

Produksi dan Purifikasi Streptavidin dengan Aktivitas Pengikatan Biotin yang Lebih Tinggi

Tarigan S, Sumarningsih

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
E-mail: simson.tarigan@yahoo.co.id

(Diterima 18 Juli 2014 ; disetujui 22 September 2014)

ABSTRACT

Tarigan S, Sumarningsih. 2014. Production and purification of streptavidin with higher biotin-binding activity. JITV 19(3): 231-238. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i3.1086>

The objective of this study was to develop practical, efficient method for production, purification and assay of binding activity of streptavidin. *Streptomyces avidinii* was first propagated on agar plates, the bacterial cells on the agar were scrapped and suspended in a defined synthetic media (4.4 ml/cm²). After 7 days agitation on a rotary shaker (200 rpm/min) at room temprature (≈28°C), the bacterial cells in the culture were pelleted. The culture supernatant was concentrated to 1/62 original volume with 75% saturation ammonium sulphate. After intensive dialysis against ammonium carbonate buffer pH 11, the suspension was loaded into an iminobiotin agarose column chromatography. The adsorbed protein (streptavidin) was eluted with sodium acetate buffer, pH 4, and the eluate was concentrated with an ultrafiltration device and suspended in PBS. The streptavidin-binding activity was assayed by a competitive ELISA, a competition between streptavidin in the sample and the HRP-streptavidin conjugate for the biotin (biotinyl IgG) immobilised on wells of a microtitre plate. The detection limit of this assay measured 0.16 µg/ml streptavidin. The method developed in this study produced 160 µg/ml streptavidin in the culture supernatant. After concentration with the ammonium sulphate, the streptavidin concentration increased to 4 mg/ml (69% recovery). At the final step of purification, streptavidin with 10 mg/ml concentration was obtained. The purity of the streptavidin was higher (95%) with a recovery of 19%. The purified streptavidin in this study appeared as a dimer core streptavidin on SDS PAGE and its binding activity was twice as high as that of a commercial one.

Key Words: Streptavidin, *Streptomyces avidinii*, Ammonium Sulphate, Iminobiotin Agarose, Binding Activity

ABSTRAK

Tarigan S, Sumarningsih. 2014. Produksi dan purifikasi streptavidin dengan aktivitas pengikatan biotin yang lebih tinggi. JITV 19(3): 231-238. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i3.1086>

Penelitian ini bertujuan mengembangkan teknik produksi, purifikasi dan pengukuran streptavidin yang efisien dan praktis. *Streptomyces avidinii* mula-mula dipropagasi dalam lempeng agar kemudian sel bakteri dari agar dipindahkan kedalam media cair sintetik (4,4 ml/cm²). Setelah 7 hari diagitasi diatas rotary shaker 200 rpm/min pada suhu ruangan (≈28°C), sel bakteri dipelekan, supernatan dikonsentrasikan menjadi 1/62 volume awal dengan amonium sulfat saturasi 75%. Setelah didialisis dalam larutan amonium karbonat pH 11, suspensi protein diadsorbsikan kedalam kolom iminobiotin agarose. Protein (streptavidin) yang teradsorbsi dielusi dengan larutan sodium asetat pH 4, eluat dikonsentrasikan dengan ultrafiltrasi dan disuspensikan dalam PBS. Pengukuran aktivitas binding streptavidin dilakukan dengan ELISA kompetitif, kompetisi antara streptavidin dalam sampel yang diukur dengan konjugat HRP-streptavidin memperebutkan biotin (IgG biotinil) yang diimmobilisasi pada microtitre plate. ELISA ini mempunyai limit deteksi 0.16 µg/ml streptavidin. Metode produksi dan purifikasi yang dikembangkan dalam penelitian ini menghasilkan 160 µg/ml pada biakan supernatan. Setelah dikonsentrasikan dengan amonium sulfat menghasilkan 4 mg/ml (recovery 69%). Hasil akhir setelah kromatografi afinitas diperoleh streptavidin dengan konsentrasi 10 mg/ml (recovery 19%) dengan kemurnian tinggi (>95%). Streptavidin yang dihasilkan terlihat dalam bentuk streptavidin dimer ketika dianalisis dengan SDS PAGE, dan memiliki aktifitas dua kali lebih tinggi dibandingkan salah satu streptavidin komersial.

Kata Kunci: Streptavidin, *Streptomyces avidinii*, Amonium Sulfat, Iminobiotin Agarose, Aktivitas Binding

PENDAHULUAN

Streptavidin adalah protein yang dihasilkan oleh bakteri *Streptomyces avidinii*, pertama kali ditemukan pada awal tahun 1960-an (Stapley et al. 1963; Chaiet & Wolf 1964). Protein ini mempunyai sifat yang sama

dengan avidin, suatu protein dalam putih telur, yakni mampu mengikat biotin dengan ikatan yang spesifik dan sangat kuat, 1000 sampai 1.000.000 kali lebih kuat dari ikatan antigen antibodi (Diamandis & Christopoulos 1991; Chivers et al. 2011; Deng et al.

2012). Biotin atau vitamin H adalah senyawa kecil ($M_r = 244$) yang dapat dikonjugasikan dengan senyawa biologis seperti protein, nucleotida, polisakarida dan sebagainya tanpa mengganggu fungsi kimiawi atau biologis senyawa tersebut. Senyawa biotinil tersebut dapat dideteksi keberadaannya dengan akurat menggunakan streptavidin yang dilabel dengan enzim atau fluorokrom. Biotinilisasi suatu senyawa biologis dan konjugasi streptavidin dengan enzim atau fluorokrom secara teknis relatif mudah dilakukan karena bahan-bahannya tersedia secara komersial, bahkan banyak tersedia dalam bentuk kit. Streptavidin mempunyai keunggulan dibandingkan dengan avidin karena reaksi non spesifik streptavidin lebih rendah. Lebih rendahnya reaksi non spesifik streptavidin berhubungan dengan sifatnya yang netral ($pI = 5-6$) dan tidak diglikosilasi, bandingkan dengan avidin yang bersifat basa ($pI = 10.5$) dan mempunyai gugus gula (glycoprotein) (Argarana et al. 1986; Almonte et al. 2014).

Pemanfaatan streptavidin dalam bidang bioteknologi terutama asai (*assay*) bioanalitik dan biosensor sangat luas. Secara umum pemakaiannya dapat dikelompokkan menjadi dua bagian. Pertama, streptavidin diimmobilisasi pada *solid support* seperti membran, *microtiter plate*, *beads*, *nano particles* dan sebagainya (Kalle et al. 1993; Hauser-Kronberger 1998; Valimaa et al. 2003; Valimaa & Laurikainen 2006; Paul et al. 2009; Wang et al. 2011). Kedua, streptavidin dilabel dengan enzim atau fluorokrom lalu digunakan untuk mendeteksi atau mengkwantifikasi senyawa biotinil. Sebagai contoh, untuk mendeteksi atau mengukur konsentrasi kompleks atau ikatan antara patogen, antigen atau hormon dengan antibodi biotinil spesifik digunakan streptavidin yang dilabel dengan enzim atau fluorokrom (Herr & Woodward 1987; Lin et al. 2008; Al-Mrabe et al. 2009).

Hasil penelitian tentang pemanfaatan streptavidin dalam teknologi biosensor dipublikasi dalam jumlah yang besar setiap tahunnya. Akan tetapi, hasil penelitian tentang produksi dan purifikasi streptavidin sangat sedikit. Pada awalnya, streptavidin diproduksi dengan media yang mengandung senyawa kompleks seperti protein (Stapley et al. 1963; Chaiet & Wolf 1964). Produksi streptavidin yang tinggi dengan menggunakan media kompleks dapat dihasilkan menggunakan bioreaktor dimana aerasi dan *shearing* dapat terkontrol (Aldwin et al. 1990; Muller et al. 2013). Media sintetik yang tidak mengandung senyawa kompleks untuk produksi streptavidin sehingga memudahkan purifikasi streptavidin telah dilaporkan (Cazin et al. 1988).

Untuk menunjang pengembangan teknologi biosensor terutama teknik diagnosa dan bioassay diperlukan ketersediaan streptavidin dalam kuantitas dan kualitas yang mencukupi. Streptavidin dari sumber komersial tidak ideal karena untuk mengimpornya

memakan waktu yang lama dan biaya tinggi. Penelitian ini sebagaimana telah dijelaskan bertujuan mengembangkan metode produksi, purifikasi dan kuantifikasi aktivitas streptavidin yang efisien.

MATERI DAN METODE

Streptomyces avidinii

Streptomyces avidinii diperoleh dari American Type Culture Collection (ATCC 27419TM). Bakteri yang diperoleh dalam ampul kering beku, mula mula disuspensikan dalam media 1877 ISP, dibiarkan 2 hari pada suhu 28°C lalu ditumbuhkan dalam *yeast malt extract agar* (HIMEDIA Pvt, Ltd), sesuai petunjuk ATCC. Selanjutnya, setelah jelas tidak ada kontaminan, bakteri disuspensikan dalam ISP medium mengandung 50% glycerol, dialikuat dalam ampul 1 ml lalu disimpan dalam -80°C.

Asai streptavidin

Imunoglobulin G kambing diisolasi dari serum menggunakan kolom afinitas Protein G (GE Healthcare Life Sciences). Imunoglobulin G dibiotinilasi pada gugus amina menggunakan *Biotinamidohexanoyl-6-aminohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester* (Sigma Aldrich) mengikuti protokol yang disarankan.

Plate 96-well maxisorp (Nunc) dicoating semalam pada suhu 4°C dengan 100 ng IgG biotinil dalam 100 µl bufer karbonat (pH 9,6) per sumur. Setelah diblocking dengan *non-fat skim milk* (5% w/v), plate dibungkus dalam plastik kedap udara lalu disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan. *Coated microplate* yang disimpan seperti ini stabil selama sekurang kurang 2 bulan. Pelaksanaan pengukuran aktivitas pengikatan atau konsentrasi streptavidin mengikuti tahapan berikut. Sebanyak 100 ul sampel yang akan diukur diencerkan secara serial dalam PBS pH 7,2. Streptavidin kontrol (Sigma Aldrich) diencerkan dalam PBS sedemikian rupa sehingga konsentrasinya 1,00; 0,50; 0,25; 0,13; 0,06; 0,03; 0,02; 0,00 µg/ml dan dimasukkan 100 ul dari setiap pengenceran kedalam sumuran *biotinyl-IgG-coated microtitre plate*. Setelah diinkubasikan selama 2 jam pada suhu ruangan (25°C), plate dicuci 4 kali dengan PBST (PBS, tween 0,5% (v/v), pH 7,2). Sebanyak 100 ul *streptavidin-HRP conjugate* (Sigma Aldrich) diencerkan 1:2000 dalam PBST, 0,5% (w/v) skim milk ditambahkan kesetiap sumuran. Setelah diinkubasikan 2 jam pada suhu ruangan, plat dicuci seperti sebelumnya. Substrat kromogenik ABTS [2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt] ditambahkan, diinkubasikan selama 15 menit lalu absorpsinya diukur pada panjang gelombang 420 nm dengan sebuah *microtitre-plate reader*. Konsentrasi streptavidin sampel yang

ditentukan dari *endpoint* pengenceran streptavidin kontrol. Sebagai contoh, sampel dan kontrol streptavidin (1 µg/ml) sama-sama diencerkan secara serial (kelipatan 2), *endpoint* kontrol pada pengenceran ke-6 (0,03 µg/ml), sedangkan *endpoin* sampel pada pengenceran ke-7, maka konsentrasi streptavidin sampel adalah 2 µg/ml. *Endpoint* ditandai dengan pengenceran yang nilai ODnya jauh lebih rendah dari nilai OD pengenceran sebelumnya.

Media sintetik

Media yang digunakan untuk produksi streptavidin adalah media sintetik yang dilaporkan dalam penelitian sebelumnya (Cazin et al. 1988). Bahan kimia sebagai komponen dikelompokkan menjadi 4 bagian: sumber nitrogen (L-asparagine (7 g/l)), sumber energi utama (glukosa (10 g/l)), mineral makro (KH₂PO₄ (2 g/l), MgSO₄·7H₂O (0,5 g/l), NaCl (0.1 g/l), CaCl₂·2H₂O (0,1 g/l)) dan mikro H₃BO₃ (500 µg/ml), CuSO₄·5H₂O (40 µg/l), KI (100 µg/l, FeCl₃·6H₂O (200 µg/l), MnSO₄·H₂O (400 µg/ml), NaMoO₄·2H₂O (200 µg/l), ZnSO₄·7H₂O (400 µg/l)). Berbeda dengan penelitian terdahulu, stok mineral mikro, untuk memudahkan penimbangan masing masing senyawa ditimbang untuk 500 liter, dicampur merata dalam 50 ml aquabidest. Sebanyak 0.1 ml stok digunakan untuk setiap liter media.

Produksi streptavidin

Streptomyces avidinii ditumbuhkan dengan kepadatan maksimum dalam *yeast malt extract agar* pada suhu ruangan (≈28°C). Setelah pertumbuhan memenuhi seluruh permukaan berupa kerak putih (≈ 4 hari), bakteri dikerok dari permukaan agar dan disuspensikan dalam media sintetik, 250 ml media per cawan Petri (diameter 8,5 cm) atau 4,4 ml/cm². Suspensi bakteri dimasukkan dalam tabung erlenmeyer (maximum ¼ volume), diletakkan diatas *rotary shaker* 200 rpm pada suhu ruangan. Pada hari ke-8, bakteri dipeletkan dengan sentrifugasi 6000 x *G* selama 30 menit, supernatan diambil dan dipresipitasi dengan 75% saturasi amonium sulfat. Presipitat disuspensikan dalam *binding buffer* (50 mM amonium karbonat pH 11), disentrifus 6000 x *G*, supernatan diambil lalu didialisis terhadap *binding buffer* selama 3 hari dengan 3 kali pergantian *binding buffer*.

Kromatografi

Kolom XK16 (GE *heathcare life sciences*) *dipacking* dengan 10 ml resin 2-iminobiotin agarose (Sigma Co.) dan diequilibrium dengan *binding buffer* dalam *ActaPrime system* (GE *heathcare life sciences*). Sampel yang sebelumnya telah didialisis dalam *binding*

buffer di *loading* kedalam kolom maksimum 3 mg total protein/ml kolom atau <75% kapasitas binding kolom. Kolom dicuci dengan *binding buffer* sampai semua protein yang tidak teradsorbsi terlepas dari kolom (A₂₈₀ ≈0). Protein yang diadsorbsi kolom (streptavidin) dilusi dengan 50 mM natrium asetat, pH 4. Semua eluate dengan A₂₈₀>0,005 ditampung, pH nya dinetralkan dengan 1 M Tris, lalu dikonsentrasikan dan didesalting dalam PBS dengan *10-KDa-cut-off-ultrafiltration device* (Amicon).

Pengukuran konsentrasi dan analisis kemurnian streptavidin

Konsentrasi protein diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm menggunakan streptavidin (Sigma Co.) sebagai standard. Kemurnian streptavidin dianalisis dengan SDS PAGE menggunakan separating gel 12,5% acrylamide dan pewarnaan Commasie blue.

HASIL DAN PEMBAHASAN

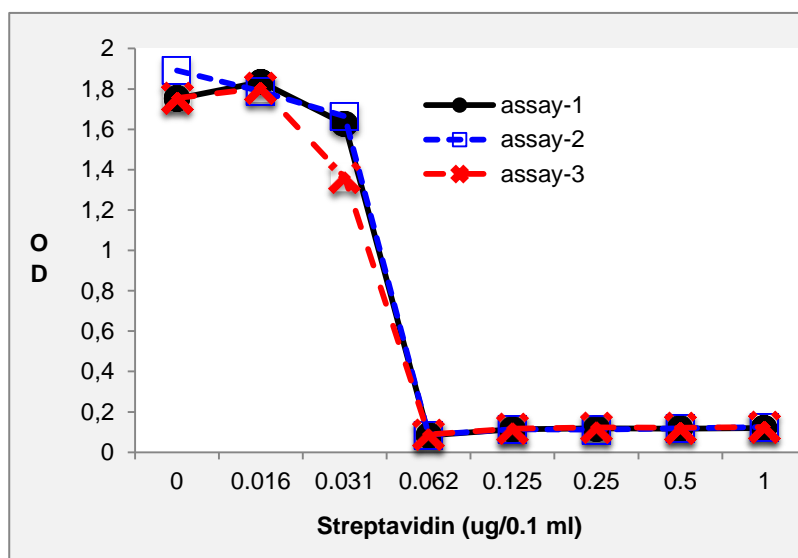
Penelitian ini menunjukkan bahwa cara yang dipakai untuk memproduksi dan mempurifikasi streptavidin adalah sederhana tetapi efektif untuk memperoleh streptavidin dalam kuantitas yang relatif tinggi dengan tingkat kemurnian dan aktifitas pengikatan yang tinggi.

Prasyarat minimal yang harus tersedia dalam usaha purifikasi suatu protein antara lain: sumber protein (*starting material*) dalam jumlah yang memadai dengan konsentrasi yang mencukupi untuk dikonsentrasikan, fasilitas konsentrasi protein seperti kolom kromatografi yang sesuai dan alat uji yang praktis yang bisa dipakai untuk mengukur konsentrasi atau sekurang kurangnya mendeteksi protein yang dipurifikasi dalam setiap tahapan purifikasi.

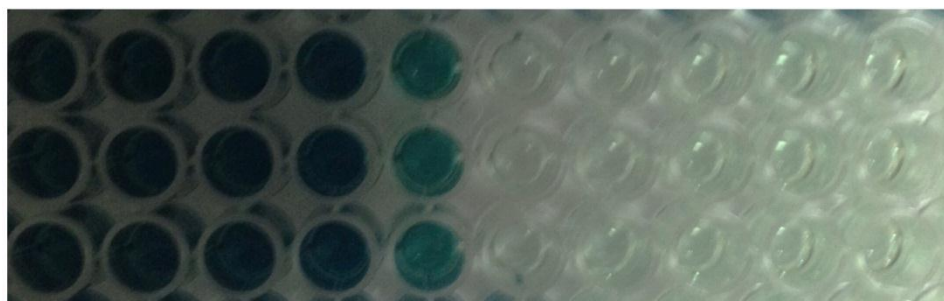
Pengukuran konsentrasi streptavidin

Pengukuran konsentrasi streptavidin berdasarkan aktifitas pengikatannya terhadap biotin merupakan cara yang ideal karena untuk itulah protein tersebut akan digunakan. Cara pengukuran yang tidak berhubungan dengan aktifitas pengikatan terhadap biotin, misalnya secara imunologis dapat saja dipakai tetapi bisa berakibat diperolehnya streptavidin dengan kemurnian yang tinggi tetapi aktifitas pengikatan yang rendah.

Pengukuran konsentrasi streptavidin dalam penelitian ini didasarkan pada kemampuan streptavidin dalam sampel untuk menghambat pengikatan konjugat streptavidin-HRP terhadap biotin yang diimmobilisasi pada *microtitre plate*. Sensitivitas uji atau deteksi limit adalah 0,62 µg/ml (Gambar 1). Sensitivitas setinggi ini



Gambar 1. A. Pengukuran konsentrasi streptavidin dengan ELISA kompetitif. Streptavidin kontrol pada konsentrasi $\geq 0,62$ ug/ml dapat menghambat konjugat HRP-streptavidin secara sempurna untuk berikatan dengan biotin yang diimmobilisasi pada *microplate*



Gambar 1. B. Batas penghambatan streptavidin sangat jelas sehingga titrasi *endpoit* dapat ditentukan dengan mata telanjang

sangat memuaskan untuk keperluan purifikasi streptavidin, karena konsentrasi streptavidin di dalam supernatan biakan *S. avidinii* mencapai 160 $\mu\text{g/ml}$ atau lebih dari 250 kali deteksi limit (Tabel 2). Nilai *endpoint* dari uji yakni konsentrasi terendah yang mampu menghambat konjugat streptavidin-HRP juga sangat jelas sehingga tidak memerlukan *microtitre plate reader* untuk menemukannya (Gambar 1).

Uji dengan prinsip yang sama juga telah dilaporkan sebelumnya (Bayer et al. 1986). Berbeda dengan yang dilaporkan dalam tulisan tersebut, sebagai *coating antigen* mereka gunakan albumin biotinil dan sebagai detektor digunakan konjugat streptavidin alkaline-phosphatase. Limit deteksi dilaporkan 0,1 ug streptavidin/ml, lebih rendah dibandingkan dengan yang diperoleh dalam penelitian ini, yakni 0,63 ug/ml. Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan oleh pemakaian albumin biotinil yang berat molekulnya sekitar 1/3 dari berat molekul immunoglobulin-G

biotinil yang dipakai dalam penelitian ini. Jumlah molekul yang terimmobilisasi didalam microtitre plate berbanding terbalik dengan berat molekul (Butler et al. 1997). Kompetitif ELISA untuk pengukuran streptavidin dengan format yang berbeda dimana kedalam sampel yang diuji ditambahkan 25 ng *biotinyl*-HRP lalu campuran tersebut ditambahkan kedalam *microtitre plate* yang *dicoated* dengan 200 ng streptavidin juga telah dilaporkan (Wu & Wong 2002). ELISA ini secara teknis lebih kompleks tetapi kelihatannya tidak lebih sensitif.

Produksi streptavidin

Streptavidin yang disekresikan oleh *S. avidinii* mulai terdeteksi pada hari ke-3 inkubasi, konsentrasinya berangsur naik dan mencapai puncaknya dan stabil pada konsentrasi 160 ug/ml mulai hari ke-7 (data tidak disajikan). Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan

yang dilaporkan pada penelitian sebelumnya yang menggunakan media yang sama yakni 100-120 µg/ml (Cazin et al. 1988). Perbedaan utama antara penelitian yang sekarang dilaporkan dengan penelitian Cazin et al. (1988) terletak pada inokulum *S. avidinii*. Pada penelitian terdahulu inokulum yang digunakan adalah bakteri yang dipeletkan dari kultur umur 4 hari, dan jumlah yang diinokulasikan adalah 0,2 ml *pack cells* per 100 ml media sintesis (Cazin et al. 1988). Penyiapan inokulum pada penelitian kami jauh lebih sederhana, yakni langsung dari bakteri yang ditumbuhkan pada agar, dan kemungkinan inokulum seperti ini lebih baik untuk produksi streptavidin.

Selain nutrisi yang sesuai, produksi streptavidin juga membutuhkan *shear stress* dan suplai oksigen. Kedua *shear stress* dan oksigen pada penelitian ini disediakan dengan agitasi atau *shaking* biakan dengan kecepatan 200 rpm/menit. Biakan yang diam atau tidak digoyang tidak menghasilkan streptavidin (data tidak disajikan). Biakan dengan nutrisi sederhana dimana sumber nitrogen berasal dari hanya satu asam amino saja, *L-asparagine*, goyangan 200 rpm/menit seperti yang diperlihatkan peneliti ini dapat menghasilkan streptavidin sebanyak 160 µg/ml. Biakan dengan nutrisi yang kompleks, dimana sumber nitrogen berasal dari *casein hydrolysate* dan *soy peptone* dengan kecepatan goyangan yang sama menghasilkan pertumbuhan bakteri yang lebat tetapi produksi streptavidin sangat rendah (2,5 µg/ml). Biakan dalam *LAB bioreactor* dengan media kompleks yang sama tetapi dengan stirrer kecepatan tinggi (400-700 rpm) dan pH yang terkontrol dilaporkan menghasilkan streptavidin dengan konsentrasi sekitar 450 µg/ml (Muller et al. 2013). Berdasarkan fakta diatas dapat disimpulkan bahwa goyangan atau *shaking* yang cepat mutlak diperlukan untuk produksi streptavidin, makin cepat pertumbuhan bakteri makin cepat goyangan yang dibutuhkan.

Konsentrasi dan purifikasi streptavidin

Proses konsentrasi protein yang terkandung dalam 1800 ml supernatan biakan menjadi 50 ml atau 1/36 volume awal meningkatkan konsentrasi streptavidin dari 0,16 mg/ml menjadi 4 mg/ml (Tabel 1). Proses konsentrasi ini menyebabkan kehilangan streptavidin sebanyak 31%, atau *recovery* (perolehan kembali) 69% (Tabel 2). Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa sebagian besar streptavidin dalam supernatan biakan dapat dipresipitasi dengan 60% saturasi amonium sulfat (Bayer et al. 1989). Berdasarkan informasi ini, penggunaan amonium sulfat dengan saturasi yang lebih tinggi (75%) dalam penelitian ini diharapkan dapat mempresipitasi semua streptavidin dalam biakan supernatan. Oleh karena itu, tidak dapat dipastikan apakah kehilangan 31% yang ditemukan

dalam penelitian ini benar benar kehilangan material atau hanya kehilangan *binding activity* streptavidin.

Manfaat utama pemakaian *define synthetic media* yang tidak mengandung molekul kompleks seperti pada penelitian ini adalah kemudahan dalam purifikasi protein yang disekresikan bakteri kedalam media. Kemudahan purifikasi streptavidin menggunakan media sintetik lebih dipermudah lagi karena streptavidin merupakan sekresi utama *S. avidinii*, sekresi protein lain seperti protease sangat rendah (Bayer et al. 1989). Oleh karena itu, presipitasi protein dalam biakan supernatan dengan amonium sulfat dari biakan supernatan mengandung streptavidin dengan kandungan yang tinggi. Streptavidin dengan kemurnian 90% setelah presipitasi protein dalam supernatan biakan media sintetik dan dialisis telah dilaporkan (Suter et al. 1988).

Kemurnian streptavidin yang lebih tinggi lagi dicapai dengan kromatografi afinitas menggunakan iminobiotin sepharose/ agarose. Iminobiotin sepharose/ agarose sebagai kolom afinitas untuk streptavidin diperkenalkan pertama kali pada akhir tahun 1970-an (Hofmann et al. 1980). Iminobiotin adalah derivat biotin yang mengandung gugus guanidinium sebagai pengganti gugus ureido pada biotin (Diamandis & Christopoulos 1991). Ikatan antara streptavidin dengan iminobiotin mempunyai konstanta disosiasi yang berbanding terbalik dengan nilai pH, disosiasi sempurna terjadi pada pH 4 (Hofmann et al. 1980).

Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini setelah kromatografi dan konsentrasi eluate menjadi 0,3% volume supernatan kultur adalah peningkatan konsentrasi streptavidin menjadi 10 mg/ml atau peningkatan sebesar 62 kali dibandingkan dengan supernatan kultur (Tabel 1, 2). Tingkat *recovery* streptavidin setelah melalui tahapan konsentrasi dengan amonium sulfat dan kromatografi afinitas adalah sebesar 19%, atau kehilangan sebesar 81%.

Pada penelitian ini, protein yang diekusi dari kolom iminobiotin agarose memperlihatkan pita tunggal dengan berat molekul sekitar 26 kDa (Gambar 2). Tidak terlihat pita lain selain pita tersebut sekalipun jumlah protein yang di *loading* kedalam gel banyak. Bahwa jumlah protein yang di *loading* banyak terlihat dari tebalnya *band* protein tunggal 26 kDa tersebut. Hasil SDS-PAGE ini membuktikan bahwa setelah purifikasi tahap akhir dihasilkan streptavidin murni, dengan kemurnian >95%. Kemurnian setinggi ini memang dapat diharapkan mengingat ikatan antara streptavidin dan iminobiotin yang sangat spesifik (Fudem-Goldin & Orr 1990).

Berdasarkan analisis gen streptavidin diketahui bahwa streptavidin tersusun dari 159 asam amino dengan berat molekul 16,5 kDa (Argarana et al. 1986). Setelah disekresi, streptavidin secara spontan membentuk struktur *kwarterner homotetramer*. Selain

Tabel 1 Konsentrasi streptavidin pada biakan supernatan, biakan supernatan yang dikonsentrasikan 200 kali dengan presipitasi amonium sulfat, dan setelah dipurifikasi dengan afinitas kolom 2-Iminobiotin Agarose

Streptavidin kontrol (10 ug/ml)		Supernatan biakan		Presipitasi amonium sulfat (36 x)		Purifikasi final Streptavidin	
ug/ml	OD	Pengenceran	OD	Pengenceran	OD	Pengenceran	OD
10	0,222	1:4	0,145	1:200	0,143	1:500	0,138
5	0,153	1:8	0,155	1:400	0,144	1:1000	0,143
2,5	0,171	1:16	0,133	1:800	0,129	1:2000	0,135
1,25	0,160	1:32	0,144 5	1:1600	0,134	1:4000	0,128
<u>0,625</u>	<u>0,175</u>	1:64	0,138	1:3200	0,140	1:8000	0,127
0,3125	1,778	<u>1:128</u>	<u>0,125</u>	<u>1:6400</u>	<u>0,125</u>	<u>1:16.000</u>	<u>0,146</u>
0,15625	2,439	1:256	1,396	1:12.800	1,412	1:32.000	2,134
0	2,648	1:512	2,245	1:25.600	2,190	1:64.000	2,210
10 ug/ml		160 ug/ml		4000 ug/ml		10.000 ug/ml	

Tabel 2. Efisiensi purifikasi streptavidin dari supernatan biakan *S. avidinii* menggunakan konsentrasi dengan amonium sulfat dan kolom afinitas iminobiotin agarose

Fraksi	Volume	Streptavidin		Recovery	Purification factor
		konsentrasi	Berat		
Biakan supernatan	1800 ml	0.16 mg/ml	288 mg	100%	1
Konsentrat amonium sulfat	50 ml	4 mg/ml	200 mg	69%	25
Purifikasi akhir	5.5 ml	10 mg/ml	55 mg	19%	62

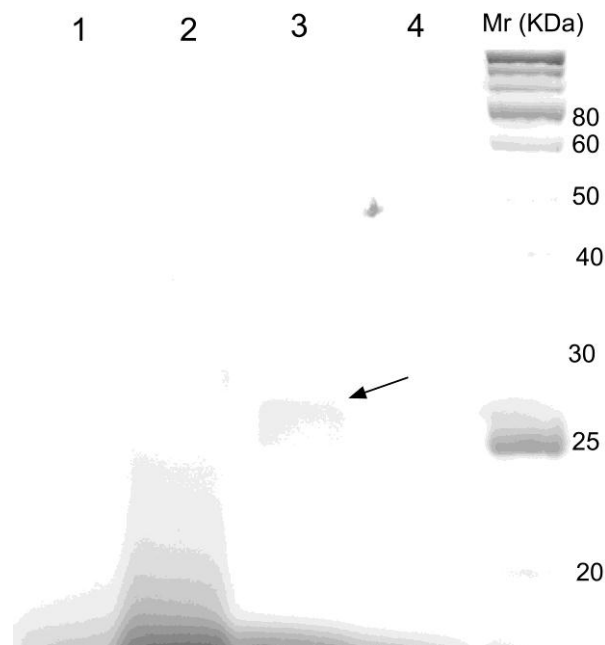
membentuk *tetramer*, streptavidin monomer juga mengalami *post secretoty modification* berupa *proteolytic degestion* pada kedua ujung N- dan C-termini yang menghasilkan core streptavidin sepanjang 125-127 asam amino dengan berat molekul 13,2 kDa (Bayer et al. 1989).

Pada penelitian ini, streptavidin yang terlihat pada SDS PAGE adalah dalam bentuk *core dimer* karena mempunyai berat molekul sekitar 26 kDa (Gambar 2). Hubungan antar monomer dalam tetramer streptavidin dapat dipisahkan dengan pendidihan dalam SDS PAGE *sample buffer* sehingga dalam SDS PAGE terlihat dalam bentuk monomer (Bayer et al. 1989). Penyebab tidak terurainya streptavidin menjadi monomer, tetapi menjadi dimer, tidak diketahui dengan pasti. Kemungkinan pertama, pendidihan sampel tidak cukup lama untuk penguraian komplit menjadi monomer. Kemungkinan kedua terjadi mutasi pada gen streptavidin yang mengakibatkan pembentukan ikatan yang kuat dalam sepasang dimer. Dugaan ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang mengungkapkan bahwa mutasi asam amino triptofan pada posisi 120

menjadi lisin atau asam aspartat (W120L/D), Lisin pada posisi 124 menjadi asam aspartat atau asparagin (L124D/N), atau histidin pada posisi 127 menjadi asam aspartat (H127D) menyebabkan perubahan streptavidin dari bentuk tetramer menjadi dimer (Pazy et al. 2003; Aslan et al. 2007).

Aktifitas binding spesifik

Konsentrasi streptavidin yang dihasilkan dalam penelitian ini berdasarkan pengukuran langsung dengan spektrofotometer (A_{280nm}) dengan menggunakan standar streptavidin dari Sigma Co adalah 5,12 mg/ml (data tidak disajikan). Sedangkan pengukuran konsentrasi secara tidak langsung berdasarkan aktivitas pengikatan biotinnya juga menggunakan streptavidin dari sigma sebagai standar diperoleh konsentrasi 10 mg/ml (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas pengikatan spesifik (*specific binding activity*, aktivitas per satuan berat) streptavidin yang dihasilkan dalam



Gambar 2. Profil protein pada SDS- PAGE protein dengan berbagai tahapan pemurnian streptavidin. Supernatan biakan media sintetik (lajur 1)
Protein pada supernatan yang telah dipresipitasi dengan amonium sulfat dan didialisis (lajur 2)
Protein yang telah dimurnikan dengan kolom iminobiotin sepharose (lajur 3)
Streptavidin komersial (Sigma Co.) (lajur 4)
Tanda panah pada lajur 3 menunjukkan streptavidin dalam bentuk dimer. Streptavidin komersial pada lajur 4 tidak terlihat kemungkinan karena agregasi atau loading terlalu sedikit

penelitian ini dua kali lebih tinggi dari streptavidin dari Sigma. Lebih rendahnya aktifitas binding spesifik streptavidin Sigma bukan akibat streptavidin tersebut belum mengalami digesti proteolitik. Sebagian besar streptavidin komersial, termasuk yang dipasarkan Sigma co., adalah core streptavidin (Bayer et al. 1989).

KESIMPULAN

Streptavidin disekresi oleh *S. avidinii* kedalam media sintetik yang setelah tujuh hari inkubasi konsentrasinya mencapai 0,16 mg/ml. Aktifitas pengikatan streptavidin terhadap biotin dapat diukur dengan ELISA kompetitif, kompetisi antara streptavidin dalam sampel yang diukur dengan konjugat streptavidin-HRP terhadap biotin (IgG biotinil) yang diimmobilisasi pada *micotiter plate*. Konsentrasi streptavidin dengan amonium sulfat, disamping meningkatkan konsentrasinya menjadi 4 mg/ml juga memudahkan tahapan purifikasi selanjutnya. Purifikasi dengan kromatografi afinitas iminobiotin yang diikuti dengan konsentrasi eluate dengan ultrafiltrasi membran menghasilkan core streptavidin dengan kemurnian lebih tinggi dari 95% dengan konsentrasi 5,12 mg/ml tetapi

dengan aktivitas pengikatan dua kali lebih besar dari streptavidin komersial.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Gita Sekarmila dan Bapak Achpas atas bantuan teknisnya. Penelitian ini dibiayai oleh anggaran APBN BBLitvet tahun 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Mrabeh A, Ziegler A, Cowan G, Torrance L. 2009. A fully recombinant ELISA using in vivo biotinylated antibody fragments for the detection of potato leafroll virus. *J Virol Methods*. 159:200-205.
- Aldwin L, Toso R, Goodson R, Hunter J. 1990. Improvement of production, assay and purification of streptavidin. *J Industrial Microbiol*. 5:239-246.
- Almonte L, Lopez-Elvira E, Baro AM. 2014. Surface-charge differentiation of streptavidin and avidin by atomic force microscopy-force spectroscopy. *Chemphyschem*. 15:2768-2773.

- Argarana CE, Kuntz ID, Birken S, Axel R, Cantor CR. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. *Nucl Acids Res.* 14:1871-1882.
- Aslan FM, Yu Y, Vajda S, Mohr SC, Cantor CR. 2007. Engineering a novel, stable dimeric streptavidin with lower isoelectric point. *J Biotechnol.* 128:213-225.
- Bayer EA, Ben-Hur H, Hiller Y, Wilchek M. 1989. Postsecretory modifications of streptavidin. *Biochem J.* 259:369-376.
- Bayer EA, Ben-Hur H, Wilchek M. 1986. A sensitive enzyme assay for biotin, avidin, and streptavidin. *Anal Biochem.* 154:367-370.
- Butler JE, Navarro P, Sun J. 1997. Adsorption-induced antigenic changes and their significance in ELISA and immunological disorders. *Immunol Invest.* 26:39-54.
- Cazin JJr, Suter M, Butler JE. 1988. Production of streptavidin in a synthetic medium. *J Immunol Methods.* 113:75-81.
- Chaiet L, Wolf FJ. 1964. The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by streptomycetes. *Arch Biochem Biophys.* 106:1-5.
- Chivers CE, Koner AL, Lowe ED, Howarth M. 2011. How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochem J* 435:55-63.
- Deng L, Broom A, Kitova EN, Richards MR, Zheng RB, Shoemaker GK, Meiering EM, Klassen JS. 2012. Kinetic stability of the streptavidin-biotin interaction enhanced in the gas phase. *J Am Chem Soc.* 134:16586-16596.
- Diamandis EP, Christopoulos TK. 1991. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinic Chem.* 37:625-636.
- Fudem-Goldin B, Orr GA. 1990. 2-Iminobiotin-containing reagent and affinity columns. *Methods Enzymol* 184:167-173.
- Hauser-Kronberger, C. 1998. Highly sensitive DNA, RNA and antigen detection methods: streptavidin-Nanogold-silver staining. *Cell vision: J Analytic Morphol.* 5:83.
- Herr, JC, Woodward MP. 1987. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for human semen identification based on a biotinylated monoclonal antibody to a seminal vesicle-specific antigen. *J Forensic Sci.* 32:346-356.
- Hofmann K, Wood SW, Brinton CC, Montibeller JA, Finn FM. 1980. Iminobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 77:4666-4668.
- Kalle WH, Hazekamp-van Dokkum AM, Lohman PH, Natarajan AT, van Zeeland AA, Mullenders LH. 1993. The use of streptavidin-coated magnetic beads and biotinylated antibodies to investigate induction and repair of DNA damage: analysis of repair patches in specific sequences of uv-irradiated human fibroblasts. *Analytic Biochem.* 208:228-236.
- Lin Z, Wang XZ, J. Li, S. Q. Ren, G. N. Chen, X. T. Ying, J. M. Lin. 2008. Development of a sensitive, rapid, biotin-streptavidin based chemiluminescent enzyme immunoassay for human thyroid stimulating hormone. *Talanta.* 75:965-972.
- Muller JM, Risse JM, Jussen D, Flaschel E. 2013. Development of fed-batch strategies for the production of streptavidin by *Streptomyces avidinii* based on power input and oxygen supply studies. *J Biotechnol.* 163:325-332.
- Paul A, Avci-Adali M, Ziemer G, Wendel HP. 2009. Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX. *Oligonucleotides* 19:243-254.
- Pazy Y, Raboy B, Matto M, Bayer EA, Wilchek M, Livnah O. 2003. Dimer-tetramer transition between solution and crystalline states of streptavidin and avidin mutants. *J Bacteriol.* 185:4050-4056.
- Stapley EO, Mata JM, Miller IM, Demny TC, Woodruff HB. 1963. Antibiotic Msd-235. I. Production by *Streptomyces avidinii* and *Streptomyces lavendulae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 161:20-27.
- Suter M, Cazin J, Butler JrJE, Mock DM. 1988. Isolation and characterization of highly purified streptavidin obtained in a two-step purification procedure from *Streptomyces avidinii* grown in a synthetic medium. *J Immunol Methods.* 113:83-91.
- Valimaa L, Laurikainen K. 2006. Comparison study of streptavidin-coated microtitration plates. *J Immunol Methods.* 308:203-215.
- Valimaa L, Pettersson K, Vehniainen M, Karp M, Lovgren T. 2003. A high-capacity streptavidin-coated microtitration plate. *Bioconjugate Chem.* 14:103-111.
- Wang H, Zhao C, F Li F. 2011. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by a novel hybridization signal amplification method based on self-assembly of DNA-streptavidin nanoparticles. *Brazil J Microbiol.* 42:964-972.
- Wu SC, Wong SL. 2002. Engineering of a *Bacillus subtilis* strain with adjustable levels of intracellular biotin for secretory production of functional streptavidin. *Appl Environ Microbiol.* 68:1102-1108.