

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) hingga kini masih menjadi ancaman kesehatan global yang serius, menempati posisi teratas sebagai salah satu dari sepuluh penyakit menular paling mematikan di dunia. Bahkan, setiap tahunnya penyakit ini mencatatkan angka kematian yang lebih tinggi dibandingkan dengan HIV/AIDS (Humaida *et al*, 2024). Berdasarkan data terbaru dari *World Health Organization* (WHO) tahun 2024, tercatat adanya lonjakan kasus baru yang signifikan hingga mencapai 10,8 juta jiwa di seluruh dunia. Angka tersebut merupakan statistik tertinggi yang terekam sejak dimulainya pencatatan pada tahun 1995. Di tingkat nasional, Indonesia masih menempati peringkat kedua dunia sebagai negara dengan beban kasus TB terbesar. Kementerian Kesehatan RI (2025) memperkirakan total kasus di tanah air mencapai 1.090.000 kasus, dengan angka kematian diproyeksikan menyentuh 136 ribu jiwa pada tahun 2024. Situasi ini juga tercermin di tingkat regional, Dinas Kesehatan Sulawesi Selatan (2025) melaporkan adanya 10.715 kasus di wilayah provinsi, dengan Kota Makassar tercatat sebagai penyumbang angka tertinggi, yakni sebanyak 3.483 kasus.

Pemerintah telah mengambil langkah masif untuk merespons masalah ini melalui vaksinasi BCG (*Bacillus Calmette Guerin*). Vaksin ini diwajibkan dalam program imunisasi dasar nasional, khususnya yang menyasar kelompok balita dan anak-anak (Saidah dan Hari, 2023). Walaupun demikian, penggunaan vaksin BCG memiliki sejumlah keterbatasan signifikan. Vaksin ini memang terbukti efektif menekan angka mortalitas pada populasi anak, namun tidak cukup ampuh untuk memutus rantai penularan TB di masyarakat luas, terutama pada kelompok dewasa. Hal ini disebabkan oleh ketidakmampuan vaksin BCG dalam menstimulasi pembentukan sistem kekebalan jangka panjang yang kuat. Respon imun yang dihasilkan dinilai kurang spesifik dan tidak cukup tangguh untuk mengenali antigen bakteri TB yang sesungguhnya, khususnya dalam melawan TB paru yang merupakan bentuk penyakit paling menular dan mematikan (Mahdizade *et al*, 2024).

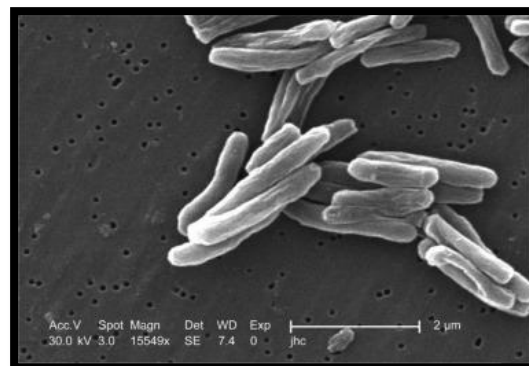
Upaya pengembangan vaksin menjadi solusi yang diharapkan saat ini. Strategi penggunaan vaksin rekombinan yang memanfaatkan antigen spesifik dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dianggap sebagai kandidat terbaik untuk mengatasi permasalahan tersebut. Terdapat gen spesifik dalam genom bakteri yang berperan krusial dalam virulensi, yaitu gen Rv3874 dan Rv1419. Kedua gen ini bertanggung jawab dalam mengkode protein *Culture Filtrate Protein* 10 kDa (CFP-10) dan Lektin 13 kDa (sMTL-13). Kedua protein tersebut memiliki peran vital dalam mekanisme infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, dimana keduanya terlibat dalam memediasi translokasi bakteri menuju sitosol makrofag inang dengan cara memecah membran fagosom. Selain peran virulensinya, kedua protein ini juga menunjukkan aktivitas imunogenik, yakni kemampuan untuk memicu produksi sitokin proinflamasi oleh *Antigen Presenting Cells* (APC) serta menstimulasi proliferasi sel

limfosit T CD4⁺ (Christiano *et al*, 2019). Adanya aktivitas imunogenik ini mengindikasikan bahwa produksi protein fusi rekombinan dari gabungan kedua protein tersebut memiliki potensi besar untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin baru. Inovasi ini diharapkan mampu menggantikan peran vaksin BCG dan menjadi solusi yang lebih efektif dalam upaya penanggulangan penyakit Tuberkulosis di masa depan. Oleh karena itu, dilakukan penelitian ini untuk melakukan produksi protein fusi rekombinan CFP-10 dan sMTL-13 pada *Escherichia coli* BL21.

1.2 Teori

1.2.1 Tuberkulosis

Tuberkulosis (TB) didefinisikan sebagai penyakit infeksi kronis yang bersifat menahun dan dapat menular secara langsung akibat paparan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Secara umum, infeksi ini menyerang organ paru-paru dan berpotensi menjangkiti individu dari berbagai kelompok usia maupun jenis kelamin (Rasyid dan Lukman, 2023). *Mycobacterium tuberculosis* diklasifikasikan sebagai bakteri aerob yang mutlak membutuhkan oksigen untuk kelangsungan hidupnya, tidak memiliki kapsul maupun endospora, bersifat non-motil (tidak dapat bergerak), serta termasuk dalam kategori bakteri Gram-positif (Chen *et al*, 2017).



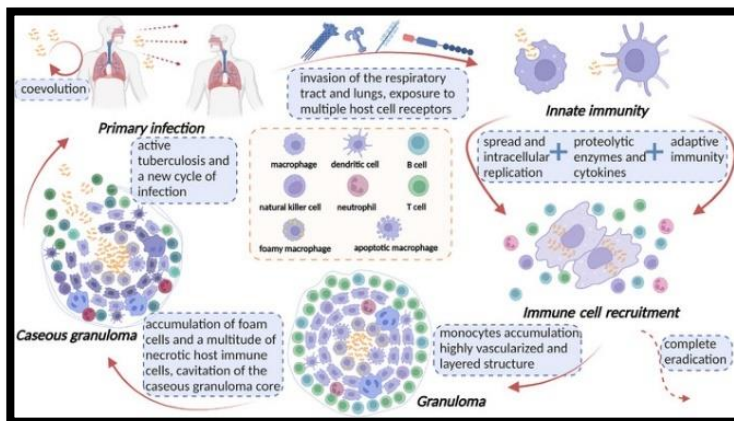
Gambar 1. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*
Sumber: Oosthuizen *et al*, 2018.

Bakteri ini memiliki morfologi berbentuk batang dengan dimensi ukuran berkisar antara 0,2 hingga 0,4 x 2 hingga 10 μm. Bakteri ini memerlukan waktu regenerasi yang cukup lambat, yakni berkisar antara 2 hingga 60 hari, dengan suhu pertumbuhan optimal pada 37°C. Salah satu karakteristik paling distingtif dari genus ini terletak pada struktur dinding selnya yang kaya akan komponen lipid. Dinding sel tersebut tersusun atas lapisan peptidoglikan yang tebal serta mengandung senyawa kompleks seperti arabinogalaktan, lipoarabinomanan, dan asam mikolat. Asam mikolat merupakan komponen unik yang secara spesifik hanya ditemukan pada dinding sel *Mycobacterium* dan tidak terdapat pada bakteri jenis lain. Keberadaan struktur dinding sel yang didominasi oleh asam lemak inilah yang memberikan proteksi kuat terhadap berbagai gangguan fisik maupun kimia, sekaligus menjadikan bakteri ini memiliki sifat tahan asam, sehingga kerap disebut sebagai Basil Tahan Asam atau BTA (Chen *et al*, 2017).

Kondisi lingkungan yang mendukung proliferasi optimal bakteri ini meliputi suhu sekitar 37°C dengan derajat keasaman (pH) antara 6,4 hingga 7. Secara imunologis, komponen antigen bakteri tersebar baik pada dinding sel maupun sitoplasma dalam bentuk lipid, polisakarida, dan protein. Mengingat karakteristik dinding selnya yang sulit ditembus oleh zat warna biasa akibat sifat tahan asamnya, proses identifikasi bakteri ini memerlukan teknik pewarnaan khusus, yakni metode pewarnaan Ziehl-Neelsen (Girsang dan Friska, 2022).

1.2.2 Patogenesis Tuberkulosis

Tuberkulosis tercatat sebagai salah satu penyakit tertua dalam sejarah peradaban manusia yang telah teridentifikasi sejak kurang lebih 3400 tahun SM. Secara evolusioner, asal-usul penyakit ini diduga bermula dari infeksi pada hewan ternak (sapi) yang kemudian menular ke manusia akibat pola hidup yang berdampingan. Transmisi awal terjadi ketika peternak dan keluarganya menghirup udara di sekitar ternak atau mengonsumsi susu yang terkontaminasi bakteri *Mycobacterium bovis*. Seiring berjalannya waktu, patogen ini mengalami mutasi genetik menjadi *Mycobacterium tuberculosis* (Estela *et al*, 2024).



Gambar 2. Patogenesis *Mycobacterium tuberculosis*

Sumber: (Yang *et al*, 2023)

Proses invasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* ke dalam tubuh manusia terjadi terutama melalui saluran pernapasan menuju paru-paru, meskipun bakteri juga dapat masuk melalui rute lain seperti kulit, saluran kemih, dan saluran pencernaan. Secara klinis, gejala yang muncul meliputi batuk berdahak yang persisten selama dua minggu atau lebih. Kondisi ini sering kali disertai dengan hemoptisis (batuk darah), sesak napas, kelemahan umum, penurunan nafsu makan (anoreksia), penurunan berat badan yang signifikan, malaise, keringat malam tanpa aktivitas fisik, serta demam yang berlangsung lebih dari satu bulan (Kartika *et al*, 2022). Patogenesis dimulai ketika bakteri terhirup dan mencapai alveoli, yang menjadi lokasi utama bagi bakteri untuk berkumpul dan berproliferasi. Melalui sistem limfatik dan cairan tubuh, bakteri dapat menyebar secara sistemik ke organ lain seperti ginjal, tulang, korteks serebri, serta lobus paru bagian atas. Sebagai respons pertahanan, sistem kekebalan tubuh akan memicu reaksi inflamasi di mana sel

fagosit berusaha menekan bakteri, sementara limfosit spesifik bekerja melisis bakteri beserta jaringan normal di sekitarnya. Reaksi imunologis ini menyebabkan akumulasi eksudat di dalam alveoli yang dapat berkembang menjadi bronkopneumonia. Fase infeksi awal ini umumnya bermanifestasi dalam rentang waktu 2 hingga 10 minggu setelah paparan (Mari'yah dan Zulkarnain, 2021).

Saat memasuki saluran pernapasan dan paru-paru inang, *Mycobacterium tuberculosis* memicu respons imun bawaan dan kemudian difagositosis oleh sel-sel imun utama seperti makrofag dan sel dendritik. Selanjutnya, *Mycobacterium tuberculosis* bereplikasi di dalam sel-sel tersebut seiring dengan dikerahkannya lebih banyak sel imun ke lokasi infeksi. Meskipun pada tahap ini inang memiliki kemungkinan untuk mengeliminasi Mtb sepenuhnya, pembentukan granuloma padat sering kali justru terjadi. Granuloma ini tersusun atas sel busa (*foam cells*) yang berasal dari makrofag, serta sejumlah besar sel imun nekrotik, yang berujung pada pembentukan granuloma kaseosa. Granuloma ini akan pecah dan melepaskan bakteri, sehingga memicu perkembangan TB aktif. Bakteri akan dilepaskan ke lingkungan luar sebagai percikan aerosol (*aerosol droplets*) yang infeksius, memulai kembali siklus infeksi yang baru (Yang *et al*, 2023).

1.2.3 Vaksin Rekombinan

Vaksin *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) merupakan sediaan bakteri *Mycobacterium bovis* yang telah mengalami proses atenuasi atau pelemahan. Dalam sejarah medis manusia, vaksin ini tercatat sebagai imunisasi yang paling luas penggunaannya dan hingga kini menjadi satu-satunya vaksin berlisensi yang tersedia untuk penanggulangan tuberkulosis. Kendati memiliki rekam jejak keamanan yang sangat baik selama satu abad penerapannya dalam program vaksinasi global serta berkontribusi signifikan dalam menekan angka mortalitas tuberkulosis pada populasi anak, efikasi BCG masih menjadi subjek perdebatan yang berkelanjutan. Hal ini dikarenakan perlindungan yang diberikan vaksin ini terhadap tuberkulosis paru pada orang dewasa dinilai tidak komprehensif (Okafor *et al*, 2023).

Keterbatasan proteksi tersebut disebabkan oleh adanya respons imun yang telah terbentuk sebelumnya (*pre-existing immune response*) terhadap antigen mikobakteri lingkungan, serta fakta bahwa durasi imunitas dari vaksinasi masa kanak-kanak cenderung memudar dalam kurun waktu 10 hingga 20 tahun pascavaksinasi. Merespons tantangan tersebut, berbagai upaya intensif telah dilakukan untuk mengatasi kelemahan BCG, salah satunya dengan merekayasa varian vaksin (rBCG) yang mampu mengekspresikan antigen spesifik. Strategi ini bertujuan untuk meningkatkan kemampuan priming sistem kekebalan tubuh sehingga menghasilkan imunitas yang lebih kuat dan berkelanjutan terhadap tuberkulosis. Sejumlah kandidat rBCG yang telah dikembangkan dengan melepaskan berbagai antigen spesifik ini secara umum terbukti mampu memicu respons imun yang lebih superior, dan dalam beberapa kasus, menunjukkan profil keamanan yang lebih baik dibandingkan BCG konvensional (Singh *et al*, 2021).

1.2.4 Protein CFP-10 dan sMTL-13

Culture Filtrate Protein 10 kDa (CFP-10) merupakan protein yang dikodekan oleh gen Rv 3874 yang merupakan genom bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang terletak pada lokus *Genomic Radiance of Difference 1* (RD1) yang merupakan daerah dengan berat molekul 9,5 Kbp. Protein ini membentuk kompleks heterodimerik dengan *Early Secreted Antigenic Target Protein* 6 kDa (ESAT-6). Kompleks protein ini menjadi antigen protektif atau antigen virulensi bakteri dengan terlibat dalam mediasi translokasi sitosol bikobakteri dalam makrofag inang dengan memecah membrane fagosom. Namun pada vaksin BCG, protein ini dinonaktifkan yang menyebabkan efektivitas vaksin tersebut menurun (Valizadeh *et al*, 2022).

Protein Lectin 13 kDa, atau yang dikenal sebagai sMTL-13, merupakan protein yang dikodekan oleh gen Rv 1419 dan diklasifikasikan ke dalam famili protein beta-trefoil tipe risin. Protein ini memiliki karakteristik spesifik berupa keberadaan peptida sinyal tipe Sec dan terdistribusi pada spesies yang tergabung dalam kompleks *Mycobacterium tuberculosis*. Secara fungsional, sMTL-13 bertindak sebagai lektin tipe-R yang terekspresi pada permukaan sel bakteri dan berperan penting dalam memediasi interaksi dengan makrofag inang. Dari perspektif imunologis, sMTL-13 memicu peningkatan produksi Interferon-Gamma oleh sel darah mononuklear yang berasal dari pasien tuberkulosis aktif. Selain itu, potensi imunogenik sMTL-13 semakin diperkuat oleh kemampuannya dalam menginduksi *Antigen Presenting Cells* (APC) untuk memproduksi sitokin proinflamasi, serta menstimulasi proliferasi sel limfosit T CD4⁺ (Agus *et al*, 2022).

1.2.5 Produksi Protein

Teknologi DNA rekombinan menempatkan produksi protein heterolog sebagai salah satu instrumen fundamental dalam bioteknologi modern (Rosano *et al*, 2014). Mekanisme ini berfokus pada integrasi gen asing atau transgen ke dalam suatu vektor ekspresi, yang selanjutnya diintroduksi ke dalam sel inang seperti *Escherichia coli*, ragi, maupun sel mamalia (Sambrook and Russel, 2001). Melalui modifikasi genetik tersebut, sel inang diarahkan untuk mensintesis protein spesifik yang secara biologis tidak diproduksi oleh genom aslinya. Jika dibandingkan dengan metode ekstraksi konvensional dari jaringan alami, pendekatan ini jauh lebih unggul dalam hal skalabilitas produksi serta efisiensi waktu dan biaya, tanpa mengesampingkan aspek fungsionalitas dan kemiripan struktural protein yang dihasilkan (Tripathi and Ambuj, 2019).

Secara prosedural, mekanisme produksi protein rekombinan dimulai dari konstruksi kloning dan vektor ekspresi, yaitu tahap isolasi DNA target lalu disisipkan ke dalam vektor ekspresi (plasmid) (Sambrook and Russel, 2001). Selanjutnya yaitu transformasi DNA seleksi sel inang dengan mengintroduksi vektor rekombinan ke dalam sel inang melalui proses transformasi dan diseleksi menggunakan media selektif (Khan, 2013). Sel rekombinan selanjutnya dikultur dan saat mencapai fase logaritma dilakukan proses induksi untuk mengaktifkan proses transkripsi dan translasi sehingga protein target dapat diproduksi dalam konsentrasi tinggi (Tripathi and Ambuj, 2019). Biomassa sel kemudian dipanen dengan dilisiskan menggunakan

metode sentrifugasi sehingga protein terpisah dari komparten sitoplasma. Protein yang telah dipanen kemudian dimurnikan dari komponen kontaminan melalui berbagai metode (Miralles and Antonio, 2013). Pemurnian protein dapat dilakukan dengan berbagai metode, salah satunya menggunakan lisis buffer, yaitu RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) Lysis Buffer dengan teknik pencucian yang umum digunakan dalam deteksi gen reporter, eksperimen protein kinase, immunoassay, dan pemurnian protein. Komponen utama RIPA Lysis Buffer adalah Tris (pH 7,4), NaCl, Triton X-100, natrium deoksikolat, SDS dan inhibitor protease dan fosfatase umum (seperti natrium ortovanadat, natrium fluorida dan EDTA). Buffer ini dapat digunakan untuk sampel sel atau jaringan hewan dan tumbuhan, serta sampel jamur atau bakteri (Good Laboratory Practice Bioscience, 2024).

1.2.6 SDS-PAGE

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) adalah merupakan metode identifikasi dan kuantifikasi protein yang paling disukai, adalah teknik pemisahan berdasarkan perbedaan berat molekul protein dan makromolekul lainnya. Teknik ini digunakan untuk mengisolasi satu atau lebih komponen, menentukan berat molekul suatu senyawa, dan menghilangkan kontaminan nonprotein dan agregat protein (Koshkina *et al*, 2023). Menurut Kilic *et al* (2023) menyatakan bahwa dalam SDS-PAGE, protein awalnya didenaturasi dengan deterjen anionik, SDS, dan kemudian bermigrasi sebagai respons terhadap medan listrik melalui pori-pori dalam matriks gel poliakrilamida. Sistem ini terdiri dari lapisan gel ganda, gel pemisah di mana protein dipisahkan karena berat molekulnya, dan gel penumpuk di mana protein dikonsentrasikan sebelum campuran protein masuk ke dalam gel. Komposisi dan pH gel penumpuk, gel pemisah, dan buffer elektroforesis menghasilkan sistem yang dapat memisahkan protein secara tepat relatif terhadap berat molekul spesifiknya. Kombinasi ukuran pori dan muatan, ukuran, dan bentuk protein menentukan laju migrasi. SDS-PAGE sering digunakan dalam analisis sampel biologis karena kemampuannya dalam memisahkan campuran kompleks dengan baik (Aini, 2021).

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini, yaitu:

1. Untuk melakukan produksi protein fusi rekombinan CFP-10 dan sMTL-13 dari *Mycobacterium tuberculosis* pada *Escherichia coli* BL21.
2. Untuk melakukan karakterisasi protein fusi rekombinan CFP-10 dan sMTL-13 dari *Mycobacterium tuberculosis* pada *Escherichia coli* BL21 dengan metode SDS-PAGE,

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini, yaitu hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memperoleh protein fusi rekombinan CFP-10 dan sMTL-13 yang bersifat imunogenik.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan bulan November 2025 bertempat di Laboratorium Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC), Makassar.

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan spada penelitian ini yaitu, gelas ukur, cawan petri, gelas kimia, botol Schott, tabung falcon (10 mL dan 50 mL), tabung Eppendorf (1,5 mL), sendok tanduk, rak tabung, ose bulat, elektroforesis, *autoclave*, *centrifuge*, *waterbath*, *incubator shaker*, *incubator CO2*, *freezer -80 °C*, kulkas 4 °C, *biosafety cabinet*, timbangan analitik, mikropipet dan *cooler box*.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah klon *Escherichia coli* BL21 yang membawa plasmid rekombinan CFP-10 dan sMTL-13, media LB (Luria Bertani), ampicilin 100 µg/mL, IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) 1.0 dan 1.5 mM, gel sodium dodecylsulfate (SDS) 10% (Genscript), 1X RIPA *Buffer Lysis*, *loading buffer* 1 mL, 2-Mercaptoethanol (Merck), 2X Laemmli *Sample Buffer* (BIO-RAD), Tris-MOPS-SDS *Running Buffer Powder* (Genscript), protein marker 1 mL (GenScript), larutan *blue lightning stain* (Vivantis), dekolisasi dan akuades.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Kultur Sel *Escherichia coli* BL21 yang membawa plasmid fusi rekombinan gen Rv3874 dan Rv1419

Ditumbuhkan koloni bakteri *Escherichia coli* BL21 yang membawa plasmid fusi rekombinan gen Rv3874 dan Rv1419 13 ke dalam 10 mL media LB (Luria Bertani) yang mengandung ampicilin 100 µg/mL. Diinkubasi di dalam *incubator shaker* selama 18 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 400 rpm. Kultur yang telah diinkubasi dipindahkan masing-masing sebanyak 50 µL ke dalam dua media LB (Luria Bertani) 50 mL yang mengandung ampicilin 100 µg/mL. Kultur kemudian diinkubasi di dalam *incubator shaker* selama 2.5 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 400 rpm.

2.3.2 Induksi Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

Setelah inkubasi 2.5 jam, kultur bakteri pada kedua media ditambahkan IPTG hingga konsentrasi akhir pada tabung pertama sebanyak 1 mM dan 1.5 mM pada tabung kedua. Kedua kultur kemudian di inkubasi selama 6 jam di dalam *incubator shaker* pada suhu 25°C dengan kecepatan 400 rpm, lalu dilanjutkan pada proses lisis. Sisa kultur diinkubasi kembali selama 14 jam di dalam *incubator shaker* pada suhu 25°C dengan kecepatan 400 rpm.

2.3.3 Produksi Protein Fusi Rekombinan

Kedua kultur yang telah diinkubasi selama 6 jam dan 20 jam, disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 4000 rpm, supernatan dibuang.

Pelet kemudian ditambahkan 1X RIPA *Lysis Buffer* sebanyak 1 mL dan dihomogenkan, lalu dipindahkan sebanyak 500 μ L di dalam tabung Eppendorf. Suspensi disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 14000 rpm, diambil supernatan 50 μ L. Supernatan ditambahkan campuran 2X Laemmli *Sample Buffer* (950 μ L) dan 2-Mercaptoethanol (50 μ L) sebanyak 50 μ L dan diwaterbath selama 5 menit pada suhu 95°C.

2.3.4 Karakterisasi Protein dengan Metode SDS-PAGE

Dimasukkan running buffer ke dalam rangkaian elektroforesis. Sampel sebanyak 20 μ L dimasukkan ke dalam sumur Gel SDS-Page serta marker sebanyak 20 μ L. Kemudian dielektroforesis selama 2 jam dengan ketegangan 120 Volt. Gel kemudian dikeluarkan dari kaca penyangga dan diberikan cairan blue lightning stain dan di inkubasi di atas *shaker* selama 15 menit dalam keadaan gelap. Selanjutnya di bilas dengan air bersih, lalu diberikan cairan decolorisasi dan diinkubasi selama overnight di atas shaker dalam keadaan gelap. Pita yang terlihat dicocokkan dengan marker dan didokumentasikan.