

## Produksi dan Purifikasi Antigen Protektif *Bacillus anthracis*

SIMSON TARIGAN, RAHMAT S. ADJI dan LILY NATALIA

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114  
E-mail: s.tarigan@balitvet.org

(Diterima dewan redaksi 4 April 2005)

### ABSTRACT

TARIGAN, S., R.S. ADJI and L. NATALIA. 2005. Production and purification of *Bacillus anthracis* protective antigen. *JITV* 10(3): 208-216.

Protective antigen (PA) plays crucial roles in the pathogenicity and virulence of *Bacillus anthracis*. Animals or human immunised with the protein acquire a complete protection against the disease. In addition to vaccine, PA can also be developed into a sensitive diagnostic test for anthrax. The purpose of this study was to produce PA using a culture medium easily obtained, and to develop a simple and effective technique for purification of the protein. To produce PA, *B. anthracis* Sterne 34F2 strain was first grown on blood agar, then bacterial colonies were suspended and incubated for 2 hours in RPMI-1640 supplemented with NaHCO<sub>3</sub> and Tris. Protein components in the culture supernatant were separated consecutively with Phenyl sepharose, Q-sepharose and Superdex-200 columns. This order was used in order to simplify and speed up the purification process. The PA contained in the fractions was detected by a dot blot or an ELISA using commercial PA specific antibody. The PA was absorbed strongly by the phenyl sepharose whereas other proteins were absorbed weakly or not absorbed at all. When these PA-containing fractions were loaded into Q-sepharose column, PA was absorbed considerably weaker than contaminated proteins. Although the level of purity obtained from the Q-sepharose column was satisfactory, further separation on Superdex produced an even higher purity. However, on SDS-PAGE analysis, the purified PA was seen as a two-band protein (54.7 and 29.2 kDa) because of nicked proteolysis. On an immunoblot assay, only the 54.7 band was recognised by the PA-specific antibody. Despite the nick proteolysis, the PA purified in this study was considered to retain its biological activities.

**Key Words:** *Bacillus anthracis*, Protective Antigen, Protein Purification

### ABSTRAK

TARIGAN, S., R.S. ADJI dan L. NATALIA. 2005. Produksi dan purifikasi antigen protektif *Bacillus anthracis*. *JITV* 10(3): 208-216.

*Protective antigen* (PA) memainkan peranan vital dalam patogenisitas dan virulensi *Bacillus anthracis*. Hewan atau manusia yang diimunisasi dengan protein tersebut memiliki kekebalan terhadap penyakit antraks. Disamping dapat digunakan sebagai komponen utama suatu vaksin, PA juga dapat digunakan untuk pembuatan perangkat diagnostik imunologis. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi PA dengan media biakan yang mudah diperoleh dan mengembangkan cara purifikasi yang efektif. Untuk memproduksi toksin, *B. anthracis* strain Sterne 34F2 ditumbuhkan pada agar darah, lalu koloni bakteri disuspensikan dan diinkubasikan selama 2 jam dalam RPMI-1640 yang ditambah NaHCO<sub>3</sub> dan Tris. Protein yang terkandung dalam supernatan biakan diseparasi berturut-turut dengan kolom kromatografi Phenyl sepharose, Q sepharose dan Superdex-200. Urutan ini dilakukan untuk menyederhanakan dan mempercepat proses purifikasi. Deteksi PA pada fraksi yang dielusi dari kolom dilakukan dengan *dot blot* dan ELISA menggunakan antibodi spesifik PA komersial. Phenyl sepharose mengabsorpsi PA dengan kuat sedangkan sebagian besar protein yang lain tidak diabsorpsi atau diabsorpsi secara lemah. Purifikasi tahap berikutnya dengan Q sepharose, yang mengabsorpsi PA secara lemah sedangkan protein yang lain secara lebih kuat, sehingga menghasilkan PA dengan tingkat kemurnian yang tinggi. Tingkat kemurnian yang lebih tinggi lagi diperoleh setelah separasi dengan kolom Superdex-200. Akan tetapi PA yang berhasil dimurnikan tersebut telah mengalami *nick*, karena pada analisis SDS PAGE selalu terpisah menjadi dua pita protein 54.7 dan 29.2 kDa, dan hasil analisis imunoblot menunjukkan bahwa hanya pita protein 54.7 kDa saja yang dikenali oleh antibodi spesifik PA. Walaupun mengalami *nick*, PA yang dipurifikasi tersebut diperkirakan tidak kehilangan aktifitas biologisnya.

**Kata Kunci:** *Bacillus anthracis*, Antigen Protektif, Purifikasi Protein

### PENDAHULUAN

Penyakit antraks telah dikenal sejak ribuan tahun sebagai penyakit yang sangat menakutkan pada hewan dan manusia. Akan tetapi, *Bacillus anthracis*, sebagai agen penyebab penyakit baru dapat diisolasi pada awal perkembangan ilmu mikrobiologi oleh pelopor

mikrobiologi Casimir-Joseph Davaine tahun 1863 dan diidentifikasi lebih lanjut oleh Rober Koch tahun 1876 (ENCYCLOPEDIA-BRITANICA, 2004). Kejadian pertama antraks di Indonesia dilaporkan pada ternak kerbau di Teluk Betung pada tahun 1884 tidak lama setelah pengisolasian penyebabnya, dan sejak itu sampai sekarang, serangan antraks terjadi secara sporadis pada

hewan dan manusia yang mengakibatkan banyak kematian (NAIPOSPOS, 2005).

Virulensi *B. anthracis* terletak pada eksotoksin dan kapsul asam gamma poly-D-glutamat yang disandi oleh genom yang terletak masing-masing pada plasmid p0X1 dan p0X2 (KASPAR dan ROBERTSON, 1987). Eksotoksin yang terdiri dari 3 komponen polipeptida (*protective antigen* [PA], *lethal factor* [LF] dan *edema factor* [EF]) adalah faktor patogen yang bertanggung jawab terhadap kerusakan patologis dan kematian. Sementara itu, kapsul asam gamma poly-D-glutamat berfungsi sebagai anti fagositik yang memungkinkan bakteri berkembang biak dengan cepat tanpa hambatan dalam induk semang. Bakteri menjadi tidak virulen apabila salah satu atau kedua faktor virulen tersebut tidak ada (LEPPLA, 1999). Antigen protektif (PA) adalah komponen *receptor binding* yang berikatan dengan reseptor pada sel induk semang dan yang mentranslokasikan komponen katalitik (LF dan EF) ke dalam sitoplasma dimana kedua toksin ini menyebabkan perubahan biokimiawi sel yang berakibat edema yang parah dan kematian (ASCENZI *et al.*, 2002; LEPPLA, 1982; 1984). Antigen protektif, dinamai demikian karena protein ini dapat menginduksi kekebalan yang dapat melindungi hewan atau manusia yang diimunisasi dengan protein tersebut (MCBRIDE *et al.*, 1998). Karena sifat protektif tersebut protein ini paling banyak mendapat perhatian. Usaha untuk memproduksi dan mempurifikasi PA telah dimulai sejak tahun 1950-an, yang diawali dengan pembuatan media yang dapat menunjang produksi toksin. Pembuatan media dimulai oleh WRIGHT *et al.* (1962) yang memperkenalkan Media 1095 dan HAINES *et al.* (1965) yang memperkenalkan Casamino sebagai media untuk memproduksi PA, namun produksi toksin pada media tersebut masih rendah disamping itu media tersebut juga mengandung protein dan makromolekul lainnya yang menyulitkan purifikasi toksin. Usaha untuk mengembangkan *defined media* (media yang komponennya hanya terdiri dari molekul-molekul yang sederhana dan komposisinya diketahui dengan pasti) berhasil dilakukan dengan ditemukannya media R oleh RISTROPH dan IVINS (1983). Produksi toksin dalam medium ini lebih tinggi sampai lima kali lipat dibandingkan dengan media sebelumnya. Penyempurnaan media ini yakni dengan mengurangi konsentrasi beberapa komponen dilakukan oleh LEPPLA (1988) dan produksi toksin dalam media yang dimodifikasi tersebut lebih tinggi lagi dibandingkan dengan media sebelum modifikasi.

Media R atau RM (*R-modified*) dibuat dari sekitar 30 senyawa kimia terpisah (asam amino, garam dan sebagainya) dan media tersebut belum tersedia secara komersial sehingga penyediaannya sulit dan mahal. Komponen media basal untuk kultur jaringan seperti RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) dan DMEM (*Dulbecco Modified Essential Medium*) juga terdiri dari

asam amino dan garam-garam yang lengkap untuk menunjang pertumbuhan sel mamalia dan tersedia secara komersial serta mudah didapat.

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi PA dengan media RPMI dan mengembangkan metode purifikasi yang sederhana dan efektif. Saat ini tersedia pilihan sistem dan media kromatografi yang jauh lebih lengkap dibandingkan dengan tahun 1980-an atau sebelumnya ketika metode purifikasi PA yang ada dalam publikasi saat ini umumnya dikembangkan.

## MATERI DAN METODE

### Supernatan kultur bakteri

Metode produksi toksin yang dipakai dalam penelitian ini mengikuti metode yang dipakai untuk produksi toksin *Actinobacillus pleuropneumoniae* (TARIGAN *et al.*, 1994). *Bacillus anthracis* strain Sterne 34F2 mula-mula ditumbuhkan pada 40 plat agar darah. Setelah inkubasi selama 18 jam, koloni bakteri dikerok dan disuspensikan dalam 1 liter RPMI yang disuplementasi dengan 10 mM NaHCO<sub>3</sub> dan 10 mM *Tris base*. Suspensi diinkubasikan selama 2 jam pada suhu 37°C lalu disentrifus selama 30 menit pada 5000 xg dan suhu 4°C. Supernatan diambil, ke dalamnya ditambahkan EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, pH nya diturunkan menjadi 7 dengan HCl, lalu perlahan-lahan ditambahkan amonium sulfat bubuk sampai konsentrasi 1 M. Setelah amonium sulfat terlarut semua, larutan disentrifus lagi seperti semula dan supernatan diambil dan disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan.

### Kromatografi

*Phenyl sepharose high sub* (25 ml) (*Amersham Biosciences*) dikemas dalam kolom XK-16/20 (*Amersham Biosciences*). Setelah kolom diekuilibrasikan dengan larutan 1 M amonium sulfat dalam 20 mM Tris-HCl, pH 7 (*Buffer A*), 250 ml supernatan kultur bakteri di-loading ke dalam kolom dengan aliran 1 ml/menit menggunakan sebuah pompa peristaltik. Protein yang tidak terikat oleh kolom dilepas dengan 100 ml *buffer A*, lalu kolom dipindahkan ke dalam *AktaPrime chromatography system* (*Amersham Biosciences*). Protein yang terikat dengan kolom dielusi dengan 100 ml gradien linier 75-100% *buffer B* (20 mM Tris-HCl, pH 7) diikuti dengan 100 ml *buffer B* (100%) dengan kecepatan aliran 2,5 ml/menit. Fraksi (5 ml) ditampung dan kandungan PA setiap fraksi diuji dengan *dot blot*.

Fraksi yang mengandung PA disatukan kemudian di-desalting terhadap 20 mM Tris pH 8 dan dikonsentrasikan menjadi 35 ml (dari 1000 ml supernatan) dengan 10-kDa-MWCO *ultrafiltration concentrator* (*Vivascience*, Germany). Fraksinasi

selanjutnya dilakukan dengan kromatografi pertukaran anion menggunakan 5 ml kolom Q *sepharose*, *HiTrap Q HP* (Amersham Biosciences). Sebanyak 5 ml sampel (untuk sekali separasi) di-*loading* ke dalam kolom dengan kecepatan 2,5 ml/menit, kolom dicuci dengan 60 ml *buffer* A (20 mM Tris pH 8). Protein yang terikat dengan kolom dielusi secara gradien linier 0-100% *buffer* B (500 mM NaCl dalam bufer A). Fraksi (5 ml) ditampung dan kandungan PA setiap fraksi diuji dengan *dot blot*. Fraksi yang positif PA disatukan lalu dikonsentrasikan menjadi 1,6 ml dengan konsentrator. Fraksinasi terakhir dilakukan dengan kromatografi *gel filtration*, menggunakan 125 ml media Superdex 200 (Amersham Biosciences) yang dikemas dalam kolom XK 16/70 (Amersham Biosciences). Sebanyak 0,5 ml sampel di-*loading* ke dalam kolom dan protein dielusi dengan PBS + 5 mM EDTA, pH 7,4 dengan kecepatan 0,5 ml/menit. Fraksi (5 ml) ditampung dan kandungan PA setiap fraksi diuji dengan *dot blot*.

### Dot blot

Sebanyak 1  $\mu$ l sampel yang akan diuji diletakkan di atas membran nitroselulosa (BioRad) dengan jarak antar sampel kira-kira 7 mm dan sampel dibiarkan mengering di udara. Setelah diblok dengan larutan *non-fat skim milk* dalam bufer *Tris-buffered saline* (TBS) pH 7,4 selama 1 jam, membran direaksikan selama 1 jam dalam suspensi goat anti-PA (Saphire Biosciences, Australia) 0,2  $\mu$ g/ml TBS. Setelah dicuci 5 kali dalam TBST (TBS + 0,5% Tween 20), membran direaksikan di dalam suspensi *alkaline phosphatase anti-goat IgG monoclonal antibody* (Sigma) diencerkan 1: 5000 dalam TBST selama 1 jam. Setelah dicuci 4 kali dalam TBST dan satu kali dalam bufer alkalin fosfatase (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5), *blot* direaksikan dengan larutan substrat NBT/BCIP (Sigma).

### Penentuan konsentrasi protein, SDS PAGE dan Immunoblot

Konsentrasi protein ditentukan dengan metode Bradford (BRADFORD, 1976) menggunakan kit komersial dan *bovine serum albumin* sebagai standar (BioRad).

Sampel yang mengandung 100  $\mu$ g protein dipresipitasi dengan larutan *trichloro acetic acid* (TCA) (ROSENBERG, 1996). Protein yang terpresipitasi dilarutkan dalam 50  $\mu$ l sampel *buffer* SDS-PAGE (*reducing*) dan dipanaskan pada 95°C selama 10 menit. Sebanyak 20  $\mu$ l sampel di-*loading* ke dalam sumur gel lalu elektroforesis dilakukan dengan Mini-Protean 3 cell (BioRad Laboratories). *Stacking* dan *separating gel* masing-masing mengandung 4 dan 10% acrilamida monomer. Protein pada satu set gel diwarnai dengan

*comassie blue* dan pada satu lagi ditransfer ke dalam membran nitroselulosa menggunakan MiniTransblot (Bio-Rad Laboratories) dan 25 mM Tris, 192 mM glisin dan 20% metanol sebagai *buffer* transfer. Transfer dilakukan pada 350 mA selama 2 jam, dan keberhasilan transfer diuji dengan pewarnaan *Ponceau S* (ROSENBERG, 1996). Untuk memperlihatkan pita PA pada membran dilakukan dengan cara yang sama seperti *dot blot*.

### Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Sampel dari setiap tahap purifikasi terlebih dahulu disamakan konsentrasi proteinnya menjadi 100  $\mu$ g/ml sebelum diencerkan secara serial dalam *buffer* karbonat pH 9,6. Dari setiap pengenceran diisikan 50  $\mu$ l ke dalam mikrolat Elisa dan dibiarkan semalam. Setelah dicuci dua kali dengan PBST, mikrolat diblok dengan *non-fat skimmed milk* 2,5 mg/ml selama 1 jam dilanjutkan dengan penambahan antibodi anti PA (0,2  $\mu$ g/ml dalam PBS). Setelah mikrolat dicuci lima kali, ditambahkan *alkaline phosphatase anti-goat IgG monoclonal antibody* yang diencerkan 1:5000 dalam PBST lalu diinkubasikan selama 1 jam. Setelah plat dicuci lima kali, ditambahkan larutan substrat *p-nitrophenyl phosphate* (Sigma) dan setelah warna terbentuk reaksi dihentikan dengan penambahan larutan 3M NaOH 3 M. Absorpsi (OD) pada 405 nm diukur pada sebuah *microplate reader*. Titer PA dinyatakan sebagai pengenceran sampel yang OD nya lebih tinggi dari rata-rata sampel negatif (PBS).

## HASIL PENELITIAN

Supernatan biakan *B. anthracis* pada RPMI yang ditambah dengan NaHCO<sub>3</sub> dan Tris-base mengandung 109  $\mu$ g/ml protein (Tabel 1). Analisis SDS-PAGE memperlihatkan bahwa protein dalam supernatan tersebut mempunyai berat molekul yang beragam tetapi protein dengan berat molekul >65 kDa konsentrasinya sangat rendah (Gambar 4, lajur 1). Kandungan PA pada supernatan tersebut dapat dideteksi dengan *dot blot* sampai pengenceran 1:8, tetapi dengan ELISA keberadaannya bahkan dapat dideteksi sampai pengenceran 1:64 (Gambar 5).

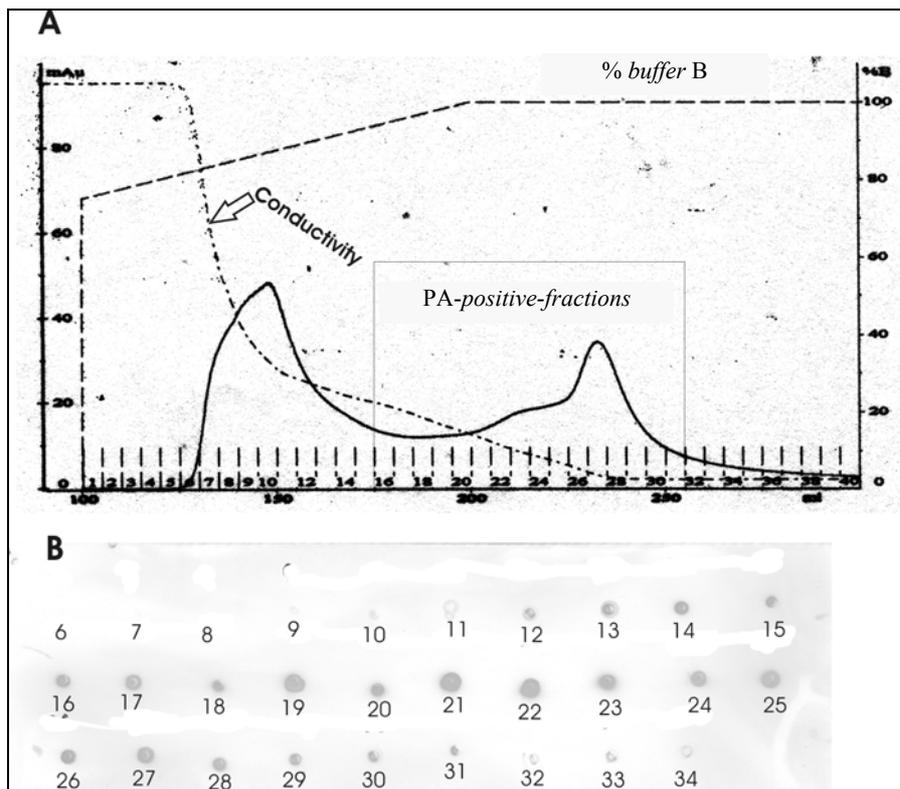
Hasil separasi supernatan (setelah pH nya diturunkan menjadi 7 dan ditambahkan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M) menunjukkan bahwa sebagian besar protein tidak diabsorpsi oleh fenil *sepharose*. Akan tetapi, PA diabsorpsi dengan kuat sehingga protein ini hanya dapat dielusi dengan  $\geq$  80% *buffer* B atau *buffer* yang mengandung tidak lebih dari 0,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, bahkan sebagian besar PA dielusi dengan 100% *buffer* B (20 mM Tris) (Gambar 1). Separasi dengan kromatografi interaksi hidrofobik ini mengkonsentrasikan PA lebih

dari 4 kali (2.56/0.59) dan hanya mengalami kehilangan PA sebanyak 19% dari total PA yang ada dalam supernatan (Tabel 1). Kehilangan tersebut bukan hanya terjadi akibat proses separasi tetapi juga akibat *desalting* dan pengkonsentrasian fraksi. Pada analisis SDS PAGE tiga pita protein (66,3; 54,7 dan 42,9 kDa) terlihat paling menonjol (Gambar 4, lajur 2).

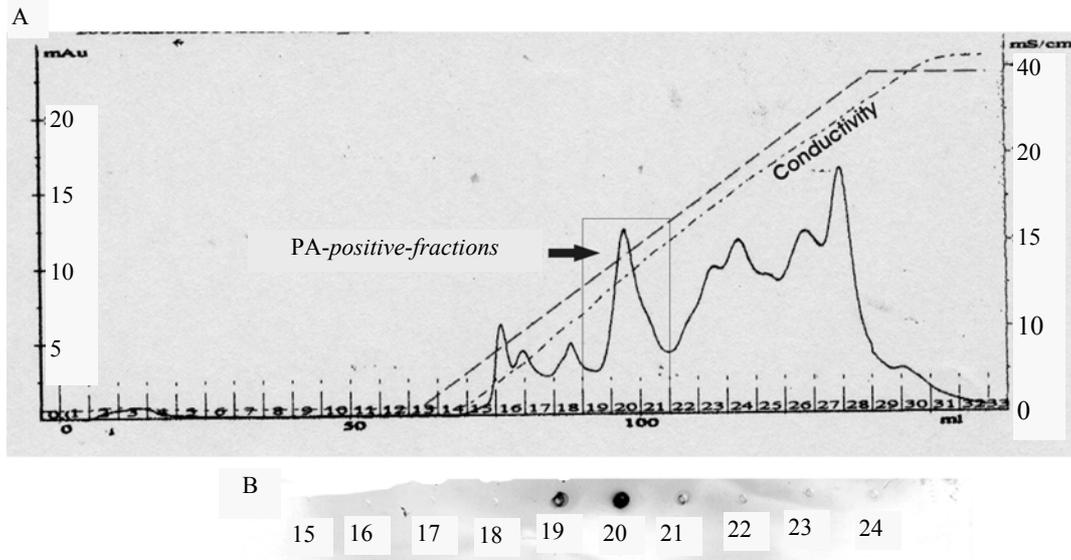
Separasi selanjutnya dengan kolom Q-sepharose menghasilkan beberapa *peak* yang terpisah dengan baik. Hasil analisis fraksi-fraksi dengan *dot blot* menunjukkan bahwa PA hanya terkandung dalam satu *peak* yang terpisah relatif sempurna dengan *peak* yang lain (Gambar 2). Analisis dengan SDS PAGE menunjukkan *peak* yang positif PA tersebut mengandung dua pita protein pada 54,7 dan 29,2 kDa yang sangat dominan, dan pita protein yang lain terlihat sangat tipis. Analisis *imunoblot* menunjukkan bahwa hanya pita protein 54.7 kDa saja yang dikenali oleh antibodi anti PA (Gambar 4, lajur 3). Penyatuan semua fraksi yang mengandung PA dan mengkonsentrasikan menjadi 1,6 ml mengakibatkan kehilangan PA yang

sangat besar (71,8%), PA yang tersisa hanya 9,2% dari PA yang ada dalam supernatan biakan. Karena PA terkonsentrasi pada satu *peak* kromatografi yang terpisah sempurna maka kehilangan tersebut kemungkinan terjadi bukan sewaktu proses kromatografi tetapi sewaktu konsentrasi dengan ultrafiltrasi konsentrator.

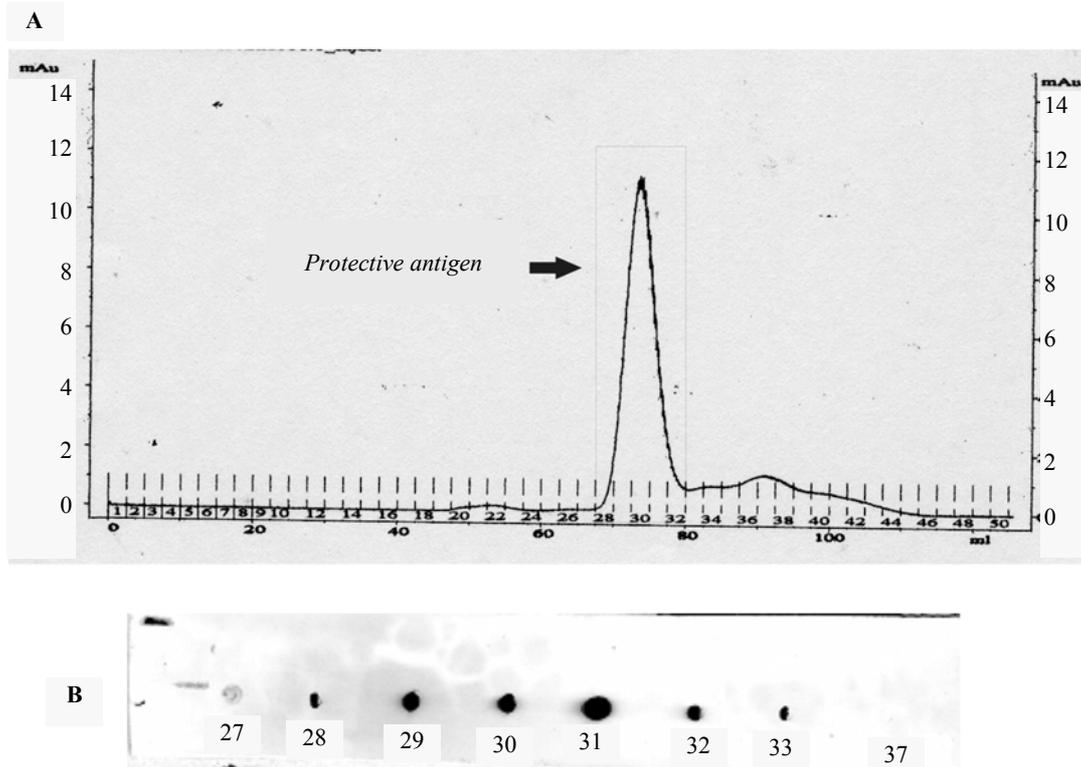
Purifikasi tahap terakhir yang dilakukan dengan kolom Superdex menghasilkan hanya satu *peak* yang dominan (Gambar 3A) dan hasil analisis *dot blot* memperlihatkan bahwa PA hanya terkandung dalam *peak* tersebut (Gambar 3B). Analisis dengan SDS PAGE menunjukkan bahwa *peak* tersebut hanya mengandung dua pita protein pada 54,7 dan 29,2 kDa. Analisis dengan *imunoblot* menunjukkan bahwa hanya protein dengan berat molekul 54,7 kDa saja yang dikenali oleh antibodi anti PA (Gambar 4, lajur 4). Total PA yang terkandung dalam fraksi-fraksi setelah dikonsentrasikan menjadi 2,7 ml hanya 5,4% dari total PA yang terdapat pada supernatan biakan (Tabel 1).



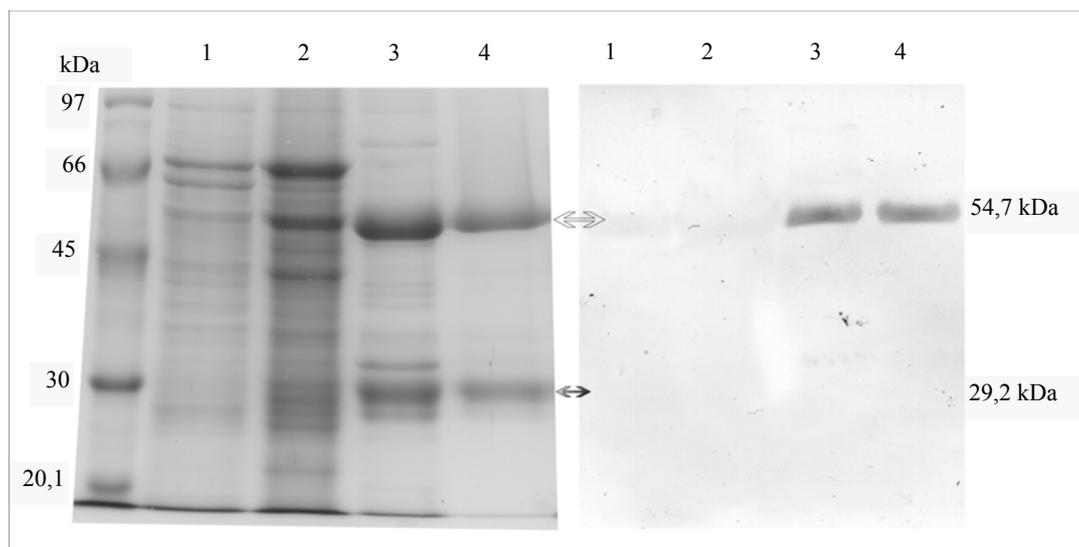
**Gambar 1.** Separasi protein dalam supernatan biakan *B. anthracis* dengan kolom fenil sepharose (*high sub*). Sebanyak 250 ml supernatan kultur *B. anthracis* diabsorbsikan ke dalam kolom fenil sepharose (volume kolom = 25 ml), kemudian protein yang terabsorbsi dielusi dengan gradien *buffer* B (20 mM fosfat, pH=7) dari 75 sampai 100% (125 ml) kemudian 100% *buffer* B (125 ml) (Gambar A). Fraksi (5 ml) ditampung kemudian keberadaan PA dalam setiap fraksi dideteksi dengan *dot blot* (Gambar B). Catatan: fraksi 16 sampai 31 disatukan lalu dikonsentrasikan dan di-*desalting* terhadap *buffer* 20 mM Tris-HCl, pH 8, dan diseparasi lebih lanjut dengan kromatografi pertukaran anion



**Gambar 2.** Fraksi yang positif mengandung PA dari kolom fenil *sepharose* (fraksi 16-31) dikonsentrasikan dan di-desalting terhadap 20 mM Tris-HCl, pH 8 (*buffer A*) kemudian sebanyak 5 ml di-*loading* ke kolom Q-*sepharose* (volume kolom = 5 ml). Protein yang terabsorpsi oleh kolom dielusi secara gradien (0 sampai 100%) dengan *buffer B* (500 mM NaCl dalam *buffer A*) (Gambar A). Sebanyak 5 ml fraksi diambil kemudian kandungan PA setiap fraksi diuji dengan *immunoblot* (Gambar B). Catatan: Fraksi 19 dan 20 disatukan, dikonsentrasikan kemudian diseparasi lebih lanjut dengan kromatografi gel filtrasi



**Gambar 3.** Fraksi yang mengandung PA dari kromatografi pertukaran anion dikonsentrasikan kemudian sebanyak 0,5 ml diseparasi dengan kolom Superdex-200 (tinggi kolom = 60 cm, diameter internal = 2 cm), kecepatan aliran= 0,5 ml/menit (Gambar A). Fraksi 2,5 ml ditampung kemudian kandungan PA fraksi diuji dengan *immunoblot* (Gambar B)



**Gambar 4.** Profil SDS-PAGE (kiri) dan *immunoblot* (kanan) berbagai tahap purifikasi PA. Lajur 1 = supernatan biakan *B. anthracis*, lajur 2 = setelah diseparasi dengan fenil *sepharose*, lajur 3 = setelah diseparasi dengan *Q-sepharose* dan lajur 4 = setelah diseparasi dengan *Superdex*. Setelah tahap terakhir ini diperoleh PA dengan kemurnian yang sangat tinggi tetapi dalam kondisi denaturasi protein tersebut terpisah menjadi 2 fragmen dengan berat molekul masing-masing 54,7 dan 29,2 kDa; hanya fragmen 54,7 kDa saja yang dikenali oleh antibodi anti PA spesifik

Tahap purifikasi	DOT BLOT (ng/dot)						
	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,7
Supernatan biakan							
Fenil <i>sepharose</i>							
<i>Q-sepharose</i>							
<i>Superdex-200</i>							

**Gambar 5.** Hasil pemeriksaan *dot blot* pada setiap tahap purifikasi

**Tabel 1.** Tingkat kemurnian dan *recovery* PA pada setiap purifikasi berdasarkan kuantifikasi PA dengan Elisa

Tahap purifikasi	Volume (ml)	Konsentrasi protein (µg/ml)	Aktifitas spesifik (titer/µg)	Total aktivitas (titer)	<i>Recovery</i>
Supernatan biakan	1000	109	0,59	64.3100	100%
Fenil <i>sepharose</i> + konsentrasi + <i>desalting</i>	35	580	2,56	51.968	81%
<i>Q sepharose</i> + <i>desalting</i>	1,6	854	4,4	5944	9,2%
<i>Superdex</i> + konsentrasi	2,7	126	10,2	3470	5,4%

## PEMBAHASAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa RPMI yang ditambah Natrium bikarbonat dan Tris dapat dipakai sebagai media biakan untuk produksi PA. Penambahan kedua bahan kimia ini dilakukan karena hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa sekresi PA oleh bakteri hanya terjadi bila penambahan tersebut dilakukan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh BARTKUS dan LEPLA (1989) yang menunjukkan bahwa karbonat dan kondisi basa diperlukan sebagai penginduksi transkripsi gen toksin Purifikasi PA yang terdapat dalam biakan supernatan dapat dilakukan secara efektif dengan tiga tahapan kromatografi, berturut-turut kromatografi interaksi hidrofobik (fenil *sepharose*), pertukaran anion (Q-*sepharose*) dan filtrasi gel (*Superdex-200*). Sekalipun pembiakan dalam media RPMI singkat (2 jam) tetapi karena jumlah bakteri yang diinokulasikan sangat banyak, konsentrasi protein dalam supernatan biakan seperti yang diamati dalam penelitian ini (109 µg/ml) jauh lebih tinggi dari yang dilaporkan dengan menggunakan media *defined standard* (media R) dan inkubasi selama 24 jam ( $\leq 75$  µg/ml) (RISTROPH dan IVINS, 1983).

Kandungan toksin antraks (PA, EF dan LF yang masing-masing mempunyai berat molekul 83, 89, 90 kDa) pada supernatan biakan *B. anthracis* pada media R atau media RM dilaporkan melebihi 50% dari total protein yang ada dalam supernatan (LEPLA, 1999). Hal serupa tidak ditemui dalam penelitian ini karena konsentrasi protein yang memiliki berat molekul di atas 65 kDa, seperti yang ditunjukkan analisis SDS PAGE terhadap supernatan biakan, sangat sedikit. Hal ini tidak berarti bahwa supernatan biakan tersebut tidak mengandung PA karena hasil pemeriksaan dengan *dot blot* dan ELISA menggunakan antibodi yang spesifik terhadap PA memperlihatkan keberadaan PA dalam supernatan masih dapat dideteksi sampai pengenceran yang tinggi.

Pemilihan kolom-kolom fenil *sepharose* sebagai tahap pertama dalam purifikasi PA seperti yang diperlihatkan dalam penelitian ini mempunyai beberapa keuntungan yang penting. Pertama, kolom ini memerlukan perlakuan terhadap sampel (supernatan biakan) yang sederhana dan cepat yakni hanya dengan penambahan amonium sulfat ke dalam sampel sebelum *diload* ke dalam kolom. Perlakuan yang sederhana dan cepat tersebut sangat bermanfaat dalam mencegah kehilangan, denaturasi dan degradasi PA oleh protease. Dalam penelitian sebelumnya, kromatografi *hydroxyapatite* atau pertukaran ion dipilih sebagai kromatografi tahap pertama (FARCHAUS *et al.*, 1998; LAIRD *et al.*, 2004; LEPLA, 1988; QUINN *et al.*, 1988). Kedua kromatografi tersebut mempersyaratkan bahwa supernatan biakan harus terlebih dahulu di-*desalting*

atau didialisis. Pelaksanaan *desalting* untuk volume supernatan biakan yang besar membutuhkan waktu lama dan fasilitas khusus disamping itu kehilangan sebagian PA dalam proses *desalting* sulit dihindarkan. Kedua, PA diabsorpsi oleh matriks fenil *sepharose* dengan ikatan kuat sehingga hanya terelusi dengan persentasi *buffer* B (20 mM Tris) yang sangat tinggi sedangkan protein lain dalam supernatan tidak terabsorpsi atau dielusi dengan persentasi *buffer* B yang lebih rendah, dengan demikian kromatografi ini dapat memisahkan PA dari protein yang lain dalam supernatan.

Karena PA dielusi dari kolom fenil *sepharose* dengan konsentrasi garam (amonium sulfat) yang sangat rendah, fraksi yang mengandung PA diharapkan dapat langsung disepari lebih lanjut dengan kolom Q *sepharose* dengan hanya pengenceran dengan *aquabidest* tanpa dialisis. Akan tetapi dengan perlakuan pengenceran saja PA tidak terabsorpsi oleh Q *sepharose* karena ikatan antara PA dengan matrik kolom sangat lemah. Sekalipun sampel masih harus didesalting tetapi karena volume yang di-*desalting* tidak besar maka prosesnya tidak membutuhkan waktu yang lama.

Sekalipun *peak* yang mengandung PA terpisah dengan baik dari *peak* protein lainnya dalam kolom Q-*sepharose*, tetapi karena analisis SDS PAGE dan *immunoblot* memperlihatkan dua pita protein, 54,7 kDa (dikenali oleh antibodi spesifik terhadap PA) dan 29,2 kDa (tidak dikenali oleh antibodi PA). Untuk membuktikan apakah kedua protein tersebut benar-benar dua protein yang berbeda atau berasal dari satu protein yang terpisah saat proses SDS PAGE, dilakukan pemisahan dengan kromatografi filtrasi gel. Karena perbedaan berat molekul kedua protein tersebut cukup besar dan matrik yang dipakai (*Superdex*) memiliki resolusi yang sangat tinggi kedua protein tersebut dipastikan terpisah kalau memang keduanya merupakan dua protein yang berbeda. Karena hasil kromatografi ini memperlihatkan bahwa keduanya tidak dapat dipisahkan, maka kesimpulan yang diambil adalah kedua pita tersebut merupakan satu protein yang terpisah saat SDS PAGE. Kedua pita tersebut diyakini sebagai PA karena jumlah berat molekul keduanya 83,9 kDa sama dengan berat molekul PA (83 kDa) (LEPLA, 1999) dan dikenali (sekalipun hanya satu pita) oleh antibodi spesifik terhadap PA.

Hasil penelitian sebelumnya telah berhasil mengungkapkan lokasi pada molekul PA yang sangat rentan terhadap protease, yakni pada rantai asam amino 313-314 dan 164-167 (LEPLA, 1999). Pemutusan rantai pada lokasi pertama menghasilkan fragmen 34 kDa dan 44 kDa sedangkan pada tempat ke dua menghasilkan fragmen 63 kDa (PA63) dan 20 kDa (PA20). Pemutusan rantai pada salah satu posisi tersebut hanya menyebabkan *nick* pada molekul sehingga kedua fragmen masih tetap bersatu. Akan tetapi pada kondisi

yang bersifat denaturasi kedua fragmen akan terpisah (LEPPLA, 1999). Fenomena ini memberi petunjuk bahwa molekul PA yang dipurifikasi pada penelitian ini juga telah mengalami *nick* karena PA sudah dimurnikan melalui kromatografi filtrasi gel selalu tersegregasi menjadi dua fragmen (pita 54,7 dan 29,2 kDa) dalam analisis SDS PAGE yang bersifat denaturasi. Hasil pengamatan dalam analisis *immunoblot* dimana hanya pita 54,7 kDa yang dikenali oleh antibodi spesifik terhadap PA sedangkan pita 29,2 kDa sama sekali tidak dikenali memberi petunjuk bahwa fragmen 29,2 kDa tersebut adalah bagian N-terminal. Dugaan ini didasarkan pada penelitian sebelumnya bahwa kurang lebih sepanjang 20 kDa ujung *N terminal* molekul PA (P20) sama sekali tidak bersifat imunogenik karena segera setelah molekul PA berikatan dengan reseptornya pada permukaan sel bagian tersebut langsung terlepas akibat aktifitas furin atau protease permukaan sel (CHRISTENSEN *et al.*, 2005; KLIMPEL *et al.*, 1992; LEPPLA, 1999). Penyebab fragmen yang terjadi pada penelitian ini adalah 54,7 dan 29,2 kDa bukan 63 dan 20 kDa, tidak diketahui dengan pasti. Perbedaan tersebut mungkin saja akibat penyimpangan dalam estimasi berat molekul protein dalam SDS PAGE. Penyimpangan tersebut sering terjadi terutama jika perhitungan dilakukan pada gel mini, seperti yang dipakai dalam penelitian ini.

*Peak* yang mengandung PA dari kolom Q *sepharose* mengharuskan untuk dikonsentrasikan sebelum diseparasi dengan kolom *superdex*. Pengkonsentrasian sampel yang dilakukan dengan alat konsentrator ultrafiltrasi tidak efisien karena mengakibatkan kehilangan PA yang besar (71,8%). Kehilangan tersebut, yang diduga karena membran pada konsentrator tersebut mengabsorpsi PA, mengakibatkan rendahnya efisiensi purifikasi. Untuk meningkatkan efisiensi purifikasi perlu dipilih alternatif pengkonsentrasian lain yang tidak menimbulkan kehilangan PA yang besar.

Molekul PA yang mengalami *nick* oleh protease masih memiliki kemampuan mengikat reseptor dan mentranslokasikan EF dan LF karena aktifitas biologis tersebut terletak pada PA63 (LEPPLA, 1999). Dengan demikian PA yang diproduksi dan dipurifikasi dengan cara seperti yang diuraikan dalam penelitian ini masih dapat digunakan sebagai komponen utama vaksin, antigen untuk pengembangan diagnosis imunologis antraks, dan produksi antibodi spesifik terhadap PA.

## KESIMPULAN

Antigen protektif *B. anthracis* dapat diproduksi dengan mudah menggunakan media *defined* yang mudah diperoleh, yakni RPMI yang ditambah dengan NaHCO<sub>3</sub> dan Tris. Purifikasi PA yang disekresikan oleh bakteri ke dalam media tersebut dapat dipurifikasi

dengan serangkaian kromatografi kolom fenil *sepharose*, Q *sepharose* dan *Superdex*. Tingkat kemurnian PA yang diperoleh sangat tinggi namun PA yang diperoleh telah mengalami *nick* oleh protease.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Gita Sekarmila, Bapak Koko Barkah dan Achpas yang telah membantu dengan sangat baik dalam pelaksanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- ASCENZI, P., P. VISCA, G. IPPOLITO, A. SPALLAROSSA, M. BOLOGNESI and C. MONTECUCCO. 2002. Anthrax toxin: A tripartite lethal combination. *FEBS Lett.* 531: 384-388.
- BARTKUS, J.M. and S.H. LEPPLA. 1989. Transcriptional regulation of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 57: 2295-2300.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- CHRISTENSEN, K.A., B.A. KRANTZ, R.A. MELNYK and R.J. COLLIER. 2005. Interaction of the 20 kDa and 63 kDa fragments of anthrax protective antigen: Kinetics and thermodynamics. *Biochemistry* 44: 1047-1053.
- ENCYCLOPEDIA-BRITANICA. 2004. Encyclopedia Britanica Inc.
- FARCHAUS, J.W., W.J. RIBOT, S. JENDREK and S.F. LITTLE. 1998. Fermentation, purification, and characterization of protective antigen from a recombinant, avirulent strain of *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 982-991.
- HAINES, B.W., F. KLEIN and R.E. LINCOLN. 1965. Quantitative assay for crude anthrax toxins. *J. Bacteriol.* 89: 74-83.
- KASPAR, R.L. and D.L. ROBERTSON. 1987. Purification and physical analysis of *Bacillus anthracis* plasmids pxo1 and pxo2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149: 362-368.
- KLIMPEL, K.R., S.S. MOLLOY, G. THOMAS and S.H. LEPPLA. 1992. Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89: 10277-10281.
- LAIRD, M.W., D. ZUKAUSKAS, K. JOHNSON, G.C. SAMPEY, H. OLSEN, A. GARCIA, J.D. KARWOSKI, B.A. COOKSEY, G.H. CHOI, J. ASKINS, A. TSAI, J. PIERRE and W. GWINN. 2004. Production and purification of *Bacillus anthracis* protective antigen from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 38: 145-152.
- LEPPLA, S.H. 1982. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic amp

- concentrations of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3162-3166.
- LEPPLA, S.H. 1984. *Bacillus anthracis* calmodulin-dependent adenylate cyclase: Chemical and enzymatic properties and interactions with eucaryotic cells. *Adv Cyclic Nucl. Prot. Phosphorylation Res.* 17: 189-198.
- LEPPLA, S.H. 1988. Production and purification of anthrax toxin. *Methods Enzymol.* 165: 103-116.
- LEPPLA, S.H. 1999. The anthrax toxin complex. *In: Sourcebook of Bacterial Protein Toxins.* J.E.A.F. ALOUF, J.H. (Ed.). Academic Press, London. pp. 276-302.
- MCBRIDE, B.W., A. MOGG, J.L. TELFER, M.S. LEVER, J. MILLER, P.C. TURNBULL and L. BAILLIE. 1998. Protective efficacy of a recombinant protective antigen against *Bacillus anthracis* challenge and assessment of immunological markers. *Vaccine* 16: 810-817.
- NAIPOSOS, T.S.P. 2005. Beternak di daerah endemis anthraks: Perlunya komunikasi risiko. *Harian Kompas*, 5 Maret 2005. hlm. 58.
- QUINN, C.P., C.C. SHONE, P.C. TURNBULL and J. MELLING. 1988. Purification of anthrax-toxin components by high-performance anion-exchange, gel-filtration and hydrophobic-interaction chromatography. *Biochem. J.* 252: 753-758.
- RISTROPH, J.D. and B.E. IVINS. 1983. Elaboration of *Bacillus anthracis* antigens in a new, defined culture medium. *Infect. Immun.* 39: 483-486.
- ROSENBERG, I.M. 1996. Protein analysis and purification, benchtop technique. Birkhauser, Boston. pp. 158-159.
- TARIGAN, S., R.F. SLOCOMBE, G.F. BROWNING and W. KIMPTON. 1994. Functional and structural changes of porcine alveolar macrophages induced by sublytic doses of a heat-labile, hemolytic, cytotoxic substance produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Am J Vet. Res.* 55: 1548-1557.
- WRIGHT, G.G., M. PUZISS and W.B. NEELY. 1962. Studies on immunity in anthrax. IX. Effect of variations in cultural conditions on elaboration of protective antigen by strains of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 83: 515-522.