

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1. 1 Latar Belakang

Dunia memiliki satu masalah kesehatan yang dapat berbahaya bagi populasi manusia yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit yang menular dan menyebar melalui udara. Penyebaran dapat terjadi ketika seseorang batuk, bersin, berbicara, meludah, dikarenakan tetesan air liur yang mengandung basil tuberkel menyebar diudara dan terhirup oleh orang disekitarnya (Rahlwes et al., 2023). Utamanya, MTB menyerang paru-paru hingga pada 80% dari total kasus MTB. MTB juga dapat menyerang bagian jaringan lainnya dari tubuh yakni mencakup usus, meningen, tulang, kelenjar getah benih, sendi, kulit, dan ginjal, yang kemudian disebut tuberkulosis ekstra paru (TBEP) (Acharya et al., 2020).

Berdasarkan sejarah, TB muncul pada sekitar 73.000 tahun yang lalu dan masih jarang ditemui hingga abad ke 18. Pada tahun 1882, seorang dokter Jerman Robert Koch berhasil mengidentifikasi basil tuberkel yang bertindak sebagai agen penyebab tuberkulosis. Kemudian dikarenakan meningkatnya kepadatan penduduk dan adanya kondisi kehidupan yang tidak mendukung menyebabkan TB ini menjadi pandemi pada masa revolusi industri. Setelah itu diterapkanlah langkah-langkah kesehatan yang bertujuan untuk mengurangi penyebaran dari TBC dan ditemukannya vaksin BCG pada tahun 1920 serta mulai digunakannya vaksin BCG setelah Perang Dunia I. Pada abad 20-an, kasus MTB mulai menurun dan terkendali pada negara-negara maju dikarenakan membaiknya kondisi kesehatan, nutrisi, dan lingkungan (Fatima et al., 2020).

Data WHO melaporkan pada tahun 2022, sebanyak 7,5 juta orang jumlah orang baru diseluruh dunia yang didiagnosa menderita TB. Adanya peningkatan jumlah ini disebabkan oleh diagnosa dan pengobatan yang tertunda karena kases dan layanan kesehatan yang dipengaruhi oleh gangguan terkait COVID. Jumlah ini merupakan angka tertinggi yang terdata sejak pemantauan TBC global yang dimulai pada tahun 1995. Pada tahun 2019 tercatat pada angka 7,1 juta orang, dilanjut pada tahun 2020 tercatat pada angka 5,8 juta orang, dan pada tahun 2021 tercatat pada angka 6,4 juta orang. TB menyebabkan kematian hingga diangka 1,3 juta jiwa pada tahun 2022 secara global. Dilaporkan jumlah kasus TB yang diderita oleh laki-laki sebanyak 55%, perempuan sebanyak 33%, dan anak-anak pada *range* usia 0-14 tahun sebanyak 12%. Diperkirakan jumlah penderita TB yang memiliki resistensi terhadap rifampisin (TB-RR) atau terhadap banyak obat (TB-MDR) mencapai jumlah 410.000 orang secara global pada tahun 2022 (World Health Organisation, 2023).

Pada tahun 2021, Indonesia memiliki estimasi jumlah kasus TB sebanyak 969.000 jiwa. Penderita koinfeksi TB-HIV sebanyak 22.000 kasus per tahun. Jumlah kematian yang disebabkan oleh TB diestimasikan sebanyak 144.000 kasus dan jumlah kematian yang disebabkan oleh koinfeksi TB-HIV diestimasikan sebanyak 6.500 kasus. Terjadi penurunan jumlah kasus TB dan jumlah kematian TB pada tahun 2000-2020 namun pada 2020-2021 terjadi kenaikan jumlah kasus. Pada 2021 terdapat sebanyak 18% kenaikan jumlah kasus infeksi TB dan terjadi peningkatan angka kematian TB sebanyak 55%. Sedangkan perkiraan kasus TB RR/ TB-MDR sebanyak 28.000 kasus dan jumlah ini mengalami kenaikan jika dibandingkan dengan jumlah kasus pada tahun 2020 sebanyak 17% (Kemenkes, 2023).

Saat ini vaksin yang tengah ada untuk menghadapi TB ialah Bacille Calmette-Guerin (BCG) yang merupakan strain dari *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan (Khader et al., 2019). Sejak tahun 1921, BCG sudah menjadi satu-satunya vaksin TB yang disetujui untuk penggunaan klinis. Negara dengan kasus TB yang tinggi menggunakan BCG sebagai strategi vaksinasi universal sedangkan strategi vaksinasi selektif yang menargetkan pada kelompok beresiko tinggi digunakan pada sebagian besar negara dengan tingkat kasus TB rendah (Qu et al., 2021). Walau vaksin BCG telah diterima oleh lebih dari 4 miliar orang di dunia sekaligus menjadi vaksin yang paling banyak digunakan, TBC masih menjadi penyakit paling mematikan yang dapat menular (Kuan et al., 2022).

Penyebaran TB yang tetap tinggi setiap tahun walaupun penggunaan vaksin anti TB telah diberikan pada bayi baru lahir dan sudah adanya kombinasi kemoterapi yang efektif masih tetap menunjukkan kompleksitas yang dihadapi dalam mengatasi organisme yang telah berevolusi bersama TB (Mashabela et al., 2019). Pengelolaan dan pengendalian kasus TB secara global juga mengalami skenario yang semakin buruk karena penyebaran strain TB yang resisten terhadap rifampisin, strain TB yang resisten terhadap banyak obat (MDR), serta strain TB yang resisten terhadap obat yang luas (XDR) (Miggiano et al., 2020).

BCG merupakan satu-satunya vaksin TB berlisensi yang diberikan secara intradermal sejak kelahiran bayi dan memberikan perlindungan kepada bayi dari penyebaran TB, vaksin BCG ini masih memiliki variasi keefektifan pada remaja dan orang dewasa terhadap penyakit paru (Darrah et al., 2020). BCG yang efektif pada anak-anak mencapai perlindungan hingga 50% terhadap penyakit paru-paru dan perlindungan lebih dari 80% terhadap TB yang menyebar. Namun perlu diketahui bahwa anak-anak tidak menularkan TB. TB ditularkan oleh remaja dan orang dewasa. Tetapi perlindungan yang ditunjukkan oleh BCG terhadap remaja dan orang dewasa bervariasi dan sebagai besar buruk terhadap TB (Khader et al., 2019). Meskipun vaksin BCG disarankan

dikarenakan memiliki efek protektif parsial dalam menghadapi TB aktif, BCG cenderung memiliki efikasi yang lebih besar dalam menghadapi penyakit diseminata dan penyakit meninggal pada anak-anak jika dibandingkan dengan menghadapi penyakit paru pada orang dewasa. BCG tidak melindungi dari infeksi TB primer atau ketika aktifnya kembali TB laten hingga terhadap penularan MTB dari satu individu ke individu lain (Yamazaki-Nakashimada et al., 2020). Dengan kata lain, BCG tidak dapat mencegah infeksi primer dan tidak dapat memberikan perlindungan yang konsisten pada infeksi yang terjadi pada orang dewasa (Rahlwes et al., 2023). Maka dari itu masih diperlukan pencarian hingga penelitian mengenai vaksin yang lebih baik dalam mencegah dan menghadapi TB baik pada anak maupun orang dewasa.

Tantangan yang paling sering dihadapi dalam diagnosa tuberculosi pada praktik klinis saat ini yakni sensitivitas rendah pada metode konvensional. Pada microscopy (sputum smear) tidak sensitif, terutama pada TB dengan jumlah bakteri rendah (paucibacillary TB) seperti pada TB anak, TB ekstrapulmoner dan TB dengan HIV. Dengan metode kultur membutuhkan infrastruktur laboratorium yang memadai, dapat memakan waktu lama (4-8 minggu) dan hasilnya tidak selalu positif meskipun pasien memiliki TB aktif. Pada tes imunologi seperti TST (Tuberculin Skin Test) dan IGRA (Interferon Gamma Release Assays) tidak bisa membedakan antara infeksi TB laten dan penyakit TB aktif (Suárez et al., 2019). TB ekstrapulmoner dan TB anak pun memiliki jumlah bakteri yang rendah serta spesimen sulit diperoleh sehingga membuat deteksi lebih sulit dibanding TB paru biasa. Tantangan lainnya yakni WHO yang tidak merekomendasikan tes serologi komersial karena deteksi antibodi TB memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang rendah. Sensitivitas berbagai metode terutama pada TST dan IGRA akan menurun pada pasien immunokompromi seperti HIV, pasien transplantasi, dan hemodialysis. Keterbatasan akses ke teknologi modern seperti PCR dan sekuensing genom yang sulit diakses pada daerah dengan sumber daya terbatas dapat menjadi tantangan. Tantangan lainnya yakni kurangnya biomarker spesifik yang dapat membedakan TB aktif dari TB laten secara jelas, memprediksi progresi dari TB laten ke TB aktif serta memantau efektivitas pengobatan secara real time (Huang et al., 2022). Dibutuhkan pendekatan diagnostik non-respiratorik dengan pengembangan tes berbasis urin atau darah untuk memudahkan pengambilan sampel terutama pada anak-anak. Dengan adanya biomarker baru untuk TB laten, TB subklinis, dan TB aktif dapat menjadi solusi untuk tantangan pada masa mendatang. Pengembangan imunodiagnostik dengan memanfaatkan subunit protein antigen spesifik *Mycobacterium tuberculosis* memiliki potensi karena bersifat non-invasif, spesifik dan juga cepat.

Vaksin-vaksin baru untuk menggantikan vaksin sebelumnya yang telah diproduksi seperti vaksin mutan *M. tuberculosis*, vaksin BCG rekombinan, vaksin

DNA, dan vaksin subunit (Moradi et al., 2020). Dari semua kandidat vaksin yang dikembangkan, vaksin subunit yang mengandung antigen yang dimurnikan memiliki efek samping yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan jenis kandidat vaksin lainnya (Mansury et al., 2019). Rv3875 (ESAT-6 atau 6-kDa early-secreted antigenic target) adalah salah satu antigen yang dapat berpotensi sebagai kandidat vaksin TB dikarenakan Rv3875 merangsang produksi interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) dari limfosit T dan berpartisipasi dalam peningkatan kadar IL-4 dan IL-10, berkontribusi pada pengembangan kekebalan anti-tuberkulosis (Restrepo-Pineda et al., 2019). Rv3875 disekresikan melalui sistem sekresi ESX-1 (Tipe VII) *M. tuberculosis*. Rv3875 telah terlibat dalam memediasi translokasi sitosol mikobakteri dalam makrofag inang dengan memecahkan membran fagosom. ESAT-6 adalah protein *M. tuberculosis* yang banyak disekresikan dan dianggap sebagai faktor virulensi yang penting (Valizadeh et al., 2022).

MPT83 (Rv2873) adalah lipoglikoprotein pada *Mycobacterium tuberculosis* yang memicu respons imun bawaan dan adaptif. Dikenali oleh TLR2, MPT83 merangsang produksi sitokin dan presentasi MHC kelas II pada makrofag. Vaksinasi dengan MPT83 menghasilkan respons yang kuat dari sel T CD4+ dan CD8+, melindungi dari infeksi *M. tuberculosis* pada tikus. MPT83 dapat dikenali oleh manusia terinfeksi dan berpotensi sebagai antigen vaksin yang tidak mengganggu tes diagnostik (Wang et al., 2017). Singkatnya MPT83 (Rv2873) dikenali oleh TLR2 dan menginduksi respon imun bawaan dan adaptif melalui peningkatan kadar sitokin seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 p40 dan IFN- $\alpha$  (R. Sharma et al., 2021). Penggunaan antigen yang tepat dari *M. tuberculosis* akan menimbulkan respons perlindungan yang tepat hingga mengarah pada pemahaman yang lebih baik dalam merancang vaksin yang optimal untuk melawan TBC. Respon imun manusia terhadap TBC bergantung pada beberapa faktor dimana respon Th1 sangat berperan penting. Selain itu, penting dari suatu antigen untuk merangsang dan memproduksi IFN- $\gamma$  (Valizadeh et al., 2022)

## **1. 2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana proses konstruksi dan kloning gen Rv3875 dan Rv2873 sebagai protein subunit *Mycobacterium tuberculosis* yang potensial menjadi kandidat dalam pengembangan vaksin subunit tuberkulosis?
2. Bagaimana karakteristik imunoinformatika (antigenisitas, alergenitas, toksisitas, sekresi, dan topologi membran) dari protein ESAT-6(Rv3875) dan MPT83(Rv2873) sebagai dasar penentuan potensinya dalam pengembangan protein subunit untuk imunodiagnostik dan vaksin tuberkulosis?

## **1. 3 Hipotesis**

1. Gen Rv3875 dan Rv2873 dapat berhasil dikonstruksi dan dikloning ke dalam vektor ekspresi pTrcHis A menggunakan teknik molekuler berbasis

restriksi *Bam*HI dan *Hind*III, serta dapat diekspresikan secara stabil dalam *E. coli* BL21.

2. Protein rekombinan hasil ekspresi ESAT-6 (Rv3875) dan MPT83 (Rv2873) memiliki berat molekul sesuai teori (~9.9 kDa dan ~22 kDa) dan menunjukkan sifat antigenik, non-alergenik, non-toksik, serta tanpa domain transmembran, sehingga berpotensi sebagai protein subunit imunodiagnostik spesifik terhadap *M. tuberculosis*.

## **1. 4 Tujuan Penelitian**

### **1.4.1 Tujuan Umum**

Tujuan umum dalam penelitian ini menghasilkan konstruksi gen rekombinan dan ekspresi protein subunit ESAT-6 (Rv3875) dan MPT83 (Rv2873) dari *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv sebagai kandidat protein subunit potensial dalam pengembangan imunodiagnostik dan vaksin tuberkulosis berbasis subunit.

### **1.4.2 Tujuan Khusus**

1. Melakukan konstruksi, kloning, dan ligasi gen Rv3875 dan Rv2873 ke dalam vektor pTrcHis A.
2. Melakukan transformasi dan seleksi koloni positif menggunakan metode biru-putih pada *E. coli* DH5 $\alpha$  serta konfirmasi sisipan gen melalui PCR dan sekuensing.
3. Mengekspresikan protein rekombinan ESAT-6 (Rv3875) dan MPT83 (Rv2873) pada *E. coli* BL21 menggunakan induksi IPTG dan menganalisis ekspresinya dengan SDS-PAGE 4-20%.
4. Melakukan analisis *in silico* terhadap ESAT-6 (Rv3875) dan MPT83 (Rv2873), meliputi prediksi epitop CD8<sup>+</sup>(MHC-II), CD4<sup>+</sup> (MHC-II), B-Cell, antigenisitas (VaxiJen), alergenisitas (AllerTOP), toksisitas (ToxinPred2), serta sekresi dan topologi (SignalP 6.0 dan DeepTMHMM) untuk menentukan kelayakan antigen sebagai protein imunodiagnostik dan kandidat vaksin subunit.

## **1.5 Manfaat Penelitian**

### **1.5.1 Manfaat Praktis**

Memberikan dasar ilmiah dan bukti eksperimental terkait keberhasilan konstruksi, kloning, dan ekspresi gen Rv3875 dan Rv2873 serta karakter imunoinformatika-nya, yang dapat digunakan sebagai acuan pengembangan imunodiagnostik cepat dan vaksin subunit terhadap *Mycobacterium tuberculosis*.

### **1.5.2 Manfaat Teoritis**

Menambah pengetahuan mengenai hubungan antara karakter molekuler antigen sekresi ESAT-6 (Rv3875) dan lipoprotein permukaan MPT83 (Rv2873) dengan potensi imunogenisitas.

### **1.5.3 Manfaat Klinis**

Memberikan kontribusi dalam identifikasi biomarker protein subunit yang spesifik terhadap *M. tuberculosis* sehingga dapat mendukung diagnosis dini, pemantauan terapi, dan pengembangan vaksin dengan profil keamanan tinggi.

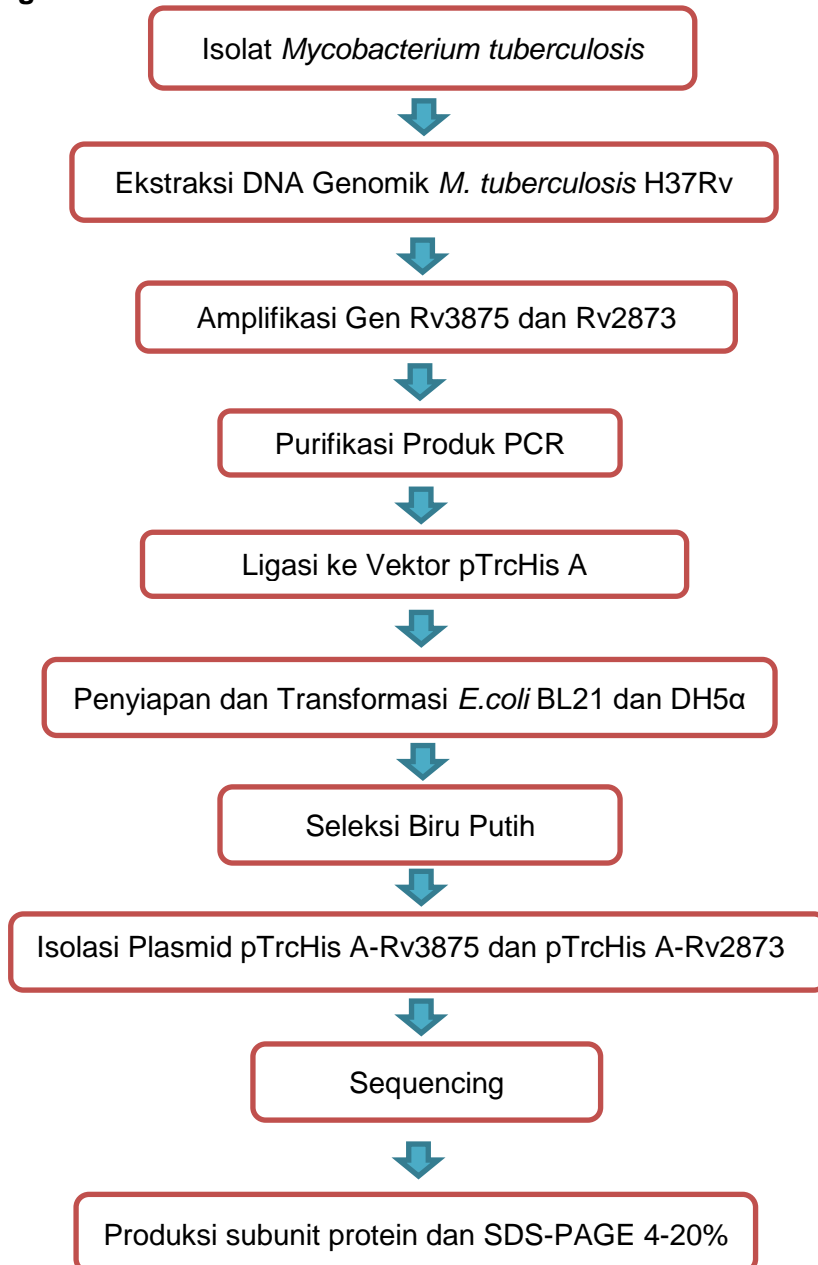
## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### 2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2024 – Mei 2025. Bertempat di Laboratorium bertempat di laboratorium HUMRC Rumah Sakit Universitas Hassanuddin dan Laboratorium Mikromolekuler LPPM Unhas.

#### 2.2 Rancangan Penelitian





## Uji *In Silico*

### 2.3 Alat dan Bahan

#### 2.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini mencakup mikropipet ukuran 10, 100, dan 1000  $\mu\text{L}$  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 ( $4^{\circ}\text{C}$ ), ice box, pisau bedah, vortex mixer, electrophoresis chamber, Gel Documentation System (GelDoc BioRad), freezer bersuhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dan  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.3.2 Bahan

Pasangan primer spesifik *Bam*HI dan *Hind*III, isolat *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, 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* BL21 dan DH5 $\alpha$ , IPTG, X-gal, BL21 (DE3) Chemically Competent Cells (SIGMA ; CMC0014-4X40UL), 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  $\text{CaCl}_2$  0,1 M dan 0,5 M, etanol absolut, etidium bromida, Laemmli Sample Buffer 2x, Wash Buffer, larutan  $\text{CaCl}_2$  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 4-20%.

### 2.4 Metode Kerja

#### 2.4.1 Pengambilan Sampel dan Ekstraksi DNA Genomik *M.Tuberculosis* H37Rv.

Sampel *Mycobacterium tuberculosis* diperoleh dari stok kultur HUM-RC. Ekstraksi DNA genomic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dilakukan menggunakan gSYNC DNA Extraction Kit (Geneaid) sesuai dengan prosedur standar manual kit. Kultur *M. tuberculosis* H37Rv disentrifugasi pada  $10.000 \times g$  selama 5 menit untuk mendapatkan pellet sel. Pellet kemudian disuspensika

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 flowtrough. 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 sentrifugasi 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.

### 2.4.2 Amplifikasi gen Rv3875 dan Rv2873

Genom *M. tuberculosis* H37Rv dan genom dari isolat lokal digunakan sebagai cetakan DNA untuk isolasi gen Rv3875 dan Rv2873. Rv3875 dan Rv2873 diisolasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang menggunakan masing-masing sepasang primer spesifik seperti pada **tabel 1**.

**Tabel 1.** Rancangan Primer untuk Isolasi Gen Rv3875 dan Rv2873

Antigen	Primer	Sekuens	Sisi Restriksi	Panjang Sekuens Target
Rv3875	F	5'-GCGC <b>GGATCC</b> ATG ACA GAG CAG CAG TGG-3'	<i>Bam</i> HI	288 bp
	R	5'CGCG <b>AAGCTT</b> CTA TGC GAA CAT CCC AGT-3'	<i>Hind</i> III	
Rv2873	F	5'-GCGC <b>GGATCC</b> ATG ATC AAC GTT CAG GCC -3'	<i>Bam</i> HI	663 bp
	R	5'-CGCG <b>AAGCTT</b> TTA CTG TGC CGG GGG CAT -3'	<i>Hind</i> III	

Keterangan :  
Huruf yang digaris bawah menunjukkan sisi restriksi yang ditambahkan  
F : Primer Forward  
R : Primer Reverse

Kondisi PCR untuk Rv3875: pre-denatured pada 94°C selama 5 menit; denatured pada 94°C selama 1 menit, annealed pada 60°C selama 50 detik and extended pada 72°C selama 1 menit, total 35 siklus; dan extended pada 72°C selama 5 menit setelah siklus terakhir. Untuk Rv2873 complete denaturation: 94

°C selama 3 menit; Annealing: 55 °C selama 15 detik; Extension: 72 °C selama 1 menit, diikuti dengan 30 siklus amplifikasi dan final elongation step (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 µL 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).

#### **2.4.3 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 µL 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 µL Buffer EB ditengah membran kolom untuk melulusi DNA. Kemudian disentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit.

Tahapan restriksi dilakukan untuk memotong produk PCR dan vektor menggunakan enzim *Bam*HI dan *Hind*III agar terbentuk ujung kohesif yang kompatibel pada proses ligasi selanjutnya. Reaksi restriksi untuk masing-masing produk PCR gen Rv3875 dan Rv2873 disiapkan dalam total volume 30 µL, yang terdiri dari 16 µL nuclease-free water, 2 µL FastDigest Buffer (10x), 10 µL produk PCR, 1 µL enzim *Bam*HI, dan 1 µL enzim *Hind*III. Campuran dihomogenkan secara perlahan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit untuk memastikan pemotongan sempurna. Setelah inkubasi, enzim dinonaktifkan dengan pemanasan pada suhu 80°C selama 10 menit.

Sementara itu, reaksi restriksi untuk vektor pTrcHis A disiapkan dalam total volume 20 µL dengan komposisi 14 µL nuclease-free water, 2 µL FastDigest Buffer (10x), 2 µL DNA vektor (konsentrasi hingga 1 µg), 1 µL enzim *Bam*HI, dan 1 µL enzim *Hind*III. Reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, kemudian dilakukan inaktivasi enzim pada suhu 80°C selama 10 menit. Produk hasil restriksi selanjutnya diverifikasi melalui elektroforesis agarosa untuk memastikan keberhasilan pemotongan sebelum dilanjutkan ke tahap ligasi.

#### **2.4.4 Ligasi Gen Rv3875 dan Rv2873 ke Vektor pTrcHis A**

Gen Rv3875 dan Rv2873 yang sudah direstriksi dengan *Bam*HI dan *Hind*III kemudian masing-masing diligasikan dengan vektor kloning pTrcHis A. Untuk mengikat DNA, digunakan enzim Ligasi DNA T4 merk Thermo Scientific. Ligasi Rv3875 dan Rv2873 ke vektor kloning masing-masing (pTrcHis A) dengan komposisi reaksi ligasi setiap reaksi memerlukan 1 µL T4 DNA Ligase, 10 µL air bebas nuklease, 5 µL DNA Insert, 2 µL vektor, dan 2 µL 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 pTrcHis A – Rv3875 dan pTrcHis A – Rv2873.

#### **2.4.5 Penyiapan Sel Kompeten**

Disiapkan sel kompeten *Escherichia coli* strain DH5α. 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 CaCl<sub>2</sub> 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  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  0,5 M, dan suspensi ini disimpan dalam kondisi dingin (di es) untuk digunakan pada tahap transformasi berikutnya dengan hasil ligasi DNA.

#### **2.4.6 Transformasi Hasil Ligasi ke Sel Kompeten**

Transformasi hasil ligasi dilakukan dengan menambahkan sebanyak 10  $\mu\text{L}$  campuran ligasi ke dalam masing-masing satu tabung sel kompeten *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  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  $\mu\text{L}$  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  $\pm 50$   $\mu\text{L}$  suspensi sel untuk tahap penanaman ke media agar dengan ampisilin.

#### **2.4.7 Seleksi Biru Putih**

Seleksi biru putih dilakukan pada medium LB padat yang mengandung antibiotik ampisilin, IPTG dan X-gal. Sebanyak 50  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{L}$  / 1 mL LB agar, IPTG sebanyak 1,12  $\mu\text{L}$  / 1 mL LB agar, dan ampisilin sebanyak 1  $\mu\text{L}$ /1 mL LB agar. Cawan petri yang berisi kultur diinkubasi pada temperatur 37°C selama 16-18 jam. Koloni transforman yang membawa plasmid pTrcHis A – Rv3875 dan pTrcHis A – Rv2873 akan berwarna putih sehingga dapat dibedakan dari koloni transforman yang membawa plasmid pTrcHis A tanpa insersi gen (berwarna biru).

#### **2.4.8 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 per ml). Dibuang supernatannya kemudian ditambahkan 250  $\mu\text{l}$  Suspension Buffer + RNase ke dalam tabung centrifuge yang berisi pelet. disuspensikan kembali pelet dan aduk rata. Kemudian ditambahkan 250  $\mu\text{l}$  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 × 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. Jika strain E. coli pada 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 mengelusi 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.

#### **2.4.9 Analisis PCR**

Analisis dilakukan untuk memeriksa berhasil atau tidaknya ligasi gen Rv3875 dan Rv2873 pada vektor pTrcHis A. DNA insersi dianalisis dengan PCR. Kondisi PCR yang sama dengan di atas. Hasil koloni PCR dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis pada gel agarosa 1%.

#### **2.4.10 Analisis Sequencing**

Hasil isolasi DNA plasmid tersebut dikonfirmasi dengan metode PCR dan Sanger sequencing dengan primer gen spesifik dari Rv3875 dan Rv2873. Produk PCR di sekuensing dan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) digunakan untuk menganalisis homologi gen target dengan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

#### **2.4.11 Produksi Subunit Protein dan SDS-PAGE 4-20%**

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  $\mu$ L ampisilin (100 mg/mL) sebagai antibiotik selektif dan 5–10  $\mu$ 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  $\mu$ L ampisilin (100 mg/mL) dan 450  $\mu$ 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  $\mu$ L untuk 0,5 mM dan 450  $\mu$ 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 1x 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  $-80^{\circ}\text{C}$  untuk analisis lebih lanjut dengan SDS-PAGE 4-20%.

Analisis ekspresi protein dilakukan dengan metode SDS-PAGE 4-20%. 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  $\beta$ -merkaptoetanol dengan perbandingan 950  $\mu\text{L}$  Laemmli buffer dan 50  $\mu\text{L}$   $\beta$ -merkaptoetanol. Sebanyak 10  $\mu\text{L}$  sampel protein dicampur dengan volume yang sama dari buffer  $2\times$ , lalu dipanaskan menggunakan waterbath pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit untuk mendefoldasi protein. Setelah dipanaskan, sebanyak 20  $\mu\text{L}$  campuran sampel dimuat ke dalam sumur gel, dan 10  $\mu\text{L}$  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.

## **2.4.12 Uji In Silico**

### **2.4.11.1 Karakterisasi Dasar Protein ESAT-6 (Rv3875) dan MPT83 (Rv2873)**

Karakterisasi fisikokimia protein ESAT-6 (Rv3875) dan MPT83 (Rv2873) dilakukan secara in silico menggunakan server ExPASy ProtParam berdasarkan sekuens asam amino yang diperoleh dari database NCBI.

### **2.4.11.2 Prediksi Epitop Sel T CD8<sup>+</sup> (MHC-I) dari dari ESAT-6 (Rv3875) dan MPT83 (Rv2873)**

- Sekuens asam amino protein ESAT-6 (Rv3875) dan MPT83 (Rv2873) disiapkan dalam format FASTA sebagai input analisis prediksi epitop sel T CD8<sup>+</sup>.
- Prediksi epitop sel T MHC kelas I dilakukan secara in silico menggunakan IEDB Next-Generation Tools melalui modul T-cell Class I pipeline.
- Sekuens FASTA protein dimasukkan ke dalam panel Input Sequence(s), baik melalui penyalinan langsung maupun pengunggahan berkas FASTA.
- Panjang peptida yang dianalisis ditetapkan sebesar 9 asam amino (9-mer), sesuai karakteristik epitop yang dipresentasikan oleh MHC kelas I.
- Alel HLA target dipilih menggunakan fitur Allele Finder, dengan mempertimbangkan alel yang umum pada populasi Indonesia dan Asia Tenggara, yaitu HLA-A11:01, HLA-A24:02, HLA-A24:07, HLA-B15:02, HLA-B15:13, HLA-B35:05, HLA-C01:02, dan HLA-C07:02, berdasarkan data Allele Frequency Net Database (AFND).

- Pada bagian Prediction model(s), modul MHC-I Binding/Elution diaktifkan dan model NetMHCpan 4.1 EL dipilih untuk memprediksi afinitas pengikatan dan potensi presentasi peptida.
- Penilaian potensi imunogenisitas peptida dilakukan dengan menambahkan modul Class I pMHC Immunogenicity menggunakan pengaturan default pada posisi 1, 2, dan C-terminal.
- Hasil prediksi diambil dari tab Results dan disimpan dalam format CSV untuk analisis lanjutan.
- Seleksi epitop kandidat didasarkan pada nilai %Rank\_EL, di mana peptida dengan %Rank\_EL  $\leq 0,5$  dikategorikan sebagai strong binder dan %Rank\_EL  $\leq 2,0$  sebagai weak binder, kemudian dievaluasi lebih lanjut berdasarkan immunogenicity score, dengan nilai  $> 0$  menunjukkan potensi imunogenik positif.

#### **2.4.11.3 Prediksi Epitop Sel T CD4+ (MHC-II) dari ESAT-6 (Rv3875) dan MPT83 (Rv2873)**

- Prediksi epitop sel T CD4<sup>+</sup> dilakukan menggunakan modul IEDB MHC Class II Binding Prediction dengan metode NetMHCIIpan.
- Panjang peptida ditetapkan sebesar 15 asam amino (15-mer).
- Penilaian potensi imunogenisitas peptida dilakukan dengan menambahkan modul Class I pMHC Immunogenicity
- Alel HLA yang digunakan berdasarkan frekuensi tinggi pada populasi Asia Tenggara dan Indonesia, yaitu HLA-DRB1\*12:02, HLA-DRB1\*15:02, HLA-DQA103:01/DQB103:01, HLA-DPA102:02/DPB104:01, HLA-DPA101:03/DPB113:01
- Seleksi epitop dilakukan berdasarkan kriteria Strong binder: EL Rank  $\leq 0,5\%$ , Weak binder: EL Rank  $\leq 2,0\%$ , Immunogenicity score tinggi

#### **2.4.11.4 Prediksi Epitope B Cell Protein ESAT-6 (Rv3875) dan MPT83 (Rv2873)**

- Prediksi epitop sel B linear dilakukan menggunakan IEDB B-cell Epitope Prediction Tool (BepiPred).
- Nilai probabilitas epitop dihitung untuk setiap residu asam amino.
- Residue dengan nilai probabilitas  $\geq 0,5$  dikategorikan sebagai epitop B-cell potensial.
- Segmen epitop kontinu diidentifikasi dan dipilih sebagai kandidat epitop humoral.

#### **2.4.11.5 Karakteristik dan Keamanan Protein ESAT-6 dan MPT83**

- Prediksi antigenisitas dilakukan menggunakan server VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen>). Parameter yang digunakan

adalah model bakteri dengan threshold  $\geq 0,4$ . Peptida dengan nilai  $\geq 0,4$  dikategorikan sebagai antigenik.

- Prediksi alergenisitas dilakukan menggunakan server AllerTOP v2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP>). Hasil analisis dikategorikan sebagai: Non-allergen dan Probable allergen.
- Prediksi toksisitas dilakukan menggunakan server ToxinPred2 (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred>). Metode yang digunakan adalah Support Vector Machine (SVM) dengan parameter default. Hasil analisis diklasifikasikan sebagai: Toxin atau Non-toxin.
- Prediksi signal peptide dilakukan menggunakan server SignalP versi 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>). Sekuens protein target dimasukkan dalam format FASTA ke dalam server SignalP 6.0. Parameter organisme dipilih sesuai dengan kategori Gram-positive bacteria. Analisis dilakukan menggunakan parameter default.
- Prediksi domain transmembran dilakukan menggunakan server DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>). Sekuens protein dimasukkan dalam format FASTA menggunakan parameter default. Output yang diamati meliputi jumlah domain transmembran, posisi residu transmembran, dan topologi protein.

#### **2.4.11.6 Analisis Keamanan Epitop (Antigenisitas, Alergenisitas, dan Toksisitas)**

- Prediksi antigenisitas dilakukan menggunakan server VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen>). Parameter yang digunakan adalah model bakteri dengan threshold  $\geq 0,4$ . Peptida dengan nilai  $\geq 0,4$  dikategorikan sebagai antigenik dan dipilih sebagai kandidat potensial.
- Prediksi alergenisitas dilakukan menggunakan server AllerTOP v2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP>). Setiap epitop dianalisis secara individual. Epitop dikategorikan sebagai: Non-allergen dan Probable allergen. Epitop yang diklasifikasikan sebagai non-allergen diprioritaskan sebagai kandidat.
- Prediksi toksisitas dilakukan menggunakan server ToxinPred2 (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred>). Metode yang digunakan adalah Support Vector Machine (SVM) dengan parameter default. Epitop diklasifikasikan sebagai: Toxin atau Non-toxin Hanya epitop non-toxin yang dipilih sebagai kandidat aman.