

ILMU KEDOKTERAN

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING XV-I



22 FEB 2008

0800476

**KLONING DAN EKSPRESI GEN PENYANDI ANTIGEN 78 DARI  
*Mycobacterium tuberculosis*  
SECARA SISTIM HETEROLOG**

**Ketua: Sumarno**

**Anggota :**

1. Tri Yudani MR
2. Diana Lyrawati
3. Samsul Islam

**Dibiayai oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat  
Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penugasan Penelitian  
Desentralisasi**

**Nomor: 017/SP2H/PP/DP2M/III/2007  
Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi  
Departemen Pendidikan Nasional**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
NOPEMBER 2007**

**HALAMAN PENGESAHAN  
LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING XV-1**

1. Judul Penelitian : **KLONING DAN EKSPRESI GEN PENYANDI  
ANTIGEN 78 *Mycobacterium tuberculosis* SECARA  
SISTIM HETEROLOG**

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap dan Gelar : Prof. DR.dr. Sumarno, DMM, SpMK  
 b. Jenis Kelamin : L  
 c. Nip : 130 809 130  
 d. Jabatan fungsional : Staf Pengajar  
 e. Jabatan Struktural : KPS Biomedik, Ka. Lab Biomedik  
 f. Bidang Keahlian : Mikrobiologi, Immunologi  
 g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran/ Lab. Mikrobiologi  
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Brawijaya, Malang  
 i. Tim Peneliti

NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.Tri Yudani MR, MAppSc, PhD	mikrobiologi, biologi molekuler	Kedokteran/Lab.Biokim-Biomol	UNBRAW
2.Diana Lyrawati, MS, PhD	biologi molekuler	Kedokteran/Lab.Farmasi	UNBRAW
3.Dr.dr.Samsul Islam, SpMK, MS	mikrobiologi	Kedokteran/Lab. Mikrobiologi	UNBRAW

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka Waktu penelitian yang diusulkan : 3 tahun  
 b. Biaya total yang diperlukan : Rp 150.000.000,-  
 c. Biaya yang disetujui th 2007-10-27 : Rp 33.000.000,-

Mengetahui  
Dekan/PDI/PDII/PDIII  
Fakultas Kedokteran

Malang, 27 okt 2007  
Ketua Peneliti,



(Prof. DR.dr. Sumarno, DMM, SpMK)  
NIP 130 809 130

Menyetujui  
Ketua Lembaga Penelitian  
Universitas Brawijaya  
Prof. Dr. Ir. Syamsulbahri, MS  
NIP. 130 935 096

## RINGKASAN DAN SUMMARY

Antigen 78, protein dari *Mycobacterium tuberculosis* merupakan antigen yang dengan berat molekul 38kDa yang memiliki spesifisitas tinggi (95%). Untuk memproduksi dalam jumlah yang besar secara konvensional, beberapa kendala yang harus dihadapi: fasilitas laboratorium dengan kriteria BSL3 yang sangat mahal, menurunnya aktivitas setelah purifikasi. Untuk itulah tim kami melakukan studi kemungkinan menghasilkan antigen secara rekombinan.

Dalam penelitian ini dilakukan kloning gen *pab* yang mengkode antigen 38 dari *M. tuberculosis* dan diekspresikan secara sistem heterolog di *Escherhia coli*. Segmen DNA antigen 38 diperoleh dengan cara mengamplifikasi DNA genom *M. tuberculosis* menggunakan polymerase chain reaction (PCR). Bakteri yang dipergunakan merupakan isolat liar, hasil biakan pasien TBC di Batu-Malang. Sebuah pita dengan besar 900bp dipurifikasi dan diligasikan ke vektor pGmT. pGemT kemudian ditransformasikan ke *E. coli* DH5 $\alpha$  untuk mengecek sequensnya. Seleksi koloni-koloni yang berwarna putih dilakukan dimedia selektiv dengan X-gal. Sequensing segmen *pab* dilakukan dengan 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Analisa rangkaian DNA klon memperlihatkan homologi sebesar 95% dengan sequens *M. tuberculosis* H37Rv yang telah dipublikasikan. Klon ini kemudian digunakan untuk membuat konstruk ekspresi *pab* dengan system ekspresi pRoExHT dan selanjutnya ditransformasikan ke into *E. coli* DH5 $\alpha$ . Klon-klon yang dihasilkan dicek dengan PCR dan sequencing.

## PRAKATA

Dengan mengucapkan syukur kepada Allah SWT atas karuniaNya sehingga bisa selesaikannya penelitian ini. Penelitian dengan judul „Kloning dan ekspresi gen penyandi antigen 78 dari *Mycobacterium tuberculosis* secara sistim heterolog“ bukan merupakan penelitian yang mudah bagi kami. Karena pertama kali inilah di Fakultas Kedokteran berhasil membuat klon yang berasal dari prokariot.

Kami mengucapkan terimakasih kepada beberapa pihak yang sudah membantu terlaksananya penelitian ini :

1. Pemerintah yang telah memberikan dana ini sehingga memungkinkan kami melakukan penelitian.
2. Prof. dr. Sangkot Marzuki, PhD, Kepala Lembaga Penelitian Eijkman yang telah memerikin ijin kami untuk menggunakan fasilitas serta bahan kimianya bagi berlangsungnya penelitian ini.
3. Teman-teman dan asisten dari Lembaga Eijkman yang banyak membantu kami selama penelitian berlangsung baik bantuan informasi, diskusi ilmiah serta barang2 molekuler.

Hasil penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan, maka kritik yang membangun dan saran akan kami terima dengan tangan terbuka.

tertanda  
penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	i
<b>A. LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	
RINGKASAN DAN SUMMARY .....	ii
PRAKATA .....	iii
DAFTAR ISI .....	iv
DAFTAR GAMBAR .... ..	v
BAB I.PENDAHULUAN .....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	2
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	6
BAB IV. METODA PENELITIAN.....	8
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	10
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	16
DAFTAR PUSTAKA.....	17
LAMPIRAN	
(Termasuk instrument penelitian, personalia tenaga peneliti beserta kualifikasinya, dll)	
<b>B. DRAFT ARTIKEL ILMIAH</b>	
<b>C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN</b>	

## DAFTAR GAMBAR

	<b>hal</b>
Gb.1. Hasil amplifikasi segmen <i>pab</i> dari chromosome <i>M. tuberculosis</i> .....	14
Gb 2. Hasil transformasi pGEmTeasy/tb1 dengan <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	15
Gb 3. Test PCR beberapa koloni <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ / MB38 .....	15
Gb 4. Hasil transformasi pRoExHtc/tb1 dengan <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	16

## BAB I PENDAHULUAN

Salah satu penyebab tingginya angka kematian pasien penyakit TBC di negara berkembang adalah lambatnya diagnosa dan kurang akuratnya hasil diagnosa (Cheng *et al.*, 2005). Sampai saat ini uji laboratorium standar untuk menegakkan diagnosa definitif TBC dilakukan melalui pengecatan BTA. Namun metoda ini sensitifitas serta spesifisitasnya rendah, sehingga sering terjadi false positif. Oleh karena itu berbagai tes serologis seperti deteksi antigen atau antibodi mulai dijadikan alternatif. Beberapa pengembangan tes serodiagnostik menggunakan bahan ekstrak antigen langsung dari *Mycobacterium tuberculosis* seperti PPD, filtrat kultur dan hasil sonikasi untuk ELISA. Namun, timbul masalah karena antigen hasil sekresi *M. tuberculosis* sering kehilangan sensitivitas dan spesifisitas selama dalam proses pemurnian (Devi *et al.*, 2001).

Protein 78 atau nama lainnya antigen 38 atau Ag38 merupakan antigen yang potensial untuk dikembangkan sebagai agen diagnostik karena spesifisitasnya tinggi (95%). Akan tetapi, terutama di negara berkembang, untuk memproduksinya, ada beberapa: dibutuhkan fasilitas ekstra untuk keamanan laboratorium, sulitnya identifikasi dan purifikasi konstituen sel serta menurunnya aktifitas antigen setelah dipurifikasi.

Berdasar permasalahan diatas, dalam penelitian ini dipelajari pengembangan antigen rekombinan dengan cara mengklon gen *pab*, mengkode protein 78 dari *M. tuberculosis* dan mengekspresikannya secara heterolog pada *Escherichia coli*.

Tahun pertama penelitian difokuskan pada konstruksi plasmid rekombinan pembawa gen *pab*. Gen ini diamplifikasi dari genom *M. tuberculosis* melalui PCR, kemudian diklonkan pada vektor plasmid pGemTeasy dan diekspresikan di dalam sistem *E. coli*. Koloni yang membawa gen penyandi antigen diseleksi pada medium selektif. Untuk memastikan bahwa plasmid pada *E. coli* membawa gen *pab* dilakukan pengecekan panjang gen serta arah transkripsi gen melalui PCR dan tes restriksi. Koloni yang berwarna putih yang didapatkan kemudian dikulturkan dan plasmidnya diisolasi. Selanjutnya gen *pab* akan di"rekonstruksi" pada plasmid lain yang membawa sistem ekspresi untuk diekspresikan.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Tuberculosis dan sistim penanganan di negara berkembang**

Tuberculosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh *M. tuberculosis* yang masuk dan kemudian menyebar dalam tubuh manusia melalui saluran getah bening, pembuluh darah, pernapasan dan pencernaan serta secara langsung menyerang organ dan jaringan tubuh. Setiap tahun lebih dari 3 juta orang dari seluruh dunia meninggal karena penyakit TBC. Penyakit ini mempunyai tingkat infeksi yang sangat tinggi. Efek timbal balik antara inang dalam hal ini manusia dan *M. tuberculosis* sangat kompleks, sebagian berasal dari virulensi strain bakteri, tapi juga dari resistensi spesifik dan tidak spesifik inang (Madigan *et al.*, 2000).

Tingginya angka kematian pasien penyakit TBC di negara berkembang merupakan gabungan akibat buruknya sanitasi tempat tinggal serta penanganan pasien yang kurang mendukung yaitu lambatnya diagnosa dan kurang akuratnya diagnosa sehingga penanganan menjadi terlambat ataupun kurang tepat (Cheng *et al.*, 2005). Metoda laboratorium yang biasa digunakan untuk diagnosis definitif TBC adalah pengamatan mikroskopis pada sputum pasien TBC dengan metoda smear Ziehl-Neelsen atau uji mikrobiologis dengan pembiakan *M. tuberculosis*. Walaupun demikian, metoda smear secara langsung kurang sensitif dan bahkan hasilnya sering negatif. Sedangkan metoda kultur membutuhkan waktu yang lama (8 hari). Tes cepat seperti polymerase chain reaction (PCR), walaupun sensitif, tapi biayanya sangat mahal sehingga tidak terjangkau oleh masyarakat dan tidak tersedia pada kebanyakan rumahsakit. Oleh karena itu berbagai tes serologis seperti deteksi antigen atau antibodi dalam sampel telah banyak dikembangkan. Beberapa antigen telah dievaluasi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agen diagnostik yang digunakan untuk mendeteksi antibodi yang terbentuk (Woods, 2001 and Anonyme, 1997).

#### **2.2. Pengembangan antigen**

*Mycobacterium tuberculosis* mengandung sejumlah komponen yang secara kimia berbeda yang mempunyai peran dalam interaksi antara mycobacteria patogen dan



komponen dari system imunitas tubuh inang. Pemilihan terhadap antigen dan penelitian untuk pengembangannya harus dibuat berdasar pada kapasitas mereka dalam berinteraksi dengan suatu komponen yang dihasilkan oleh respon imunitas selama infeksi baik secara alamiah ataupun imunisasi (proteksi aktif atau patogenitas). Meningkatnya resistensi terhadap strain *M. tuberculosis* diperoleh secara percobaan setelah sebelumnya dilakukan imunisasi dengan *Mycobacteria* hidup yang sudah dilemahkan. Sebaliknya jika yang diberikan bakteri yang sudah mati, maka hanya diperoleh proteksi yang sangat rendah. Dari sinilah timbul konsep adanya peran antigen yang disekresikan secara aktif dalam imunitas protektif dan beberapa artikel menyebutkan suatu peningkatan proteksi sampai batas tertentu setelah dilakukan imunisasi dengan antigen yang disekresikan ( Laquererie *et al*, 1995).

Beberapa usaha telah dilakukan untuk membuat tes serodiagnostik menggunakan bahan ekstrak antigen langsung dari *Mycobacterium tuberculosis* seperti PPD, filtrat kultur dan hasil sonikasi untuk ELISA. Namun, metode demikian mempunyai beberapa kelemahan antara lain dalam spesifisitas dan sensitivitas. Antigen yang diperoleh dari kultur *M. tuberculosis* langsung umumnya sulit dijamin keseragaman mutunya terutama dalam hal kemurnian, jumlah kandungan antigen per ml filtrat dan sensitivitasnya. Hasil purifikasi dari kultur *M. tuberculosis* seringkali kehilangan sensitivitas dan spesifisitas selama dalam proses pemurnian (Devi *et al.*, 2001). Perkembangan selanjutnya, dalam rangka mengembangkan tes diagnostic dan vaksin, beberapa antigen permukaan mycobacteria banyak ditemukan (Young *et al.*, 1990). Dari beberapa antigen tersebut, suatu lipoprotein yang dikenal sebagai protein 38 kDa banyak mendapat perhatian (Harboe and Wiker, 1992). Protein 38 kDa ini dideteksi hanya pada *M tuberculosis* (Kadival *et al*, 1987) dan mempunyai immunogenisitas yang kuat (Haslov *et al.*, 1992). Hasil cloning dan sekuensing menunjukkan adanya kesamaan sekuens 30% dengan protein pengikat fosfat dari *Escherichia coli* (Andersen dan Hansen, 1989) dan mungkin berperan dalam metabolisme fosfat (Chang *et al.*, 1994; Andersen *et al.*, 1990). Protein ini dikembangkan oleh banyak peneliti untuk pembuatan vaksin dan alat imunodiagnostik, dan beberapa sudah dijual komersial untuk pemakaian di klinik, namun harganya relatif mahal (Sugiri, 2004).

### 5.3.Studi Pendahuluan

Penelitian terhadap hasil sekresi *M. tuberculosis* pada pasien yang sedang sakit menunjukkan beberapa protein antigen yang mempunyai sifat imuno protektif. Analisa lebih teliti berhasil mengidentifikasi interaksi spesifik antara protein tersebut dengan system imunitas inang yang memperlihatkan sejumlah protein dengan berbagai berat molekul dan sifat biokimia yang berbeda: protein 71, 65 and 12 kilodaltons (kDa) merupakan keluarga heat shock. Protein 30 kDa merupakan antigen yang paling banyak disekresikan yang terikat pada fibronectin. Antigen dengan berat molekul 38 kD and 19 kD mungkin merupakan lipoprotein yang mempunyai peran dalam transport nutrient (Chang *et al.*, 1994), sementara antigen 23 kDa adalah enzyme superoxide dismutase (Young *et al.*, 1991).

Di fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya telah dilakukan penelitian terhadap sekresi *M. tuberculosis* dari isolat lokal. Sugiri (2004) memperlihatkan beberapa protein dengan kisaran berat molekul dari 35 kDa – 70 kDa dari kultur filtrat *M. tuberculosis*. Dari uji serologis yang dilakukan dengan ELISA, diketahui bahwa antigen 52 kDa yang merupakan polimer dari antigen 35 kDa memberikan sensitifitas cukup tinggi (95%) namun dengan spesifitas yang rendah (27%).

Dari beberapa protein ekstraselluler tersebut diatas, antigen 38 kDa *M. tuberculosis* merupakan protein yang memperlihatkan reaksi imunitas paling tinggi dengan spesifisitas 95% (Chang *et al.*, 1994, Haslov *et al.*, 1992). Kloning dan sequence dari gen penyandi protein 78 menemukan bahwa 30% dari rangkaian DNANYa identik dengan protein pengikat phospat (PBP atau sering disebut dengan PstS atau PhoS) dari *E. coli* (Andersen dan Hansen, 1989). Berdasarkan spesifisitas yang tinggi, maka protein ini kemudian diproduksi menjadi antigen yang dikenal dengan nama protein antigen B (Pab), antigen 5, antigen 78 dan protein 38-kDa (Laquererie *et al.*, 1994).

Penelitian mengenai protein 78 yang berasal dari isolat lokal masih tetap terbuka, karena kebanyakan meneliti dari sisi imunologinya. Hasil studi menggunakan Western Blot isolat *M. tuberculosis* dari pasien di Indonesia (Malang dan sekitarnya) menunjukkan adanya ekspresi protein 38 kDa ini (Tandya, 2005). Beberapa peneliti lain dengan menggunakan *M. tuberculosis* strain laboratorium atau dari daerah selain

Indonesia (Dasgupta *et al.*, 2003; Devi *et al.*, 2001; de Franseca *et al.*, 2001) yang mungkin berbeda dengan isolat *M. tuberculosis* yang ada di pasien di Indonesia.

Sejauh ini sudah ada beberapa antigen mikobakterium baik dalam bentuk murni maupun murni yang dijual di pasaran seperti antigen-60 (Anda-TB), 38 kDa (*Pathozyme Myco, Omega Diagnostic UK*) dan 16 kDa *Recombinant antigen (Pathozyme TB complexplus)*. Semuanya merupakan antigen impor, sehingga harga yang menjadi tidak terjangkau oleh pasien TBC yang kebanyakan berasal dari masyarakat lapisan bawah. Akibatnya sampai saat imunisasi yang digunakan di Indonesia juga masih tetap dengan BCG, yang diketahui paling sedikit memproduksi protein ekstraselluler. Dengan demikian juga memberikan proteksi tubuh sangat rendah.



### BAB III

#### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Pengembangan antigen di negara berkembang selama ini menghadapi berbagai kendala: *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai tingkat infeksi sangat tinggi dan mudah menular, sehingga dibutuhkan fasilitas ekstra untuk melindungi pekerja serta pencegahan keluarnya bakteri dari lokasi pembiakan (Madigan *et al*, 2000). Masalah lain adalah sulitnya identifikasi dan purifikasi konstituen sel secara langsung karena kompleksitas struktur sel *M. tuberculosis*. Lebih lanjut, seringkali terjadi penurunan aktifitas antigen setelah dipurifikasi, bisa jadi disebabkan karena antigen target telah terkontaminasi dengan protein lain pada saat pemurnian ataupun karena proses pemurnian yang terlalu panjang sehingga sebagian antigen sudah terdenaturasi (Cohen *et al*, 1987)

Penelitian yang akan dilakukan oleh tim peneliti dari Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran berkenaan dengan studi kemungkinan memproduksi antigen rekombinan. Dalam hal ini dari keseluruhan komponen sel *M. tuberculosis* hanya gen penyandi antigen 38 kDa yang akan dijadikan focus penelitian. Gen ini akan diisolasi dan kemudian diekspresikan pada *E. coli*. Keberhasilan penelitian ini akan menawarkan beberapa solusi bagi masalah di atas:

1. Dengan mengklon gen pengkode antigen target, diharapkan akan lebih mudah dalam melakukan isolasi satu protein saja, dibanding bila isolasi dilakukan langsung dengan mengekstrak satu protein dari ratusan protein dan komponen lain hasil sekresi *M. tuberculosis* dalam filtrat kultur.
2. Pemilihan inang *E. coli* sebagai pengganti pembiakan *M. tuberculosis* menghindarkan bahaya infeksi dari TBC, karena *E. coli* merupakan bakteri penghuni usus pada tubuh manusia. Oleh karena itu resiko infeksi tidak ada, dengan demikian biaya yang diperlukan untuk pembangunan fasilitas ekstra untuk pengkulturan dan pembiakan bakteri juga bisa dikurangi.
3. Karena yang diklonkan hanya gen target, maka hasil ekspresi utama dari bakteri adalah protein target. Dengan cara ini diharapkan bahwa eksploitasi produk bisa lebih maksimal. Hal ini didasarkan pada beberapa penelitian sebelumnya yang



menunjukkan bahwa dengan system heterolog, protein yang diekspresikan dibawah kontrol promoter yang kuat mampu menghasilkan 10% dari total protein yang disekresikan (Singh *et al.*, 1992).

4. Diproduksinya antigen rekombinan dari strain lokal, memungkinkan peningkatan spesifikasi antigen terhadap antibodi pasien yang berasal dari lokal pula. Dengan demikian manfaatnya bisa langsung dirasakan oleh masyarakat. Digunakannya isolat *M. tuberculosis* dari pasien di Indonesia, dengan harapan agar hasilnya lebih sesuai dan dapat diaplikasikan untuk diagnosis tuberkulosis pada pasien di Indonesia.

5. Hasil kloning dan ekspresi ini kemudian masih bisa dikembangkan lebih jauh dengan teknik rekayasa DNA, misalnya dengan penggunaan promoter yang lebih baik (Harth *et al.*, 1997); dan segera berespon poten terhadap stimulus ekspresi, atau dengan melakukan site directed mutagenesis untuk memperoleh protein 38 kDa hasil rekayasa dalam jumlah besar (produksi) dan sensitif serta spesifik untuk serodiagnostik ELISA.

## BAB IV

### METODA PENELITIAN

#### 4.1. Desain penelitian

Desain penelitian adalah observasi laboratorium.

Pada tahun pertama, target penelitian adalah isolasi gen *pab* dari penderita TBC yang dirawat di rumah sakit di Malang, amplifikasi segmen gen langsung dari kromosom DNA dan pembuatan konstruk vektor plasmid pembawa gen pengkode protein antigen 78. Pada tahun kedua diperoleh transforman *E. coli* yang mengandung plasmid rekombinan dan rekonstruksi plasmid vektor pembawa gen antigen 78 kepada plasmid yang mempunyai sistem ekspresi. Pada tahun ketiga dilakukan ekspresi gen *M. tuberculosis* secara heterolog di *E. coli*, purifikasi protein rekombinan, pembuatan antibodi monoklonal dan uji serologis (sensitivitas dan spesifisitas) antigen rekombinan melalui analisa ELISA.

#### 4.2. Isolasi gen *pab* dari kromosom *M. tuberculosis*

Kromosom DNA berasal dari kultur *M. tuberculosis* merupakan hasil isolasi dari sputum penderita TBC yang dirawat di rumah sakit Syaiful Anwar, Malang. Dua oligonukleotida dipakai untuk memperbanyak gen struktural penyandi protein 78 dari DNA genom *M. tuberculosis* dengan bantuan PCR (polynucleotide chain reaction). Penetapan 2 macam oligonukleotida didasarkan dari penelitian sebelumnya.

Primer 1: pabF224 (5'-GGCGGCCATGGGCTCGAAACCACCGAGCGG-3') mengandung sisi restriksi Nco I dan menempel pada nukleotida pada posisi 72 sampai 102 dimulai dari residu A dari kodon start methionin ATG.

Primer 2: pab1342 3' (5'-CCAGCAGGATCCGCAAAGCAGCCCGATGGC-3') terletak downstream dari kodon stop, mengandung sisi restriksi BamHI dan menempel pada nukleotida pada posisi +1.002 sampai +974 dihitung dari kodon start ATG.

#### **4.3. Konstruksi vektor plasmid pMB38**

Produk hasil amplifikasi dari PCR kemudian dipurifikasi ligasi dengan pGemTeasy yang sebelumnya sudah dipotong dengan enzim yang sama. Vektor dan gen yang akan diklon dicampur jadi satu dalam buffer, ditambah dengan enzim T4 DNA ligase dan kemudian diinkubasikan pada 16°C. Hasil ligasi selanjutnya dinamai pBM38 (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **4.4. Skrening klon *Escherichia coli*/ pMB38**

pBM38 ditransformasikan ke *E. coli* DH5 $\alpha$  dengan metode heatshock (Sambrook *et al.*, 1989) dan kemudian ditumbuhkan pada media LB (Luria broth) yang mengandung X-gal dan IPTG (Ausubel *et al.*, 1997). Klon positif dicirikan dengan warna putih sedangkan koloni yang tidak membawa gen berwarna biru. Klon yang berwarna putih kemudian dipindahkan ke media baru untuk dilakukan pemurnian.

#### **4.5. Transformasi plasmid pMB38 pada *E. coli* DH5 $\alpha$**

Klon *E. coli* DH5 $\alpha$ /pBM38 yang berwarna putih, dikulturkan kemudian dilakukan sequencing pada gen *pab*.

#### **4.6. Transformasi plasmid pada *E. coli* DH5 $\alpha$**

Fragmen DNA yang sudah disequencing kemudian diligasi dengan vektor yang membawa sistem ekspresi pRoExHTc. Seleksi klon dilakukan pada media LB yang ditambah dengan antibiotik dan IPTG.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pada penelitian kali ini, secara umum bisa dikatakan bahwa tidak ada hambatan teknis yang menyebabkan gagalnya penelitian. Bahkan sebaliknya, karena beberapa penelitian untuk tahap selanjutnya sudah sebagian dikerjakan. Hal ini disebabkan pengerjaan eksperimen dilakukan di Lembaga Penelitian Eijkman, yang mempunyai fasilitas untuk bidang molekuler. Selain itu kita bisa membeli dari mereka dalam jumlah kecil sehingga bisa mengirit biaya penelitian.

**5.1. Isolasi gen pengkode protein antigen 78 dari kromosom *M. tuberculosis* dengan menggunakan PCR**

Amplifikasi segmen gen *pab* dilakukan langsung dari khromosom *M. tuberculosis* dengan metoda Polymerase Chain Reaction (PCR). Walaupun pada awalnya mengalami kesulitan karena terkadang didapatkan beberapa pita yang nonspecific, tetapi dengan perubahan temperatur kemudian pita yang dimaksud tidak ada sama sekali. Akan tetapi melakukan optimasi maka akhirnya diperoleh 1 pita sesuai dengan yang diharapkan yaitu 900 bp (gambar 1). Segmen DNA yang selanjutnya diberi nama tb1 ini memang lebih pendek dari gen *pab M. tuberculosis* 37Rv, hal ini disebabkan karena primer 1 tidak menempel pada kodon 1 gen *pab*, tetapi dimulai dari kodon 72. Hal ini dikarenakan Cys<sup>1</sup> sampai Ala<sup>20</sup> mengkode sisi dari penempelan lipolyl bagi protein yang ditransportasi ke periplasm (Young and Garbe, 1990). Sedangkan konstruk ini didesign dengan tujuan agar protein tidak ditransport ke periplasma ataupun menempel pada membran luar sel melalui rangkaian beberapa asam amino lipolil .

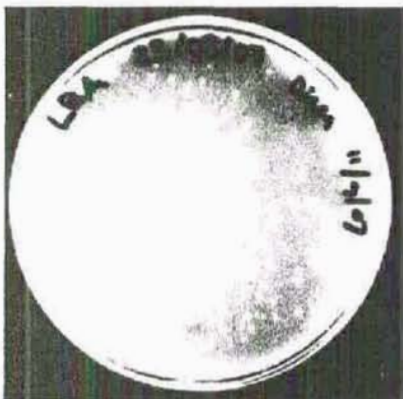




Gambar.1. Hasil amplifikasi segmen *pab* dari chromosome *M. tuberculosis*

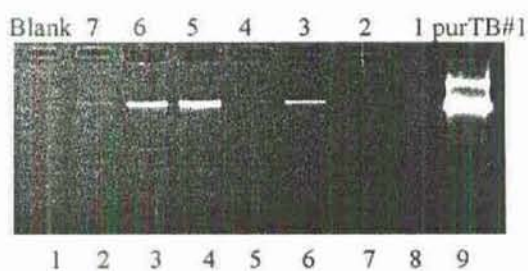
### 5.2.Pembuatan konstruk vektor plasmid pMB38

Ada dua macam vektor plasmid yang dipergunakan dalam penelitian ini. Sebagai perantara untuk bisa mengecek benar tidaknya sequence digunakan pGemTeasy. Plasmid ini sangat tepat bagi tujuan cloning dan kemudian screening hasil klon dengan perubahan warna koloni apabila ditumbuhkan dalam media yang ditambahkan X-gal didalamnya. Ekspresi gen berada dibawah kontrol promoter T7. Sedangkan untuk system ekspresi dipergunakan pRoExHTc. Hasil ligasi antara *tb1* dan pGemTeasy menghasilkan plasmid yang sekanjutnya disebut dengan pMB38. Transformasi pMB38 pada *E. coli* DH5 $\alpha$ /pBM38 menghasilkan 120 klon. Setelah ditunggu beberapa jam untuk meyakinkan bahwa koloni yang putih memang putih, maka didapatkan 100 koloni berwarna putih, sedangkan sisanya berwarna biru (gambar 2).



Gambar 2. Hasil transformasi pGemTeasy/*tb1* dengan *E. coli* DH5 $\alpha$

Tujuh koloni putih kemudian di cek dengan PCR dan empat koloni membawa gen *tb1*. (gambar 3). Empat koloni dinyatakan positif membawa gen *tb1*. Klon 5 dipilih untuk diperbanyak dan disequencing. Hasil sequencing pertama tidak begitu bagus karena peak dari masing2 nucleotida terlalu rapat sehingga tidak bisa dibaca (data tidak diperlihatkan). Kemudian dilakukan pengulangan. Pada kesempatan kali ini sequencing dilakukan dari dua arah yaitu 5'-3' dan dari 3'-5'. hasil sequencing memperlihatkan homologi dengan gen *pab M. tuberculosis* yang sudah dipublikasikan sebesar 99% (gambar 4). Radiogram dari Sequencing bisa dilihat di Lampiran 1.



Gambar 3. Test PCR dari beberapa koloni (1-7). Koloni 3,5,6 dan 7 positif membawa gen *tb1*. Kolom 1. kontrol negatif, 2-8 koloni 1-7 yang dites. 9. *tb1*.

### 5.3.Rekonstruksi vektor plasmid pMB38 menjadi pMBhis

Fragmen DNA dari klon 5 yang sudah disequencing kemudian diligasi dengan vektor pRoExHTc. Plasmid ini berada dibawah kontrol promotor yang kuat sehingga diharapkan mampu mengekspresikan protein dan sangat kuat. Plasmid juga dilengkapi dengan rangkaian 6x histidin yang memudahkan pada proses purifikasi protein yaitu dengan kolom Ni-NTA. Hasil ligasi selanjutnya disebut dengan pMBhis dan ditransformasikan ke *E. coli* DH5 $\alpha$ . Sebanyak 50 transforman berwarna putih dihasilkan (Gambar 4). Setelah dilakukan pengecekan melalui PCR, ada beberapa klon yang positif membawa gen *tb1*.



```

Query 422 TCCGCTGCACCGCTCCGACGGGTCCGGTGACACCTTCTTGTTACCCAGTACCTGTCCAA 481
          |||
Sbjct 694 TCCGCTGCACCGCTCCGACGGGTCCGGTGACACCTTCTTGTTACCCAGTACCTGTCCAA 753

Query 482 GCAAGATCCCAGGGCTGGGGCAAGTCGCCC GGCTTCGGCACCACCGTCGACTTCCC GGC 541
          |||
Sbjct 754 GCAAGATCCCAGGGCTGGGGCAAGTCGCCC GGCTTCGGCACCACCGTCGACTTCCC GGC 813

Query 542 GGTGCCGGGTGCGCTGGGTGAGAACGGCAACGGCGGCNTGGTGACCGGTTGC 593
          |||
Sbjct 814 GGTGCCGGGTGCGCTGGGTGAGAACGGCAACGGCGGCATGGTGACCGGTTGC 865

```



Reverse sequence:

> gb|M30046.1|MSGPABA *M.tuberculosis* protein antigen b (Pab) gene, complete cds  
Length=1993

Score = 1077 bits (583), Expect = 0.0  
Identities = 591/597 (98%), Gaps = 1/597 (0%)  
Strand=Plus/Minus

```
Query 7      GGTC-ACGAGGCTAGCTGGAAATCGTCGCGATCAACGCGTCANACAACTTCACCACCGCG 65
          ||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 1287    GGTC AACGAGGCTAGCTGGAAATCGTCGCGATCAACGCGTCAGACAACTTCACCACCGCG 1228

Query 66     GGGCGGCAGCGGCTGGAAATGAACCTGGTCGAGGAACGAGGCCTTGTGCGCGTGGTGATC 125
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 1227    GGGCGGCAGCGGCTGGAAATGAACCTGGTCGAGGAACGAGGCCTTGTGCGCGTGGTGATC 1168

Query 126    GCCCAGTGCANAAATGCCTGCAAGGTCTGCGCGGTGGCGGCCTCTTTGCGCGTGTGTG 185
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 1167    GCCCAGTGCAGAAATGCCTGCAAGGTCTGCGCGGTGGCGGCCTCTTTGCGCGTGTGTG 1108

Query 186    ACGATGGCGTACTCGTAGTTGATGATCGGGTAGCCGTCGGGGCGGGCCCGTCGATCATC 245
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 1107    ACGATGGCGTACTCGTAGTTGATGATCGGGTAGCCGTCGGGGCGGGCCCGTCGATCATC 1048

Query 246    GAAATCGCCTGGTTCGCCGGGGTTTTTCGATGCGAAGCCAGCCGCCGCGGCCTGAATGCTT 305
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 1047    GAAATCGCCTGGTTCGCCGGGGTTTTTCGATGCGAAGCCAGCCGCCGCGGCCTGAATGCTT 988

Query 306    TGCCGCTCGGGCAACAAGAAATGCCAGAGCTATTGCCTAGTTGGGCTCGCCGAGTCCC 365
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 987     TGCCGCTCGGGCAACAAGAAATGCCAGAGCTATTGCCTAGTTGGGCTCGCCGAGTCCC 928

Query 366    CGTTGACTGGCCTGNTCNAGGAAGCTGATGCCGATATAGGCCACGCAGCCCGGTGTCTCG 425
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 927     CGTTGACTGGCCTGGTTCGAGGAAGCTGATGCCGATATAGGCCACGCAGCCCGGTGTCTCG 868

Query 426    GCGCAACCGGTCACCATGCCGCCGTTGCCGTTCTACCCAGCGCACCCGGCACC GCCGGG 485
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 867     GCGCAACCGGTCACCATGCCGCCGTTGCCGTTCTACCCAGCGCACCCGGCACC GCCGGG 808

Query 486    AAGTCGACGGTGGTGCCGAAGCCGGGCGACTTGCCCCAGCCCTCGGGATCTTGCTTGGAC 545
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 807     AAGTCGACGGTGGTGCCGAAGCCGGGCGACTTGCCCCAGCCCTCGGGATCTTGCTTGGAC 748

Query 546    AGGTACTGGGTGAACAAGAAGGTGTCACCGGACCCGTCGGANCGGTGCAGCGGAACT 602
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 747     AGGTACTGGGTGAACAAGAAGGTGTCACCGGACCCGTCGGAGCGGTGCAGCGGAACT 691
```

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian pendahuluan mengenai kloning and ekspresi gen *pab* pengkode antigen 78 ini diperoleh beberapa kesimpulan:

1. Berhasilnya kloning dan ekspresi gen *pab* dari *M. tuberculosis* pada *E. coli* DH5 $\alpha$  dengan sistem heterolog.
2. Rangkaian DNA *M. tuberculosis* yang diisolasi dari pasien TBC di Malang menunjukkan homologi yang sangat tinggi dengan *M. tuberculosis* yang sudah dipublikasikan. Ada harapan yang tinggi bahwa protein yang dihasilkan juga mempunyai karakter yang sama pula dengan antigen 78.

0800476

#### SARAN

Penelitian ini merupakan studi awal dan merupakan penelitian pertama yang dilakukan di Indonesia untuk memproduksi antigen rekombinan. Namun demikian karena studi berbasis molekuler sangat mahal biayanya. Kalau pada penelitian kali ini biaya bisa ditekan, itu karena kita mengerjakannya di Lembaga Penelitian Eijkman yang sudah memiliki fasilitas lengkap termasuk bahan kimia. Dengan demikian kita tidak harus membeli dalam jumlah banyak. Namun demikian, yang kita butuhkan juga agar bagaimana penelitian yang berkualitas bisa dilakukan di institusi sendiri. Dari sini memang dibutuhkan suatu komitmen yang serius dari Lembaga terkait seperti fakultas dan LEMLIT untuk membantu penelitian seperti ini sampai tuntas sehingga hasilnya pun bisa dinikmati oleh masyarakat.

## DAFTAR PUSTAKA

- American thoracic Society workshop. 1997. Rapid diagnostic tests for tuberculosis: what is the appropriate use? *Am J Respir Crit Care Med* 155:1804-1814
- Andersen, A.B., Ljungqvist, L., and Olsen, M. 1990. *J. Gen. Microbiol.* 136:477-480.
- Andersen, A.B., dan Hensen, E.B. 1989. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38.000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infret. Immun.* 57, 2481-2488.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Sminth, J.A., dan Struhl, K. 1997. *Current Protocols in molecular biology*, J. Wiely and Sons, Inc.
- Chang, Z., A, Choudary., R Lathigra., dan Quiocho, FA., 1994. The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a Phosphate-binding Protein *J Biol Chem* 269 (3) 1956-68
- Cheng, V.C.C., W.W, Yew., dan K.Y. Yuen. 2005. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:711-720
- Cohen, M.L, L.W. Mayer., H.S, Rumschlag., M.A. Yakrus., W.D. Jones., dan Good, R.C. 1987. Expression of Proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli* dan Potential of Recombinant Genes and Proteins for Development of Diagnostic Reagents. *J. Clin. Microbiol*, July 1987. p.1176-1180
- da Franseca, D.P.A.J., Frerichs. J., Singh, M., Snippe, H., dan Verheul, A.F.M. 2001. Induction of antibody and T-cell responses by immunization with ISCOMS containing the 38-kilodalton protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 19: 122-31
- Dasgupta, S., Bhinge, A., Chandran, V., Sewlikar, S., Nimbkar, A., dan Datta, D. 2003. Role of l-lysine HCl in immunopotentialisation towards development of suitable tuberculosis vaccination. *Vaccine* 21: 4722-7
- Devi, K. R. U., Ramalingam, B., Brennan, P. J., Narayanan, P. R., dan Raja, A. 2001. Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38kDa antigen in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 81(3), 249-253
- Harboe, M., dan Wiker, H. G. 1992. *J. Infect. Dis.* 186,874484
- Harth, G., Lee, B.Y, dan Horwitz M. A. 1997. High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic *Mycobacteria* of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets. *Infection and immunity*, 65 (6): 2321-8.
- Haslov, K, Andersen, A. B., Ljungqvist, L., dan Bentzon, M. W. 1992. *Scand. J.*



- Kadival, G. V., Chaparas, S. D., and Hussong, D. 1987. Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of a 38-kDa antigen isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 139, 2447-51
- Laquererie, A., P, Militzer., F, Romain., K, Eiglmeier, S, Cole., and Marchal, G. 1995. Cloning, sequencing and expression of the *apa* gen coding for the *Mycobacterium tuberculosis* 45/47-kilodalton secreted antigen complex. *Infection and immunity.* oct. p.4003-4010.
- Madigan, M.T., J.M, Martinko., dan Parker, J. 2000. *Mikrobiologie.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. Berlin.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1999. *Molecular cloning: a laboratory manual,* Cold Spring Harbour, NY
- Singh, M., A.B, Andersen., J.E.G, McCarthy., M, Rohde., H, Schutte., E, Sanders., dan Timmis, K.N. 1992. The *Mycobacterium tuberculosis* 38-kD antigen: overproduction in *Escherichia coli*, purification and characterization.
- Studier, F.W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. 1990. *Methods. Enzymol,* 185, 60-89
- Sugiri, L. Y. 2004. Analisis immunoglobulin G serum penderita tuberculosis paru terhadap antigen 52 kDa *M. tuberculosis* menggunakan metode ELISA indirect dan dot blot, *Tugas Akhir PPDS Ilmu penyakit paru,* Universitas Brawijaya.
- Tandya, S. 2006. Uji adesi protein 38 kDa *M. tuberculosis* sebagai kandidat vaksin, *Disertasi S3,* Universitas Brawijaya
- Woods, G. L. 2001. Molecular techniques in mycobacterial detection. *Arch Pathol Lab Med* 125:122-126
- Young, D. B., Garbe. T., Lathigra. R., and Abou-Zeid, C. 1990. in *Molecular Biology of the Mycobacteria* (J. McFadden, ed) pp. 136, Surrey University Press, London

## B. DRAF ARTIKEL ILMIAH

Berikut adalah absrak yang sudah diterima dan akan dipresentasikan dalam bentuk poster di International Conference of Infectious disease di Denpasar Bali, 15-17 Oct 2007.

Untuk publikasi yang berkualitas internasional, masih diperlukan data tambahan sampai ekspresi gen *tb1* terlihat jelas.

### **Cloning, sequencing and expression of *pab* gene of *Mycobacterium tuberculosis* using heterologous system**

Tri Yudani Mardining Raras<sup>1</sup>, Diana Lyrawati<sup>2</sup>, Soemarno<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biochemistry-Biomol, <sup>2</sup> Laboratory of Pharmacy, <sup>3</sup> Laboratory of Microbiology, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Jl.Veteran, Malang, Indonesia.

Corresponding author : TYMR: [daniraras@yahoo.com](mailto:daniraras@yahoo.com) or DL: [eldi\\_7\\_98@yahoo.com](mailto:eldi_7_98@yahoo.com).

#### **Abstract**

Antigen 38, a 38 kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis* is a species-specific antigen with high specificity (95%). Gaining a large amount of this protein through conventional method confront several obstacles: a high cost laboratories safety facilities, difficulties in identification of the secreted proteins and the low activity after purification. In the present study, we report the molecular cloning of *pab* gene encoding the antigen 38 from *M. tuberculosis* and its overexpression in heterologous system in *Escherichia coli*. The DNA segment corresponding to the antigen 38 was obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the field strain of *M. tuberculosis* genomic DNA collected from patient suffering pulmonary tuberculosis hospitalized in local hospital, Batu-Malang. A single band corresponding to 900bp was purified and ligated into pGEMT vector. White colonies were selected and checked for DNA sequence on 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem). The DNA sequence analysis of the clone showed that it has 95% homology to that of published sequence of *M. tuberculosis* H37Rv. This clone was then used to generate an expression construct using pRoExHT as the backbone and subsequently transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . The resulting clones were checked via PCR and DNA sequencing. Expression studies including affinity purification of the recombinant protein facilitated by the hexahistidines peptide of the vector pRoExHT are in progress.

*Keywords* : cloning, overexpression, *pab*, *M. tuberculosis*, heterologous system.

## C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

Untuk penelitian lanjutan dari proyek ini, maka akan terdiri dari ekspresi pMBhis, purifikasi antigen 78 dan kemudian tes serologis rekombinan protein.

Untuk penelitian itu semua diperlukan dana lebih dari 50 juta, oleh karena itu kami tidak mengajukan lagi ke proyek hibah bersaing.

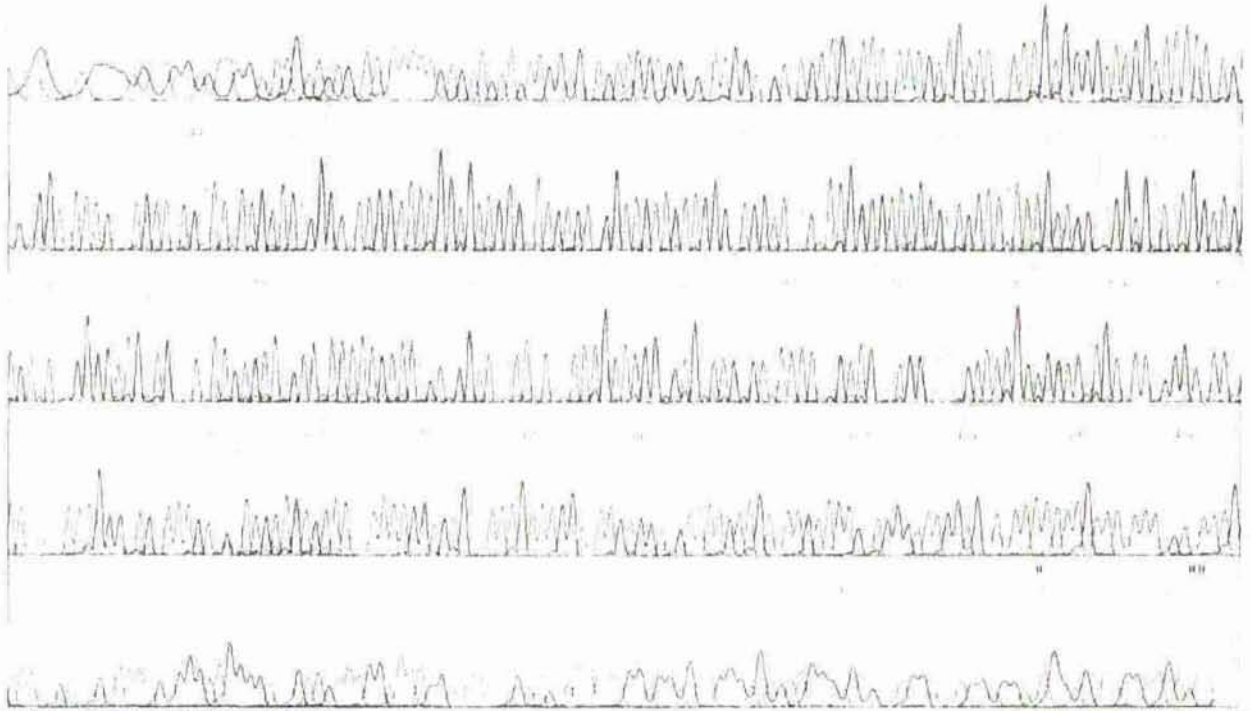
# LAMPIRAN

## 1. Electropherogram sequencing tb1

Applied  
Biosystems  
S/N G-292 A / 3 T 59 C 127  
KB cap  
KB 1.2 Cap 3

TBclone5\_MTBF\_2007-09-20\_003  
TBclone5\_MTBF  
KB\_3130\_POP7\_BD1v3.mob  
Pis 1834 to 8532 Pk1 Loc 1803  
Version 5.2 Patch2 H.SGV Bases: 590

Inst Model#Name 3100:EUKMAN\_INSTITUTE\_JAKARTA-18330-040  
Sep 20 2007 11:52AM, GMT+07:00  
Sep 20 2007 12:14PM, GMT+07:00  
Spacing 11.67 Pts/Panel1500  
Plate Name seq200907

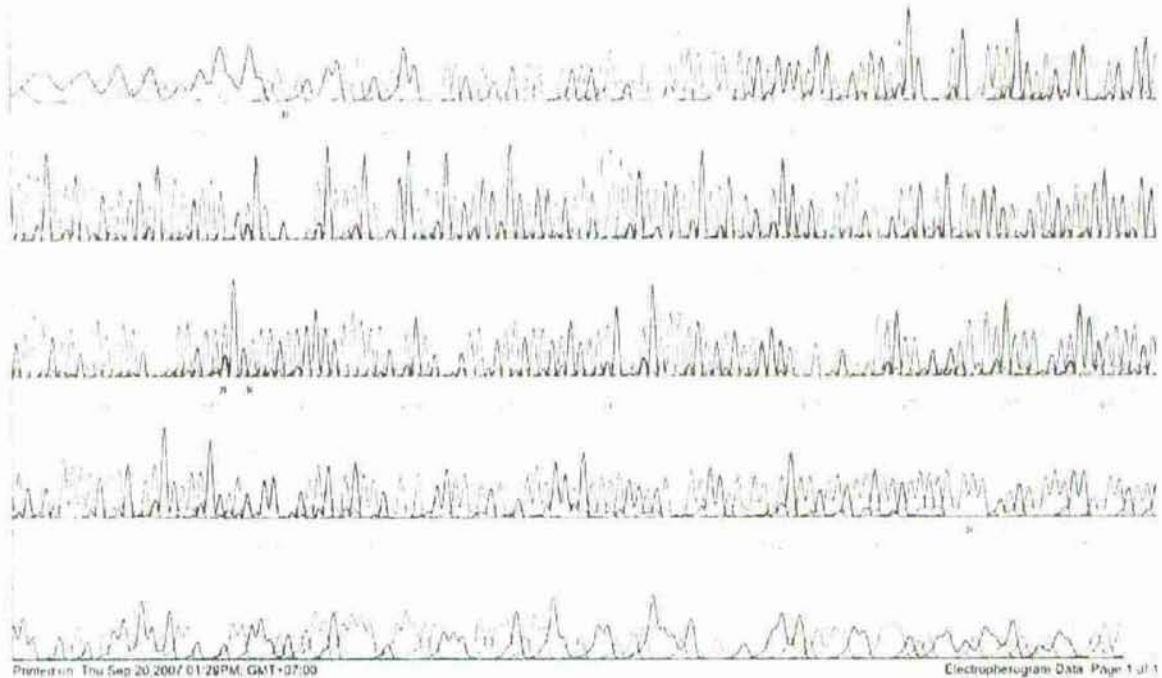




Applied  
BodySystems  
S/N G229 A 102 1 920 164  
K11 top  
KB 12 Cap 4  
Serial: 0101 0000 01

TBclone5\_MTR\_2007-09-20\_004  
TBclone5\_MTR  
hd: 3130 POP7\_B0753.msp  
Pb: 1826 w 8532 Pk1 Loc: 1795  
Version 5.7 Patch07 1850V Bases: 583

hdl ModelName: 3100/ELKMAN\_INSTITUTE\_JAKARTA-18330-048  
Sep 20 2007 11:52AM, GMT+07:00  
Sep 20 2007 12:14PM, GMT+07:00  
Spacing: 11.58 Pts/Chan/15.00  
Phase Name: sec000007





## Cloning, Sequencing and Expression of *pab* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Using Heterologous System

**Tri Yudani Mardining Raras<sup>1</sup>, Diana Lyrawati<sup>2</sup>, Soemarno<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Laboratory of Biochemistry-Biomol, <sup>2</sup> Laboratory of Pharmacy, <sup>3</sup> Laboratory of Microbiology, <sup>4</sup> Laboratory of Biomedical Science, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Jl.Veteran, Malang, Indonesia.

Antigen 38, a 38 kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis* is a species-specific antigen with high specificity (95%). Gaining a large amount of this protein through conventional method confront several obstacles: a high cost laboratories safety facilities, difficulties in identification of the secreted proteins and the low activity after purification. In the present study, we report the molecular cloning of *pab* gene encoding the antigen 38 from *M. tuberculosis* and its overexpression in heterologous system in *Escherichia coli*. The DNA segment corresponding to the antigen 38 was obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the field strain of *M. tuberculosis* genomic DNA collected from patient suffering pulmonary tuberculosis hospitalized in local hospital, Batu-Malang. A single band corresponding to 900bp was purified and ligated into pGEMT vector. White colonies were selected and checked for DNA sequence on 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem). The DNA sequence analysis of the clone showed that it has 95% homology to that of published sequence of *M tuberculosis* H37Rv. This clone was then used to generate an expression construct using pRoExHT as the backbone and subsequently transformed into *E coli* DH5 $\alpha$ . The resulting clones were checked via PCR and DNA sequencing. Expression studies including affinity purification of the recombinant protein facilitated by the hexahistidines peptide of the vector pRoExHT are in progress.

**Keywords:** cloning, overexpression, *pab*, *M. tuberculosis*, heterologous system.