

BAB VI

PEMBAHASAN

Salah satu faktor virulensi yang dipercaya paling poten menyebabkan dan meningkatkan keparahan TB adalah antigen 38 (Ag38) kDa. Gen *pab* pengkode antigen ini telah diisolasi dan dipatenkan pada tahun 1992 oleh Mahavir Singh.

Untuk proses purifikasi, kami menggunakan Protino® Ni-NTA (Ni(II)-*nitri-lotriacetic acid*) yang memperlihatkan suatu afinitas yang tinggi pada residu-residu histidin berdekatan dan matriks yang paling sering dipakai untuk IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*). Matriks tersebut merupakan suatu resin berbahan dasar silika kering yang sebelumnya sudah *dicharge* dengan ion-ion Ni^{2+} (Waugh, 2005). Prinsip IMAC sendiri mengacu pada interaksi reversibel antara berbagai sisi rantai asam amino dengan ion-ion logam yang terimobilisasi (Porath, 1985; Sulkowski, 1985; Hemdan dan Porath, 1985a; Hemdan dan Porath, 1985b; Zhao, et.al., 1991).

Histidine berikatan secara selektif terhadap logam tertentu dan memiliki kegunaan yang sangat baik pada IMAC. Enam histidin dipercaya dapat berikatan dengan logam-logam transisi (nikel [Ni^{2+}]) pada kondisi dimana terdapat suatu agen denaturan yang kuat, misalnya guanidin klorida (atau urea) (Hochuli, et.al., 1985). Contoh protein tag yang sering digunakan adalah 6xHis tag.

Di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya telah dilakukan kloning dan ekspresi gen *pab* pengkode antigen 38 kDa *M. tuberculosis* yang diisolasi dari sputum pasien TB di Malang (Raras dan Lyrawati, 2011). Untuk memudahkan purifikasi, pada saat pembuatan konstruksinya,

dilakukan dengan menyisipkan 6xHis pada N-terminal dari gen *pab* dengan harapan bahwa ketika proses purifikasi menggunakan kolom Ni-NTA 1000, maka His-tag akan berikatan dengan resin yang mengandung Ni^{2+} . Dengan demikian, hanya protein Ag38 yang terikat dan selanjutnya pada proses elusi protein sudah murni.

Namun demikian, pada saat gennya diekspresikan, protein Ag38 yang disintesis dalam bentuk *inclusion bodies*. Dengan demikian, tidak bisa dipurifikasi secara konvensional. Salah satu cara purifikasi protein rekombinan dari *inclusion bodies* adalah menggunakan teknik denaturasi dan renaturasi dengan agen denaturan. Agen denaturan yang dimaksud adalah menggunakan urea atau guanidin hidroklorida (GnHCl). Kami memilih agen denaturasi berupa urea karena ketersediaannya dan harga yang terjangkau.

Purifikasi protein rekombinan Ag38 kDa menggunakan resin Ni-NTA yang terbuat dari bahan silika dan telah diisi dengan ion-ion Ni^{2+} . Dengan menggunakan resin tersebut, protein yang telah disisipi His-tag akan tertangkap oleh ion-ion Ni^{2+} setelah terjadi proses denaturasi. Selanjutnya, protein dikembalikan ke struktur awalnya dengan melalui proses renaturasi. Hasil purifikasi protein rekombinan Ag38 kDa dianalisis dengan menggunakan teknik SDS PAGE dimana berat molekul protein yang telah dimurnikan akan dipisah secara elektrolisis.

Konsentrasi agen denaturasi yang kami gunakan berbeda-beda. Diawali dengan konsentrasi tertinggi (8 M Urea), memperlihatkan hasil yang kurang memuaskan karena terjadi sumbatan (*clogging*) pada resin saat proses *binding*. Dari profil protein pada SDS-PAGE tampak bahwa urea 8 M tidak mampu meningkatkan proses *binding* pada kolom ini. Kemungkinan hal ini dapat disebabkan adanya kesalahan teknis dalam mengkondisikan proses *binding*. Komposisi larutan penyangga seharusnya dicek pada pH 7-8. Namun, hal

tersebut tidak dilakukan karena jumlah volume larutan penyangga terlalu sedikit (Machery-Nagel, 2006).

Penggunaan urea 4 M memberikan hasil yang lebih baik. Jadi, ini mengisyaratkan bahwa meskipun telah dilakukan penyaringan pada *lysate*, masih terjadi *overload* protein meskipun tidak sebanyak pada proses purifikasi sebelumnya. Namun demikian, adanya penebalan pada berat molekul 38 kDa pada tahap *washing* 1 mengindikasikan banyaknya protein Ag38 yang tidak berikatan dengan Ni^{2+} dan berlanjut hingga tahap *washing* ketiga. Tahap elusi 1 menunjukkan adanya pita protein Ag38 meskipun masih diikuti dengan protein lain karena beberapa kemungkinan penyebab. Salah satunya adalah ekspresi yang terlalu rendah. Protein *host* yang mengkontaminasi memiliki kesempatan yang lebih baik untuk berikatan dengan resin ketika hanya sebagian kecil protein target ada pada *lysate*. Jumlah protein polihistidin-tag (dalam hal ini adalah Ag38) yang sangat sedikit tidak mampu menggeser mayoritas protein-protein kontaminan secara efektif (Machery-Nagel, 2006).

Dilanjutkan dengan purifikasi menggunakan urea berkonsentrasi 2 M, didapatkan hasil yang sangat baik. Pada kolom *washing* 1, tidak didapatkan protein Ag38 yang menunjukkan bahwa tidak terjadi *overload* protein (semua protein Ag38 terikat dengan *resin bed* Ni^{2+} pada kolom Ni-NTA). Pada saat elusi pertama, masih didapatkan pita protein selain Ag38 yang sangat tipis, namun untuk protein Ag38 sendiri, ketebalannya kurang memuaskan karena hanya sedikit yang terikat pada *resin bed*.

Urea pada konsentrasi rendah dapat meningkatkan hasil protein yang terlipat (*folded*) dengan benar. Urea bukan hanya agen denaturasi yang kuat, tetapi juga merupakan inhibitor agregasi yang efektif. Kemudahan dalam denaturasi dan renaturasi protein merupakan proses yang seimbang yang ditentukan oleh konsentrasi urea. Semakin tinggi konsentrasi urea, maka

kemampuan protein untuk kembali terlipat (*refolded*) akan menurun, jika konsentrasi urea melebihi 2 mol/l atau 2 M. Sehingga, dapat ditarik kesimpulan bahwa konsentrasi final urea yang optimum adalah 2 M. (Fan, et.al., 2007).

Hasil purifikasi yang telah divisualisasi dengan SDS PAGE perlu dilakukan konfirmasi apakah benar bahwa protein antigen yang dimurnikan memang berasal dari *M. tuberculosis*, yaitu dengan tes Western Blot. Pada supernatan (0 M urea), terdapat pita protein selain Ag38 yang ikut tervisualisasi. Hal ini disebabkan adanya reaksi silang (*cross reaction*) antara antibodi Ag38 dengan protein endogen *E. coli* yang bersifat homolog terhadap Ag38.

Suatu studi purifikasi protein bebas-lipopolisakarida *M. tuberculosis* dengan teknik IMAC menggunakan urea 8 M memberikan hasil yang kurang memuaskan. Sebab, IMAC sendiri tidak cukup memberikan kemurnian lebih dari 99%. Terdapatnya kontaminan-kontaminan dengan massa molekular (*Mr*) rendah sering terjadi pada proses pemurnian polihistidin-tag yang telah berdifusi dengan protein rekombinan (Colangeli, et. al., 1998). Namun, masih belum jelas apakah kontaminan-kontaminan ber-*Mr* rendah tersebut merupakan protein-protein *host* yang mengandung *histine-tag*, NH₂-fragmen terminal dari protein fusi, atau protein-protein *host* yang berhubungan dengan produk rekombinan. Dengan adanya 20 mM imidazol pada sampel dan larutan penyangga *binding* seharusnya dapat mengurangi level kontaminan-kontaminan pada kolom (Janknecht dan Nordheim, 1992), bahkan penggunaan elusi bergradien resolusi tinggi dengan agen-agen elusi kompetitif gagal mencapai purifikasi lebih dari 90% (Hutchens dan Yip, 1990).

Sangat penting untuk dicatat bahwa menghilangkan *gradient-based* urea bisa menghasilkan solubilisasi yang efektif tanpa presipitat protein yang signifikan pada kolom. Sebaliknya, menghilangkan urea dengan cara dilusi atau dialisis protein elusi menyebabkan presipitasi protein dan hasil yang sedikit. Pada

suatu eksperimen terhadap protein yang *insoluble*, antigen 38 kDa, kulturnya dilisat dengan *French press* (suatu teknik dimana *inclusion bodies* tidak dirusak sama sekali), dan afinitas kromatografinya dilakukan pada kondisi nondenaturasi. Teknik ini ternyata mampu mempurifikasi sedikit antigen yang *soluble* yang terdapat pada sel-sel *E. coli* (Tabel 1). Hasil ini dapat memberikan penjelasan bahwa pada eksperimen protein-protein yang *insoluble* yang tidak siap melipat kembali (*refold*) setelah penghilangan urea, purifikasi protein-protein sitoplasmik yang *soluble* dalam jumlah mikrogram sangat memungkinkan untuk dilakukan dengan menggunakan prosedur tersebut (Colangeli, et. al., 1998).

