

Isolasi Purifikasi, dan studi Immunogenitas protein Rekombinan Resuscitation Promoting Factor B (RpfB) Mycobacterium Tuberculosis secara Invitro pada Splenosit Mencit = Isolation purification and immunogenicity of resuscitation promoting factor b rpfb recombinant protein of mycobacterium tuberculosis on mice splenocytes

Burhannuddin, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20415387&lokasi=lokal>

Abstrak

Mortalitas yang disebabkan oleh Tuberkulosis (TB) masih tinggi dan saat ini hanya tersedia vaksin BCG untuk mencegah TB. Lebih dari 90 % individu yang terinfeksi adalah laten, bakteri dalam kondisi tersebut dorman, namun dapat terjadi reaktivasi saat imunitas melemah atau bakteri mengalami resusitasi. Vaksin BCG menunjukkan efikasi yang bervariasi pada orang dewasa dan tidak dapat mencegah reaktivasi pada TB laten. Protein RpfB yang disekresikan *M. tuberculosis* dalam tahap resusitasi diketahui imunogenik, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai kandidat vaksin TB. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mempurifikasi, dan mengetahui imunogenitas protein rekombinan RpfB hasil konstruksi Departemen Mikrobiologi FK UI secara invitro pada splenosit mencit. Protein rekombinan RpfB diekspresikan dalam strain bakteri MRB4 (*E. coli* BL21 pGEX6p-1 RpfB). Protein diekstraksi dengan sonikasi dan sentrifugasi bertahap kemudian disolubilisasi dengan dapar urea 8M. Protein direnaturasi dalam dapar refolding kemudian diisolasi dengan kolom kromatografi afinitas terhadap GST. Keberadaan protein dikonfirmasi dengan SDS-PAGE dan Western Blot kemudian dihitung konsentrasinya menggunakan metode Bradford. Uji imunogenitas dilakukan secara invitro menggunakan kultur splenosit mencit yang distimulasi masing-masing dengan 25 g/ml protein rekombinan RpfB, 25 g/ml protein GST, 1-2 % mitogen PHA, dan satu kelompok kultur tidak stimulasi sebagai kontrol negatif. Selanjutnya dilakukan booster pada jam ke-24 dan ke-72. Supernatan kultur splenosit dikoleksi pada jam ke-96 kemudian digunakan untuk menganalisis respon IFN, IL-12, IL-4, dan IL-10 dengan kit ELISA. Perbedaan respon yang dihasilkan dianalisis secara statistika menggunakan uji T independen pada nilai $P < 0.05$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein rekombinan RpfB terekspresi dalam bentuk badan inklusi dengan berat molekul sekitar 66 kDa dan berhasil dipurifikasi dengan konsentrasi 53 g/ml. Uji imunogenitas menunjukkan protein rekombinan RpfB dapat menstimulasi respon IFN dan IL-12, namun tidak menstimulasi respon IL-4 dan IL-10 pada splenosit mencit.

.....Mortality rate caused by tuberculosis (TB) is high all over the world and only BCG vaccine is currently available. More than 90% of TB infection is latent, where *Mycobacterium tuberculosis* in dormant state that can be active when host immune response is insufficient or the bacteria promote resuscitation. As a vaccine, BCG shows varied efficacy in adults and can not give protection against resuscitation of latent TB infection. Resuscitation Promoting Factor B (RpfB) is one protein produced by *M. tuberculosis* in resuscitation state and proved to be immunogenic as make it suitable to be use as TB vaccine. Microbiology Department, University Indonesia has successfully construct recombinant pGEX6p-1-RpfB plasmid in BL21 *E. coli* (known as MRB4 strain) as the aim of this study is to isolate, purify, and analyze recombinant RpfB-GST protein in mice splenocytes in-vitro. After induction with IPTG, protein was extracted by sonication and differential centrifugation then solubilized with buffer contain 8M urea. Protein then renatured followed by purification with GST chromatography. Protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blot using

anti-GST. Concentration of isolated protein was measured using Bradford method. Each group of mice splenocytes was treated with 25 g/ml of recombinant protein RpfB, GST, PHA, and one culture group without treatment; and boosted twice at 24h and 72h. Cell supernatant was collected at 96h and level of IFN, IL-12, IL-4, and IL-10 was measured by ELISA. The results showed that RpfB recombinant proteins expressed in the form of inclusion bodies with a molecular weight of about 66 kDa and purified at 53g/ml. Based on independent t-test analysis, RpfB can stimulate IFN and IL-12 but not IL-4 and IL-10.