J Med Vet Indones 9(1):27-31 (2005)
ISSN: 1858-4489

PENGEMBANGAN METODE PRODUKSI ANTIGEN PROTEASE *Escherichia coli* ENTEROPATOGENIK (EPEC)*

DEVELOPMENT OF METHOD FOR PRODUCTION OF Escherichia coli *ENTEROPATHOGENIC (EPEC) ANTIGEN*

Murtini S[1], Nurhayati T[3], Purwanto SB[2], Wibawan IWT[1]
[1] Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, FKH-IPB
[2] Laboratorium Bioteknologi Hewan dan Biomedis, Pusat Penelitian Bioteknologi IPB
[3]Jurusan Pengolahan Hasil Perikanan, Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

A study was carried out to develop a method of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) protease antigen production. In the first trial EPEC strain K1.1 which was cultured in the LCT-skim-milk-starch medium to produce protease. After purification using centricon this antigen induced non specific polyclonal antibody and cross reacted with the production medium. On the other hand a specific reaction was found from that of the bacteria grown in minimal medium M9 and precipitated with 45% ammonium sulphate. The protease had molecular weight of approximately 58.6 kDa and 37.4 kda with specific protease activity 0.019 IU/ mg protein.

Key words: enteropathogenic, E. coli, (EPEC), protease enzym, polyclonal antibody

PENDAHULUAN

Diare merupakan salah satu penyakit menular yang penting di Indonesia. Diare yang hebat menyebabkan penderita kehilangan banyak cairan dan garam – garaman terutama natrium dan kalium, sehingga mengakibatkan dehidrasi yang bila tidak diobati akan mengakibatkan kematian. Salah satu agen penyebab diare adalah bakteri *Escherichia coli* enteropatogenik (EPEC). EPEC merupakan salah satu penyebab utama diare pada anak-anak di Indonesia di mana prevalensi mencapai 55% dari anak-anak penderita diare tercuplik (Budiarti,1997).

Infeksi EPEC menyebabkan kerusakan mikrovili usus akibat adanya aktivitas proteolitik dari bakteri (Bell *et al.* 1985). Budiarti & Suhartono (1999) dalam Suhartono (2000) menemukan bahwa EPEC yang diisolasi dari penderita diare di Indonesia menghasilkan serin protease yang aktivitasnya berkorelasi dengan tingkat infeksi yang ditimbulkan. Protease tersebut mampu menghidrolisis kasein dan musin, dimana aktivitas proteolitiknya lebih tinggi pada substrat musin dibandingkan kasein (Kusumayanti,1998). Enzim proteolitik tersebut termasuk kelompok serin metaloprotease yang optimum pada pH 8.5-9.0 dengan berat molekul 42 kDa (Waturangi, 1991).

Dalam upaya pengendalian penyakit diare yang disebabkan oleh EPEC, pengobatan dini terhadap penyakit ini sangat penting. Salah satu bentuk pengobatan adalah pemberian imunisasi pasif. Hal itu dapat terwujud bila tersedia antibodi yang spesifik terhadap faktor-faktor virulensi yang dimiliki EPEC. Enzim protease ekstraseluler yang diduga merupakan salah satu faktor virulensi EPEC dapat digunakan sebagai antigen yang menginduksi antibodi dalam imunisasi pasif. Untuk menjadi antigen yang baik, protease tersebut harus murni sehingga antibodi yang diperoleh spesifik hanya terhadap protease saja. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metoda produksi protease EPEC sehingga dapat digunakan sebagai antigen yang spesifik.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan antigen. Dua metode produksi antigen protease ekstraseluler dari EPEC galur K1.1 dicoba dalam penelitian ini. Galur K1.1 dipilih karena galur ini mempunyai aktivitas spesifik terhadap musin yang paling tinggi (Kusumayanti,1998).

Antigen 1: EPEC K1.1 ditumbuhkan pada media cair kaldu *Luria Berthani* dan diinkubasikan pada *shaker waterbath* (Certomat® WR,B. Braun Biotech. Int.) selama 8 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm. Selanjutnya 10% dari biakan tersebut dipindahkan ke media produksi limbah cair tahu - skim pati (LCT, skim 0.5%, pati 1%) dan diinkubasi pada kondisi yang sama. Kemudian biakan tersebut disentrifugasi (*Beckman GPR Centrifuge*) pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit, dan supernatan yang diperoleh diendapkan dengan amonium sulfat 45% selama 24 jam pada suhu 4°C. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam Tris Cl 10 mM, pH 8 dan didialisis dengan membran dialisis (Sigma) selama 4 jam menggunakan buffer Tris Cl 20 mM, pH 8 sebanyak 100 kali volume dialisat. Hasil dialisis difiltrasi dengan kolom kromatografi gel Shephadex G 1000 (Sigma). Hasil kromatografi dimurnikan dengan sentrifugasi membran menggunakan sentricon (Amicon bioseparation, milipore corp.) pada kecepatan 1000 g selama 1 jam. Protease yang diperoleh tersebut digunakan sebagai antigen.

Antigen 2: Bakteri EPEC ditumbuhkan pada media cair kaldu *Luria Berthani* dan diinkubasikan pada *shaker waterbath* (Certomat® WR,B. Braun Biotech.Int.) selama 8 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm, kemudian disentrifugasi (*Beckman GPR Centrifuge*) pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dan diambil pelet bakterinya. Pelet bakteri dicuci dengan menambahkan larutan buffer Tris-Cl 10 mM pH 8 dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pencucian pelet bakteri tersebut dilakukan sebanyak tiga kali. Bakteri yang telah dicuci dibiakkan pada media produksi M9 (Sambrook *et al.*, 1989) yaitu media minimal dengan komposisi $Na_2HPO_4 7H_20$ 64g/l, KH_2PO_4 15 g/l, NaCl 2.5 g/l, NH_4Cl 5 g/l yang dilarutkan dalam air bebas ion dan disuplementasi dengan 2mM $CaCL_2$ selama 12 jam dalam kondisi kultur diam (tidak dikocok) pada suhu 37°C. Kemudian biakan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 15000 g selama 15 menit (Sorval plus 80). Supernatan yang diperoleh diendapkan dengan ammonium sulfat 45% selama 24 jam pada suhu 4°C. Endapan protease dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 15000 g selama 30 menit (Sorval plus 8). Pelet yang diperoleh dilarutkan dalam buffer Tris Cl 10 mM pH 8 dan disaring dengan filter membran dengan ukuran lubang pori 0.22 nm (Sartorius). Protease yang diperoleh tersebut digunakan sebagai antigen.

Pada setiap tahapan isolasi protease tersebut diukur konsentrasi protein dengan metode Bradford (1976) dan aktivitas protease yang diperoleh dengan metode Bergmeyer *et al.* (1984). Konfirmasi protein dilakukan dengan melarikan hasil pemurniannya pada SDS-PAGE 12%.

Hewan Coba. Sebanyak 17 ekor mencit BALB/c (umur 4 minggu), yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB, digunakan dalam produksi poliklonal antibodi. Lima belas ekor mencit diimunisasi dengan antigen protease sedangkan 2 ekor lainnya tidak diimunisasi digunakan sebagai kontrol serum negatif.

Produksi antibodi poliklonal. Lima ekor mencit diimunisasi antigen protease hasil permurnian pertama dengan dosis 20 µg/ekor pada rute penyuntikan di bawah kulit (subkutan) menggunakan adjuvant komplit dan tidak komplit masing-masing dengan perbandingan 1 : 1 dengan jarak penyuntikan 10 hari. Pada hari ke-28 darah diambil melalui vena ekor (v. *sacralia media*) untuk mengevaluasi hasil imunisasi. Serum yang diperoleh disebut dengan antibodi 1.

Sepuluh ekor mencit diimunisasi menggunakan antigen protease hasil pemurnian kedua dengan dosis penyuntikan masing-masing adalah 20 µg/ekor. Rute penyuntikan di bawah kulit (subkutan) menggunakan adjuvant komplit dan tidak komplit. Penyuntikan dilakukan sebanyak 9 kali dengan jarak penyuntikan 10 hari pada 3 kali penyuntikan pertama dan 7 hari pada penyuntikan selanjutnya. Pada hari ke-28, 42, 51, 62, dan 69 darah diambil melalui vena *sacralia media* (vena ekor) untuk mengevaluasi hasil imunisasi. Serum yang diperoleh disebut dengan antibodi 2. Evaluasi serum menggunakan metode dot blot menurut Wibawan (1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rataan konsentrasi protein dan aktivitas terhadap musin dari protease ekstraseluler EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media LCT-slim-pati sampai tahap pemurnian dengan sentricon lebih tinggi dibandingkan dengan EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media minimal M9 (Tabel 1). Perbedaan konsentrasi dan aktivitas ini dapat terjadi karena adanya perbedaan suplemen pada media pertumbuhannya, dimana pada media minimal tidak mengandung protein sedangkan LCT-skim-pati merupakan media yang kaya protein, sehingga protease yang diekskresikan oleh bakteri yang tumbuh dalam media kaya protein akan lebih banyak dibandingkan dengan bakteri yang ditumbuhkan pada media miskin protein. Namun penggunaan protease ekstraseluler EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media LCT-skim-pati yang telah dimurnikan sampai tahap pemurnian dengan sentricon bila digunakan sebagai antigen menghasilkan antibodi yang tidak spesifik terhadap protease karena adanya reaksi silang dengan media penumbuhnya (LCT-skim-pati).

Hasil pemurnian antigen ini menunjukkan bahwa enzim protease dapat disintesis secara konsisten oleh EPEC K1.1 pada media minimal. Kondisi optimal untuk mensintesis protease ekstraseluler sesuai dengan kondisi optimal untuk pertumbuhan EPEC, karena sintesis enzim protease ekstraseluler EPEC sangat dipengaruhi oleh faktor fisiologis dan lingkungan selama pertumbuhan (Darma, 2000).

Berdasarkan elektroforesis pada SDS-PAGE dari protease EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media M9 hanya diperoleh dua pita protein dengan berat molekul kira-kira 58.6 dan 37.4 kDa (Gambar 1), sedangkan protease yang dimurnikan dari EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media LCT-skim-pati mempunyai lima pita protein dengan berat molekul masing-masing 60.9 kDa, 39.3 kDa, 32.9 kda, 23.9 kDa dan 17.3 kDa (Gambar 2).

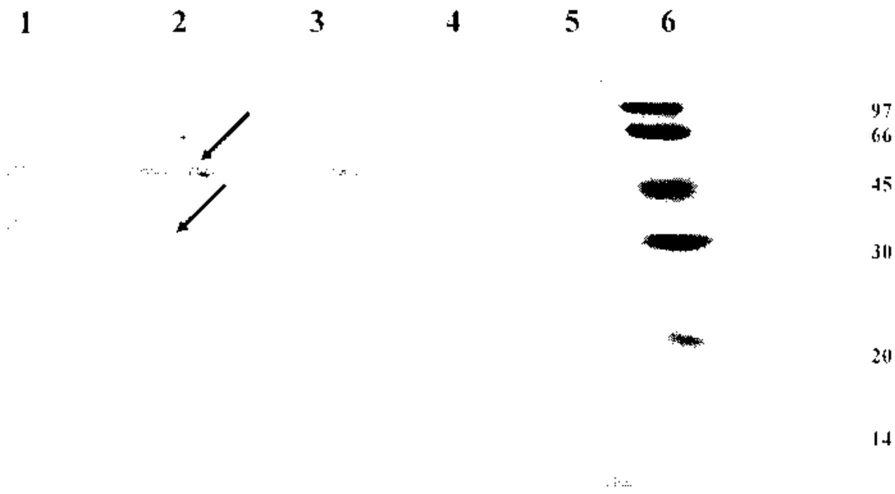
Hasil uji dot blot terhadap antibodi poliklonal yang diperoleh dari mencit yang diimunisasi dengan protease EPEC yang ditumbuhkan pada media LCT-skim-pati menunjukkan adanya reaksi silang dengan media pernumbuhnya. Hal ini berarti bahwa protein pada media penumbuhnya cukup imunogenik sehingga menginduksi terbentuknya antibodi. Adanya protein media selain protease EPEC pada antigen 1 yang digunakan dapat dilihat dari gambaran elektroforesis antigen 1 tersebut. Gambar 2 menunjukkan adanya tiga pita protein media yang sama dengan pita protein antigen 1. Diduga ketiga pita protein tersebut turut menginduksi terbentuknya antibodi antimedia yang menyebabkan terjadinya reaksi silang. Smith (1995) yang menyatakan bahwa serum hiperimun dari hewan yang diimunisasi mengandung antibodi tidak saja terhadap antigen yang diimunisasikan tetapi sejumlah kecil ketidakmurnian yang ada dalam preparat antigen dapat menimbulkan respon antibodi yang kuat.

Antibodi terhadap enzim protease ekstraseluler EPEC K1.1 yang ditumbuhkan pada media M9 baru terbentuk setelah mencit BALB/c disuntik tujuh kali. Titer antibodi hasil induksi antigen 2 yang diperoleh meningkat setelah pengulangan ke-8 dan 9 yaitu 2^2 dan 2^7. Hasil uji terhadap serum positif menunjukkan tidak adanya reaksi silang antara antibodi poliklonal dengan media produksi. Hal ini berarti bahwa protein antigen 2 cukup murni dan imunogenik

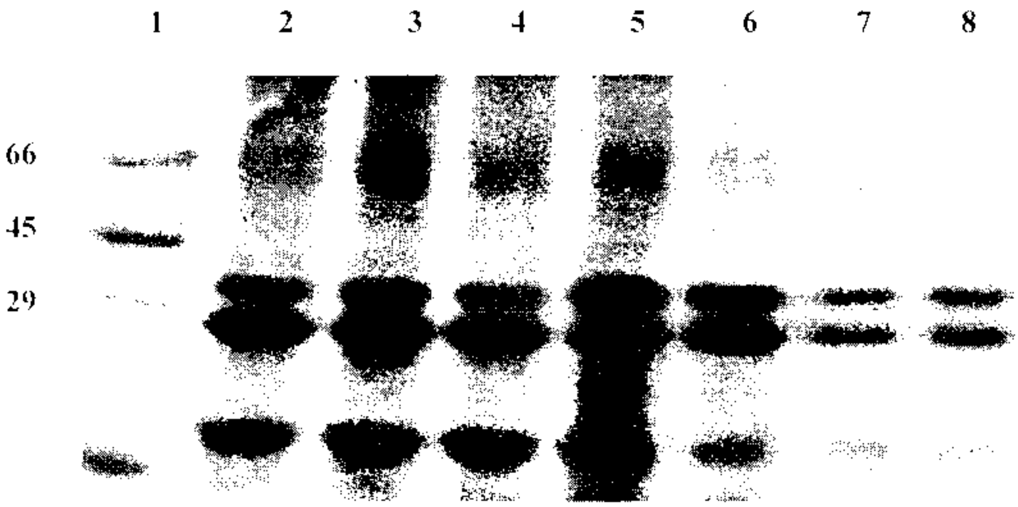
.

Tabel 1. Konsentrasi dan aktivitas protease EPEC K1.1 terhadap substrat musin

Media Produksi	**Konsentrasi protein (mg/ml)**	**Aktivitas protease (UI/ml)**	**Aktivitas spesifik (UI/mg)**
LCT-skim-pati	9.85 ± 0.114	6.8 ± 0.044	0.69
M9	0.412 ± 0.316	0.078 ± 0.12	0.19



Gambar 1. Visualisasi protein protease EPEC K1.1 : media produksi M9: (1-4) protease EPEC K1.1 dengan pengendapan ammonium sulfat, (5) musin, (6) penanda berat molekul (kDa)



Gambar 2. Visualisasi protein protease EPEC K1.1 media produksi LCT-skim-pati: (1) penanda berat molekul (kDa), (2-3) protease EPEC hasil sentricon, (4) protease EPEC hasil kromatografi, (5) protease EPEC hasil dialisis (6) protease EPEC hasil pengendapan ammonium sulfat, (7) ektrak kasar, (8) media LCT-skim-pati.

Tabel 2. Hasil Uji dot blot serum mencit yang diimunisasi dengan protease EPEC dari kedua jenis media.

Serum	Antigen			
	Protease 1	Media LCT-skim-pati	Protease 2	M9
Antibodi 1	+	+	-	-
Antibodi 2	-	-	+	-

DAFTAR PUSTAKA

Bell AE, Seller LA, Allen A, Cunliffe WJ, Morris ER, Ross-Murphy SB. 1985. Properties of gastric and duodenal mucus : effect of proteolysis, disulfide reduction, bile, acid, ethanol and hypertonicity on mucus gel structure. *Gastroenterol*, 88:269-280

Bergmeyer HV, Grasll M, Walter HE. 1984. Methods of enzymatic analysis. Vol 5. Verlag Chemie. Weinheim.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal Biochem*, 72:2458-254.

Budiarti S. 1997. Pelekatan pada sel Hep-2 dan keragaman serotipe O *Escherichia coli* enteropatogenik isolat Indonesia. *J Berkala Ilmu Kedokteran*, 29:105-110

Darma K. 2000 Aktivitas protease ekstraseluler *Escherichia coli* enteropatogenik (EPEC) K1.1 pada substrat lisozim. Thesis Program Pasca Sarjana IPB.

Kusumayanti RC. 1998 Aktivitas proteolitik enteropatogenik *Escherichia coli* pada substrat musin. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Hal.12

Sambrook JEF, Fritsch F, Maniatis T. 1989 Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. CSH. Laboratory Press.

Smith J. 1995. Produksi serum hipermun. *Dalam*: Teknologi ELISA dalam diagnosis dan penelitian. Burgess GW (Ed). Terjemahan oleh Artama WT. Gadjah Mada University Press. Hal 15-32

Suhartono MT. 2000. Pemahaman karakteristik biokimiawi enzim protease dalam mendukung industri berbasis bioteknologi. Makalah Orasi Ilmiah Guru Besar Tetap Ilmu Dasar-Dasar Biokimia Pangan. Fateta IPB.

Waturangi DE. 1999. Purifikasi dan karakterisasi protease ekstraseluler enteropatogenik *Escherichia coli*. Tesis Program Pasca Sarjana IPB. Hal.50

Wibawan IWT. 1993. Typenantigene von Streptokokken der serologischen gruppe B und deren bedeutung als virulenzfaktoren. Inagural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärnedizin der Justus-Leibig_universität Gießen 176 pp.