

Protein Rekombinan *Outer Membrane Protein-31* dengan *Superoxide Dismutase* pada *Pichia Pastoris* Berpotensi Sebagai Kandidat Vaksin *Brucellosis*

(*PROTEIN RECOMBINANT OF OUTER MEMBRANE PROTEIN-31
WITH SUPEROXIDE DISMUTASE IN PICHIA PASTORIS AS
A POTENTIAL BRUCELLOSIS RECOMBINANT VACCINE CANDIDATE*)

**Arizah Kusumawati, Sri Kartika Wijaya,
Ulfatul Husnaa, Yana Rubiyana, Adi Santoso**

Pusat Penelitian Bioteknologi,
Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI),
Jln Raya Jakarta Bogor km 46, Cibinong,
Kabupaten Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16911
E-mail: ariz001@lipi.go.id

ABSTRAK

Brucellosis adalah penyakit zoonosis akibat infeksi bakteri *Brucella* yang menular dari hewan ke manusia secara langsung maupun melalui konsumsi produk hewani. Penyakit ini menjadi permasalahan dunia terutama di negara-negara endemis *Brucella* maupun di negara berkembang. *Brucella melitensis* merupakan salah satu spesies patogen berbahaya dari genus *Brucella*. Penggabungan sisi imunogenik dari *outer membrane protein 31* (OMP31) yang berasal dari *B. melitensis* dan *superoxide dismutase* (SOD) *B. abortus* berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin rekombinan. Pada penelitian ini, ekspresi protein fusi OMP31-SOD dalam plasmid pPIC9K dengan penambahan sekuen *His-tag*, bertujuan untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin protein rekombinan. Plasmid rekombinan pPIC9K+OMP31-SOD ditransformasikan ke dalam *Pichia pastoris* KM71 menggunakan metode elektroporasi. Seleksi transforman dilakukan menggunakan geneticin konsentrasi bertingkat 0,25-4,00 mg/mL. Klon transforman yang terseleksi ditumbuhkan untuk mengekspresikan protein rekombinan OMP31-SOD. Ekspresi protein dikonfirmasi menggunakan metode *dot-blot* dan elektroforesis dengan pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). Protein rekombinan OMP31-SOD berhasil diekspresikan *Pichia pastoris* KM71 klon 3, 4, dan 6 secara ekstraseluler dengan berat molekul sekitar 40 kDa.

Kata-kata kunci: *Brucellosis*; *Brucella melitensis*; *Pichia pastoris* KM71; protein rekombinan fusi OMP31-SOD

ABSTRACT

Brucellosis is zoonotic disease caused by *Brucella* infections transmitted to human either direct contact with animals or consume their products. This becomes problematic in the world especially in endemic countries of *Brucella* and development countries. *Brucella melitensis* is one of pathogenic species from genus *Brucella*. Combining immunogenic side both the outer membrane protein 31 (OMP31) derived from *B. melitensis* and superoxide dismutase (SOD) derived from *B. abortus* has the potential to be developed as a candidate for recombinant vaccine. In this study, the expression protein of fusion OMP31-SOD inserted in pPIC9K plasmid with extra *His-tag* sequence, intends to be developed as a recombinant protein vaccine. Recombinant plasmids pPIC9K+OMP31-SOD were transformed into *Pichia pastoris* KM71 using electroporation method. Selection of transformants was as performed using geneticin® concentrations of 0.25 mg/mL – 4 mg/L Selected transformants were grown to express the OMP31-SOD recombinant protein. Protein expression was confirmed using both of *dot-blot* method and electrophoresis with *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) staining. The OMP31-SOD recombinant protein was successfully expressed extracellularly by *Pichia pastoris* KM71 clones 3, 4, and 6 with a molecular weight approximately 40 kDa.

Keywords: *Brucellosis*; *Brucella melitensis*; *Pichia pastoris* KM71; OMP31-SOD recombinant fusion protein

PENDAHULUAN

Brucellosis merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh infeksi dari genus *Brucella*. *Brucella* termasuk bakteri gram negatif fakultatif intraseluler yang dapat mempengaruhi sistem imun inang (Avila-Calderón *et al.*, 2013). Penyakit *brucellosis* menimbulkan permasalahan kesehatan cukup serius pada hewan ternak dan manusia (Bahador *et al.*, 2012). Kasus serangan pada manusia dilaporkan mencapai sekitar 500.000 orang per-tahun di dunia, terutama terjadi di beberapa negara endemis *Brucella* (Pappas *et al.*, 2006). Infeksi *Brucella melitensis* sampai saat ini masih menjadi permasalahan di negara berkembang dan Timur Tengah (Ghasemi *et al.*, 2013). *Brucellosis* dikenal di Indonesia pada tahun 1925 dan telah ditemukan antibodi *brucellosis* di DKI Jakarta sebesar 13,5% (Sudiby, 1995). Prevalensi kasus *brucellosis* di Indonesia saat ini mencapai 40% pada hewan ternak yang tersebar di seluruh wilayah Indonesia (Samkhan, 2014).

Serangan *brucellosis* berdampak negatif pada laju ekonomi masyarakat. Kerugian ekonomi akibat *brucellosis* pada ternak ruminansia besar di Indonesia diperkirakan mencapai Rp. 3,6 trilyun per tahun (Basri dan Sumiarto, 2017). Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian menaksir kerugian akibat penyakit *brucellosis* mencapai lebih dari 5 milyar rupiah per tahun (Subdit Pengamatan Penyakit Hewan, 2014). *Brucellosis* pada hewan ternak mengakibatkan terjadinya penurunan sistem reproduksi hewan yang memicu berkurangnya produksi hasil ternak seperti produksi susu, keguguran, penurunan berat badan, dan infertilitas. Infeksi ini ditularkan ke manusia secara kontak langsung maupun lewat konsumsi susu tanpa pasteurisasi atau daging mentah (Mangen *et al.*, 2002). *Brucella* memiliki kemampuan mekanisme virulensi untuk menghindari deteksi dan aktivasi sistem imun (Mansoori dan Pourmand, 2016). Oleh karena itu, vaksinasi dimungkinkan sebagai salah satu upaya untuk mengatasi penyebaran *brucellosis* pada hewan dan manusia (Olsen dan Stoffregen, 2005; Avila-Calderón *et al.*, 2013).

Beberapa studi menyebutkan adanya efek proteksi dari vaksin sub-unit *Brucella* diantaranya yang berasal dari asam deoksiribonukleat (DNA), protein purifikasi, dan fraksi antigenik (Pasquevich *et al.*, 2011). Protein

rekombinan merupakan salah satu kandidat vaksin sub-unit yang lebih aman, *avirulent*, tidak infeksius, dan menginduksi proteksi terhadap *brucellosis* lebih lama (Perkins *et al.*, 2010). Fraksi antigenik yang berasal dari *Brucella* berpotensi sebagai vaksin protein rekombinan diantaranya *outer membrane protein* (OMP), lipopolisakarida (LPS), *superoxide dismutase* (SOD), L7/L12 ribosom, dan *outer membrane vesicles* (OMVs). Kandidat vaksin DNA rekombinan *OmpA-like trans-membrane domain* (OMP31) *B. melitensis* menunjukkan karakteristik imunogenik dan berpotensi dalam memicu sistem imun humoral dan seluler pada mencit yang terinfeksi *B. melitensis* (Doosti *et al.*, 2009). Fraksi antigenik lainnya yaitu SOD dari *B. abortus* yang merupakan enzim yang banyak diproduksi oleh organisme aerob dan anaerob. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa gen SOD berpotensi sebagai kandidat vaksin DNA maupun protein rekombinan yang mampu menginduksi sistem imun humoral maupun seluler pada hewan ternak (Yu, 2007; Sa'ez *et al.*, 2008).

Penelitian pengembangan vaksin dalam rangka mencari kandidat vaksin *Brucella* yang aman dan efektif bagi hewan ternak dan manusia terus dilakukan sampai saat ini. Penelitian ini bertujuan untuk ekspresi protein rekombinan fusi OMP31-SOD sebagai kandidat vaksin divalen yang akan mampu menginduksi sistem imun sehingga memiliki proteksi terhadap *brucellosis* pada hewan ternak. Konstruksi vaksin rekombinan dengan menggabungkan dua protein diharapkan dapat meningkatkan imunogenisitas sehingga penggunaannya lebih efektif. Studi penggunaan kandidat vaksin divalen menunjukkan bahwa vaksin fusi DNA divalen OMP16 dan L7/L12 lebih kuat dalam meningkatkan respons imun seluler dan proteksi sistem imun dibandingkan vaksin univalen pada mencit yang terpapar *brucellosis* (Luo *et al.*, 2006).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terapeutik Protein dan Vaksin, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Bahan yang digunakan untuk penelitian yaitu plasmid rekombinan pPIC9K+OMP-SOD telah dikonstruksi sebelumnya (Kusumawati *et al.*, 2017), *Pichia*

pastoris KM71 (Invitrogen), enzim restriksi *SacI* (Roche), *agarose gel DNA extraction kit* (Roche), sorbitol (Merck), *yeast nitrogen base* (YNB) (Sigma), *dextrose* (Merck), biotin (Sigma), *bacto yeast extract* (Becton Dickinson), *bacto peptone* (Becton Dickinson), *bacto agar* (Becton Dickinson), *potassium phosphate* (Merck), geneticin® (Biowest), gliserol (Merck), metanol (Merck), antibodi primer anti-his (Sigma), antibodi sekunder *anti-mouse* (Promega), akrilamida (Bio-Basic), *ammonium persulfate* (Biorad), *tetramethylethylenediamine* (TEMED) (Biorad), *nitro blue tetrazolium - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* (NBT-BCIP) (Invitrogen), *coomassie brilliant blue* (CBB) (Biorad).

Transformasi plasmid Rekombinan ke *Pichia pastoris* KM71

Plasmid rekombinan pPIC9K+OMP31-SOD dilinierkan dengan enzim restriksi *Sac I* dan dipurifikasi menggunakan *agarose gel DNA extraction kit* sebelum ditransformasikan ke *Pichia pastoris* KM71. Transformasi dilakukan dengan metode elektroporasi. Sel *Pichia pastoris* KM71 dibuat kompeten menggunakan sorbitol. Sebanyak 40 µl sel kompeten *P. pastoris* KM71 dicampur dengan 2 µg plasmid linier pPIC9K+OMP31-SOD. Sel dielektroporasi sesuai protokol menggunakan alat *gene pulser™ electroporation system* (Biorad). Hasil transformasi selanjutnya ditumbuhkan pada media MD agar (1% *yeast nitrogen base* (YNB), 2% *dextrose*, dan 0,2% biotin) yang diinkubasi pada suhu 30 °C selama tiga hari.

Seleksi Klon Transforman *Pichia pastoris* KM71

Seleksi klon transforman dilakukan pada media seleksi YPD agar (1% *yeast extract*, 2% *bacto peptone*, 2% *dextrose*, dan 2% agar) yang ditambah antibiotik geneticin®. Inkubasi proses seleksi klon transforman dilakukan pada suhu 30°C. Konsentrasi geneticin® digunakan secara bertingkat dari 0,25 mg/mL sampai 4 mg/mL. Seleksi klon dengan konsentrasi antibiotik geneticin® bertingkat bertujuan untuk memperoleh klon transforman yang unggul dengan integrasi multikopi.

Ekspresi Protein Rekombinan Fusi OMP31-SOD

Klon transforman *Pichia pastoris* ditumbuhkan pada media cair YPD 2 mL. Kultur YPD diinkubasi suhu 30 °C dengan

pengocokan 250 rpm selama 2 hari. Sebanyak 1 mL kultur selanjutnya dipindahkan ke media BMGY 10 mL (1% *yeast extract*, 2% *bacto peptone*, 100 mM *potassium phosphate* pH 6, 1,34% YNB, 1% gliserol, dan 0,2% biotin). Inkubasi dilakukan pada suhu 30 °C dengan pengocokan 250 rpm sampai OD600 mencapai 2-6. Sel selanjutnya dipanen dan dipisahkan dari supernatan melalui metode sentrifugasi 3000 g selama 5 menit. Pelet sel selanjutnya diresuspensi kedalam media BMMY 3 mL (1% *yeast extract*, 2% *bacto peptone*, 1,34% YNB, 0,2% biotin, dan 0,5% metanol). Inkubasi kultur sel dilakukan pada suhu 30 °C dengan pengocokan 250 rpm. Kultur sel selanjutnya diinduksi melalui penambahan metanol dengan konsentrasi akhir 0,5% setiap 24 jam. Pengambilan sampel sebanyak 0,2 mL dilakukan pada hari ke 1 sampai hari ke 5 untuk dilakukan analisis tingkat ekspresi sehingga bisa diperoleh hasil ekspresi protein yang optimal. Supernatan dipisahkan dari pelet dengan metode sentrifugasi dan kemudian disimpan pada -20 °C.

Karakterisasi Protein Rekombinan Fusi OMP31-SOD

Karakterisasi protein rekombinan terfusi yang diperoleh dilakukan dengan metode *dot blot* dan elektroforesis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Sampel 16 µl supernatan ditambah 4 µl bufer dianalisis dengan metode SDS-PAGE 12% yang dilanjutkan pewarnaan CBB (*coomassie brilliant blue*). Pendeteksian protein rekombinan pada metode *dot blot* menggunakan antibodi primer anti-his dengan antibodi sekunder *anti-mouse*. Pewarnaan membran nitroselulosa dilakukan dengan pemberian substrat NBT (*nitro blue tetrazolium*) - BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Protein rekombinan dapat diproduksi pada *Pichia pastoris* yang termasuk mikroorganisme eukariot metilotropik yang mana mampu mengekspresikan protein heterolog. *Pichia pastoris* digunakan untuk produksi protein rekombinan karena pertumbuhan selnya yang cepat dalam media minimal dan memiliki sistem ekspresi yang efisien sehingga memungkinkan untuk produksi dalam jumlah besar dengan teknik yang sederhana dan biaya yang lebih

murah (Daly dan Hearn, 2005). Beberapa galur *Pichia pastoris* yang digunakan sebagai inang ekspresi protein rekombinan diantaranya GS115, KM71 dan X33. Galur GS115 dan X33 memiliki gen promoter AOX1 dan memiliki fenotipe H⁺ sehingga mampu menggunakan metanol lebih efektif sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya. Pada penelitian ini digunakan galur KM71 Mut^s dengan promoter AOX2 yang menggunakan metanol sebagai sumber karbon lebih lambat. Pertumbuhan dan produksi protein pada Mut^s lebih lambat sesuai untuk produksi protein dengan pelipatan protein terbatas sehingga menghasilkan produk protein yang lebih tepat. Sel dengan fenotipe Mut^s juga mampu tumbuh dan memproduksi protein lebih banyak pada kultur *shake-flask* dengan ketersediaan oksigen terbatas dibandingkan pertumbuhan fenotipe Mut⁺ yang menjadi lebih lambat (Daly dan Hearn, 2005; Krainer *et al.*, 2012).

Plasmid rekombinan pPIC9K+OMP31-SOD hasil penelitian sebelumnya (Kusumawati *et al.*, 2017) dilinierkan terlebih dahulu sebelum ditransformasikan ke *Pichia pastoris* KM71. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan efisiensi proses transformasi. Metode transformasi elektroporasi dipilih karena umum digunakan untuk transformasi pada *Pichia pastoris*. Hasil transformasi selanjutnya dikultur pada media MD agar dan diperoleh banyak klon transforman yang tumbuh (Gambar 1A). Koloni tunggal yang tumbuh pada media MD agar dipilih secara acak sebanyak 70 klon transforman untuk ditanam pada media YPD agar (Gambar 1B) sebelum dilanjutkan proses seleksi klon. Seleksi klon transforman *P. pastoris* KM71 dilakukan pada media YPD agar yang ditambah geneticin[®] dengan konsentrasi bertingkat 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 1,75; 2,0; 3,0; dan 4,0 mg/mL. Sebanyak 56 klon transforman yang tumbuh pada media YPD dilakukan seleksi pada media YPD+geneticin[®] 0,25 mg/mL, akan tetapi hanya sedikit yang tumbuh (Gambar 1C). Pada media YPD+geneticin[®] 0,5 mg/mL diseleksi tujuh klon transforman yang diberi kode baru klon 1, klon 2, klon 3, klon 4, klon 5, klon 6, klon 7 (Gambar 1D). Ketujuh klon transforman ditumbuhkan pada media YPD+geneticin[®] 0,75 mg/mL dan diperoleh hanya 5 klon transforman yang mampu tumbuh (Gambar 1D). Kelima klon transforman (klon 3, klon 4, klon 5, klon 6, dan klon 7) selanjutnya dilakukan seleksi pada media YPD+geneticin[®] 1 mg/mL sampai YPD+geneticin[®] 4 mg/mL dan hasilnya kelima

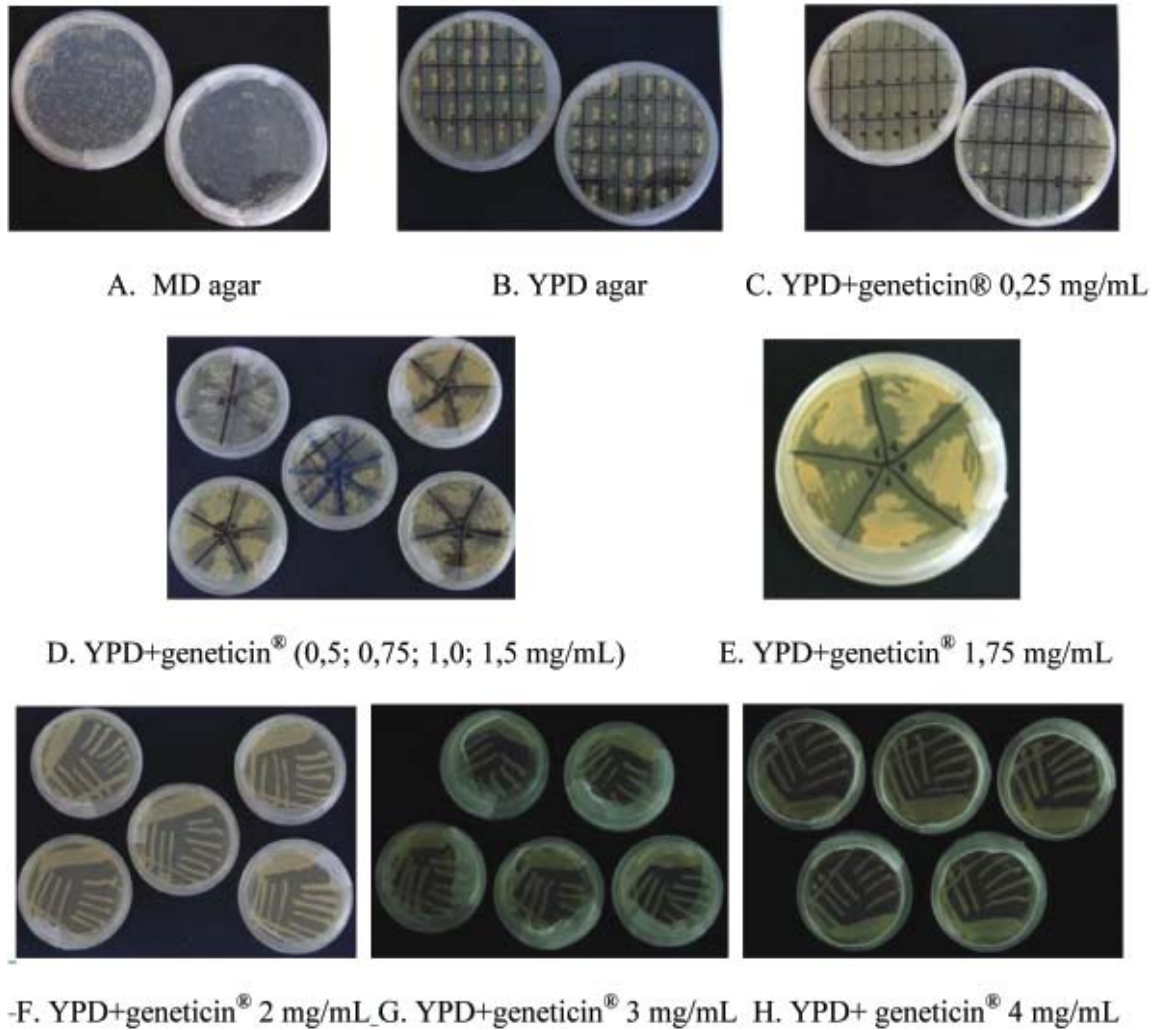
klon transforman tersebut menunjukkan mampu tumbuh (Gambar 1D-1H). Diperolehnya lima klon transforman (klon 3, klon 4, klon 5, klon 6, dan klon 7) yang tumbuh pada media seleksi yang ditambah antibiotik geneticin[®] menunjukkan bahwa transformasi plasmid rekombinan pPIC9K+OMP31-SOD ke *Pichia pastoris* KM71 dan proses seleksi klon transforman berhasil dilakukan. Vektor pPIC9K mempunyai gen resisten G418 (geneticin[®]) sehingga tahap seleksi dan isolasi klon transforman yang mengekspresikan protein rekombinan menjadi lebih cepat (Romanos, 1995). Pada vektor pPIC9K juga mempunyai signal sekuen alfa faktor untuk ekspresi protein secara ekstraseluler sehingga mempermudah dalam proses purifikasi protein (Yan *et al.*, 2013).

Uji ekspresi protein rekombinan fusi OMP31-SOD dilakukan dengan menumbuhkan klon transforman *Pichia pastoris* KM71 pada media ekspresi. Protein rekombinan fusi OMP31-SOD diekspresikan *P. pastoris* secara ekstraseluler dan disekresikan kedalam media kultur. Isolasi protein dilakukan dengan memisahkan sel dan media kultur melalui sentrifugasi. Supernatan yang mengandung protein rekombinan fusi OMP31-SOD selanjutnya dicek menggunakan metode *dot blot* (Gambar 2) dan elektroforesis SDS-PAGE 12% yang dilanjutkan dengan pewarnaan CBB (Gambar 3). Pengamatan hasil *dot blot* melalui dot yang terwarnai sedangkan pada hasil pewarnaan CBB berdasarkan pita yang tampak dan ukuran pita tersebut. Hasil *dot blot* klon transforman tiga seleksi geneticin[®] 0,5 mg/mL menunjukkan dot terwarnai dominan pada hari ke-4. Hasil pewarnaan CBB pada klon transforman tiga seleksi geneticin[®] 0,5 mg/mL terdapat pita yang berukuran sekitar 40 kDa pada hari ke-1 sampai hari ke 5. Protein rekombinan fusi OMP31-SOD diestimasi menggunakan *software* ExPASy berukuran 44 kD. Berdasarkan hasil pewarnaan CBB dan hasil *dot blot* menunjukkan bahwa protein rekombinan fusi OMP31-SOD terekspresi di *P. pastoris* KM71 dengan berat molekul sekitar 40 kDa dan masa inkubasi optimal empat hari.

Berdasarkan percobaan hasil uji ekspresi diperoleh masa inkubasi optimal untuk ekspresi protein rekombinan fusi OMP31-SOD adalah empat hari, maka dilakukan uji ekspresi secara bersamaan pada kelima klon transforman (klon 3, klon 4, klon 5, klon 6, dan klon 7) hasil seleksi geneticin[®] 0,5 mg/mL dengan masa inkubasi

selama 4 hari. Hasil uji ekspresi dikarakterisasi menggunakan *dot blot* diperoleh tampak dot yang terwarnai pada klon 3, klon 4, dan klon 6 (Gambar 4). Hal ini menunjukkan hasil seleksi geneticin® 0,5 mg/mL pada klon transforman 3, 4, dan 6 mengekspresikan protein rekombinan lebih tinggi daripada klon transforman 5 dan 7.

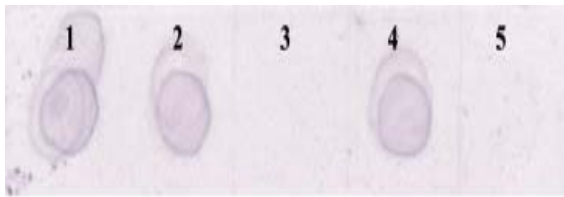
Uji ekspresi dan karakterisasi protein menggunakan *dot blot* juga dilakukan pada kelima klon transforman (klon 3, klon 4, klon 5, klon 6, dan klon 7) hasil seleksi geneticin® 4 mg/mL dengan masa inkubasi 4 hari. Hasil *dot blot* pada kelima klon transforman geneticin® 4 mg/mL menunjukkan dot yang kurang



Gambar 1. Hasil transformasi dan seleksi klon transforman *P. pastoris* KM71. (A.) Kultur hasil transformasi pada media MD agar diperoleh banyak klon yang tumbuh. (B.) Sebanyak 70 klon transforman dipilih secara acak dan dikultur pada media YPD agar. (C.) Seleksi 56 klon transforman ditumbuhkan pada media YPD+geneticin® 0,25 mg/mL diperoleh hanya 7 klon transforman yang tumbuh. (D.) Seleksi 7 klon transforman (klon 1, klon 2, klon 3, klon 4, klon 5, klon 6, dan klon 7) pada media YPD+geneticin® 0,5 mg/mL diperoleh 7 klon transforman tumbuh dan pada media YPD+geneticin® 0,75 mg/mL diperoleh hanya 5 klon transforman yang tumbuh. Seleksi 5 klon transforman transforman (klon 3, klon 4, klon 5, klon 6, dan klon 7) pada media YPD+geneticin® 1 mg/mL dan media YPD+geneticin® 1,5 mg/mL diperoleh 5 klon transforman tumbuh. Seleksi 5 klon transforman pada media YPD+geneticin® 1,75 mg/mL (E.), media YPD+geneticin® 2 mg/mL (F.), media YPD+geneticin® 3 mg/mL (G.), dan media YPD+geneticin® 4 mg/mL (H.) menunjukkan 5 klon transforman mampu tumbuh.



Gambar 2. Hasil *dot blot* ekspresi klon transforman 3 seleksi geneticin® 0,5 mg/mL. (1) Hari ke-1; (2) Hari ke-2; (3) Hari ke-3; (4) Hari ke-4; (5) Hari ke-5. Terlihat dot terwarnai dominan pada hari ke-4.



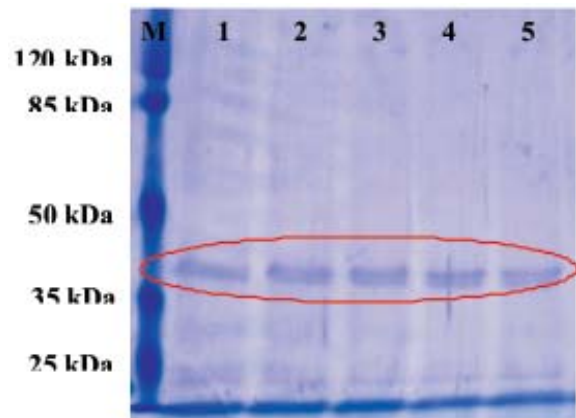
Gambar 4. Hasil *dot blot* ekspresi klon *P. pastoris* KM71 geneticin® 0,5 mg/mL lama inkubasi 4 hari. (1) Klon transforman 3, (2) Klon transforman 4, (3) Klon transforman 5, (4) Klon transforman 6, (5) Klon transforman 7. Terlihat dot lebih terwarnai pada klon transforman 3, 4, dan 6 hasil seleksi geneticin® 0,5 mg/mL.



Gambar 5. Hasil *dot blot* ekspresi klon *P. pastoris* KM71 geneticin® 4 mg/mL masa inkubasi empat hari. (1) Klon transforman 3, (2) Klon transforman 4, (3) Klon transforman 5, (4) Klon transforman 6, (5) Klon transforman 7. Terlihat dot kurang terwarnai pada kelima klon transforman hasil seleksi geneticin® 4 mg/mL.

terwarnai (Gambar 5). *Dot blot* yang kurang terwarnai pada kelima klon transforman hasil seleksi geneticin® 4 mg/mL menunjukkan ekspresi protein rekombinan yang rendah.

Tingkat resistensi geneticin® tergantung pada jumlah gen kan dari Tn903 yang terintegrasi ke dalam genom inang. Integrasi



Gambar 3. Hasil pewarnaan CBB ekspresi klon transforman 3 seleksi geneticin® 0,5 mg/mL. (M) Marker; (1) Hari ke-1; (2) Hari ke-2; (3) Hari ke-3; (4) Hari ke-4; (5) Hari ke-5. Terlihat pita yang berukuran sekitar 40 kDa.

multikopi vektor pPIC9K dapat meningkatkan tingkat resistensi geneticin® dari 0,5 mg/mL (1-2 kopi) sampai 4 mg/mL (7-12 kopi) (Invitrogen, 2010). Integrasi multikopi gen di *P. pastoris* dapat meningkatkan ekspresi protein rekombinan (Madhusudhan *et al.*, 2017). Akan tetapi tidak ada jaminan bahwa multikopi akan meningkatkan jumlah protein yang diekspresikan (Invitrogen, 2010). Berbagai strategi untuk mengoptimalkan ekspresi protein diantaranya melalui seleksi generasi klon, seleksi uji ekspresi protein dan meminimalkan proteolisis (Ahmad *et al.*, 2014). Faktor-faktor yang memengaruhi hasil produksi protein diantaranya komposisi medium kultur, tipe galur, dan faktor non nutrisi seperti pH kultur, tingkat agitasi, oksigen yang terlarut, induksi metanol, dan strategi fermentasi (Li *et al.*, 2007).

Saat ini banyak dilakukan riset pengembangan vaksin generasi baru untuk penyakit *brucellosis* melalui modifikasi genetik dan reformulasi vaksin. Vaksin sub-unit yang dikombinasikan dengan penambahan *adjuvant* ataupun ekspresi heterolog epitop *Brucella* pada berbagai vektor vaksin sedang diuji (Goodwin dan Pascual, 2016). Pada penelitian ini dilakukan penggabungan dua protein rekombinan yaitu OMP31 dan SOD sebagai kandidat vaksin divalen dengan harapan dapat meningkatkan sifat imunogenik sehingga lebih responsif dan penggunaannya lebih efektif. Vaksin sub-unit yang mengandung OMP dan LPS dari *B. ovis* diuji pada inang alaminya

melalui pemberian secara subkutan dalam mikropartikel dapat memberikan perlindungan yang sama seperti vaksin Rev 1 (Da Costa Martins *et al.*, 2010). Beberapa kandidat vaksin telah diidentifikasi dan dievaluasi lebih lanjut untuk menentukan kesesuaian dengan inangnya (Clapp *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2010). Vaksin sub-unit *brucellosis* menunjukkan peningkatan keamanan dan efikasi diuji pada hewan model, maka memberikan harapan besar untuk dapat menggantikan vaksin hewan yang ada dan mungkin diaplikasikan pada manusia (Yang *et al.*, 2013).

SIMPULAN

Berdasarkan data yang diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa proses transformasi plasmid rekombinan pPIC9K+OMP31-SOD, seleksi klon transforman, dan ekspresi protein rekombinan fusi OMP31-SOD telah berhasil dilakukan. Ekspresi protein rekombinan secara ekstraseluler ditunjukkan pada klon transforman 3, 4, dan 6 hasil seleksi geneticin® 0,5 mg/mL dengan masa inkubasi selama 4 hari. Protein rekombinan fusi OMP31-SOD sebagai kandidat vaksin rekombinan *brucellosis* mempunyai berat molekul sekitar 40 kDa.

SARAN

Hasil penelitian masih perlu dilakukan uji biologis pada hewan coba sebagai kandidat vaksin rekombinan *brucellosis* yang potensial. Penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi ekspresi protein rekombinan sebagai vaksin rekombinan sub-unit juga dapat diaplikasikan untuk penyakit hewan lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Kegiatan Unggulan LIPI.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 5301-5317.
- Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Sriranganathan N, Boyle SM, Contreras-Rodríguez A. 2013. A history of the development of *Brucella* vaccines. *BioMed Research International* Article ID 743509 1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/743509>.
- Bahador A, Mansoori N, Esmaeili D, Sabri RA. 2012. Brucellosis: prevalence and retrospective evaluation of risk factors in western cities of Tehran province Iran. *Journal of Bacteriology Research* 4(3): 33-37.
- Basri C, Sumiarto B. 2017. Taksiran kerugian ekonomi penyakit kluron menular (*brucellosis*) pada populasi ternak di Indonesia. *Jurnal Veteriner* 18(4): 547-556.
- Clapp B, Skyberg JA, Yang X, Thornburg T, Walters NB, Pascual DW. 2011. Protective live oral brucellosis vaccines stimulate Th1 and Th17 cell responses. *Infect. Immun.* 79: 4165-4174.
- Da Costa Martins R, Irache JM, Blasco JM, Muñoz MP, Marín CM, Jesús Grilló M, Jesús De Miguel M, Barberán M, Gamazo C. 2010. Evaluation of particulate acellular vaccines against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine* 28: 3038-46.
- Daly R, Hearn MTW. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* 18: 119-138.
- Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P, Javadi GR, Sardari S, Shokrgozar MA. 2009. DNA vaccine encoding the Omp31 gene of *Brucella melitensis* induces protective immunity in BALB/c mice. *Research Journal of Biological Science* 4(1): 126-131.

- Ghasemi A, Salari MH, Zarnani AH, Pourmand MR, Ahmadi H, Mirshafiey A, Jeddi-Tehrani M. 2013. Immune reactivity of *Brucella melitensis* vaccinated rabbit serum with recombinant Omp31 and DnaK proteins. *Iran J Microbiol* 5(1): 19-23.
- Goodwin ZI, Pascual DW. 2016. Brucellosis vaccines for livestock. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 181: 51-58.
- Invitrogen. 2010. *Multi-copy pichia expression kit for the isolation and expression of recombinant proteins from Pichia pastoris strains containing multiple copies of a particular gene*. User Manual. Invitrogen Corporation. 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 USA.
- Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, Herwig C, Spadiut O, Glieder A. 2012. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories* 11-22.
- Kusumawati A, Wijaya SK, Husnaa U, Rubiyana Y, Santoso A. 2017. Gene cloning encoding OMP31-SOD proteins of *Brucella* into pPIC9K vector using *Escherichia coli* host system. In: Proceeding The 6th Indonesian Biotechnology Conference. Surakarta 6-7 September 2016. Pp 439-444. ISBN: 987-602-14235-6-1.
- Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N, Renugopala-krishnan V. 2007. Expression of recombinant proteins in *Pichia Pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol* 142:105-124.
- Luo D, Ni B, Li P, Shi W, Zhang S, Han Y, Mao L, He Y, Wu Y, Wang X. 2006. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 2734-2741.
- vMadhusudhan R, Neha G, Satish KK, Ramanjini GPH. 2017. Effect of gene copy number, methanol and time period on production of CVS rabies glycoprotein expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6(5): 1173-1177.
- Mangen MJ, Otte J, Pfeiffer D, Chilonda P. 2002. Bovine brucellosis in Sub-Saharan Africa: estimation of seroprevalence and impact on meat and milk offtake potential. In: *Livestock Policy Discussion Paper No. 8*. Food and Agriculture Organization, Livestock Information and Policy Branch, AGAL.
- Mansoori N, Pourmand MR. 2016. Vaccines and vaccine candidates against brucellosis. *Infect Epidemiol Med* 2(4): 32-36.
- Olsen SC, Stoffregen WS. 2005. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Review of Vaccines* 4(6): 915-928.
- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases* 6 (2): 91-99.
- Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM. 2011. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PLoS ONE* 6(1): 1-13 article e16203.
- Perkins SD, Smither SJ, Atkins HS. 2010. Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS Microbiology Reviews* 34(3): 379-394.
- Romanos M. 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 527-533.
- Sa'ez D, Guzmán I, Andrews E, Cabrera A, Onat A. 2008. Evaluation of *Brucella abortus* DNA and RNA vaccines expressing Cu-Zn superoxide dismutase (SOD) gene in cattle. *Veterinary Microbiology* 129: 396-403.
- Samkhan. 2014. Analisis ekonomi brucellosis dalam menyongsong penanggulangan, pemberantasan, dan pembebasan brucellosis di Indonesia tahun 2025. *Buletin Laboratorium Veteriner* 14(1): 1-5.
- Subdit Pengamatan Penyakit Hewan. 2014. *Manual penyakit Hewan Mamalia*. Ed 2. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan c.q. Direktorat Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian. Jakarta.
- Sudibyo A. 1995. Studi epidemiologi brucellosis dan dampaknya terhadap reproduksi sapi perah di DKI Jakarta. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1: 31-36.

- Yan W, Zhi-min Z, Jun W, Kun Z, Jing Z, Yi W, Yan W, Ji-sheng Z, Jian-xin G. 2013. Cloning and high-level expression of methanol-tolerant lipase gene lipI in *Pichia pastoris*. *Journal of Henan Agricultural Sciences* issues 06. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-HNNY201306036.htm.
- Yang X, Skyberg JA, Cao L, Clapp B, Thornburg T, Pascual DW. 2013. Progress in *Brucella* vaccine development. *Front Biol* 8(1): 60–77.
- Yang X, Thornburg T, Walters N, Pascual DW. 2010. ΔznuA ΔpurE *Brucella abortus* 2308 mutant as a live vaccine candidate. *Vaccine* 28: 1069-74.
- Yu P. 2007. A new approach to the production of the recombinant SOD protein by methylotrophic *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 93-98.