

INTISARI

Tuberkulosis merupakan penyakit menular yang masih menjadi masalah kesehatan global, dengan Indonesia sebagai negara kedua kasus tertinggi di dunia. Meskipun berbagai metode diagnostik telah tersedia, seperti TST dan IGRA, namun tes IGRA lebih spesifik karena mendeteksi respon imun terhadap antigen spesifik *Mycobacterium tuberculosis*. ESAT-6 dan CFP-10 merupakan protein spesifik *Mycobacterium tuberculosis* yang berperan sebagai antigen utama dalam sistem sekresi ESX-1. Kompleks ESAT-6/CFP-10 berpotensi besar untuk pengembangan diagnostik tuberkulosis. Namun, produksi protein fusi di *E. coli* sering menghasilkan *inclusion bodies*. Solusi permasalahan tersebut dilakukan dengan penambahan modifikasi tag SEP (C9R, C6R, dan C3R) di C-terminal guna meningkatkan ekspresi, kelarutan, dan efisiensi purifikasi. Ekspresi dan purifikasi dikonfirmasi dengan SDS-PAGE, *Western blot*, dan kolom kromatografi afinitas Ni-NTA. Hasil SDS-PAGE menunjukkan pita protein target terlihat di 23,5 kDa (rESAT-6/CFP-10 CO), 26,5 kDa (rESAT-6/CFP-10 CO SEP panjang), dan 25,5 kDa (rESAT-6/CFP-10 CO SEP pendek). Kelarutan protein terlihat pada hasil *western blot* yang menunjukkan bahwa penambahan SEP meningkatkan ekspresi dan kelarutan protein hingga 3 – 5 kali dengan ditandai adanya pita protein target yang lebih tebal. Konsentrasi akhir protein yang dimurnikan adalah 1,549 mg/mL (tanpa SEP), 0,109 mg/mL (SEP panjang), dan 0,228 mg/mL (SEP pendek), dengan kemurnian masing-masing 0,59; 0,66; dan 0,48. Uji imunogenisitas dilakukan menggunakan *whole blood* dari kelompok subjek sehat dan pasien tuberkulosis. Hasil uji ELISA menunjukkan bahwa antigen rESAT-6/CFP-10 *codon optimized*, rESAT-6/CFP-10 CO SEP Panjang, dan rESAT-6/CFP-10 CO SEP Pendek yang diproduksi mampu menstimulasi sekresi IFN- γ pada pasien tuberkulosis maupun kelompok sehat. Namun, respon IFN- γ pada pasien TB lebih rendah dibandingkan kelompok sehat, yang kemungkinan disebabkan oleh gangguan sistem imun, khususnya pada respon imun seluler, sehingga tubuh kurang efektif melawan *Mycobacterium tuberculosis*. Meskipun demikian, hasil positif kadar IFN- γ yang diperoleh melalui stimulasi antigen *M. tuberculosis* tetap mencerminkan adanya respon imun spesifik terhadap infeksi tuberkulosis.

Kata kunci: Peptida SEP; ESAT-6/CFP-10; Ekspresi protein; purifikasi protein; Imunogenisitas

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains a major global health problem, with Indonesia ranking second in case numbers worldwide. The Interferon-Gamma Release Assay (IGRA) is more specific than the Tuberculin Skin Test (TST) as it detects immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens, ESAT-6 and CFP-10, which are crucial in the ESX-1 secretion system. The ESAT-6/CFP-10 complex shows strong potential for TB diagnostics; however, recombinant protein production in *E. coli* often leads to insoluble inclusion bodies. This study applied SEP tag modifications (C9R, C6R, C3R) at the C-terminal to enhance expression, solubility, and purification efficiency. Protein expression and purification were validated using SDS-PAGE, Western blot, and Ni-NTA affinity chromatography. SDS-PAGE revealed protein bands at 23.5 kDa (rESAT-6/CFP-10 CO), 26.5 kDa (rESAT-6/CFP-10 CO long SEP), and 25.5 kDa (rESAT-6/CFP-10 CO short SEP). Western blot confirmed increased solubility, with SEP tags enhancing protein expression and solubility by 3–5 levels. Purified protein concentrations were 1.549 mg/mL (without SEP), 0.109 mg/mL (long SEP), and 0.228 mg/mL (short SEP), with respective purities of 0.59, 0.66, and 0.48. Immunogenicity was assessed using whole blood from TB patients and healthy controls. ELISA showed that codon-optimized rESAT-6/CFP-10, long SEP, and short SEP antigens stimulated IFN- γ secretion in both groups. TB patients exhibited lower responses, likely due to impaired cellular immunity. Nevertheless, positive IFN- γ induction confirmed the antigens' potential to detect TB-specific immune responses.

Keywords: SEP Peptide; ESAT-6/CFP-10; protein expression; protein purification; Immunogenicity