

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

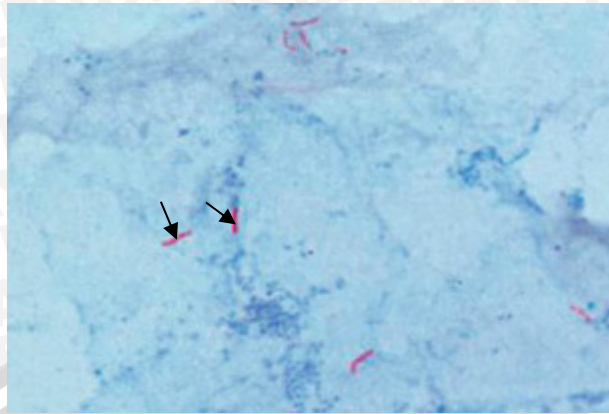
#### 2.1. *Mycobacterium tuberculosis*

##### 2.1.1 Taksonomi

*Mycobacterium* termasuk dalam famili *Mycobacteriaceae* dan berordo *Actinomycetales*. Spesies yang termasuk dalam kompleks *Mycobacterium tuberculosis*, dan yang paling sering dan menjadi agen yang penting untuk menimbulkan penyakit pada manusia adalah *Mycobacterium tuberculosis* atau sering disingkat menjadi *M. tuberculosis*. Kompleks *M. tuberculosis*, termasuk *M. bovis* (basilus tuberkel bovin yang memiliki ciri resisten terhadap pirazinamid, rute penularannya melalui susu yang tidak terpasteurisasi, dan menyebabkan sebagian kecil dari kasus tuberkulosis di dunia), *M. caprae* (sama dengan *M. bovis*), *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, dan *M. canettii* (Raviglione dan O'Brien, 2010).

##### 2.1.2 Morfologi

*Mycobacteria* merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk basil (batang) yang ramping. Mereka non-motil, obligat aerob, dan tidak menghasilkan spora. Dinding selnya mengandung peptidoglikan seperti halnya bakteri Gram positif lainnya. Bersamaan dengan peptidoglikan, banyak sekali rantai polisakarida, lemak, dan protein. Lemak pada dinding sel inilah yang menyebabkan *Mycobacteria* bersifat hidrofobik dan tidak menyerap cat pewarnaan. Sekali tercat, maka warna tidak dapat dilunturkan dengan alkohol. Oleh karena itu, bakteri ini juga disebut basil tahan asam (BTA) (Plorde, 2004).



**Gambar 1. Bakteri *M. tuberculosis* dengan pengecatan Ziehl-Nielsen (ditunjuk anak panah)**

### 2.1.3 Virulensi

Pengertian virulensi mengacu pada pengukuran kuantitatif patogenitas maupun kemungkinan suatu patogen menyebabkan penyakit (Weiss, 2002). Menurut Cross (2008), faktor-faktor virulensi bakterial memungkinkan suatu bakteri untuk bereplikasi, dan menyebar dalam tubuh *host* dengan melemahkan maupun menghindari perlawanan dari *host*.

Faktor-faktor virulensi melekat pada elemen-elemen (misalnya pada produk-produk genetik) yang memungkinkan suatu mikroorganisme berkolonisasi di dalam tubuh *host* dimana organisme tersebut bereplikasi dan menyebabkan kerusakan jaringan maupun menyebabkan inflamasi atau peradangan sistemik. Secara konvensional, faktor-faktor virulensi meliputi protein yang disekresikan, seperti protein-protein enzim atau toksin, dan struktur-struktur permukaan sel, misalnya polisakarida kapsular, lipopolisakarida, dan protein-protein membran luar yang secara langsung berkontribusi dalam proses penyakit. Gen-gen yang mengkode karakteristik virulensi, seperti alat-alat pensекреksi, siderofor, katalase, regulator-regulator, dan lain-lain, yang secara langsung terlibat dalam patogenesis yang sama pentingnya bagi bakteri untuk menginfeksi *host* (Brogden, et. al., 2000).



Menurut Forrelland, et. al. (2013), penentu virulensi *M. tuberculosis* dikategorikan menjadi beberapa kelompok berdasarkan pada fungsi, fitur selular, atau lokalisasi selular, yaitu :

#### 2.1.3.1 Metabolisme lemak dan asam lemak

*M. tuberculosis* adalah bakteri yang memiliki susunan kompleks lipid yang lebar dan lipoglikan pada permukaan selnya. Hal tersebut yang menjadikan bakteri patogen ini unik jika dibandingkan dengan bakteri yang lain (Convers, et. al., 2003). Lemak dinding sel yang eksklusif ini berperan penting dalam patogenesis, oleh karena itu, gen-gen yang bertanggung jawab dalam biosintesis, degradasi, dan transpor yang merupakan faktor-faktor virulensi yang potensial.

Banyak jenis lemak yang telah diketahui peran pentingnya sebagai faktor-faktor virulensi bakteri dan bermacam-macam mekanisme peran selama proses infeksi. Beberapa lemak muncul pada dinding sel mikobakterial yang merupakan ligan kunci untuk reseptor sel *host*, menyebabkan terjadinya pemotongan secara molekuler antara fagosit *host* dan mikobakterial, sehingga terjadi invasi ke sel. Sekalinya masuk ke dalam fagosit, *M. tuberculosis* akan menghindari fusi lisosom dan asidifikasi, kemudian menetap dalam fagosom yang imatur (Armstrong dan Hart. 1979; Russell, 2001).

Beberapa lemak mikobakterial, seperti TDMs, Man-LAM, dan PDIMs (Astarie-Dequeker, et. al., 2009; Axelrods, et. al., 2008; Welin, et. al., 2008) berperan penting dalam *trafficking* intraseluler dan penghambatan maturasi vakuol oleh *M. tuberculosis*. Di samping itu, beberapa lemak mikobakterial membatasi *signaling* sel *host*, sehingga berakibat pada sekresi sitokin yang dibutuhkan untuk proteksi, terlibat dalam proses inflamasi selama proses infeksi tuberkulosis, atau mengenali antigen oleh sistem imun adaptif.

Terlepas dari mekanisme interaksi sel *host*, beberapa lemak juga mempengaruhi virulensi karena mereka menunjukkan fungsi struktural yang

merupakan bagian dari bagian dari sel dinding mikobakterial yang mempresentasikan, khususnya, permeabilitas yang rendah terhadap nutrisi dan obat antimikrobal. Keistimewaan inilah yang menyebabkan lamanya pertumbuhan bakteri dan membuat penyakit tuberkulosis sulit untuk diobati. Sebagai konsekuensi mekanisme aksi, banyak lipid mikobakterial, dan tentu saja, gen-gen yang mengkode protein-protein yang terlibat dalam metabolisme, merupakan faktor-faktor virulensi yang sangat penting dari spesies patogen (Forrellan, et. al., 2013).

#### 2.1.3.2 Protein-protein *cell-envelop* dari *M. tuberculosis* dan fungsinya

Ciri khas dinding sel mikobakterium adalah suatu struktur kompleks protein dan lipid yang berlekuk-lekuk. "Intinya" terdiri dari peptidoglikan yang secara konvalen berbatasan dengan galaktofuran linear yang kemudian melekat pada beberapa *strand* dari cabang arabinofuran digabungkan dengan asam *mycolic* yang merupakan rantai asam lemak alpha-alkil beta-hidroksi. Lemak-lemak ini terletak tegak lurus terhadap *plane* membran dan menyediakan penghalang khusus untuk kebanyakan aspek-aspek fisiologis dan aspek induksi penyakit mikobakterial. Interkalasi yang terdapat dalam intinya, antara lain PDIMs, TDM, SLs, dan PIMs (Mougous, 2004). Kemudian, fosfatidil-mioinositol manosida, lipomanan (LM), dan lipoarabinomanan (LAM) berhenti di plasma membran dan melebar ke eksterior dinding sel.

Kebanyakan lapisan eksternal mikobakteria merupakan suatu struktur yang telah lama dikenali dan dideskripsikan lebih lanjut dibandingkan komponen-komponen dinding sel (Daffé dan Etienne, 1999). Kapsul berisi polisakarida dan sedikit jumlah *inner* lipid. Terdapat beberapa protein-protein yang terdapat di dalam matriks memiliki fungsi berkaitan dengan sintesis dan pemeliharaan dinding sel dan juga bertugas untuk adhesi, infeksi, transpor solusi (porin), dan per-tahanan hidup mikobakteri di dalam sel *host*.



i. Protein-protein dinding sel

Studi-studi proteomik dinding sel mikobakteria telah mengidentifikasi lebih dari 500 protein dalam struktur selnya, termasuk sekresi protein dinding sel dan lipoprotein (Mawuenyega, et. al., 2005; Wolfe, et. al., 2010). Mayoritas protein dinding sel putatif ini terlibat dalam proses pembentukan dinding sel dan metabolisme yang memperantarainya. Di antara protein-protein dinding sel putatif yang teridentifikasi ini, lebih dari 5% dikategorikan sebagai kategori virulensi dan detoksifikasi, dan sekitar 15% dalam kategori metabolisme lipid. Protein dinding sel adalah termasuk protein membran luar atau *outer membrane proteins* (O-MPs) yang kemungkinan besar berada di *outer membrane* bilayer mikobakterial yang telah ditemukan (Hoffmann, et. al., 2008; Zuber, et. al., 2008). Beberapa gen yang terlibat dalam *cell wall* di antaranya :

a. Gen *erp* (*exported repetitive protein*) dan *Erp*

Gen ini mengkode protein yang dibutuhkan untuk multiplikasi atau biosintesis lipopolisakarida (Loscalzo, 2010) dan terletak di antara *glf* dan *csp*. *Erp* adalah protein permukaan terasosiasi-dinding-sel dengan massa molekular 36 kDa yang terletak di permukaan sel. Protein ini ditemukan melalui suatu strategi fusi *phoA* untuk mengidentifikasi protein-protein *M. tuberculosis* yang disekresikan (Berthet, et. al., 1995; Berthet, et. al., 1998; de Mendonça-Lima, et. al., 2003).

Berthet, et. al. (1998) telah membuktikan bahwa mutasi pada gen *erp* menyebabkan kerusakan fungsi multiplikasi dalam makrofag yang dikultur dan pada mencit BALB/c dibandingkan dengan tipe *wild*. Transduksi kembali *erp*, mengembalikan fungsi multiplikasi, sehingga dapat diindikasikan bahwa gen ini merupakan faktor virulensi pada *M. tuberculosis*.

b. *OmpATb* dan Gen *ompA*

OmpATb adalah protein yang membentuk pori-pori atau protein yang mirip dengan pori-pori yang merupakan bagian dari famili OmpA OMPs dan dapat membentuk pori-pori pada liposom (Senaratne, et. al., 1998)

Menurut Raynaud, et. al. (2002), ekspresi *ompA* diinduksi oleh pH rendah dan selama pertumbuhan dalam makrofag. Suatu mutan *ompA* menunjukkan suatu penurunan multiplikasi secara signifikan pada makrofag dibandingkan dengan level tipe *wild* dan ditandai oleh turunnya pertumbuhannya di paru-paru dan limpa mencit BALB/c dibandingkan tipe *wild*.

Transkripsi gen *ompA* meningkat pesat pada pH rendah disebabkan akti-vitas porin dalam kondisi asam. Seperti yang telah diperkirakan, pertumbuhan mutan gen *ompA* pada pH rendah dipengaruhi pula oleh *uptake* metabolik larut air seperti serin (Raynaud, et. al., 2002).

## ii. Lipoprotein

Lipoprotein atau disingkat Lpps menyusun suatu komponen mayor dari dinding sel *M. tuberculosis*. Lpps pada *M. tuberculosis complex* diprediksi berhubungan dengan perubahan fungsi seluler, termasuk transpor, metabolisme dinding sel, adhesi sel, degradasi protein dan sinyal, dan juga beberapa lipoprotein berperan dalam virulensi. Hubungan antara Lpps dengan virulensi telah dibuktikan pada tahun 2004. Penemuan baru-baru ini mengenai dinding sel baru diasosiasikan Lpps potensial melalui gabungan separasi fase Triton X<sub>114</sub> ke spektrometri massa (Målen, et. al., 2010) memperlihatkan banyaknya hal yang perlu dieksplorasi dari famili protein ini. Bukti-bukti yang berbeda mengindikasikan bahwa Lpps dapat terlibat virulensi secara langsung maupun tak langsung.

### 1. LpqH (19-kDa Lipoprotein Antigen)

LpqH pertama kali dideskripsikan sebagai antigen lipoprotein 19 kDa *M. tuberculosis* (Young dan Garbe, 1991). Studi belakangan ini menunjukkan bahwa



LpqH diduga merupakan suatu glikoprotein (González-Zamorano, et. al., 2009). Glikoprotein 19 kDa *M. tuberculosis* (p19) dapat menghambat proses antigen MHC-II dan presentasinya terhadap makrofag (Tobian, et. al., 2003) serta menurunkan respon makrofag terhadap infeksi *M. tuberculosis* (Noss, et. al., 2001). Hambatan ini terjadi karena adanya blokade sinyal interferon gamma melalui mekanisme *Toll-like receptor 2-dependent* (TLR-2). Lipoprotein 19 kDa, seperti halnya lipopeptida sintesis, menginduksi maturasi sel dendritik. Setengah dari lipid lipo-peptida telah terbukti menginduksi maturasi sel dendritik (Hertz, et. al., 2001). Sebagai tambahan properti imunomodulator yang kuat, paparan neutrofil terhadap lipoprotein 19-kDa *M. tuberculosis* melengkapi dan mengaktifkan neutrofil (Neufert, et. al., 2001). Paparan makrofag terhadap protein ini memungkinkan adanya apoptosis, menghindarkan dan menyebarkan basil (López, et. al., 2003).

Gen pengkode p19 *M. tuberculosis* matur telah dikloning sebelumnya ke dalam sisi pada *Sma*I Qiagen (Mississauga, Ontario, Kanada) menggunakan pQE-30 vektor plasmid (Abou-Zeid, et. al., 1997). Protein p19 diproduksi sebagai protein rekombinan His-tag yang difusi enam residu-residu His (histidin) pada terminal akhir asam aminonya. Bentuk re-kombinan p19 mengurangi empat asam amino awalnya yang menggantikan *site* modifikasi lipid (lemak). Modifikasi ini memicu solubilitas selama prosedur ekstraksi. p19 His-tag dipurifikasi dari *E. coli* menggunakan TALON *Metal Affinity Resin* yang berbasis kobalt. Spesifikasi protein terhadap p19 dilakukan menggunakan metode *immunoblotting* dengan mAb spesifik terhadap p19 (López, et. al., 2003).

## 2. PstS-1 (38-kDa Ag; phoS atau phoS1)

PstS-1 termasuk famili transfer fosfat ABC, homolog dengan sistem Pst pada *E. coli*. PstS-1, *phosphat binding subunit*, dikode oleh gen yang dikelilingi *pstB*, *pstC-1*, dan *pstA-2* dalam suatu operon potensial (*pstB*, *pstS-1*,

*pstC-1*, dan *pstA-1*) (Andersen dan Hansen, 1989). Protein ini dideskripsikan sebagai salah satu glikoprotein yang pertama dilaporkan pada *M. tuberculosis* (Estipicia dan Mancilla, 1989) dan merupakan suatu antigen yang imunodominan pada pasien tuberkulosis (Espitia, et. al., 1989). Protein Ag38 kDa dari *M. Tuberculosis* mengandung epitop-epitop sel B dan memiliki spesifitas terhadap kompleks *Mycobacterium* (Beck, et. al. 2005).

### iii. Sistem sekresi

Sekresi protein merupakan mekanisme yang sangat penting dengan lingkungan untuk adaptasi kelangsungan hidup. Selain itu, sistem ini juga penting untuk berinteraksi dengan sel inang dengan mengirim toksin/ sinyal-sinyal dari protein yang memungkinkan spesies bakteri berbeda yang dapat menyebabkan patologi. Terlebih lagi, sistem sekresi yang telah berevolusi, melakukan duplikasi dan divergen untuk melakukan fungsi-fungsi tertentu. Beberapa dari mereka yang terlibat dalam patogenisitas, yang mengarah ke deskripsi sejumlah besar sistem tersebut. Beberapa kelompok gen pengkodean protein yang disekresikan ke lingkungan melalui jalur khusus telah diidentifikasi dalam *mycobacteria*, sehingga mereka dianggap penting bagi patogenesis mikobakteri (Forrellad, et. al., 2013).

Suatu studi menyatakan bahwa mikobakteria telah mengembangkan suatu sistem sekresi yang baru dan khusus untuk transpor protein ekstraseluler melintasi dinding selnya yang hidrofobik dan sangat impermeabel. Abdallah et. al. telah membahas jalur sekresi yang baru ini dan mempertimbangkan variasi-variasi yang muncul pada bakteri Gram positif lainnya. Karena komposisi sistem sekresi ini unik dan cukup penting, Abdallah et. al. mengusulkan adanya nomenklatur yang diterima, disebut dengan *type seven secretion system*(T7SS) (Abdallah, et. al., 2007).



*M. tuberculosis* terdiri atas lima T7SS, juga disebut ESX, yang menunjukkan suatu persamaan konten dan urutan genetik. Salah satu contoh virulen pada *M. tuberculosis complex* yang disekresi oleh T7SS adalah ESX-1 yang terdiri atas ESXA (target antigenik sekresi awal 6-kDa, atau juga disebut ESAT6) dan ESXB (protein filtrat kultur 10-kDa, atau sering disebut CFP<sub>10</sub>). ESAT6 dan CFP<sub>10</sub> dibutuhkan sebagai virulens penuh spesies *M. tuberculosis complex* (Wards, et. al., 2000).

ESAT6 dan CFP10 adalah protein kecil, sekitar 9 dan 10 kDa masing-masing, dengan *self-affinity* yang sangat tinggi dan muncul sebagai heterodimer dalam supernatan kultur. Kedua protein adalah bagian dari keluarga protein besar di mikobakteri dan beberapa bakteri Gram-positif. Keluarga ini ditandai dengan *signature* WXG terletak di bagian tengah dari sekitar 100 asam amino ukuran protein (Pallen, 2002). ESAT6 dan CFP10 telah digambarkan sebagai antigen dominan yang dikenali oleh sel T pada infeksi alami pada manusia dan *bovine* dan hewan-hewan yang terinfeksi secara eksperimental (Ravn, et. al., 1999; Aagaard, et. al., 2010).

Belum lama ini telah ditemukan bahwa translokasi *M. tuberculosis* dari fagosom ke dalam sitoplasma sel inang pada tahap akhir dari infeksi difasilitasi oleh ESAT6 dan CFP<sub>10</sub> (van der Wel, et. al., 2007). Pada hari ke-4 hingga 7 setelah terinfeksi *M. tuberculosis* lebih dari sepertiga sel dendritik manusia non-apoptosis mengandung bakteri, efek ini tidak diamati ketika BCG atau *M. tuberculosis* ESX-1 transposon mutan digunakan untuk menginfeksi (van der Wel, et. al., 2007). Pengamatan ini menunjukkan bahwa ESX-1 sistem mungkin memberikan kesempatan pada *M. tuberculosis* dengan yang dibutuhkan alat untuk melarikan diri dari kompartemen fagosomal sel fagosit profesional dan / atau melepaskan protein ESAT6 ke sitoplasma, di mana mereka mendapatkan akses ke mesin proses kelas I yang terkandung dalam proteasom. Kejadian-

kejadian tersebut akan menjelaskan perekrutan dan aktivasi sel T CD8 yang ditemukan di paru-paru tikus aerosol yang terinfeksi *M. tuberculosis*. Ini menjadi indikasi kuat bahwa protein tersekresi ESX-1 mencapai sitoplasma eukariotik. Penelitian lain menunjukkan bahwa ESAT6 mencegah fungsi sel *antigen-presenting* dengan menghambat jalur sinyal TLR, yang pada gilirannya mengurangi produksi IL-12 THP1 makrofag dan menghambat sinyal apoptosis makrofag juga (Pathak, et. al., 2007).

## 2.2. Vaksin

Concise encyclopedia (2013) mendefinisikan vaksin sebagai preparat yang berisi mikroorganisme yang dilemahkan maupun dimatikan atau berupa toksin yang diadministrasikan secara oral, injeksi, maupun spray nasal untuk menstimulasi produksi antibodi melawan agen infeksius. Imunitas yang timbul terhadap agen infeksius tersebut kemudian mensensitisasi limfosit B untuk merespon dan memproduksi antibodi jika terjadi paparan infeksi di kemudian hari.

Cara kerja vaksinasi, yaitu dengan mengaktifasi sel CD4<sup>+</sup> naif yang mengenali antigen melalui sel dendritik. Sel ini mempresentasikan peptida yang berasal dari protein antigen yang telah diendositososis yang berasosiasi dengan MHC kelas II dan sel T CD4<sup>+</sup>. Sel dendritik juga merespon struktur mikroba dengan mengekspresikan kostimulator-kostimulator, seperti sitokin IL-12. Sinyal dari sitokin ini berguna untuk mengaktifasi dan digunakan untuk diferensiasi sel T CD4<sup>+</sup>.

Selain itu, paparan antigen juga menyebabkan aktivasi dan diferensiasi sel limfosit B naif menjadi sel memori dan sel yang memproduksi antibodi. Antibodi inilah yang nantinya bertahan lama sehingga pada paparan berikutnya dengan antigen yang sama, akan menyebabkan aktivasi sel B lebih besar dan cepat (Abbas, Lichtman, dan Pillai, 2007).



## 2.4 Protein

Protein merupakan kumpulan dari ratusan hingga ribuan unit asam amino dan mengandung rantai karbon, hidrogen, dan oksigen seperti halnya karbohidrat maupun lipid, namun, protein juga mengandung nitrogen, bahkan fosfor dan sulfur (Dorland, 1998). Amida mengandung nitrogen dan nitrogen menyusun 16% kandungan protein. Asam amino-asam amino ini diikat oleh ikatan peptida dan membentuk rantai yang disebut rantai polipeptida. (Shipman, Wilson, dan Todd, 1993). Menurut Ophardt (2003), protein memiliki tiga struktur utama, yaitu struktur primer, sekunder, dan tersier.

- i. Struktur protein primer didefinisikan sebagai sekuens (rangkaian) spesifik dari asam amino dalam protein.
- ii. Struktur protein sekunder adalah bentuk geometrik spesifik yang disebabkan oleh ikatan hidrogen intramolekular dan intermolekular kelompok-kelompok asam amino. Geometri ini diasumsikan oleh rantai protein secara lengkap dengan konsep geometri molekular teori hibridisasi. Hasil penelitian secara fotografi X-Ray dan model konstruksi molekular, Linus Pauling dan Robert Cory, pada tahun 1951, mengusulkan bahwa struktur sekunder protein berbentuk alfa-heliks atau lembaran lipatan beta.

- a. Heliks alfa

Pada heliks alfa, rantai peptida bergelung membentuk pola pegas. Kerangka peptida membentuk bagian dalam gelungan, sedangkan bagian lainnya melebar hingga ke arah luar gelungan. Heliks distabilisasi oleh ikatan hidrogen antara  $>N-H$  satu asam amino dan  $>C=O$  pada asam amino keempat dari asam amino yang pertama.

- b. Lembaran lipatan beta

Pada struktur ini, rantai protein individual diluruskan dari satu sisi ke sisi yang lain dengan menggunakan tiap-tiap rantai protein yang diluruskan pada lokasi yang berlawanan. Rantai protein diikat oleh ikatan hidrogen intermolekular, dimana ikatan hidrogen ini menjadi pemisah dua kelompok amida. Ikatan hidrogen pada lembaran lipatan beta berbeda sama sekali dengan ikatan hidrogen intramolekular pada heliks-alfa.

Hidrogen pada amida rantai protein satu merupakan hidrogen yang berikatan dengan oksigen amida pada rantai protein sebelahnya.

iii. Struktur tersier protein merupakan bentuk geometrik spesifik final yang diasumsikan pada protein. Bentuk final ini ditentukan oleh varietas interkasi-interaksi ikatan antara “rantai-samping” pada asam-asam amino. Interaksi-interaksi ikatan ini mungkin lebih kuat dibandingkan ikatan hidrogen antara kelompok-kelompok amida yang mengikat stuktur helikal. Sehingga, interaksi-interaksi ikatan antara “rantai-samping” menyebabkan banyaknya lipatan, lekukan, dan lengkungan pada rantai protein. Berbeda dengan fragmen-fragmen pada rantai yang sama mungkin menjadi terikat menjadi satu.

### 2.3.1. Polyhistidine-tag (His-tag)

Telah banyak metode dilakukan menggunakan *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC) untuk mempurifikasi protein-protein rekombinan yang memiliki afinitas *tag* pendek terdiri dari residu-residu polihistidin. IMAC sendiri didasari oleh interaksi antara suatu ion logam transisi ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , dan  $\text{Zn}^{2+}$ ) yang terimobilisasi pada matriks dan rantai-rantai sisi asam amino spesifik. Histidin merupakan suatu asam amino yang mengekshibit interaksi terkuat dengan matriks-matriks ion logam yang terimobilisasi, sebagai kelompok-



kelompok donor pada cincin histidin imidazol yang siap membentuk ikatan koordinasi dengan logam transisi terimobilisasi. Peptida-peptida yang mengandung rangkaian residu histidin konsekutif akan tertahan pada IMAC secara efektif. Dengan mencuci (*washing*) material matriks tersebut, peptida-peptida yang mengandung residu histidin konsekutif dapat dielusi dengan mudah baik dengan mengatur pH larutan penyangga kolom atau dengan menambahkan imidazol secara bebas (Terpe, 2003).

His-tag sendiri mengkombinasikan kelebihan yang berukuran kecil dengan menambahkan keuntungan interaksi dengan matriks kromatografi (seperti resin Ni-NTA) yang relatif tidak mahal, dapat diregenerasi berulang kali meskipun pada kondisi sanitasi yang keras, dan memberikan kapasitas *binding* yang besar. Terlebih lagi, kondisi pada saat elusi cukup ringan dan fleksibel (imidazol 100-250 mM pH <5.0, atau EDTA 10 mM). His-tag juga bekerja dengan baik pada kondisi denaturasi. Jika suatu protein rekombinan His-tag tidak terlarut (*insoluble*) pada *E. coli*, protein tersebut tetap dapat dipurifikasi menggunakan IMAC pada kondisi denaturasi dan *refolded* (Vaugh, 2005).

### 2.3.2. Denaturasi dan Renaturasi Protein (*Unfolding* dan *Refolding*)

Denaturasi dan renaturasi protein merupakan awal dari proses *fold*ing (pelipatan) protein. *Fold*ing protein adalah suatu proses dimana suatu protein yang tidak terstruktur mengubah konformasinya (hubungan yang renggang antara satu atom dengan atom yang lain dalam suatu molekul) untuk mencapai struktur aslinya (natif) (Shin, 2001).

Konformasi protein dipengaruhi secara fisika maupun kimiawi lingkungan protein. Jika derajat keasaman (pH), konsentrasi garam, temperatur, dan aspek-aspek lainnya diubah, protein bisa akan mengurai dan melonggarkan konformasi natifnya, proses inilah yang disebut dengan denaturasi (Campbell dan Reece, 2005). Denaturasi protein melibatkan desrupsi (mengacaukan),

bahkan merusak, struktur sekunder dan tersier protein. Karena proses denaturasi protein tidak cukup kuat untuk melepaskan ikatan peptida, struktur primer (sekuens asam amino) masih tetap sama hingga setelah proses denaturasi protein. Denaturasi bekerja dengan cara mengacaukan heliks-alfa normal dan lembaran beta dalam protein dan melepaskan gulungan protein menjadi bentuk yang acak (Ophardt, 2003). Kebanyakan protein terdenaturasi ketika protein-protein tersebut diubah dari keadaan *aqueous* ke dalam larutan organik, misalnya eter atau kloroform; rantai polipeptida menggulung kembali (*refold*) sehingga, regio hidrofobik menghadap ke luar, ke arah pelarut. Agen-agen denaturasi lainnya termasuk kimiawi yang merusak ikatan hidrogen, ikatan-ikatan ionik, dan jembatan disulfida yang menjaga bentuk protein. Denaturasi terjadi akibat pemanasan yang eksekif dengan cara mengganggu rantai polipeptida sehingga menyergap interaksi-interaksi lemah yang menstabilisasi konformasi (Campbell dan Reece, 2005). Protein-protein yang berbentuk *inclusion bodies* diisolasi dengan melakukan sentrifugasi protein yang dilarutkan dalam denaturan kuat, seperti guanidin hidroklorida 6 M atau 8 M urea (Fischer, Sumner, dan Goodenough, 1993).

Pace (1986) menganggap bahwa denaturasi kimiawi dengan agen urea merupakan salah satu alternatif primer untuk mengukur stabilitas protein, efek-efek mutasi pada stabilitas protein, dan protein yang *unfolding*. Urea dapat berikatan dengan protein dan berkompetisi dengan interaksi-interaksi natifnya. Dengan demikian, urea berpartisipasi aktif dalam proses *unfolding* (Bennion dan Daggett, 2003). Penggunaan konsentrasi urea, guanidium klorida, atau arginin, secara literatur, dapat meningkatkan *refolding* protein dan hasil protein-protein yang aktif dengan menekan pembentukan agregasi. Konsentrasi guanidium klorida yang rendah terbukti mampu mendenaturasi protein. Sedangkan urea



dapat membantu penekanan presipitat yang tak larut (*insoluble*) (Chen, et. al., 2009).

Selain urea, guanidin hidroklorida pun bisa digunakan sebagai agen denaturan. Ia merupakan agen *chaotropic* (agen yang merusak suatu struktur makromolekul) yang berguna untuk denaturasi dan *refolding* protein. Denaturan kuat ini dapat bercampur namun tak larut atau mendenaturasi protein, seperti *inclusion bodies* (Mukhopadhyay, 1997; Rudolph dan Lilie, 1996). Ini bisa digunakan sebagai langkah pertama *refolding* protein (Levine, et. al., 1995).

Jika protein terdenaturasi masih dalam keadaan terlarut, ia bisa direnaturasi ketika aspek lingkungan fisika dan kimiawinya dikembalikan ke dalam keadaan normal (Campbell dan Reece, 2005). Menurut Shin (2001), renaturasi *inclusion bodies* yang terlarut diawali dengan dilusi maupun dialisis untuk menghilangkan denaturan. Efisiensi renaturasi tergantung pada kompetisi antara lipatan (*foldng*) intramolekular dan agregasi intermolekular. Untuk memperlambat proses agregasi, *refolding* biasanya dilakukan pada konsentrasi protein yang rendah, dalam rentang antara 10-100 µg/mL. Terlebih lagi, kondisi-kondisi renaturasi harus diperhatikan betul, sehingga berada pada kondisi yang optimum, berkenaan dengan paramater-parameter eksternal, seperti temperatur, pH, dan kekuatan ion untuk tiap-tiap protein (Lilie, Schwarz, dan Rudolph, 1998).

Kebanyakan protein-protein tersekresi mengandung ikatan disulfida dalam kondisi natifnya. Jika protein yang akan direnaturasi mengandung ikatan disulfida, sebaiknya proses ini ditambahkan dengan menggunakan sistem redoks (reduksi dan oksidasi). Penambahan campuran bentuk-bentuk reduksi dan oksidasi reagen *thiol* berat molekul rendah, menyediakan potensial redoks yang tepat untuk memfasilitasi formasi dan *reshuffle* disulfida-disulfida tersebut (Lilie, Schwarz, dan Rudolph, 1998; Wetlaufer, Branca, dan Chen, 1987)). Sistem ini meningkatkan, baik peringkat maupun hasil renaturasi/ reoksidasi dengan

memfasilitasi *reshuffle* yang cepat ikatan-ikatan disulfida (Rudolph, 1990). Untuk mencegah oksidasi *fortuitous* dari *thiol* dengan memecah oksigen, dikatalisasi dengan sejumlah kecil ion logam seperti  $\text{Cu}^{2+}$ , EDTA sebaiknya ditambahkan ke dalam solusi larutan penyangga (Shin, 2001).

#### 2.4. Purifikasi Protein

Purifikasi protein dengan tingkat kemurnian yang tinggi sangat penting untuk membedakan sekuens asam amino (Harper, 2003). Sedangkan protein rekombinan merupakan protein yang diproduksi dari proses satu atau lebih molekul asam nukleat disusun ulang (*rearranged*) atau dikombinasikan untuk menghasilkan sekuens nukleotida yang baru (Prescott, 2002). Dalam penelitian ini, protein rekombinan dihasilkan dengan menggunakan tehnik His-tag dengan menggunakan plasmid dari bakteri *E. coli* yang telah dilakukan oleh Raras dan Lyrawati (2011). Dari hasil tersebut, perlu dilakukan purifikasi untuk mendapatkan antigen yang bersifat imunodominan dari *M. tuberculosis* yaitu Ag38kDa.

Pada prinsipnya, purifikasi protein lebih baik mengalami *over-purify* dibandingkan *under-purify*, sebab kualitas hasil akhirnya tidak dapat dikompromikan. Kemurnian 95% mungkin dapat diterima jika 5% sisanya merupakan kontaminan yang minim bahaya. Bagaimanapun juga, ketidakmurnian sekecil apapun yang bersifat biologis aktif dapat menyebabkan masalah yang berarti, baik pada saat uji coba (penelitian) maupun pada aplikasi terapi. Sehingga, perlu adanya perbedaan antara kontaminan yang harus disingkirkan secara penuh dan yang dapat dikurangi hingga level yang dapat diterima (tidak membahayakan) (Amesham Bioscience, 2001).

Penggunaan vektor untuk mengekspresikan protein rekombinan dengan teknologi DNA masih menempatkan *E. coli* sebagai vektor yang paling banyak digunakan. Beberapa alasan di antaranya adalah karena kecepatan dan



kemudahannya dalam bermultiplikasi (Middelberg, 2002). Selain itu, bakteri ini mampu memproduksi gen-gen yang terklon dalam jumlah yang sangat besar (Hartley dan Kane (1988) dan Marston (1986)). Namun, dengan beberapa pengecualian, karena protein-protein rekombinan ketika diproduksi dalam kecepatan yang tinggi, protein akan membentuk *inclusion bodies* (Kane dan Hartley (1991); Schein (1990)).

Oleh karena itu, untuk memperoleh protein-protein rekombinan yang aktif secara biologis dari *inclusion bodies* tersebut, dibutuhkan suatu pengembangan prosedur renaturasi yang sederhana dan efisien dari protein-protein ini (Rudolph dan Lilie, 1996). Pembentukan *inclusion bodies* menawarkan beberapa keuntungan dalam produksi protein rekombinan. Jika target protein tidak stabil pada sitoplasma *E. coli* dikarenakan proteolisis atau toksik terhadap sel *host* dalam konformasi natifnya, lebih baik untuk memproduksi target protein sebagai *inclusion bodies* (Shin, 2001).

#### **2.4.1 Metode-metode Purifikasi dengan Sistem *Batch***

##### **2.4.1.1 Presipitasi Amonium Sulfat**

Penggunaan metode-metode *batch* dapat digunakan baik untuk protein-protein alami maupun yang telah diubah secara genetik. Dengan metode *batch* seperti fraksinasi amonium sulfat, lebih mengarah ke optimasi hasil dibandingkan optimasi tingkat kemurnian. Cara terbaik yaitu dengan menggunakan metode-metode resolusi rendah tetapi tinggi hasil rekovery. Protein yang diinginkan kemudian menggunakan metode-metode resolusi tinggi untuk meningkatkan purifikasi pada langkah selanjutnya (Ward dan Swiatek, 2009).

##### **2.4.1.2 Reduksi Viskositas**

Langkah-langkah *batch* yang menghilangkan DNA, seperti presipitasi dengan protamin sulfat (Scopes, 1994), sederhana dan hasilnya murni. Pilihan-pilihan lain untuk mengurangi viskositas termasuk menambahkan nuklease atau

glukosidase untuk mendepolimerisasi DNA dan polisakarida yang *viscous* secara berturut-turut.

#### 2.4.1.3 Presipitasi Asam

Suatu metode *batch* yang sederhana dalam mempresipitasi protein yang tidak diinginkan. Menurunkan pH ekstrak-ekstrak ini menjadi pH 4.6 menyebabkan kontaminan-kontaminan presipitasi yang banyak dan cepat. Performa pada temperatur 4°C dan diikuti dengan sentrifugasi pada temperatur rendah, belum 50% total presipitasi kontaminan-kontaminan dan dibuang selama langkah sentrifugasi kecepatan tinggi yang singkat (Ward, et. al., 1979).

#### 2.4.1.4 *Tangential Flow Ultrafiltration* (TFF)

TFF merupakan metode khusus dan tepat untuk mengkonsentrasikan dan men-*desalting* volume besar dari solusi protein (Strathman, 1985). Sebab cairan mengalir langsung dengan cepat melintasi permukaan membran lebih baik dibandingkan tegak lurus terhadap permukannya, TFF mengatasi *feedstock* yang keruh sebaik materi-materi bebas partikel. Efeknya, aliran tangensial menjaga permukaan membran tetap jernih dengan menyapu partikel-partikel yang mungkin dapat menghambat pori-pori. Jika tekanan transmembran optimal, TFF dapat beroperasi selama berjam-jam atau berhari-hari, pada aliran konstan dan tekanan konstan, meresirkulasi *feedstock* di atas permukaan membran (Ward dan Swiatek, 2009).

#### 2.4.1.5 *Three-Phase Partitioning* (TPP)

TPP adalah metode preparasi rendah teknologi tetapi lebih menyempurnakan dibandingkan metode purifikasi *batch* lainnya yang pernah dilakukan (Dennison dan Lovrien, 1997; Thomson dan Ward, 2002). Dalam waktu beberapa menit, TPP semi-selektif melepaskan, memurnikan, dan mengkonsentrasikan suatu protein yang diinginkan dari seluruh, sel-sel *unlysed E. coli* selama menyingkirkan semua lemak, kromosom DNA, pigmen-pigmen,



mendekati viskositas, kebanyakan polisakarida, dan kebanyakan dari protein-protein yang mengkontaminasi. Selain membutuhkan sentrifugasi kecepatan rendah, TPP dapat mengisolasi protein yang diinginkan dari hampir seluruh protein lain dan asam nukleat kontaminan-kontaminan, seperti yang ditunjukkan dengan mereduksi, hingga 100-fold, dengan total absorpsi pada 280 dan 260 nm secara berturut-turut. Pada proses TPP, viskositas dan turbiditas tereliminasi secara visual, menghasilkan suatu ekstrak protein yang jernih secara kasat mata pada 50-100 kali konsentrasi aslinya.

#### 2.4.2 Metode *Continuous Annular Chromatography*

Penghapusan polimer protein dari monomernya merupakan proses pemisahan yang sering dihadapi, terutama dalam langkah pemolesan protein terapeutik. Pemisahan kontinyu polimer protein dari monomer dengan kromatografi annular menggunakan kromatografi eksklusi ukuran (*size exclusion chromatography*, SEC) telah dipelajari mengenai resolusi, pemulihan, pencemaran, dan produktivitas dan telah dibandingkan dengan kromatografi konvensional (Buchacher, et. al., 2001).

Iberer, et. al. (2001) menyatakan bahwa dalam kromatografi eksklusi (SEC), protein dan peptida dipisahkan menurut ukuran molekul mereka dalam larutan. SEC sangat berguna sebagai langkah fraksinasi yang efektif untuk memisahkan sejumlah besar kotoran dari komponen *interest* dan / atau sebagai langkah akhir untuk pemisahan protein dimurnikan dari agregat mereka, yang disebut langkah pemolesan. Namun, *throughput* di SEC rendah dibandingkan dengan proses kromatografi lain. Resolusi yang baik hanya dapat dicapai dengan volume pakan terbatas (*limited feed volume*) (yaitu, maksimal sekitar 5% dari volume kolom yang dapat dimuat). Keterbatasan ini berlawanan dengan SEC secara konvensional dalam industri meskipun potensi pemisahan yang sangat baik. Oleh karena itu proses pemisahan kontinyu (yaitu kromatografi

preparatif terus menerus annular (*annular continuous preparative chromatography*) dikembangkan dan dibandingkan dengan sistem konvensional SEC baik menggunakan kelas persiapan Superdex 200 kelas sebagai sorben. Pengaruh pakat kecepatan alirannya, eluen tingkat aliran dan tingkat rotasi pada efisiensi pemisahan diselidiki. Persamaan tinggi dengan *plate* secara teoritis lebih rendah untuk kromatografi preparatif *continuous annular* yang dapat dijelaskan oleh berkurangnya pita tambahan kolom memperluas. Kualitas kemasan terbukti menjadi identik untuk kedua sistem. Produktivitas *batch* konvensional SEC lebih rendah dibandingkan dengan terus menerus SEC, akibatnya konsumsi penyangga lebih tinggi dalam modus *batch*.

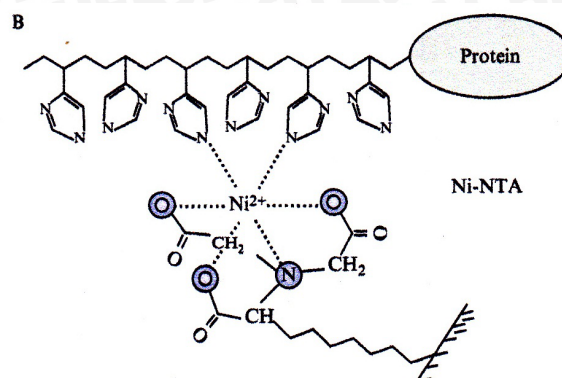
#### 2.4.3 Metode *Immobilized-Metal Affinity Chromatography* (IMAC)

Konsep IMAC telah diformulasikan oleh Porath et.al. pada tahun 1975 berdasarkan afinitas ion logam transisional seperti  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , dan  $Co^{2+}$  terhadap histidin dan sistein dalam solusi yang encer. Sehingga muncul suatu ide untuk menggunakan ion-ion logam yang terfiksasi dengan kuat untuk menyokong fraksinasi solusi protein.

Perkembangan selanjutnya, ditemukan suatu *improved chelating ligand*, nitrilotriacetic acid (NTA) pada tahun 1980. Sementara, purifikasi protein rekombinan secara genetik telah dimodifikasi pada level *template* DNA dalam rangka menghasilkan polipeptida oligohistidin terekstensi menggunakan NTA sebagai aplikasi IMAC yang paling penting.

Ligan NTA berkoordinasi dengan  $Ni^{2+}$  dengan empat valensi (tetradentat, koordinasi nomor 4) dan dua valensi yang tersedia untuk interaksi dengan cincin imidazol dari residu histidin (Block, et. al., 2009).





**Gambar 2.4.3 Model interaksi antara residu pada His-tag dan ion tetra-(NTA)**

#### 2.4.4 Purifikasi Protein Rekombinan

Dalam studi kloning dan overekspresi, Raras dan Lyrawati (2011) melakukan fusi terhadap protein rekombinan Ag38 dengan 6x *histidine tag* (his-tag) yang berlokasi pada sisi terminal-N. His-tag biasanya digunakan untuk purifikasi afinitas polihistidine-tag protein-protein rekombinan yang diekspresikan di *E. coli* (Hengen, 1995).

Proses yang pernah dilakukan dalam purifikasi protein antara lain dengan metode IMAC (*Immobilize Metal Affinity Chromatography*) melalui matriks Ni-NTA. Selama rangkaian purifikasi, matriks Ni-NTA digunakan untuk menangkap his-tag untuk meningkatkan resolusi protein. Namun, purifikasi recAg38M (antigen rekombinan 38 kDa *M. tuberculosis*) menggunakan afinitas Ni-NTA sistem *Batch* masih menunjukkan adanya kontaminasi dari protein lain (Raras dan Lyrawati, 2011).

Protein rekombinan terakumulasi intraseluler sehingga sering berada dalam bentuk *inclusion bodies*, agregat *insoluble* protein yang *misfolded* yang minim aktivitas biologis (Williams, et. al., 1982; Harris, 1983; Marston, et. al., 1984; Lowe, et. al., 1987). Densitas apung yang tinggi pada *inclusion bodies* memfasilitasi pemisahannya dari protein solubel *E. coli* dan debris sel dengan sentrifugasi yang berbeda-beda (Marston, et. al., 1984; Kelley dan Winkler, 1990;

Mitraki dan King, 1990). Metode konvensional untuk *refolding* protein-protein rekombinan yang tak larut termasuk dialisis lambat atau pengenceran dengan menggunakan aliran bufer yang pH-nya mendekati netral (Knuth dan Burgess, 1987). Gel filtrasi (Werner, et. al., 1994), pertukaran ion (Hoess, et. al., 1988), atau kromatografi interaksi hidrofobik (Application Note, GE Healthcare) telah digunakan untuk memfasilitasi langkah *refolding*.

Penandaan afinitas protein rekombinan, misalnya dengan penambahan beberapa residu histidin berturut-turut menyebabkan purifikasi yang efisien dan *refolding* satu langkah kromatografik tunggal pun menjadi mungkin. Karena pengikatan bidang histidin untuk imobilisasi ion-ion logam divalen dapat terjadi pada penampakan agen *chaotropic* (seperti urea atau guanidin hidroklorida) pada konsentrasi tinggi, (histidin)<sub>6</sub>-tagged protein *inclusion body* dapat terlarut dengan ekstraksi *chaotropic* dan secara langsung dapat berikatan dengan matriks afinitas. Menghilangkan protein-protein kontaminan dan *refolding* dengan menukarnya menjadi kondisi-kondisi larutan penyangga non-*denaturing* dapat ditampilkan sebelum elusi protein dari kolom (Colangeli, et. al., 1998)