



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI PROTEIN *HUMAN GRANULOCYT COLONY  
STIMULATING FACTOR* REKOMBINAN DARI  
*ESCHERICHIA COLI***

**SKRIPSI**

**DEWI RAHMAWATI  
0706197244**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
DESEMBER 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI PROTEIN *HUMAN GRANULOCYT COLONY  
STIMULATING FACTOR* REKOMBINAN DARI  
*ESCHERICHIA COLI***

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Farmasi**

**DEWI RAHMAWATI  
0706197244**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
DESEMBER 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Dewi Rahmawati

NPM : 0706197244

Tanda Tangan : .....

Tanggal : .....

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Dewi Rahmawati  
NPM : 0706197244  
Program Studi : Ekstensi Farmasi  
Judul Skripsi : Isolasi Protein *Human Granulocyt Colony Stimulating Factor* Rekombinan dari *Escherichia coli*

**Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia**

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Asrul M. F., M.Si ( ..... )  
Pembimbing II : Dr. Arry Yanuar, MSi, Apt ( ..... )  
Penguji I : Prof. Dr. Endang Hanani ( ..... )  
Penguji II : Dra. Sabaridjah W.E., SKM ( ..... )  
Penguji III : Dr. Amarila Malik, M.Si. ( ..... )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : Desember 2010

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'alamin, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, nikmat, dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi.

Pada kesempatan ini penulis ingin menghaturkan rasa terima kasih kepada pihak-pihak yang dengan penuh ketulusan hati memberikan bimbingan, arahan, dan dukungan kepada penulis selama menjalankan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS sebagai Ketua Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
2. Bapak Dr. Abdul Mun'im, MS selaku Ketua Program Ekstensi Departemen Farmasi FMIPA UI sekaligus sebagai pembimbing akademis yang telah memberikan dukungan dan saran selama masa pendidikan ekstensi di Departemen Farmasi FMIPA UI.
3. Bapak Asrul Muhamad Fuad, MS selaku pembimbing I yang telah bersedia membimbing saya dengan sabar dan telah memberikan kesempatan terhadap saya untuk melakukan penelitian di Laboratorium Rekayasa Bioproses dan Protein, Pusat Penelitian Bioteknologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong.
4. Bapak Arry Yanuar, Apt, MS selaku pembimbing II yang telah bersedia memberikan bimbingan, pengarahan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini serta memberikan kesempatan kepada saya untuk memperbolehkan saya penelitian diluar wilayah kampus FMIPA UI.
5. Seluruh staf pengajar, laboran, dan karyawan Program Ekstensi Farmasi FMIPA UI.
6. Teriring cinta dan sayang untuk Bapak, Ibu, kakak, adikku tersayang (Mba Diah dan Hanif) dan sahabatqu (Ashfar) sebagai penyemangat hidupqu yang telah mencurahkan kasih sayang dan perhatiannya.

7. Sahabat-sahabatku (Titik, Vivid dan Marina) yang selalu memberikan semangat, dukungan, keceriaan, dan warna baru dalam persahabatan.
8. Teman-teman seperjuangan di laboratorium Bioproses LIPI (Suci, Nurma, Pretty, Tewe, Arti,) atas kerja sama, kekompakan, dan keceriaannya selama masa penelitian.
9. Teman-teman Ekstensi Farmasi FMIPA UI angkatan 2007.
10. Staf-staf Lab Bioproses LIPI ( Teh Golly, Teh Ami dan Mas Ucup).
11. Bapak Zainal yang telah memberikan bimbingannya kepada saya selama saya berada di LIPI serta Mas Ridwan dan teman-teman dari IPB.
12. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun sebagai proses penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat khususnya dalam bidang ilmu pengetahuan.

Penulis

2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dewi Rahmawati  
NPM : 0706197244  
Program Studi : Ekstensi Farmasi  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**Isolasi Protein *Human Granulocyte Colony Stimulating Factor* Rekombinan dari *Escherichia coli***

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : .....

Yang menyatakan

( Dewi Rahmawati)

## ABSTRACT

Name : Dewi Rahmawati  
Study Program : Pharmacy, Extension program  
Title : Isolation Protein of Human Granulocyte Colony Stimulating  
Factor Recombinant from *Escherichia coli*

Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (HG-CSF) is a protein hormone that is categorized as human cytokine and has a very important therapeutic applications. as an important regulator in the formation of white blood cells (neutrophils) or granulopoiesis and some mature neutrophil granulocyte cell functions. Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) is a single polypeptide chain containing 174 amino acid residues, with molecular weight around 18,800 Da and isoelectric point (pI) 6.1, encoded by a single gene CSF3. Recombinant protein G-CSF is hydrophobic, easily aggregated and generally formed inclusion bodies precipitate. The aim of this study is to obtain G-CSF proteins from *E. coli* BL21(DE3)pLysS containing pET 21b-CSF3syn plasmid. This studies started from inoculum preparation and cell culture, and solution extraction and then isolating the target protein by affinity chromatography using metal chelating matrix nickel (Ni-NTA). Isolation was also done for the soluble part is to using affinity chromatography with cobalt metal chelating matrix (Talon). The results obtained from affinity chromatography were then analyzed to identify target proteins by SDS-PAGE and Western blot for protein G-CSF in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. The results showed 18.8 kDa protein identified by the marker.

Keywords : *Human Granulocyte Colony Stimulating Factor, E. coli* BL21DE3 pLysS, *inclusion bodies*, recombinant protein isolation.

Bibliography : 42 (1986-2008)



## ABSTRAK

Nama : Dewi Rahmawati  
Program Studi : Ekstensi Farmasi  
Judul : Isolasi Protein *Human Granulocyte Colony Stimulating Factor*  
Rekombinan dari *Escherichia coli*

*Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (hG-CSF) adalah protein hormon manusia yang tergolong sebagai sitokin dan memiliki aplikasi terapeutik sangat penting. Protein tersebut merupakan regulator penting dalam pembentukan sel darah putih (neutrofil) atau granulopoiesis dan beberapa fungsi sel granulosit neutrofil matang. *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF) merupakan sebuah rantai polipeptida tunggal yang mengandung 174 residu asam amino, dengan berat molekul sekitar 18.800 Da dengan titik isoelektrik (pI) 6,1, disandi oleh satu gen tunggal *CSF3*. Protein G-CSF rekombinan merupakan protein yang bersifat sangat hidrofobik, mudah teragregasi dan umumnya membentuk endapan sebagai badan inklusi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan protein G-CSF dari *E. coli* BL21(DE3)pLysS yang mengandung plasmid pET 21b-*CSF3syn*. Penelitian ini dimulai dari persiapan inokulum, kultur sel, ekstraksi pelarut dan kemudian mengisolasi protein target dengan kromatografi afinitas menggunakan matriks pengkhelat logam nikel (Ni-NTA). Isolasi juga dilakukan untuk bagian terlarut dengan menggunakan kromatografi afinitas menggunakan matriks pengkhelat logam kobalt (Talon). Hasil yang diperoleh dari kromatografi afinitas dan kemudian dianalisa untuk mengidentifikasi protein target G-CSF dengan SDS-PAGE dan Western blot dalam sel *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Hasil penelitian menunjukkan 18,8 kDa telah diidentifikasi dengan penanda.

Kata kunci: *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF), netropenia, *E. coli* BL21DE3pLysS, badan inklusi, isolasi protein rekombinan.  
Bibliografi : 42 (1986-2009)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
LAMPIRAN .....	x
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Netropenia .....	4
2.2 <i>Human Granulocyt Colony Stimulating factor</i> (hG-CSF).....	4
2.3 Karakteristik Protein G- CSF .....	5
2.3.1 Bentuk Fisikokimia.....	5
2.3.2 Struktur Protein.....	6
2.3.3 Elektroforesis.....	8
2.3.4 <i>Western Blot</i> .....	10
2.4 Kromatografi .....	11
2.4.1 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) .....	11
2.4.2 Kromatografi Afinitas.....	12
<b>3. BAHAN DAN CARA KERJA .....</b>	<b>13</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	13
3.2 Alat .....	13
3.3 Bahan.....	13
3.3.1 Mikroorganisme.....	13
3.3.2 Bahan Kimia .....	14
3.4 Larutan untuk Ekspresi Protein Rekombinan.....	14
3.4.1 Medium dan Pembuatan Medium Luria Bertani .....	14
3.4.2 Pembuatan Larutan, Dapar, dan Pereaksi.....	15
3.5 Larutan untuk Isolasi Badan Inklusi.....	16
3.5.1 Pembuatan Larutan, Dapar, dan Pereaksi.....	16
3.6 Larutan untuk Isolasi Protein Terdenaturasi Menggunakan Afinitas Kromatografi .....	17
3.6.1 Pembuatan Larutan, Dapar, dan Pereaksi.....	17
3.7 Larutan untuk Isolasi Protein Setelah didialisis Menggunakan Afinitas Kromatografi.....	18

3.7.1 Pembuatan Larutan, Dapar, dan Perekasi .....	18
3.8 Larutan untuk Sodium Dodesil Sulfat Gel Elektroforesis (SDS-PAGE) dan <i>Western Blot</i> .....	19
3.8.1 Pembuatan Larutan, Dapar, dan Perekasi .....	19
3.9 Cara Kerja.....	21
3.9.1 Inokulasi Sampel .....	21
3.9.2 Isolasi Badan Inklusi .....	21
3.9.3 Melarutkan Badan Inklusi (Kondisi Terdenaturasi) .....	22
3.9.4 Isolasi Protein Terlarut .....	22
3.9.5 Afinitas Kromatografi dengan Resin Ni-NTA (Kondisi Denaturasi).....	22
3.9.6 Afinitas Kromatografi Ni-NTA dengan Protein (Setelah didialisis) .....	24
3.9.7 Sodium Dodesil Sulfat Gel Elektroforesis (SDS-PAGE).....	24
3.9.8 <i>Western Blot</i> .....	25
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>26</b>
4.1 Hasil Isolasi Badan Inklusi .....	26
4.2 Hasil Isolasi Protein Terlarut.....	30
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>34</b>
5.1 Kesimpulan .....	34
5.2 Saran .....	34
<b>DAFTAR ACUAN.....</b>	<b>35</b>

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b>	Struktur Protein Rekombinan.....	6
<b>Gambar 2.2</b>	Struktur Kristal Protein G-CSF.....	7
<b>Gambar 4.1</b>	Hasil Isolasi Badan Inklusi dengan Menggunakan SDS-PAGE.....	27
<b>Gambar 4.2</b>	Hasil SDS-PAGE Menggunakan Afinitas Kromatografi pada Protein Terdenaturasi.....	28
<b>Gambar 4.3</b>	Hasil SDS-PAGE dengan Menggunakan Afinitas Kromato- grafi pada Protein Setelah Dialisis .....	29
<b>Gambar 4.4</b>	Hasil Western Blot Protein Setelah didialisis .....	30
<b>Gambar 4.5</b>	Hasil SDS-PAGE Isolasi Protein Terlarut Menggunakan Afinitas Kromatografi .....	31
<b>Gambar 4.6</b>	Hasil Western Blot dari Isolasi Protein dengan Menggunakan Afinitas Kromatografi .....	32
<b>Gambar 4.7</b>	<i>Mikrotube</i> sentrifus dengan pendingin.....	39
<b>Gambar 4.8</b>	Sentrifus tabung 50 mL dengan pendingin .....	39
<b>Gambar 4.9</b>	Neraca .....	39
<b>Gambar 4.10</b>	Sentrifus mikrotube tanpa pendingin .....	39
<b>Gambar 4.11</b>	Vorteks .....	40
<b>Gambar 4.12</b>	pH meter.....	40
<b>Gambar 4.13</b>	Timbangan.....	40
<b>Gambar 4.14</b>	Pipetor .....	40
<b>Gambar 4.15</b>	Stirer dengan pemanas .....	41
<b>Gambar 4.16</b>	Alat Western blot .....	41
<b>Gambar 4.17</b>	Magnetik stirrer.....	41
<b>Gambar 4.18</b>	Pipet tips.....	41
<b>Gambar 4.19</b>	<i>Laminar Air Flow</i> .....	42
<b>Gambar 4.20</b>	Sonikator .....	42
<b>Gambar 4.21</b>	<i>Shaker</i> .....	42
<b>Gambar 4.22</b>	<i>Shaker</i> Inkubator .....	42
<b>Gambar 4.23</b>	Spektrofotometer.....	43

<b>Gambar 4.24</b>	<i>Freezer</i> -20°C.....	43
<b>Gambar 4.25</b>	Alat SDS-PAGE.....	43
<b>Gambar 4.26</b>	Cetakan Gel.....	43
<b>Gambar 4.27</b>	Pipetor 5 mL.....	44
<b>Gambar 4.28</b>	Lemari asam.....	44



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1</b>	Regulasi Ekspresi Protein dalam pET-System (Novagen) .....	45
<b>Lampiran 2</b>	Plasmid pTZ57 yang digunakan dalam klon E. coli.....	46
<b>Lampiran 3</b>	Plasmid pET21.....	47
<b>Lampiran 4</b>	Sertifikat Analisis Resin TALON.....	48
<b>Lampiran 5</b>	Spesifikasi Antibodi Primer.....	49
<b>Lampiran 6</b>	Sertifikat Analisis Antibodi Sekunder .....	50
<b>Lampiran 7</b>	Skema Alur Kerja Penelitian Isolasi Badan Inklusi.....	51
<b>Lampiran 8</b>	Skema Alur Kerja Penelitian Isolasi Protein Terlarut .....	52
<b>Lampiran 9</b>	Penanda Protein Prestained.....	53



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pengurangan jumlah granulosit pada darah dikenal sebagai neutropenia atau agranulositosis. Kelainan ini sungguh serius karena berhubungan dengan peningkatan kepekaan terhadap infeksi, yang sering sekali berakibat fatal (Kumar dan Robbins, 1987).

Protein *human Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (hG-CSF) rekombinan saat ini digunakan sebagai obat untuk mengatasi neutropenia. Peran G-CSF yang sangat penting dalam pembentukan sel darah putih terutama neutrofil, mengakibatkan G-CSF dapat digunakan untuk terapi dan diproduksi secara rekombinan. Produk G-CSF rekombinan tersebut bermanfaat bagi orang-orang yang menderita neutropenia. Neutropenia atau kekurangan sel darah putih dalam tubuh dapat diakibatkan oleh beberapa sebab seperti kemoterapi dan radioterapi, faktor keturunan (*chronic congenital neutropenia*) atau karena transplantasi sumsum tulang. Protein hG-CSF rekombinan telah banyak dimanfaatkan untuk mengatasi neutropenia pada pasien yang menjalani kemoterapi kanker. Umumnya hG-CSF digunakan dalam kombinasi dengan obat kanker lain dalam pengobatan berbagai kanker seperti leukemia dan *Non-Hodgkin's lymphoma* (NHL). *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* merupakan faktor pertumbuhan yang dapat menaikkan produksi dan maturasi dari sel myeloid dan khususnya proliferasi dan diferensiasi progenitor neutrofil secara *invitro* dan *invivo* (Basu,S., Hodgson, G., Katz, M., dan Dunn, A. 2002). Terapi diindikasikan untuk meregulasi pertahanan, pertumbuhan, diferensiasi, dan aktivasi neutrofil. Beberapa produk rekombinan G-CSF seperti Filgrastim<sup>®</sup> (Neupogen) dan Pegfilgrastim<sup>®</sup> (Neulasta) telah diproduksi pada *Escherichia coli*, sedangkan Lenograstim<sup>®</sup> (Granocyte) diproduksi pada sel mamalia (sel CHO). Perbedaan masing-masing produk, selain berbeda dalam produksinya seperti pada Filgrastim<sup>®</sup> dan Pegfilgrastim<sup>®</sup> yang di produksi di *E. coli* dan Lenograstim<sup>®</sup> yang di produksi di sel mamalia. Perbedaan lain terdapat dalam ukuran molekul

proteinnya yaitu Filgrastim<sup>®</sup> (Neupogen) yang memiliki tambahan pada ujung N-nya, terdiri atas 175 asam amino. Sedangkan Pegfilgrastim<sup>®</sup> (Neulasta) merupakan Filgrastim<sup>®</sup> yang memiliki ikatan kovalen 20 kDa berupa molekul *monomethoxypolyethylene glykol* pada ujung N residu metionil-nya sehingga berat total molekul Pegfilgrastim<sup>®</sup> adalah 39 KDa. Ikatan kovalen PEG pada obat atau protein terapeutik dapat melindungi agens dari sistem imun inang. Lenograstim<sup>®</sup> (Granocyte) merupakan glikoprotein dengan berat molekul 25 KDa, memiliki ikatan disulfida (Fuad, A. M., Agustiyanti, D.F., Yulawati, dan Santoso, A., 2009)

Eksresi rekombinan hG-CSF di *Escherichia coli* sering mengarah pada pembentukan agregat protein tidak larut, yang disebut badan inklusi (*inclusion bodies*), sementara jumlah bentuk larut dalam sitoplasma hanya sedikit. Untuk mendapatkan protein biologis aktif dari badan inklusi berbagai langkah pelipatan kembali protein diperlukan. *Escherichia coli* adalah salah satu organisme prokariotik yang paling banyak digunakan untuk ekspresi karena biomassa yang tinggi terhadap rasio biaya. Namun, ekspresi protein rekombinan dalam *E. coli* sering gagal untuk mencapai konformasi yang benar dan kemudian bergabung satu sama lain untuk terbentuk protein agregat yang dikenal sebagai badan inklusi sehingga protein tersebut terlindung dari degradasi proteolitik oleh protease (Jong-Am S., et al. 2009).

*Escherichia coli* merupakan salah satu sel inang yang paling banyak digunakan untuk produksi protein rekombinan. Teknologi kultur *E. coli* untuk produksi protein rekombinan telah dipelajari dengan sangat baik, demikian pula dengan latar belakang genetik dari sel *E. coli*. Walau tidak semua protein rekombinan untuk tujuan terapeutik dapat diproduksi pada *E. coli*, tetapi sistem *E. coli* telah digunakan untuk produksi beberapa jenis protein terapeutik termasuk hG-CSF. *Escherichia coli* adalah satu dari sekian banyak inang yang telah digunakan secara luas untuk produksi protein heterolog karena kemudahannya dalam pemberian nutrisi, pertumbuhan yang tinggi dan telah diketahui genetik molekuler dan fisiologisnya (Babaeipour, V., Abbas, H. P. M., Sahebazar, Z., dan Alizadeh, R. 2010).



Dalam penelitian ini sistem ekspresi *E. coli* akan digunakan untuk produksi protein hG-CSF rekombinan. Klon *E. coli* yang digunakan adalah klon yang mengandung plasmid rekombinan pET-*CSF3syn*. Gen sintetik *CSF3syn* merupakan gen penyandi protein hG-CSF. Plasmid rekombinan pET-*CSF3syn* dan transforman *E. coli* yang mengandung plasmid rekombinan tersebut telah dikerjakan sebelumnya di Laboratorium Rekayasa Bioproses dan Protein, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Analisis ekspresi, isolasi, dan purifikasi protein rekombinan belum dilakukan. Oleh karena itu penelitian yang dilakukan difokuskan pada ekspresi dan isolasi protein hG-CSF rekombinan.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah mengekspresi dan mengisolasi protein *human Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (hG-CSF) rekombinan dari *E. coli* yang mengandung plasmid rekombinan pET-*CSF3syn*.

## 1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian adalah memperoleh protein hG-CSF rekombinan hasil isolasi yang selanjutnya dapat dikembangkan untuk diteliti lebih lanjut.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Neutropenia

Neutropenia adalah suatu keadaan dimana kandungan sel darah putih sangat rendah. Neutropenia terutama terjadi pada pasien yang menjalani kemoterapi atau setelah dilakukannya transplantasi tulang (Metha, A. dan Hoffbrand, V., 2006).

Neutropenia dapat terjadi akibat bawaan secara genetik (*congenital neutropenia*) seperti *chronic neutropenia* atau disebabkan oleh sesuatu (*acquired neutropenia*) misalnya infeksi, kemoterapi kanker, atau kekurangan nutrisi tertentu seperti vitamin B<sub>12</sub> dan asam folat (Hoffbrand, A.V., et al., 2005).

Neutropenia umumnya didefinisikan jika jumlah mutlak neutrofil (*absolute neutrophil count*, ANC) kurang dari 1500 sel/ $\mu$ L darah. Neutropenia dapat dikategorikan dalam beberapa tingkatan seperti ringan (ANC 1000-1500), sedang (ANC 500-1000), berat (ANC 200-500), dan sangat parah (ANC < 200). Pasien dengan neutropenia bawaan rentan terhadap bakteri atau infeksi berulang. Kondisi neutropenia yang berkepanjangan dapat menyebabkan kerentanan terhadap infeksi jamur (Christoph, 2009; Druhan J. L., et al, 2005).

Pokok utama dalam perawatan neutropenia berfokus pada penggunaan G-CSF. Kebanyakan studi menunjukkan bahwa penggunaan G-CSF mempercepat waktu pemulihan neutrofil (Berliner, N., Horwitz, M., dan Jr.Loughran, T. P., 2004).

### 2.2 *Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor (hG-CSF)*

*Human Granulocyte-colony stimulating factor* (hG-CSF atau G-CSF) merupakan protein hormon manusia yang tergolong sebagai sitokin dan memiliki aplikasi terapeutik sangat penting. *Granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) merupakan regulator penting dalam pembentukan sel darah putih (neutrofil) atau granulopoiesis dan beberapa fungsi sel granulosit neutrofil matang (Chao, Z. W., Jiang, F. L., dan Xin D. G., 2005).

*Human* G-CSF merupakan salah satu hemopoietik faktor pertumbuhan yang memainkan peranan penting dalam aktivasi merangsang proliferasi, diferensiasi, dan fungsional sel darah. Protein G-CSF berasal dari fagosit mononuklear, sel endotel, dan fibroblast (Cordevilla F. C., *et al.*, 2004).

Protein tersebut merupakan molekul pengatur penting dalam pembentukan sel darah putih (neutrofil) atau granulopoiesis. Protein G-CSF yang dilepaskan oleh sel-sel sumber akan berinteraksi dengan reseptor spesifiknya yang berada dipermukaan sel responsif, kemudian menstimulasi kelangsungan hidup, pertumbuhan, diferensiasi, dan fungsi progenitor neutrofil yaitu *granulocyte-monocyte progenitor*, serta maturasi neutrofil (Abbas *et al.*, 1994; Lieschke, 1994).

Protein G-CSF bersifat selektif khususnya dalam merangsang proliferasi dan diferensiasi prekursor neutrofil melalui interaksi (pengikatan) dengan reseptor spesifik protein G-CSF yang terletak pada permukaan sel progenitor granulosit. Protein tersebut bersifat lebih selektif dibandingkan dengan sitokin lain seperti *macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) dan interleukin-3 (IL-3). Gen *CSF3* (*Colony Stimulating Factor 3*) penyandi G-CSF alami dalam sel manusia terletak pada kromosom 17q21-22, sedangkan reseptor G-CSF manusia dikode oleh suatu gen yang terletak pada kromosom 1p35-p34.3 (Welte *et al.*, 1996).

## **2.3 Karakteristik Protein G-CSF**

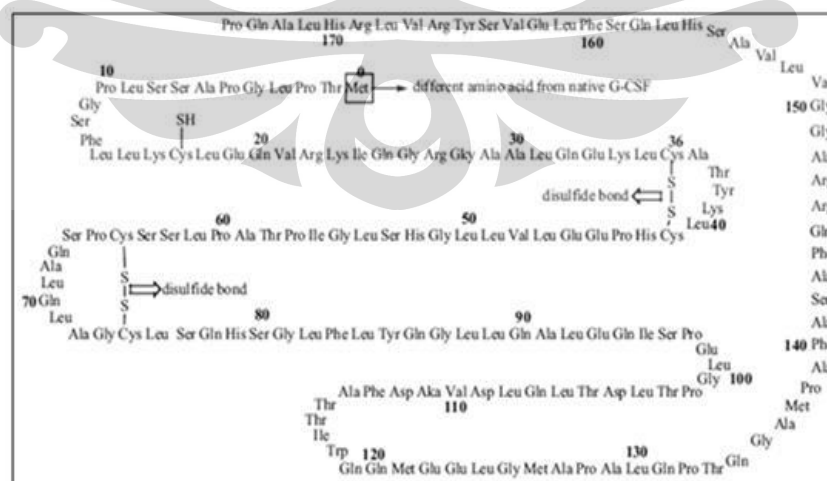
### **2.3.1. Bentuk fisikokimia**

*Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) merupakan sebuah rantai polipeptida tunggal yang mengandung 174 residu asam amino, dengan berat molekul sekitar 18.800 Da dan titik isoelektrik (pI) 6,1. Molekul G-CSF mengandung satu sistein bebas pada posisi 17 (Cys17) dan dua ikatan disulfida intramolekular, yaitu antara Cys<sup>36</sup>-Cys<sup>42</sup> dan Cys<sup>64</sup>-Cys<sup>74</sup>. Kedua ikatan disulfida dalam molekul G-CSF memiliki peran terhadap bioaktivitasnya. Protein G-CSF rekombinan merupakan protein yang bersifat sangat hidrofobik, mudah teragregasi dan umumnya membentuk endapan sebagai badan inklusi dalam kultur *E. coli* (Chao, Z. W., Jiang, F. L., dan Xin D. G., 2005).

*Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) disandi oleh satu gen tunggal berukuran 2500 pb, serta memiliki 5 ekson yang dipisahkan oleh 4 intron. Gen tersebut menghasilkan 3 macam mRNA yang membentuk 3 isoform preprotein G-CSF manusia, meskipun begitu hanya ada dua isoform protein G-CSF matang yang ditemukan di dalam tubuh, yaitu isoform a dan isoform b. Protein yang disandi oleh gen *CSF3* mengandung 207 asam amino untuk isoform a dan 204 asam amino untuk isoform b. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya perbedaan pemotongan intron pada proses maturasi mRNA. Isoform b kehilangan 3 asam amino pada nomor 36-38 dari ujung-N yaitu asam amino Val-Ser-Glu. Sebanyak 30 residu asam amino pada ujung-N dari kedua isoform tersebut merupakan peptida sinyal sehingga dihasilkan 2 isoform G-CSF dengan panjang 177 asam amino untuk isoform a dan 174 asam amino untuk isoform b. Kedua isoform G-CSF sama-sama memiliki bioaktivitas, akan tetapi isoform b memiliki aktivitas yang lebih baik dan lebih melimpah. Hal tersebut mengakibatkan G-CSF isoform b (174 asam amino) banyak digunakan dalam pengembangan produk farmasetika dengan teknologi DNA rekombinan (rDNA) (Nagata., *et al.*, 1986; Souza., *et al.*, 1986).

### 2.3.2 Struktur Protein

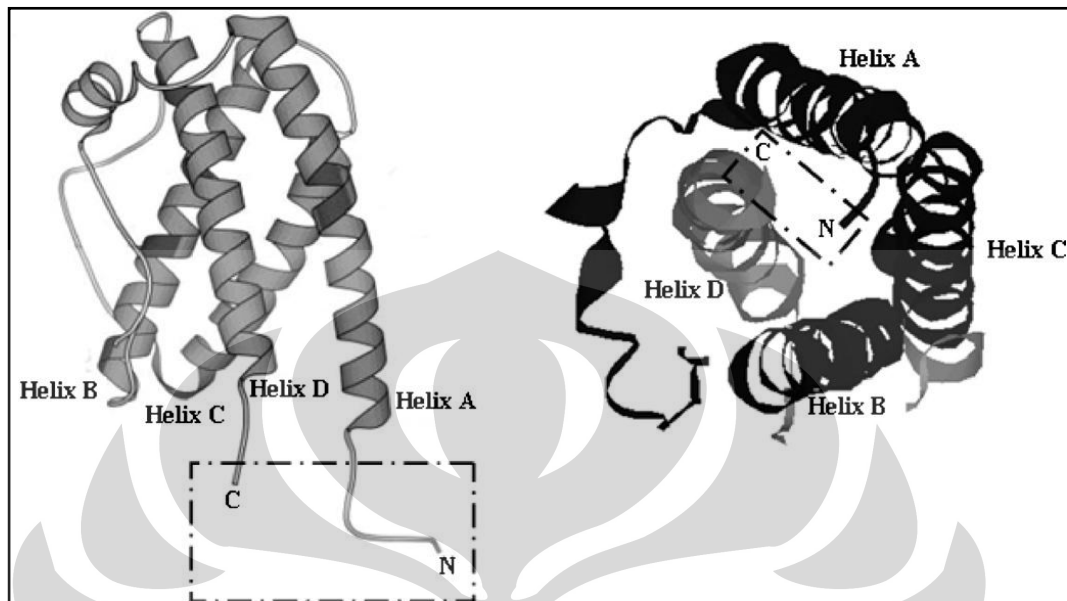
Gambar berikut menunjukkan struktur primer protein hG-CSF, yang mengandung 174 asam amino (Makinoda *et al.*, 2008).



[Sumber : Makinoda *et al.*, 2008]

Gambar 2.1 Struktur protein rekombinan hG-CSF

Gambar berikut menunjukkan struktur kristal protein hG-CSF (Jong-Am S., *et al.*, 2009) :



[Sumber : Jong-Am S., *et al.*, 2009]

Gambar 2.2. Ribbon diagram struktur kristal rekombinan HG-CSF. Diagram di sebelah kiri memberikan pandangan orthogonal terhadap sumbu panjang protein. Di sebelah kanan, diagram diputar 90° untuk memberikan pandangan ke sumbu dari empat-heliks-bundel (Protein Data Bank ID: 1rhg). Kotak putus-putus menunjukkan daerah C-terminal dan daerah N-terminal HG-CSF.

### 2.3.3 Elektroforesis

Protein biasanya memiliki muatan netto positif atau negatif yang mencerminkan campuran asam amino bermuatan yang dikandungnya. Jika sebuah larutan yang mengandung molekul protein mengalami suatu medan listrik, protein tersebut akan bermigrasi dengan laju yang bergantung pada muatan netto, ukuran, serta bentuknya. Prinsip dasar tersebut yang diterapkan dalam teknik elektroforesis (Albert *et al.*, 1994).

Elektroforesis SDS-PAGE termasuk ke dalam kelompok elektroforesis zona/wilayah, yaitu kelompok elektroforesis yang dibedakan berdasarkan medium penyangganya. Elektroforesis SDS-PAGE menggunakan gel buatan sebagai medium penyangga. Gel yang digunakan terbentuk dari polimerisasi akrilamida dengan *N, N'*-metilena bis akrilamida sehingga terbentuk ikatan silang karena polimerisasi akrilamida sendiri hanya menghasilkan ikatan linear yang tidak membentuk gel kaku (Girindra 1993). Polimerisasi dapat terjadi dengan cepat

pada suhu kamar dengan adanya katalis dan inisiator. Katalis dan inisiator yang umum digunakan ialah *N,N,N',N'*-tetrametilenadamina (TEMED) dan amonium persulfat (APS) sebagai sumber radikal bebas yang akan menginisiasi pembentukan polimer (Caprette, 2005). Pada metode tersebut, digunakan sodium dodesil sulfat (SDS) dan  $\beta$ -merkaptobetanol. Sodium dodesil sulfat (SDS) merupakan detergen anionik yang bersama dengan  $\beta$ -merkaptobetanol dan pemanasan menyebabkan rusaknya struktur tiga dimensi protein menjadi konfigurasi acak. Hal tersebut disebabkan oleh pecahnya ikatan disulfida yang selanjutnya tereduksi menjadi gugus-gugus sulfhidril. Hampir semua analisis dengan elektroforesis protein menggunakan gel poliakrilamida dengan konsentrasi yang sesuai dengan berat proteinnya (Tabel 1).

Tabel 2.1 Variasi konsentrasi gel berdasarkan bobot protein

% gel	Bobot protein (kDa)
7	50 – 500
10	20 – 300
12	10 – 200
15	3 – 100

[Sumber: Laemmli, 1970]

Pergerakan partikel di dalam medium bergantung pada ukuran partikel dan ukuran medium penunjang. Ukuran pori dari gel akan ditentukan oleh konsentrasi gel poliakrilamida. Protein yang besar mempunyai mobilitas yang lebih lambat dibandingkan dengan protein yang berukuran kecil. Berat molekul protein dapat ditentukan dengan kalibrasi menggunakan standar protein yang sudah diketahui berat molekulnya (Rybicki, 1996). Teknik elektroforesis gel banyak digunakan baik di bidang kimia maupun biokimia, karena teknik tersebut memiliki banyak keuntungan, diantaranya memiliki daya resolusi tinggi, sederhana, dan mudah dibawa (Girindra, 1993).

Elektroforesis gel poliakrilamid SDS (atau SDS-PAGE), mengawali teknik dalam analisis protein. Metode tersebut menggunakan gel poliakrilamid dengan struktur yang saling-silang sebagai matriks gel yang harus dilalui oleh molekul

protein. Gel disiapkan sebelum digunakan dengan cara polimerisasi dari monomer-monomernya, ukuran pori diatur sedemikian rupa sehingga cukup kecil untuk menghambat migrasi molekul-molekul protein yang dianalisis. Molekul protein tidak sekedar dilarutkan dalam air tetapi dicampur dengan semacam deterjen yang bermuatan sangat negatif, yaitu Sodium Dodesil Sulfat (SDS). (Albert *et al.*, 1994).

Deterjen tersebut mengikatkan diri pada molekul protein, sehingga protein tersebut menguraikan lipatan-lipatannya menjadi rantai-rantai polipeptida yang memanjang. Dengan demikian setiap molekul protein terbebas dari interaksi dengan molekul protein lain atau dengan molekul lipid dan membuatnya dapat larut secara bebas dalam larutan deterjen. Setiap molekul protein mengikat sebagian besar molekul deterjen yang bermuatan negatif, sehingga muatan setiap molekul protein menjadi negatif. Hal tersebut menyebabkan molekul bermigrasi ke arah elektroda positif apabila mengalami tegangan listrik. Gel poliakrilamid bertindak sebagai penyaring molekul, protein-protein berukuran besar mengalami hambatan jauh lebih besar dibanding protein berukuran kecil. Dengan demikian suatu campuran kompleks protein-protein akan saling terpisah membentuk pita-pita yang tersusun menurut berat molekul setiap protein. Pita-pita protein dengan mudah dideteksi melalui pewarnaan gel dengan zat pewarna *Commassie Brilliant Blue (CBB)*, sedangkan bila konsentrasi protein rendah dapat dideteksi dengan zat pewarna perak (Albert *et al.*, 1994).

#### **2.3.4 Western Blot**

Teknik *Western blot* atau bercak protein merupakan suatu cara yang sering digunakan untuk memindahkan atau transfer protein yang diuraikan secara elektroforesis dari gel poliakrilamid ke membran nitroselulosa. Teknik ini didahului oleh teknik *Sodium Dodesil Sulfat Gel Elektroforesis (SDS-PAGE)*, protein yang diuraikan secara elektroforasis pada gel sukar dideteksi secara enzimatik. Protein yang mempunyai sifat antigenitas pada membran nitroselulosa bereaksi dengan antibodi spesifik dan membantu suatu imun kompleks yang terlibat sebagai pita.

Membran nitroselulosa yang sering digunakan untuk transfer protein dari gel poliakrilamid sebelumnya diblok terlebih dahulu untuk menghindari timbulnya reaksi tidak spesifik dan untuk menekan terjadinya pewarnaan pada latarbelakang membran sehingga pita akan terlihat menjadi lebih tajam.

Efektifitas transfer protein dapat dipengaruhi oleh :

1. Jenis gel atau persentase komposisi gel,
2. Jenis protein yang ditransfer,
3. Formulasi dapar
4. Lamanya waktu transfer

Penggunaan teknik *Western blot* dalam bidang molekuler biologi

1. Identifikasi protein/ antigen dengan monoklonal atau poliklonal antibodi,
2. Identifikasi antibodi dengan antigen spesifik,
3. Untuk tes alergen,
4. Deteksi mikroelemen dari kompleks protein dengan penggunaan antibodi,
5. Untuk pewarnaan protein (Putra, S.T., 1997).

#### **2.4 Kromatografi**

Salah satu metode yang paling berguna untuk pemisahan (fraksinasi) protein adalah kromatografi, yaitu sebuah teknik yang semula dikembangkan untuk memisahkan molekul-molekul kecil seperti gula dan asam amino. Pada umumnya protein dipisahkan menggunakan kromatografi kolom. Pada kromatografi kolom larutan yang mengandung campuran protein dilewatkan melalui sebuah kolom berisi suatu matriks zat padat yang berpori. Protein-protein yang berlainan dihambat secara berbeda akibat interaksi yang berbeda antara masing-masing protein dengan matriks. Sesuai dengan matriks yang dipilih, protein dapat dipisahkan berdasarkan : muatan yang dimiliki (kromatografi penukar-ion), hidrofobitas (kromatografi hidrofobik), ukuran molekul (kromatografi filtrasi-gel), atau berdasarkan kemampuan mengikat gugus kimia tertentu (kromatografi



afinitas). Banyak jenis matriks yang tersedia untuk berbagai jenis kromatografi. Kolom penukar-ion dilengkapi dengan butir-butir kecil yang membawa muatan positif atau negatif, sehingga protein akan terpisah menurut perbedaan muatan yang terdapat pada permukaan masing-masing (Albert *et al.*, 1994).

#### **2.4.1 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)**

*Fast Protein Liquid Chromatography* adalah modifikasi dari Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan perantara antara kromatografi klasik dan KCKT. Pada dasarnya prinsip FPLC adalah sama dengan KCKT. *Fast Protein Liquid Chromatography* ditujukan khusus untuk pemisahan protein. Perbedaan utama adalah jenis kolom dan matriks yang digunakan. Komponen baja tahan karatnya diganti dengan bahan gelas dan plastik, karena baja tahan karatnya dianggap mengubah sifat protein (mnstate, 2010).

*Fast Protein Liquid Chromatography* juga dapat digunakan untuk memisahkan molekul polimer lain, seperti asam nukleat pada konsentrasi sangat rendah. Tekanan FPLC lebih rendah dari pada tekanan HPLC. Karakterisasi protein sangat penting untuk memahami fungsinya di tingkat molekul. Protein dapat dipisahkan melalui kromatografi dengan FPLC dengan berbagai metode seperti kromatografi fase balik (*reversed phase*), penukar ion (*ion exchange*), filtrasi gel (*size exclusion*) dan kromatografi afinitas (*affinity*) (MSUM Biotech-Chromatography., n.d.).

##### **2.4.1.1 Kromatografi Afinitas**

Kromatografi afinitas merupakan salah satu dari beberapa jenis kromatografi adsorpsi, sangat cocok dan efisien untuk isolasi biomolekul. Teknik ini bergantung pada material dasar adsorben berdasarkan afinitas biologis zat yang akan diisolasi. Dalam kromatografi afinitas, adsorpsi spesifik sifat dasar material direalisasikan dengan menambahkan ligan kovalen yang melengkapi biomolekul target ke sebuah matriks yang tidak larut. Jika sebuah sel ekstrak kasar mengandung target biologis aktif dilewatkan melalui kolom seperti sebuah ligan bergerak, maka semua senyawa yang menunjukkan afinitas di bawah kondisi percobaan yang diberikan akan ditahan oleh kolom, sedangkan senyawa tidak

menunjukkan afinitas akan melewati kolom, yang ditahan target kemudian dilepaskan dari kompleks dengan ligan bergerak dengan mengubah parameter seperti pH, kekuatan ion, komposisi dapar atau suhu. Secara konseptual tehnik ini merupakan kromatografi yang memiliki selektivitas dengan hasil yang tinggi dan tidak ada bandingannya (Zachariou M., 2008).



## BAB 3

### BAHAN DAN CARA KERJA

#### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Rekayasa Bioproses dan Protein, Pusat Penelitian Bioteknologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong. Penelitian dilakukan pada bulan September sampai bulan Desember 2010.

#### 3.2 Alat

Beberapa alat berikut ini digunakan sepanjang penelitian : *Laminar Air Flow* [Esco], timbangan analitik [Precisa], tabung reaksi [Pyrex], kawat ose, spatula, labu erlenmeyer [Pyrex], gelas ukur [Duran], pH meter, sentrifuse dengan pendingin [BioFuge], mikropipet 20-200  $\mu\text{L}$  [Witopet], pemanas dengan *magnetic stirrer*, inkubator [Heraeus], mesin pembuat es [Scotman], *freezer*  $-20^{\circ}\text{C}$  [Scotman], *Ultra Low Temperatur*  $-80^{\circ}\text{C}$ , vorteks [Thermolyne], bunsen, termometer [Yenaco], mikropipet 0,5-10  $\mu\text{L}$  dan 100-1000  $\mu\text{L}$  [Witeg], mikropipet 2-20  $\mu\text{L}$  dan 20-200  $\mu\text{L}$  [Lab mate], mikropipet 200  $\mu\text{L}$  dan 1000  $\mu\text{L}$  [Gibson], mikropipet 1-5 mL [HTL], spektrofotometer [BECKMAN], tabung sentrifus [Nalgene], sonikator [HERMLE Z320K], Spektofotometer, alat elektroforesis Mini-Protean II [Bio-Rad], alat *western blot* [Bio-Rad], inkubator dengan agitasi [Heraeus], dan alat-alat lain yang biasa digunakan dalam laboratorium.

#### 3.3 Sampel

##### 3.3.1 Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah kultur *E. coli* BL21(DE3)pLysS [Novagen] yang mengandung plasmid rekombinan pET-*CSF3syn* (ec). Gen *CSF3syn* merupakan gen yang dikonstruksi mengandung kodon preferensi *E. coli* sehingga ekspresi protein dapat optimal di sel target. Galur ini dikonstruksi agar membawa gen penyandi *CSF3syn*.

### 3.3.2 Bahan Kimia

Tripton [Biomark], Ekstrak ragi [Pronadisa], Natrium klorida [AppliChem], Glukosa [Merck], Ampisilin, IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranosida [Fermentas], Lisozim [Biobasic Inc.], DNase1 [Fermentas], Gliserol [Merck<sup>®</sup>], Magnesium klorida [Merck], Natrium azida [Merck<sup>®</sup>], Triton X-100 [Merck], Ditiotretitol (DTT) [BioRad], Amonium Persulfat (APS) [BioRad], TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamin) [Appllichem], Sodium dodesil sulfat [Invitrogen], Akrilamid [BioRad], Glisin [IBI], *Commassie Brilliant Blue* (CBB), Asam asetat glasial [Merck], Tris metil hidroksi aminometan [Bio Basic Inc], Bromofenol biru [Biobasic Inc.], 2-merkaptotanol [Merck<sup>®</sup>], Metanol [Merck], Sukrosa [Merck<sup>®</sup>], Natrium EDTA [Merck<sup>®</sup>], Natrium deoksikolat [Bio Basic Inc], Imidazol [GE healthcare], Resin NiNTA [Qiagen], Resin TALON [Clontech], Natrium hidrogen fosfat [Merck], Hidrogen klorida [Merck<sup>®</sup>], Susu skim, Tween 20 [BioRad], Membran dialisis [Spectra/Por<sup>®</sup>], Penanda protein PageReguler<sup>TM</sup>prestained [Fermentas], Antibodi poliklonal IgG [Promega], *Anti rabbit* IgG (Fc) Antibodi poliklonal konjugat [Promega], Urea [Basicbasic Inc.].

## 3.4 Larutan untuk Ekspresi Protein Rekombinan

### 3.4.1 Medium dan Pembuatan Medium

#### 3.4.1.1 Medium Luria Bertani

Medium yang digunakan adalah medium cair Luria Bertani (LB). Adapun kandungan dari medium LB adalah tripton, ekstrak ragi dan Natrium klorida. Medium LB cair ini digunakan untuk membuat kultur inokulum dan kultur cair bakteri.

#### 3.4.1.2 Pembuatan Medium Luria Bertani

Untuk membuat 1 liter medium cair ditimbang 10 gram tripton, 5 gram ekstrak ragi, dan 10 gram natrium klorida kemudian dilarutkan dengan aquadest sampai 1 liter dalam Erlenmeyer 2 liter. Medium yang sudah jadi disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah agak dingin, ditambahkan 10 mL glukosa konsentrasi 40% sehingga medium tersebut mengandung 0,4% glukosa. Kemudian ditambahkan 500  $\mu$ L larutan ampisilin

sehingga medium mengandung 50  $\mu\text{g/mL}$  dan ditambahkan 340  $\mu\text{L}$  larutan kloramfenikol sehingga medium mengandung 34  $\mu\text{g/mL}$  kloramfenikol. Medium selanjutnya dapat langsung digunakan untuk pembuatan kultur cair.

### **3.4.2 Pembuatan Larutan, Dapar dan Preaksi**

#### **3.4.2.1 Larutan Glukosa 40%**

Sebanyak 40 gram glukosa ditimbang dan dilarutkan dengan aquadest hingga 100 mL. Selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### **3.4.2.2 Larutan Stok IPTG 1 M**

Sebanyak 1 gram IPTG dilarutkan dengan 4,2 mL aquabidest steril secara aseptis menghasilkan larutan stok IPTG dengan konsentrasi 1 M.

#### **3.4.2.3 Larutan Lisozim 50 mg/mL**

Sebanyak 100 mg lisozim dilarutkan dengan aquabidest steril hingga 2 mL secara aseptis, menghasilkan larutan lisozim dengan konsentrasi 50 mg/mL. Kemudian lisozim disimpan dalam *freezer* -20°C.

#### **3.4.2.4 Larutan Natrium klorida 1 M**

Sebanyak 5,85 gram natrium klorida dilarutkan dengan aquabidest steril hingga 100 mL, sehingga menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1 M.

#### **3.4.2.5 Larutan Magnesium klorida 1 M**

Sebanyak 20,3 gram magnesium klorida dilarutkan dengan aquabidest steril hingga 100 mL, sehingga menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1 M.

#### **3.4.3.6 Dapar Tris-HCl pH 8,0 1 M**

Sebanyak 12,1 gram tris base dilarutkan dalam kurang lebih 80 mL aquabidest steril. Kemudian pH diatur dengan penambahan hidrogen klorida 2 N hingga tercapai pH 8,0. Setelah mencapai pH 8,0 ditambahkan aquabidest steril hingga 100 mL.

### **3.4.3.7 Larutan Posfat Buffer Saline pH 7,2 (PBS)**

Sebanyak 8 gram natrium klorida, 0,2 gram kalium klorida, 1,44 gram natrium hidrogen fosfat dan kalium hidrogen fosfat dilarutkan kedalam 800 mL aquadest, atur pH hingga 7,4 menggunakan larutan hidrogen klorida atau Natrium hidroksida. Aquadest ditambahkan hingga 1 liter.

### **3.4.3.8 Larutan Natrium azida 30% dalam Posfat Buffer Saline (PBS)**

Sebanyak 30 gram natrium azida dilarutkan kedalam aquabidest steril hingga 100 mL, menghasilkan larutan dengan konsentrasi 30%.

### **3.4.3.9 Larutan Triton X-100 10%**

Sebanyak 10 mL triton X-100 dilarutkan kedalam aquabidest steril hingga 100 mL, menghasilkan larutan dengan konsentrasi 10%.

### **3.4.3.10 Larutan DTT (Ditiotreitol) 1M**

Sebanyak 15,42 gram ditiotreitol dilarutkan kedalam aquabidest steril hingga 100 mL, menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1M.

## **3. 5 Larutan untuk Isolasi Badan Inklusi**

### **3.5.1 Pembuatan Larutan, Dapar dan Perekasi**

#### **3.5.1.1 Larutan Dapar pH 8,0**

Dibuat sebanyak 25 mL larutan dapar pH 8,0 yang mengandung 50 mM tris-HCl, Sukrosa 25%, 1 mM natrium EDTA, 0,1 % natrium azida, dan 10 mM ditiotreitol kemudian ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 8 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

#### **3.5.1.2 Larutan Dapar Lisis pH 8,0**

Dibuat sebanyak 25 mL larutan dapar lisis pH 8,0 yang mengandung 50 mM tris-HCl, 1 % triton X-100, 1% natrium deoksikolat, 100 mM natrium klorida, 0,1% natrium azida dan 10 mM ditiotreitol kemudian ditambahkan

hidrogen klorida 2 N hingga pH 8,0 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

#### **3.5.1.3 Larutan Dapar Pencuci pH 8.0 dengan Triton**

Dibuat sebanyak 25 mL dapar pencuci pH 8 yang mengandung 50 M tris-HCl, 0,5% triton X-100, 100 mM natrium klorida, 1 mM natrium EDTA, 0,1 % natrium azida dan 1 mM ditiotritol. Kemudian ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 8,0 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

#### **3.5.1.4 Larutan Dapar Pencuci pH 8,0 tanpa Triton**

Dibuat sebanyak 25 mL dapar pencuci pH 8,0 yang mengandung 50 M tris-HCl, 100 mM natrium klorida, 1 mM natrium EDTA, 0,1 % natrium azida dan 1 mM ditiotritol. Kemudian ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 8,0 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

### **3.6 Larutan untuk Isolasi Protein Terlarut dengan Menggunakan Afinitas Kromatografi.** (Novagen, 2005)

#### **3.6.1 Pembuatan Larutan, Dapar dan Pereaksi**

##### **3.6.1.1 Larutan Dapar (Dapar A)**

Dibuat sebanyak 25 mL larutan dapar A pH 7,6 yang mengandung 20 mM tris-HCl, 20 % sukrosa, dan 1 mM EDTA. Kemudian ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 7.6 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

##### **3.6.1.2 Larutan Dapar Elusi**

Dibuat sebanyak 25 mL larutan dapar elusi pH 7,6 yang mengandung 20 mM tris-HCl, 20 % sukrosa, 1 mM EDTA dan 4 M imidazol. Kemudian ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 7,6 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

### **3.7 Larutan untuk Protein Setelah didialisis Menggunakan Kromatografi Afinitas. (Novagen, 2005)**

#### **3.7.1 Pembuatan Larutan, Dapar dan Pereaksi**

##### **3.7.1.1 Larutan Dapar Pengikat pH 8,0**

Dibuat sebanyak 25 mL larutan dapar pengikat pH 8,0 yang mengandung 50 mM natrium hidrogen fosfat, 300 mM natrium klorida, 10 mM imidazol. Kemudian ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 8,0 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

##### **3.7.1.2 Larutan Dapar Pencuci pH 8,0**

Dibuat sebanyak 25 mL larutan dapar pencuci pH 8 yang mengandung 50 mM natrium hidrogen fosfat, 300 mM natrium klorida, 20 mM imidazol. Kemudian ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 8,0 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

##### **3.7.1.3 Larutan Dapar Elusi pH 8,0**

Dibuat sebanyak 25 mL larutan dapar pencuci pH 8,0 yang mengandung 50 mM natrium hidrogen fosfat, 300 mM natrium klorida, 250 mM imidazol. Kemudian ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 8,0 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

##### **3.7.1.4 Larutan Dapar Pengikat pH 8,0 ( Larutan Dapar B)**

Dibuat sebanyak 25 mL larutan dapar pencuci pH 8,0 yang mengandung 8 M urea, 0,1 M natrium hidrogen fosfat, 0,01 M tris-HCl. Kemudian ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 8,0 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

##### **3.7.1.5 Larutan Dapar Pencuci pH 6,3 ( Larutan Dapar C)**

Dibuat sebanyak 25 mL larutan dapar pengikat pH 6,3 yang mengandung 8 M urea, 0,1 M natrium hidrogen fosfat, 0,01 M tris-HCl. Kemudian



ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 6,3 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

### **3.7.1.6 Larutan Dapar Elusi pH 5,9 ( Larutan Dapar D)**

Dibuat sebanyak 25 mL larutan dapar pencuci pH 5,9 yang mengandung 8 M urea, 0,1 M natrium hidrogen fosfat, 0,01 M tris-HCl. Kemudian ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 5,9 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

### **3.7.1.7 Larutan Dapar Elusi pH 4,5 ( Larutan Dapar E)**

Dibuat sebanyak 25 mL larutan dapar pencuci pH 4,5 yang mengandung 8 M urea, 0,1 M natrium hidrogen fosfat, 0,01 M tris-HCl. Kemudian ditambahkan hidrogen klorida 2 N hingga pH 4,5 sisanya ditambahkan aquabidest steril hingga 25 mL.

## **3.8 Larutan untuk *Sodium Dodesil Sulfat* Elektroforesis dan *Western Blot***

### **3.8.1 Pembuatan Larutan, Dapar dan Pereaksi**

#### **3.8.1.1 Pembuatan Gel Akrilamid**

Formulasi gel akrilamid 12% yang terdiri dari gel penahan yang terdiri dari gel penahan dan gel pemisah. Gel pemisah dibuat dengan melarutkan 3,35 mL dH<sub>2</sub>O, 2,5 mL tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 4,0 mL akrilamid 30%, 0,1 mL sodium dodesil sulfat 10%, 0,05 mL amonium persulfat 10%, 0,005 mL TEMED. Gel penahan dibuat dengan melarutkan 6,1 mL dH<sub>2</sub>O, 2,5 mL tris-HCl 0,5 M pH 6, 1,3 mL akrilamid 30%, 0,1 mL sodium dodesil sulfat 10%, 0,05 mL amonium persulfat 10%, 0,01 mL TEMED.

Cetakan untuk gel diisi dengan larutan gel pemisah dan di atasnya diisikan aquadest steril untuk mencegah agar gel pemisah tidak cekung saat membeku dan sekaligus mencegah terbentuknya gelembung udara dalam gel. Setelah gel pemisah membeku, lapisan aquadest steril lalu dibuang dan cetakan diisi dengan larutan gel penahan. Segera setelah gel penahan dimasukkan sisir yang akan digunakan untuk mencetak sumuran gel. Setelah gel membeku, sisir dapat diangkat dan akan terbentuk sumuran pada gel penahan. Gel dapat langsung

digunakan atau disimpan dalam aquadest steril di lemari pendingin untuk digunakan keesokan harinya. Penyimpanan dalam aquadest steril agar gel tidak kering dan pecah. (Coligan, J.E., *et al.*, 1995)

### **3.8.1.2 Larutan Dapar Elektroforesis**

Sebanyak 57,6 gram glisin, 12 gram tris base, 4 gram sodium dodesil sulfat kemudian dilarutkan dalam aquadest hingga 4 liter.

### **3.8.1.3 Larutan Pewarna Protein**

Sebanyak 2,5 gram *commasie brilliant blue* R-250, 450 mL metanol, 100 mL asam asetat glasial kemudian dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter.

### **3.8.1.4 Larutan 5x Loading Buffer**

Sebanyak 31,25 mL tris-HCl 1 M pH 6,8, 10 gram sodium dodesil sulfat, 25 mL gliserol, 750  $\mu$ L bromofenol biru (2% dalam etanol), 5 mL 2-merkaptioetanol, kemudian dilarutkan dalam aquadest hingga 100 mL.

### **3.8.1.5 Larutan Pencuci Gel Pertama**

Sebanyak 200 mL metanol dicampurkan dengan 35 mL asam asetat glasial dan 265 mL aquadest.

### **3.8.1.6 Larutan Pencuci Gel ke Dua**

Sebanyak 25 mL metanol dicampurkan dengan 35 mL asam asetat glasial dan 440 mL aquadest.

### **3.8.1.7 Larutan Tris Buffer Saline (TBS) pH 7.6**

Sebanyak 2,42 gram Tris base, 8 gram natrium klorida, selanjutnya pH diatur dengan hidrogen klorida 2 N hingga pH 7,6. Selanjutnya dilarutkan aquadest hingga 1 liter.

### 3.8.1.8 Larutan Dapar Elektroforesis Transfer

Sebanyak 15,5 gram tris base, 72 gram glisin, 5 gram sodium dodesil sulfat ditimbang. Selanjutnya dilarutkan aquadest hingga 1 liter.

### 3.8.1.9 Larutan Susu skim 10% dalam TBS pH 7,6

Sebanyak 10 gram susu skim ditimbang kemudian dilarutkan ke dalam TBS pH 7,6 hingga 100 mL.

### 3.8.1.10 Larutan Tween 0,1 % dalam TBS pH 7,6

Sebanyak 0,1 mL tween kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL TBS pH 7,6.

## 3.9 Cara Kerja

### 3.9.1 Inokulasi Sampel

Sebanyak 100 ml medium LB yang ditambah 1 ml glukosa (konsentrasi final 0,4 g/ml) ditambah ampisilin (25 µg/ml) dan kloramfenikol (34 µg/ml) diinokulasi dengan satu ose kultur *E. coli* segar. Kultur *E. coli* tersebut ditumbuhkan semalam (18-20 jam) pada suhu 37°C dengan agitasi 150 rpm. Selanjutnya kultur tersebut diinokulasi ke dalam 1L medium LB yang telah ditambah dengan glukosa (0,04 mg/ml), ampisilin (50 µg/ml) dan kloramfenikol (34 µg/ml). Kultur *E. coli* ditumbuhkan sampai kerapatan sel (OD<sub>600</sub>) mencapai sekitar 0,7. Kultur diinduksi dengan menambahkan larutan IPTG (0,1–0,4 mM) dan selanjutnya kultur diinkubasi selama 3 jam dengan agitasi (150 rpm) pada suhu 37°C atau 30°C. Setelah proses induksi selesai kultur didinginkan selama 15-20 menit. Selanjutnya kultur disentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan biomasa sel dari medium. Biomasa sel dapat disimpan pada suhu -80° C bila belum diproses lebih lanjut. (Bjorkman's group, n.d.)

### 3.9.2 Isolasi Badan Inklusi

Biomasa sel diresuspensi dalam 13 mL larutan dapar dalam es dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus (ukuran 30 mL). Suspensi sel diperlakukan dengan sonikasi selama 15 detik, dengan interval waktu 1 menit sebanyak 3 kali.

Untuk membantu pemecahan sel, ke dalam tabung ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  lisozim (dari stok 50 mg/ml), 1  $\mu\text{L}$  DNase I, 50  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (dari stok 0,5 M) dan divorteks. Selanjutnya ditambahkan 12,5 mL dapar lisis dan segera divorteks. Tabung diinkubasi selama 30-60 menit pada suhu kamar kemudian ditambahkan sebanyak 350  $\mu\text{L}$  larutan NaEDTA 0,5 M. Setelah itu dilakukan di beku cairkan selama 30 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Kemudian ditambahkan  $\text{MgCl}_2$  dan ditunggu hingga viskositas turun dalam 30-60 menit. Selanjutnya ditambahkan 350  $\mu\text{L}$  larutan NaEDTA 0,5 M (diambil 100  $\mu\text{L}$  sebagai C1 untuk di cek dengan SDS-PAGE 1) dan setelah itu disentrifugasi pada 10000 rpm selama 20 menit, pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Selanjutnya supernatan (diambil 100  $\mu\text{L}$  sebagai S1 untuk di cek dengan SDS-PAGE) dan pelet dipisahkan pada tabung yang berbeda. Kemudian pelet diambil dan diresuspensi dalam 10 mL dapar pencuci yang mengandung Triton. Kemudian dilakukan sonikasi selama 15 detik dengan interval waktu 1 menit sebanyak 3 kali, dalam es. Setelah itu sampel disentrifugasi pada 10000 rpm selama 20 menit, pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Supernatan (diambil 100  $\mu\text{L}$  sebagai S2 untuk di cek dengan SDS-PAGE) dan pelet dipisahkan pada tabung yang berbeda. Kemudian pelet diambil dan diresuspensi dalam 10 mL dapar pencuci yang tidak mengandung Triton (diambil 100  $\mu\text{L}$  sebagai W1 untuk di cek dengan SDS-PAGE). Kemudian dilakukan sonikasi selama 15 detik, dengan interval waktu 1 menit sebanyak 3 kali dalam es. Setelah itu tabung disentrifugasi kembali pada 10000 rpm selama 20 menit, pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Selanjutnya supernatan (diambil 100  $\mu\text{L}$  sebagai S3 untuk di cek SDS-PAGE) dan pelet dipisahkan dalam tabung yang berbeda. (Bjorkman's group, n.d.)

### 3.9.3 Melarutkan Badan Inkusi (Kondisi Protein Terdenaturasi)

Pelet yang berhasil diperoleh (badan inkusi) selanjutnya dilarutkan dalam 11 mL larutan 6 M urea pH 8,0 (konsentrasi akhir protein yang dilarutkan adalah 1 mg/ml) ditambahkan 4 mM ditioteritol (diambil 100  $\mu\text{L}$ , simpan sebagai Sb1 untuk dicek dengan SDS-PAGE), kemudian digoyangkan pada suhu  $4^\circ\text{C}$  untuk melarutkan pelet. Setelah itu dialisis untuk melipat kembali protein (diambil 100  $\mu\text{L}$ , disimpan sebagai D1 untuk di cek dengan SDS-PAGE), kemudian sampel protein disimpan pada  $-80^\circ\text{C}$ . (Bjorkman's group, n.d.)

### 3.9.4 Isolasi Protein Terlarut

Biomasa sel di beku cairkan sebanyak tiga kali, ditambah dengan 15 mL larutan dapar A kemudian disonikasi selama 15 detik dengan interval 1 menit. Sentrifus 10.000 rpm selama 20 menit, kemudian diambil supernatannya. Setelah itu resin talon disiapkan sebanyak 400  $\mu$ L ditambahkan larutan dapar A 200  $\mu$ L, kemudian disentrifus 3000 rpm selama 1 menit. Pelet resin diambil, kemudian dicampurkan dengan supernatan. Kemudian di agitasi perlahan selama 3 jam dalam rotator dengan suhu 4°C. Sentrifus dilakukan pada 3000 rpm selama 7 menit untuk memperoleh bagian supernatant yang disebut *inner volume* (IV) yang akan di cek dengan SDS-PAGE. Pelet resin diambil, kemudian ditambahkan 15 mL larutan dapar A disentrifus 3000 rpm selama 5 menit. Supernatannya disimpan sebagai cucian pertama W1 (di cek dengan SDS-PAGE). Pelet resin diambil kemudian ditambahkan 5 mL dapar A disentrifus kembali 3000 rpm selama 5 menit, supernatannya disimpan sebagai cucian kedua (W2, di cek dengan SDS-PAGE). Pelet resinnya diambil, kemudian ditambahkan 300  $\mu$ L dapar elusi (dapar A dengan 0,4 M), setelah itu diinkubasi semalam dalam rotator suhu 4°C. Kemudian disentrifus 3000 rpm selama 7 menit disimpan sebagai hasil elusi (E1, di cek dengan SDS-PAGE). (Bjorkman's group, n.d.)

### 3.9.5 Afinitas Kromatografi dengan Resin Ni-NTA (Kondisi Denaturasi)

Kolom disiapkan dengan memasukkan 100  $\mu$ L bubuk resin Ni-NTA ke dalam tabung 1,5 mL, resin dicuci dengan aquadest steril kemudian disentrifus 5000 rpm selama 2 menit (dilakukan dua kali pencucian dengan aquadest steril, kemudian supernatannya dibuang. Setelah itu larutan dapar pengikat (larutan dapar B) dimasukkan sebanyak 200  $\mu$ l ke dalam tabung 1,5 mL agitasi perlahan, disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 5000 rpm agar resin terikat dengan baik. Resin sudah siap untuk digunakan. Setelah itu sampel protein dimasukkan (kondisi terdenaturasi) sebanyak 100  $\mu$ L agitasi perlahan (dalam rotator selama 1 jam). Pelet dan supernatan dipisahkan (supernatan disimpan sebagai S1 dalam tabung berbeda) (cek SDS-PAGE). Pelet kemudian ditambahkan larutan dapar pencuci (larutan dapar C), agitasi perlahan, kemudian disentrifus 5000 rpm

selama 2 menit (ulangi dua kali), supernatannya disimpan dalam tabung berbeda sebagai W1 (cek dengan SDS-PAGE). Pelet kemudian ditambahkan larutan dapar pencuci (larutan dapar D), agitasi perlahan, kemudian disentrifus 5000 rpm selama 2 menit (ulangi dua kali), supernatannya disimpan dalam tabung berbeda sebagai W2 (cek dengan SDS-PAGE). Kemudian peletnya dielusi dengan 100  $\mu$ L larutan dapar elusi D, agitasi perlahan disentrifus 5000 rpm selama 2 menit (dilakukan dua kali). Supernatannya disimpan dalam tabung berbeda sebagai E1 (cek dengan SDS-PAGE). Kemudian pelet dielusi lagi dengan 100  $\mu$ L larutan dapar elusi E (lakukan dua kali), simpan supernatannya sebagai E2 (cek dengan SDS-PAGE). (Novagen, 2005)

### **3.9.6 Afinitas Kromatografi dengan Resin Ni-NTA (Setelah didialisis)**

Disiapkan kolom dengan memasukkan 100  $\mu$ L bubuk resin Ni-NTA ke dalam tabung 1,5 mL, matriks dicuci dengan aquadest steril kemudian disentrifus 5000 rpm selama 2 menit (dilakukan dua kali pencucian dengan aquadest steril, supernatan dibuang). Setelah itu masukkan 200  $\mu$ L larutan dapar pengikat ke dalam tabung 1,5 mL agitasi perlahan, disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 5000 rpm agar resin terikat dengan baik. Resin sudah siap untuk digunakan. Setelah itu dimasukkan sampel protein (kondisi setelah dialisis) sebanyak 100  $\mu$ L diagitasi perlahan (dalam rotator selama 1 jam). Pelet dan supernatan dipisahkan (supernatan disimpan sebagai S1 dalam tabung berbeda) kemudian di cek dengan SDS-PAGE. Pelet kemudian di tambahkan larutan dapar pencuci, agitasi perlahan, kemudian disentrifus 5000 rpm selama 2 menit (diulangi dua kali), supernatannya disimpan dalam tabung berbeda sebagai pencucian pertama (W1, di cek dengan SDS-PAGE). Kemudian peletnya dielusi dengan 100  $\mu$ L larutan dapar elusi agitasi perlahan disentrifus 5000 rpm selama 2 menit (dilakukan dua kali). Supernatannya disimpan dalam tabung berbeda sebagai elusi pertama ( E1, di cek dengan SDS-PAGE).(Novagen, 2005)

### **3.9.7 Sodium Dodesil Sulfat Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE)**

Disiapkan gel poliakrilamid, kemudian alat elektroforesis dipasang kemudian ditambahkan larutan dapar elektroforesis. Sampel protein (40  $\mu$ L) dididihkan pada suhu 95°C selama 5-10 menit, setelah dididihkan ditambahkan (10

$\mu\text{L}$ ) sampel *loading buffer*, kemudian disentrifus. Setelah itu dimasukkan sampel 15  $\mu\text{L}$  ke dalam sumuran gel akrilamid. Alat dijalankan 90 volt selama 2 jam. Setelah selesai gel poliakrilamid diwarnai dengan *Commasie Brilliant Blue* selama semalam. Kemudian gel dicuci (yang telah diwarnai semalam) dengan larutan pencuci pertama selama satu jam, setelah itu dicuci kembali dengan larutan pencuci ke dua selama satu jam. Hasil gel yang telah dicuci divisualisasi dengan *scanner*.

### 3.9.8 Western Blot

Membran nitroselulosa dipotong sesuai dengan gel, kemudian membran dibasahi dengan larutan dapar elektroforesis transfer. Kemudian kertas saring dan bahan berserat direndam dalam larutan dapar elektroforesis transfer, setelah itu disiapkan tumpukan untuk *Western blot* dalam kaset dengan susunan sebagai berikut: tempat berpori, kertas saring whatman, gel poliakrilamid, membran nitroselulosa, kertas saring whatman, tempat berpori. Kemudian kaset ditutup dengan rapat agar tumpukan tidak bergeser, sebelumnya dihilangkan gelembung udara antara gel dan membran. Setelah itu larutan dapar elektroforesis transfer dimasukkan ke dalam tangki, tangki diisi dan tempat kaset gel diletakkan kedalamnya. Kemudian tangki diisi dengan larutan dapar elektroforesis transfer dan dihubungkan dengan elektroda 90 volt, selama 2 jam, dibagian luar alat diberi es. Membran nitroselulosa dilepaskan, rendam dalam larutan susu skim 10% dalam TBS kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Setelah itu dicuci tiga kali dengan tween 0,1% dalam TBS selama 15 menit; 5 menit; 5 menit pada suhu kamar. Setelah itu dituangkan susu skim, ditambahkan antibodi primer (3  $\mu\text{L}$ ), inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Untuk konjugasinya, disiapkan sekunder antibodi (2  $\mu\text{L}$ ) inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Setelah itu dilakukan pencucian membran setelah ditambah antibodi sekunder dengan susu 10% dalam TBS tiga kali selama 25 menit dengan interval 15 menit; 5 menit; 5 menit untuk menghilangkan sisa-sisa tween 20 dari membran. Membran nitroselulosa direndam dalam larutan HRP pengembang warna pada suhu kamar, kemudian dicuci dengan aquabidest steril. Setelah itu membran nitroselulosa diamati untuk melihat pita.

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4. 1. Hasil Isolasi Badan Inklusi

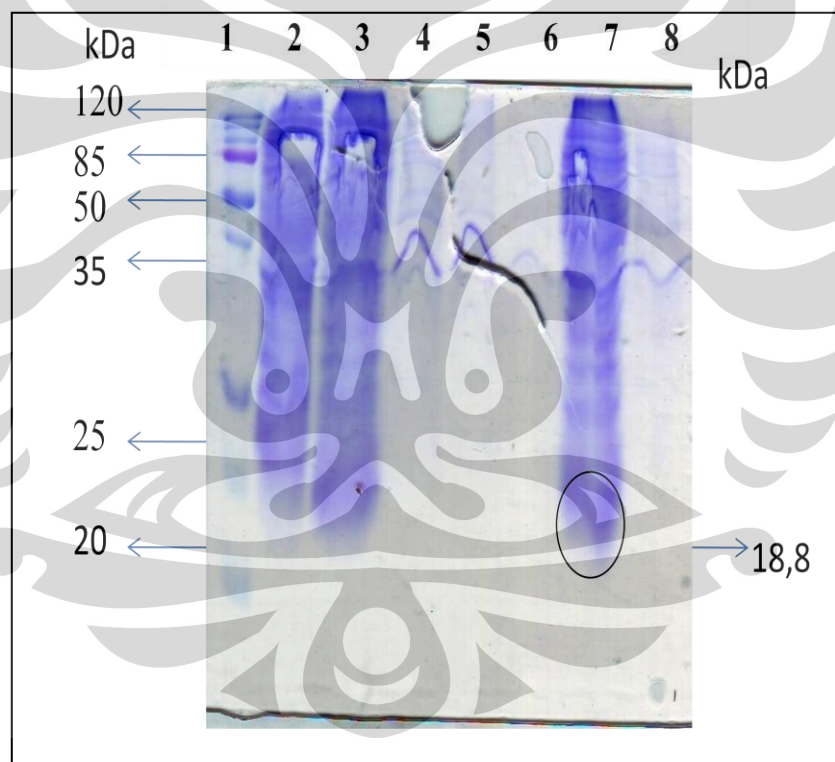
Protein G-CSF rekombinan didapatkan dengan mengisolasi protein tersebut dari sel *E. coli* yang mengandung plasmid rekombinan. Galur *E. coli* yang di gunakan adalah BL21(DE3)pLysS. Galur tersebut digunakan untuk ekspresi protein yang didasarkan pada sistem T7 RNA polimerase. Galur BL21(DE3)pLysS memanfaatkan promotor T7 untuk mengontrol ekspresi sehingga dapat mengekspresikan gen target. Gen target yang disisipkan adalah gen *CSF3syn* yang menyandi protein G-CSF yang dihubungkan oleh enam histidin di bagian N terminalnya. Galur BL21(DE3)pLysS mengandung plasmid pLysS yang membawa gen pengkode T7 lisozim sehingga menurunkan tingkat dasar ekspresi protein dari gen. hal tersebut penting jika protein bersifat toksik terhadap *E. coli*. Sel *E. coli* menjadi lebih toleran terhadap toksisitas dengan adanya T7 lisozim. Plasmid pLysS mengandung gen resisten terhadap kloramfenikol. Galur BL21(DE3)pLysS memiliki defisiensi *Lon* dan *OmpT* (*out membrane* protein) sehingga dapat meminimalkan degradasi protein rekombinan yang terekspresi (BioDynamic Laboratory, 2003).

Protein G-CSF sebagian besar diekspresikan oleh *E. coli* sebagai badan inklusi (protein berbentuk agregat) (Vanz LS. *et al.*, 2008). Analisis terhadap protein G-CSF terlarut juga dilakukan dalam penelitian, walaupun kemungkinan untuk mendapatkan protein tersebut hanya sedikit (Jong-Am S., *et al.*, 2009).

Isolasi dilakukan untuk mendapatkan protein sebagai badan inklusi. Tahap awal dari penelitian adalah dengan menginokulasikan sel *E. coli* BL21(DE3)pLysS dalam medium Luria Bertani (LB) yang mengandung antibiotik ampisilin dan kloramfenikol selama semalam (16-20 jam), kemudian diinokulasikan kembali dalam medium LB baru yang telah mengandung antibiotik ampisilin dan kloramfenikol. Densitas optik sel dicek hingga ~0,7. Setelah itu diinduksi menggunakan IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-thiogalaktosida) selama tiga jam. Setelah itu sentifus untuk mendapatkan pelet (biomasa sel). Pelet (biomasa sel)

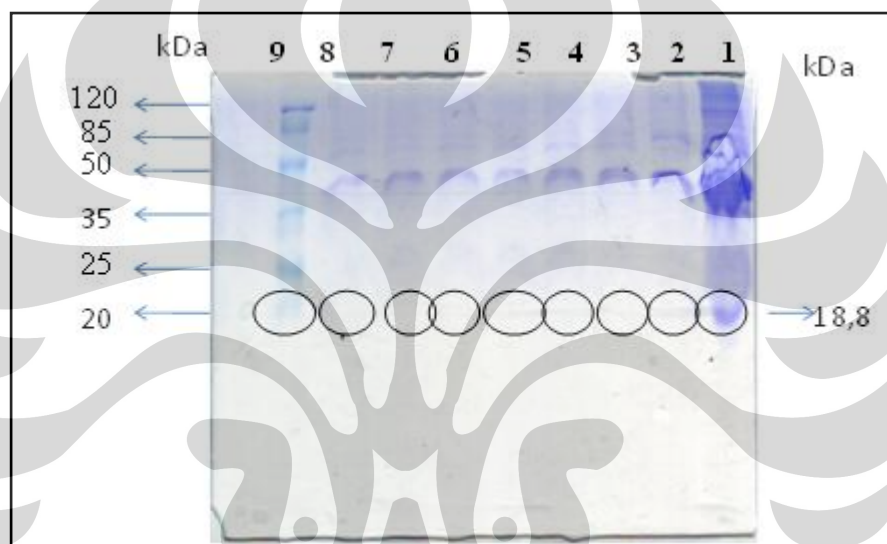


yang didapat diisolasi untuk mendapatkan protein G-CSF. Tahap awal isolasi adalah dengan memecahkan selnya (sonikasi), kemudian badan inklusi yang didapat dicuci dengan menggunakan beberapa detergen untuk menghilangkan endotoksin, DNA dan protein *E. coli* lain. Kemudian dilarutkan dengan agen pendenaturasi, dalam penelitian digunakan 6 M urea dan DTT (dithiotreitol) untuk mereduksi ikatan disulfida yang ada. Setelah dilarutkan dengan urea kemudian dianalisis dengan *Sodium* dodesil sulfat gel elektroforesis (SDS-PAGE). Hal tersebut dilakukan karena masih banyak protein lain selain protein target, kemudian isolasi dilanjutkan menggunakan IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) atau afinitas kromatografi dengan resin Ni-NTA menggunakan nikel sebagai logam pengikat. Hasilnya dianalisis menggunakan SDS-PAGE dan *western blot*.



Gambar 4.1 Hasil Isolasi Badan Inklusi Menggunakan SDS-PAGE. (1) penanda protein Prestained™, (2) setelah penambahan EDTA, (3) setelah dicuci dengan larutan dapsar tanpa triton, (4) supernatant setelah sonikasi pertama, (5) supernatant setelah sonikasi kedua, (6) supernatant setelah sonikasi ketiga, (7) sampel setelah disolubolisasi dengan urea 6 M, (8) sampel setelah dialisis.

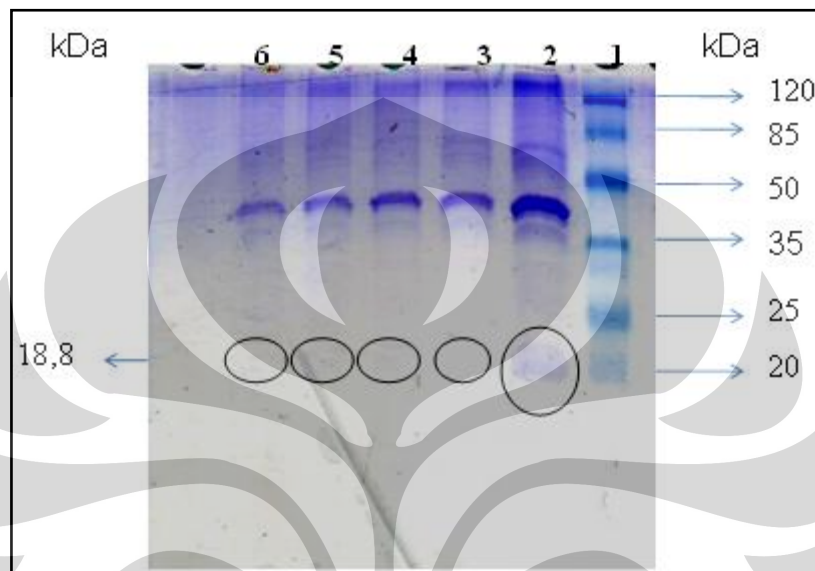
Pada gambar 4.1, lajur 7 hasil SDS-PAGE menunjukkan masih banyak protein lain yang ikut terisolasi, pada proses ini masih diperlukan lagi proses pembersihan terhadap protein-protein *E. coli* yang lain. Optimasi terhadap detergen, pH, dan suhu yang digunakan dalam proses isolasi perlu dilakukan, karena hal tersebut sangat berpengaruh terhadap proses isolasi. Optimasi perlu juga dilakukan terhadap penggunaan konsentrasi IPTG, untuk mengetahui konsentrasi optimal dalam ekspresi protein. Gambar 4.1, lajur 8 merupakan hasil dialisis. Hasil yang diperoleh adalah belum terjadinya pemisahan secara sempurna.



Gambar 4.2 Hasil SDS-PAGE Menggunakan Afinitas Kromatografi pada Protein Terdenaturasi. (1) penanda protein Prestained™, (2) sampel yang tidak terikat resin, (3) W1 setelah dicuci dengan larutan dapar pH 6,3, (4) W1, setelah pencucian dengan pH 6,3, (5) E1, sampel setelah dielusi dengan larutan dapar pH 5,9, (6) E1, sampel setelah dielusi dengan larutan dapar pH 5,9 (7) E1, sampel setelah dielusi dengan larutan dapar pH 4,5, (8) E1, sampel setelah dielusi dengan larutan dapar pH 4,5.

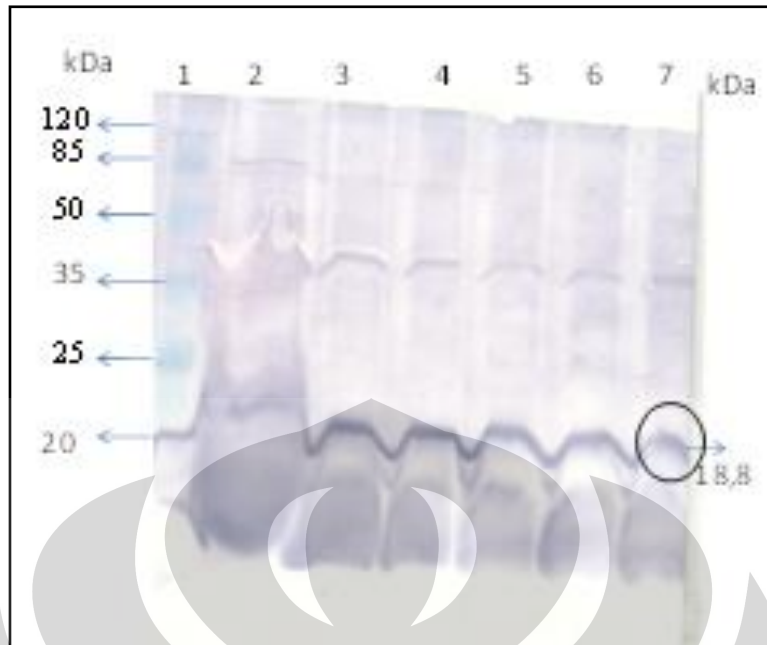
Gambar 4.2, lajur 1 hasil SDS-PAGE (sampel protein terdenaturasi) masih banyak protein yang ikut pada proses isolasi, seperti yang sudah dibahas pada gambar 4.1, lajur 7. Gambar 4.2, lajur 3 dan 4 hasil isolasi menggunakan afinitas kromatografi, ternyata masih banyak protein target yang terbuang keluar atau ikut tercuci, dikarenakan resin tidak berikatan baik dengan protein target. Sedangkan pada lajur 5 sampai 8, proses elusi menunjukkan protein target terelusi walaupun

pengikatan resin dengan protein tidak sempurna karena proses pencucian masih banyak protein yang terbuang. Hasil yang ada menunjukkan pita yang tipis pada 18,8 kDa, dan pita tajam pada sekitar 40 kDa kemungkinan adalah protein lain yang dihasilkan oleh *E. coli*. Sehingga perlu dilakukan analisis lebih lanjut untuk meyakinkan protein target sudah didapatkan.



Gambar 4.3 Hasil SDS-PAGE dengan Menggunakan Afinitas Kromatografi pada Protein Setelah didialisis. (1) penanda protein Prestained™, (2) sampel setelah dialisis, (3) W1 setelah dicuci dengan larutan dapar yang mengandung 20 mM imidazol, (4) W1 setelah dicuci dengan larutan dapar yang mengandung 20 mM imidazol, (5) E1, sampel setelah dielusi dengan larutan dapar yang mengandung imidazol 250 mM, (6) E1, sampel setelah dielusi dengan larutan dapar yang mengandung imidazol 250 mM,

Gambar 4.3, lajur 2 pita hasil SDS-PAGE terlihat jelas namun masih terlihat tipis yang disebabkan oleh pewarnaan yang kurang sensitif. Gambar 4.3, lajur 3 dan 4 hasil SDS-PAGE menunjukkan proses pencucian belum sempurna karena masih banyak protein yang terbuang. Hasil tersebut menunjukkan proses pengikatan protein belum sempurna (protein target yang dihubungkan dengan enam histidin tidak terikat sempurna dengan resin Ni-NTAnya). Terdapat pita tebal sekitar 40 kDa, protein target belum didapatkan.



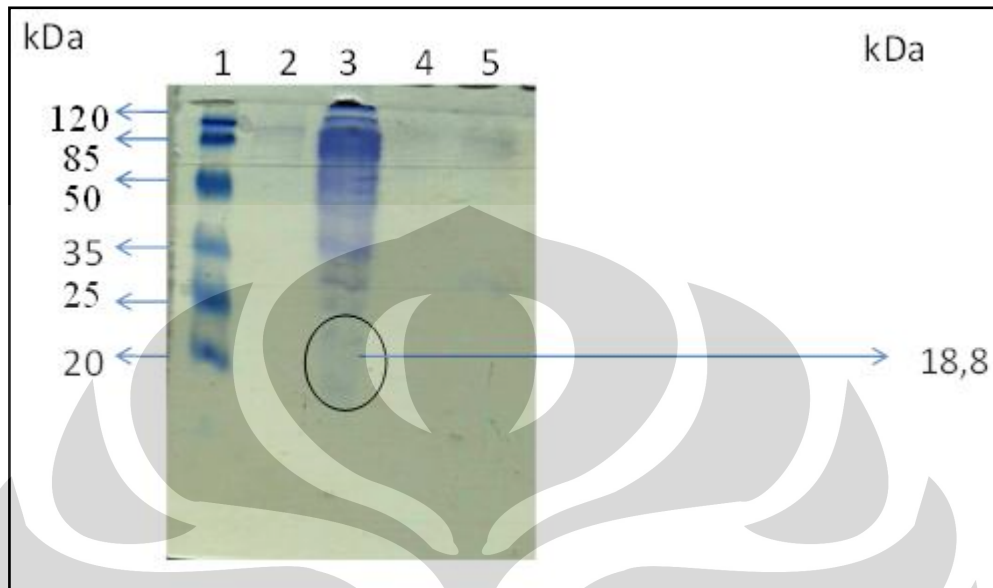
Gambar 4.4 Hasil *Western Blot* Protein Setelah didialisis. (1) penanda protein Prestained™, (2) sampel sebelum dialisis, (3) sampel sebelum dialisis, (4) W1 setelah dicuci dengan larutan dapar yang mengandung 20 mM imidazol, (5) W1 setelah dicuci dengan larutan dapar yang mengandung 20 mM imidazol, (6) E1, sampel setelah dielusi dengan larutan dapar yang mengandung imidazol 250 mM, (7) E1, sampel setelah dielusi dengan larutan dapar yang mengandung imidazol 250 mM,

Gambar 4.4 hasil *Western blot* dari protein setelah didialisis menunjukkan pita yang tajam pada 18,8 kDa. Protein target yang dituju telah terlihat dengan jelas, walaupun hasil pencuci juga terikat dengan antibodi (lajur 4 dan 5) menunjukkan masih banyak juga protein yang terbuang pada saat pencucian.

#### 4. 2. Hasil Isolasi Protein Terlarut

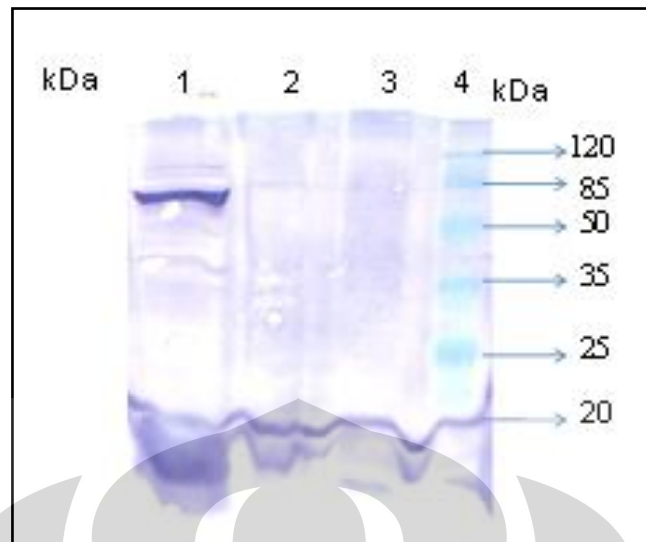
Tahap awal dari penelitian ini adalah dengan menginokulasikan sel *E. coli* BL21(DE3)PlysS dalam medium Luria Bertani (LB) yang mengandung antibiotik ampisilin dan kloramfenikol selama semalam, kemudian inokulasikan kembali dalam medium LB yang baru yang telah mengandung antibiotik ampisilin dan kloramfenikol. Kemudian cek densitas optiknya hingga ~0,7 dapat dilihat pada table 4.1. Setelah itu induksi menggunakan IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-thiogalaktosida) selama tiga jam. Setelah itu sentifus ambil supernatannya, kemudian isolasi

menggunakan afinitas kromatografi dengan resin TALON menggunakan kobalt sebagai logam pengikat. Kemudian dilakukan analisis menggunakan SDS-PAGE dan *Western blot*.



Gambar 4.5 Hasil SDS-PAGE Isolasi Protein Terlarut Menggunakan Kromatografi Afinitas. (1) penanda protein Prestained™, (2) resin talon, (3) IV, iner volume setelah supernatan dimasukkan ke resin dan disentrifus, (4) W1 setelah dicuci dengan larutan dapar A, (5) E1 supernatan setelah dielusi dengan larutan dapar A dan imidazol 0,4 M.

Gambar 4.5 SDS-PAGE hasil isolasi protein G-CSF terlarut menggunakan resin TALON (dengan logam kobalt sebagai pengikat). Pada lajur 3, masih banyak terdapat protein dari sel *E. coli*. Pada lajur 4 adalah proses pencucian, protein target banyak yang terbuang dan tidak terikat dengan logam kobalt (resinnya). Pada proses elusi juga tidak terlihat jelas pita (sangat tipis) kemungkinan protein target ada, hanya saja pewarna yang digunakan kurang sensitif sehingga pita tidak jelas terlihat. Proses pengikatan logam dengan sampel kurang lama, sehingga proses elusi tidak terlihat jelas protein tidak terikat baik dengan resinnya).



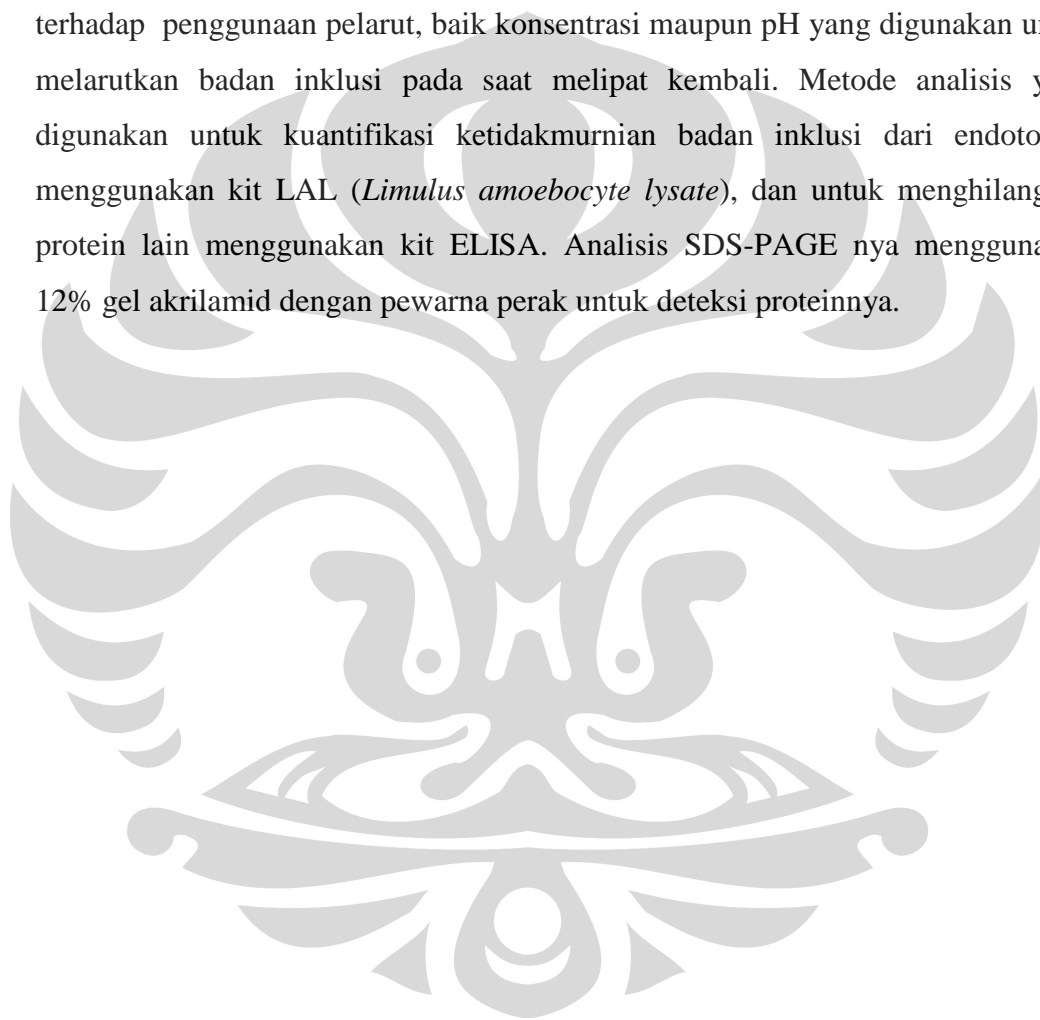
Gambar 4.6 Hasil *Western Blot* dari Isolasi Protein Terlarut Menggunakan Kromatografi Afinitas. (1) IV, iner volume setelah supernatan dimasukkan ke resin dan disentrifus, (2) W1, pelet resin setelah dicuci dengan dapar A, (3) E1, pelet resin setelah dielusi dengan larutan dapar A dan midazol0,4 M, (4) penanda protein Prestained™.

Pada gambar 4.6 Hasil SDS-PAGE dilanjutkan dengan western blot, hasil menunjukkan pada lajur 1 terdapat 2 pita, pita disekitar 85 kDa kemungkinan protein larin dari sel *E. coli*, bisa terblot kemungkinan memiliki epitop seperti protein G-CSF. Tapi pada lajur 2 atau proses pencucian sudah tidak terdapat lagi protein kontaminan tersebut. Pada proses elusi juga sudah tidak ada protein kontaminan, karena protein target (G-CSF) telah ditag dengan enam histidin. Hal tersebut meyakinkan protein target G-CSF dengan bobot molekul 18,8 kDa telah didapatkan dengan proses isolasi.

Pada penelitian sebelumnya (Rao, K. V. D., Narasu, M. L., dan Rao, A. K. S. B., 2008) menggunakan galur yang sama yaitu BL21(DE3)pLysS dengan system pET yang berbeda (pET-3a). Telah melakukan isolasi terhadap protein G-CSF (badan inklusi) hasil yang didapat dalam SDS-PAGE sudah menunjukkan satu pita yang tajam pada 18,8 kDa dibandingkan dengan penanda protein tanpa adanya protein lain yang ikut pada hasil SDS-PAGE. Dalam penelitian ini banyak dilakukan optimasi terhadap waktu induksinya sehingga bisa dilihat hasil protein



yang optimal pada berapa jam waktu induksi yang digunakan dengan dengan konsentrasi IPTG 2 mM. Pada saat isolasinya dalam melisiskan sel *E. coli* juga dilakukan optimasi terhadap waktu sonikasi yang digunakan untuk melihat efisiensi sel yang lisis. Selain itu, untuk mencuci badan inklusi dari kontaminasi lain seperti endotoksin, DNA, dan protein lain (yang dihasilkan *E. coli*) dilakukan optimasi terhadap konsentrasi detergen (Triton dan Natrium deoksikolat) yang digunakan. Pada saat melarutkan protein (badan inklusi) dilakukan optimasi terhadap penggunaan pelarut, baik konsentrasi maupun pH yang digunakan untuk melarutkan badan inklusi pada saat melipat kembali. Metode analisis yang digunakan untuk kuantifikasi ketidakmurnian badan inklusi dari endotoksin menggunakan kit LAL (*Limulus amoebocyte lysate*), dan untuk menghilangkan protein lain menggunakan kit ELISA. Analisis SDS-PAGE nya menggunakan 12% gel akrilamid dengan pewarna perak untuk deteksi proteinnnya.



## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Protein rekombinan G-CSF dari *E. coli* BL21(DE3)PlysS yang telah diisolasi dan di analisis menunjukkan bobot molekul yang sesuai dengan yang di harapkan yaitu 18,8 kDa. Walaupun isolasi yang dilakukan belum maksimal dan hasil yang di dapat belum menunjukkan satu band yang tajam.

#### 5.2 Saran

Sekuens asam amino yang diperoleh, perlu dicek dengan asam amino *sequencer*. Pada proses ekspresi protein rekombinan G-CSF lakukan optimasi terhadap konsentrasi IPTG yang digunakan untuk mendapatkan hasil ekspresi protein yang optimal. Untuk melarutkan badan inklusi lakukan juga optimasi konsentrasi agen pendenaturasi. Kemudian gunakan deteksi pewarna yang lebih sensitif, misalnya pewarna perak dan sebaiknya konstruksinya dirubah menggunakan 12 *tag* histidin, gunakan juga vektor lain misalnya *yeast*. Untuk proses *Western Blot* gunakan antibody monoclonal.



## DAFTAR ACUAN

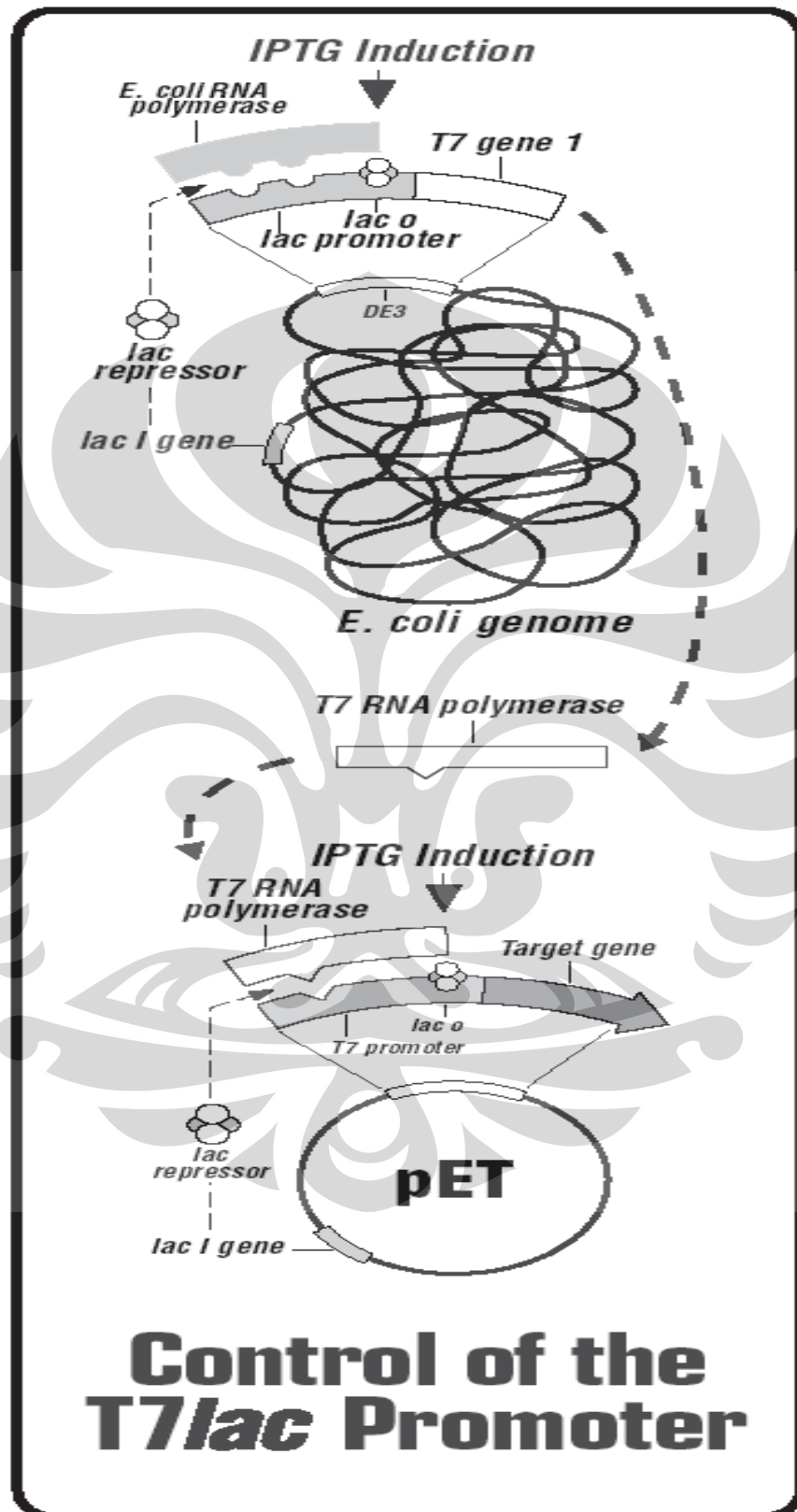
- Albert, B., Bray, D., Lewin, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J.D. (1994). *Biologi Molekuler Sel edisi ke-2* (Alex Tri Kantjono, Penerjemah). Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Aguiler M. I, (ed). (2004). *HPLC of Peptides and Proteins*. Australia: Human Press.
- Basu,S., Hodgson, G., Katz, M., dan Dunn, A. (2002). Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophile from bone marrow in to circulation. *Blood Journal, Vol. 100(3): 854-861*.
- Bjorkman's group. (n.d.). Isolation of protein from inclusion bodies. [http://www.its.caltech.edu/~bjorker/Isolation of proteins from. pdf.](http://www.its.caltech.edu/~bjorker/Isolation%20of%20proteins%20from.pdf) 15/09/2010.22.57
- Babaeipour, V., Abbas, H. P. M., Sahebazar, Z., dan Alizadeh, R. (2010). Enhancement of human granulocyte colony stimulating factor production in recombinant E. coli using batch cultivation. *Bioprocess Biosyst England, Vol.33: 591-598*.
- Berliner, N., Horwitz, M., dan Jr.Loughran, T. P. (2004). Congenital and acquired neutropenia. *Hematology Journal, 63-79*.
- Brems, D. N. (2002). The kinetics of G-CSF folding. *Protein Science, Vol.11: 2504-2511*.
- Caprette DR. (2005). *Preparing SDS-Gels*. Experimental Biosciences. Introductory Laboratory-Bios 211. Texas: Rice University.
- Chao, Z. W., Jiang, F. L., dan Xin D. G. (2005). Refolding with simultaneous purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor from Escherichia coli using strong anion exchange chromatography. *Chinese Chemical Letters, Vol.16(3): 389-392*.
- Codevilla, C. F., Barth, T., Junior, B. L., Fronza, M., dan Dalmora, S. L. (2004). Biological potency evaluation and characterization of rhG-CSF in pharmaceutical products. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter, Vol.26(2): 104-108*.

- Coligan, J.E., et al. (1995). *Current protocols in protein science, Volume 1* Editional Board. USA: John Wiley dan Sons.
- Ching-Hon, P. et al. (1997). Human granulocyte colony-stimulating factor after induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine, Vol.336(25): 1781-1787.*
- Department of Pediatric Hematology/Oncology. Medical School of Hannover. *Congenital Neutropenia*. Germany : American Society of Hematology, 2009.
- Druhan, J. L., Jing, A., Massullo, P., Kindwall-Keller, T., Ranalli, M. A., dan Avalos, B. R. (2005). Novel mechanism of G-CSF refractoriness in patients with several congenital neutropenia. *Blood Journal, Vol.105: 584-591.*
- Encor Biotechnology Inc. (n.d.). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). [http://www. Encorbio.com/ protocol/ SDS-PAGE. htm](http://www.Encorbio.com/protocol/SDS-PAGE.htm).29/09/2010.15:03.
- Fuad, A. M., Agustiyanti, D.F., Yuliawati, dan Santoso, A. (2009). Konstruksi gen CSF3 sintetik penyandi granulocyte-stimulating factor (G-CSF) manusia dengan teknik PCR. *Journal of Applied and Industrial Biotechnology in Tropical Region, Vol.2(2): 1-10.*
- Hill, C. P., Osslund, T. D., dan Eisenberg, D. (1993). The structure of granulocyte-colony stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 90. h.5167.*
- Hoffbrand, A. V., Petit, J. E., dan Moss, P. A. H. (2005). *Kapita selekta hematologi edisi 4*. EGC: Jakarta. 112-114.
- Jong-Am S., Kyung-Yeon H., Keum-Young A., Jin-Seung P., Hyuk-Seong S., dan Jeewon L.. (2009). Proteolysis and synthetic strategy of human G-CSF in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Enzyme and Microbial technology, Vol.45: 7-14.*
- Girindra, A. (1993). *Immunokimia*. Bogor: PAU-IPB.
- Honjo, E., et al. (2005). Crystallization of a 2:2 complex of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) with the ligand-binding region of the G-CSF receptor. *Acta Crystallographica Section F, Vol.6: 788-790.*

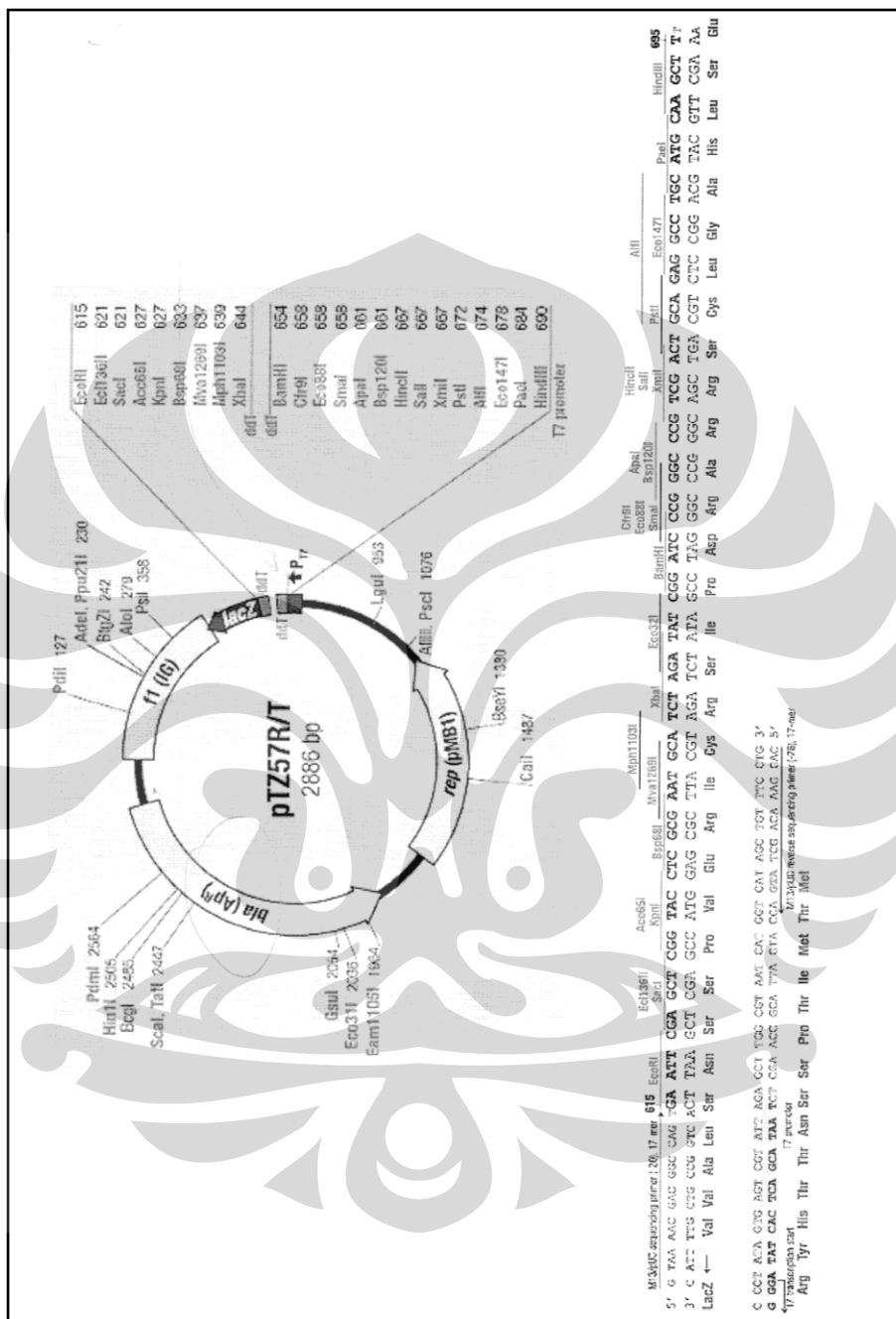
- Ki, J. J., dan Sang, Y. L. (2001). Secretory production of human granulocyte colony stimulating factor in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification, Vol.23: 311-318*.
- Khalilzadeh, R., Muhammadian-Mosaabadi, J., Bahrami, A., Nazak-Tabbar, A., Nasiri-Khalili, M. A., dan Amouheidari, A. (2008). Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *J Ind microbial Biotechnol, Vol.35: 1643-1650*.
- Klein, C. (2009). Congenital neutropenia. *Hematology Journal, 344-350*.
- Kumar dan Robbins. (1987). *Buku Ajar Patologi II*. EGC: Jakarta. 111.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature 227; 680-685*.
- Lu, H. S., Clogstone, C. L., Narhi, L. O., Merewether, L. A., Pearl, W. R., dan Boone, T. C. (1992). Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry, Vol.267(13): 8770-8777*.
- Makinoda, S., Hirosaki, T., Waseda, H., dan Fujii, R. (2008). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the mechanism of human ovulation and its clinical usefulness. *Current Medical Chemistry, Vol.15: 604-613*.
- Mehta, A. & Victor, H. (2006). *At a Glance Hematologi*. Erlangga Medika: Jakarta.
- Mergulhao, F. J. M., Summers, D. K., dan Monteiro, G. A. (2005). Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances, Vol.23: 177-202*.
- Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood Journal, Vol.111: 485-491*.
- MSUM Biotech-Chromatography. (n.d.). Chromatography-Theory, FPLC and Beyond. [http://www. Myofilament. org/ document/ teqniques/ Assets/ Chrom\\_FPLC\\_Intro. pdf](http://www.Myofilament.org/document/teqniques/Assets/Chrom_FPLC_Intro.pdf). 29/09/2010.15:03.
- Novagen. (2005). pET-System Manual 11<sup>th</sup> edition. USA.
- Novagen. (n. d.). Ni-NTA His-Bind Resins Protocol. USA
- Putra, S. T. (Ed). 1997. *Biologi Molekuler Kedokteran*. Airlangga University Press. 132.

- Rajan, R. S., et al. (2006). Modulation of protein aggregation by polyethylene glycol conjugation GCSF as a case study. *Protein Science*, Vol.15: 1063-1075.
- Rao, K. V. D., Narasu, M. L., dan Rao, A. K. S. B. (2008). A purification method for improving the process yield and quality of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, Vol.50: 77-87.
- Rybicki, E. P., Vernon, E. C., James, M. D., Sharon, J. R. (1996). *Molecular Biology Techniques Manual*. Ed ke-3. Rondebosch: University of Capetown.
- Souza, L. M., Boone, T. C., dan Gabilove, J. (1986). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*.
- Tsuchiya, M., Nomura, H., Asano, S., Kaziro, Y., dan Nagata, S. (1987). Characterization of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor produced in mouse cells. *The EMBO Journal*, Vol.6(3): 611-616.
- Vanz, A., et al. (2008). Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *BioMed central*. [http://www.mnstate.edu/biotech/FPLC\\_Overview.pdf](http://www.mnstate.edu/biotech/FPLC_Overview.pdf). 15/09/2010. 22:57
- Wang, C., Wang, L., dan Geng, X. (n.d.). solubilization and refolding with simultaneous purification of recombinant human granulocyte colony stimulating factor expressed by *Escherichia coli* as inclusion bodies. [www.paper.edu.cn](http://www.paper.edu.cn), diunduh pada tanggal 13 Juli 2010, pukul 09.47.
- Welte, K., Gabilove, J., Bronchud, M. H., Platzer, E. dan Morystyn, G. (1996). Filgrastim (r-metHuG-CSF): The first 10 years. *Blood*. Vol.88(6): 1907-1929.
- Zachariou M. (Ed). 2008. *Affinity Chromatography Methods and Protocols*. Human Press: USA.

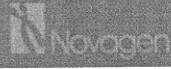
Lampiran 1: Regulasi ekspresi protein dalam pET-System (Novagen)



Lampiran 2: plasmid PTZ57 yang digunakan dalam klon *E. coli*



Lampiran 3 : Plasmid pET21



TB036 12/98

### pET-21a-d(+) Vectors

	Cat. No.
pET-21a DNA	69740-3
pET-21b DNA	69741-3
pET-21c DNA	69742-3
pET-21d DNA	69743-3

The pET-21a-d(+) vectors carry an N-terminal T7-Tag® sequence plus an optional C-terminal His-Tag® sequence. These vectors differ from pET-24a-d(+) only by their selectable marker (ampicillin vs. kanamycin resistance). Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-21a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	311-327
T7 transcription start	310
T7-Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (BamHI - XhoI)	158-203
His-Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	714-1793
pBR322 origin	3227
bla coding sequence	3988-4845
f1 origin	4977-5432

The maps for pET-21b(+), pET-21c(+), and pET-21d(+) are the same as pET-21a(+) (shown) with the following exceptions:  
 pET-21b(+) is a 5442bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond BamHI at 198.  
 pET-21c(+) is a 5441bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond BamHI at 198.  
 pET-21d(+) is a 5440bp plasmid; the BamHI I site is in the same reading frame as in pET-21c(+). An NcoI site is substituted for the NdeI site with a net 1bp deletion at position 238 of pET-21c(+). As a result, NcoI cuts pET-21d(+) at 234, and NheI cuts at 229. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 239 in pET-21a(+). Note also that StyI is not unique in pET-21d(+).

pET-21a(+) (5443bp)

pET-21a-d(+) cloning/expression region

T7 promoter primer #69348-3

AGATCTCGATCCCGCAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGAAATAATTGGTAACTTTAAGAAGGAGA

BglII T7 promoter lac operator XbaI rbs

ATATACATATGGTACATGACTGGACAGCAAAATCGCTCGATCGAATCGAATCTCTCTGACAAAGATTCGGCCGCTACGACACCACCAACCACCACTGA

NdeI NheI T7-Tag pET-21a BamHI EcoRI SacI SalI HindIII EagI XbaI His-Tag

MetAlaSerMetThrGlyCysIleInMetGlyArgGlySerGluPheGluLeuArgArgGlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProMetLeu

pET-21b GGTCGGATCCGAATTCGAGCTCGTGGCAAGCTTCGGCCGCTACGACACCACCAACCACCACTGA

pET-21c GGTCGGATCCGAATTCGAGCTCGTGGCAAGCTTCGGCCGCTACGACACCACCAACCACCACTGA

pET-21d GGTCGGATCCGAATTCGAGCTCGTGGCAAGCTTCGGCCGCTACGACACCACCAACCACCACTGA

TACCATGCGTACG MetAlaSer Bpu1102I T7 terminator

GATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAGGAAGCTGAGTTGGTCTCTCCAGCTCCGATCAATAACTAGCAATAACCCCTTGGGCGCTCAACCGGCTTGAAGGGGTTTTTG

T7 terminator primer #69337-3

Novagen • ORDERING 800-526-7319 • TECHNICAL SUPPORT 800-207-0144

## Lampiran 4: Sertifikat Analisis resin TALON

Certificate of Analysis

**PRODUCT: TALON™ Metal Affinity Resin**

CATALOG Nos.	AMOUNT	DESCRIPTION
635501	10 ml	Immobilized metal affinity chromatography resin for the purification of recombinant polyhistidine-tagged proteins under native or denaturing conditions.
635502	25 ml	
635503	100 ml	
635504	250 ml	
635505	2.5 ml	

**LOT NUMBER**  
Specified on product label.

**STORAGE BUFFER**  
Nonbuffered 20% ethanol.

**STORAGE CONDITIONS**  
Store at 4°C.

**SHELF LIFE**  
1 year from date of receipt under proper storage conditions.

**SHIPPING CONDITIONS**  
Room temperature

**FOR RESEARCH USE ONLY**

---


**QUALITY CONTROL DATA**

**Metal loading analysis**  
Each lot of TALON Resin is guaranteed to have a divalent metal loading of  $\geq 12 \mu\text{mol/ml}$  of bed volume. The amount of bound metal is determined by atomic absorption spectroscopy.

**Functional test**  
The TALON Resin was functionally tested using polyhistidine-tagged GFPuv and the TALON Buffer Kit (Cat. No. 635514). 1 ml of TALON Metal Affinity Resin was saturated with a bacterial polyhistidine-tagged GFPuv lysate in Extraction Buffer (pH 8.0). The resin was washed two times with 5 ml of Extraction Buffer (pH 8.0) and then two times with 5 ml of Extraction/Wash Buffer (pH 7.0). Bound protein was eluted by washing three times with 1 ml of Elution Buffer (pH 7.0). A sample of each eluant was analyzed by electrophoresis on a 12% SDS polyacrylamide gel to verify the purity of the eluted protein. The polyhistidine-tagged protein is  $\geq 99\%$  of the eluted material.

**PACKAGE CONTENTS**

- TALON™ Metal Affinity Resin
- User Manual (PT1320-1)



**Clontech**

United States/Canada  
800.862.2566

Asia Pacific  
+1.650.919.7300

Europe  
+33.(0)1.3904.6880

Japan  
+81.(0)77543.6116

Clontech Laboratories, Inc.  
A Takara Bio Company  
1290 Terra Bella Ave.  
Mountain View, CA 94043  
Technical Support (US)  
E-mail: tech@clontech.com  
www.clontech.com

APPROVED BY: 

**Notice to Purchaser**

This product is intended to be used for research purposes only. It is not to be used for drug or diagnostic purposes nor is it intended for human use. Clontech products may not be resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products without written approval of Clontech Laboratories, Inc.

The use of TALON Resins is covered under U.S. Patent 5,962,641.

Licensed under U.S. Patent 4, 569, 794 and its international equivalents for use in research related biopolymers. Licenses for commercial applications are available from Indiana Proteomics Consortium, Inc. (Inproteo).

Clontech, Clontech logo and all other trademarks are the property of Clontech Laboratories, Inc. Clontech is a Takara Bio Company. ©2005  
(PA43827)


Clontech logo and all other trademarks are the property of Clontech Laboratories, Inc. Clontech is a Takara Bio Company. ©2005  
(PA43827)



## Lampiran 5: Spesifikasi Antibodi Primer

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

## G-CSF (FL-207): sc-13102



The Power to Question

**BACKGROUND**

Granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF, is a pleiotropic cytokine that influences differentiation, proliferation and activation of the neutrophilic granulocyte lineage. The murine G-CSF cDNA encodes a 208 amino acid precursor containing a 30 amino acid signal peptide that is proteolytically cleaved to form a 178 amino acid residue mature protein. Two G-CSF cDNAs which are identical except for a three amino acid deletion in the amino-terminus of one form of the protein have been isolated from human cells. Murine and human G-CSF share 73% sequence identity at the amino acid level. G-CSF signals through the G-CSF receptor, G-CSFR, a heavily glycosylated 812 amino acid polypeptide with a single transmembrane domain. Stimulation of the G-CSFR results in the activation of the Ras/MAPK pathway and phosphorylation of the adaptor protein Shc. Other studies indicate that the kinases Lyn and Syk and the transcription factor Stat3 are activated in response to G-CSF stimulation.

**REFERENCES**

- Nagata, S., et al. 1986. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 319: 415-418.
- Tsuchiya, M., et al. 1986. Isolation and characterization of the cDNA for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7633-7637.
- Abrams, J.S., et al. 1992. Strategies of anti-cytokine monoclonal antibody development: immunoassay of IL-10 and IL-5 in clinical samples. *Immunol. Rev.* 127: 5-24.
- Abrams, J. 1995. Immunoenzymetric assay of mouse and human cytokines using NIP-labeled anti-cytokine antibodies. In Coligan J.E., et al, eds. *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley and Sons, Unit 6.20.
- Visani, G. and Manfroi, S. 1996. G-CSF in the biology and treatment of acute myeloid leukemias. *Leuk. Lymphoma* 18: 423-428.
- Tweardy, D.J., et al. 1996. Granulocyte colony-stimulating factor rapidly activates a distinct Stat-like protein in normal myeloid cells. *Blood* 86: 4409-4416.
- de Koning, J.P., et al. 1996. Specific involvement of Tyrosine 764 of human granulocyte colony-stimulating factor receptor in signal transduction mediated by p145/Shc/GRB2 or p90/GRB2 complexes. *Blood* 87: 132-40.
- Mielcarek, M., et al. 1996. CD14<sup>+</sup> cells in granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mobilized peripheral blood mononuclear cells induce secretion of interleukin-6 and G-CSF by marrow stroma. *Blood* 87: 574-580.

**CHROMOSOMAL LOCATION**

Genetic locus: CSF3 (human) mapping to 17q11.2-q12; Csf3 (mouse) mapping to 11 D.

**SOURCE**

G-CSF (FL-207) is a rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 1-207 representing full length G-CSF of human origin.

**PRODUCT**

Each vial contains 200 µg IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Available as HRP conjugate for Western blotting, sc-13102 HRP, 200 µg/1 ml.

**APPLICATIONS**

G-CSF (FL-207) is recommended for detection of G-CSF of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 µg per 100-500 µg of total protein (1 ml of cell lysate)] and immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and solid phase ELISA (starting dilution 1:30, dilution range 1:30-1:3000).

Suitable for use as control antibody for G-CSF siRNA (h): sc-39389 and G-CSF siRNA (m): sc-39390.

Molecular Weight of G-CSF: 19 kDa.

Positive Controls: human bladder tissue.

**RECOMMENDED SECONDARY REAGENTS**

To ensure optimal results, the following support (secondary) reagents are recommended: 1) Western Blotting: use goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004 (dilution range: 1:2000-1:100,000) or Cruz Marker™ compatible goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2030 (dilution range: 1:2000-1:5000), Cruz Marker™ Molecular Weight Standards: sc-2035, TBS Blotto A Blocking Reagent: sc-2333 and Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048. 2) Immunoprecipitation: use Protein A/G PLUS-Agarose: sc-2003 (0.5 ml agarose/2.0 ml). 3) Immunofluorescence: use goat anti-rabbit IgG-FITC: sc-2012 (dilution range: 1:100-1:400) or goat anti-rabbit IgG-TR: sc-2780 (dilution range: 1:100-1:400) with UltraCruz™ Mounting Medium: sc-24941.

**SELECT PRODUCT CITATIONS**

- Ward, A.C., et al. 1998. The Src-like tyrosine kinase Hck is activated by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and docks to the activated G-CSF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251: 117-123.
- Chen, X., et al. 2005. Expression of granulocyte colony-stimulating factor is induced in injured rat carotid arteries and mediates vascular smooth muscle cell migration. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 288: C81-88.
- Fievez, L., et al. 2007. Stat5 is an ambivalent regulator of neutrophil homeostasis. *PLoS ONE* 2: e727.

**STORAGE**

Store at 4° C. **\*\*DO NOT FREEZE\*\***. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

**RESEARCH USE**

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

**PROTOCOLS**

See our web site at [www.scbt.com](http://www.scbt.com) or our catalog for detailed protocols and support products.

Santa Cruz Biotechnology, Inc. 1.800.457.3801 831.457.3800 fax 831.457.3801 Europe +00800 4573 8000 49 6221 4503 0 [www.scbt.com](http://www.scbt.com)

## Lampiran 6: Sertifikat Antibodi Sekunder

**Product Contents**

**Anti-Rabbit IgG (Fc) Alkaline Phosphatase Conjugate:**

Part No.	Size
S373B	100µl

**Description:** Anti-Rabbit IgG (Fc) Alkaline Phosphatase Conjugate is an affinity-purified goat anti-rabbit antibody.

**Antibody Specificity:** This anti-rabbit antibody reacts with the heavy chains of rabbit IgG but not with light chains. Antibodies may cross-react with immunoglobulins from other species.

**Dilution:** A working dilution of 1:7,500 is suggested for immunoscreening filters, Western blots and ELISA assays.

**Storage Buffer:** Anti-Rabbit IgG (Fc) Alkaline Phosphatase Conjugate is provided in Tris-buffered salts containing BSA and azide.

**Storage Conditions:** Store undiluted at 4°C. The performance of this product is guaranteed for 12 months from the date of purchase if stored and handled properly.

**Promega Product Information**

**Anti-Rabbit IgG (Fc), AP Conjugate**  
**Catalog# S3731**  
**System Lot# 271025**

Size: 100µl  
S373B Lot# 24601205  
Storage Temp: +4°C

For Laboratory Use. For in vitro use only.

Madison, WI

▼ Peel Label Here

A063731 2710259

**Promega Corporation**

2600 Woods Hollow Road  
Madison, WI 53711-5399 USA  
Telephone: 608-274-4300  
Toll Free: 800-356-9626  
Fax: 608-277-2516  
Internet: www.promega.com

**PRODUCT USE LIMITATIONS, WARRANTY, DISCLAIMER**  
Promega manufactures products for a number of intended uses. Please refer to the product label for the intended use statements for specific products. Promega products contain chemicals which may be harmful if misused. Due care should be exercised with all Promega products to prevent direct human contact.

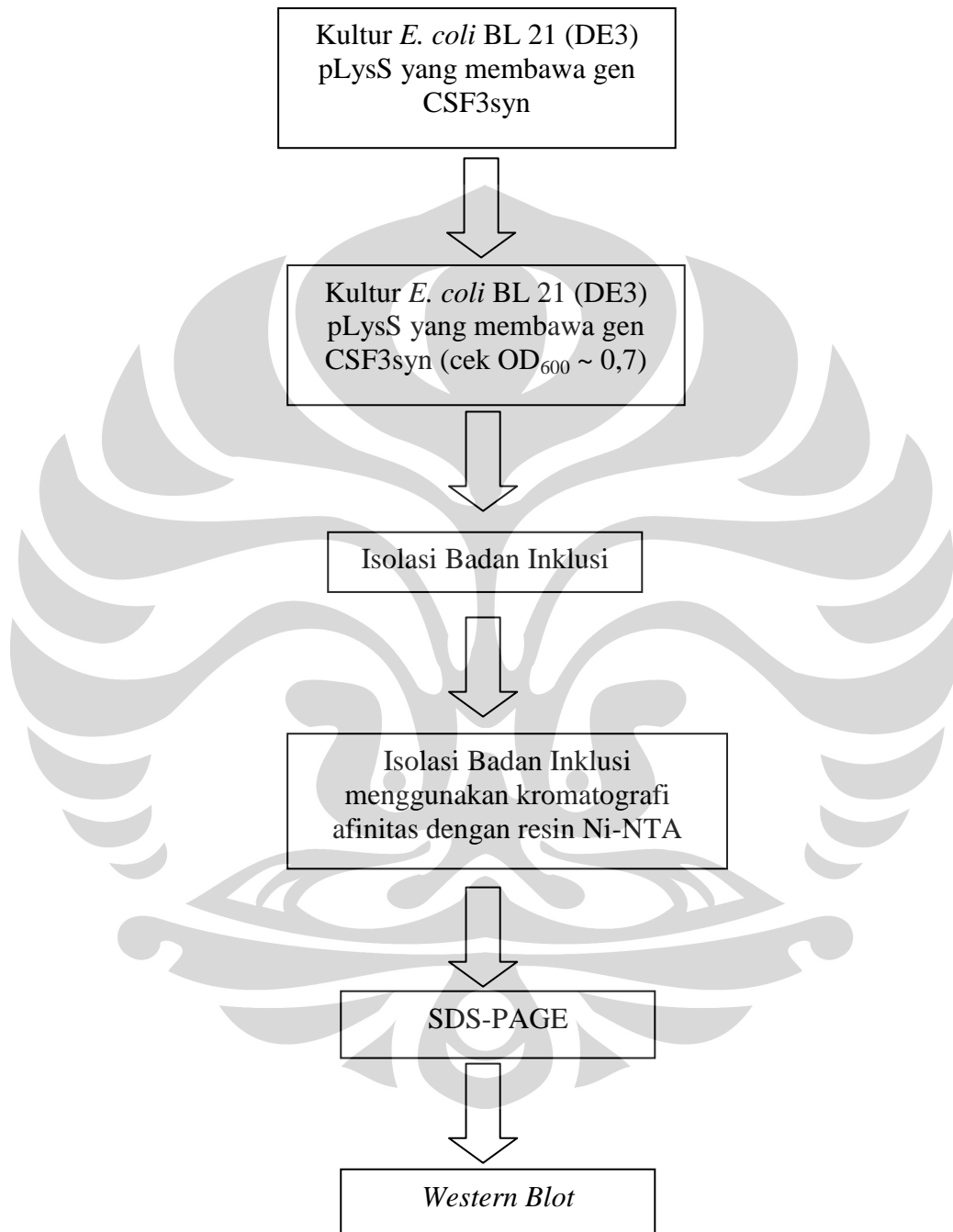
Each Promega product is shipped with documentation stating specifications and other technical information. Promega products are warranted to meet or exceed the stated specifications. Promega's sole obligation and the customer's sole remedy is limited to replacement of products free of charge in the event products fail to perform as warranted. Promega makes no other warranty of any kind whatsoever, and SPECIFICALLY DISCLAIMS AND EXCLUDES ALL OTHER WARRANTIES OF ANY KIND OR NATURE, WHATEVER, DIRECTLY OR INDIRECTLY EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, AS TO THE SUITABILITY, PRODUCTIVITY, DURABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR USE-METHOD, CONDITION, OR ANY OTHER MATTER WITH RESPECT TO PROMEGA PRODUCTS. In no event shall Promega be liable for claims for any other damages, whether direct, incidental, foreseeable, consequential, or special (including but not limited to loss of use, revenue, or profit), whether based upon warranty, contract, tort (including negligence) or other liability arising in connection with the sale or the failure of Promega products to perform in accordance with the stated specifications.

© 1999-2007 Promega Corporation. All Rights Reserved.  
Products may be covered by pending or issued patents; may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.  
All specifications are subject to change without prior notice.  
Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

Part# 9PIS373  
Printed in USA, Revised 3/07

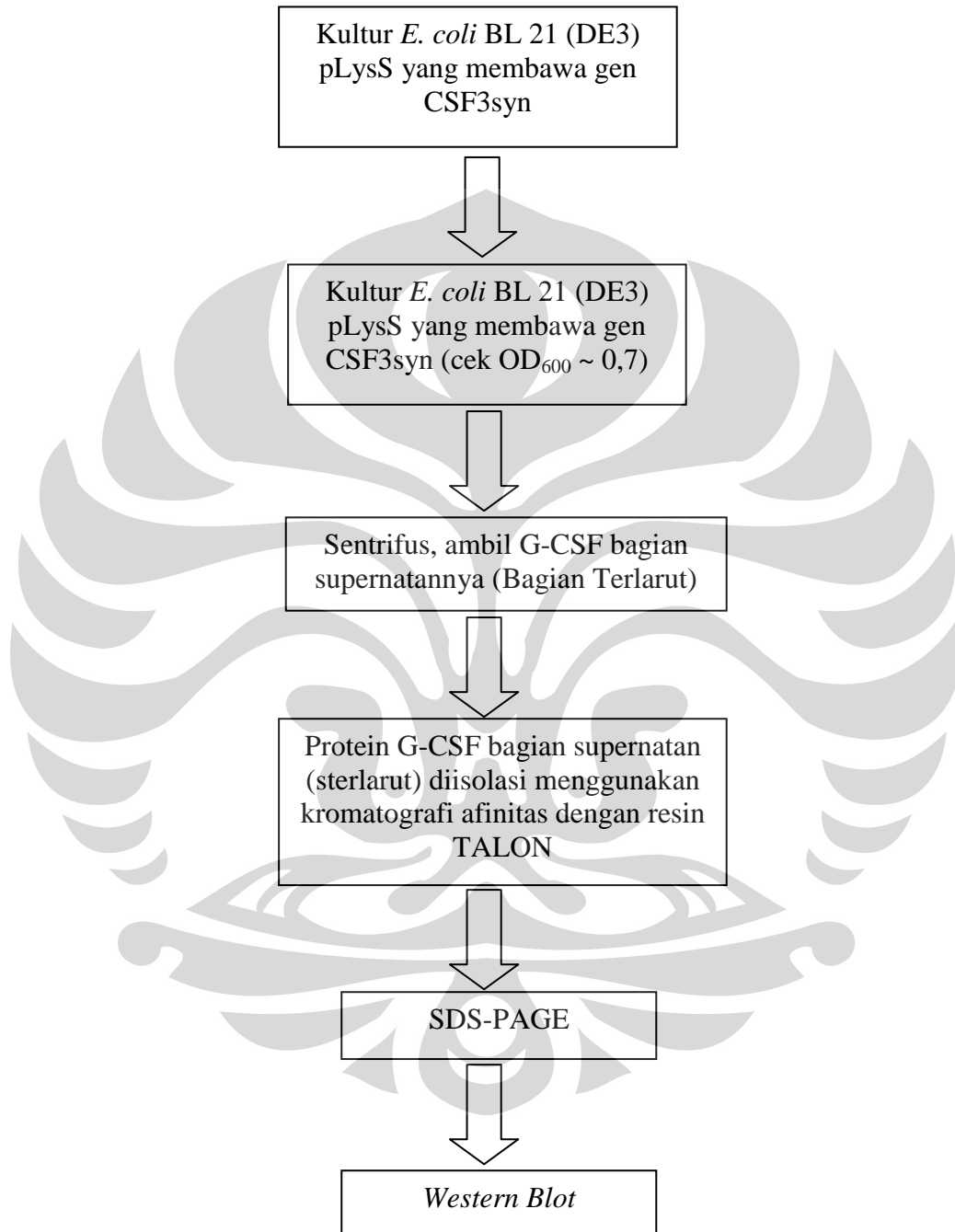
## Lampiran 7: Rancangan Penelitian

## Isolasi Protein GCSF sebagai Badan Inklusi



## Lampiran 4 Rancangan Penelitian

## Isolasi Protein G-CSF Terlarut



## Lampiran 9: Penanda Protein Prestained

