

Optimasi Overproduksi dan Purifikasi Mutein b dari Protein M1 *Streptococcus pyogenes* serta Pengujian Terhadap Pengikatan dengan Fibronektin Manusia

Mahasiswa: Imam Hardiman,

Skripsi (2008), Program Studi Sarjana Mikrobiologi SITH, e-mail:
sith04021@sith.itb.ac.id

Pembimbing: Dr. Dea Indriani Astuti¹, Debbie Sofie Retnoningrum, Ph. D.², Dr.

Ernawati Arifin Griri-Rachman³

¹ SITH-ITB, e-mail: dea@sith.itb.ac.id

² SF-ITB, e-mail: debbie@fa.itb.ac.id

³ SITH-ITB, e-mail: erna@sith.itb.ac.id

Gelar: Sarjana Sains (S.Si), Wisuda Oktober 2008

Abstrak

Streptococcus pyogenes merupakan mikroorganisme patogen yang memiliki spektrum infeksi yang sangat luas. Hal ini dikarenakan bakteri tersebut memiliki berbagai macam faktor virulensi, dan protein M merupakan faktor virulensi utama yang berperan dalam invasi, antifagositosis, adhesi ke sel epitel inang, dan internalisasi. Dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa terdapat 3 domain yang memiliki peranan penting dalam pengikatan dengan fibronektin manusia, yaitu domain A, B dan S (ABS). Pada domain ABS tersebut, diperkirakan terdapat 4 *region* yang mempengaruhi pengikatannya dengan fibronektin, yaitu *region a* dan *b* yang terdapat pada domain A, dan *region c* dan *d* yang terdapat pada domain B. Pada penelitian sebelumnya juga, nukleotida yang mengkode asam amino bermuatan pada *region b* telah dimutasi dengan metode *Site-Directed Mutagenesis* (SDM) sehingga diperoleh plasmid rekombinan pETabs-mutan b. Plasmid tersebut selanjutnya berhasil diklon di *Escherichia coli* BL21(DE3). Optimasi overproduksi mutein b kemudian dilakukan pada suhu 37 °C dengan variasi waktu induksi 3 dan 18 jam, serta penambahan IPTG 0,3 mM, 0,6 mM, dan 1 mM. Hasil overproduksi selanjutnya dimurnikan menggunakan kromatografi afinitas dan dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE serta kuantisasi menggunakan metode Bradford. Elektroferogram SDS-PAGE dengan pita tebal di sekitar 27-29 kDa dan kadar protein paling tinggi diperoleh pada protein hasil overekspresi dengan konsentrasi IPTG 0,3 mM dan lama waktu induksi 3 jam. Selanjutnya, dilakukan pengujian aktivitas pengikatannya dengan fibronektin manusia menggunakan metode Dot Blot dan ELISA. Hasil uji pengikatan dengan metode Dot Blot menunjukkan adanya indikasi perbedaan pengikatan antara *wild type* dan mutein b, tetapi hal tersebut belum dapat diklarifikasi secara kuantitatif dengan metode ELISA karena perlu dilakukan optimasi kondisi lebih lanjut.

Kata kunci: *Streptococcus pyogenes*, mutein b, overproduksi, uji ikatan.

Optimalization of Overproduction and Purification of Mutein b from the M1 Protein of *Streptococcus pyogenes*, and Examination of Its Binding With Human Fibronectin

Student: Imam Hardiman

Final Project (2008), Degree Program in Microbiology, School of Life Sciences and Technology-ITB, e-mail: sith04021@sith.itb.ac.id

Advisor: Dr. Dea Indriani Astuti¹, Debbie Sofie Retnoningrum, Ph.², and Dr. Ernawati Arifin Giri-Rachman³.

¹School of Life Sciences and Technology-ITB, e-mail: Dea@sith.itb.ac.id

²School of Pharmacy-ITB, e-mail : Debbie@fa.itb.ac.id

³School of Life Sciences and Technology-ITB, e-mail : Erna@sith.itb.ac.id

Degree: Degree Sains (S.Si), Conferred October 2008

Abstract

Streptococcus pyogenes is a pathogenic bacteria that is responsible for a number of human infections. M protein is the main virulence factor that helps this bacteria during invasion, antiphagocytosis, adhesion to the host cells, and internalization. Previous research revealed that there are three domains responsible for human fibronectin binding, namely A, B and S domains (ABS) and in these domains, there are regions a, b c and d which possibly have roles in binding to fibronectin. Nucleotides at region b had been mutated using Site-Directed Mutagenesis (SDM), resulting in pETabs-mutant b. These recombinant mutants had been successfully cloned in *Escherichia coli* BL21(DE3). The condition of mutein b overproduction was optimized with variation of induction times (3 and 18 hours) and IPTG concentrations (0.3mM, 0.6mM, and 1mM), and subsequently purified using affinity chromatography. Analysis by SDS PAGE and Bradford revealed that there was a thick band around 27-29 kDa with the highest protein concentration, while condition for highest mutein b overproduction were addition of IPTG 0.3 mM and 3 hours of induction time. Analysis using Dot Blot showed that there was an indication of protein binding interaction with human fibronectin, however this result need to be confirmed with ELISA method in the optimized condition.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, mutein b, overproduction, binding test.