

**MICROEXPRESSION ANALYSIS OF TUBERCULOSIS ANTIGEN  
PROTEIN AG85 COMPLEX AND TB10.4 IN *Escherichia coli* BL21(DE3)  
EXPRESSION SYSTEM WITH pGEX-6P-1 VECTOR**

**Muhammad Ode Rahmadhani**

**21/482233/BI/10862**

**Supervisor: Dr. rer. nat. Abdul Rahman Siregar, S.Si., M.Biotech**

**INTISARI**

Tuberkulosis (TB) menjadi salah satu penyakit paling infeksius di dunia. Pada tahun 2020, penyakit ini menginfeksi 9,9 juta orang dan menyebabkan 1,3 juta kematian, sehingga mendorong perlunya pengembangan vaksin yang lebih efektif. Kompleks Ag85 (Ag85A, Ag85B, dan Ag85C) serta Tb10.4 merupakan antigen yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai vaksin karena memiliki imunogenisitas yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis mikroekspresi antigen-antigen tersebut, berfusi dengan sistem SpyCatcher, dalam *Escherichia coli* BL21(DE3) menggunakan sistem vektor pGEX-6P-1. Penelitian ini melibatkan analisis *in silico* yang mencakup prediksi antigenisitas, alergenitas, toksisitas, analisis fisiokimia, struktur sekunder mRNA, dan laju inisiasi translasi, yang kemudian dilanjutkan dengan analisis ekspresi *in vitro* menggunakan variasi konsentrasi IPTG sebagai agen induksi. Ekspresi gen dianalisis menggunakan qRT-PCR, sedangkan ekspresi protein divalidasi melalui analisis Western blot. Hasil menunjukkan bahwa Ag85A, Ag85B, dan Ag85C mencapai ekspresi optimal pada konsentrasi IPTG 1,0 mM, sedangkan Tb10.4 menunjukkan ekspresi tertinggi pada konsentrasi IPTG 0,7 mM. Analisis statistik mengonfirmasi bahwa konsentrasi IPTG 1,0 mM memberikan pengaruh signifikan terhadap ekspresi Ag85C, sementara ekspresi antigen lainnya tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Selain itu, terdeteksi pita protein yang tidak terduga mengindikasikan adanya pemotongan proteolitik pada linker yang digunakan dalam konstruksi protein. Untuk mengatasi permasalahan ini, diusulkan linker baru, yaitu DGRDGP, yang berasal dari *M. Tuberculosis* dan secara komputasional diprediksi lebih stabil. Penggunaan ini berpotensi meningkatkan integritas struktural pada konstruksi vaksin. Studi ini berhasil mengidentifikasi kandidat antigen yang menjanjikan dan menawarkan perbaikan desain untuk mengoptimalkan stabilitas dan hasil produksi protein rekombinan.

**Kata kunci: Ag85, *Escherichia coli*, qRT-PCR, Rekombinan, Vaksin, Western Blot**

**MICROEXPRESSION ANALYSIS OF TUBERCULOSIS ANTIGEN  
PROTEIN AG85 COMPLEX AND TB10.4 IN *Escherichia coli* BL21(DE3)  
EXPRESSION SYSTEM WITH pGEX-6P-1 VECTOR**

**Muhammad Ode Rahmadhani**

**21/482233/BI/10862**

**Supervisor: Dr. rer. nat. Abdul Rahman Siregar, S.Si., M.Biotech**

**ABSTRACT**

Tuberculosis (TB) remains one of the most significant infectious diseases on the earth. This disease infected 9.9 million people in 2020, with 1.3 million cases resulting in death, urging the development of improved vaccines. The Ag85 complex (Ag85A, Ag85B, and Ag85C) and Tb10.4 are potential antigens for vaccine development due to their strong immunogenicity. This study aimed to analyze the microexpression of these antigens, fusion with SpyCatcher system, in *Escherichia coli* BL21(DE3) using the pGEX-6P-1 vector system. The research included *in silico* analyses such as antigenicity, allergenicity, toxicity, physicochemical characteristics, mRNA secondary structure, and translation initiation rate, followed with *in vitro* analysis, such as gene expression analysis using qRT-PCR, and protein expression analysis by Western blot analysis. The results indicated that Ag85A, Ag85B, and Ag85C reached optimal expression at 1.0 mM IPTG, whereas Tb10.4 showed the highest expression at 0.7 mM IPTG. Statistical analysis confirmed that 1.0 mM IPTG concentration significantly influenced Ag85C expression, while the expression of other antigens was not significantly affected. Notably, unexpected protein bands were detected, suggesting proteolytic cleavage at the linker used in the constructs. To address this issue, a new linker sequence (DGRDGP), derived from *M. tuberculosis* and computationally predicted to be more stable, was proposed. The use of this rationally designed linker has the potential to enhance structural integrity in future recombinant vaccine constructs. This study identifies promising antigenic candidates and offers design improvements for optimizing protein stability and yield.

**Keyword: Ag85, *Escherichia coli*, qRT-PCR, Recombinant, Vaccine, Western Blot**