



## Kloning Open Reading Frame (orf) ESAT-6 (Early Secretary Antigenic Target-6) *Mycobacterium tuberculosis* ke *Escherichia coli* BL21 (DE3)

### *Cloning of Open Reading Frame (orf) of ESAT-6 (Early Secretary Antigenic Target-6) from *Mycobacterium tuberculosis* into *Escherichia coli* BL21 (DE3)*

Rosana Agus<sup>1</sup>, Asaad Maidin<sup>2</sup>, Mochammad Hatta<sup>3</sup> dan Debbie S.Retnoningrum<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology Faculty of Mathematics & Science, Hasanuddin University

<sup>2,3</sup>Faculty of Medicine, Hasanuddin University

<sup>4</sup>School of Pharmacy, Bandung Institute of Technology

**KEYWORDS** ESAT-6; expression vector; immunodominant antigen; serological detection

**ABSTRACT** Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* is an infectious diseases leading to significant death toll in most part of the world. Vaccination with BCG, a TB vaccine, is still a common practice until now. In general, the people in Indonesia receive BCG vaccine during their early childhood, but the efficacy of the vaccine would not last long to adulthood, which allow them to get potential latent TB infection. This latent TB infection might be detected by tuberculin skin test (TST), however, the weakness is that false positive reactions are commonly found due to cross reaction between antibodies produced during BCG vaccination and purified protein derivative (PPD). Alternatively, its detection could be performed by identifying immunodominant antigen to *M. tuberculosis*. The Early Secretary Antigenic Target-6 (ESAT-6) for antibody based serological detection with high sensitivity and specificity could also be applied. The purpose of this study was to clone the open reading frame (orf) of ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* into *Escherichia coli* BL21 (DE3). In this method, orf ESAT-6 was ligated to the expression vector pET-32b and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Characterization of clones was carried out by cutting the recombinant plasmid using restriction enzymes BamH1 and XhoI. The result showed that three colonies with recombinant plasmid pET-32b-ESAT-6 were obtained. Sequencing of the DNA insert was then performed using the universal T7 primer. Characterization of white colonies with restriction enzymes showed two bands i.e. 288 bp and 5900 bp for orf ESAT-6 and pET-32b vector respectively. BLAST analysis of sequence showed 100% homology.

Penyakit tuberkulosis (TB) disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, merupakan penyakit infeksi penyebab kematian manusia terbesar di dunia. WHO memperkirakan bahwa tahun 2007 ada 9,27 juta kasus TB baru di dunia (139 per 100.000 orang). Diperkirakan dari 9,27 juta kasus terdapat 44% atau 4,1 juta kasus (61 per 100.000 orang) merupakan BTA positif (WHO, 2009).

Di Indonesia perkiraan insidensi TB tahun 2007 berdasarkan pemeriksaan sputum (basil tahan asam/BTA positif) adalah 228 per 100.000 orang. Perkiraan

**Correspondence:**

Rosana Agus, Department of Biology Faculty of Mathematics & Science, Hasanuddin University, Makassar, Jl. Perintis Kemerdekaan, Makassar 90245, Telephone 0411-310284, HP. 0812 413 6912.

prevalensi TB adalah 244 per 100.000 orang dan kematian akibat TB adalah 39 per 100.000 orang/tahun (WHO, 2009).

Strategi untuk mencegah dan mendeteksi TB telah banyak dilakukan. Vaksinasi dengan vaksin BCG (Bacille Calmete Guerin) merupakan satu-satunya vaksin yang masih digunakan di seluruh dunia (Brosch *et al.*, 2005). Umumnya sebagian besar masyarakat di Indonesia telah mendapatkan vaksin BCG ketika usia balita. Namun efektivitas vaksin ini tidak bertahan hingga dewasa, sehingga diduga bahwa setiap orang dapat terinfeksi oleh *M. tuberculosis* yang bersifat laten. Infeksi TB laten berpotensi menjadi TB aktif setiap saat, dan orang dengan TB aktif dapat menjadi sumber infeksi baru.

Tantangan utama dalam pengendalian TB adalah diagnosis dan penatalaksanaan infeksi TB laten. Penduduk dengan TB laten, 5-10% diantaranya akan menjadi TB aktif (Flynn and Chan, 2001).

Deteksi infeksi TB laten tidak memiliki standar baku, namun saat ini dilakukan dengan *tuberculin skin test* (TST) (Menzies *et al.*, 2007). Prinsip uji tuberkulin adalah timbulnya hipersensitivitas pada seseorang yang terinfeksi *M. tuberculosis* terhadap komponen tuberkulin dari bakteri tersebut yaitu turunan protein yang dimurnikan (*purified protein derivative*/PPD). Uji tersebut dilakukan dengan menyuntikan 0,1 ml (5 tuberkulin unit) PPD secara intrakutan. Hasilnya dapat dilihat 48-72 jam setelah penyuntikan dengan mengamati ada atau tidaknya indurasi pada kulit dengan mengukur diameter indurasi (Jasmer *et al.*, 2002).

Diketahui bahwa uji tuberkulin mempunyai beberapa keterbatasan yaitu terjadi reaksi positif palsu karena adanya reaksi silang antara PPD dan antibodi yang dihasilkan oleh vaksinasi BCG atau infeksi dengan mikobakteria bukan TB (Diel *et al.*, 2009).

Adanya keterbatasan dari uji TST, maka saat ini penelitian diarahkan untuk menemukan antigen spesifik yang akan digunakan sebagai imunodiagnostik maupun sebagai vaksin TB. Salah satu

antigen yang banyak diteliti dari *M.tuberculosis* adalah *Early secreted antigenic target- 6 kDa* (ESAT-6).

ESAT-6 merupakan protein yang disekresi pada tahap awal pertumbuhan dan dikode oleh gen Rv3875 yang terdapat pada daerah (RD1) (Lein *et al.*, 1999). Pada penelitian yang menggunakan pendekatan hibridisasi Southern, diketahui bahwa ESAT-6 terdapat pada *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. marinum*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. gastri*, *M. kansasii* tetapi tidak terdapat pada *M. bovis* galur BCG (Colangeli, *et al.*, 2000).

Selain sebagai kandidat vaksin TB, antigen ESAT-6 digunakan pula sebagai imunodiagnostik TB. Beberapa penelitian membuktikan hal ini, karena antigen ESAT-6 dapat menginduksi sel T untuk menghasilkan IFN- $\gamma$  yang berperan sebagai imunitas seluler dalam melawan TB (Cardoso *et al.*, 2002). Diketahui pula bahwa ESAT-6 merupakan antigen imunodominan yang dikenali oleh serum penderita TB (Smith, 2003).

Penelitian kami sebelumnya telah berhasil melakukan ligasi open reading frame (*orf*) ESAT-6 ke vektor kloning pGEM-T dan transformasi pada sel *host E.coli* DH5 $\alpha$ . Pada penelitian ini akan dilakukan ligasi *orf* ESAT-6 ke vektor ekspresi pET-32b dan transformasi pada sel *host E.coli* BL21 (DE3). Tahapan penelitian ini penting agar *orf* ESAT-6 dapat diekspresikan menjadi protein ESAT-6. Diharapkan protein ini nantinya dapat digunakan sebagai antigen untuk deteksi serologi pada penderita TB laten.

## TUJUAN PENELITIAN

Melakukan ligasi *orf* ESAT-6 *M. tuberculosis* ke vektor ekspresi pET-32b, transformasi pada *E.coli* BL21 (DE3) dan mengkarakterisasi klon.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Subjek dan bahan penelitian

Subyek penelitian adalah *orf* ESAT-6 berukuran 288 pb yang dihasilkan dari PCR

dengan primer spesifik. Urutan *primer reverse*: 5'-CTC GAG CTA TGC GAA CAT CCC AGT GAC GTT GCC-3' Sedang urutan *primer forward* : 5'-GGA TCC GAT GAC AGA GCA GCA GTG GAA TTT CGC-3'.

Bahan penelitian yang digunakan adalah buffer PCR, enzim Taq polimerase, primer, agarosa, buffer TAE, loading buffer, EtBr, DNA 1 kb ladder, kit GFX, pET-32b, medium Luria Bertani, Ampicilin, XGAL, IPTG, kit QiAgen, kit Geneaid, enzim restriksi *BamHI* dan *XhoI*, *E.coli* BL21.

### Cara Kerja

#### Ligasi *orf* ESAT-6 ke vektor ekspresi pET-32b

Pada ligasi ini digunakan rasio perbandingan sisipan dan vektor adalah 3:1 dan 5:1. Komponen reaksi dengan volume akhir 10  $\mu$ L direaksikan dengan mencampurkan DNA sisipan, 25 ng vektor pET-32b, 1  $\mu$ L enzim T4 DNA ligase (3U/ $\mu$ L) dan 1  $\mu$ L bufer ligase 10x. Ligasi dilakukan pada suhu ruang selama 3 jam.

#### Transformasi plasmid rekombinan pET32b-ESAT-6 ke *E.coli* BL 21(DE3)

Metode yang digunakan untuk transformasi adalah *heat shock* berdasarkan Sambrook *et al.*, 1989. Sebagai kontrol positif digunakan sel kompeten *E.coli* BL21 dan vektor pET-32b tanpa DNA sisipan. Kontrol negatif adalah sel kompeten saja. Sebanyak 4  $\mu$ L produk ligasi dimasukkan ke dalam 60  $\mu$ L sel kompeten. Kemudian tabung diinkubasi dalam es selama 30 menit. Proses *heat shock* dilakukan pada suhu 42°C selama 90 detik, kemudian diinkubasi dalam es. Selanjutnya ditambahkan media Luria Bertani cair sampai volume 740  $\mu$ L. Inkubasi dilakukan dengan inkubator goyang pada suhu 37°C, selama 90 menit dengan 150 putaran per menit. Selanjutnya disentrifuga pada 4000 rpm selama 10 menit. Produk ligasi sejumlah 800  $\mu$ L dipisahkan menjadi 150  $\mu$ L kemudian disebar masing-masing 50  $\mu$ L pada 15 mL media Luria-Bertani (LB) padat yang mengandung 0,15 mg/mL ampisilin, 0,8 mg X-gal dan 0,397 mM IPTG. Sebanyak 50  $\mu$ L kontrol positif dan 50  $\mu$ L kontrol negatif

masing masing disebar pada 15mL media LB padat yang mengandung 0,1 mg/mL ampisilin. Produk ligasi, kontrol positif, dan kontrol negatif kemudian diinkubasi pada 37°C selama 18 jam.

#### Karakterisasi plasmid rekombinan pET-ESAT-6

Plasmid rekombinan dikarakterisasi menggunakan analisis migrasi pada elektroforesis gel agarosa setelah dipotong enzim restriksi *XhoI* dan *BamHI*. Analisis terhadap DNA sisipan dilakukan dengan sekuensing dengan menggunakan primer T7. Kemiripan *orf* ESAT-6 dengan bank data dilakukan dengan analisa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), yang menggunakan *M. tuberculosis* H37Rv sebagai pembanding. Klone dinyatakan benar apabila mengandung plasmid rekombinan pET32b-ESAT-6 yang berukuran 6288 bp.

## HASIL

#### Ligasi *orf* ESAT-6 ke vektor ekspresi pET-32b

Tahap awal kloning untuk mengekspresikan protein adalah ligasi *orf* ESAT-6 ke vektor ekspresi pET-32b yang menghasilkan plasmid rekombinan pET-32b-ESAT-6 seperti terlihat pada Gambar 1. Vektor plasmid pET-32b tanpa DNA sisipan (kolom 2) tampak memiliki ukuran lebih pendek dari plasmid dengan DNA sisipan *orf* ESAT-6 (kolom 1).

#### Transformasi pET-32b-ESAT-6 ke sel kompeten *E.coli* BL 21(DE3)

Transformasi plasmid rekombinan dilakukan pada *E.coli* BL21. Gambar 2A menunjukkan pertumbuhan dari sel kompeten *E.coli* BL21 yang dilakukan dalam medium LB tanpa ampisilin. Pada Gambar B tampak bahwa plasmid rekombinan pET-32b-ESAT-6 telah berhasil ditransformasikan ke sel *E.coli* BL21. Hal ini ditunjukkan dengan adanya 3 koloni putih dalam medium LB + ampisilin.

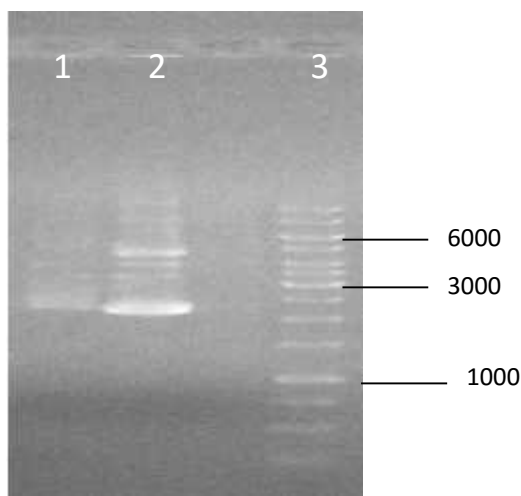
## Karakterisasi klon pET-32b-ESAT-6

### 1. Pemotongan plasmid rekombinan pET32b-ESAT-6 dengan Enzim Restriksi

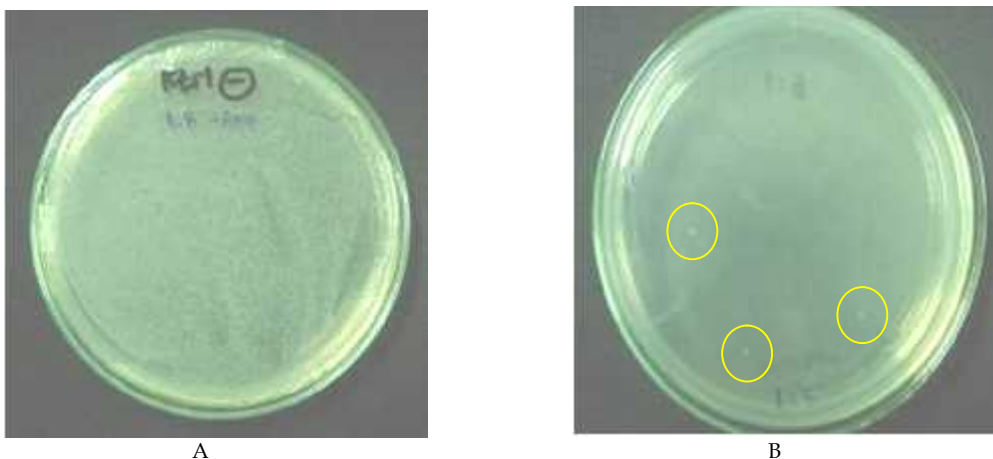
Tahapan awal untuk karakterisasi klon dilakukan dengan memotong DNA sisipan dengan enzim restriksi *XhoI* dan *BamHI*. Pada Gambar 3 tampak plasmid rekombinan yang belum terpotong (kolom 1). Setelah dipotong dengan enzim restriksi, diperoleh 2 pita yaitu DNA vektor berukuran 5900 pb dan DNA sisipan yang berukuran 288 pb (kolom 3).

### 2. Analisis DNA Sisipan *orf* ESAT-6 dengan Sekuensing

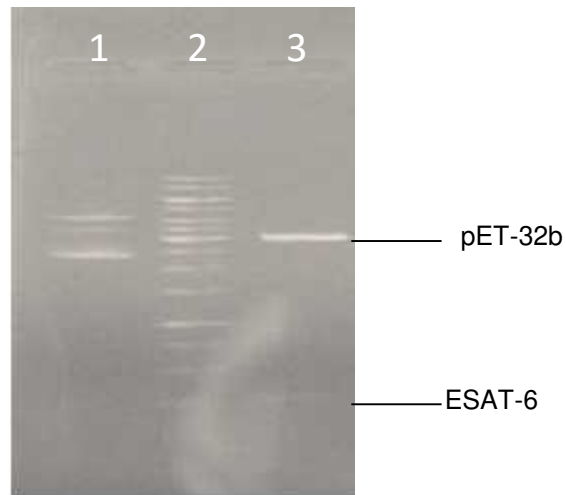
Karakterisasi klon selanjutnya dilakukan dengan menganalisa DNA sisipan *orf* ESAT-6 dengan sekuensing (Gambar 4). Setelah diurutkan urutan nukleotida dari DNA sisipan tersebut diperoleh hasil seperti pada Gambar 5. Pada Gambar 5 tampak bahwa DNA yang disisipkan yaitu *orf* ESAT-6 telah berhasil diligasi ke vektor ekspresi pET-32b. Selanjutnya dari hasil analisa BLAST terhadap DNA sisipan diperoleh tingkat homologi 100%.



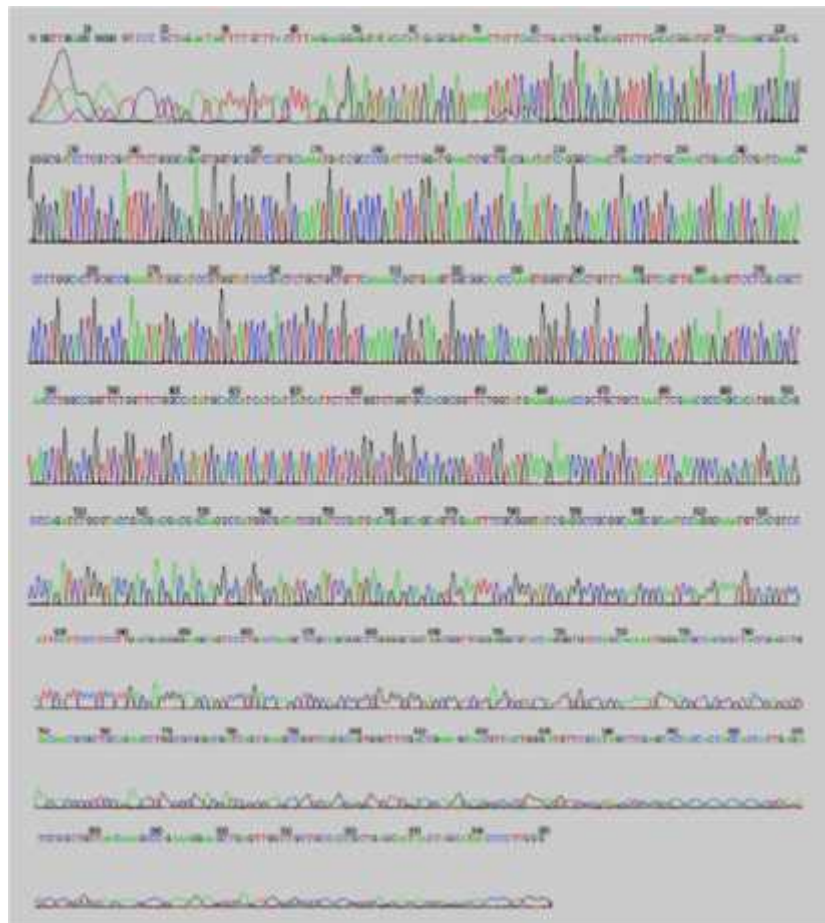
Gambar 1. Analisis migrasi pET32b-ESAT-6  
Ket.: 1 = pET-32b-ESAT-6; 2 = pET-32b  
3 = marka DNA



Gambar 2. Transformasi pET-32b-ESAT-6 ke sel kompeten *E. coli* BL 21  
A. Sel kompeten *E. coli* BL21(DE3)  
B. pET32b-ESAT-6



Gambar 3. Hasil restriksi pET32b-ESAT-6 dengan *Xho*I dan *Bam*HI.  
 Ket.: 1 = pET32b-ESAT-6 tidak terpotong  
 2 = marker 1 kb, 3 = pET32b-ESAT-6 dipotong *Xho*I dan *Bam*HI



Gambar 4. Hasil sekuensing dari plasmid rekombinan pET32b-ESAT-6 dengan primer T7

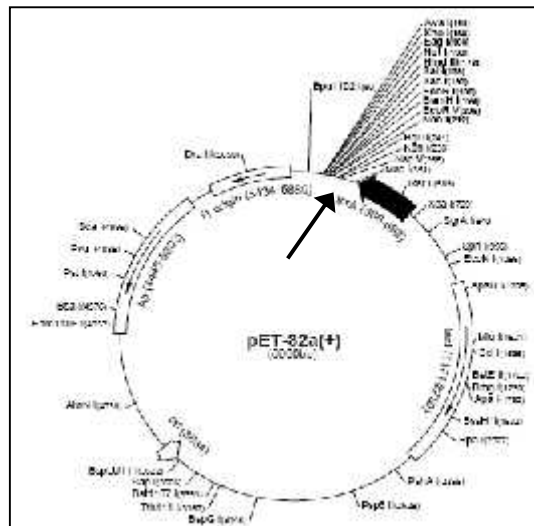


## PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan vektor ekspresi pET-32b yang dapat mengekspresikan protein dalam jumlah besar bersama dengan 109 asam amino Trx.Tag (protein thioredoxin) (Gambar 7). Kloning akan menghasilkan protein fusi His-Tag

yang berperan dalam pemurnian dan deteksi.

Metode yang sama digunakan pula oleh Ningrum (2008) yang mengkloning daerah pengkode interferon alfa-2B sintetik dengan vektor ekspresi pET-32b pada *Escherichia coli* BL 21.



Gambar 7. Vektor ekspresi pET-32b (Novagen)  
Keterangan : → = daerah yang dipotong dengan *Bam*HI dan *Xho*I untuk ligasi DNA sisipan ESAT-6

Ligasi *orf* ESAT-6 ke vektor ekspresi pET-32b dilakukan agar dapat diproduksi protein ESAT-6. Gambar 1 menampilkan bahwa setelah DNA sisipan *orf* ESAT-6 diligasi ke dalam pET-32b, diperoleh plasmid rekombinan pET-32b-ESAT-6, yang memiliki ukuran lebih besar dari pET-32b kosong (5900 pb). Jadi dapat dikatakan bahwa ligasi *orf* ESAT-6 ke vektor ekspresi pET-32b telah berhasil dilakukan.

Transformasi plasmid rekombinan pET-32b-ESAT-6 dilakukan ke dalam sel *E.coli* BL 21(DE3). Bakteri *E.coli* BL21 ini telah ditransfeksi oleh bakteriofage DE3, dan sangat baik digunakan sebagai *host cell* baik untuk transformasi maupun ekspresi.

Plasmid pET-32b memiliki gen penanda resisten antibiotik ampisilin. Oleh karena itu seleksi terhadap sel *E.coli* yang mengandung plasmid rekombinan dilakukan dengan menumbuhkannya pada media LB yang mengandung ampisilin. Terdapatnya 3 koloni putih dalam medium LB + ampisilin menunjukkan bahwa plasmid

rekombinan pET-32b-ESAT-6 telah berhasil diproduksi dalam sel *E.coli* BL21(DE3). Namun perlu dilakukan analisis terhadap koloni tersebut apakah benar DNA sisipan yang ada dalam plasmid tersebut adalah *orf* ESAT-6.

Pada penelitian ini analisis terhadap DNA sisipan dilakukan dengan analisis migrasi setelah dipotong dengan enzim restriksi *Xho*I dan *Bam*HI. Hal ini disebabkan karena enzim restriksi *Bam*HI dan *Xho*I adalah enzim yang tidak memotong urutan *orf* ESAT-6 namun terdapat pada *primer forward* dan *reverse* ESAT-6.

Sekuensing dilakukan untuk memastikan bahwa DNA sisipan yang telah diisolasi dari koloni putih adalah benar *orf* ESAT-6 berdasarkan urutan gen yang dikonfirmasi dari bank data. Setelah diurutkan nukleotidnya terlihat bahwa *orf* ESAT-6 telah berhasil diligasi ke dalam vektor ekspresi pET-32b (Gambar 5). Hasil analisa BLAST terhadap DNA sisipan diperoleh tingkat kemiripan 100% (Gambar

6). Hal ini berarti bahwa DNA yang di sisipkan pada pET32b adalah benar *orf* ESAT-6.

Hal ini sejalan dengan penelitian kami sebelumnya yang membandingkan urutan ESAT-6 *M. tuberculosis* asal Makassar dengan beberapa daerah yaitu Surabaya, Jakarta, Semarang dan Yogyakarta. Hasil yang di-peroleh bahwa tingkat kemiripan *orf* ESAT-6 dengan bank data adalah 95-100% (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa *orf* ESAT-6 terkonservasi dengan baik, sehingga dapat dijadikan sebagai antigen dalam pencarian kit deteksi tuberkulosis berbasis antibodi.

Tabel 1. Hasil analisis sekuensing dan kemiripan ESAT-6 dari beberapa daerah

Asal Isolat	Kemiripan
Jakarta (4 isolat)	95 - 100%
Semarang (4 isolat)	96 - 100%
Surabaya (4 isolat)	97 - 98%
Jogyakarta (4 isolat)	97 - 98%
Makassar (4 isolat)	97 - 100%

### SIMPULAN

1. Hasil ligasi *orf* ESAT-6 ke vektor ekspresi pET-32b dan transformasi ke *E.coli* BL21(DE3) diperoleh 3 koloni putih.
2. Karakterisasi klon dengan menganalisis laju migrasi setelah dipotong enzim restriksi *Bam*HI dan *Xho* I diperoleh dua pita yaitu *orf* ESAT-6 (288 pb) dan vektor pET-32b (5900 pb). Hasil sekuensing dari DNA sisipan dengan primer T7 dan analisis dengan BLAST diperoleh kemiripan 100%.

### Ucapan Terima Kasih

Pada kesempatan ini peneliti ingin berterima kasih kepada Kementerian Negara Riset dan Teknologi yang telah mendanai penelitian ini melalui Insentif Riset Dasar 2009.

### KEPUSTAKAAN

Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C,

- Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J and Cole ST. 2005. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Jacobs, D.N, WR Jr (eds). *Tuberculosis the Tubercle Bacillus*. ASM Press, DC USA: 71-83
- Cardoso FL, Paulo RZ. Antas, Alexandre S. Milagres, Annemieke Geluk, Kees LMC. Franken, Eliane B. Oliveira, Henrique C. Teixeira, Susie A. Nogueira, Euzenir N. Sarno, Paul Klatser, Tom H.M. Ottenhoff, and Elizabeth P. Sampaio. 2002. T-Cell Responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-Specific Antigen ESAT-6 in Brazilian Tuberculosis Patients, *Infection and Immunity*, 70 (12): 6707-6714.
- Colangeli R, Spencer JS, Bifani P, Williams A, Lyashchenko K, Keen MA, Hill PJ, Belisle J, Gennaro ML. 2000. MTSA-10, the product of the Rv3874 gene of *Mycobacterium tuberculosis*, elicit tuberculosis-specific, Delayed-Type Hypersensitivity in Guinea Pigs, *Infect Immun*, 68 (2): 990-993
- Diel R, Robert Loddenkemper, Karen Meywald-Walter, Rene Gottschalk and Albert Nienhaus. 2009. Comparative Performance of Tuberculin Skin Test, QuantiFERON-TB-Gold In Tube Assay, and T-Spot.TB Test in contact Investigations for Tuberculosis, *American College of Chest Physicians, Chest*, 135:1010-1018
- Flynn JL and John Chan. 2001. Tuberculosis: Latency and Reactivation, *Infection and Immunity*, 69 (7): 4195-4201
- Jasmer RM, Payam Nahid and Philip C.Hopewell. 2002. Latent Tuberculosis Infection, *The New England Journal of Medicine*, 347 : 1860-1866
- Lein AD, von Reyn CF, Horsburgh CR Jr RP, Alexander LN, Andersen P. 1999. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex and those with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 606-609.
- Menzies D, Madhukar Pai and George Comstock. 2007. Meta-analysis: New Tests for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: Areas of Uncertainty and Recommendations for Research, *Ann Intern Med* 146 : 340-354
- Ningrum RA. 2008. Cloning of synthetic interferon alfa-2B (IFNa2B) coding region in *Escherichia coli*, overproduction, purification and characterization of recombinant IFNa2b protein, Master Theses from JBPTITBPP / 2009-04-07
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Book 3, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Smith, Issar. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence, *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (3): 463-496
- World Health Organization Report. 2009. *Global Tuberculosis Control, Epidemiology, Strategy, Financing*.



