



## **EKPRESI ANTIGEN Ag85B DARI *Mycobacterium tuberculosis* PADA GALUR SEL MAMALIA**

### **Expression of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B Antigen in Mammalian Cell Culture**

**Sabar Pambudi\*, Tika Widayanti, Nadya Stephanie**

Laboratorium Biologi Molekular Kesehatan, Pusat Teknologi Farmasi Medika, BPPT  
Serpong, Tangerang Selatan, Banten, Indonesia

\*Email: [sabar.pambudi@bppt.go.id](mailto:sabar.pambudi@bppt.go.id)

#### **ABSTRACT**

*Tuberculosis (TB) continues to be a major health problem worldwide, affecting millions of people each year. The only vaccine approved for the prevention of TB is Bacillus Calmette-Guérin (BCG). However, one of the limitations of BCG is that its preventive effect against pulmonary TB varies from person to person. Therefore, there arises a need for a new TB vaccine to replace BCG. This study aims to obtain the Ag85B recombinant protein which has characteristics similar to the native Ag85B antigen from Mycobacterium tuberculosis. In this study, we cloned and expressed recombinant Ag85B in mammalian cell culture. In the initial step, we cloned synthetic Ag85B into mammalian expression vector pFLAG-CMV4 and expressed the gene in CHO-K1 cells. Interestingly, a specific band around 30 kDa was observed in the culture media of transfected cells by Western blot analysis. The results from our research showed the potency of mammalian expression system to produce recombinant protein Ag85B for new TB vaccine candidate.*

**Keywords:** *Ag85B, mammalian cells, tuberculosis, vaccine, expression*

#### **ABSTRAK**

Tuberkulosis (TB) terus menjadi salah satu masalah kesehatan dunia yang mempengaruhi jutaan manusia setiap tahun. Satu-satunya vaksin untuk TB yang ada adalah *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). Namun demikian, vaksin BCG ini memiliki kelemahan berupa terjadi efek preventif yang bervariasi dari satu individu terhadap individu lainnya. Oleh sebab itu diperlukan pengembangan vaksin TB yang dapat menggantikan vaksin BCG yang sudah ada. Penelitian ini bertujuan memperoleh protein rekombinan Ag85B yang memiliki karakteristik mirip dengan antigen Ag85B *native* dari *Mycobacterium tuberculosis*. Pada penelitian ini, telah dilakukan kegiatan pengklonaan dan ekspresi gen Ag85B pada galur sel mamalia. Pada tahap awal dilakukan pengklonaan gen sintesis Ag85B ke dalam plasmid pada sel mamalia pFLAG-CMV4 dan diekspresikan gennya pada sel CHO-K1. Hasil analisis Western blot menunjukkan tersekresinya gen target berukuran 30 kDa pada media kultur dari sel mamalia yang ditransfeksi. Hasil dari penelitian ini menunjukkan potensi dari sistem ekspresi untuk protein rekombinan Ag85B pada galur sel mamalia sebagai kandidat vaksin TB yang baru.

**Kata Kunci:** Ag85B, ekspresi, galur sel mamalia, tuberkulosis, vaksin

## PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi yang ditularkan lewat partikel-partikel (1–5  $\mu\text{m}$ ) di udara yang mengandung bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Penyakit ini menyebabkan kematian tidak kurang sekitar 1 miliar orang selama 2 abad terakhir (Smith 2003; Lee 2016). Infeksi TB menjadi penyebab utama kematian pada orang-orang yang terinfeksi *human immunodeficiency virus* [HIV] (Kwan dan Ernst 2011; Pawlowski et al. 2012). Pada tahun 2015, diperkirakan sebanyak 10,4 juta orang terinfeksi TB dengan lebih dari 1,8 juta kasus kematian (Centis et al. 2017). Penyebab resiko utama dari infeksi TB adalah kemiskinan, kepadatan penduduk, kelaparan, dan ko-infeksi dengan HIV (Duarte et al. 2018).

Pengobatan yang umum digunakan pada pasien TB adalah kombinasi antibiotik isonisida dan rifamisin. Namun kedua jenis obat tersebut tidak efektif untuk pengobatan pada kasus *multi-drug resistant tuberculosis* (MDR-TB) (Seung et al. 2015). Beberapa jenis obat baru anti-TB seperti bedaquiline (Sirturo<sup>®</sup>; Janssen Therapeutics, Titusville, NJ, USA) dan delamanid (Deltyba<sup>®</sup>; Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima, Japan) saat ini sedang dikembangkan untuk penanggulangan kasus MDR-TB (Rustomjee dan Zumla 2015). Selain itu, beberapa senyawa yang telah dikenal seperti linezolid, imatinib, dan metformin juga sedang dikaji sebagai alternatif untuk pengobatan MDR-TB (Kwon et al. 2018).

Vaksin yang telah terlisensi terhadap infeksi TB adalah *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (Luca dan Mihaescu 2013). Vaksin tersebut dibuat dengan cara melemahkan *M. bovis* (Matsuo dan Yasutomi 2011; Palmer dan Thacker 2018). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa vaksin BCG dapat mencegah TB meningitis dan TB pada anak, namun vaksin tersebut tidak dapat memberikan perlindungan pada infeksi primer TB (Dockrell dan Smith 2017). Selain itu, vaksin BCG juga tidak dapat mencegah terjadinya infeksi paru laten (Sathkumara et al. 2019). Efikasi dari jenis vaksin ini terhadap infeksi TB paru juga sangat bervariasi, yaitu di bawah 80% (Favorov et al. 2012; Kwon et al. 2018).

Bakteri *M. tuberculosis* telah diketahui mensekresikan ratusan protein dalam siklus

hidupnya. Sebagian besar dari protein-protein tersebut menimbulkan respons imun spesifik pada inangnya dan potensial sebagai biomarker untuk digunakan dalam pengembangan sistem deteksi maupun vaksin generasi baru terhadap infeksi TB (Zhang et al. 2015). Salah satu biomarker yang banyak dipelajari adalah kompleks antigen 85 (Ag85) (Kruh-Garcia et al. 2014). Kompleks antigen 85 terdiri atas antigen 85A, B dan C. Antigen 85A (Ag85A) dan antigen 85B (Ag85B) memiliki kemampuan untuk menginduksi respons imun sel T limfosit CD4 dan CD8. Oleh sebab itu, kedua antigen tersebut saat ini paling banyak diteliti sebagai kandidat vaksin TB generasi baru berbasis protein rekombinan yang diharapkan dapat menggantikan vaksin BCG yang selama ini digunakan (Ernst et al. 2019).

Belum tersedianya vaksin TB generasi baru yang lebih efektif dan efisien mendorong dilakukannya usaha-usaha pengembangan vaksin TB berbasis protein rekombinan. Pada penelitian ini, telah dilakukan kloning dan ekspresi protein rekombinan Ag85B dari *M. tuberculosis* pada sel mamalia. Tujuan dari penelitian ini adalah diperolehnya protein rekombinan Ag85B yang memiliki karakteristik yang mirip dengan antigen Ag85B *native* dari *M. tuberculosis*. Diharapkan dengan dilakukannya penelitian ini dapat mempercepat penyediaan vaksin TB generasi baru yang secara efektif dapat mencegah kasus infeksi TB di Indonesia.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekular Kesehatan dan Laboratorium Kultur Sel, Pusat Teknologi Farmasi Medika, LAPTIAB, BPPT Kawasan Puspiptek, Serpong, Tangerang Selatan. Waktu penelitian dilakukan pada Mei hingga Oktober 2019.

### Bahan

Gen sintetik pUC57-Ag85B (GenScript, USA) didesain berdasarkan sekuen referensi *M. tuberculosis strain* BJ10 strain Beijing (GQ150316.1) yang mengkode gene *fbpB* (Ag85B). Vektor ekspresi pFLAG-CMV4-HA diperoleh dari Dr. Takeshi Kurosu (Osaka University, Jepang). Sel *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen) dan sel mamalia CHO-K1

(Mikrobiologi FKUI) digunakan dalam proses kloning dan ekspresi gen Ag85B.

### Isolasi gen Ag85B

Gen Ag85B yang berukuran 1008 pb diisolasi dari plasmid pUC57-Ag85B (GenScript, USA) dengan digesti enzim restriksi *HindIII* (FastDigest, ThermoScientific) dan *XbaI* (FastDigest, ThermoScientific). Sebanyak 2 µg plasmid pUC57-Ag85B dipotong dengan 1,5 µL enzim *HindIII* dan *XbaI*, 2 µL buffer (10x) dan air bebas nuklease hingga total volum menjadi 20 µL, serta diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam. Reaksi digesti divisualisasi pada gel agarosa 1% dan DNA gen Ag85B diisolasi dari gel dan diekstraksi dengan menggunakan kit Wizard® SV Gel dan PCR Clean-Up System (Promega). Gen Ag85B yang telah diisolasi di simpan pada suhu -20°C hingga digunakan pada tahap selanjutnya.

### Kloning gen Ag85B

Sebanyak 2 µg plasmid pFLAG-CMV4-HA dilinearisasi dengan 1,5 µL enzim *HindIII* dan *XbaI*, 2 µL buffer (10x) dan air bebas nuklease hingga total volum menjadi 20 µL. Reaksi linearisasi dilakukan pada suhu 37°C selama 3 jam. Plasmid pFLAG-CMV4-HA yang telah dilinearisasi dipurifikasi dengan menggunakan kit Wizard® SV Gel dan PCR Clean-Up System. Ligasi dilakukan antara plasmid yang telah dilinearisasi dengan gen Ag85B yang telah didigesti sebelumnya. Rasio ligasi antara plasmid dengan gen Ag85B adalah 1:5 yang direaksikan dengan enzim Anza T4 DNA Ligase Master Mix (ThermoScientific) dan diinkubasi pada suhu 22–24°C selama 1 jam.

Tahap selanjutnya adalah transformasi hasil reaksi ligasi ke dalam sel kompeten *E. coli* TOP10 (Invitrogen) dengan menggunakan modifikasi metode CaCl<sub>2</sub>-heat-shock (Hanahan et al. 1991). Sebanyak 3 mL dari kultur *E. coli* TOP10 dikultivasi pada suhu 37°C, dengan kecepatan 180 rpm hingga OD<sub>600</sub> mencapai nilai antara 0,6–1. Kemudian kultur *E. coli* TOP10 dipeletkan dan dikompetenkan dengan pencucian sebanyak 2 kali dengan menggunakan larutan dapar 0,5 M CaCl<sub>2</sub>. Ke dalam 100 µL sel kompeten dimasukkan 10 µL larutan ligasi dan diinkubasi di dalam es selama 30 menit. Sel kompeten yang mengandung hasil ligasi

diberikan kejutan panas (*heat-shock*) pada suhu 42°C selama 90 detik dan disebar pada media seleksi LB agar ampisilin (75 µg mL<sup>-1</sup>). Sel transforman yang muncul pada media seleksi dipilih secara acak dan diisolasi plasmid rekombinannya dengan kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Plasmid yang diperoleh didigesti dengan menggunakan enzim *HindIII* dan *XbaI* dan divisualisasi pada gel agarosa 1%.

### Transfeksi plasmid rekombinan

Sel CHO-K1 ditumbuhkan pada plate 96 dengan densitas 3x10<sup>4</sup> sel mL<sup>-1</sup> sehingga diperoleh konfluensi sel sekitar 60–70% setelah diinkubasi selama 16–18 jam pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>. Setiap 200 ng plasmid rekombinan dilarutkan dalam 10 µL OPTI MEM (Gibco) dan 0,2 µL reagen TurboFect (ThermoScientific). Setelah diinkubasi selama 20 menit, larutan transfeksi tersebut diteteskan ke atas sumur plate 96 yang telah ditumbuhkan sel CHO-K1 pada hari sebelumnya. Setelah diinkubasi selama 48 jam, sel dicuci dengan PBS 1x dan difiksasi selama 30 menit dengan 3,7% formaldehid dalam PBS 1x dan dilanjutkan dengan permeabilisasi menggunakan 1% Triton-X100 dalam PBS 1x selama 10 menit. Sel kemudian dicuci sebanyak 3x dengan PBS 1x dan di *blocking* dengan 1% Bovine Serum Albumin (BSA) dalam PBS 1x selama 1 jam. Sel dicuci dengan PBS 1x dan direaksikan dengan antibodi pertama, yaitu antibodi anti-HA 1:500. Sel diinkubasi dengan antibodi pertama pada suhu 4°C selama 16–24 jam. Setelah itu sel dicuci dengan PBS 1x sebanyak 5 kali dan dilanjutkan dengan inkubasi dengan antibodi kedua yaitu Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (ThermoScientific) 1:1000 selama 1 jam pada suhu 37°C. Sel dicuci dengan PBS 1x sebanyak 3x lalu diamati fluoresensinya dengan menggunakan mikroskop fluoresens.

### Analisa protein Ag85B rekombinan

Sel CHO-K1 ditumbuhkan pada plate 12 dengan densitas 2x10<sup>4</sup> sel mL<sup>-1</sup> sehingga diperoleh konfluensi sel sekitar 60–70% setelah diinkubasi selama 16–18 jam pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>. Setiap 1 µg plasmid rekombinan dilarutkan dalam 200 µL OPTI MEM (Gibco) dan 3 µL reagen TurboFect (ThermoScientific). Setelah diinkubasi selama 20 menit, larutan transfeksi tersebut

diteteskan ke atas sumur plate 12 yang telah ditumbuhkan sel CHO-K1 pada hari sebelumnya. Setelah diinkubasi selama 48 jam, media tumbuh dan sel dikoleksi secara terpisah dan ditambahkan dapar *loading dye* 6x SDS-PAGE. Protein total dari media tumbuh dan sel CHO-K1 yang telah ditransfeksi diseparasi dengan menggunakan gel akrilamid SDS PAGE 12% dan ditransfer ke membran PVDF untuk analisa Western blot. Membran PVDF yang telah ditransfer kemudian dibloking dengan 5% skim milk dalam PBS 1x Tween 0,1% (PBST) selama 2 jam pada suhu 37°C. Setelah dibloking, membran direndam dengan antibodi pertama yaitu antibodi anti-HA 1:1,000 dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 16–24 jam. Membran dicuci dengan PBST sebanyak 5x dan dilanjutkan dengan inkubasi dengan antibodi kedua yaitu antibodi anti-mouse IgG HRP 1:10,000 selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah dicuci dengan PBST sebanyak 5x, membran diinkubasi dengan substrat SuperSignal™ West Femto (ThermoScientific) dan ditangkap sinyalnya dengan film Hyperfilm ECL (Amersham).

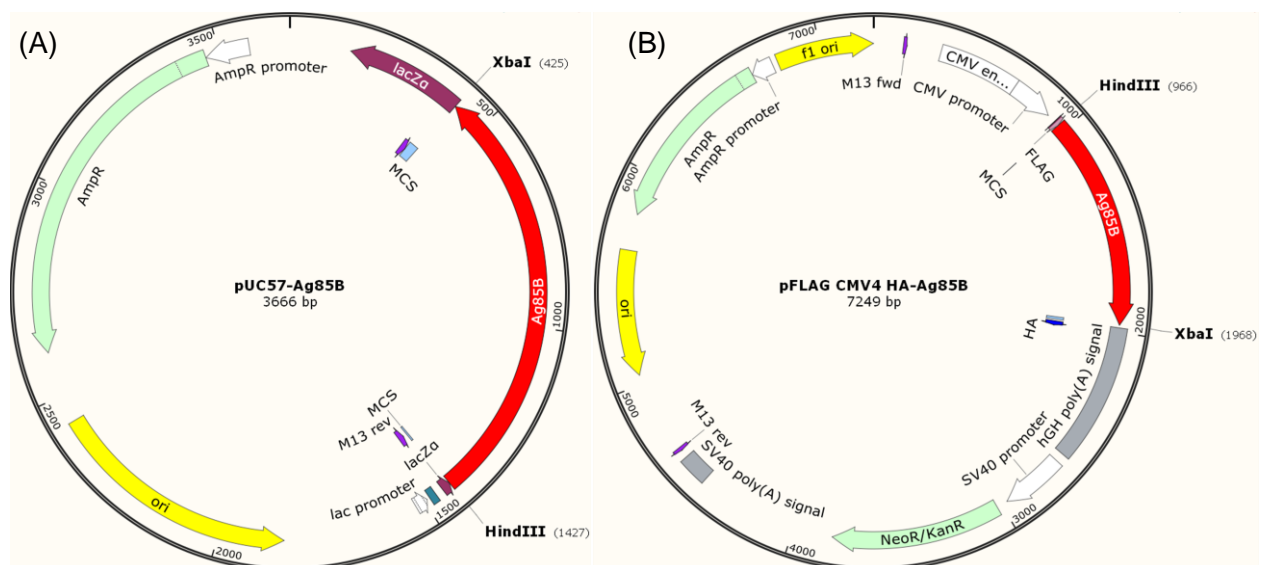
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Protein yang tersekresi pada darah pasien pengindap infeksi TB dapat berfungsi sebagai target antigen yang potensial dalam pengembangan vaksin generasi baru. salah satu biomarker yang potensial adalah

kompleks antigen Ag85 (Rv3804c/FbpA/Ag85A, Rv1886c/FbpB/Ag85B dan Rv0129c/FbpC/Ag85C) (Kruh-Garcia et al. 2014). Ketiga protein dari kompleks antigen Ag85 tersebut memiliki aktivitas enzim *mycolyltransferase* yang penting dalam produksi *trehalose dimycolate* (TDM). Fungsi dari kompleks antigen yang penting tersebut menjadikan Ag85 sebagai target pengembangan obat yang potensial untuk pengobatan TB (Viljoen et al. 2018). Pada antigen Ag85B khususnya, *trehalose dimycolate* (TDM) dapat berfungsi sebagai mediator *proinflammatory* ketika terjadinya infeksi TB (Ernst et al. 2019).

Antigen Ag85B merupakan salah satu imunodominan protein sekresi dari Mtb yang telah banyak dipelajari sebagai kandidat vaksin generasi baru untuk infeksi TB (Ahmad et al. 2017). Telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya bahwa mencit yang diimunisasi dengan bakteri BCG yang kandungan antigen rekombinan Ag85B yang tinggi (15,5 kali lebih tinggi dibandingkan bakteri BCG *original*) memberikan efek proteksi yang signifikan terhadap infeksi *M. leprae* dibandingkan dengan mencit yang diimunisasi dengan bakteri BCG *original* (Gillis et al. 2014).

Pada penelitian ini, telah dilakukan kloning dan ekspresi protein Ag85B dari Mtb dengan menggunakan sistem ekspresi sel mamalia. Isolasi gen Ag85B dilakukan dengan digesti enzim restriksi. Digesti

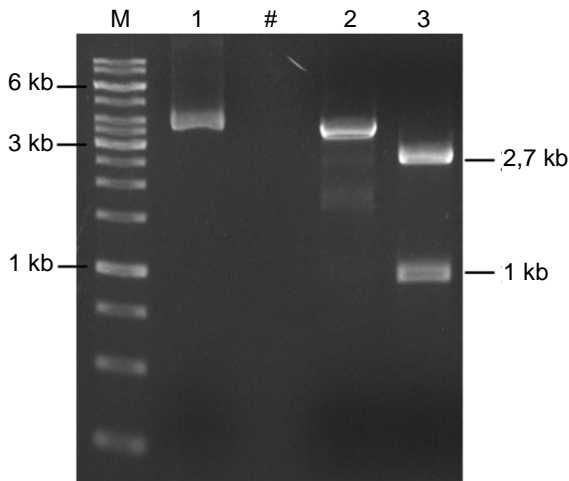


**Gambar 1.** Konstruksi plasmid rekombinan. (A) Gen sintetik Ag85B pada plasmid pUC57-Ag85B berada di antara 2 situs pemotongan enzim restriksi yaitu *HindIII* dan *XbaI*. (B) Gen Ag85B diinsersikan pada plasmid pFLAG-CMV4-HA dan menjadi plasmid rekombinan pFLAG-CMV4-HA-Ag85B

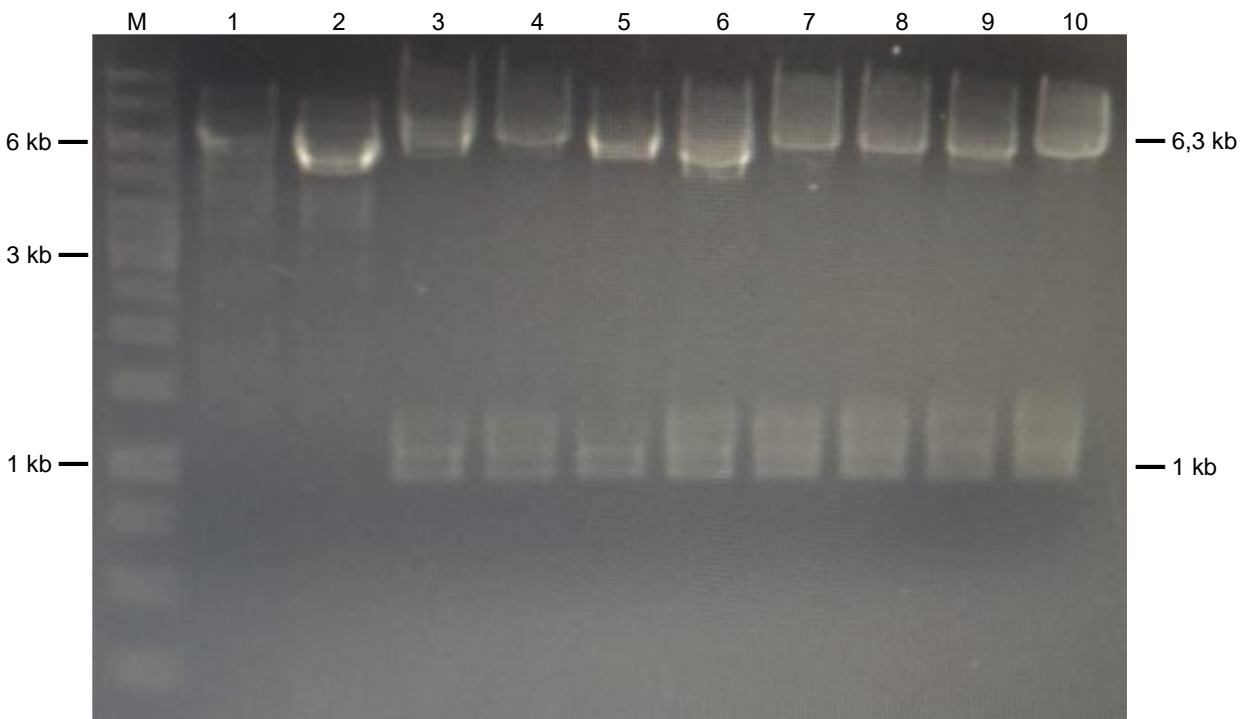
dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *HindIII* dan *XbaI* untuk mengisolasi gen Ag85B dari plasmid pUC57-Ag85B (Gambar 1A). Digesti dengan enzim restriksi *HindIII* dan *XbaI* menghasilkan 2 fragmen yaitu 2,7 kb yang merupakan ukuran dari plasmid pUC57 dan fragmen yang berukuran

1 kb yang merupakan ukuran gen Ag85B (Gambar 2). Setelah itu fragmen gen Ag85B diisolasi dan digunakan dalam kloning ke dalam plasmid pFLAG-CMV4-HA yang merupakan vektor ekspresi pada sel mamalia sehingga akan diperoleh plasmid rekombinan pFLAG-CMV4-HA-Ag85B (Gambar 1B).

Beberapa koloni transforman yang tumbuh pada media seleksi LB agar ampisilin telah dipilih dan diseleksi lebih lanjut untuk dikonfirmasi keberadaan plasmid rekombinan pFLAG-CMV4-HA-Ag85B. Sebanyak 9 koloni dikultivasi dalam media cair LB ampisilin dan diisolasi plasmidnya dan didigesti dengan enzim restriksi *HindIII* dan *XbaI*. Hasil digesti menunjukkan bahwa 8 dari 9 klon terkonfirmasi membawa fragmen gen Ag85B pada plasmid pFLAG-CMV4-HA (Gambar 3). Urutan basa nitrogen dari klon plasmid rekombinan pFLAG-CMV4-HA-Ag85B telah dikonfirmasi identik dengan sekuen referensi gen Ag85B strain Beijing yang dominan ditemukan di Indonesia (Gambar 4). Hasil sekuensing menunjukkan kemiripan 100% dengan sekuen referensi kecuali pada bagian stop kodon dari gen rekombinan Ag85B yang telah dimodifikasi sehingga keberadaan stop kodon tepat setelah protein Tag HA pada bagian ujung 3'.



**Gambar 2.** Isolasi gen Ag85B dari plasmid pUC57-Ag85B dengan digesti enzim restriksi (M: Marker DNA 1 kb ladder; 1: plasmid pUC57-Ag85B sebelum didigesti; 2: plasmid pUC-Ag85B didigesti *HindIII/BamHI*; 3: plasmid pUC-Ag85B didigesti *HindIII/XbaI*)



**Gambar 3.** Konfirmasi plasmid rekombinan pFLAG-CMV4-HA-Ag85B dengan digesti enzim restriksi (M: Marker DNA 1 kb ladder; 1: plasmid pFLAG-CMV4-HA didigesti *HindIII/XbaI* (kontrol negatif); 2-10: plasmid rekombinan didigesti *HindIII/XbaI*)

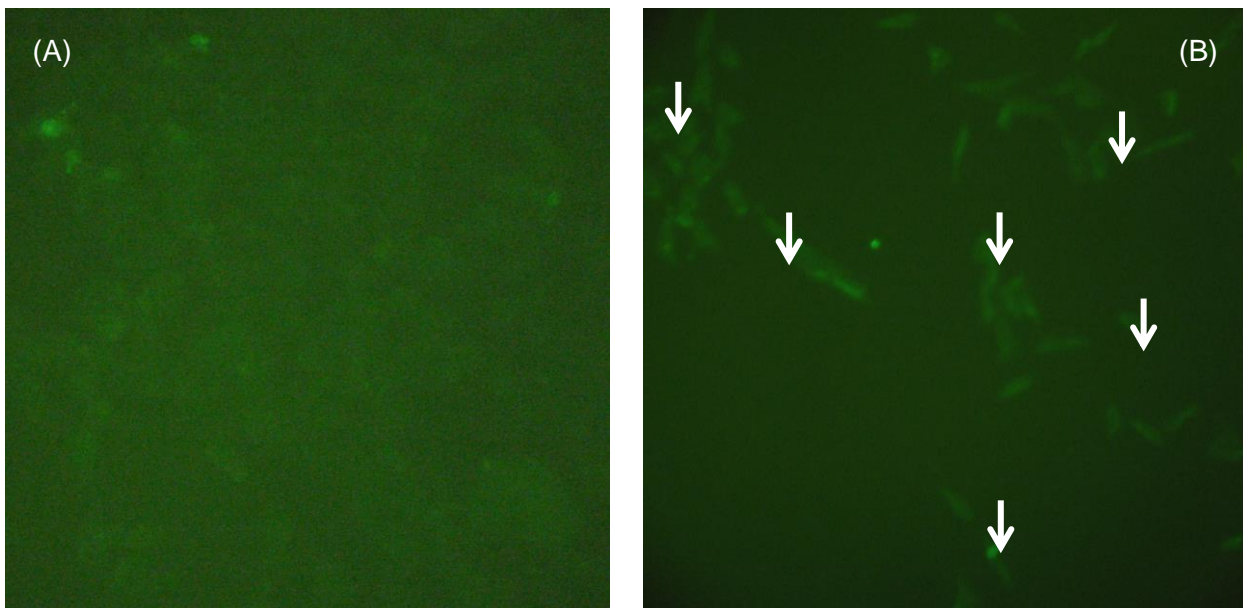


Ekspresi protein rekombinan Ag85B dievaluasi dengan metode *immunofluorescence assay* (IFA) dan Western blot. Ekspresi protein dilakukan pada sel CHO-K1 yang merupakan turunan dari sel CHO. Sel CHO banyak digunakan dalam industri farmasi untuk menghasilkan protein-protein rekombinan yang bernilai komersial tinggi (Gupta et al. 2017). Beberapa kelebihan utama penggunaan sel CHO dibandingkan dengan sistem ekspresi lainnya adalah kemampuannya untuk dapat tumbuh dalam bentuk suspensi sehingga dapat digunakan dalam volum skala produksi yang besar, menghasilkan produk-produk protein yang memiliki modifikasi paska translasi yang mirip dengan protein yang dihasilkan dari sel manusia. Selain itu, sel CHO juga dapat beradaptasi pada perubahan kondisi (pH, suhu, tekanan) yang cukup ekstrim pada proses produksi di Industri (Dumont et al. 2016). Berdasarkan hal tersebut maka pada penelitian ini digunakan sel CHO-K1 dalam mengekspresikan protein rekombinan Ag85B.

Pada Gambar 5 terlihat bahwa ekspresi protein Ag85B pada sel CHO-K1 yang telah ditransfeksi dengan plasmid rekombinan pFLAG-CMV4-HA-Ag85B menunjukkan intensitas cahaya fluoresens tidak terlalu berbeda dengan kontrol negatif berupa sel CHO-K1 yang tidak ditransfeksi

ketika diuji dengan metode IFA. Secara umum, metode IFA hanya dapat digunakan untuk mengevaluasi protein rekombinan yang terekspresi di bagian intraseluler atau di bagian trans-membran sel (Chapin et al. 2009). Oleh sebab itu, untuk menganalisa lebih lanjut kemungkinan tersekresinya protein rekombinan Ag85B ke media pertumbuhan CHO-K1 yang telah tertransfeksi, maka dilakukan analisa Western blot.

Analisa ukuran protein Ag85B berdasarkan hasil Western blot dari sampel sel lisat maupun media tumbuh dari sel CHO-K1 yang telah ditransfeksi terdapat pada Gambar 6. Prediksi ukuran protein Ag85B berdasarkan panjang fragmen gen Ag85B yang dikloning adalah sekitar 37 kDa. Pada sampel sel lisat, tidak tampak adanya pita protein spesifik Ag85B yang muncul dari hasil Western blot (Gambar 6A). Pada sampel yang berasal dari media tumbuh CHO-K1 yang telah tertransfeksi plasmid rekombinan pFLAG-CMV4-HA-Ag85B terlihat pita protein yang berukuran sekitar 30 kDa (Gambar 6B). Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa ukuran protein Ag85B yang diekspresikan pada sistem ekspresi *E. coli* adalah sekitar 34 kDa (Fihiruddin et al. 2019). Perbedaan ukuran antara prediksi dengan hasil yang diperoleh dalam analisa Western blot tersebut dikarenakan adanya proses pemotongan 40

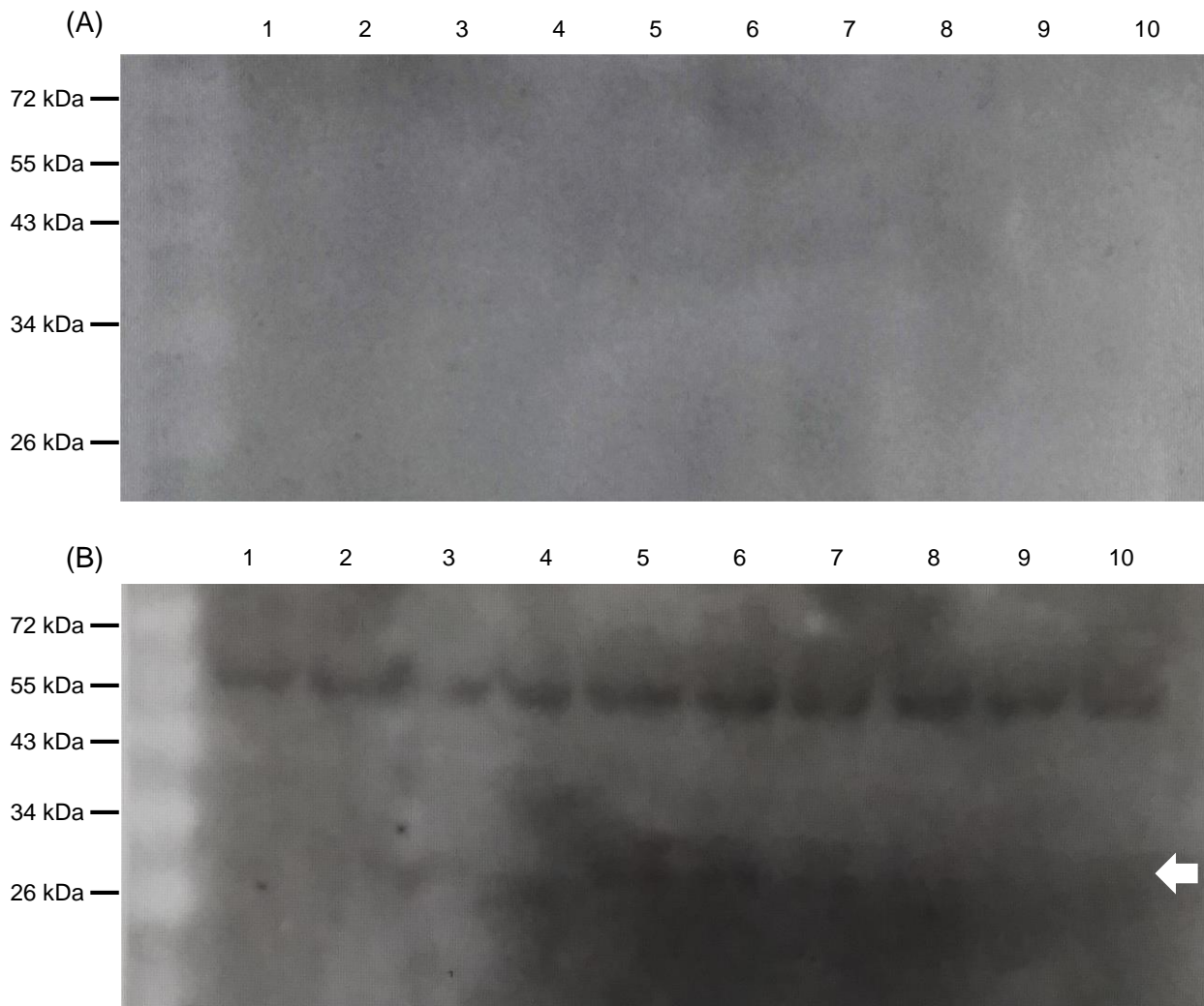


**Gambar 5.** Uji ekspresi protein Ag85B dengan metode *Immunofluorescence Assay* (IFA) (perbesaran mikroskop 40×). (A) Sel CHO-K1 yang tidak ditransfeksi (kontrol negatif). (B) Sel CHO-K1 yang telah ditransfeksi dengan plasmid rekombinan pFLAG-CMV4-HA-Ag85B (beberapa sel CHO-K1 ditunjukkan dengan panah putih)

asam amino bagian ujung 5' yang terjadi ketika protein Ag85B akan dilepaskan dari sel kultur yang terinfeksi oleh *M. tuberculosis* (Huygen 2014). Proses yang sama diperkirakan terjadi ketika protein Ag85B diproses di dalam sel CHO-K1 sehingga protein rekombinan tidak diperoleh pada sel lisat karena protein tersekresikan pada media kultur dari CHO-K1. Pada penelitian ini, gen sintesis Ag85B digunakan berdasarkan sekuen referensi *M. tuberculosis* strain BJ10 strain Beijing (GQ150316.1) tanpa dilakukan optimasi kodon. Sehingga pada bagian konstruksi plasmid pFLAG-CMV4-HA-Ag85B masih memiliki *signal peptide* otentik yang diharapkan akan memudahkan proses maturasi dari sekresi protein rekombinan Ag85B dari sel mamalia CHO-K1.

### KESIMPULAN

Protein Ag85B dari *M. tuberculosis* strain Beijing yang memiliki penyebaran dominan di Indonesia telah berhasil diekspresikan pada sistem galur sel mamalia CHO-K1. Protein tersebut memiliki karakter yang mirip dengan antigen Ag85B pada kultur *M. tuberculosis* yang telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya, yaitu tersekresikan ke media kultur dari sel dan memiliki ukuran sekitar 30 kDa. Penelitian selanjutnya perlu dilakukan untuk mengetahui karakter lainnya seperti profil paska modifikasi translasi serta kemampuan protein rekombinan Ag85B tersebut sebagai kandidat vaksin subunit untuk TB dalam menginduksi respons imun seluler dan humoral.



**Gambar 6.** Uji ekspresi protein Ag85B dengan Western blot. (A) Ekspresi protein Ag85B pada sel lisat sel CHO-K1 yang telah ditransfeksi maupun kontrol negatif. (B) Ekspresi protein Ag85B pada media kultur sel CHO-K1 yang telah ditransfeksi maupun kontrol negative. (1-9: Klon sel CHO-K1 rekombinan; 10: Sel CHO-K1 tidak ditransfeksi (kontrol negatif); tanda panah putih: Ag85B tersekresi)



## UCAPAN TERIMA KASIH

Kegiatan penelitian ini didukung oleh pendanaan dari Insinas Pratama RistekDikti tahun 2019 (kode kegiatan 018\_6\_IP\_RISTEK\_2019\_34). Pada penelitian ini, Sabar Pambudi adalah kontributor utama, sedangkan Tika Widayanti dan Nadya Stephanie adalah kontributor anggota.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad F, Zubair S, Gupta P, Gupta UD, Patel R, Owais M (2017) Evaluation of aggregated Ag85B antigen for its biophysical properties, immunogenicity, and vaccination potential in a murine model of tuberculosis infection. *Front Immunol* 8:1608. doi: 10.3389/fimmu.2017.01608
- Centis R, D'Ambrosio L, Zumla A, Migliori GB (2017) Shifting from tuberculosis control to elimination: Where are we? What are the variables dan limitations? Is it achievable? *Int J Infect Dis* 56:30–33. doi: 10.1016/j.ijid.2016.11.416
- Chapin HC, Rajendran V, Capasso A, Caplan MJ (2009) Detecting the surface localization dan cytoplasmic cleavage of membrane-bound proteins. *Methods Cell Biol* 94:223–239. doi: 10.1016/S0091-679X(08)94011-5
- Dockrell HM, Smith SG (2017) What have we learnt about BCG vaccination in the last 20 years? *Front Immunol* 8:1134. doi: 10.3389/fimmu.2017.01134
- Duarte R, Lönnroth K, Carvalho C, Lima F, Carvalho ACC, Muñoz-Torrico M, Centis R (2018) Tuberculosis, social determinants dan co-morbidities (including HIV). *Pulmonology* 24:115–119. doi: 10.1016/j.rppnen.2017.11.003
- Dumont J, Ewart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R (2016) Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, dan future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* 36:1110–1122. doi: 10.3109/07388551.2015.1084266
- Ernst JD, Cornelius A, Bolz M (2019) Dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B revealed by a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *mBio* 10:e00611–19. doi: 10.1128/mBio.00611-19
- Favorov M, Ali M, Tursunbayeva A, Aitmagambetova I, Kilgore P, Ismailov S, Chorba T (2012) Comparative tuberculosis (TB) prevention effectiveness in children of bacillus calmette-guérin (BCG) vaccines from different sources, Kazakhstan. *PLoS One* 7:e32567. doi: 10.1371/journal.pone.0032567
- Fihiruddin, Artama WT, Wibawa T, Mertaniasih NM (2019) Expression of immunoglobulin, granzyme-B and perforin against Ag85A and Ag85B proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in Balb/c mice. *Afr J Infect Dis* 13:13–20. doi: 10.21010/ajid.v13i2.2
- Gillis TP, Tullius MV, Horwitz MA (2014) rBCG30-induced immunity and cross-protection against *Mycobacterium leprae* challenge are enhanced by boosting with the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kilodalton antigen 85B. *Infect Immun* 82:3900–3909. doi: 10.1128/IAI.01499-13
- Gupta SK, Srivastava SK, Sharma A, Nalage VHH, Salvi D, Kushwaha H, Chitnis NB, Shukla P (2017) Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform. *PLoS One* 12:e0181455. doi: 10.1371/journal.pone.0181455
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204:63–113. doi: 10.1016/0076-6879(91)04006-a
- Huygen K (2014) The Immunodominant T-cell epitopes of the mycolyl-transferases of the antigen 85 complex of *M. tuberculosis*. *Front Immunol* 5:321. doi: 10.3389/fimmu.2014.00321
- Kruh-Garcia NA, Murray M, Prucha JG, Dobos KM (2014) Antigen 85 variation across lineages of *Mycobacterium tuberculosis*-implications for vaccine and biomarker success. *J Proteomics* 97:141–150. doi: 10.1016/j.jprot.2013.07.005
- Kwan CK, Ernst JD (2011) HIV and tuberculosis: A deadly human syndemic. *Clin Microbiol Rev* 24:351–376. doi: 10.1128/CMR.00042-10
- Kwon B-E, Ahn J-H, Min S, Kim H, Seo J, Yeo S-G, Ko H-J (2018) Development of new preventive and therapeutic vaccines for tuberculosis. *Immune Netw* 18:e17. doi: 10.4110/in.2018.18.e17

- Lee SH (2016) Tuberculosis infection and latent tuberculosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 79:201–206. doi: 10.4046/trd.2016.79.4.201
- Luca S, Mihaescu T (2013) History of BCG vaccine. *Maedica (Buchar)* 8:53–58
- Matsuo K, Yasutomi Y (2011) *Mycobacterium bovis* bacille calmette-guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. *Tuberc Res Treat* 2011:574591. doi: 10.1155/2011/574591
- Palmer MV, Thacker TC (2018) Use of the human vaccine, *Mycobacterium bovis* bacillus calmette guérin in deer. *Front Vet Sci* 5:244. doi: 10.3389/fvets.2018.00244
- Pawlowski A, Jansson M, Sköld M, Rottenberg ME, Källenius G (2012) Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathog* 8:e1002464. doi: 10.1371/journal.ppat.1002464
- Rustomjee R, Zumla A (2015) Delamanid expanded access novel treatment of drug resistant tuberculosis. *Infect Drug Resist* 8:359–366. doi: 10.2147/IDR.S62119
- Sathkumara HD, Pai S, Aceves-Sánchez MdJ, Ketheesan N, Flores-Valdez MA, Kupz A (2019) BCG vaccination prevents reactivation of latent lymphatic murine tuberculosis independently of CD4<sup>+</sup> T cells. *Front Immunol* 10:532. doi: 10.3389/fimmu.2019.00532
- Seung KJ, Keshavjee S, Rich ML (2015) Multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5:a017863. doi: 10.1101/cshperspect.a017863
- Smith I (2003) *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 16:463–496. doi: 10.1128/cmr.16.3.463-496.2003
- Viljoen A, Richard M, Nguyen PC, Fourquet P, Camoin L, Paudal RR, Gnawali GR, Spilling CD, Cavalier J-F, Canaan S, Blaise M, Kremer L (2018) Cyclopostins and cyclophostin analogs inhibit the antigen 85C from *Mycobacterium tuberculosis* both *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 293:2755–2769. doi: 10.1074/jbc.RA117.000760
- Zhang C, Song X, Zhao Y, Zhang H, Zhao S, Mao F, Bai B, Wu S, Shi C (2015) *Mycobacterium tuberculosis* secreted proteins as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis and latent tuberculosis infection. *J Clin Lab Anal* 29:375–382. doi: 10.1002/jcla.21782