

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Penyakit tuberkulosis menjadi penyebab utama kematian di seluruh dunia. Pada tahun 2024 terdapat 10,7 juta orang diseluruh dunia terjangkit tuberkulosis, termasuk 5,8 juta pria, 3,7 juta wanita dan 1,2 juta anak-anak. Sebanyak 1,23 juta orang meninggal dunia akibat tuberkulosis (*World Health Organization*, 2025). Indonesia (10%) berada di posisi kedua dengan jumlah penderita TB terbanyak di dunia dengan dua pertiga total global setelah India (25%), Filipina (6,8%), dan China (6,5%).

Indonesia menghadapi tantangan besar dalam upaya eliminasi tuberkulosis. Lebih dari 1 juta kasus dan 125.000 kematian setiap tahunnya menyebabkan penyakit TB menjadi ancaman kesehatan yang serius bagi masyarakat. Beberapa provinsi di Jawa, Sumatera Utara dan Sulawesi Selatan tercatat sebagai penyumbang kasus tertinggi penderita tuberkulosis di Indonesia dengan masing-masing mencatat lebih dari 40.000 kasus (Kemenkes, 2025). Kasus tuberkulosis di Provinsi Sulawesi Selatan khususnya di Makassar tercatat mengalami peningkatan tiap tahunnya dengan total penderita hingga September 2025 sebanyak 6.627 orang (Dinkes SulSel, 2025).

Penyakit tuberkulosis dapat menyerang berbagai organ tubuh manusia, namun yang paling sering terkena adalah paru-paru. Penularan penyakit tuberkulosis umumnya melalui inhalasi droplet di udara yang mengandung agen pembawa penyakit tuberkulosis yang biasanya dikeluarkan melalui batuk atau bersin. Bakteri masuk ke dalam tubuh dan terkumpul dalam paru-paru. Pada orang yang memiliki imunitas rendah, bakteri akan bereplikasi, berkembangbiak dan menyebar melalui pembuluh darah. Oleh karena itu, penyakit tuberkulosis dapat menginfeksi hampir seluruh organ tubuh seperti paru-paru, ginjal, tulang, kelenjar getah bening, hingga otak (Sari et al., 2022). Manifestasi klinis tuberkulosis bervariasi tergantung dari kekebalan imunitas tubuh penderita. Gejala umum ditandai dengan batuk selama dua minggu, demam, kelelahan dan penurunan berat badan (Davidson et al., 2024).

Upaya pemberantasan kasus TB dapat dilakukan pencegahan melalui imunisasi atau vaksinasi untuk meningkatkan daya tahan tubuh sehingga dapat melindungi diri dari virus ataupun bakteri. Salah satu usaha preventif untuk mencegah tuberkulosis yaitu pemberian vaksinasi BCG. *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) merupakan vaksin yang berasal dari bakteri *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan dan dapat bertahan selama beberapa tahun setelah dilakukannya vaksinasi (Fatahillah et al., 2022). Balita yang tidak mendapatkan vaksinasi BCG berisiko 8 kali lebih besar terkena penyakit TB dibandingkan balita yang mendapatkan vaksinasi BCG. Namun, efektivitas vaksin BCG mengalami penurunan di beberapa negara berkembang seiring dengan berkembangnya strain baru dari agen *Mycobacterium tuberculosis*. Vaksin BCG memiliki keterbatasan dalam

memberikan perlindungan terutama pada orang dewasa dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah. Kurangnya ketersediaan vaksin TB generasi baru yang lebih efektif dan efisien menjadi alasan dilakukannya upaya-upaya pengembangan vaksin TB yang lebih baik (Sutanti et al., 2025).

Kemajuan dalam bidang biologi molekuler dan rekayasa genetika telah memungkinkan untuk mengembangkan vaksin DNA. Vaksin DNA rekombinan merupakan cara efektif untuk mengembangkan vaksin anti-TB dengan DNA dari *Mycobacterium tuberculosis* yang mampu memicu respon imun humoral dan seluler (Liang et al., 2016). Menurut Agus et al. (2022) salah satu kandidat vaksin baru yang diharapkan dapat memberikan respon imun yang lebih efektif yaitu menggunakan protein *secreted Mycobacterium tuberculosis lectin* (sMTL-13) yang dikode oleh Rv1419 dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.

Protein sMTL-13 menyebabkan peningkatan produksi IFN- γ oleh PBMC dari penderita tuberkulosis yang menunjukkan bahwa protein sMTL-13 memiliki aktivitas imunogenik (Agus et al., 2022). Pengembangan vaksin DNA dilakukan dengan memasukkan gen Mtb ke dalam plasmid. Vektor ekspresi pTrcHis A merupakan plasmid yang dapat dimanfaatkan sebagai vektor untuk produksi protein dengan diperbanyak dalam sel inang. Penggunaan bakteri *Escherichia coli* BL21 sebagai sel inang dalam kloning gen dikarenakan mudah bereplikasi dan memperkuat ekspresi protein dari gen target dengan penambahan isopropil- β -D-tiogalaktopiranosida (IPTG) (Oktapan et al., 2023).

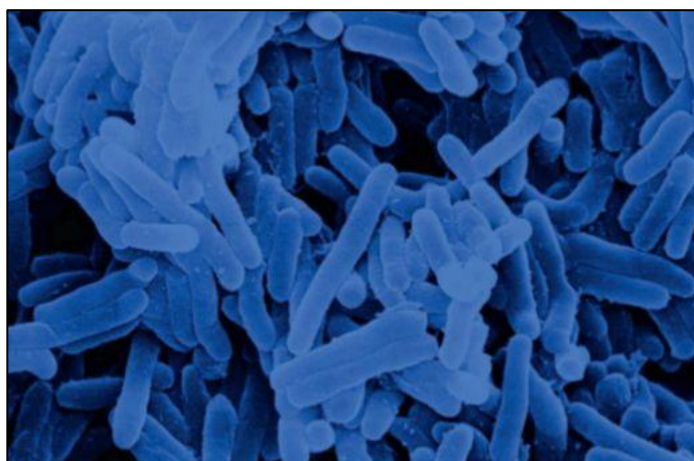
Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan ligasi Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis* ke dalam vektor ekspresi pTrcHis A dengan mentransformasikannya ke dalam bakteri *Escherichia coli* BL21 untuk memperbanyak sel rekombinan sebagai studi awal dalam pengendalian kasus tuberkulosis.

1.2 Teori

1.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri penyebab penyakit tuberkulosis dengan struktur sel berbentuk batang, ukuran panjang 1-4 μm dan berdiameter 0,3 – 0,6 μm . Secara fisiologi, golongan bakteri ini termasuk bakteri aerob, tidak memiliki endospora dan kapus, non-motil dan termasuk bakteri tahan asam (BTA) karena pada saat pewarnaan akan sukar luntur dengan asam dan alkohol. Sifat tahan asamnya diakibatkan dinding sel yang tebal terdiri dari asam mikolat sehingga digolongkan dalam bakteri patogen. Secara biosistematika, taksonomi dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis* adalah sebagai berikut (Velayati dan Parissa, 2016):

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

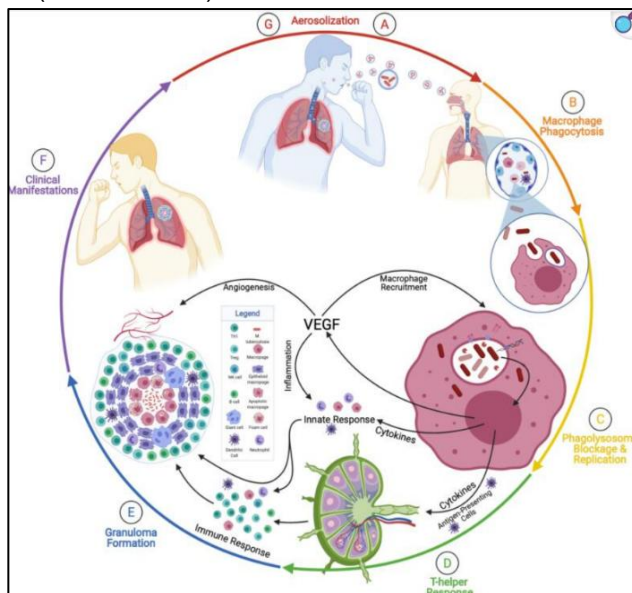


Gambar 1. *Mycobacterium tuberculosis*
 Sumber: Velayati dan Parissa, 2016

Berdasarkan data dari *World Health Organization* (WHO) bahwa satu perempat dari total populasi di seluruh dunia telah terinfeksi tuberkulosis. Berkembangnya strain baru dari Mtb menyebabkan resistensi terhadap banyak antibiotik karena dinding selnya mengandung komponen asam mikolat yang berperan dalam faktor virulensi (Gordon dan Parish, 2018). Penyakit tuberkulosis termasuk salah satu penyakit dengan tingkat kematian yang tinggi. Penularan terjadi secara menyebar melalui batuk, bersin, berbicara atau bernyanyi sehingga partikel-partikel kecil dari penderita yang mengandung Mtb dapat dilepaskan ke udara dan terhirup oleh orang sekitar. Partikel-partikel kecil tersebut berukuran mikro sekitar 1-5 μm dan dapat bertahan di udara selama beberapa jam tergantung pada lingkungan (Latifah et al. 2022). Dalam jaringan tubuh, Mtb dapat mengalami dorman selama beberapa tahun tetapi dapat aktif kembali jika dipicu oleh kondisi tertentu sehingga menyebabkan penyakit. Sifatnya yang aerobik menjadikan Mtb ini menyukai jaringan yang kaya akan oksigen seperti pada bagian apikal paru-paru sehingga menjadi tempat mendukung pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulosis tidak hanya menyerang sistem pernapasan, namun dapat pula menyerang organ lain seperti otak dan tulang (Mar'iyah dan Zulkarnain, 2021).

Patofisiologi tuberkulosis aktif dimulai pada tahap aerosolization yaitu saat penderita tuberkulosis aktif mengeluarkan Mtb ke udara melalui batuk ataupun bersin dan terhirup oleh individu yang rentan. Bakteri Mtb mencapai alveolus paru dan berinteraksi dengan sel imun bawaan seperti makrofag, sel dendritik dan monosit. Makrofag akan memfagositosis bakteri sebagai langkah awal pertahanan tubuh, sementara sel dendritik bermigrasi ke kelenjar getah bening untuk mengaktifasi sel T-helper. Namun, bakteri Mtb memiliki kemampuan hidup dalam makrofag dengan menghambat fusi fagolisosom sehingga dapat bereplikasi di dalam sel. Makrofag yang terinfeksi akan melepaskan sitokin dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) yang memicu respon sel-sel imun. Respon imun adaptif berkembang melalui aktivasi dan migrasi sel T_H1 , Sel T regulator dan sel B kemudian membentuk

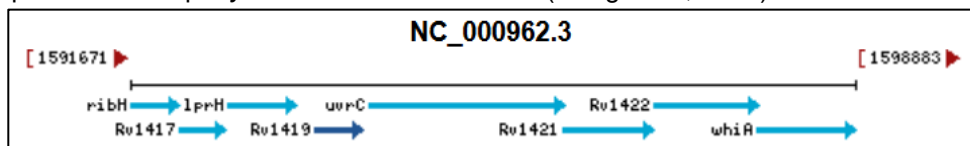
granuloma untuk mengisolasi bakteri. Jika sistem imun melemah, granuloma gagal dalam menahan bakteri sehingga menimbulkan berbagai manifestasi klinis tuberkulosis aktif (Maison, 2022).



Gambar 2. Patofisiologi Tuberkulosis Aktif
Sumber: Maison, 2022

1.2.2 Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis*

Rv1419 ditemukan di dalam genom *Mycobacterium tuberculosis* merupakan gen dengan *Open Reading Frame* (ORF) mengandung 474 nukleotida, 157 asam amino dan peptide *signaling* dengan 33 asam amino N-terminal. Rv1419 mengkode protein sMTL-13 yang merupakan sebuah lektin, kelompok protein sekretori yang memiliki kemampuan untuk mengikat karbohidrat secara spesifik. Protein sMTL-13 termasuk ke dalam kelompok β -trefoil tipe risin dan dikeluarkan ke lingkungan ekstraseluler bakteri yang biasanya terlibat dalam proses adhesi sel, pembelahan sel dan respon imun bawaan. Protein ini terbukti hanya ditemukan pada Mtb patogen dan tidak pada mikrobakteria non-tuberkulosis, sehingga menunjukkan sifatnya yang spesifik terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (Liang et al., 2016).



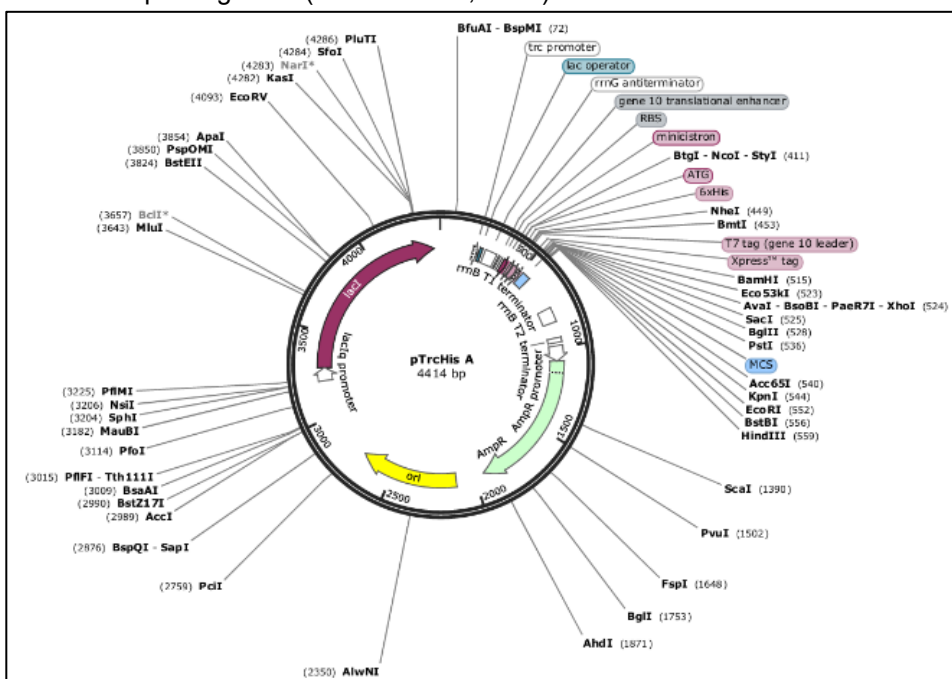
Gambar 3. Letak Rv1419 pada genom *Mycobacterium tuberculosis*
Sumber: NCBI

Protein sMTL-13 yang dikodekan oleh Rv1419 mensekresikan lektin dengan berat molekul 13,6 kDa berpotensi menjadi antigen imunodominan tipe Th1 yang mengandung banyak epitop sel T, yakni antigen yang mampu memicu respon imun

sel T yang kuat dan penting dalam pertahanan terhadap Mtb. Rv1419 menstimulasi pelepasan IFN- γ dari penderita dengan tuberkulosis aktif, menunjukkan bahwa protein sMTL-13 dikenali oleh sistem imun selama infeksi berlangsung. Protein sMTL-13 diprediksi sebagai salah satu protein spesifik Mtb yang terkonservasi dan dapat menjadi kandidat target obat TB yang potensial (Nogueira et al., 2010).

1.2.3 Vektor Ekspresi pTrcHis A

Plasmid merupakan elemen genetik ekstrakromosomal terdapat bebas dalam sitoplasma sel yang banyak dijumpai pada beberapa jenis spesies bakteri dengan DNA berbentuk sirkuler mulai dari ukuran 1000 hingga ratusan ribu pasangan basa. Plasmid dapat dimanfaatkan sebagai vektor gen target yang disisipkan. Umumnya vektor dirancang sedemikian rupa sehingga insersi DNA sisipan pada vektor akan merusak integritas satu diantara gen-gen yang terdapat dalam plasmid tersebut. Salah satunya adalah vektor ekspresi pTrcHis A dengan ukuran 4414 pasang basa (Buwono et al, 2017).



Gambar 4. Peta Plasmid pTrcHis A
Sumber: SnapGene

Vektor ekspresi pTrcHis A memiliki *Origin of Replication* (ORI) yang memungkinkan plasmid bereplikasi secara mandiri dalam sel dan mengandung gen Amp^r sebagai *selectable marker* sehingga hanya sel transforman yang dapat tumbuh pada media yang mengandung antibiotik ampicilin dan gen target akan disisipkan pada daerah *Multiple Cloning Site* (MCS) sehingga dipilih enzim restriksi yang tidak memotong target (Langden et al., 2017). Dalam produksi protein rekombinan dapat dilakukan dengan menyisipkan DNA target ke vektor ekspresi dan dilanjutkan

dengan transformasi ke sel inang. Pada vektor ekspresi pTrcHis A, keberadaan LacO dan gen LacIq memperkuat regulasi ekspresi gen target setelah penambahan isopropil- β -D-tiogalaktopiranosida (IPTG) yang dapat masuk ke sel bakteri melalui transport aktif yang dimediasi oleh *lac permease* (Simas et al., 2023). pTrcHis A mengandung 6x His tag yaitu enam asam amino histidine pada bagian N-terminal sehingga mempermudah proses purifikasi protein (Oktapan et al., 2023).

1.2.4 *Escherichia coli* BL21

Escherichia coli termasuk bakteri golongan gram negatif, berbentuk batang dengan ukuran mulai dari 1 – 1.5 μm x 2 – 6 μm , bersifat fakultatif anaerobik sehingga tetap dapat tumbuh dengan ada tidaknya oksigen, ada yang non-motil dan adapula yang mempunyai flagella sebagai alat geraknya serta dapat tumbuh pada media yang kurang nutrisi. *Escherichia coli* memiliki waktu generasi singkat terutama bila berada pada suhu optimal 37°C dengan waktu generasi 30 menit untuk membelah diri menjadi dua kali lipat. *E.coli* merupakan mikroba yang paling umum digunakan untuk penelitian pada bidang genetika karena sifatnya yang sederhana, mudah bereplikasi dan tidak memerlukan kode etik (Rahayu et al., 2018).

Salah satu strain yang biasa digunakan dalam penelitian yakni *Escherichia coli* BL21, dipilih sebagai *host* dengan pertimbangan sel dengan waktu replikasi cepat, non-motil, memiliki protease Lon dan ompT yang tidak berfungsi, sehingga sangat cocok untuk ekspresi protein secara berlebihan dan memiliki T7 RNA Polymerase yang berperan dalam pengekspresian protein rekombinan dibawah regulasi T7 promoter. Proses optimasi ekspresi protein rekombinan pada bakteri transforman menunjukkan perlunya penambahan IPTG untuk mengaktifkan produksi protein rekombinan dalam sel *Escherichia coli* BL21 sebagai inangnya. IPTG akan berinteraksi dengan lac repressor, sehingga repressor tidak lagi menghambat kerja dari T7 RNA polymerase. Kondisi tersebut memungkinkan T7 RNA polymerase mengenali promoter dan mengekspresikan gen target (Febrianti et al., 2023).

I.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Melakukan ligasi Rv1419 *Mycobacterium tuberculosis* ke vektor ekspresi pTrcHis A dan transformasi ke *Escherichia coli* BL21
2. Melakukan karakterisasi klon rekombinan pTrcHis A – 1419 dengan PCR koloni dan analisis restriksi

I.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi dalam kloning Rv1419 melalui proses ligasi dan transformasi serta menghasilkan klon rekombinan pTrcHis A – 1419 untuk produksi protein sebagai studi awal dalam pengembangan vaksin tuberkulosis.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan September – Oktober 2025 bertempat di Laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUMRC), Makassar.

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Bio-Rad PCR, *Biosafety Cabinet* (BSC) Class II, elektroforesis, *gel documentation*, *microwave*, *autoclave*, *centrifuge*, *waterbath*, vortex, timbangan analitik, *incubator shaker*, inkubator, *freezer* -20°C dan -80°C, kotak es, wadah reagen, mikropipet, cawan petri, ose bulat *disposable*, batang L, gelas ukur, sendok tanduk, tabung eppendorf (0,2 mL dan 1,5 mL), tabung falcon (15 mL dan 50 mL), rak tabung falcon dan eppendorf, dan botol *schoot* (100 mL dan 250 mL).

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat DNA *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* strain BL21 *chemically competent cells* [Sigma-Aldrich], vektor ekspresi pTrcHis A, KAPA2G *Fast* RM PCR kit [Sigma-Aldrich], pasangan primer spesifik (forward dan reverse) [IDT DNA], *FastDigest KpnI* kit [Thermo Scientific], *FastDigest HindIII* kit [Thermo Scientific], kit enzim T4 DNA ligase [Thermo Scientific], *QIAquick PCR Purification Kit* [Qiagen], *High Pure Plasmid Isolation kit* [Roche], *Nuclease Free Water* [Qiagen], *micropipet tips* (10 µL, 200 µL, dan 1000 µL), Ethidium Bromide [Merck], *Luria Bertani Broth* [Sigma-Aldrich], *Bacteriological Agar* [Sigma-Aldrich], *aquades*, *FloroSafe DNA stain* [1st BASE], DNA Ladder 100bp [Vivantis], DNA *Loading Dye* [Bioline], *Agarosa* [1st BASE], TBE Buffer 10x [Sigma-Aldrich], CaCl₂, Ampicilin, IPTG, alkohol 70%, es kristal dan aluminium foil.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Kriteria Sampel

Isolat *Mycobacterium tuberculosis* berupa DNA hasil ekstraksi diperoleh dari isolat klinis Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.3.2 Amplifikasi Rv1419

Amplifikasi Rv1419 dilakukan dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) melibatkan sepasang primer spesifik yang dirancang untuk Rv1419 seperti pada tabel 1. Amplifikasi dengan teknik PCR diulang sebanyak 30 siklus dengan satu siklus terdiri dari pra denaturasi pada suhu 94°C selama 10 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 60°C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72°C

selama 5 menit. Sampel disimpan pada suhu 12°C. PCR Rv1419 dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis pada gel agarosa 1%. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit dengan tegangan sebesar 100 volt.

Tabel 1. Rancangan Primer Rv1419

Antigen	Primer	Sekuens	Sisi Restriksi
Rv1419	Forward	GTC AGG TAC CAT GGG TGA ATT ACG GTT GG	<i>KpnI</i>
	Reverse	ACT GAA GCT TTT ACG GCA CGC TAT CCC AC	<i>HindIII</i>

Keterangan:

Huruf bercetak hijau dan merah menunjukkan sisi restriksi yang ditambahkan

Tabel 2. Komposisi Mix PCR

Komponen	Volume
Enzim PCR	25 µL
Primer <i>Forward</i>	1,5 µL
Primer <i>Reverse</i>	1,5 µL
DNA	12 µL
<i>Nuclease Free Water</i>	10 µL
Total	50 µL

2.3.3 Purifikasi Produk PCR Rv1419

Sisa hasil amplifikasi sebanyak 40 µL dimasukkan ke dalam tabung eppendorf baru. Tahapan purifikasi produk PCR dilakukan mengikuti protokol kit yaitu QIAquick PCR Purification Kit [Qiagen]. Pada tabung eppendorf yang telah berisi produk PCR, selanjutnya ditambahkan PB Buffer sebanyak 200 uL (5 x volume produk PCR). Disiapkan tabung filter dan tabung koleksi. Larutan dari tabung eppendorf dipindahkan melalui tabung filter, disentrifugasi pada kec. 13.000 rpm selama 1 menit. Supernatan pada tabung koleksi dibuang, lalu ditambahkan 750 uL PE Buffer melalui kolom filter, disentrifugasi kec. 13.000 rpm selama 1 menit. Supernatan pada tabung koleksi dibuang, disentrifugasi kembali (sentrifugasi kering) kec. 13.000 rpm selama 1 menit. Tabung filter dipindahkan ke dalam tabung eppendorf baru, lalu ditambahkan EB Buffer 70 uL, disentrifugasi kec. 13.000 rpm selama 1 menit hingga cairan turun ke tabung eppendorf dan tabung filter dibuang. Hasil purifikasi produk PCR Rv1419 dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 1%. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit dengan tegangan sebesar 100 volt.

2.3.4 Restriksi Rv1419 dan Vektor Ekspresi pTrcHis A

Hasil purifikasi produk PCR Rv1419 selanjutnya direstriksi menggunakan enzim *fastdigest KpnI* dan *HindIII* bersamaan dengan vektor ekspresi pTrcHis A dengan komposisi restriksi seperti tabel dibawah ini:

Tabel 3. Komposisi Restriksi Rv1419 dan Vektor Ekspresi pTrcHis A

Komponen	Rv1419	pTrcHis A
Insert	10 μ L	5 μ L
Buffer 10x	2 μ L	2 μ L
<i>fastdigest KpnI</i>	1 μ L	1 μ L
<i>fastdigest HindIII</i>	1 μ L	1 μ L
<i>Nuclease Free Water</i>	16 μ L	11 μ L
Total	30 μL	20 μL
Inkubasi 37°C	20 menit	15 menit
Inaktivasi 80°C	10 menit	10 menit

2.3.5 Ligasi Rv1419 ke dalam Vektor Ekspresi pTrcHis A

Ligasi Rv 1419 ke dalam vektor ekspresi pTrcHis A dilakukan menggunakan enzim T4 DNA Ligase dan diinkubasi pada suhu 22°C selama 10 menit dengan suhu penyimpanan 12°C. Hasil ligasi ini merupakan DNA plasmid rekombinan yang siap untuk ditransformasikan ke dalam sel kompeten. Komposisi ligasi sesuai dengan tabel di bawah ini:

Tabel 4. Komposisi Ligasi Rv1419 ke Vektor Ekspresi pTrcHis A

Komponen	Volume
DNA (Rv1419)	5 μ L
Vektor (pTrcHis A)	3 μ L
T4 Ligase	1 μ L
Buffer 10x	2 μ L
<i>Nuclease Free Water</i>	9 μ L
Total	20 μL

2.3.6 Penyiapan Sel Kompeten

Sel kompeten yang digunakan ialah sel kompeten *Escherichia 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 (*day 1*), kemudian diinkubasi selama 18 jam pada *incubator shaker*, pada suhu 37°C, berkecepatan 175 rpm. Setelah 18 jam, bakteri diinokulasi kembali sebanyak 1% dari 22,5 mL dari total media LB cair (*day 2*), lalu diinkubasi selama 2 jam 30 menit. Setelah itu, kultur bakteri didinginkan dalam es selama 15 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Bagian supernatan yang terbentuk dibuang dan ditambahkan CaCl_2 0,1 M steril sebanyak 2 mL (CaCl_2 harus selalu dalam keadaan dingin) lalu disimpan dalam es selama 10 menit. Disentrifugasi kembali dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C lalu supernatan yang terbentuk dibuang 1 mL, sisanya dihomogenkan dengan pellet yang terbentuk. Kemudian dialiquot ke dalam tabung eppendorf baru, didiamkan kembali

pada es selama 5 menit. Disentrifugasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan 4.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang (tersisa pellet di dasar tabung eppendorf) dan pellet diresuspensikan dengan 300 µL CaCl₂ lalu didiamkan dalam es selama 10 menit. Disentrifugasi terakhir selama 5 menit kecepatan 4.000 rpm pada suhu 4°C kemudian supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan ditambahkan 50 µL CaCl₂ kemudian disimpan pada kulkas -20°C hingga digunakan.

2.3.7 Transformasi ke *Escherichia coli* BL21 dan Seleksi Transforman

Metode yang digunakan dalam transformasi ini adalah metode *heat shock*. Sebanyak 10 µL produk ligasi dimasukkan ke dalam sel kompeten yang telah tersedia, lalu diinkubasi pada es selama 30 menit. Setelah inkubasi, dilakukan *heat shock* menggunakan *water bath* pada suhu 42°C selama 45 detik, lalu diinkubasi kembali dalam es selama 15 menit. Ditambahkan 1000 µL media LB cair ke dalam tabung eppendorf yang berisi bakteri transforman dan dilanjutkan inkubasi pada *incubator shaker* dengan kecepatan 175 rpm, pada suhu 37°C selama satu jam. Setelah diinkubasi selama 1 jam, bakteri transforman disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang hingga tersisa ±50 µL pada tabung eppendorf lalu dihomogenkan dengan pellet yang terbentuk.

Seleksi transforman dilakukan pada media LB padat yang mengandung antibiotik ampicilin dan IPTG. Ditambahkan 50 µL antibiotik ampicilin dan IPTG dalam media LB padat 50 mL. Sebanyak 50 µL suspensi bakteri transforman diinokulasikan dengan metode sebar menggunakan batang L secara merata pada media LB padat. Cawan petri yang berisi bakteri transforman diinkubasi pada temperatur 37°C selama 16-18 jam. Pengamatan hasil transformasi dilakukan secara makroskopis terhadap koloni bakteri *E.coli* BL21 yang terbentuk pada media LB.

2.3.8 Karakterisasi Klon Rekombinan

2.3.8.1 PCR koloni rekombinan

Karakterisasi klon rekombinan dimulai dengan PCR Koloni. Analisis ini dilakukan untuk mengetahui keberhasilan transformasi hasil ligasi plasmid rekombinan pada bakteri *Escherichia coli* BL21. DNA insersi dianalisis menggunakan teknik PCR. Diambil 6 koloni yang tumbuh pada media LB padat dan masing-masing koloni dimasukkan dalam 6 tabung eppendorf berbeda yang telah berisi *nuclease free water* (NFW) 50 µL. Siklus PCR untuk Rv1419 diulang sebanyak 30 siklus dengan satu siklus terdiri dari pra denaturasi pada suhu 94°C selama 10 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 60°C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Sampel disimpan pada suhu 12°C. Hasil PCR koloni dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 1%.

Tabel 5. Komposisi Mix PCR Koloni

Komponen	Volume
Enzim PCR	6,25 μ L
Primer <i>Forward</i>	0,5 μ L
Primer <i>Reverse</i>	0,5 μ L
DNA	2,5 μ L
<i>Nuclease Free Water</i>	2,75 μ L
Total	12,5 μL

2.3.8.2 Isolasi Plasmid Rekombinan

Plasmid rekombinan diisolasi dari koloni bakteri yang tumbuh. Koloni yang telah dikonfirmasi pada PCR koloni, selanjutnya ditumbuhkan pada media LB cair yang berisikan antibiotik ampicilin dengan perbandingan 1:1 yaitu 10 mL LB cair dan 10 μ L ampicilin. Kultur bakteri diinkubasi pada *incubator shaker* selama 16 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, kultur bakteri dialiquot ke 6 tabung eppendorf, masing-masing sebanyak 500 μ L (untuk dijadikan stok), tersisa 4 mL kultur. Isolasi plasmid dilakukan dengan menggunakan manual *High Pure Plasmid Isolation* [Roche]. Hasil inkubasi 4 mL disentrifugasi dengan kecepatan 4400 rpm selama 30 detik, sebagian supernatan yang terbentuk dibuang, sisanya dihomogenkan dengan pellet lalu dipindahkan ke tabung eppendorf baru dan dilanjutkan dengan sentrifugasi kec. 6000 rpm selama 30 detik. Supernatan dibuang, selanjutnya pellet diresuspensi dengan 250 μ L Suspension Buffer ke dalam tabung eppendorf lalu homogenkan. Sebanyak 250 μ L Lysis Buffer ditambahkan, dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan 3-6 kali, inkubasi selama 5 menit pada suhu 15-25°C (tidak boleh lebih dari 5 menit). Sebanyak 350 μ L Binding Buffer dingin ditambahkan dan dihomogenkan dengan membolak-balikkan 3-6 kali, lalu diinkubasi dalam es selama 5 menit (hasilnya akan memperlihatkan seperti bentuk awan), sentrifugasi kec. 13.000 rpm selama 10 menit. Dimasukkan tabung filter ke dalam tabung koleksi, dipindahkan supernatan dari tabung eppendorf ke dalam tabung filter, dilakukan sentrifugasi kec. 13.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang terdapat pada tabung koleksi dibuang dan dimasukkan kembali tabung filter ke dalam tabung koleksi yang sama. Sebanyak 500 μ L Wash Buffer I ditambahkan melalui tabung filter, sentrifugasi kec. 13.000 rpm selama 1 menit. Dibuang supernatan yang terdapat pada tabung koleksi. Sebanyak 700 μ L Wash Buffer II melalui tabung filter, sentrifugasi kec. 13.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang terdapat pada tabung koleksi dibuang, lalu disentrifugasi kembali (sentrifugasi kering) kec. 13.000 rpm selama 1 menit. Dibuang supernatan beserta tabung koleksi. Tabung filter dimasukkan ke dalam tabung eppendorf baru. Sebanyak 100 μ L Elution Buffer ditambahkan melalui tabung filter, disentrifugasi kec. 13.000 rpm selama 1 menit. Tabung filter dibuang dan tabung eppendorf telah berisi plasmid rekombinan.

2.3.8.3 Analisis Restriksi Plasmid Rekombinan

Analisis restriksi dilakukan untuk memeriksa keberhasilan proses ligasi plasmid rekombinan yang membawa Rv1419 pada vektor ekspresi pTrcHis A. Plasmid rekombinan pTrcHis A – 1419 yang telah diisolasi, selanjutnya direstriksi menggunakan enzim *KpnI* dan *HindIII* dengan komposisi seperti tabel dibawah ini:

Tabel 6. Komposisi Restriksi Plasmid Rekombinan

Komposisi	pTrcHisA-1419
Insert Plasmid Rekombinan	5
Buffer 10x	2
<i>fastdigest KpnI</i>	1
<i>fastdigest HindIII</i>	1
<i>Nuclease free water</i>	11
Total	20 uL

Inkubasi dilakukan 30 menit pada suhu 37°C dan inaktivasi enzim pada suhu 80°C selama 10 menit serta penyimpanan pada suhu 12°C. Hasil analisis restriksi plasmid rekombinan dikonfirmasi menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 1%.