Jurnal Matematika dan Sains
Vol. 8 No. 3, September 2003, hal 117 – 123

Optimasi Proses Overproduksi, Pemurnian dan Karakterisasi Protein Mga Sebagai Molekul Target Untuk Pencegahan Infeksi oleh *Streptococcus Pyogenes*

Muhaimin[1)], Oei Ban Liang[2,4)], Enny Ratnaningsih[2,4)],
Endang Purwantini[3,4)] dan Debbie Sofie Retnoningrum[3,4)]
[1)] Jurusan Kimia-FKIP Universitas Jambi
[2)] Departemen Kimia-FMIPA Institut Teknologi Bandung
[3)] Departemen Farmasi-FMIPA Institut Teknologi Bandung
[4)] Pusat Penelitian Antar Universitas Bioteknologi ITB

Diterima April 2003, disetujui untuk dipublikasikan Juli 2003

Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang optimasi overproduksi, purifikasi dan karakterisasi protein Mga Streptococcus pyogenes *dari* Escherichia coli *pMALMga rekombinan yang mengandung gen* mga49. *Optimasi overproduksi dilakukan dengan membuat biakan* Escherichia coli *pMALMga dengan* OD_{600} *= 0,7 dalam medium LB dengan atau tanpa glukosa, dan diinduksi dengan IPTG 0,3 mM dalam variasi waktu tertentu. Protein yang dihasilkan berupa protein fusi MBP-Mga dengan massa molekul relatif sekitar 104 kDa. Purifikasi dilakukan menggunakan teknik kromatografi afinitas dengan kolom resin amilosa pada kondisi pH 7,4 dilanjutkan dengan SDS PAGE. Terdeteksinya pita tunggal pada 104 kDa menunjukkan protein fusi MBP-Mga yang cukup murni. Protein fusi MBP-Mga murni digunakan untuk produksi antibodi poliklonal pada kelinci. Pembentukan antibodi dalam serum kelinci dimonitor dengan teknik* dot blot *dan* Western blot. *Antibodi poliklonal yang dihasilkan memberikan reaksi positif terhadap protein fusi MBP-Mga rekombinan. Adsorpsi dan presipitasi terhadap antibodi poliklonal yang bereaksi positif dengan protein MBP dilakukan dengan menambahkan protein MBP murni (56 kDa) yang diproduksi oleh* Escherichia coli *pMALc2 rekombinan dengan konsentrasi tertentu, dan dimurnikan dengan kromatografi afinitas menggunakan ligan amilosa pada kondisi pH 7,4. Antibodi poliklonal yang telah diadsorpsi tersebut, memberikan reaksi positif terhadap protein Mga rekombinan dan reaksi negatif terhadap protein MBP rekombinan.*

Kata kunci *:* Streptococcus pyogenes*, gen* mga49*, protein fusi MBP-Mga, protein MBP, antibodi poliklonal*

Abstract

Optimization of overproduction, purification and characterization of Streptococcus pyogenes's *Mga recombinant protein from* Escherichia coli *pMALMga carrying* mga49 *gene had been carried out. The overproduction optimization was conducted by culturing the* Escherichia coli *pMALMga of* OD_{600} *= 0,7 in LB medium with or without glucose, and induced by 0,3 mM IPTG for a certain period of time. The protein produced was MBP-Mga fusion protein with a molecular weight of about 104 kDa. The purification was conducted by affinity chromatography using amylose ligands at pH 7,4 and continued by SDS-PAGE. One band identified at 104 kDa showed that the MBP-Mga fusion protein was pure enough for further analysis. The MBP-Mga protein was then injected into rabbit to produce polyclonal antibodies. The antibody development was monitored by dot blot and Western blot. The antibodies produced gave a positive reaction to MBP-Mga fusion protein. Adsorption and precipitation of the polyclonal antibodies which gave a positive reaction to MBP protein was done by adding pure MBP protein (56 kDa) produced by* Escherichia coli *pMALc2, and purified by affinity chromatography using amylose ligands at pH 7,4. The results showed that the antibodies gave a positive reaction to Mga recombinant protein and a negative reaction to MBP recombinant protein.*

Keywords *:* Streptococcus pyogenes, mga49 *gene, MBP-Mga fusion protein, MBP protein, polyclonal antibodies*

1. Pendahuluan

Streptococcus pyogenes merupakan salah satu bakteri gram positif yang menyebabkan berbagai penyakit pada manusia, mulai dari infeksi lokal seperti faringitis, impetigo dan pioderma sampai pada infeksi invasif yang membahayakan kehidupan manusia, seperti sepsis, *necritizing fascitis*, dan *toxic shock-like syndrome*[1,2)]. Infeksi ini dapat berkembang menjadi kondisi yang lebih parah, seperti demam rematik dengan karditis dan *glomerulonephritis pascastreptococcus* akut[2)]. Di Indonesia dan negara-negara berkembang, faringitis dan pioderma adalah jenis penyakit yang paling banyak dijumpai pada anak-anak usia sekolah. Puncak insiden penyakit ini terdapat pada kelompok usia 5 sampai 15 tahun. Karditis dan *glomerulonephritis* dilaporkan terjadi pada lebih kurang 5% populasi, terutama jika pengobatan dengan antibiotik tidak dilakukan.

Sampai saat ini, kasus infeksi oleh bakteri *S. pyogenes* masih menjadi masalah kesehatan penting di negara-negara berkembang, termasuk Indonesia[3)].

Pengobatan terhadap infeksi *S. pyogenes* yang dilakukan selama ini adalah menggunakan antibiotik ampisilin dan rifampisin[4)]. Saat ini penggunaan antibiotik menghadapi permasalahan baru dengan ditemukannya galur bakteri yang resisten terhadap antibiotik tersebut. Maka, untuk mengatasi hal ini dilakukan usaha mencari senyawa baru dengan mekanisme kerja yang baru dalam mengatasi infeksi *S. pyogenes.* Untuk itu, ditelitilah cara kerja dari beberapa faktor virulensi yang terdapat pada *S. pyogenes*, sehingga diharapkan dapat membantu mencari senyawa baru untuk mengatasi infeksi *S. pyogenes.*

Streptococcus pyogenes memiliki beberapa protein permukaan yaitu protein M, streptococcal C5a peptidase, dan reseptor imunoglobulin[5-7)]. Protein M dan streptococcal C5a peptidase merupakan faktor virulensi utama dalam *S. pyogenes* dan sintesisnya dikendalikan oleh suatu protein aktivator Mga[6,8-11)]. Berdasarkan hipotesa, untuk menghambat sintesis protein M, maka aktivitas protein Mga harus dicegah oleh senyawa bioaktif tertentu sehingga tidak dapat berinteraksi dengan situs aktivator gen *emm* dan *scpA* yang letaknya dekat promotor *emm* dan promotor *scpA* dari *S. pyogenes.* Dengan demikian, gen yang terlibat pada faktor virulensi pada *S. pyogenes* tidak akan terekspresi.

Informasi mengenai interaksi antara protein Mga dengan situs aktivator gen *emm* dan *scpA* pada tingkat molekul dapat digunakan sebagai dasar untuk mencari suatu senyawa bioaktif yang menghambat ekspresi gen faktor virulensi[1,6)]. Penemuan senyawa baru yang mampu membunuh bakteri *S. pyogenes* di dalam tubuh manusia, tetapi tidak membunuh flora normal akan sangat bermanfaat dalam bidang farmasi dan kedokteran. Senyawa tersebut diharapkan pula dapat mengatasi masalah timbulnya resistensi *S. pyogenes* terhadap berbagai antibiotik. Maka, untuk mengetahui informasi protein Mga pada tingkat molekul diperlukan protein Mga rekombinan murni dalam jumlah yang cukup besar, karena protein Mga rekombinan murni akan digunakan untuk skrining senyawa bioaktif asal Indonesia dan untuk menguji situs aktivator gen *emm*. Selain itu protein Mga rekombinan murni digunakan untuk produksi antibodi poliklonal pada kelinci, antibodi ini digunakan untuk mendeteksi protein Mga rekombinan dengan cara imunokimia, sehingga berfungsi sebagai kontrol positif untuk protein Mga rekombinan yang diproduksi melalui eksperimen berbeda. Pada penelitian ini, untuk memproduksi protein Mga digunakan teknik DNA rekombinan yang dikombinasi dengan kromatografi afinitas[2,7,11)]. Fusi protein pengikat maltosa (MBP) dengan Mga dibuat dengan membuat rekombinasi DNA antara gen *mga49* dengan *malE*. Hasilnya disisipkan ke vektor pMALc2 dan menghasilkan plasmid pMALMga yang ditransformasi ke *Escherichia coli* sebagai sel inang[2,6)]. MBP akan berikatan dengan matriks kolom resin maltosa pada kromatografi afinitas sehingga pemurnian dapat dilakukan dengan mudah.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dalam tulisan ini dilaporkan tentang perlunya dilakukan suatu penelitian untuk menentukan teknik terbaik pada overproduksi protein Mga rekombinan, metode purifikasi yang dapat menghasilkan protein Mga rekombinan dengan kemurnian tinggi, dan teknik terbaik produksi antibodi poliklonal untuk karakterisasi protein Mga rekombinan. Overproduksi protein Mga *S. pyogenes* dari *E. coli* pMALMga rekombinan, meliputi tahap deteksi keberadaan gen *mga49* pada pMALMga, pembuatan kurva pertumbuhan, optimasi overproduksi, pemurnian protein Mga dengan kromatografi afinitas, dan produksi antibodi poliklonal terhadap protein Mga dalam serum kelinci. Antibodi poliklonal yang dihasilkan dianalisa menggunakan teknik *dot blot* dan *Western blot*.

2. Bahan dan Metode

Bahan-bahan yang digunakan adalah *Escherichia coli* pMALMga yang membawa gen *mga49*, *Escherichia coli* pMALc2, antibodi terhadap MBP, media cair dan padat Luria Bertani, kelinci jenis Albino dari New Zealand, antibodi primer, antibodi sekunder, dan zat-zat kimia yang digunakan untuk overproduksi, elektroforesis, purifikasi, produksi antibodi, *dot blot* dan *Western blot.* Zat-zat kimia yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kapasitas p.a (*pro analysis*).

2.1. Overekspresi gen *mga49* dalam *E. coli* (pMALMga)

Bakteri *E. coli* yang mengandung plasmid pMALMga ditanam dalam medium LB cair (tripton 1% b/v, ekstrak *rag* 0,5% b/v, NaCl 1% b/v dalam akuades) yang mengandung glukosa 0,2% b/v atau yang tidak mengandung glukosa. Protein Mga rekombinan akan dihasilkan sebagai protein fusi dengan pengikat maltosa. Untuk overproduksi protein fusi MBP-Mga rekombinan, maka dilakukan induksi dengan penambahan 0,3 mM IPTG (Isopropil-β-D-tiogalaktosida). Lalu untuk menentukan waktu optimal ekspresi, maka dilakukan sampling pada 1 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam, 5 jam dan 6 jam setelah induksi. Sel dipanen dengan cara sentrifugasi, kemudian ditambah buffer sodium-tris-etilendiamintetraasetat (NaCl 5 M, EDTA 0,5 M, Tris-HCl 1 M), diresuspensi dan disentrifugasi kembali sebanyak dua kali. Pelet sel dilisis dengan sonikator, dan protein dipisahkan dari debris sel dengan cara sentrifugasi pada kecepatan tinggi. Protein yang diambil adalah protein yang berada dalam supernatan.

2.2. Pemurnian Protein Fusi MBP-Mga.

Pemurnian protein fusi MBP-Mga dilakukan dengan kromatografi afinitas menggunakan kolom resin amilosa. Protein Mga yang dihasilkan sebagai protein fusi dengan pengikat maltosa dimasukkan ke dalam kolom amilosa dan diinkubasi selama 1-2 jam. Hal ini bertujuan agar protein fusi dapat menempel pada ligan. Kolom kemudian dicuci dengan buffer (Tris.Cl 20 mM pH 7,4, NaCl 0,2 M, 2-merkaptoetanol 10 mM, dan EDTA 1 mM) sebanyak 100 X volume kolom, untuk menghilangkan kontaminan. Selanjutnya protein dilepaskan dari ligan dengan mengalirkan buffer elusi (Tris.Cl 20 mM pH 7,4, NaCl 0,2 M, 2-merkaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, dan maltosa 10 mM) ke dalam kolom. Setiap 1,5 ml hasil elusi ditampung sebagai fraksi-fraksi yang diamati dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm. Fraksi yang menunjukkan absorbansi pada 280 nm adalah fraksi yang mengandung protein fusi yang kita inginkan. Analisa kemudian dilakukan dengan SDS-PAGE pada konsentrasi poliakrilamid 12%. Pita tunggal sekitar 104 kDa menunjukkan bahwa protein fusi MBP-Mga yang diperoleh adalah relatif murni.

2.3. Produksi Antibodi untuk Karakterisasi Protein Fusi MBP-Mga

Kelinci yang belum diberi perlakuan diambil darah vena marginalisnya sebanyak 3 ml, darah ini digunakan sebagai kontrol negatif. Protein fusi MBP-Mga rekombinan murni dengan konsentrasi 50-200 µg / 0,75 ml dibuat larutan dengan 0,75 ml *Freund's complete adjuvant*. Larutan ini disuntikkan di bawah kulit kelinci dengan volume maksimal 0,15 ml. Penyuntikan dilakukan di 10 tempat *intradermal*. Setelah 10 hari dari penyuntikan pertama, serum kelinci diambil untuk dianalisa antibodinya. Pemisahan serum dari sel darah merah dilakukan dengan cara sentrifugasi. Kemudian dilakukan penyuntikan kedua dengan volume maksimal 0,15 ml. Larutan yang disuntikkan terdiri dari 0,75 ml *incomplete adjuvant* dengan 50-200 µg / 0,75 ml protein fusi MBP-Mga rekombinan. Penyuntikan dilakukan pada 10 tempat *intradermal*. Sepuluh hari kemudian, serum kelinci diambil lagi untuk dianalisa antibodinya. Penyuntikan antigen pada kelinci dilakukan sampai tidak menginduksi antibodi. Antibodi terhadap protein fusi MBP-Mga diamati dengan *dot blot* dan *Western blot.* Pewarnaan dilakukan dengan penambahan *nitroblue tetrazolium* dan 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat dalam buffer alkalin fosfatase.

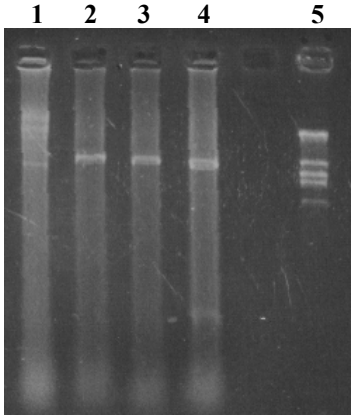
2.4. Absorpsi Terhadap Antibodi MBP

Antibodi terhadap protein fusi MBP-Mga yang telah dibuat di kelinci diambil sebanyak 1 ml dengan kadar 1.663 µg/ml. Protein MBP murni disiapkan dengan kadar 282; 423; 564; 705; 846 µg/ml antibodi. Kemudian 1 ml antibodi dicampurkan terhadap MBP-Mga dengan protein MBP murni tersebut, diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 4 ^{o}C, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm. Protein MBP murni dan antibodi yang terikat padanya akan membentuk endapan pada tabung. Akhirnya pada supernatan hanya tertinggal antibodi yang hanya mengenali protein Mga, untuk penambahan protein MBP murni dengan kadar tertentu. Jadi untuk menyerap antibodi terhadap protein MBP diperlukan protein MBP murni.

3. Hasil dan Diskusi

3.1. Optimasi overproduksi protein fusi MBP-Mga

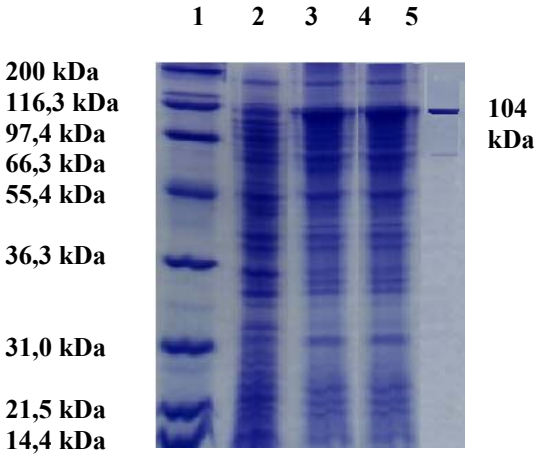
Sebelum overproduksi, konfirmasi keberadaan gen *mga49* dalam plasmid pMALMga dilakukan melalui analisis gel elektroforesis. Plasmid pMALMga rekombinan mempunyai ukuran sekitar 7,2 kb. Dalam analisis ini digunakan enzim restriksi *Eco*RI dan *Bam*HI, baik untuk *single digest* maupun *double digest*. Hasil elektroforesis ditunjukkan dalam Gambar 1. Dapat dilihat bahwa ukuran pMALMga yang diperoleh adalah sesuai dengan yang diharapkan, yaitu sekitar 7,2 kb. Hal ini menunjukkan bahwa gen *mga49* memang masih ada dalam pMALMga.



Gambar 1. Elektroforegram hasil isolasi plasmid.
(1) Plasmid pMALMga; (2) pMALMga dipotong dengan *Eco*RI; (3) pMALMga dipotong dengan *Bam*HI; (4) pMALMga dipotong dengan *Eco*RI/*Bam*HI; (5) Marker λ_{EcoRI}.

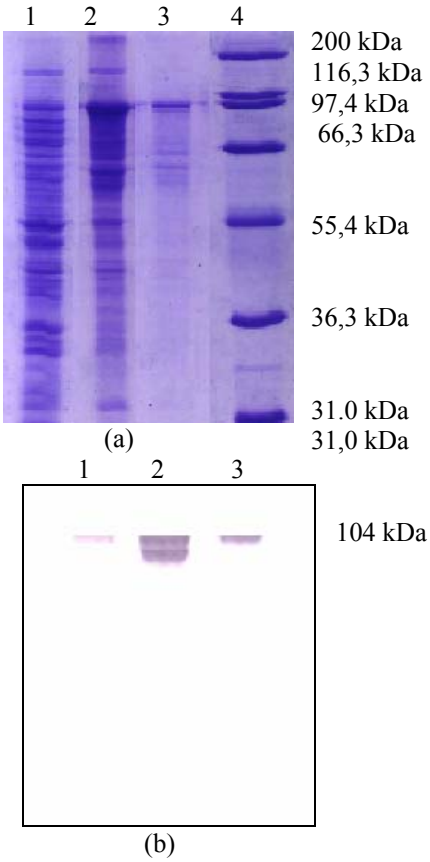
Setelah isolasi plasmid, dibuat kurva standar albumin manusia melalui pengukuran A_{280} dan kadar protein fusi MBP-Mga ditentukan menggunakan standard albumin tersebut. Kurva pertumbuhan *E. coli* pMALMga menunjukkan bahwa OD_{600} = 0,7 dicapai rata-rata setelah 3,5 jam dalam medium LB yang mengandung 0,2% glukosa dan 6 jam dalam medium LB tanpa glukosa. Overproduksi diupayakan dengan penambahan IPTG kedalam medium hingga konsentrasi 0,3 mM pada saat OD_{600} = 0,7. Hasil analisis dengan SDS-PAGE menunjukkan perbedaan yang jelas antara *E. coli* pMALMga yang diinduksi

dengan yang tidak diinduksi (Gambar 2). Pita protein fusi MBP-Mga paling tebal didapat dari sampel protein kasar *E. coli* pMALMga yang diinduksi selama 2 jam dalam medium LB yang mengandung 0,2% glukosa dan 4 jam dalam medium LB yang tidak mengandung glukosa. Hal ini ditunjukkan dalam Gambar 2 jalur 3 dan 4. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa protein fusi MBP-Mga mempunyai massa molekul sekitar 104 kDa, yang terdiri atas 49 kDa protein MBP dan 55 kDa protein Mga.



Gambar 2. Elektroforegram protein fusi MBP-Mga yang diproduksi dari *E. coli* pMALMga.
(1) Protein marker; (2) Protein kasar *E. coli* pMALMga non induksi; (3) Protein kasar *E. coli* pMALMga yang diinduksi 4 jam dalam medium LB; (4) Protein kasar *E. coli* pMALMga yang diinduksi 2 jam dalam medium LB + 0,2 % Glukosa; (5) Protein fusi MBP-Mga hasil purifikasi.

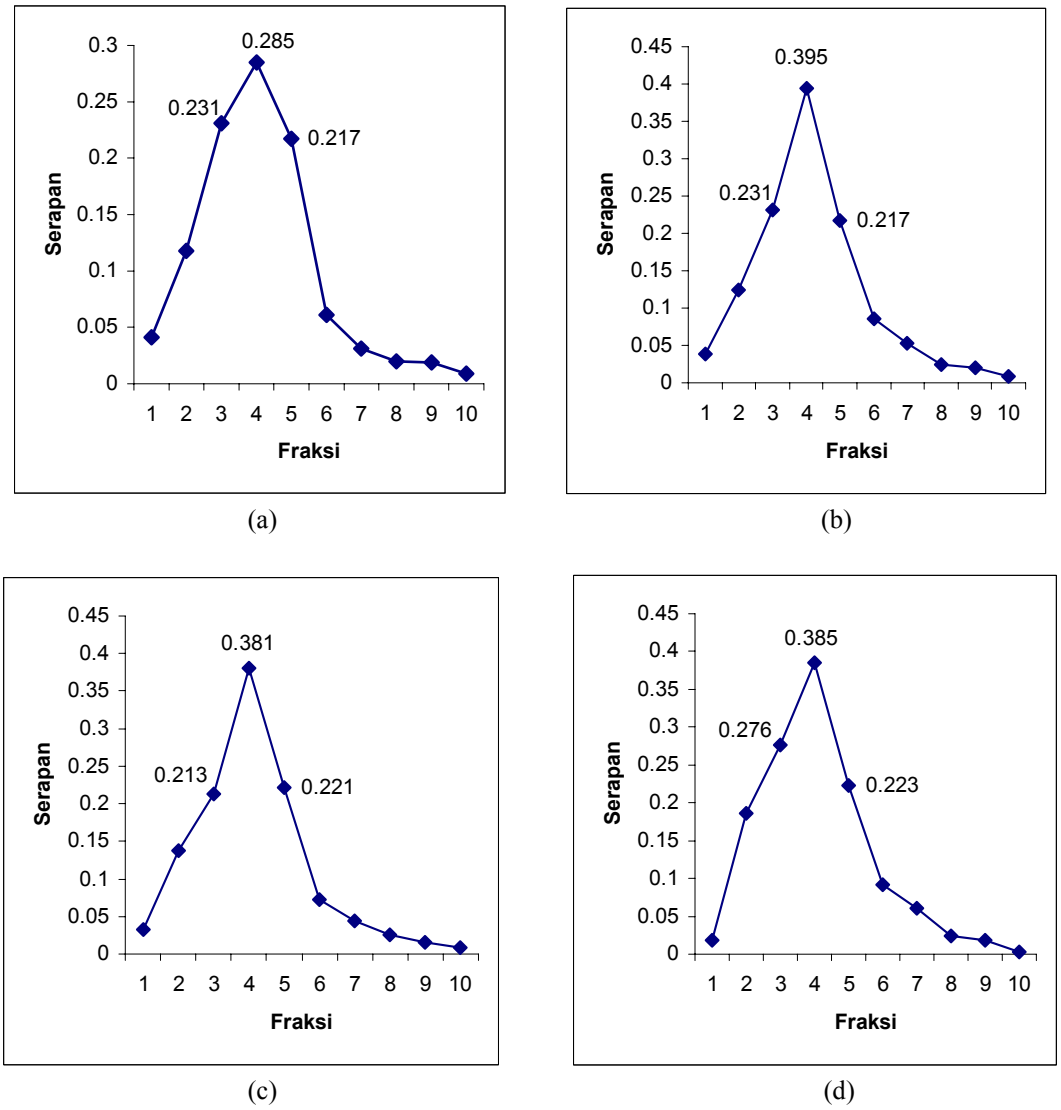
Untuk membuktikan bahwa protein yang terekspresi adalah protein MBP-Mga, maka dilakukan uji imunokimia dengan menggunakan antibodi yang bereaksi positif terhadap protein pengikat maltosa. Ternyata setelah dilakukan uji imunokimia protein MBP-Mga memberikan reaksi positif, hal ini terjadi karena protein Mga difusikan dengan protein pengikat maltosa. Reaksi positif yang terjadi sebagai respons protein MBP terhadap antibodinya. Gambar 3 berikut menunjukkan hasil uji imunokimia terhadap protein kasar *E. coli* pMALMga yang non induksi, protein kasar *E. coli* pMALMga yang diinduksi, dan protein MBP-Mga murni.



Gambar 3. (a) Elektroforegram protein fusi MBP-Mga, (b) Hasil *western blot* antibodi MBP terhadap protein fusi MBP-Mga.
(1) Protein kasar *E. coli* pMALMga non induksi; (2) Protein kasar *E. coli* pMALMga yang diinduksi; (3) Protein fusi MBP-Mga hasil purifikasi; (4) Protein marker.

3.2. Purifikasi Protein Fusi MBP-Mga dengan Kromatografi Afinitas

Protein fusi MBP-Mga hasil overekspresi dimurnikan dengan kolom amilosa pada pH 7,4, menggunakan *wash buffer* (20 mM Tris.Cl pH 7,4, NaCl 0,2 M, 2-merkaptoetanol 10 mM, dan EDTA 1 mM) dan *elution buffer* (20 mM Tris.Cl pH 7,4, NaCl 0,2 M, 2-merkaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, dan maltosa 10 mM). Pemurnian dilakukan 4 kali. Fraksi yang diambil setiap kali pemurnian adalah 10 fraksi, setiap fraksi 1,5 ml dan dimonitor dengan pengamatan A_{280}. Gambar 4 menunjukkan pengukuran serapan fraksi-fraksi protein MBP-Mga pada pemurnian pertama sampai ke empat. Elektroforegram sampel protein fusi MBP-Mga hasil pemurnian memberikan satu pita dengan massa molekul sekitar 104 kDa (Gambar 2 jalur 5). Hal ini menunjukkan bahwa protein fusi MBP-Mga yang diperoleh adalah relatif murni. Perbandingan kadar protein kasar *E. coli* pMALMga hasil induksi dengan protein MBP-Mga murni hasil purifikasi menggunakan kolom resin amilosa, dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 4. Pengukuran serapan fraksi-fraksi protein fusi MBP-Mga

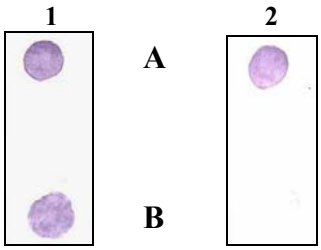
Tabel 1. Kadar protein kasar *E. coli* MALMga dan protein MBP-Mga murni hasil purifikasi dengan kolom resin amilosa.

Protein Kasar *E. coli* pMALMga (µg/ml)	Protein MBP-Mga murni (µg/ml)
1.897	232
1.890	286
1.901	273
1.898	306

3.3. Produksi Antibodi Poliklonal

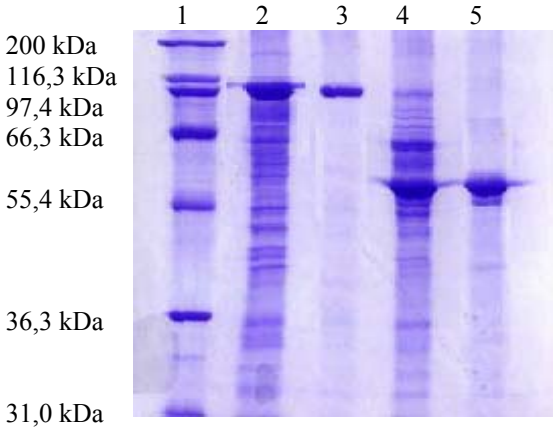
Protein kasar *E. coli* pMALMga non-induksi, protein kasar *E.coli* pMALMga yang diinduksi dan protein fusi MBP-Mga hasil pemurnian memberikan reaksi positif terhadap antibodi serum kelinci yang telah disuntik dengan protein MBP-Mga murni yang dicampur *Freund's complete adjuvant* (penyuntikan primer) dan *incomplete adjuvant* (penyuntikan sekunder). Antibodi poliklonal yang dihasilkan adalah antibodi yang mengenali protein MBP-Mga. Pada penelitian ini yang akan diperlukan adalah antibodi terhadap protein Mga, maka untuk menghilangkan antibodi terhadap protein MBP yang ada dalam serum dilakukan adsorpsi. Adsorpsi terhadap antibodi MBP dilakukan dengan menambahkan protein MBP murni yang diproduksi dari *E. coli* pMALc2 dan purifikasi menggunakan kolom resin amilosa. Jumlah protein MBP yang ditambahkan adalah 0,564 µg/µl serum yang mengandung antibodi poliklonal terhadap MBP-Mga. Gambar 5 menunjukkan reaksi antara antibodi dengan antigen sebelum dan sesudah dilakukan adsorpsi terhadap antibodi MBP. Ternyata setelah antibodi diadsorpsi dengan protein MBP, reaksi positif hanya terjadi dengan protein MBP-Mga sedangkan dengan protein MBP reaksi negatif, sebab yang tertinggal hanya antibodi terhadap protein Mga. Hasil analisis *dot blot* menunjukkan bahwa

pengenceran serum 1:10.000 (v/v) merupakan pengenceran terendah yang memberikan reaksi positif.

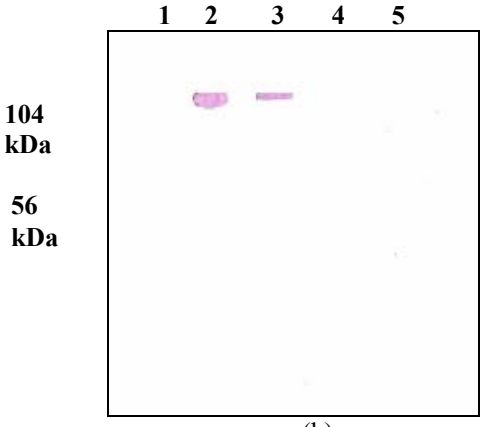


Gambar 5. Hasil analisis antibodi terhadap protein MBP-Mga dan MBP sebelum dan sesudah dilakukan adsorpsi.
(1) Antibodi terhadap MBP-Mga yang tidak diadsorpsi dengan MBP murni; (2) Antibodi terhadap MBP-Mga diadsorpsi dengan MBP murni 0,564 µg/µl antibodi; (A) Protein MBP-Mga murni dengan kadar 80 ng; (B) Protein MBP murni dengan kadar 80 ng.

Berdasarkan data di atas antibodi poliklonal terhadap protein fusi MBP-Mga telah berhasil dibuat pada kelinci. Untuk melihat apakah antibodi yang telah diadsorpsi dengan MBP murni mempunyai reaksi silang dengan protein lain, maka dilakukanlah *western blot.* Tujuan *western blot* adalah untuk mendeteksi keberadaan protein MBP-Mga pada protein kasar *E. coli* pMALMga yang diinduksi dan protein MBP-Mga murni. *Western blot* dilakukan dengan pengenceran 1 : 10.000. Hasil analisis *western blot* menunjukkan bahwa antibodi yang dibuat hanya bereaksi positif dengan protein MBP-Mga dan bereaksi negatif terhadap protein lain (Gambar 6).



(a)



(b)

Gambar 6. (a) Elektroforegram protein MBP-Mga dan protein MBP, (b) Hasil analisis antibodi terhadap protein MBP-Mga dan protein MBP menggunakan metode *western blot.*
(1) Protein marker; (2) Protein kasar *E. coli* pMALMga yang diinduksi; (3) Protein MBP-Mga murni; (4) Protein kasar *E. coli* pMALc2 yang diinduksi; (5) Protein MBP murni.

4. Kesimpulan

Produksi protein fusi MBP-Mga *Streptococcus pyogenes* dari *Escherichia coli* pMALMga telah berhasil ditingkatkan dengan penambahan IPTG 0,3 mM, selama 2 jam dalam medium LB yang mengandung 0,2% glukosa. Protein ini telah berhasil dimurnikan menggunakan kromatografi afinitas dengan kolom resin amilosa. Analisis SDS-PAGE menunjukkan adanya satu pita dengan massa molekul sekitar 104 kDa.

Antibodi poliklonal terhadap protein fusi MBP-Mga dapat dibuat pada kelinci. Analisis *dot blot* menunjukkan bahwa pengenceran tertinggi serum kelinci yang masih memberikan hasil positif adalah 1 : 10.000 (v/v). Adsorpsi terhadap antibodi poliklonal yang bereaksi positif dengan MBP dilakukan dengan menambahkan protein MBP murni yang diproduksi oleh *E. coli* pMALc2 rekombinan dengan konsentrasi 0,564 µg/µl serum ke dalam antibodi poliklonal yang bereaksi positif dengan protein fusi MBP-Mga. Hasil *dot blot* dan *western blot* menunjukkan bahwa antibodi poliklonal yang dihasilkan memberikan reaksi positif terhadap protein Mga rekombinan dan reaksi negatif dengan protein lain.

Hasil penelitian protein Mga rekombinan diharapkan dapat dikembangkan untuk penemuan senyawa bioaktif asal Indonesia yang dapat digunakan sebagai anti mikroba baru terhadap infeksi *S. pyogenes*. Sedangkan antibodi poliklonal terhadap protein Mga rekombinan akan digunakan untuk karakterisasi protein Mga rekombinan yang dihasilkan dari riset lain.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh Hibah Tim *(Project URGE Batch IV)* dari Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia. Peneliti mengucapkan terimakasih kepada anggota Hibah Tim yang telah memberikan kesempatan untuk turut serta dalam penelitian ini.

Terimaksih kepada Prof. Andreas Podbielski, M. D. Ph.D, dari *Dept. of Med. Microbiology, University Hospital Ulm, Robert-Koch-Strasse 8, D-89081 Ulm, Germany* atas pemberian bakteri *E. coli* pMALMga dan *E. coli* pMALc2, serta antibodi poliklonal terhadap protein pengikat maltosa (MBP) untuk digunakan dalam penelitian ini.

Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada PT. Biofarma Indonesia di Bandung yang telah menyediakan fasilitas untuk pembuatan antibodi poliklonal terhadap protein fusi MBP-Mga.

Daftar Pustaka

1. Retnoningrum, D.S., & Cleary, P.P., "M12 Protein from *Streptococcus pyogenes* is a Receptor for Immunoglobulin G3 and Human Albumin", *Infect. Immun.* **61:1**, 2387 (1994).
2. Schlievert, P.M., Assimacopoulos, A.P., & Cleary, P.P., "Severe Invasive Group A Streptococcal Disease- Clinical Description and Mechanisms of Pathogonesis", *J. Labor. Clin. Med.* **127:1**, 13 (1996).
3. Kisworo, B., "Demam Rematik", *Cermin Dunia Kedokteran* **116:1**, 25 (1997).
4. Fischetti, V.A., Jones, K.F., Hollingshead, S.K., & Scott, J.R., "Structure, Function, and Genetics of Streptococcal M Protein", *Rev. Infect. Dis.* **10:S2**, S356 (1988).
5. La Penta, D., Zhang, X.P., & Cleary, P.P., "*Streptococcus pyogenes* Type Iia IgG Fc Receptor Expression is co-ordiantely Regulated with M Protein and Streptococcal C5a Peptidase", *Mol. Microbiol.* **12:6**, 873 (1994).
6. Podbielski, A., Woischnik, B.P.M., & Schmidt, K.H., "What is the Size of the Group A Streptococcal Vir Regulon? The Mga Regulator Affects Expression of Secreted and Surface Virulence Factors", *Med. Microbiol. Immunol.* **185:3**, 171 (1996).
7. Retnoningrum, D.S., & Cleary, P.P., "Group A Streptoccal Class I M Proteins are Functionally and Structurally Similar to Bacterial Ig Receptors in Pathogenic Streptocci : Present and Future", *Lancer Publication*, 241 (1994).
8. Chen, C., Bormann, N., & Cleary, P.P., "VirR and Mry are Homologous Trans-acting Regulators of M Protein and C5a Peptidase Expression in Group A Streptococci", *Mol. Gen. Genet.* **241:5**, 685 (1993).
9. Kihlberg, B.M., Cooney, J., Caparon, M.G., Olsen, A., & Bjorck, L., "Biological Properties of A *Streptococcus pyogenes* Mutant Generated by Tn916 Insertion in *mga*", *Microbiol. Pathol.* **19:5**, 299 (1995).
10. McIver, K.S., Thurman, A.S., & Scott, J.R., "Regulation of *mga* Transcription in the Group A Streptococcus: Spesific Binding of Mga within Its Own Promoter and Evidence for a Negative Regulator", *J. Bacteriol.* **181:17**, 5373 (1999).
11. McLandsborough, L.A., & Cleary, P.P., "Insertional Inactivation of VirR in *Streptococcus pyogenes* M49 Demonstrates that VirR Function as a Positive Regulator of ScpA, FcRA, OF, and M Protein", *FEMS Microbiol. Lett.* **128:1**, 45 (1995).