E. coli* tidak memiliki nuklease yang tinggi konten (misalnya, strain XL1 biru atau DH5), langkah pencucian opsional dilewati dan dilanjutkan pada langkah berikutnya. Langkah pencucian opsional: Untuk menghilangkan aktivitas nuklease yang tinggi dari sediaan, ditambahkan 500 μl *Wash Buffer I* ke *upper reservoir Filter Tube*. Disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan penuh dan dibuang *flow-throughnya*.

Untuk mencuci sediaan ditambahkan 700 μl *Wash Buffer II* ke *upper reservoir Filter Tube*. Disentrifugasi selama 30 – 60 detik dengan kecepatan penuh dan *flow-through* dibuang. Setelah dibuang cairan *flow-through*, sentrifugasi seluruh rangkaian tabung *High Pure* selama 1 menit. Dibuang *Collection Tube*. Waktu sentrifugasi ekstra untuk memastikan penghilangan sisa *Wash Buffer*. Untuk melus DNA, dimasukkan *Filter Tube* ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml yang bersih dan steril. Ditambahkan 100 μl *Elution Buffer* atau *double dist. water* (pH disesuaikan menjadi 8,0 – 8,5) ke *upper reservoir Filter Tube*. Disentrifugasi rakitan tabung selama 1 menit dengan kecepatan penuh. Tabung mikrosentrifugasi berisi DNA plasmid yang dielusi. DNA yang dielusi secara langsung digunakan dalam aplikasi seperti kloning atau *sequencing* atau simpan DNA yang dielusi pada +2 hingga +8°C –15 hingga –25°C untuk analisis selanjutnya. Hasil isolasi DNA plasmid tersebut dapat dikonfirmasi dengan metode PCR dan *sequencing*.

2.3.9 Analisis PCR

Analisis PCR dilakukan untuk memeriksa berhasil atau tidaknya ligasi Gen Rv3874 dan Rv2389c pada vektor pCold II. DNA insersi dianalisis dengan PCR. Kondisi PCR yang sama dengan di atas. Hasil koloni PCR dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis pada gel agarosa 1%.

2.3.10 Analisis Sequencing

Setelah proses PCR selesai, hasil isolasi DNA plasmid kemudian menjalani proses sequencing. Tahap sequencing dilakukan untuk memverifikasi urutan nukleotida yang diperoleh. Analisis hasil sequencing dilakukan menggunakan perangkat lunak BioEdit v.7.2.

2.3.11 Produksi Subunit Protein dan SDS-PAGE

Pembuatan kultur Day 1 untuk produksi protein diawali dengan menyiapkan 10 mL media LB cair ke dalam tabung falcon 15 mL. Ke dalam media tersebut ditambahkan 10 μ L ampisilin (100 mg/mL) sebagai antibiotik selektif dan 5–10 μ L inokulum bakteri yang diambil dari stok gliserol beku suhu -80°C . Koloni diambil secukupnya dari stok gliserol tanpa pencairan berlebih, cukup hingga dapat ditransfer menggunakan jarum ose. Suspensi kemudian diinkubasi dalam inkubator shaker pada suhu 37°C dengan kecepatan 195 rpm selama 18 jam. Kultur ini digunakan sebagai starter untuk tahap kultur skala lebih besar (Day 2) dalam produksi protein rekombinan.

Pada hari kedua produksi protein, sebanyak 45 mL media LB cair ditambahkan ke dalam tabung falcon 50 mL, kemudian ditambahkan 45 μ L ampisilin (100 mg/mL) dan 450 μ L kultur Day 1 sebagai inokulum. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Selama inkubasi, densitas sel dipantau menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) hingga mencapai nilai antara 0,6–0,8, yang menunjukkan bahwa sel berada pada fase pertumbuhan logaritmik optimal untuk induksi ekspresi protein. Setelah OD_{600} berada dalam rentang yang diinginkan, ekspresi protein diinduksi dengan penambahan IPTG pada dua konsentrasi berbeda yaitu 0,5 mM dan 1 mM. Untuk mencapai

konsentrasi tersebut, digunakan IPTG dari stok 100 mM, dengan volume masing-masing 225 μ L untuk 0,5 mM dan 450 μ L untuk 1 mM. Setelah penambahan IPTG, kultur diinkubasi dalam inkubator shaker pada suhu 18°C selama 16-20 jam.

Setelah proses induksi selesai, kultur bakteri disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C untuk memisahkan sel dari medium. Supernatan dibuang, dan pelet sel yang diperoleh disimpan sementara pada suhu -20°C sebelum dilakukan proses ekstraksi. Untuk ekstraksi protein, pelet disuspensikan kembali dengan 5 mL PBS 1 \times pH 7,4, kemudian dilakukan proses sonikasi sebanyak tiga siklus, masing-masing selama 30 detik dengan jeda istirahat selama 1 menit di atas es setiap selesai satu siklus, guna mencegah denaturasi protein akibat panas. Setelah sonikasi, sampel disentrifugasi kembali pada kecepatan 8500 rpm selama 25 menit pada suhu 4°C untuk memisahkan fraksi terlarut (supernatan) dari debris sel. Supernatan kemudian dialiquot ke dalam lima tabung mikrocentrifuge (eppendorf), masing-masing berisi 1 mL, sedangkan sisa supernatan tetap disimpan di dalam tabung falcon. Semua sampel yang mengandung fraksi protein larut kemudian disimpan pada suhu -80°C untuk analisis lebih lanjut dengan SDS-PAGE.

Analisis ekspresi protein dilakukan dengan metode SDS-PAGE. Langkah awal dimulai dengan menyiapkan running buffer dengan cara melarutkan satu bungkus buffer instan ke dalam 1 L aquades hingga larut sempurna. Selanjutnya, gel SDS-PAGE dipasang pada cetakan dan dipastikan telah siap digunakan. Buffer pemuat sampel (Laemmli buffer) disiapkan dengan membuat campuran 2 \times Laemmli buffer dan β -merkaptoetanol dengan perbandingan 950 μ L Laemmli buffer dan 50 μ L β -merkaptoetanol. Sebanyak 10 μ L sampel protein dicampur dengan volume yang sama dari buffer 2 \times , lalu dipanaskan menggunakan waterbath pada suhu 95°C selama 5 menit untuk mendefoldasi protein. Setelah dipanaskan, sebanyak 20 μ L campuran sampel dimuat ke dalam sumur gel, dan 10 μ L marker protein dimasukkan sebagai penanda ukuran molekul. Proses

elektroforesis dijalankan dengan tegangan 120 volt dan arus 400 mA selama 120 menit hingga separasi protein berlangsung optimal.

2.3.12 Uji *In silico*

Karakterisasi Dasar Protein CFP-10 (Rv3874) dan rpfD (Rv2389c)

Pertama, sifat fisikokimia protein diperoleh dari ProtParam (ExPASy). Prosesnya yaitu dengan membuka laman ProtParam di portal ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>), kemudian dimasukkan data sekuens protein (satu analisis untuk satu protein, ulangi untuk protein kedua). Selanjutnya jalankan analisis dengan klik *Compute parameters* dan tunggu hasil keluar. ProtParam menyajikan hasil komposisi asam amino, *molecular weight* (MW), *Theoretical pI*, *Instability index*, *aliphatic index*, dan GRAVY (grand average of hydropathy).

Kedua, prediksi peptida sinyal dilakukan menggunakan SignalP 6.0 (DTU Health Tech). Tahapannya yaitu dengan membuka laman SignalP 6.0 (DTU) <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>, selanjutnya sekuens protein (FASTA) dimasukkan ke server. Pada opsi Organism dipilih Other; kemudian opsi *Output* dipilih *Long output*. Pada opsi Model mode dipilih model *Fast* untuk estimasi probabilitas, atau *Slow* bila diperlukan penetapan batas n-region, h-region, dan c-region yang lebih presisi. *Output* utama meliputi klasifikasi tipe peptida sinyal (Sec/SPI; Sec/SPII—lipoprotein; Tat/SPI; Tat/SPII; Sec/SPIII) beserta *cleavage site* dan anotasi fitur khas (misalnya residu Cys +1 pada lipoprotein dan motif *twin-arginine* pada Tat).

Ketiga, prediksi sekresi non-klasik (tanpa peptida sinyal) berbasis sekuens dilakukan menggunakan SecretomeP 2.0 (DTU). Langkah pertama yaitu mengakses laman SecretomeP 2.0 (DTU) dengan link sebagai berikut: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SecretomeP-2.0/>, kemudian dimasukkan sekuens FASTA protein pada kotak input, atau unggah berkas FASTA sekuens protein. Pilih organisme gram-negative bacteria. Selanjutnya klik submit dan catat hasil. Keluaran SecretomeP untuk bakteri meliputi sejumlah skor, dengan SecP/NN-score sebagai parameter utama. Sesuai

dokumentasi DTU, nilai SecP di atas 0,5 diinterpretasikan sebagai indikasi potensi sekresi non-klasik.

Keempat, analisis topologi transmembran dilakukan dengan menggunakan DeepTMHMM 1.0 (DTU Health Tech), dengan mengakses laman <https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepTMHMM-1.0/> yang selanjutnya ditempelkan sekuens protein dalam format FASTA pada kotak penginputan atau diunggah berkas FASTA, kemudian diklik submit. Keluaran yang diperoleh meliputi berkas .gff3 dan 3line berisi koordinat fitur topologi, grafik probabilitas posterior per-residu, serta ringkasan jumlah segmen transmembran/sinyal. Disimpan dan dicatat hasil.

Kelima, prediksi lokalisasi subseluler protein menggunakan PSORTb 3.0. Prosedurnya yaitu mengakses laman <https://psort.org/psortb/>. Pada *choose an organism type* dipilih *bacteria*, selanjutnya pada *choose gram stain* dipilih *positive* untuk hasil pertama kemudian dipilih *advanced* dan klik *positive with outer membrane*. Pada *output format* dipilih *normal* dan pada *show results* dipilih *via the web*. Kemudian, ditempel sekuens FASTA protein pada kotak penginputan atau diunggah berkas sekuens FASTA protein. Diklik submit dan tunggu hingga hasil keluar.

Keenam, prediksi antigenisitas protein menggunakan VaxiJen v2.0 dengan mengakses laman pada link akses <https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>. Setelah laman server diakses, ditempel sekuens FASTA protein atau diunggah berkas FASTA protein. Selanjutnya pada target organism dipilih *bacteria*, dan *threshold* dipilih 0,5. Kemudian dipilih ACC output dan summary mode. Klik *submit* dan dicatat hasil.

Prediksi Epitope T Cell MHC Class I

Prediksi epitope T cell MHC Class I untuk protein CFP-10 dan rpfD dilakukan dengan menggunakan *IEDB Next-Generation Tools* (T-cell Class I pipeline). Dibuka halaman pipeline dengan akses <https://nextgen-tools.iedb.org/pipeline?tool=tc1> dan dimasukkan sekuens FASTA protein

atau diunggah file FASTA protein ke panel *Input Sequence(s)*. Ditentukan panjang peptida 9 mer untuk dianalisis. Ditambahkan alel HLA target dengan menggunakan fitur *Allele finder*. Dipilih alel HLA yang relevan untuk populasi Indonesia dan Asia Tenggara yaitu HLA-A*11:01, HLA-A*24:02, HLA-A*24:07, HLA-B*15:02, HLA-B*15:13, HLA-B*35:05, HLA-C*01:02, HLA-C*07:02. Pencarian alel HLA yang relevan untuk populasi Indonesia dan Asia Tenggara dilakukan dengan mengakses Allele Frequency Net Database (AFND) (<http://www.allelefreqencies.net/hla6006a.asp>). Pada *Prediction model(s)* ditambahkan MHC-I *Binding/Elution* dan dipilih NetMHCpan 4.1 EL (*Recommended epitope predictor-2023.09*) sebagai model utama untuk menghasilkan peringkat elusi (%Rank_EL) sebagai ukuran kecenderungan peptida untuk dipresentasikan *in vivo*. Ditambahkan Class I pMHC Immunogenicity dengan pengaturan default *Positions to Mask* 1,2,C-terminal, jika ingin menilai imunogenisitas peptida. Ditekan tombol run yang berwarna biru dibagian kanan bawah. Ditunggu proses selesai dan dibuka tab *Results*. Disimpan hasil dalam file CSV. Kriteria utama pemilihan epitop didasarkan pada nilai *percentile rank (EL)* yang menunjukkan kekuatan afinitas pengikatan peptida terhadap molekul MHC kelas I Parameter %Rank_EL peptida untuk strong binder ≤ 0.5 dan weak binder ≤ 2.0 . Peptida yang memenuhi kriteria ini kemudian dievaluasi nilai *immunogenicity score*-nya untuk menilai potensi aktivasi sel T CD8⁺.

Prediksi Epitope T-cell MHC Class II

Prediksi epitope T cell MHC Class II untuk protein CFP-10 dan rpfD dilakukan dengan menggunakan *IEDB Next-Generation Tools* (T-cell Class II pipeline). Dibuka halaman pipeline dengan akses <https://nextgen-tools.iedb.org/pipeline?tool=tc2>, kemudian dimasukkan sekuens FASTA protein atau diunggah file FASTA protein ke panel *Input Sequence(s)*. Ditentukan panjang peptida 15 mer untuk dianalisis dan dipilih 1 pada *Peptide Shift Length*. Ditambahkan alel HLA target dengan menggunakan fitur *Allele finder*. Dipilih alel HLA yang relevan untuk populasi Indonesia dan Asia

Tenggara yaitu HLA-DRB1*12:02, HLA-DRB1*15:02, HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:01, HLA-DPA1*02:02/DPB1*04:01, HLA-DPA1*01:03/DPB1*13:01. Pencarian alel HLA yang relevan untuk populasi Indonesia dan Asia Tenggara dilakukan dengan mengakses Allele Frequency Net Database (AFND) (<http://www.allelefrequencies.net/hla6006a.asp>).

Pada *Prediction model(s)* ditambahkan MHC-II *Binding/Elution* dan dipilih NetMHCIIpan 4.1 EL (*Recommended epitope predictor-2023.09*) sebagai model utama untuk menghasilkan peringkat elusi (%Rank_EL) sebagai ukuran kecenderungan peptida untuk dipresentasikan *in vivo*. Sebagai prediksi pelengkap, ditambahkan modul MHC-II Processing dan dipilih MHCII-NP. Ditambahkan Class II pMHC Immunogenicity dengan pengaturan CD4Episcore, jika ingin menilai imunogenisitas peptida. Ditekan tombol run yang berwarna biru dibagian kanan bawah. Ditunggu proses selesai dan dibuka tab *Results*. Disimpan hasil dalam file CSV.

Kriteria utama pemilihan epitop didasarkan pada nilai *percentile rank (EL)* yang menunjukkan kekuatan afinitas pengikatan peptida terhadap molekul MHC Class II. Parameter %Rank_EL peptida untuk strong binder ≤ 5 dan weak binder ≥ 5 . Cutoff %Rank EL $< 5\%$ digunakan sebagai kriteria *strong binder* guna memperoleh kandidat epitop dengan afinitas ikatan tinggi namun tetap mempertahankan kemungkinan imunogenisitas, karena ambang $< 2\%$ menghasilkan jumlah peptida yang sangat terbatas dan tidak imunogenik. Peptida yang memenuhi kriteria ini kemudian dievaluasi nilai *immunogenicity score* untuk menilai potensi aktivasi sel T CD4⁺.

Prediksi Epitope B Cell

Prediksi Epitope B-cell dilakukan dengan menggunakan BepiPred 2.0 (DTU) dengan mengakses laman pada link akses berikut <https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/>, kemudian ditempelkan sekuens FASTA protein atau diunggah berkas sekuens FASTA protein pada kolom. Selanjutnya diklik submit dan tunggu hingga hasil keluar. Diatur ambang batas epitope 0.5 dan diunduh hasil CSV atau JSON.

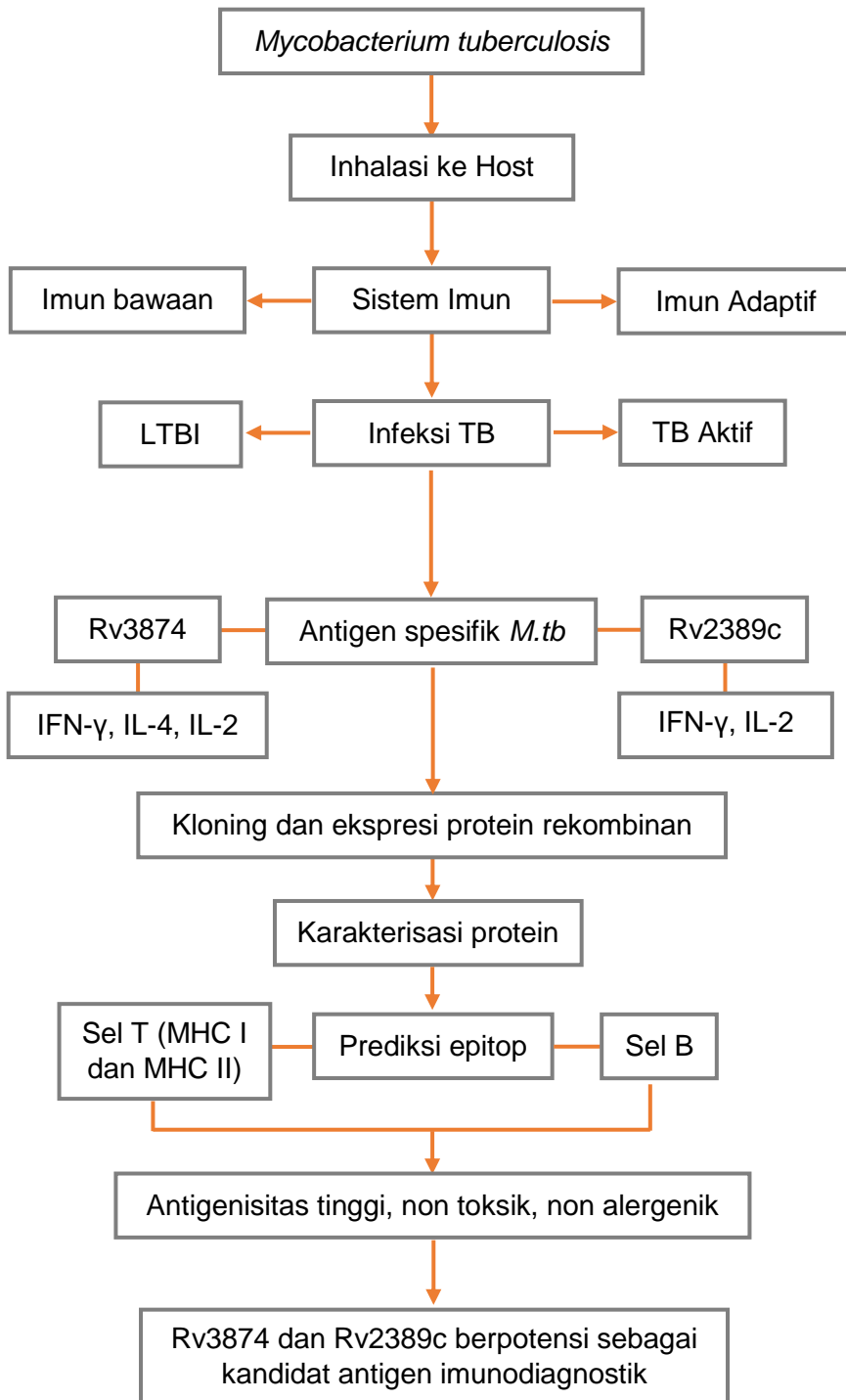
Analisis Antigenisitas, Alergenisitas, dan Toksisitas Kandidat Epitop T Cell dan B Cell CFP-10 dan rpfD

Analisis antigenisitas dilakukan menggunakan server VaxiJen v2.0 <https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>, yang berfungsi untuk memprediksi potensi antigen suatu peptida secara *alignment-independent*. VaxiJen mengklasifikasikan peptida sebagai antigenik atau non-antigenik berdasarkan nilai ambang batas (threshold) 0.4 untuk model bakteri. Nilai di atas ambang batas menunjukkan potensi antigen yang tinggi dan berpeluang menimbulkan respon imun adaptif.

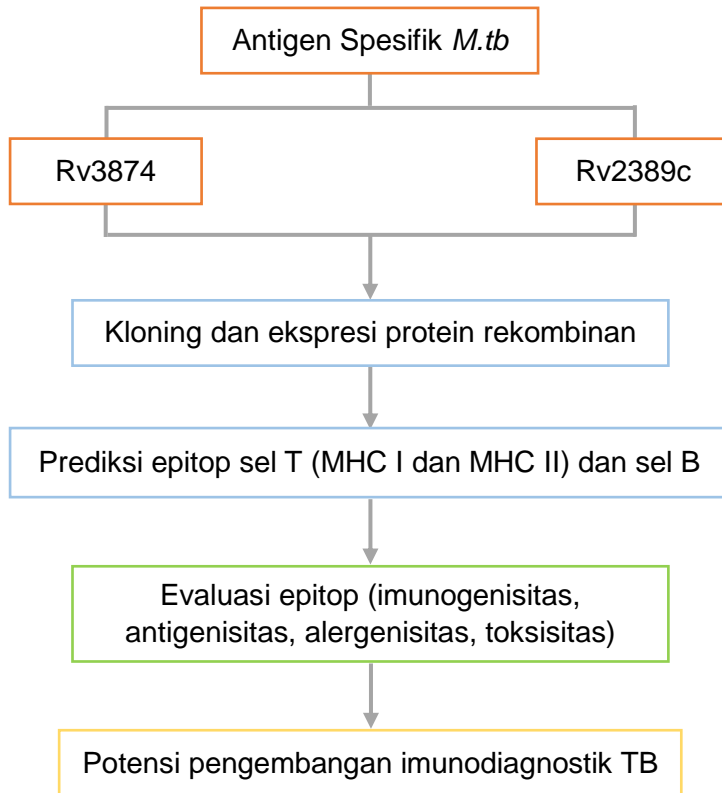
Prediksi alergenisitas utama dilakukan menggunakan AlgPred 2.0 <https://webs.iitd.edu.in/raghava/algpred2/batch.html>, yang menganalisis kemungkinan suatu epitop bersifat alergen berdasarkan kombinasi pendekatan berbasis *machine learning*, motif alergen, dan analisis *IgE epitope mapping*. Serta analisis pembandingan menggunakan beberapa server lain yaitu server AllerTOP v2.0 https://www.ddg-pharmfac.net/allertop_test/ dan AllerCatPro <https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg/allergy/index.html>

Selanjutnya, prediksi toksisitas epitop dilakukan menggunakan server ToxinPred <https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>, yang memanfaatkan pendekatan berbasis *Support Vector Machine (SVM)* untuk mengidentifikasi potensi toksik pada urutan peptida. Epitop dengan nilai prediksi negatif dikategorikan sebagai non-toksik, sedangkan nilai positif menunjukkan potensi toksik. Hasil dari analisis antigenisitas, alergenisitas, dan toksisitas digunakan secara terpadu untuk menyeleksi epitop dengan karakteristik imunogenik tinggi, aman, dan non-alergenik, sehingga layak dipertimbangkan sebagai kandidat vaksin peptida.

2.4 Kerangka Teori



2.5 Kerangka Konsep



Keterangan:

: Variabel independen

: Variabel dependen