

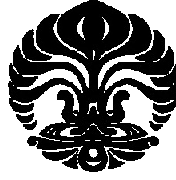
UNIVERSITAS INDONESIA

**EKSPRESI GEN *CSF3SYN* DENGAN PROMOTOR
KONSTITUTIF P_{GAP} PADA *Pichia pastoris***

SKRIPSI

**TRI WAHYUNI
0706264356**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**EKSPRESI GEN *CSF3SYN* DENGAN PROMOTOR
KONSTITUTIF P_{GAP} PADA *Pichia pastoris***

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**TRI WAHYUNI
0706264356**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Tri Wahyuni

NPM : 0706264356

Tanda Tangan : 

Tanggal : 07 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Tri Wahyuni
NPM : 0706264356
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Ekspresi Gen *CSF3syn* dengan Promotor Konstitutif
 P_{GAP} pada *Pichia pastoris*

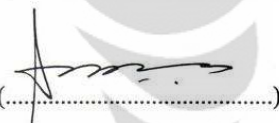
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Asrul Muhamad Fuad

()

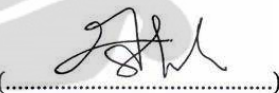
Pembimbing II : Dr. Anom Bowolaksono

()

Penguji I : Ariyanti Oetari, Ph.D

()

Penguji II : Dr. Andi Salamah

()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 07 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan hanya kepada Allah SWT atas segala nikmat, rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Begitu banyak bantuan moril dan material serta bimbingan dari berbagai pihak yang tidak dapat diungkapkan hanya dengan kata-kata. Walau demikian, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Asrul Muhamad Fuad dan Dr. Anom Bowolaksono selaku Pembimbing I dan II atas waktu, perhatian, pengertian, kesabaran, bimbingan dan dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Ariyanti Oetari, Ph.D dan Dr. Andi Salamah selaku Penguji I dan II atas segala saran, perbaikan-perbaikan, dan dukungan yang diberikan kepada penulis untuk pembuatan dan perbaikan skripsi ini.
3. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc selaku Penasehat Akademik atas saran-saran dan semangat yang selalu diberikan.
4. Dr. Abinawanto dan Retno Lestari, M.Si yang telah memberikan semangat dan bimbingan selama menjadi asisten genetika dan perkuliahan.
5. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti S.U selaku Koordinator Pendidikan, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI dan segenap staf pengajar atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis selama berada di Biologi. Terima kasih pula kepada Mbak Asri, Ibu Ida, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, atas segala bantuan yang telah diberikan.
6. Kepala Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Laboratorium Rekayasa Bioproses Protein, Bioteknologi LIPI yang pasti menjadi tempat yang takkan

terlupakan bagi penulis. Terima kasih kepada Ibu Enung, Teh Goli, Teh Ami, Teh Ai, Kak Prety, Kak Yona, Mas Asep, Teh Yati untuk bimbingan, canda tawa, semangat, dukungan, dan penerimaan yang baik selama penulis melakukan penelitian.

7. Keluarga tercinta, Bapak (Sugiarto), Ibu (Marpingah), kakak-kakakku (Dwi dan Eko), kakak-kakak ipar (Arie dan Dina), dan keluarga besar atas kasih sayang, cinta, dukungan, semangat, nasehat, dan doa yang selalu diberikan kepada penulis.
8. Rekan seperjuangan dalam satu lembaga penelitian Arty. Terima kasih atas segala semangat, dukungan, dan kerja samanya.
9. Sahabat spesial dan terbaik dari TEAM eXpr3SsO (Naba, Gitaw, Merry, Putsan, Pepeb, Tiara) serta Uthie, Bibil, Ine atas persahabatan, kebersamaan, tawa dan tangis yang kita lalui bersama. HIMBIO 08 (Wahyu, Bayu, Kimbod, Iik, Ade, Fika, Nesty, Ecid, Naya), dan seluruh teman-teman BLOSSOM tercinta atas segala canda tawa, semangat yang diberikan, dan semua hal yang selalu menghibur.
10. Terima kasih juga buat Kak Adiep (Bio'01) atas bantuan jurnal-jurnal yang sangat bermanfaat dan semangatnya. Kak Ai (Bio'05) atas nasehat yang selalu diberikan, kakak-kakak senior Bio'04 (kak Afi, kak AP dll), Bio'05 (Kak Irma, Kak Meli dll), Bio'06. Terima kasih juga buat teman-teman Bio'08, Bio'09, Bio'10, KSHL Comata, dan asisten genetika atas semangat dan doanya.
11. Teman-teman terbaik Lina, Ghina, Kak Prisca, Ito, Marthen, teman MPKT (Widi, Ina, Dicky, Dito), teman-teman dan murid-murid SG atas dukungan, keceriaan, doa, dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.

Akhir kata, penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para perkembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 07 Juli 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Tri Wahyuni
NPM : 0706264356
Program Studi : S1 Biologi
Departemen : Biologi
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:

Ekspresi Gen *CSF3syn* dengan Promotor Konstitutif P_{GAP} pada *Pichia pastoris*

berserta 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 karya ilmiah 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 : 07 Juli 2011

Yang menyatakan



Tri Wahyuni

ABSTRAK

Nama : Tri Wahyuni
Program Studi : S1 Biologi
Judul : Ekspresi Gen *CSF3syn* dengan Promotor Konstitutif P_{GAP} pada *Pichia pastoris*

Gen *CSF3syn* adalah gen sintetik yang menyandi protein G-CSF. Protein G-CSF dapat diproduksi secara rekombinan. Sel inang alternatif yang dapat digunakan yaitu *Pichia pastoris*. Penelitian bertujuan untuk menyeleksi *P. pastoris* transforman yang stabil, mendapatkan *P. pastoris* transforman yang terintegrasi dengan gen *CSF3syn*, dan menganalisis ekspresi protein G-CSF pada *P. pastoris* transforman dengan promotor konstitutif GAP. Sebanyak 47 transforman berhasil diseleksi pada konsentrasi zeosin 1000 µg/ml. Analisis PCR menunjukkan gen *CSF3syn* sebesar 567 pb berhasil terintegrasi dalam genom *P. pastoris*. Analisis SDS PAGE, *slot blot*, dan *western blot* menunjukkan protein G-CSF berhasil diekspresikan. Analisis *western blot* menunjukkan G-CSF terglykosilasi ~20 kDa dan tidak terglykosilasi ~18 kDa. Selain itu, terdapat protein dengan berat molekul lebih dari protein target yaitu protein fusi terglykosilasi ~40--60 kDa.

Kata kunci : Ekspresi gen, gen *CSF3syn*, *Pichia pastoris*, promotor konstitutif GAP, protein G-CSF.
xiii + 69 halaman : 25 gambar; 5 tabel.
Daftar referensi : 77 (1986--2011).

ABSTRACT

Name : Tri Wahyuni
Program Study : S1 Biology
Title : Expression of *CSF3syn* Gene in *Pichia pastoris* Using Constitutive GAP Promoter.

CSF3syn gene is a synthetic gene that encodes G-CSF protein. G-CSF protein can be produced by recombinant technique. *Pichia pastoris* can be used as an alternative host. The objectives of this study were to select stability of the *P. pastoris* transformant, to obtain *P. pastoris* transformants which were integrated with *CSF3syn* gene, and expressed G-CSF recombinant in *P. pastoris* using the constitutive GAP promoter. A total of 47 transformants were selected in YEPD medium with 1000 µg/ml zeocin. Analyses by PCR confirmed the inserted *CSF3syn* gene in *P. pastoris* genome of 567 bp. Analyses of SDS PAGE, western blot, and slot blot showed that the G-CSF protein was expressed successfully. Western blot analyses showed that the bands of ~20 kDa as glycosylated G-CSF and ~18 kDa as non glycosylated G-CSF. The result also showed that the band with higher molecular mass ~40--60 kDa which was probably glycosylated fusion protein.

Keywords : Constitutive GAP promoter, *CSF3syn* gene, expression of gene, G-CSF protein, *Pichia pastoris*.
xiii + 69 pages : 25 pictures; 5 table.
Daftar referensi : 77 (1986--2011).

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 <i>Granulocyte Colony Stimulating Factors</i> (G-CSF)	4
2.2 <i>Pichia pastoris</i>	6
2.3 Sistem Ekspresi <i>Pichia pastoris</i>	8
2.3.1 Vektor ekspresi pGAPZ α	11
2.4 Penapisan Klon Hasil Transformasi	13
2.5 Beberapa Teknik Dasar Biologi Molekular	14
2.5.1 Isolasi DNA	14
2.5.2 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	14
2.5.3 Elektroforesis	15
2.5.4 <i>Slot blot</i> dan <i>western blotting</i>	16
3. METODE KERJA	18
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	18
3.2 Bahan	18
3.2.1 Mikroorganisme, plasmid DNA dan sumber gen <i>CSF3syn</i> ..	18
3.2.2 Medium tumbuh	18
3.2.3 Bahan kimia	19
3.3 Alat	19
3.4 Cara Kerja	20
3.4.1 Pembuatan medium, larutan, dan dapar	21
3.4.2 Seleksi klon <i>P. pastoris</i> transforman	21
3.4.3 Pengamatan morfologi <i>P. pastoris</i> secara makroskopik	22
3.4.4 Pengamatan morfologi <i>P. pastoris</i> secara mikroskopik	22
3.4.5 Subkultur	22
3.4.6 Isolasi DNA genom <i>P. pastoris</i>	23

3.4.7	Verifikasi insersi gen <i>CSF3syn</i> pada DNA genom <i>P. pastoris</i> transforman	24
3.4.8	Elektroforesis gel agarosa	25
3.4.9	Uji ekspresi protein G-CSF rekombinan dalam skala kecil..	26
3.4.10	Produksi protein G-CSF rekombinan dalam kultur labu kocok berdasarkan rentang waktu	26
3.4.11	Pemekatan protein dengan metode presipitasi menggunakan larutan TCA (<i>Trichloroacetic acid</i>).....	27
3.4.12	Analisis elektroforesis gel protein rekombinan	28
3.4.13	Analisis <i>western blotting</i> protein rekombinan	28
3.4.14	Deteksi protein G-CSF rekombinan menggunakan metode <i>slot blot</i>	29
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1	Seleksi Klon <i>P. pastoris</i> Transforman	31
4.2	Pengamatan Morfologi <i>P. pastoris</i>	34
4.3	Isolasi DNA Genom <i>P. pastoris</i>	35
4.4	Verifikasi Insersi Gen Sisipan <i>CSF3syn</i> pada Genom <i>P. pastoris</i> Melalui Teknik PCR	37
4.5	Uji Ekspresi Protein G-CSF Rekombinan dalam Skala Kecil	43
4.5.1	Analisis protein G-CSF rekombinan skala kecil dengan SDS PAGE	43
4.5.2	Analisis spesifikasi protein G-CSF rekombinan skala kecil dengan teknik <i>western blotting</i>	45
4.6	Produksi Protein G-CSF Rekombinan dalam Kultur Labu Kocok ..	47
4.6.1	Deteksi protein G-CSF rekombinan dengan teknik <i>slot blot</i>	49
4.6.2	Analisis protein G-CSF rekombinan dalam kultur labu kocok dengan teknik SDS PAGE	51
4.6.3	Analisis spesifikasi produksi protein G-CSF rekombinan pada kultur labu kocok dengan teknik <i>western blotting</i>	53
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1	Kesimpulan.....	57
5.2	Saran	57
	DAFTAR REFERENSI	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur protein G-CSF	5
Gambar 2.2.	Lokasi gen <i>CSF3</i>	5
Gambar 2.3.	Struktur gen <i>CSF3</i>	6
Gambar 2.4.	Sel vegetatif <i>P. pastoris</i>	7
Gambar 2.5.	Struktur glikosilasi	11
Gambar 2.6.	Vektor ekspresi pGAPZ α	12
Gambar 4.1.	Koloni sel <i>P. pastoris</i> hasil transformasi dengan vektor rekombinan pada medium seleksi YEPDS dengan zeosin 100 μ g/ml	31
Gambar 4.2.	(A) Koloni khamir transforman pada medium YEPD dengan zeosin 200 μ g/ml NT: non-transforman; T: transforman. (B) Koloni khamir transforman pada medium YEPD tanpa zeosin.....	34
Gambar 4.3.	(A) Koloni khamir transforman pada medium YEPD dengan zeosin 1.000 μ g/ml (B) Koloni khamir transforman pada medium YEPD tanpa zeosin	34
Gambar 4.4.	Morfologi <i>P. pastoris</i> pada medium YEPD umur 48 jam, suhu 30° C	35
Gambar 4.5.	Visualisasi elektroforesis gel agarosa DNA genom <i>P. pastoris</i> transforman	36
Gambar 4.6.	Visualisasi elektroforesis gel optimasi suhu <i>annealing</i> PCR hasil isolasi genom <i>P. pastoris</i> transforman nomor 5 ..	39
Gambar 4.7.	Visualisasi elektroforesis gel produk PCR DNA genom beberapa klon <i>P. pastoris</i> transforman.....	42
Gambar 4.8.	Integrasi vektor rekombinan pada genom <i>P. pastoris</i>	42
Gambar 4.9.	Posisi penempelan primer CSF3ye F dan CSFye R pada gen sintetik <i>CSF3syn</i>	43
Gambar 4.10.	Hasil SDS PAGE ekspresi G-CSF pada <i>P. pastoris</i> dalam skala kecil.....	44
Gambar 4.11.	Hasil <i>Western blotting</i> ekspresi G-CSF pada <i>P. pastoris</i> dalam skala kecil.....	46
Gambar 4.12.	Kurva standar marka protein untuk ekspresi G-CSF pada beberapa klon <i>P. pastoris</i> dalam skala kecil.....	47
Gambar 4.13.	Kurva standar berat kering sel	48
Gambar 4.14.	Kurva pertumbuhan <i>P. pastoris</i> transforman klon nomor 5	49
Gambar 4.15.	Hasil <i>slot blot</i> protein G-CSF rekombinan <i>P. pastoris</i> transforman klon nomor 5	50
Gambar 4.16.	Hasil SDS PAGE ekspresi G-CSF pada <i>P. pastoris</i> transforman klon nomor 5 berdasarkan waktu.....	52
Gambar 4.17.	Hasil <i>western blot</i> protein GCSF rekombinan pada <i>P. pastoris</i> transforman klon nomor 5 berdasarkan waktu..	54

Gambar 4.18. Kurva standar marka protein.....	55
---	----

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Komponen dan volume reaksi PCR yang digunakan	25
Tabel 4.1. Data uji stabilitas genetik pada klon <i>P. pastoris</i> transforman...	33
Tabel 4.2. Data hasil uji spektrofotometri DNA genom <i>P. pastoris</i> transforman dan non transforman	37
Tabel 4.3. Primer CSF3ye <i>forward</i> dan primer CSF3ye <i>reverse</i>	40
Tabel 4.4. Data pengukuran biomassa sel <i>P. pastoris</i> transforman nomor 5	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi dan Cara Pembuatan Larutan dan Dapar yang Digunakan dalam Penelitian	66
Lampiran 2. Komponen dan Volume Reaksi yang Digunakan pada Pembuatan Gel Poliakrilamid	68
Lampiran 3. Perhitungan Efisiensi Transformasi	69
Lampiran 4. Perhitungan Berat Molekul Protein G-CSF Rekombinan pada Ekspresi Skala Kecil.....	70
Lampiran 5. Perhitungan Berat Molekul Protein G-CSF Rekombinan pada Produksi Protein G-CSF Rekombinan dalam Kultur Labu Kocok.....	71

BAB 1 PENDAHULUAN

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) adalah glikoprotein yang memiliki aplikasi terapeutik. Fungsi dari G-CSF mengatur proses proliferasi dan diferensiasi sel-sel progenitor granulosit (Nagata *dkk.* 1986: 575). Protein G-CSF manusia dikode oleh gen *CSF3*. Gen *CSF3* ditemukan pada kromosom nomor 17 lokus q11--q22 (Demetri dan Griffins 1991: 2792). Protein G-CSF memiliki berat molekul 19,6 kDa yang tersusun atas 4 ikatan α -heliks. Protein tersebut memiliki satu situs O-glikosilasi pada Thr133 yang berfungsi untuk melindungi molekul dari agregasi tanpa memengaruhi pengikatan reseptor. Protein tersebut juga memiliki 2 ikatan disulfida, yaitu pada asam amino Cys36--Cys42 dan Cys67--Cys77 (Hill *dkk.* 1993: 5167).

Protein G-CSF dapat diproduksi secara rekombinan dan digunakan sebagai pengobatan bagi penderita neutropenia. Lebih dari 50% penderita kanker yang menjalani kemoterapi akan mengalami neutropenia yang dapat mengakibatkan kematian pada penderita karena infeksi (Sanyoto 2003: 6; Carbonero *dkk.* 2001: 31). Neutropenia adalah kondisi dengan jumlah neutrofil dalam aliran darah kurang dari 1500 sel per mm³, sehingga tubuh rentan terhadap serangan penyakit. Penderita *congenital neutropenia* memerlukan G-CSF setiap hari untuk menghindari infeksi. Beberapa penderita hanya perlu G-CSF untuk meningkatkan jumlah neutrofil saat terserang infeksi berat (Fuad *dkk.* 2009: 1).

Produk G-CSF rekombinan telah tersedia secara komersial, yaitu filgrastim dan lenograstim. Filgrastim adalah *human G-CSF recombinant* (rhuG-CSF) yang disintesis dalam sistem ekspresi *E. coli*, sedangkan lenograstim dihasilkan di dalam sistem ekspresi sel mamalia (Vanz *dkk.* 2008: 2). Carbonero *dkk.* (2001: 31) serta Sung *dkk.* (2004: 3355) telah melaporkan bahwa penggunaan G-CSF untuk pengobatan neutropenia mampu merangsang pemulihan jumlah neutrofil dan mengurangi resiko infeksi akibat kemoterapi.

Kendala produksi protein G-CSF rekombinan adalah produktivitas yang rendah jika diproduksi pada sel mamalia. Kendala tersebut dapat diatasi dengan penggunaan mikroorganisme yang dapat menghasilkan produktivitas tinggi dan ekonomis. Sel inang alternatif sangat diperlukan untuk produksi protein

rekombinan. Khamir *Pichia pastoris* merupakan salah satu alternatif untuk hal tersebut. *Pichia pastoris* memiliki beberapa keuntungan dibandingkan sel mamalia dan *E. coli* sebagai sel inang. *Pichia pastoris* merupakan khamir metilotropik yang mampu menggunakan metanol sebagai sumber karbon. Tingkat ekspresi protein rekombinan yang dihasilkan *P. pastoris* lebih tinggi, lebih cepat, mudah, serta penggunaan medium produksi lebih murah dibandingkan sistem ekspresi eukariotik lainnya seperti sel mamalia (Invitrogen 2001: 1).

Lasnik *dkk.* (2001: 184), Bahrami *dkk.* (2007: 162), dan Saeedinia *dkk.* (2008: 1) telah berhasil mengekspresikan gen *CSF3* dalam vektor ekspresi pPIC9 pada *P. pastoris* GS115 dan menghasilkan protein G-CSF. Penelitian-penelitian tersebut telah dilakukan menggunakan gen *CSF3* alami dan vektor ekspresi pPIC dengan promotor AOX yang bersifat dapat terinduksi dan menggunakan metanol sebagai sumber karbon.

Laboratorium Rekayasa Bioproses dan Protein, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI berupaya mengembangkan protein G-CSF rekombinan sebagai produk biosimilar protein terapeutik dengan menggunakan gen *CSF3syn* sintetik. Gen *CSF3syn* telah berhasil dikonstruksi dan dikloning dalam vektor pengklonaan pTZ57R/T (Fuad *dkk.* 2009: 9). Gen *CSF3syn* juga sebelumnya telah berhasil disubkloning pada vektor ekspresi pGAPZ α dan ditransformasikan ke dalam *P. pastoris* (Arfia 2010: 78). Namun demikian, klon *P. pastoris* transforman yang stabil, integrasi gen *CSF3syn* pada genom *P. pastoris* transforman, dan ekspresi gen *CSF3syn* dari *P. pastoris* transforman dalam menghasilkan protein G-CSF rekombinan belum diperoleh. Oleh karena itu, penelitian bertujuan untuk menyeleksi klon *P. pastoris* transforman yang stabil, memperoleh *P. pastoris* transforman yang terintegrasi gen *CSF3syn*, dan menganalisis ekspresi protein G-CSF rekombinan pada beberapa klon *P. pastoris* transforman secara konstitutif. Hipotesis yang diajukan adalah klon *P. pastoris* transforman berhasil diseleksi dan diverifikasi, serta protein G-CSF rekombinan berhasil diekspresikan secara konstitutif.

Penelitian meliputi penapisan klon *P. pastoris* transforman, seleksi klon *P. pastoris* transforman yang stabil mengandung plasmid rekombinan, deteksi gen

CSF3syn dalam DNA genom *P. pastoris* melalui teknik PCR, dan analisis ekspresi protein G-CSF rekombinan.

Penelitian diawali dengan melakukan seleksi klon *P. pastoris* transforman pada medium yang mengandung antibiotik zeosin. Inseri gen *CSF3syn* pada genom *P. pastoris* transforman dapat diketahui melalui teknik PCR menggunakan pasangan primer spesifik untuk mendeteksi gen *CSF3syn*. Ekspresi protein G-CSF rekombinan pada beberapa klon *P. pastoris* transforman secara konstitutif. Protein GCSF rekombinan dianalisis menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) 12% dan *Western blotting*.

Gen *CSF3syn* diekspresikan menggunakan vektor ekspresi pGAP α . Vektor pGAP α memiliki promotor P_{GAP} yang bersifat konstitutif. Vektor pGAP α berbeda dengan vektor pPICZ α yang perlu diinduksi menggunakan metanol. Vektor pGAP α lebih menguntungkan dibandingkan pPICZ α karena tidak perlu diinduksi dengan metanol sehingga lebih aman untuk produksi protein terapeutik (Zhang *dkk.* 2009: 1614). Vektor tersebut juga memiliki sinyal sekresi faktor- α untuk efisiensi sekresi protein dan 6xHis *Tag* yang berfungsi untuk deteksi dan purifikasi protein rekombinan. Penelitian yang dilakukan Pal *dkk.* (2006: 656) telah menunjukkan bahwa pGAP α dapat digunakan sebagai vektor ekspresi alternatif untuk mengekspresikan GM-CSF rekombinan.

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai ekspresi protein G-CSF rekombinan secara konstitutif pada *P. pastoris* dan bermanfaat sebagai data awal untuk tahapan selanjutnya dalam proses purifikasi dan karakterisasi protein G-CSF rekombinan yang diperoleh.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

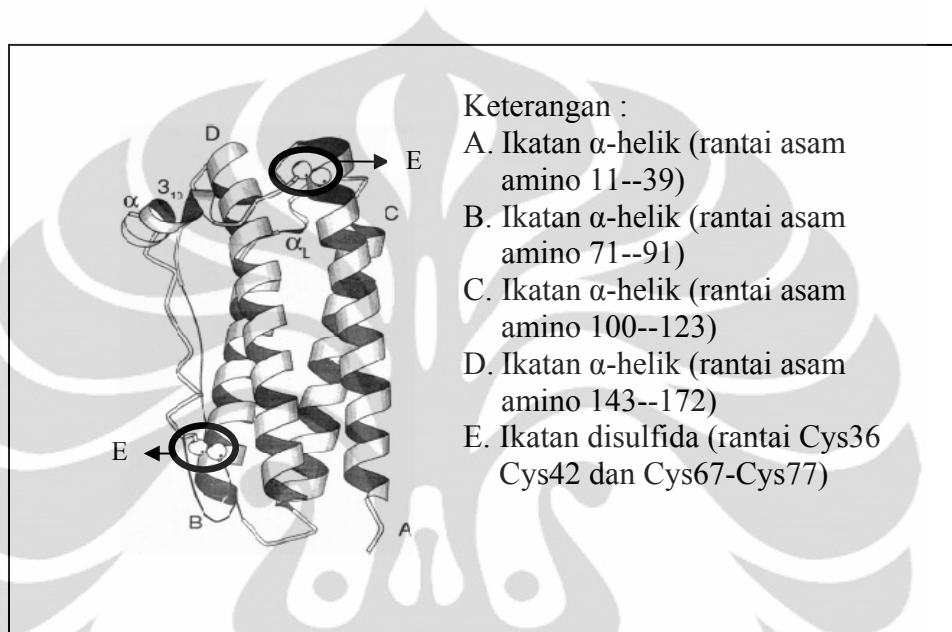
2.1 *Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)*

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) adalah glikoprotein manusia yang memiliki aplikasi terapeutik dan termasuk ke dalam kelompok protein *colony stimulating factors (CSF)*. Kelompok CSF terdiri atas empat jenis, yaitu *granulocyte-macrophage CSF (GM-CSF)*, *granulocyte CSF (G-CSF)*, *macrophage CSF (M-CSF)*, dan interleukin 3 (IL-3). Fungsi M-CSF bekerja spesifik mengatur proliferasi dan diferensiasi sel progenitor makrofag, G-CSF bekerja spesifik terhadap granulosit, sedangkan GM-CSF bekerja pada granulosit dan makrofag. Interleukin 3 (IL-3) tidak hanya merangsang pembentukan granulosit dan makrofag, tetapi juga eosinofil, megakariosit, dan sel mast (Nagata *dkk.* 1986: 575).

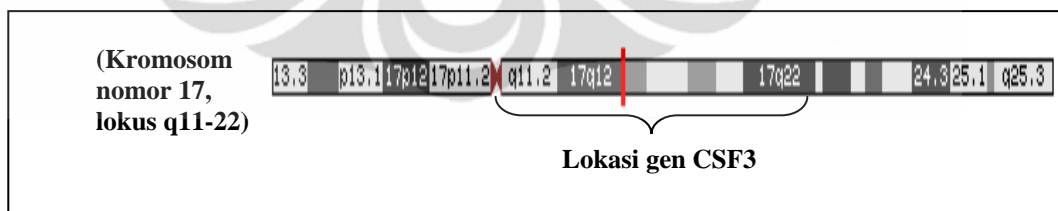
Fungsi dari G-CSF adalah mengatur proliferasi, diferensiasi, fungsi sel progenitor granulosit neutrofil dan pematangan neutrofil. Protein G-CSF manusia memiliki berat molekul sebesar 19,6 kDa, 4 struktur α -heliks, satu situs O-glikosilasi (Thr133), dan dua ikatan disulfida. Dua ikatan disulfida pada rantai terbentuk antara Cys36-Cys42 dan Cys67-Cys77. Satu situs O-glikosilasi pada Thr133 berfungsi untuk melindungi molekul dari agregasi tanpa memengaruhi pengikatan reseptor (Hill *dkk.* 1993: 5167). Struktur protein G-CSF dapat dilihat pada Gambar 2.1.

Gen *CSF3* mengkode G-CSF. Gen *CSF3* ditemukan pada kromosom nomor 17 lokus q11--22 (Demetri dan Griffin 1991: 2792). Gen tersebut terdiri atas 2500 nukleotida. Struktur gen *CSF3* memiliki lima ekson yang dipisahkan oleh empat intron. Gen tersebut menghasilkan 3 macam mRNA yang membentuk 3 isoform preprotein G-CSF manusia tetapi hanya ada dua isoform protein G-CSF matang yang ditemukan di dalam tubuh, yaitu isoform a dan isoform b. Isoform a mengandung 207 asam amino, sedangkan isoform b hanya mengandung 204 asam amino. Tiga asam amino pada nomor 36-38 dari ujung-N yaitu asam amino Val-Ser-Glu tidak dijumpai lagi pada isoform b. Hal tersebut terjadi karena perbedaan pemotongan intron pada proses maturasi mRNA. Sebanyak 30 residu asam amino

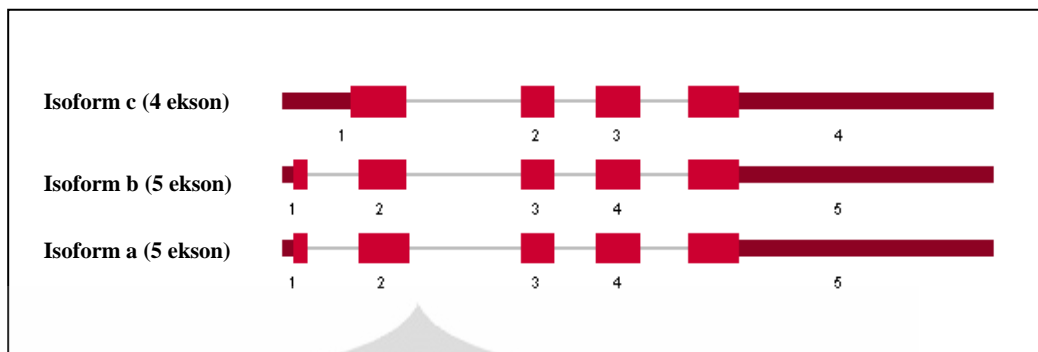
pada ujung-N dari kedua isoform tersebut merupakan sinyal peptida sehingga terdapat 177 asam amino untuk isoform a dan 174 asam amino untuk isoform b (Nagata *dkk.* 1986: 575--577). Lokasi gen *CSF3* dapat dilihat pada Gambar 2.2. Struktur gen *CSF3* dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.1. Struktur tersier protein G-CSF
[Sumber: Hill *dkk.* 1993: 5169.]



Gambar 2.2. Lokasi gen *CSF3*
[Sumber: GeneCard 2010: 1.]



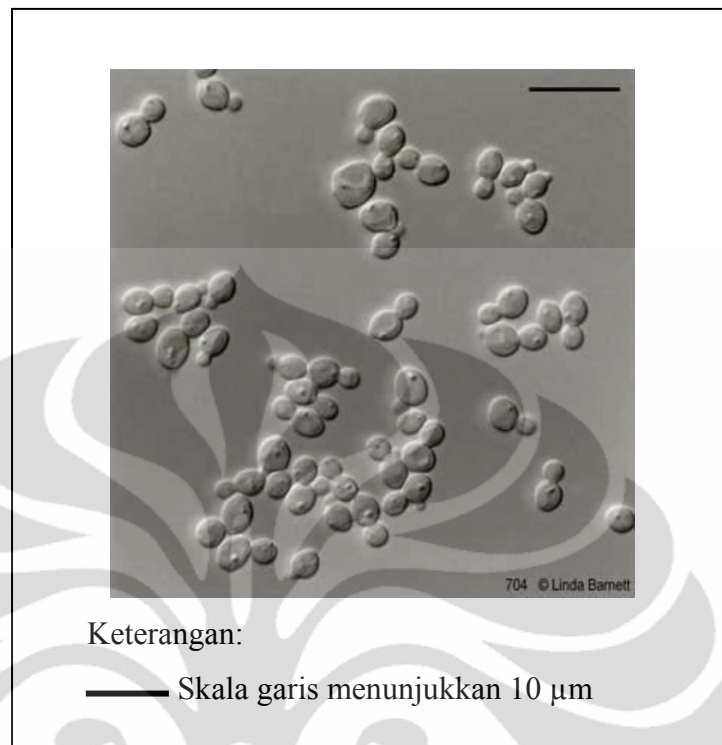
Gambar 2.3. Struktur gen *CSF3*
[Sumber: Dessen 2010: 2.]

2.2 *Pichia pastoris*

Taksonomi *Pichia pastoris* berdasarkan Suh *dkk.* (2006: 1006), yaitu

Kingdom : *Fungi*
 Filum : *Ascomycota*
 Kelas : *Hemiascomycetes*
 Bangsa : *Saccharomycetales*
 Suku : *Saccharomycetaceae*
 Marga : *Pichia*
 Jenis : *Pichia pastoris* Guilliermond, 1925

Pichia pastoris merupakan khamir sel tunggal yang membentuk koloni berwarna putih krem. *Pichia pastoris* memiliki sel berbentuk oval dengan tipe pertunasan multipolar serta menghasilkan pseudomiselium dan askospora. *Pichia pastoris* dapat tumbuh optimum pada suhu 30° C dalam medium agar atau cair yang mengandung ekstrak *yeast*, pepton, glukosa, metanol, gliserol, dan etanol (National Collection of Yeast Cultures 2011: 1). Morfologi *P. pastoris* dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Sel vegetatif *P. pastoris*
 [Sumber: National Collection of
 Yeast Cultures 2011: 1.]

Pichia pastoris merupakan khamir metilotropik yang mampu melakukan metabolisme metanol sebagai sumber karbon. Reaksi kimia yang dilakukan *P. pastoris* adalah oksidasi metanol menjadi formaldehid dengan bantuan alkohol oksidase. Salah satu produk sampingan dari reaksi oksidasi metanol adalah hidrogen peroksida (H_2O_2) yang akan diuraikan menjadi hidrogen dan air di peroksisom. Alkohol oksidase memiliki afinitas yang sangat rendah terhadap oksigen. *Pichia pastoris* mengatasi hal tersebut dengan menghasilkan sejumlah besar enzim (Invitrogen 2001: 1).

Pichia pastoris memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, 1883 antara lain adalah *P. pastoris* mampu memproduksi protein rekombinan dalam jumlah besar yang diatur promotor gen *AOX1*. Ekspresi protein rekombinan yang dihasilkan *S. cerevisiae* umumnya lebih rendah dibanding *P. pastoris*. *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan etanol saat kepadatan sel tinggi, yang beracun bagi sel dan akibatnya protein yang

Universitas Indonesia

disekresikan rendah. Protein yang dihasilkan *S. cerevisiae* memiliki hiperglikosilasi dengan 100 manosa residu pada rantai ikatan N-oligosakarida. Kelebihan manosa menyebabkan protein menjadi antigenik. Berbeda dengan *S. cerevisiae*, tingkat sekresi protein rekombinan pada *P. pastoris* sangat tinggi. Hal tersebut disebabkan oleh konsentrasi sel yang tinggi dan tidak dihasilkannya etanol yang merupakan racun bagi sel. *Pichia pastoris* umumnya mensekresikan proteinnya sendiri dalam jumlah sedikit, sehingga memudahkan proses pemurnian protein rekombinan yang diseekresikan (Glick dan Pasternak 2003: 172).

Keuntungan utama *P. pastoris* dibandingkan *E. coli* adalah *P. pastoris* dapat melakukan modifikasi pasca translasi seperti pelipatan protein, pembentukan ikatan disulfida dan glikosilasi. Protein rekombinan yang diproduksi pada *E. coli* mungkin tidak terlipat dengan tepat, sehingga tidak aktif dan tidak larut. Protein eukariotik yang disintesis pada sistem ekspresi bakteri umumnya tidak stabil atau aktivitas biologinya berkurang yang diakibatkan oleh tidak terjadinya modifikasi pasca translasi (Glick dan Pasternak 2003: 172; Gellisen 2005: 144).

Pichia pastoris memiliki beberapa galur dengan genotip yang berbeda. Beberapa galur *P. pastoris* tersedia secara komersial seperti GS115, KM71, MC100-3, SMD1163, dan X33. Galur *P. pastoris* yang sering digunakan pada ekspresi protein rekombinan adalah GS115. *Pichia pastoris* GS115 (*his4*) memiliki mutasi pada *histidinol dehydrogenase gene (his4)*. Galur GS115 akan tumbuh pada medium kompleks seperti *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD) dan medium minimum yang ditambahkan histidin (Cregg *dkk.* 2000: 26).

Beberapa penelitian telah menggunakan *P. pastoris* sebagai sel inang antara lain penelitian ekspresi protein G-CSF (Lasnik *dkk.* 2001: 184), hGM-CSF (Pal *dkk.* 2006: 650), dan *human erythropoietin* (Maleki *dkk.* 2010: 197).

2.3 Sistem Ekspresi *Pichia pastoris*

Ekspresi gen merupakan proses transkripsi materi genetik (DNA) di dalam sel menjadi RNA dan selanjutnya ditranslasi menjadi polipeptida yang spesifik

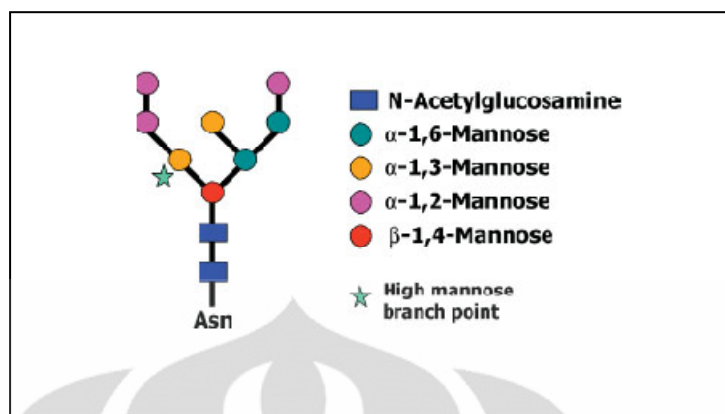
(Madigan *dkk.* 2009: 225). Ekspresi gen asing pada *P. pastoris* meliputi tiga langkah dasar, yaitu penyisipan gen asing ke dalam vektor ekspresi, integrasi vektor rekombinan ke dalam genom *P. pastoris*, dan seleksi galur *P. pastoris* hasil transformasi yang dapat mengekspresikan gen asing (Li *dkk.* 2007: 107). *Pichia pastoris* memiliki dua gen yang mengkode alkohol oksidase, yaitu *AOX1* dan *AOX2*. Gen *AOX1* diekspresikan oleh promotor *AOX1* yang sangat tergantung kepada regulasi dan induksi dari metanol yang terkandung dalam medium. Total protein yang dihasilkan dapat mencapai lebih dari 30% dari total protein terlarut ketika sel ditumbuhkan dalam medium yang mengandung metanol sebagai sumber karbon. Tingkat ekspresi dari *AOX1* diatur pada tingkat transkripsi (Zhang *dkk.* 2009: 1614).

Promotor alternatif yang dapat digunakan selain promotor *AOX* yaitu promotor *GAP*, *FLD1*, *PEX8*, dan *YPT7*. Promotor *GAP* merupakan promotor konstitutif yang tidak memerlukan induksi. Promotor *GAP* berasal dari gen yang mengkode *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) dan gen tersebut merupakan salah satu *housekeeping gene*. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) adalah enzim yang sangat diperlukan pada proses glikolisis. Enzim tersebut mengkatalis *glyceraldehyde-3-phosphate* menjadi *1,3 biphosphoglycerate*. Enzim *GAPDH* juga berperan pada beberapa proses non metabolisme seperti inisiasi apoptosis dan transportasi RNA *binding* protein dalam aktivasi transkripsi. Enzim *GAPDH* terdiri dari subunit tetramer yang identik (Thanonkeo *dkk.* 2010: 3242). Penggunaan promotor *GAP* dalam sistem ekspresi protein rekombinan pada *P. pastoris* dapat mengurangi biaya dan penggunaan metanol sebagai penginduksi promotor *AOX*. Sumber karbon yang dapat digunakan pada sistem ekspresi P_{GAP} adalah glukosa, gliserol, asam oleat, dan metanol (Zhang *dkk.* 2009: 1614).

Pichia pastoris mampu mengekspresikan protein heterolog secara ekstraseluler. Pada sel *P. pastoris*, sintesis dan transport protein terjadi di retikulum endoplasma kasar (RE kasar). Hasil transkripsi berupa mRNA terikat pada ribosom dan proses translasi dimulai. Bagian pertama protein yang dibuat adalah sinyal peptida. Sinyal peptida akan berikatan dengan *Signal Recognition*

Peptide (SRP). Ikatan tersebut menyebabkan proses translasi berhenti sementara. Hal tersebut terjadi untuk mencegah protein sekretori dikeluarkan terlalu awal ke sitosol. Kompleks ribosom-mRNA-SRP kemudian terikat dengan reseptor SRP, yaitu sebuah protein pada permukaan RE kasar, kemudian proses translasi berlanjut. Polipeptida yang terbentuk kemudian memasuki pori yang terbentuk pada membran RE. Saat polipeptida bergerak melewati pori, sinyal peptida dipotong oleh *signal peptidase* pada sisi lumen dari RE kasar. Protein masuk ke dalam lumen RE kasar untuk kemudian terjadi proses modifikasi translasi yaitu proses pelipatan protein dan glikosilasi. Retikulum endoplasma membentuk vesikel yang membawa protein tersebut ke badan golgi kompleks. Protein kemudian bergerak masuk ke dalam lumen golgi dan mengalami glikosilasi kembali. Pada bagian akhir, golgi akan membentuk vesikel untuk membawa protein ke membran plasma. Vesikel akan terintegrasi dengan membran plasma dan membebaskan protein ke luar sel (Nikaido dan Glazer 2007: 143). Keberhasilan sekresi protein heterolog dipengaruhi oleh adanya tahapan-tahapan, seperti *foldings*, ikatan disulfida, glikosilasi, transpor protein, dan proses pelepasan protein dari selnya (Bollok *dkk.* 2009: 194).

Glikosilasi merupakan proses modifikasi translasi yang umum terjadi sebelum protein disekresikan. Glikosilasi adalah penambahan gugus oligosakarida terhadap asam amino spesifik. Glikosilasi terjadi di RE kasar dan badan golgi. Proses glikosilasi memberikan stabilitas terhadap protein. Pada glikosilasi, terdapat penambahan *N-acetyl-galactosamine* atau *N-acetyl-glucosamine* yang berikatan dengan residu asam amino asparagin, serin, atau threonin diikuti dengan penambahan rantai oligosakarida (Daly dan Hearn 2005: 129) (Gambar 2.5.).



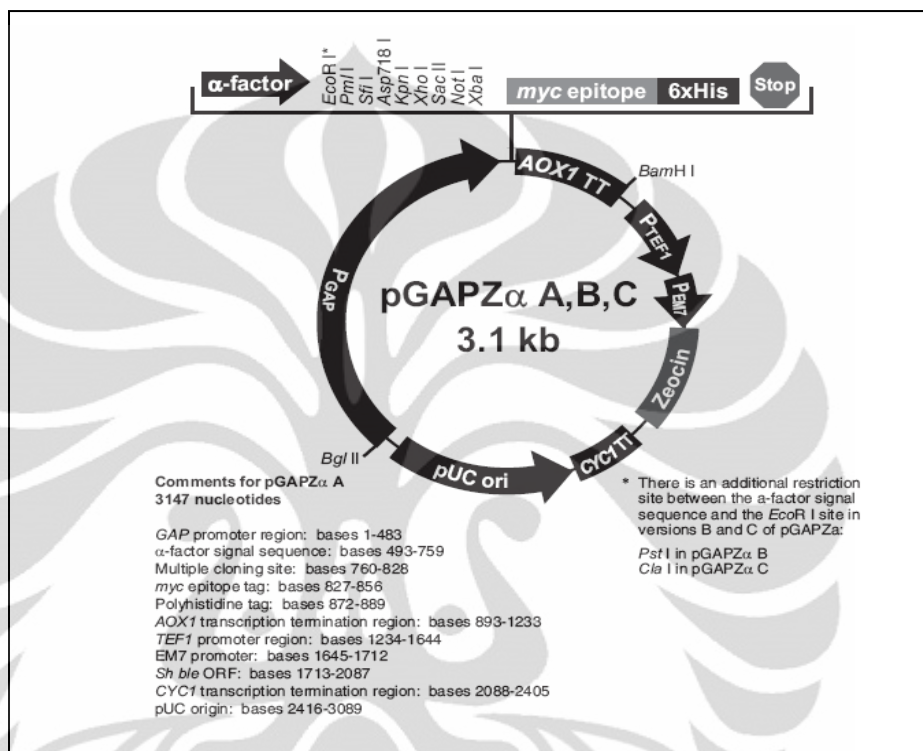
Gambar 2.5. Struktur glikosilasi
[Sumber: Daly dan Hearn 2005: 129.]

2.3.1 Vektor ekspresi pGAPZ α

Vektor ekspresi pGAPZ α adalah vektor yang menggunakan promotor GAP dari gen yang mengkode *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Vektor ekspresi pGAPZ α dapat digunakan untuk ekspresi protein rekombinan secara konstitutif pada *P. pastoris*. Vektor pGAPZ α dapat mengekspresikan protein tanpa menggunakan metanol dan lebih disukai untuk ekspresi skala besar. Penggunaan promotor GAP tidak disarankan jika produksi protein toksik terhadap khamir sebagai sel inang. Vektor pGAPZ α berukuran 3,1 kb, mengandung *myc* epitope untuk deteksi dan *polyhistidine tag* untuk purifikasi pada ujung-C. Vektor ekspresi pGAPZ α mengandung sinyal sekresi faktor α yang berfungsi untuk sekresi protein rekombinan. Gen *Sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus bleomycin*) pada vektor bersifat resisten terhadap antibiotik zeosin, sehingga dapat digunakan untuk seleksi vektor rekombinan. Vektor ekspresi pGAPZ α memiliki *multiple cloning site* (MCS) dengan situs restriksi yang unik. Vektor pGAPZ α juga memiliki promotor TEFI, promotor EM7, CYCI *transcription termination region*, dan pUC origin. Promotor TEFI berasal dari *S. cerevisiae* yang digunakan untuk mengekspresikan gen *Sh ble* pada *P. pastoris* sebagai gen resistensi zeosin. Promotor EM7 merupakan promotor konstitutif mengekspresikan gen *Sh ble* pada *E. coli* sebagai gen resistensi zeosin, serta CYCI

Universitas Indonesia

transcription termination region berasal dari *S. cerevisiae* yang berfungsi untuk meningkatkan stabilitas gen *Sh ble*. *Origin* pUC merupakan situs replikasi plasmid pada *E. coli* (Invitrogen 2008: 33). Gambar vektor ekspresi pGAPZ α dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Vektor ekspresi pGAPZ α

[Sumber: Invitrogen 2008: 32.]

Waterham *dkk.* (1997: 37) melaporkan produksi β lactamase lebih efisien menggunakan promotor GAP pada medium yang mengandung glukosa. Namun demikian, terdapat beberapa ekspresi protein yang lebih tinggi menggunakan promotor AOX dibandingkan dengan promotor GAP. Sears *dkk.* (1998: 783) melaporkan ekspresi gen yang mengkode *bacterial b-glucuronidase* (GUS) dengan promotor AOX pada medium metanol lebih tinggi dibandingkan dengan promotor GAP pada medium glukosa. Vassileva *dkk.* (2001: 21) melaporkan bahwa peningkatan jumlah salinan gen dapat meningkatkan ekspresi protein rekombinan dengan promotor GAP konstitutif.

2.4 Penapisan Klon Hasil Transformasi

Penapisan adalah metode seleksi klon yang membawa molekul DNA target dengan klon yang tidak membawa DNA target. Pada dasarnya ada tiga kemungkinan yang dapat terjadi setelah transformasi dilakukan, yaitu sel inang tidak dimasuki DNA apa pun atau berarti transformasi gagal, sel inang dimasuki vektor religasi tanpa adanya fragmen DNA target atau berarti ligasi gagal, dan sel inang dimasuki vektor rekombinan yang mengandung fragmen DNA atau gen yang diinginkan. Marka gen resistensi terhadap antibiotik lebih sering digunakan dalam transformasi, karena banyak mikroorganisme eukariot ataupun prokariot yang sensitif terhadap konsentrasi tertentu inhibitor metabolik atau antibiotik. Gen resistensi tersebut umumnya mengkode suatu enzim yang mengakibatkan suatu antibiotik tidak aktif, sehingga transformasi gen tersebut ke sel yang sensitif akan mengubahnya menjadi sel yang resisten (Brooker 2005: 493).

Salah satu contoh antibiotik yang digunakan untuk seleksi klon transforman adalah zeosin. Zeosin merupakan antibiotik yang memiliki struktur mirip dengan *bleomycin* yang diisolasi dari *Streptomyces verticillus*. Zeosin terikat kepada logam Cu sehingga larutan zeosin berwarna biru. Mekanisme aksi zeosin di dalam sel hampir sama dengan antibiotik *bleomycin*. Zeosin akan masuk dalam sel dalam bentuk tidak aktif, kemudian akan berikatan dengan DNA sehingga zeosin dapat aktif bekerja. Ikatan zeosin dengan DNA menyebabkan terjadinya aktivitas pemotongan DNA sehingga terjadi kematian sel (Berdy 1980 dalam Invitrogen 2001: 55). Gen *Sh ble* (sebagai gen resisten zeosin) pada vektor rekombinan yang ditransformasikan mengkode protein yang dapat berikatan dengan antibiotik zeosin. Ikatan zeosin dengan protein tersebut dapat menyebabkan aktivitas perusakan molekul DNA terhambat sehingga sel transforman tidak akan mati (Drocourt *dkk.* 1990: 4009).

2.5 Beberapa Teknik Dasar Biologi Molekular

2.5.1 Isolasi DNA

Genom merupakan materi genetik yang dimiliki oleh suatu organisme termasuk gen penyandi maupun gen bukan penyandi. Isolasi DNA merupakan pemisahan molekul DNA dari komponen-komponen penyusun sel lain. Isolasi DNA genom merupakan tahapan awal yang dilakukan untuk mendapatkan DNA genom yang akan dianalisis. Isolasi DNA memiliki dua prinsip, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip kerja sentrifugasi berdasarkan gaya sentrifugasi dan perbedaan berat molekul (Wolfe 1993: 124; Campbell *dkk.* 2002: 115). Prinsip presipitasi adalah pengendapan DNA agar terpisah dari zat lain yang terdapat dalam sel (Boyer 1993: 455).

Tahapan pada isolasi DNA genom dari bakteri atau khamir meliputi sentrifugasi, inkubasi, presipitasi, elusi, pencucian dan pengeringan. Beberapa metode yang dapat digunakan untuk proses isolasi DNA genom yaitu metode *sodium dodecyl sulphate* (SDS), metode *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB), metode proteinase K, metode *bead vortexing* dan lisis sel secara mekanik (Cheng dan Jiang 2006: 55).

2.5.2 *Polymerase chain reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik biologi molekuler untuk memperbanyak atau amplifikasi fragmen DNA yang spesifik menjadi jutaan kalinya secara *in vitro*. Prinsip kerja dari PCR adalah reaksi enzimatik dari proses polimerisasi DNA untuk memperbanyak bagian-bagian spesifik DNA yang diinisiasi oleh pelekatan primer. Komponen-komponen yang digunakan pada proses PCR antara lain fragmen DNA sebagai cetakan, larutan dapar PCR, dNTP, *primer*, kation divalen, enzim DNA polimerase, dan akuabides. Setiap komponen memiliki fungsi yang penting dalam proses PCR (Leonard *dkk.* 1994: 116--126).

Siklus PCR terdiri atas tiga tahap, yaitu denaturasi, pelekatan (*annealing*), dan polimerisasi. Tahap denaturasi dilakukan pada suhu $\pm 94^{\circ}\text{C}$ selama 60 detik untuk memisahkan kedua untai DNA dan menghentikan semua reaksi enzimatik. Masing-masing untai tunggal kemudian akan menjadi cetakan bagi primer. Tahap *annealing* merupakan pelekatan primer. Proses tersebut membutuhkan waktu 60 detik. Suhu diturunkan menjadi $\pm 56^{\circ}\text{C}$ agar primer dapat melekat pada situs yang tepat pada DNA cetakan (*template*). Tahap polimerisasi merupakan pemanjangan primer menggunakan DNA untai tunggal sebagai cetakan. Suhu dinaikkan menjadi $\pm 72^{\circ}\text{C}$ agar terjadi sintesis untai baru oleh enzim DNA polimerase yang dimulai pada tiap primer. Proses tersebut membutuhkan waktu 90 detik (Klug dan Cummings 1994: 291 & 403).

2.5.3 Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu metode yang digunakan untuk memisahkan molekul-molekul organik (DNA, RNA, dan protein). Prinsip kerja elektroforesis adalah pemisahan molekul DNA, RNA, atau protein berdasarkan kecepatan migrasi tiap-tiap molekul dalam sebuah medan listrik (Fairbanks dan Andersen 1999: 278). Pada proses elektroforesis DNA akan menuju ke kutub positif karena molekul DNA memiliki muatan negatif. Keberhasilan dalam proses elektroforesis ditentukan oleh beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut adalah ukuran molekul DNA, konsentrasi gel, densitas muatan, bentuk DNA, konsentrasi DNA, pori-pori gel, voltase, dan larutan dapar elektroforesis (Wolfe 1995: 126--127).

Berdasarkan kemampuannya dalam memisahkan berbagai ukuran molekul, gel yang digunakan dalam proses elektroforesis ada dua, yaitu gel agarosa dan gel poliakrilamid. Agarosa merupakan polisakarida yang diekstrak dari rumput laut dan mempunyai ukuran pori-pori yang cukup besar. Gel agarosa mampu memisahkan molekul DNA dengan ukuran sekitar 50--20.000 pb. Penggunaan konsentrasi gel agarosa bervariasi bergantung dari besarnya molekul DNA yang ingin dianalisis. Semakin besar persentase konsentrasi agarosa maka

semakin kecil molekul DNA yang akan dipisahkan (Sambrook dan Russell 2001: 5.2).

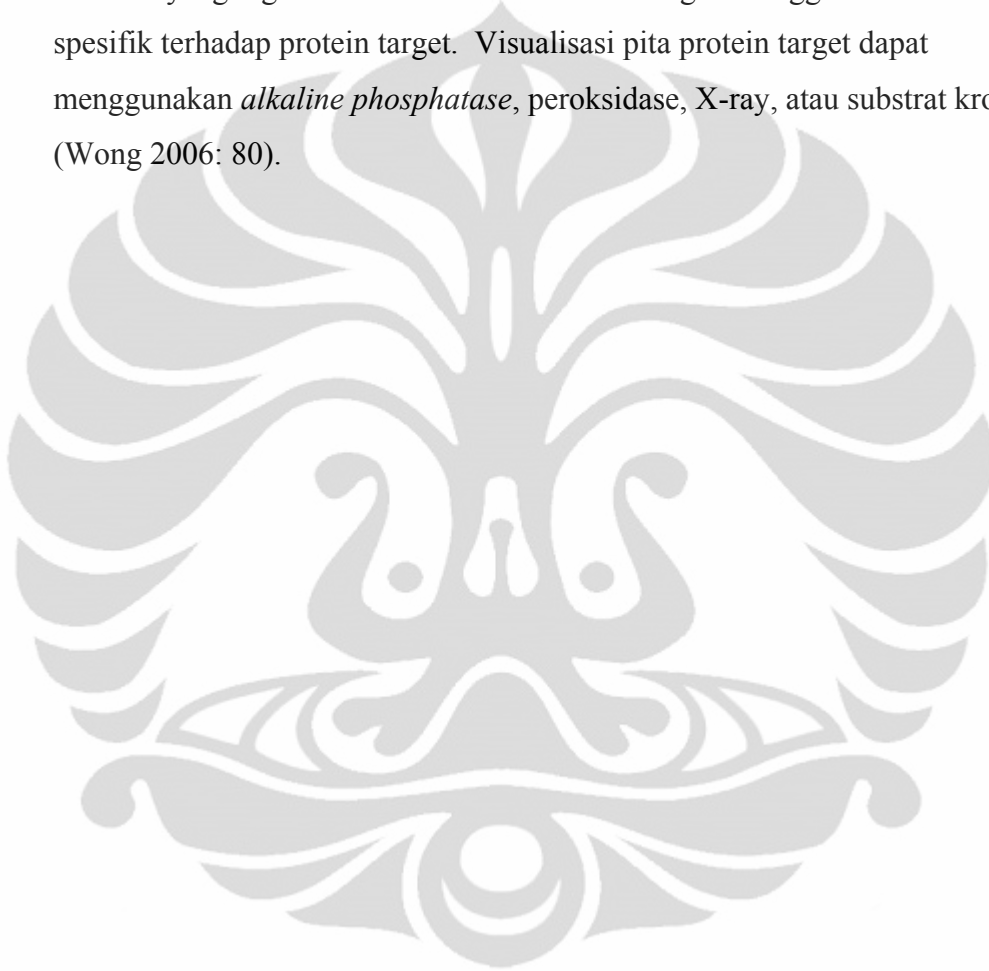
Poliakrilamid merupakan polimer dari akrilamid yang memiliki ukuran pori bervariasi tergantung dari konsentrasi akrilamid yang digunakan. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) adalah suatu metode elektroforesis gel poliakrilamid untuk protein dalam keadaan terdenaturasi. Metode SDS PAGE dapat dibagi menjadi dua berdasarkan gel dan larutan dapar yang digunakan, yaitu sistem kontinyu dan diskontinyu. Sistem kontinyu hanya menggunakan satu macam gel (*running gel*), serta menggunakan dapar yang sama untuk pembuatan gel dan proses elektroforesis. Sistem diskontinyu menggunakan dua jenis gel yang berbeda yaitu *stacking gel* dan *running gel*. Larutan dapar yang digunakan juga berbeda dalam pembuatan gel maupun proses elektroforesisnya. Faktor-faktor yang memengaruhi proses SDS PAGE adalah ukuran pori-pori gel, muatan yang dikandung dalam sampel, ukuran molekul, dan bentuk protein (Davis *dkk.* 1994: 151).

2.5.4 Slot Blot dan Western blotting

Teknik protein *blotting* telah banyak digunakan pada penelitian bidang molekular. Protein *blotting* digunakan untuk mendeteksi jumlah protein sampel atau keberhasilan ekspresi protein. Teknik protein *blotting* yang sederhana dikenal dengan teknik *slot blot*. *Slot blot* menggunakan filtrasi vakum untuk mentransfer protein ke membran. Teknik *slot blot* akan memberikan informasi kualitatif mengenai jumlah total ekspresi protein, tetapi tidak dapat memberikan informasi mengenai berat molekul protein (Millipore 2011: 1).

Western blotting adalah suatu teknik yang dapat mendeteksi keberadaan protein dengan menggunakan antibodi spesifik. *Western blotting* dapat memberikan informasi mengenai berat molekul dan kualitas protein yang terdapat di dalam sampel. Langkah pertama yang dilakukan adalah memisahkan protein melalui elektroforesis SDS PAGE. Protein pada gel elektroforesis tersebut kemudian ditransfer ke permukaan suatu membran, dapat berupa membran

nitroselulosa atau PVDF. Protein pada gel dan membran diletakkan pada alat *western blotting* yang dialirkan listrik. Protein yang telah ditransfer dari gel ke membran nitroselulosa kemudian diinkubasi dengan larutan *blocking* (seperti larutan susu bebas lemak). Pemberian larutan *blocking* berguna untuk menutupi seluruh permukaan membran dan mencegah pengikatan tidak spesifik dari antibodi yang digunakan. Deteksi dilakukan dengan menggunakan antibodi yang spesifik terhadap protein target. Visualisasi pita protein target dapat menggunakan *alkaline phosphatase*, peroksidase, X-ray, atau substrat kromogenik (Wong 2006: 80).



BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Rekayasa Bioproses dan Protein, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong, Bogor. Penelitian berlangsung selama enam bulan (Desember 2010--Mei 2011).

3.2 Bahan

3.2.1 Mikroorganisme, plasmid DNA dan sumber gen *CSF3syn*

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian adalah *P. pastoris* GS115 hasil transformasi yang mengandung vektor rekombinan pGAPZ α pembawa gen *CSF3syn* (pGAPZ α -CSF3) dan *P. pastoris* GS115 yang tidak mengandung vektor rekombinan (bukan transforman). *Pichia pastoris* GS115 dan plasmid pGAPZ α yang digunakan dari Invitrogen. Konstruksi plasmid rekombinan pGAPZ α -CSF3 dan transformasi pada *P. pastoris* GS115 telah dilakukan pada penelitian sebelumnya di Laboratorium Rekayasa Bioproses dan Protein, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong. Gen sintetik *CSF3syn* berasal dari plasmid pTZ-CSF3syn(ye) yang telah dikonstruksi pada penelitian terdahulu dan merupakan koleksi dari Laboratorium Rekayasa Bioproses dan Protein, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong.

3.2.2 Medium tumbuh

Medium tumbuh yang digunakan antara lain medium YEPD cair (*yeast extract peptone dextrose*), YEPD agar, YEPDS agar (*yeast extract peptone dextrose sorbitol*), YEPDZ (YPD + zeosin) cair atau padat.

3.2.3 Bahan kimia

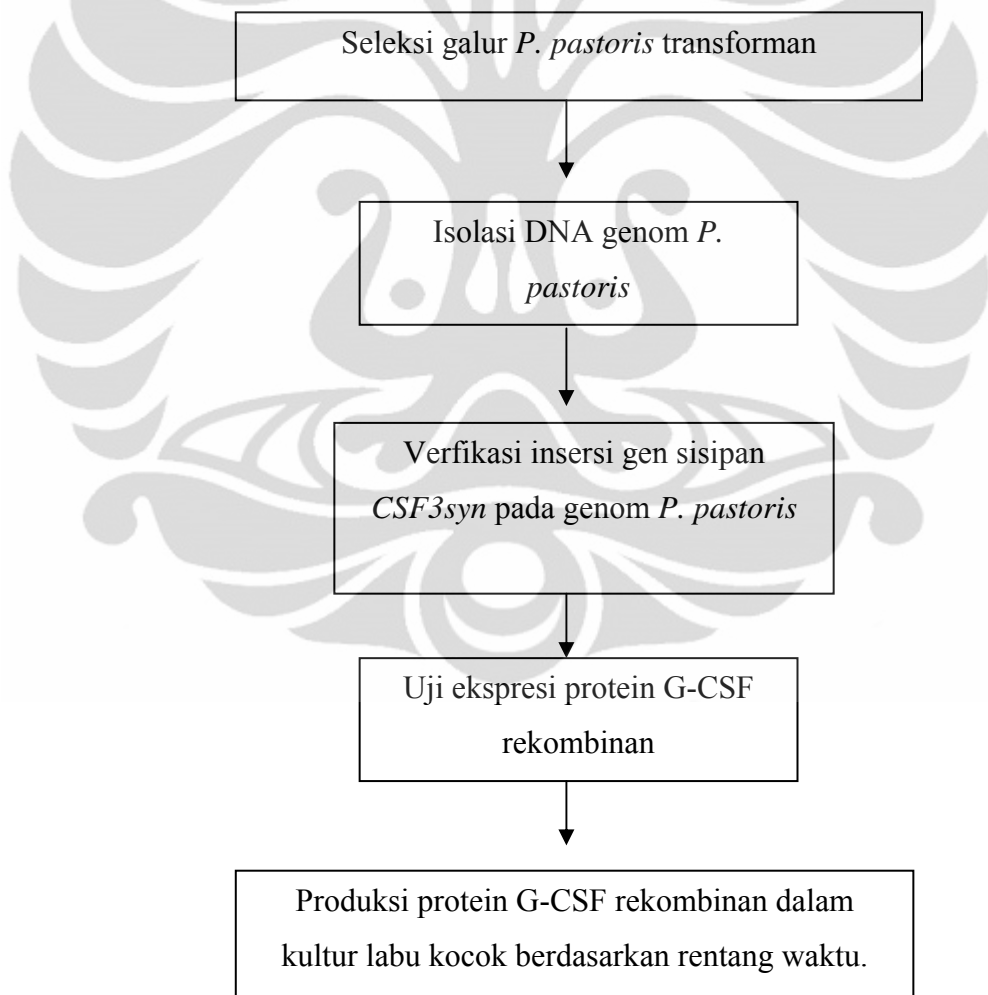
Bahan-bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini yaitu: *yeast extract* [Pronadisa], D (+) glukosa [Merck], zeosin [Invitrogen], pepton [Himedia], ampicilin [Invitrogen], triton X-100 [Merck], NaCl [AppliChem], sorbitol [Difco], proteinase K, kloroform [Sigma], *washed glass bead* [Sigma], EDTA [BDH], isopropanol [Merck], etanol absolut [Merck], ammonium asetat 7 M pH 7, tris [Merck], RNase [Promega], akuades, 10 mM dNTPs [Fermentas], 5x KAPA 2G dapar A dengan MgCl [Fermentas], enzim *Taq polymerase* 5u/μl [KAPA], bubuk agarosa [Bio Basic Inc.], etidium bromida (EtBr) [Promega], *Bromophenol blue* [Pharmacia], *loading dye* 6x, marka DNA 1 kb [Fermentas], *sodium dodecyl sulphate* (SDS) [Promega], Ammonium persulfat 10% (APS) [Promega], akrilamid 30% [Promega], TEMED [Bio Rad], *coomassie brilliant blue* [Pharmacia], marka *prestained protein low range* [BioRad], asam asetat glasial (CH₃COOH) [Merck], metanol [Merck], Tris *base* [Promega], glisin [Sigma], dithiothreitol (DTT) [BioRad], 2-merkaptotanol [Merck], gliserol [Merck], *rabbit anti-hG-CSF IgG FL207* [Santa Cruz], *goat anti-rabbit IgG – Alkaline Phosphatase conjugate* [Promega], natrium hidroksi (NaOH), susu *non fat* [Tropicana Slim], NaCl [Merck], HCl 1N [Merck], Tween 20 [Merck], *Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase* [Promega], primer CSF3ye *Forward* (5'- AGGCCAGCTTCTTCTTTGC -3') [First Base], dan primer CSF3ye *Reverse* (5'-GTCTGACTGCTTGAGCCAAATGTCTCAAACACTCT-3') [First Base].

3.3 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian, antara lain pipet mikro [Witopet], kawat ose, timbangan digital [Precisa], *magnetic stirrer*, *stir plate* [Amicon], *hot plate stirrer* [Spin Bar], autoklaf [Iwaki], *microwave*, *laminar air flow cabinet* [Esco], mesin sentrifugasi [Heraeus], lemari pendingin [Modera], *incubator shaker* [Heraeus], *ice maker* [Scotsman], spektrofotometer [Beckman], kuvet *disposable*, cawan petri *disposable* [Pyrex], filter 0,22 Vm [Millex], spatula, labu Erlenmeyer 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml [Pyrex], gelas ukur 100 ml

[Duran], tabung reaksi [Pyrex], apparatus elektroforesis gel agarosa [Mupid®_exu advance], tabung mikro 1,5 ml [MCT], vorteks [Thermolyne], kamera digital [Canon Powershot A480], pH meter [Thermo Orion 410 A+], bunsen, apparatus elektroforesis SDS PAGE [BIO RAD], *thermal cycler* 2720 [Applied Biosystem], membran nitroselulosa, apparatus western blot [BioRad], cold room, *freezer* -20° C [Scotman], termometer [Yenaco], *moisture balance analysis* [Precisa HA 300], PR 648 *Slot Blot Manifold* [GE Healthcare] dan peralatan laboratorium yang digunakan di Laboratorium Genetika.

3.4 Cara Kerja



3.4.1 Pembuatan medium, larutan, dan dapar

Pengerjaan kultur mikroba dilakukan secara aseptik dalam *laminar air flow* yang telah disinari UV selama 15 menit. Metode aseptik juga dapat dilakukan di tempat terbuka dengan terlebih dahulu mensterilkan area dengan menyemprotkan alkohol 70% di permukaan alas dan melakukan pengerjaan pada jarak 20 cm dari nyala api bunsen berdasarkan Teamwork microbiology Edc. (2005: 6--7).

Komposisi dan pembuatan medium, larutan dan dapar yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.4.2 Seleksi klon *P. pastoris* transforman

Seleksi transforman dilakukan berdasarkan protokol dari Invitrogen (2008: 18) dengan menggunakan medium seleksi YEPDS agar yang mengandung zeosin 100 µg/ml (YEPDSZ100). Sebanyak 50 µl suspensi sel khamir hasil transformasi disebar pada medium seleksi YEPDS agar yang mengandung zeosin 100 µg/ml dan diratakan dengan *spatel Drygalski*. Tepi cawan petri ditutup dengan plastik *clingwrap*. Kultur tersebut diinkubasi pada suhu 30° C selama 2--3 hari. Koloni yang tumbuh pada medium seleksi (diduga mengandung plasmid rekombinan) diamati dan dihitung.

Untuk menguji stabilitas genetik plasmid rekombinan, koloni yang tumbuh dalam medium seleksi YEPDSZ tersebut ditumbuhkan kembali pada medium YEPD padat yang mengandung zeosin (YEPDZ) dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari medium seleksi sebelumnya. Koloni tunggal yang terbentuk pada medium seleksi YEPDS agar+ zeosin 100 µg/ml (YEPDSZ100) ditumbuhkan pada medium YEPD padat yang mengandung zeosin 200 µg/ml (YEPDZ200) dengan cara digores. Koloni yang tumbuh adalah klon khamir transforman yang stabil, diamati dan dihitung. Koloni yang tumbuh kemudian ditumbuhkan kembali pada medium YEPD padat yang mengandung zeosin 1000 µg/ml (YEPDZ1000). Koloni yang tumbuh diamati dan dihitung.

3.4.3 Pengamatan morfologi *P. pastoris* secara makroskopik

Pembuatan kultur untuk pengamatan morfologi *P. pastoris* secara makroskopik pada medium padat dilakukan menggunakan medium YEPD miring. Sel khamir diinokulasikan dengan digores ke dalam medium kemudian diinkubasi pada suhu 30° C selama 48 jam. Karakteristik morfologi koloni khamir yang diamati secara makroskopik pada medium padat antara lain tekstur, warna, penampakan permukaan, profil, dan tepi koloni.

3.4.4 Pengamatan morfologi *P. pastoris* secara mikroskopik

Pembuatan kultur untuk pengamatan morfologi *P. pastoris* secara mikroskopik pada medium cair menggunakan medium YEPD. Sebanyak satu ose koloni khamir diinokulasikan ke dalam medium cair kemudian diinkubasi pada suhu 30° C selama 48 jam. Sebanyak satu ose biakan khamir diambil dan diletakkan di atas gelas obyek kemudian ditutup dengan kaca obyek. Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10 X 100 dengan bantuan minyak imersi. Karakteristik yang diamati antara lain bentuk sel, keberadaan miselium palsu, dan tipe pertunasan.

3.4.5 Subkultur

Koloni *P. pastoris* transforman yang tumbuh pada medium seleksi dengan konsentrasi zeosin 1000 µg/ml dikultur terlebih dahulu pada medium YEPD agar miring sebagai *stock culture* dalam tabung reaksi. *Stock culture P. pastoris* transforman kemudian disubkultur terlebih dahulu pada medium YEPD agar miring dalam tabung reaksi. Subkultur dilakukan untuk mengantisipasi rusaknya *stock culture* akibat adanya kontaminasi.

3.4.6 Isolasi DNA genom *P. pastoris*

Isolasi DNA genom *P. pastoris* transforman dilakukan berdasarkan Melo *dkk.* (2006: 852) dan labsfhr (2010: 1). Tujuan isolasi DNA genom *P. pastoris* untuk mendapatkan DNA genom dari beberapa klon *P. pastoris* transforman yang diduga mengandung gen *CSF3 syn*. Klon khamir transforman yang digunakan adalah klon nomor 1, 2, 3, 4, 5, 7 yang tumbuh pada medium YEPD padat yang mengandung zeosin 1000 µg/ml. Satu ose koloni tunggal khamir transforman diinokulasikan ke dalam 1 ml medium YEPD cair yang mengandung ampisilin 25 µg/ml (sebagai antibiotik pencegah kontaminasi bakteri) dan zeosin 100 µg/ml, kemudian diinkubasi pada suhu 30° C selama satu malam. Keesokan harinya sebanyak 1 ml inokulum dimasukkan ke dalam 20 ml medium YEPD cair yang mengandung ampisilin 25 µg/ml dan diinkubasi selama satu malam. Kultur disentrifugasi dengan kecepatan 1500--3000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet sel diresuspensi dengan 1 ml dH₂O steril untuk pencucian. Kultur disentrifugasi kembali dengan kecepatan 1500--3000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet sel diresuspensi dengan larutan lisis. Ke dalam suspensi sel tersebut ditambahkan 1 µl proteinase K dan *glass bead* seujung spatula, kemudian suspensi sel *divortex* selama 6 menit. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Fase air diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml yang baru. Sebanyak 275 µl larutan 7 M ammonium asetat pH 7 ditambahkan ke dalamnya. Fase air tersebut diinkubasi selama 5 menit pada suhu 65° C dan 5 menit di dalam es. Sebanyak 500 µl larutan kloroform ditambahkan ke dalamnya, kemudian *divortex* dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml kemudian dipresipitasi dengan 1 ml isopropanol. Campuran tersebut diinkubasi selama 5 menit dalam suhu kamar dan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet (DNA) yang terendapkan dicuci dengan etanol 70% dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 7

menit. Pelet DNA dikering-anginkan sampai etanol hilang dan endapan DNA diresuspensi dengan 30 μ l larutan TE. Pelet tersebut merupakan DNA genom yang selanjutnya dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa. Genom digunakan sebagai cetakan DNA pada analisis insersi gen target dengan teknik PCR.

3.4.7 Verifikasi insersi gen *CSF3syn* pada DNA genom *P. pastoris* transforman

Optimasi suhu *annealing* dilakukan terlebih dahulu untuk reaksi PCR menggunakan DNA genom khamir transforman. Optimasi dilakukan terhadap DNA genom salah satu klon khamir transforman menggunakan primer *CSF3synR* (5'-GTCGACTGCTTGAGCCAAATGTCTCAA AACTCT-3') dan *CSF3synF* (5'-AGGCCAGCTTCTTCTTTGC-3'). Suhu *annealing* yang digunakan beragam, yaitu 50,2° C; 53,2° C; 55,6° C; 58° C; dan 60° C. Kondisi PCR yang dilakukan adalah denaturasi awal pada suhu 95° C selama 5 menit. Selanjutnya siklus PCR dilakukan sebanyak 30 kali dimulai dengan denaturasi pada suhu 95° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu yang beragam selama 1 menit, polimerasi awal pada suhu 72° C selama 1 menit, siklus PCR dilanjutkan dengan tahap polimerasi akhir pada suhu 72° C selama 5 menit dan penurunan suhu menjadi 4° C.

Komponen dan volume reaksi PCR yang dilakukan dapat dilihat pada Tabel 3.1. Contoh DNA genom khamir non transforman digunakan sebagai kontrol negatif dalam reaksi PCR, sedangkan plasmid rekombinan pGAPZ α -CSF3ye digunakan sebagai kontrol positif reaksi. Semua komponen reaksi dimasukkan ke dalam tabung PCR 200 μ l. Campuran dihomogenkan dengan *tapping* kemudian dimasukkan dalam mesin *thermal cycle*. Selanjutnya produk PCR diperiksa dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Tegangan listrik yang digunakan sebesar 70 V selama \pm 1 jam. Penentuan suhu *annealing* yang optimum ditentukan berdasarkan kualitas pita DNA hasil produk PCR yang diperoleh.

Setelah suhu optimum *annealing* diperoleh, analisis insersi gen target dilakukan kembali terhadap contoh DNA genom dari 6 klon khamir transforman lainnya. Pita DNA dari gen target yang diharapkan adalah berukuran 567 pb.

Tabel 3.1. Komponen dan volume reaksi PCR yang digunakan

Bahan	[Final]	Volume (μ l)
10x Kappa 2G <i>buffer A with MgCl₂</i>	1x	2,5
25mM dNTPs	0,2 mM	0,2
20 μ M primer CSF3ye <i>Forward</i>	0,2 μ M	0,25
20 μ M primer CSF3ye <i>Reverse</i>	0,2 μ M	0,25
0,5 unit <i>KAPA Taq</i> polimerase	0,5 u/ μ l	1
DNA genom	-	1
dH ₂ O	-	19,8
Total	-	25

3.4.8 Elektroforesis gel agarosa

Elektroforesis gel agarosa dilakukan berdasarkan metode Sambrook dan Russell (2001: 5.10--5.13). Elektroforesis dilakukan terhadap contoh DNA genom *P. pastoris* transforman hasil isolasi dan produk PCR dari beberapa klon *P. pastoris* transforman. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan adalah 1%.

Gel agarosa 1% dibuat dengan melarutkan 1 g agarosa ke dalam 100 ml larutan 0,5X TAE dalam botol, kemudian dipanaskan di dalam *microwave* sampai terlarut. Setelah suhu turun mencapai sekitar 45° C larutan tersebut dituang ke dalam cetakan yang sudah disiapkan. Cetakan sumur diangkat setelah gel mengeras, kemudian gel diletakkan di dalam *electrophoresis chamber* dan direndam dengan larutan 0,5X TAE *buffer*. Cetakan DNA (5 μ l DNA genom atau 15 μ l produk PCR) ditambah dengan *loading dye* 6x, dihomogenkan dengan mikropipet sebelum dimasukkan ke dalam sumur. Sebanyak 1 μ l marka DNA (1 kb) ditambah dengan *loading dye* 6x, kemudian dimasukkan ke dalam sumur. *Electrophoresis chamber* dihubungkan pada sumber listrik dengan tegangan 70

volt dan elektroforesis berlangsung selama 45 menit. Gel kemudian dinkubasi dalam larutan 0,5 µl/ml etidium bromida (EtBr) selama 30 menit. Gel diamati di UV *transilluminator*. Sinar UV akan memendarkan pita DNA.

3.4.9 Uji ekspresi protein G-CSF rekombinan dalam skala kecil

Pengujian ekspresi protein G-CSF rekombinan dalam skala kecil dilakukan berdasarkan protokol dari Invitrogen (2008: 19). Beberapa klon transforman digunakan dalam uji ini, yaitu klon nomor 1, 2, 3, 4, 5, dan 7. Sebanyak satu ose koloni khamir transforman ditumbuhkan dalam 1 ml medium YEPD yang mengandung ampisilin 25 ug/ml (untuk mencegah kontaminasi bakteri) dan zeosin 100 ug/ml. Galur *P. pastoris* GS115 non transforman yang digunakan sebagai kontrol negatif ditumbuhkan dalam 1 ml medium YPD cair yang hanya mengandung tanpa zeosin. Kultur diinkubasi pada suhu 30° C selama satu malam dengan agitasi 200 rpm. Inokulum tersebut dimasukkan ke dalam 4 ml medium YEPD mengandung ampisilin 25 ug/ml dan diinkubasi pada suhu 30° C selama 48 jam dengan agitasi 200 rpm. Selanjutnya kultur tersebut dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Supernatan dipisahkan dari biomassa sel dalam tabung yang lain dan disimpan pada suhu 4° C untuk analisis lebih lanjut dengan SDS PAGE dan *western blotting*.

3.4.10 Produksi protein G-CSF rekombinan dalam kultur labu kocok berdasarkan rentang waktu

Ekspresi protein G-CSF rekombinan dalam kultur labu kocok dilakukan berdasarkan protokol Invitrogen (2008: 19) untuk menentukan waktu optimal produksi protein rekombinan. Sebanyak satu ose koloni khamir transforman ditumbuhkan dalam 5 ml medium YEPD cair yang mengandung ampisilin 25 ug/ml dan zeosin 100 ug/ml. Sementara itu satu ose koloni khamir non transforman ditumbuhkan dalam 5 ml medium YEPD mengandung ampisilin

25 ug/ml tanpa zeosin. Kultur diinkubasi pada suhu 30° C selama satu malam dengan agitasi (200 rpm). Inokulum tersebut kemudian dimasukkan ke dalam 20 ml medium YEPD mengandung ampisilin 25 ug/ml dan diinkubasi pada suhu 30° C selama satu malam dengan agitasi (200 rpm). Sebanyak 25 ml inokulum tersebut dimasukkan ke dalam 125 ml medium YEPD mengandung ampisilin 25 ug/ml. Pengambilan contoh 1,5 ml (*sampling*) dilakukan pada jam ke- 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, dan 72. Pada setiap waktu pengambilan contoh dilakukan pengukuran densitas sel dari kultur dan pengukuran dilakukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 600nm (OD₆₀₀). Contoh kultur disentrifugasi dan cairan kultur (supernatan) disimpan (-20° C) untuk analisis lebih lanjut dengan SDS PAGE dan *western blotting*.

Pengukuran berat kering biomassa sel (DCW, *dry cell weight*) dilakukan menggunakan alat *moisture balance* dengan suhu 60° C. Data absorbansi (OD₆₀₀) yang diperoleh selanjutnya dapat dikonversi ke dalam besaran DCW yang diolah dengan metode grafis dan dijelaskan secara deskriptif.

3.4.11 Pemekatan protein dengan metode presipitasi menggunakan larutan TCA (*Trichloroacetic acid*)

Presipitasi protein dilakukan untuk memekatkan protein yang terdapat pada contoh supernatan. Presipitasi protein menggunakan larutan TCA dilakukan berdasarkan prosedur dari Sanchez (2001:1). Sebanyak 1 ml supernatan dicampurkan dengan 250 µl larutan TCA 100%. Campuran tersebut diinkubasi selama 10 menit pada suhu 4° C. Selanjutnya campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Supernatan dibuang sedangkan protein akan terpresipitasi membentuk pelet. Pelet dicuci menggunakan aseton dingin sebanyak 200µl untuk menghilangkan larutan TCA yang tersisa dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4° C. Aseton dibuang sedangkan pelet protein dikering-anginkan pada suhu ruang untuk menguapkan aseton yang tersisa. Pelet protein digunakan sebagai sampel protein yang akan dianalisis menggunakan SDS PAGE, *slot blot*, dan *western blot*.

3.4.12 Analisis elektroforesis gel protein rekombinan

Analisis dan visualisasi protein G-CSF rekombinan hasil ekspresi dilakukan dengan metode SDS PAGE berdasarkan Ausubel (2002: 10.14--10.18). Cara kerja SDS PAGE diawali dengan pembuatan gel (*separating gel* dan *stacking gel*). Pembuatan *separating gel* dan *stacking gel* sesuai prosedur (Lampiran 2).

Sebanyak 1 ml contoh supernatan dipresipitasi menggunakan larutan TCA 100% dengan perbandingan contoh dan larutan TCA adalah 4:1. Selanjutnya presipitat protein diresuspensi dengan 30 μ l 4X *sample buffer* dalam tabung mikro 1,5 ml. Campuran tersebut dipanaskan pada suhu 95° C selama 5 menit lalu disentrifugasi selama 5 detik untuk menurunkan uap. Masing-masing contoh sebanyak 15 μ l dan marka protein sebanyak 5 μ l dimasukkan ke dalam sumur. Kontrol positif yang digunakan adalah filgrastim sebanyak 5 μ l. Kabel elektroda dipasangkan dengan perangkat elektroforesis kemudian gel diberi tegangan 90 V selama 120 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, gel diangkat lalu direndam dalam larutan pewarna dan *fixing (staining solution)* (Lampiran 1) selama satu malam. Kemudian gel dibilas dengan *destaining solution 1* (Lampiran 1) selama 1 sampai 2 jam dan dilanjut dengan *destaining solution 2* (Lampiran 1) selama 30 sampai 60 menit.

3.4.13 Analisis *western blotting* protein rekombinan

Metode kerja analisis *western blotting* secara umum berdasarkan Ausubel *dkk.* (1992: 10.45--10.51). Semua contoh protein rekombinan yang akan dianalisis dengan *western blotting*, dielektroforesis terlebih dahulu menggunakan metode SDS PAGE. Selanjutnya protein pada gel hasil elektroforesis dipindahkan ke dalam membran nitroselulosa yang sebelumnya telah dibasahi *electrotransfer buffer* (Lampiran 1). Gel ditempatkan pada sisi katode yang sebelumnya dilapisi kertas saring dan busa kemudian membran nitroselulosa diletakkan di atasnya dalam posisi sejajar. Semua gelembung udara harus

dihilangkan. Membran ditutup dengan kertas saring dan busa, dan berada di sisi anode. *Sandwich* yang terbentuk dan larutan *electrotransfer buffer* dimasukkan ke dalam tangki *electroblotting*. Elektrotransfer dilakukan pada tegangan konstan 90 volt selama 90 menit dalam kondisi dingin (balok es ditempatkan di dalam tangki dan di luar tangki). Setelah proses transfer selesai, membran direndam dalam *blocking solution* (Lampiran 1) selama 60 menit. Kemudian membran dicuci dengan *washing solution* (Lampiran 1) sebanyak 3 kali (15 menit; 5 menit; 5 menit). Selanjutnya membran direndam dan digoyang dalam larutan antibodi primer, yaitu *rabbit anti-hG-CSF IgG FL207* yang dimasukkan ke dalam larutan *blocking* dengan perbandingan 1 : 3500 selama 60 menit dan dicuci seperti sebelumnya. Selanjutnya membran direndam dan digoyang dalam larutan antibodi sekunder, *goat anti-rabbit IgG – Alkaline Phosphatase conjugate*, yang dimasukkan ke dalam larutan *blocking* dengan perbandingan 1 : 3500 selama 60 menit yang dilanjutkan dengan pencucian seperti sebelumnya. Pita protein target (G-CSF rekombinan) divisualisasi dengan merendam membran dalam larutan substrat untuk *alkaline phosphatase*, yaitu *Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline PhosphataseTM*.

3.4.14 Deteksi protein G-CSF rekombinan menggunakan metode *Slot blot*

Metode *slot blot* dapat digunakan untuk mendeteksi total contoh protein rekombinan secara semi-kuantitatif. Prosedur kerja *slot blot* dilakukan berdasarkan Amersham Biosciences (2011: 6). Apparatus *slot blot* dan membran nitroselulosa dipasang dan dihubungkan dengan pompa vakum. Sebanyak 25 µl contoh larutan protein yang sudah diresuspensi dengan dapar TBS dimasukkan ke dalam sumur dari alat *slot blot*. Pompa vakum dinyalakan supaya contoh protein tertransfer ke membran nitroselulosa. Pompa vakum dimatikan jika semua sampel sudah dimasukkan. Membran yang sudah ditransfer direndam dan digoyang dalam *blocking solution* (Lampiran 1) selama 60 menit. Membran dicuci dengan *washing solution* (Lampiran 1) sebanyak 3 kali (15 menit; 5 menit; 5 menit). Membran direndam dan digoyang dalam larutan antibodi primer yang dimasukkan ke dalam larutan *blocking* dengan perbandingan 1 : 3500 selama 60 menit dan

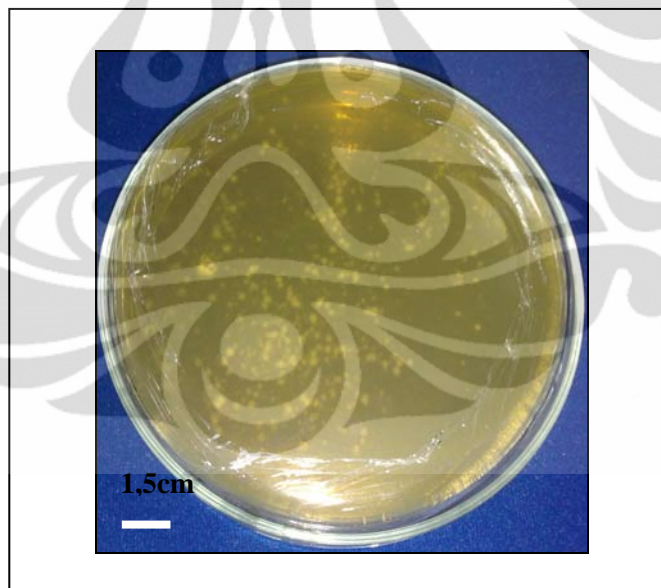
dicuci seperti sebelumnya. Membran direndam dan digoyang dalam antibodi sekunder yang dimasukkan ke dalam larutan *blocking* dengan perbandingan 1 : 3500 selama 60 menit yang dilanjutkan dengan pencucian seperti sebelumnya. Pita protein divisualisasi dengan merendam membran dalam larutan *Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase*. Senyawa antibodi primer dan antibodi sekunder sama seperti yang digunakan pada analisis *western blotting*.



BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Seleksi Klon *P. pastoris* Transforman

Transformasi telah dilakukan menggunakan 1,26 µg plasmid DNA yang telah dipotong terlebih dahulu dengan enzim restriksi *Bsp*HI. Transformasi vektor rekombinan (pGAPZα_CSF3ye) dalam *P. pastoris* menghasilkan tumbuhnya 524 koloni pada medium selektif YEPDS yang mengandung zeosin 100 µg/ml (Gambar 4.1). Efisiensi transformasi yang diperoleh sebesar $4,9 \times 10^3$ cfu/µg plasmid DNA (Lampiran 3). Hasil transformasi menunjukkan bahwa efisiensi transformasi yang diperoleh masih berada dalam kisaran efisiensi transformasi yang cukup tinggi. Menurut Invitrogen (2001: 22), efisiensi transformasi dengan teknik elektroporasi berada pada kisaran 10^3 -- 10^4 transforman/µg plasmid DNA.



Gambar 4.1. Koloni sel *P. pastoris* hasil transformasi dengan vektor rekombinan pada medium seleksi YEPDS dengan zeosin 100 µg/ml

Koloni yang tumbuh adalah koloni yang diduga membawa vektor rekombinan karena koloni-koloni tersebut resisten terhadap zeosin. Berdasarkan Invitrogen (2001: 55), vektor pGAPZα memiliki gen *Sh ble*. Menurut Drocourt

dkk. (1990: 4009), gen *Sh ble* (gen *bleomycin* dari *Streptoalloteichus hindustanus*) pada vektor mengkode suatu protein (13,7 kDa) yang dapat berikatan dengan antibiotik zeosin dan menghambat kerja zeosin. Ikatan zeosin dengan protein tersebut dapat menyebabkan aktivitas perusakan molekul DNA terhambat sehingga sel transforman tidak akan mati. Mulsant *dkk.*(1988: 244) dan Drocourt *dkk.* (1990: 4009) melaporkan bahwa ekspresi gen *Sh ble* membuat sel mamalia, tanaman, khamir dan prokariot resisten terhadap zeosin.

Hasil seleksi selanjutnya menunjukkan bahwa dari 90 koloni transforman yang telah diperoleh dan diuji kembali pada medium selektif antibiotik zeosin 200 µg/ml, hanya 77 koloni transforman yang tumbuh (Tabel 4.1.). Dengan demikian persentase koloni transforman yang stabil adalah sekitar 85% dari 90 koloni transforman yang diuji (Tabel 4.1.). Sebagian koloni hasil transformasi yang tidak mampu tumbuh kembali dalam medium seleksi mengandung zeosin 200 µg/ml diduga merupakan transforman palsu yang hanya menunjukkan ekspresi sesaat (*transient expression*). Transformasi pada *P. pastoris* dengan menggunakan vektor pGAPZα berlangsung melalui proses yang disebut rekombinasi homolog. Transformasi yang sesungguhnya hanya terjadi bila vektor rekombinan tersebut telah terintegrasi ke dalam genom dari *P. pastoris*. Hasil pengamatan (Gambar 4.2 A) merupakan koloni transforman yang tumbuh pada medium selektif antibiotik zeosin 200 µg/ml. Hasil pengamatan (Gambar 4.2 B) menunjukkan koloni transforman yang ditumbuhkan pada medium YEPD tanpa zeosin yang digunakan sebagai kontrol.

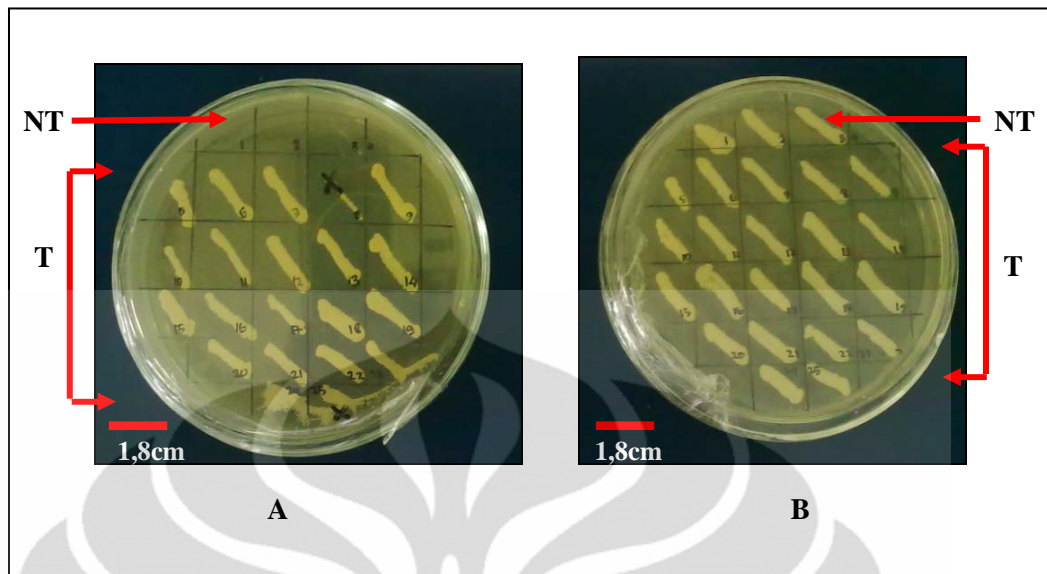
Hasil pengamatan menunjukkan 47 koloni transforman tumbuh dari 49 koloni transforman yang diuji pada medium selektif antibiotik zeosin 1000 µg/ml (Gambar 4.3.A). Dengan demikian hampir 96% dari jumlah koloni transforman yang diujikan (49 koloni) mampu tumbuh dengan baik pada kandungan zeosin yang jauh lebih tinggi (Tabel 4.1.). Koloni transforman yang tumbuh pada medium selektif antibiotik zeosin 1000 µg/ml diduga merupakan koloni transforman yang membawa plasmid rekombinan telah terintegrasi dengan stabil dalam sel inang. Selain stabil secara genetik, seleksi transforman pada kandungan zeosin yang tinggi juga dapat digunakan untuk memperoleh klon transforman

dengan jumlah salinan gen lebih dari satu atau telah terjadi integrasi gen majemuk (*multicopy gene*).

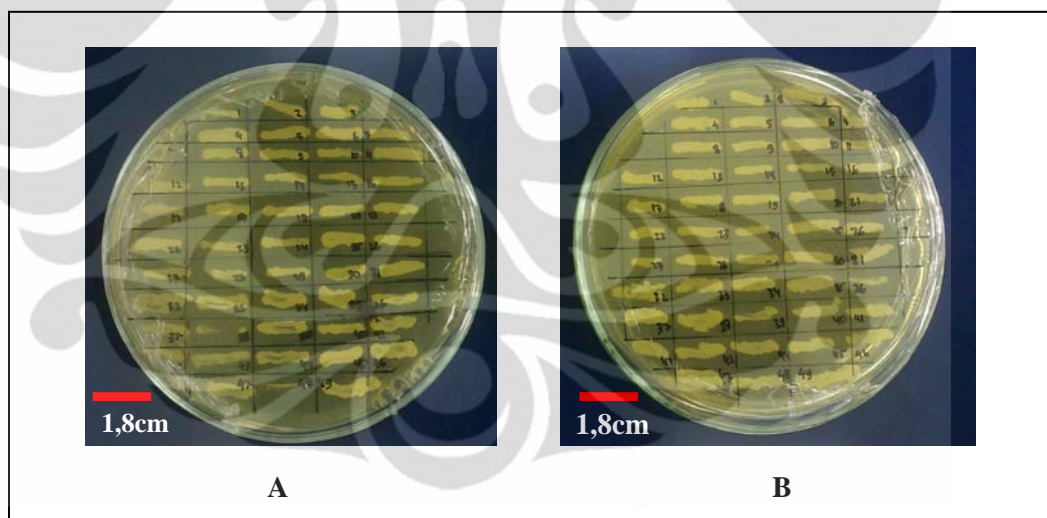
Berdasarkan hasil yang diperoleh, koloni transforman yang tumbuh baik pada konsentrasi zeosin 1000 $\mu\text{g/ml}$ mencapai 96% dari sejumlah koloni yang telah diseleksi sebelumnya pada konsentrasi zeosin 200 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel 4.1.). Menurut Daly dan Hearn (2005: 125), peningkatan konsentrasi zeosin yang digunakan pada medium selektif dapat menunjukkan kestabilan koloni transforman dan jumlah salinan gen yang terdapat pada genom transforman. Vassileva *dkk.* (2001: 29) melaporkan bahwa semakin tinggi konsentrasi antibiotik zeosin yang digunakan dalam medium selektif, maka semakin banyak salinan gen yang terdapat pada koloni transforman yang tumbuh. Teknik *southern blotting* menunjukkan klon *P. pastoris* transforman yang resisten terhadap konsentrasi zeosin 100 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$ berturut-turut mengandung ~1 salinan gen, ~2 salinan gen, ~3 salinan gen, dan ~4 salinan gen.

Tabel 4.1. Data uji stabilitas genetik pada klon *P. pastoris* transforman

Konsentrasi zeosin	Jumlah koloni yang diuji	Jumlah koloni yang tumbuh	Persentase
200 $\mu\text{g/ml}$	90	77	85%
1000 $\mu\text{g/ml}$	49	47	96%



Gambar 4.2. (A) Koloni khamir transforman pada medium YEPD dengan zeosin 200 $\mu\text{g/ml}$ (B) Koloni khamir transforman pada medium YEPD tanpa zeosin. NT: non-transforman; T: transforman

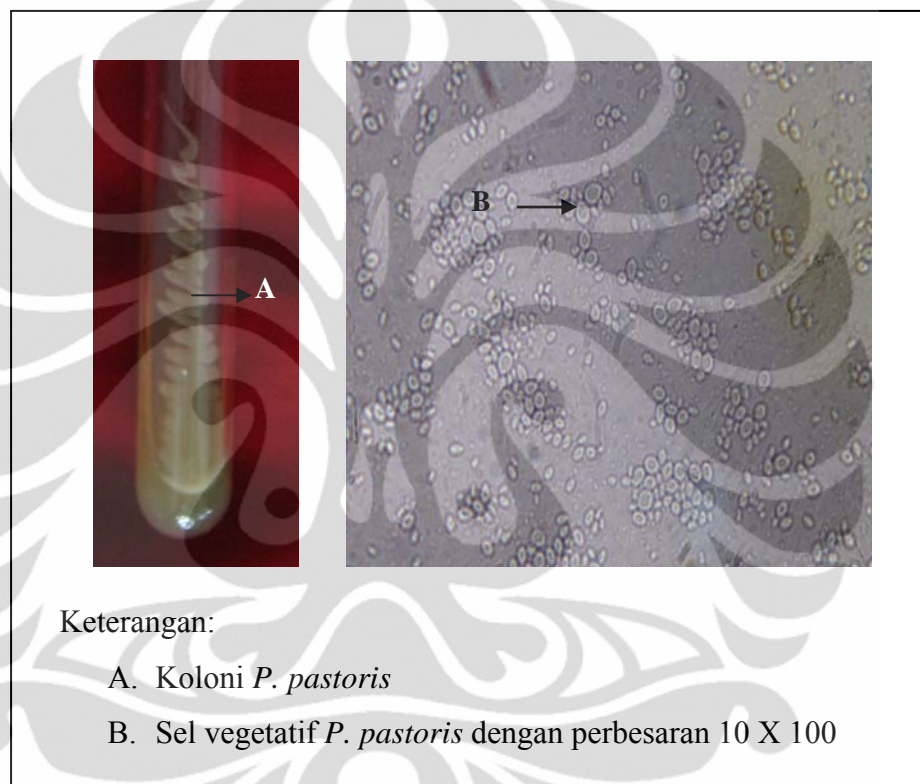


Gambar 4.3. (A) Koloni khamir transforman pada medium YEPD dengan zeosin 1.000 $\mu\text{g/ml}$ (B) Koloni khamir transforman pada medium YEPD tanpa zeosin

4.2 Pengamatan Morfologi *P. pastoris*

Hasil pengamatan morfologi *P. pastoris* secara makroskopik pada medium YEPD miring menunjukkan koloni khamir yang berwarna putih krem, tekstur koloni seperti mentega, permukaan koloni halus dan mengilap, tepi koloni halus

dan menggunung (Gambar 4.4.). Hasil pengamatan morfologi secara mikroskopik (Gambar 4.4.) pada medium YEPD yang diinkubasi selama 48 jam memperlihatkan sel vegetatif dengan bentuk oval serta tipe pertunasan multipolar. Menurut Negruta *dkk.* (2008:1) dan National Collection of Yeast Cultures (2011:1), khamir *P. pastoris* memiliki koloni berwarna putih atau krem, permukaan halus, bentuk oval, dan tipe pertunasan multipolar.



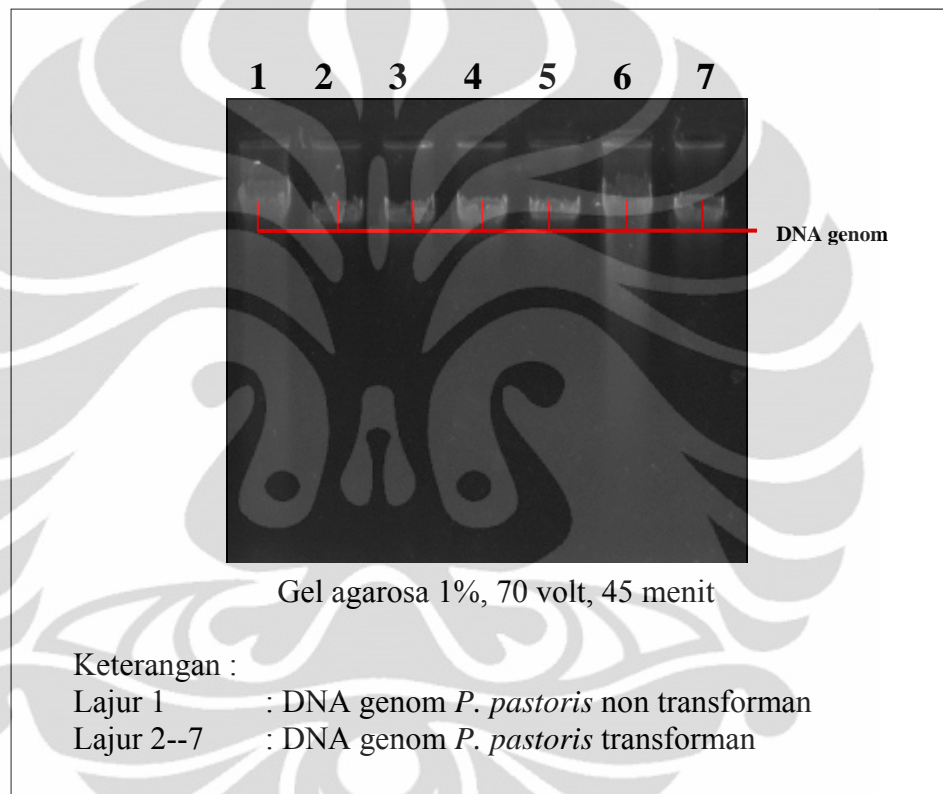
Gambar 4.4. Morfologi *P. pastoris* pada medium YEPD, umur 48 jam, suhu 30° C

4.3 Isolasi DNA genom *P. pastoris*

Isolasi genom *P. pastoris* telah dilakukan pada 7 sampel, yaitu 1 klon non transforman dan 6 klon transforman. Hasil isolasi DNA genom dapat dilihat pada gel elektroforesis 1% (Gambar 4.5.). Satu buah pita DNA terbentuk pada gel agarosa menunjukkan hasil positif bahwa terdapat DNA pada setiap lajur. Menurut Cheng dan Jiang (2006: 58), isolasi genom khamir berhasil dilakukan dengan diperolehnya satu buah pita DNA. Satu buah pita DNA yang terbentuk

jenis pada gel elektroforesis merupakan hasil isolasi genom khamir yang menunjukkan tidak terjadinya kerusakan DNA.

Gambar 4.5 pada lajur 1 dan lajur 6 memperlihatkan *smear* tipis pada pita DNA yang terbentuk. Menurut Sambrook dan Russell (2001: 1.42), *smear* di sepanjang jalur migrasi DNA dapat menunjukkan degradasi sampel akibat adanya DNase.



Gambar 4.5. Visualisasi elektroforesis gel agarosa DNA genom *P. pastoris* transforman

Berdasarkan hasil spektrofotometri, rasio $A_{260} : A_{280}$ sampel DNA berkisar 1,74--1,98 (Tabel 4.2). Sampel DNA yang diperoleh tidak perlu dipurifikasi karena nilai rasio $A_{260} : A_{280}$ berada pada kisaran DNA murni. Menurut Seidman dan Mowery (2006: 5), DNA dikatakan murni bila nilai $A_{260} : A_{280}$ berkisar 1,8--2,0. Bila nilai $A_{260} : A_{280}$ di bawah 1,7 atau di atas 2,0 maka kemungkinan terdapat RNA atau protein di dalam larutan.

Tabel 4.2. Data hasil uji spektrofotometri DNA genom *P. pastoris* transforman dan non transforman

No	Kode Sampel	Faktor pengenceran	260 nm	280 nm	260nm/280nm
	Blanko		0	0	
1	Klona non transforman	100	0,72	0,36	1,96
		100	0,78	0,39	1,97
2	Klona transforman 1	100	0,20	0,10	1,89
		100	0,20	0,11	1,88
3	Klona transforman 2	100	0,38	0,20	1,86
		100	0,38	0,21	1,87
4	Klona transforman 3	100	0,29	0,17	1,74
		100	0,29	0,17	1,74
5	Klona transforman 4	100	0,30	0,16	1,85
		100	0,29	0,16	1,83
6	Klona transforman 5	100	0,26	0,13	1,98
		100	0,26	0,13	1,98
7	Klona transforman 7	100	0,56	0,30	1,87
		100	0,56	0,30	1,87

4.4 Verifikasi Insersi Gen Sisipan *CSF3syn* pada Genom *P. pastoris* Melalui Teknik PCR

Visualisasi hasil optimasi suhu *annealing* pada elektroforesis gel agarosa 1% dengan cetakan DNA genom sebanyak 1 μ l memperlihatkan bahwa dari 5 suhu *annealing* yang dioptimasi, pita tunggal DNA berukuran 567 pb yang lebih tebal dibandingkan yang lain terbentuk pada suhu 58 $^{\circ}$ C (Gambar 4.6, lajur 8).

Lajur 1--3 (Gambar 4.6.) merupakan kontrol negatif. Lajur 1 adalah kontrol reaksi tanpa sampel DNA. Lajur 2 adalah DNA genom *P. pastoris* non transforman. Lajur 3 adalah plasmid pGAPZ α . Kontrol negatif tidak menunjukkan adanya pita DNA, hal tersebut menunjukkan tidak terjadi kontaminasi saat reaksi PCR. Pada kontrol negatif tidak memiliki gen sisipan *CSF3syn*. Menurut Roux (1995: 5188), kontrol negatif diperlukan dalam reaksi PCR untuk melihat kesalahan akibat adanya kontaminasi, sehingga jika tidak terjadi kontaminasi maka tidak terbentuk pita DNA hasil amplifikasi pada kontrol negatif. Lajur 4 (Gambar 4.6.) adalah plasmid rekombinan (pGAPZ α _CSF3ye)

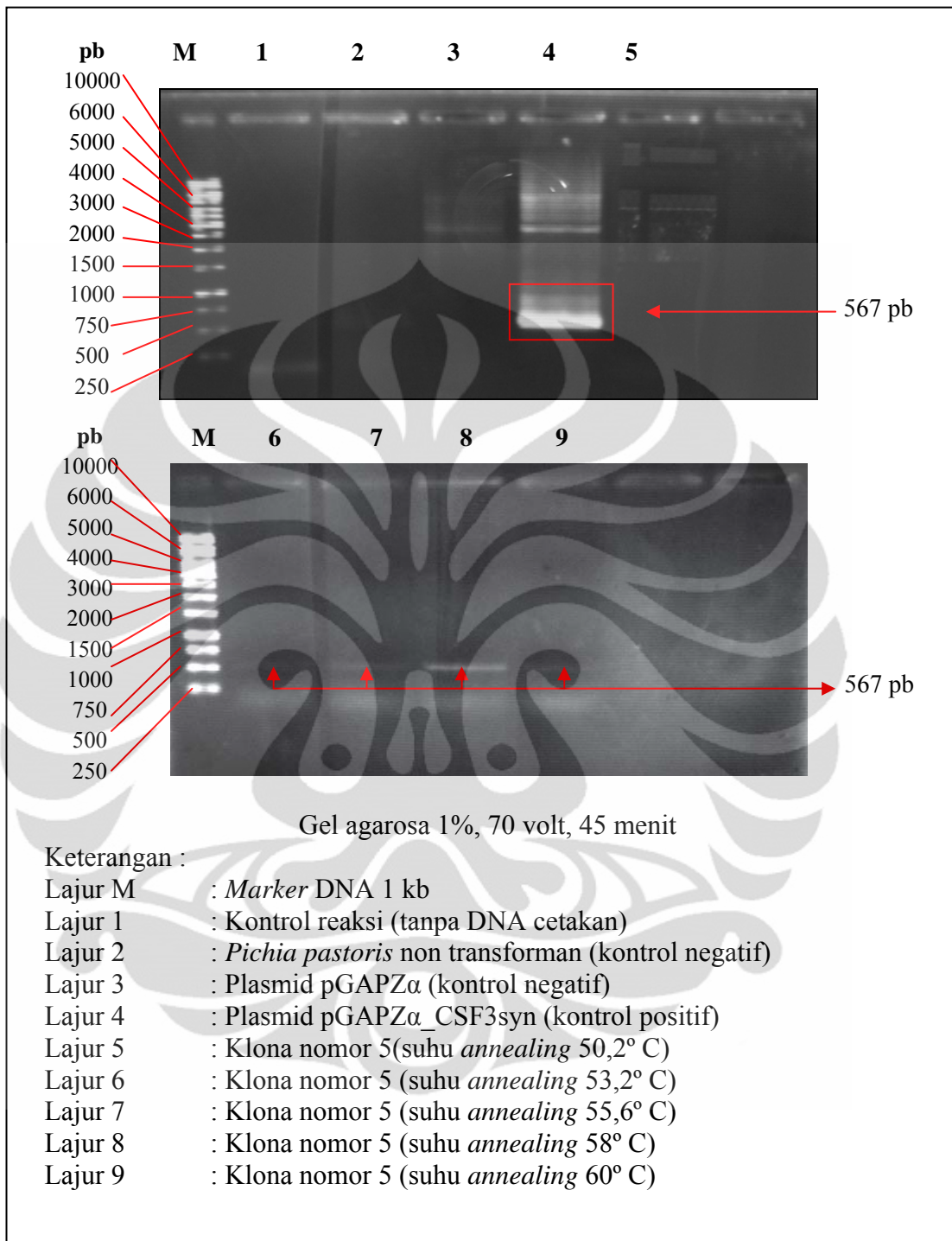
yang merupakan kontrol positif. Kontrol positif menunjukkan adanya pita DNA yang berukuran sekitar 567 pb.

Lajur 6--9 (Gambar 4.6) adalah sampel DNA dengan suhu *annealing* berturut-turut 53,2° C, 55,6° C, 58° C, dan 60° C. Hasil visualisasi pada lajur 6--9 menunjukkan terbentuknya pita DNA dengan ukuran 567 pb. Pola pita DNA yang terbentuk pada lajur 8 lebih tebal dibandingkan yang lain. Lajur 5 (Gambar 4.6) adalah sampel DNA dengan suhu *annealing* 50,2° C. Lajur 5 tidak menunjukkan adanya pita DNA. Berdasarkan hasil tersebut, suhu *annealing* yang dapat digunakan untuk reaksi PCR selanjutnya adalah suhu 58° C. Menurut Ahmed (2006: 118), spesifisitas PCR dipengaruhi oleh kondisi reaksi amplifikasi yang optimal, kondisi primer dan cetakan DNA. Optimasi kondisi reaksi amplifikasi dilakukan dengan optimasi suhu *annealing* yang tepat sehingga didapatkan produk PCR spesifik, yaitu terbentuknya pita DNA tebal dengan ukuran sesuai yang diharapkan. Penentuan suhu *annealing* yang optimum dapat ditentukan berdasarkan perbandingan ketebalan pita DNA hasil elektroforesis gel.

Suhu *annealing* dipengaruhi oleh *temperature of melting* (T_m) dan kandungan basa GC dari primer yang digunakan. Primer yang digunakan memiliki T_m sebesar 69° C dan 68,4° C (Tabel 4.3.). Menurut Sambrook dan Russell (2001: 8.8) suhu *annealing* PCR umumnya 3--5° C di bawah suhu T_m . Melo *dkk.* (2006: 853) melaporkan pada penelitian yang telah dilakukan bahwa suhu *annealing* 58° C dapat digunakan untuk proses PCR genom khamir.

Primer yang digunakan memiliki memiliki persentase kandungan basa G dan C sebesar 53,6% dan 45,5% (Tabel 4.3.). Menurut PREMEIR Biosoft (2007:1) dan Sambrook dan Russell (2001: 8.8) persentase kandungan G dan C yang baik untuk proses PCR adalah sekitar 40--60%. Hal tersebut bertujuan agar DNA cetakan dan DNA komplementer berikatan lebih kuat saat proses *annealing*.

Berdasarkan data yang diperoleh, kondisi *annealing* yang dapat digunakan untuk proses PCR selanjutnya adalah suhu 58° C.



Gambar 4.6 Visualisasi elektroforesis gel optimasi suhu *annealing* PCR hasil isolasi genom klon *P. pastoris* transforman nomor 5

Tabel 4.3. Primer CSF3ye *forward* dan primer CSF3ye *reverse*

Nama	Urutan nukleotida	Panjang primer	Tm (°C)	GC (%)	Panjang ampikon
CSFye-F	5'-ACT CCA CTA GGC CCA GCT TCT TCT TTG C- 3'	28 basa	69	53,6	567 pb
CSFye-R	5'- GTC GAC TGG AGC CAA ATG TCT CAA AAC TCT-3'	33 basa	68,4	45,5	

Hasil verifikasi insersi gen sisipan *CSF3syn* dengan teknik PCR dapat dilihat pada visualisasi gel elektroforesis 1% (Gambar 4.7.). Hasil amplifikasi dengan sepasang primer spesifik menghasilkan pita DNA sekitar 567 pb yang merupakan ukuran gen *CSF3syn* (Lajur 2--8, Gambar 4.7). Fuad *dkk.* (2009: 9) dan Arfia (2010: 78) melaporkan bahwa ukuran gen *CSF3syn* sebesar 567 pb yang telah dikonstruksi dan dikloning dalam vektor pengklonaan pTZ57R/T. Gen tersebut telah berhasil disubkloning pada vektor ekspresi pGAPZα dan ditransformasikan ke dalam *P. pastoris*.

Marka DNA (Gambar 4.7, lajur M) digunakan sebagai kontrol proses elektroforesis gel agarosa dan penanda ukuran DNA. Kontrol lain yang digunakan adalah vektor rekombinan yang mengandung gen sisipan *CSF3syn* sebagai kontrol positif yang diharapkan dapat menunjukkan ukuran gen sisipan sebesar 567 bp (Gambar 4.7, lajur 2) dan kontrol negatif yaitu genom *P. pastoris* non transforman (Gambar 4.7, lajur 1). Hasil reaksi PCR yang terlihat pada lajur 1 menunjukkan tidak terbentuk pita DNA. Hal tersebut dikarenakan pada genom *P. pastoris* non transforman tidak terdapat vektor rekombinan sehingga tidak terdapat sekuen yang dikenali oleh primer CSF3ye *reverse* dan primer CSF3ye *forward*.

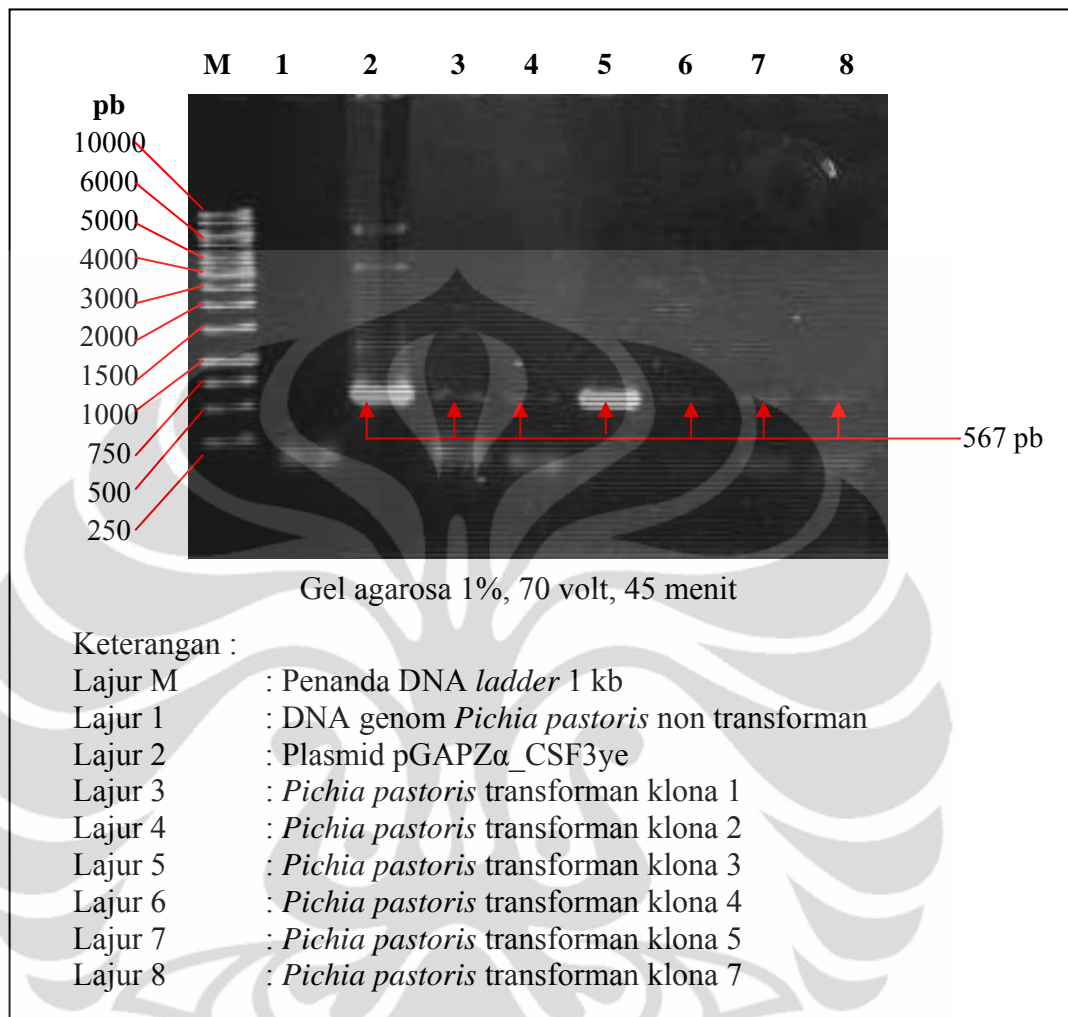
Pola pita pada lajur 2 (Gambar 4.7) terbentuk pita DNA berukuran sekitar 567 pb yang merupakan kontrol positif. Lajur 3--8 (Gambar 4.7) menunjukkan terbentuknya pita DNA berukuran sekitar 567 pb. Menurut Settanni *dkk.* (2006: 3794), suatu sampel DNA dikatakan berhasil diamplifikasi dan spesifik jika hasil

elektroforesis menunjukkan terbentuknya pita DNA yang sesuai dengan ukuran yang diinginkan.

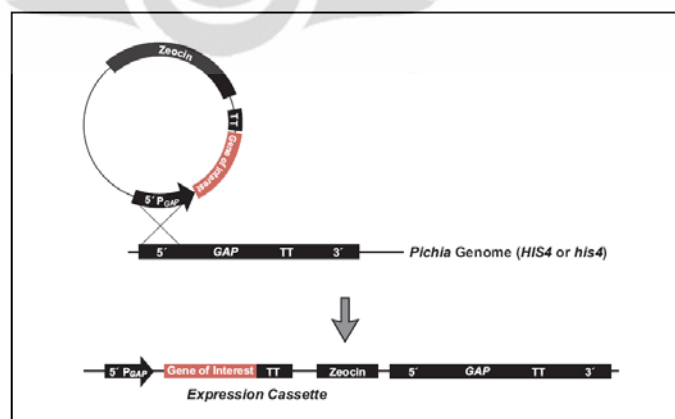
Pola pita DNA pada lajur 5 (Gambar 4.7) yang merupakan genom klon transforman nomor 5 terlihat spesifik dibandingkan dengan lajur 3, 4, 6, 7, 8 (Gambar 4.7). Pita DNA yang terbentuk pada lajur 3, 4, 6, 7, 8 (Gambar 4.7) ternyata masih terdapat pita DNA yang tidak spesifik. Menurut Sambrook dan Russell (2001:8.8) serta Raymer dan Smith (2007: 746), pita non spesifik dapat terjadi saat proses *annealing* karena suhu *annealing* lebih rendah dari suhu optimalnya, sehingga penempelan primer pada DNA target kurang optimal.

Berdasarkan pita DNA yang terbentuk pada gel elektroforesis lajur 3--8 (Gambar 4.7) membuktikan bahwa gen sisipan *CSF3syn* pada vektor rekombinan berhasil terintegrasi dengan genom *P. pastoris*. Menurut Invitrogen (2008: 3), integrasi diawali dengan bagian promotor pGAP 5' dari vektor rekombinan menyisip ke dalam promotor pGAP pada genom *P. pastoris*, kemudian seluruh bagian vektor termasuk gen sisipan masuk ke dalam genom *P. pastoris* (Gambar 4.8).

Primer *CSF3ye forward* dan primer *CSF3ye reverse* merupakan primer spesifik yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *CFS3syn*. Primer *CSF3ye forward* menempel pada ujung 5' gen *CSF3syn*, sedangkan primer *CSF3ye reverse* menempel pada ujung 3' gen *CSF3syn* (Gambar 4.9.). Primer *CSF3ye forward* dan primer *CSF3ye reverse* memiliki panjang 28 dan 33 basa nukleotida. Bahrami *dkk.* (2007: 163) melaporkan bahwa pasangan primer spesifik dengan panjang 30--33 basa dapat mengamplifikasi gen *CSF3* dengan baik. Menurut Abd-Elsalam (2003: 94), panjang primer yang baik agar dapat menempel secara spesifik adalah sekitar 18--30 basa.

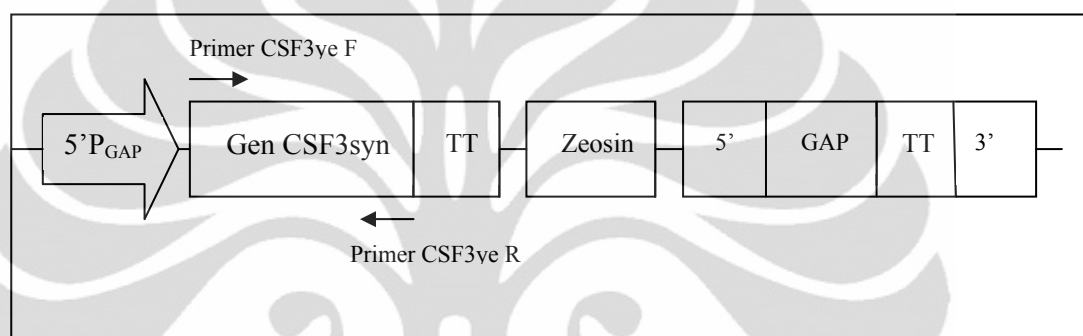


Gambar 4.7. Visualisasi elektroforesis gel produk PCR DNA genom beberapa klona *P. pastoris* transforman



Gambar 4.8. Integrasi vektor rekombinan pada genom *P. pastoris*
 [Sumber : Invitrogen 2008: 3.]

Persentase kandungan basa G dan C pada pasangan primer memengaruhi suhu denaturasi dalam proses PCR. Suhu denaturasi yang digunakan dalam penelitian adalah 95° C. Primer CSF3ye *forward* memiliki persentase kandungan basa G dan C sebesar 53,6%, sedangkan primer CSF3ye *reverse* sebesar 45,5% (Tabel 4.3). Menurut PREMEIR Biosoft (2007:1), persentase kandungan G dan C yang baik untuk proses PCR adalah sekitar 40--60%. Sambrook dan Russell (2001: 8.8) menyatakan untuk primer dengan kandungan basa G dan C kurang dari 55% dapat menggunakan suhu denaturasi antara 94--95° C.



Gambar 4.9. Posisi penempelan primer CSF3ye F dan CSFye R pada gen sintetik *CSF3syn*
[Sumber : Modifikasi dari Invitrogen 2008: 3.]

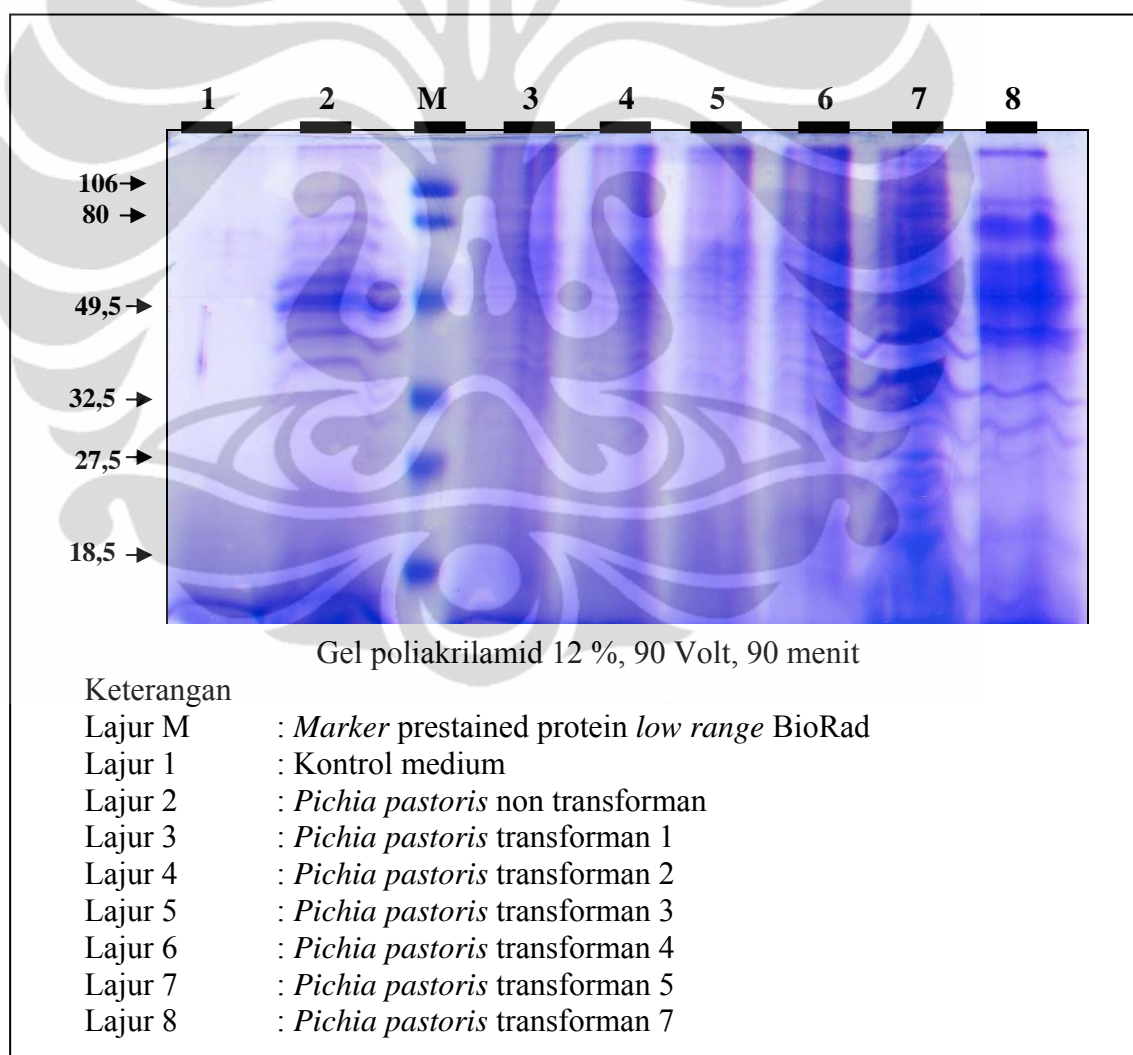
Berdasarkan data yang diperoleh dari analisis PCR, gen target *CSF3syn* pada vektor rekombinan telah berhasil terintegrasi dengan genom *P. pastoris*. Oleh sebab itu, klon khamir transforman yang mengandung gen target dapat digunakan untuk uji ekspresi protein rekombinan.

4.5 Uji Ekspresi Protein G-CSF Rekombinan dalam Skala Kecil

4.5.1 Analisis protein G-CSF rekombinan skala kecil dengan SDS PAGE

Berdasarkan hasil analisis SDS-PAGE (Gambar 4.10), ekspresi protein G-CSF telah berhasil dilakukan menggunakan plasmid pGAPZ α dan sel inang *P. pastoris* dengan terbentuknya pola pita protein. Lajur 3--8 merupakan sampel protein klon *P. pastoris* transforman nomor 1, 2, 3, 4, 5, dan 7. Kontrol negatif (lajur 1 dan 2) adalah kontrol medium dan klon *P. pastoris* non transforman. Hasil analisis SDS-PAGE dengan pewarnaan *coomassie blue* menunjukkan pola

pita protein *smear*, sehingga berat molekul protein tidak dapat ditentukan. Menurut Conde *dkk.* (2004: 43790 & 43794), *smear* yang terbentuk pada gel akrilamid akibat adanya proses hiperglikosilasi pada glikoprotein yang dihasilkan sel khamir. Buxbaum (2003: 71) melaporkan glikoprotein mengandung banyak muatan negatif pada gugus karbohidrat sehingga menghasilkan pita protein *smear* pada SDS-PAGE. Pola pita protein *smear* dapat diatasi dengan mengganti penggunaan SDS dengan CTAB. Deterjen CTAB memiliki muatan positif sehingga muatan negatif karbohidrat yang terdapat pada glikoprotein dapat dinetralisasi. Penggunaan CTAB dapat menghasilkan pola pita protein yang tajam.



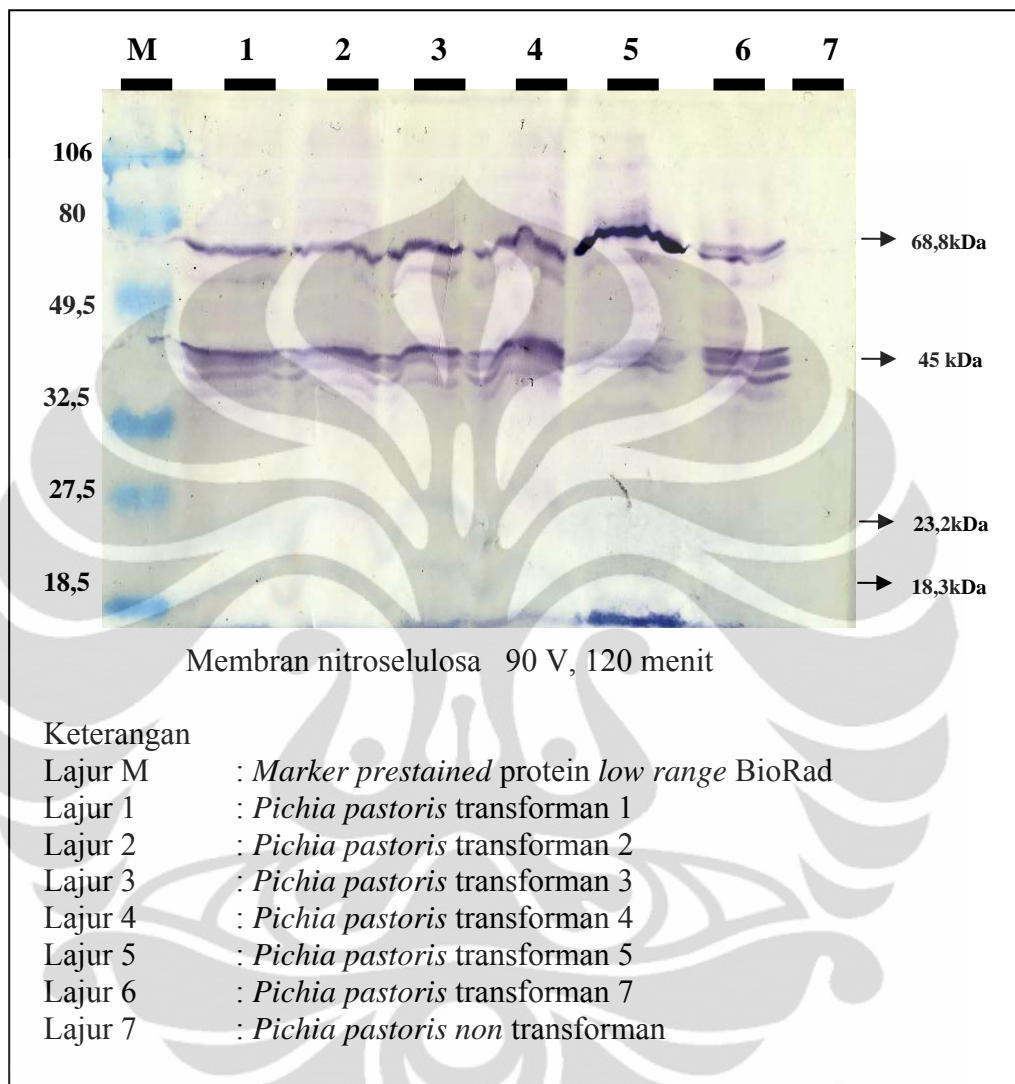
Gambar 4.10. Hasil SDS PAGE ekspresi G-CSF pada *P. pastoris* dalam skala kecil

4.5.2 Analisis spesifikasi protein G-CSF rekombinan skala kecil dengan teknik *western blotting*

Hasil analisis *western blot* menunjukkan bahwa antibodi yang digunakan hanya bereaksi positif terhadap protein G-CSF pada enam klon *P. pastoris* transforman (Gambar 4.11.). Lajur 1--6 merupakan klon *P. pastoris* transforman dan lajur 7 adalah *P. pastoris* non transforman. Lajur 7 *P. pastoris* non transforman tidak menunjukkan terbentuknya pita protein. Hal tersebut membuktikan bahwa *P. pastoris* non transforman tidak membawa vektor rekombinan sehingga tidak bereaksi dengan antibodi yang digunakan.

Berdasarkan hasil perhitungan dari kurva standar marka (Gambar 4.12, Lampiran 4) yang digunakan protein G-CSF rekombinan yang diproduksi *P. pastoris* transforman secara ekstraselular diperoleh berat molekul yaitu ~68,8 kDa, ~45 kDa, ~23,2 kDa, dan ~18,3 kDa. Protein dengan berat molekul ~18,3 kDa diperkirakan merupakan protein G-CSF yang tidak mengalami glikosilasi karena berat molekul kurang dari 19,6--23 kDa. Menurut Welte *dkk.*(1996: 1908) dan Vanz *dkk.*(2008: 12), produk G-CSF rekombinan yang tidak mengalami glikosilasi dapat dihasilkan oleh sel *E. coli*. Filgrastim adalah produk G-CSF rekombinan komersial yang dihasilkan oleh sel *E. coli* sebesar ~18,8 kDa.

Protein dengan berat molekul ~23,2 kDa pada hasil *western blot* diduga merupakan protein G-CSF yang mengalami glikosilasi karena berat molekul sesuai dengan protein G-CSF terglykosilasi berukuran 20--23,5. Welte *dkk.*(1996: 1908) menyatakan lenograstim merupakan protein G-CSF rekombinan yang diproduksi oleh sel mamalia. Lenograstim memiliki berat molekul protein sebesar 20--23,5 kDa. Protein G-CSF pada lenograstim mengalami glikosilasi. Hill *dkk.* (1993: 5167) melaporkan berat molekul protein G-CSF manusia ~19,6 kDa.

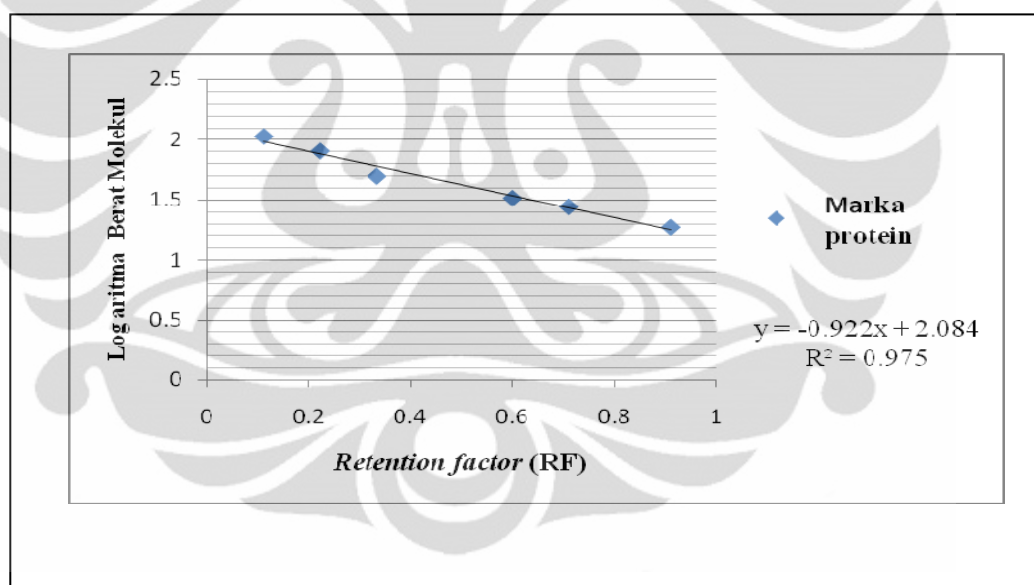


Gambar 4.11. Hasil *Western blotting* ekspresi G-CSF pada beberapa klon *P. pastoris* dalam skala kecil

Protein dengan berat molekul ~68,8 kDa dan ~45 kDa diperkirakan merupakan protein fusi yang mengalami glikosilasi karena berat molekul tersebut lebih besar dari protein target yang diharapkan sebesar 20--23 kDa. Pola pita protein yang tebal dan bervariasi diduga adanya oligosakarida dalam jumlah tinggi berikatan dengan asam amino protein target. Maleki *dkk.*(2010: 204) melaporkan bahwa munculnya pita protein fusi pada *western blotting* akibat tidak terpotongnya sinyal α mating factor yang disekresikan ke media kultur. Sekresi

protein fusi dengan sinyal α mating factor ke media kultur disebabkan karena proses kerja KEX2 endoprotease untuk menghilangkan sinyal sekresi α mating factor kurang optimal. Nakamura *dkk.* (2005: 89) melaporkan bahwa berat molekul protein yang lebih besar dari protein target dapat terbentuk karena proses glikosilasi pada situs glikosilasi selain pada protein target dan pemotongan sinyal peptida yang kurang sempurna.

Berdasarkan data yang diperoleh uji ekspresi G-CSF pada beberapa klon *P. pastoris* dalam skala kecil berhasil dilakukan. Ekspresi G-CSF menghasilkan protein G-CSF yang mengalami glikosilasi dan tidak terglykosilasi dengan berat molekul $\sim 23,2$ kDa dan $\sim 18,36$ kDa. Hasil uji ekspresi G-CSF juga memperlihatkan protein fusi yang mengalami glikosilasi dengan berat molekul $\sim 68,8$ kDa dan ~ 45 kDa. Selanjutnya, ekspresi protein rekombinan dapat dilakukan dalam kultur labu kock.

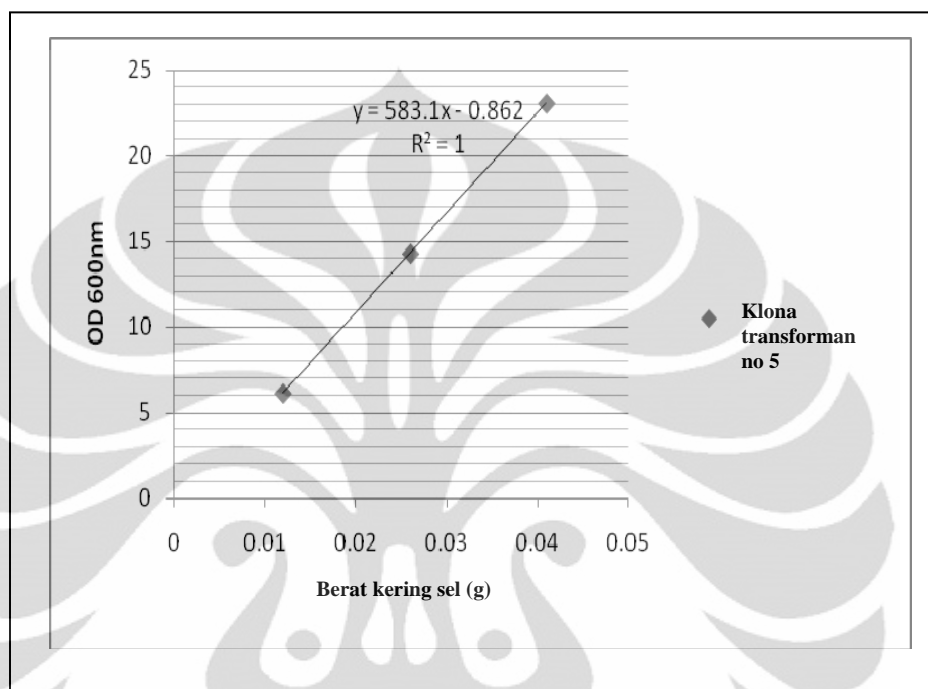


Gambar 4.12. Kurva standar marka protein untuk ekspresi G-CSF pada beberapa klon *P. pastoris* dalam skala kecil

4.6 Produksi Protein G-CSF Rekombinan dalam Kultur Labu Kock

Berdasarkan perhitungan kurva standar didapatkan persamaan garis linear $y = 583,1x - 0,862$ dengan nilai $R^2 = 1$ (Gambar 4.13). Berdasarkan pengamatan grafik pertumbuhan sel diperoleh data berat kering sel pada Gambar 4.14, Tabel 4.4. Hasil pengamatan menunjukkan pertumbuhan sel meningkat sejalan dengan

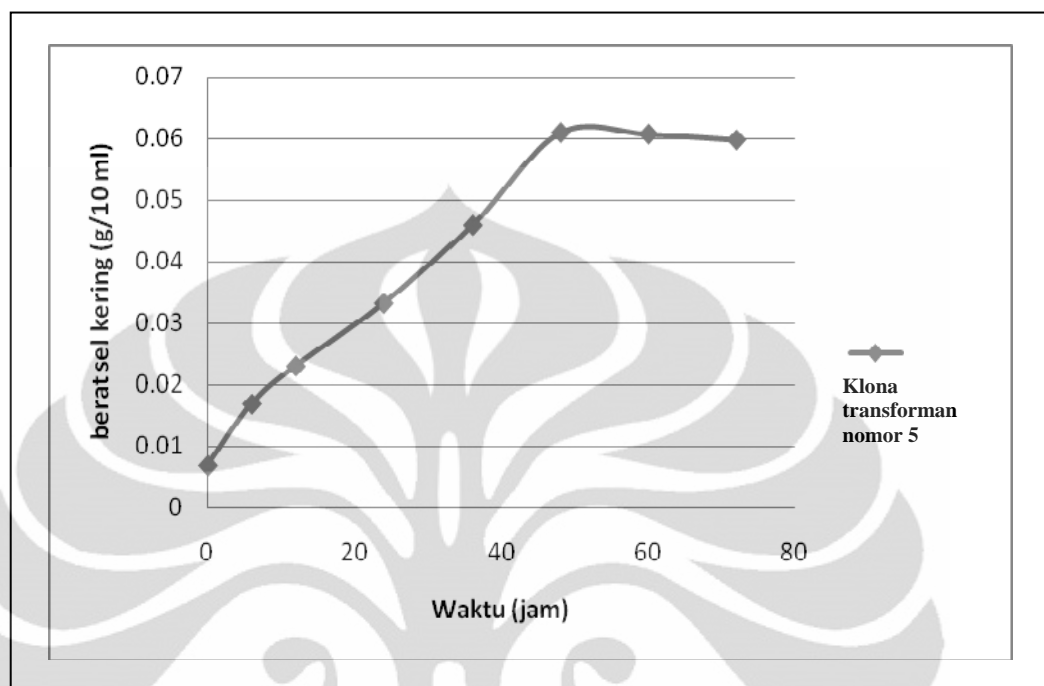
waktu kultur sampai jam ke-48 dan stabil hingga jam ke-72. Menurut Tawfeek *dkk.*(1989:33) dan Kolleva *dkk.*(2008: 764), pertumbuhan *P. pastoris* dengan sumber karbon glukosa mencapai fase akhir logaritma pada jam ke-48 dan fase stasioner pada jam ke-72.



Gambar 4.13. Kurva standar berat kering sel

Tabel 4.4. Data pengukuran biomassa sel *P. pastoris* transforman nomor 5

No	Waktu	OD 600nm	pH	DCW (mg/10ml)
	Blanko	0		
1	0 jam	3,15	6	6,88
2	6 jam	8,96	6	16,84
3	12 jam	12,55	5,5	23,01
4	24 jam	18,49	5,5	33,18
6	36 jam	25,88	5,5	45,86
7	48 jam	34,65	6	60,90
8	60 jam	34,51	6	60,66
9	72 jam	33,97	6	59,73



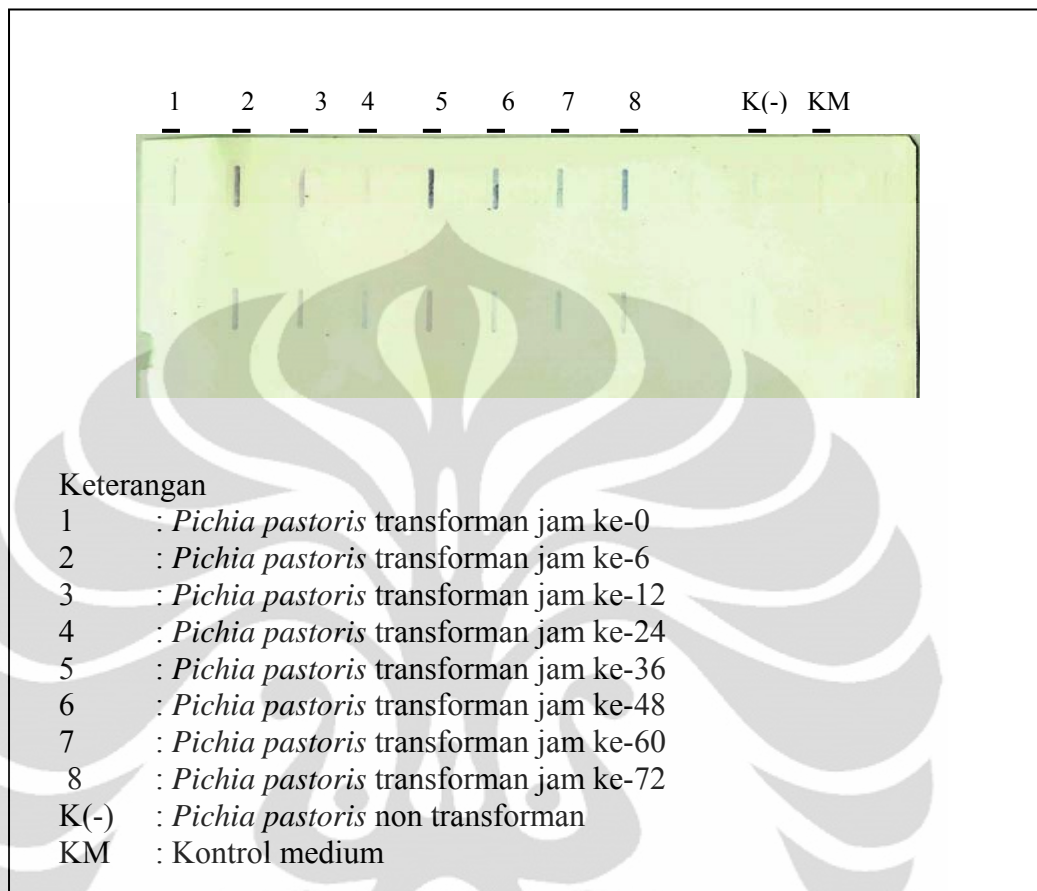
Gambar 4.14. Kurva pertumbuhan *P. pastoris* transforman klon nomor 5

4.6.1 Deteksi protein G-CSF rekombinan dengan teknik *slot blot*

Hasil *slot blot* menunjukkan bahwa protein G-CSF rekombinan telah berhasil diekspresikan. Hal tersebut ditandai dengan timbulnya warna ungu pada sampel protein G-CSF rekombinan jam ke 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 sedangkan kontrol negatif medium dan protein *P. pastoris* non transforman tidak menimbulkan warna (Gambar 4.15).

Ketebalan warna yang terbentuk pada *slot blot* jam ke 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 terlihat berbeda-beda dan tidak konsisten. Hal tersebut diduga karena preparasi sampel protein dan teknik memasukkan sampel protein ke dalam sumur alat *slot blot* kurang baik. Menurut Moore (2009: 45), tidak terbentuknya warna pita protein dan lemahnya warna yang timbul pada *immunoblotting* dapat diakibatkan beberapa hal, yaitu rendahnya ikatan antigen dan antibodi yang digunakan serta kurang optimalnya sampel protein yang dimasukkan ke dalam alat. Untuk mengatasi masalah tersebut dapat dilakukan dengan mengurangi

tahap pencucian dan mengukur konsentrasi sampel protein.



Gambar 4.15. Hasil *slot blot* protein G-CSF rekombinan *P. pastoris* transforman klon nomor 5

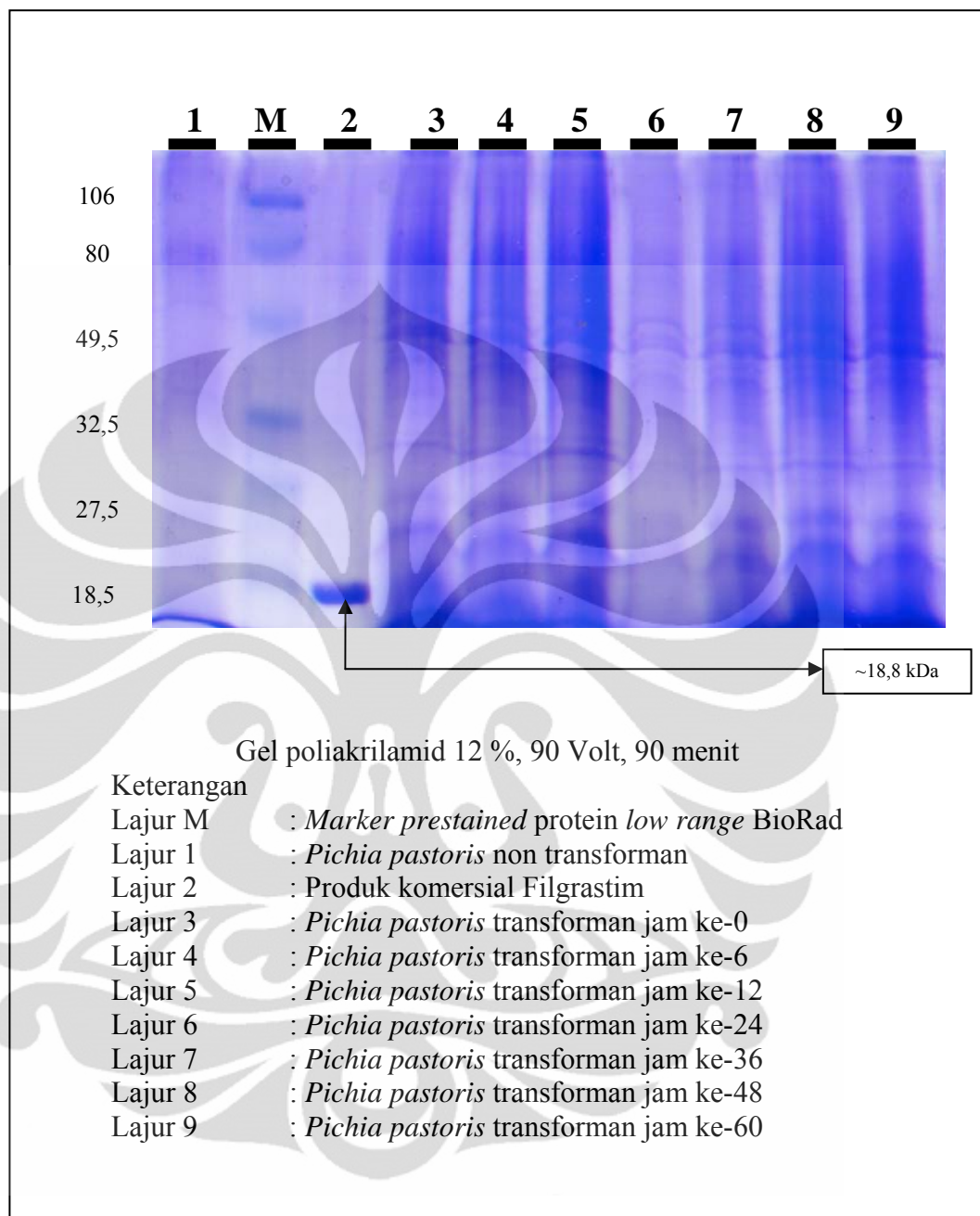
Berdasarkan hasil *slot blot* yang diperoleh, ekspresi protein rekombinan pada *P. pastoris* transforman klon nomor 5 telah berhasil, tetapi jumlah protein yang dihasilkan tidak dapat ditentukan secara kuantitatif. Menurut Helmy *dkk.* (2010:8576), deteksi protein dengan menggunakan *slot blot* dapat menunjukkan total protein G-CSF secara semi kuantitatif, tetapi tidak dapat memberikan informasi mengenai berat molekul protein. Pal *dkk.* (2005: 652) melaporkan untuk mengetahui jumlah protein rekombinan dalam sitoplasma dan ekstraselular dapat digunakan teknik ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Total sekresi protein G-CSF rekombinan akan dihitung secara kuantitatif menggunakan kurva standar dari ELISA.

4.6.2 Analisis protein G-CSF rekombinan dalam kultur labu kocok dengan teknik SDS PAGE

Berdasarkan hasil analisis SDS PAGE 12% (Gambar 4.16.), sampel supernatan protein yang telah dipekatkan dengan TCA menunjukkan *multiband* pada visualisasi SDS PAGE. Hasil pengamatan SDS PAGE dapat terlihat berat molekul protein G-CSF antara pita marka 18,5 kDa--27 kDa pada lajur 3--9 (Gambar 4.16). Lajur 1 merupakan kontrol negatif *P. pastoris* non transforman menunjukkan visualisasi pita protein yang berbeda dengan pita protein *P. pastoris* transforman yang lebih tipis. Lajur 2 merupakan produk GCSF rekombinan komersial filgrastim. Visualisasi pita protein filgrastim yang ditunjukkan menunjukkan berat molekul ~18,8 kDa. Protein tersebut merupakan protein G-CSF yang tidak mengalami glikosilasi karena dihasilkan oleh sel prokariot *E. coli*. Berat molekul protein G-CSF rekombinan pada tidak dapat ditentukan dengan korelasi regresi linear karena pita protein tidak terlihat tajam.

Lajur 3--9 menunjukkan pita protein dengan berat molekul tinggi ~49,5 kDa. Pita protein tersebut merupakan pita protein yang tidak diharapkan timbul pada gel poliakrilamid karena berat molekul lebih besar dari protein target. Pita protein yang timbul dianggap sebagai protein fusi yang mengalami glikosilasi. Menurut Moore (2009: 42), pita protein yang terbentuk dengan berat molekul lebih tinggi dari protein yang diharapkan akibat protein yang mengalami glikosilasi atau banyaknya residu asam amino.

Berdasarkan data yang diperoleh dari analisis SDS PAGE, ekspresi protein G-CSF rekombinan pada klon transforman nomor 5 berhasil dilakukan dengan terlihat pita protein G-CSF antara pita marka 18,5 kDa--27 kDa pada lajur 3--9 (Gambar 4.16.). Sampel protein kemudian dapat dianalisis dengan *western blotting* untuk mengetahui spesifikasi protein G-CSF rekombinan.

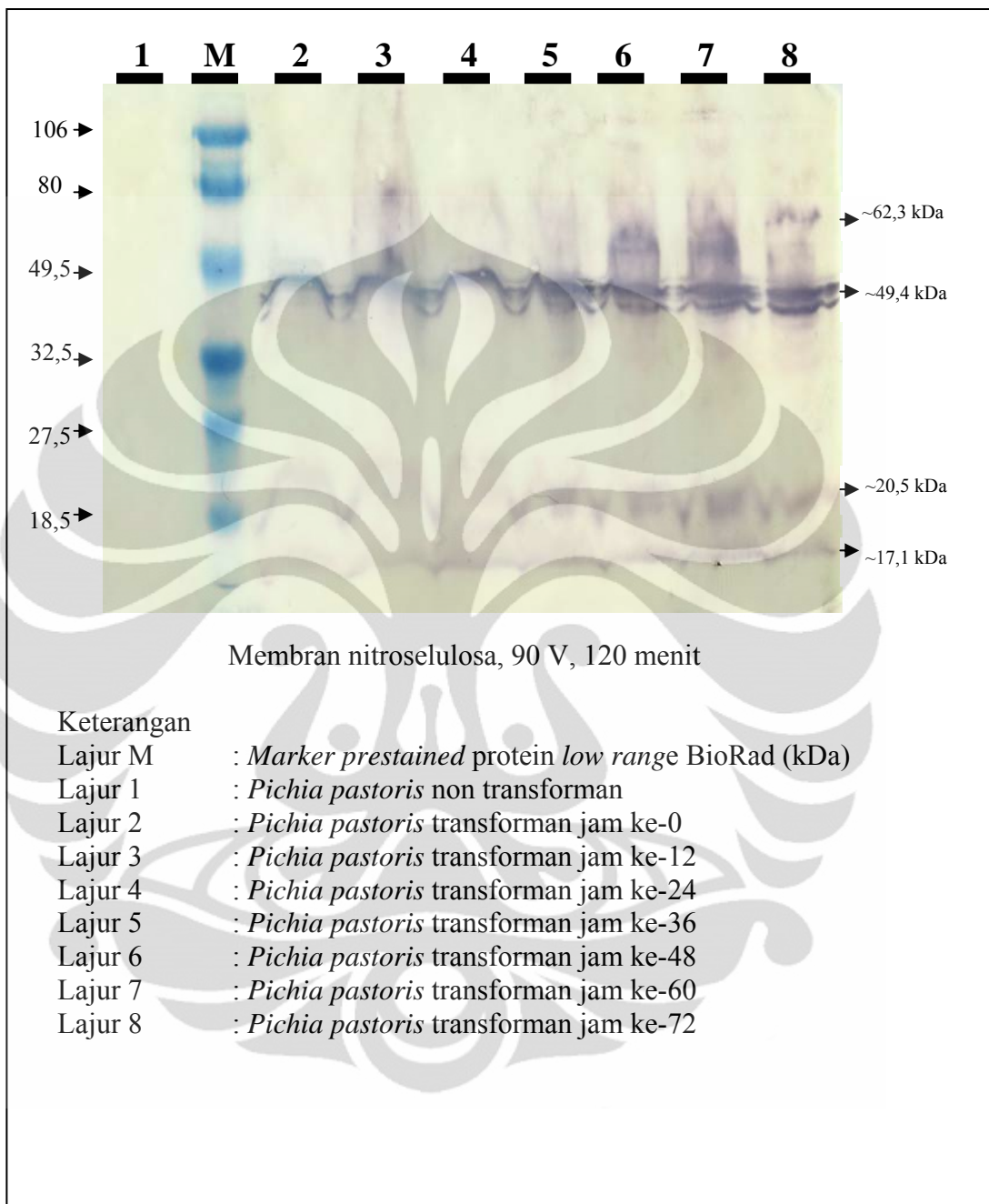


Gambar 4.16. Hasil SDS PAGE ekspresi G-CSF pada *P. pastoris* transforman klon nomor 5 berdasarkan waktu

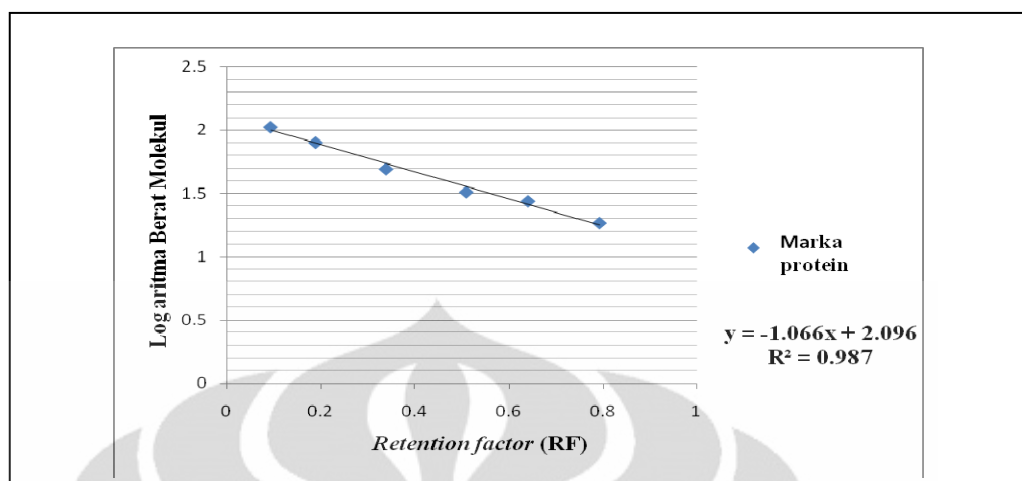
4.6.3 Analisis spesifikasi produksi protein G-CSF rekombinan pada kultur labu kacak dengan teknik *western blotting*

Hasil analisis *western blot* menunjukkan bahwa antibodi yang digunakan bereaksi positif terhadap protein G-CSF pada klon *P. pastoris* transforman nomor 5 (lajur 2--8, Gambar 4.17). Lajur 1 adalah kontrol negatif *P. pastoris* non transforman tidak menunjukkan terbentuknya pita protein. Hal tersebut membuktikan bahwa *P. pastoris* non transforman yang tidak membawa vektor rekombinan yang mengandung gen *CSF3syn* tidak bereaksi dengan antibodi yang digunakan.

Berdasarkan perhitungan berat molekul protein dengan kurva standar marka protein (Gambar 4.18, ampiran 5), berat molekul protein yang terbentuk pada *western blot*, yaitu ~17,1 kDa, ~20,5 kDa, ~49,4 kDa, dan ~62,3 kDa. Pada jam ke-0 sudah terbentuk pita protein G-CSF rekombinan. Pita protein pada jam ke-0 sampai jam ke-36 telah terbentuk protein dengan berat molekul ~17,1 kDa, ~20,5 kDa, dan ~49,4 kDa. Pita protein pada jam ke 36, 48, dan 60 lebih tebal dibandingkan dengan pita protein yang lain karena pada jam-jam tersebut sudah memasuki fase akhir logaritma dan stasioner. Pada jam ke- 48, 60, dan 72 terbentuk protein dengan berat molekul ~17,1 kDa, ~20,5 kDa, ~49,4 kDa, dan ~62,3 kDa. Kualitas warna pita protein terlihat lebih tebal pada jam ke-48 dan 60. Berdasarkan kurva pertumbuhan sel, pada jam ke-48 memasuki fase akhir logaritma. Pada fase akhir logaritma diduga sel *P. pastoris* transforman memproduksi protein rekombinan dalam jumlah tinggi. Menurut Kotze (2007: 22), ekspresi gen heterolog yang menggunakan promotor konstitutif GAP terjadi bersamaan dengan pertumbuhan *P. pastoris* dalam medium yang mengandung glukosa.



Gambar 4.17. Hasil *western blot* protein G-CSF rekombinan pada *P. pastoris* transforman klon nomor 5 berdasarkan waktu



Gambar 4.18. Kurva standar marka protein

Protein dengan berat molekul $\sim 17,1$ kDa (Gambar 4.17) diperkirakan merupakan protein G-CSF yang tidak mengalami glikosilasi karena berat molekul lebih rendah dari protein target terglykosilasi sebesar 20--23 kDa. Protein G-CSF yang tidak terglykosilasi terbentuk diduga karena proses glikosilasi pada tahap pasca translasi tidak optimal. Welte *dkk.* (1996: 1908) dan Vanz *dkk.* (2008: 12), menunjukkan berat molekul produk komersial filgrastim yang merupakan protein G-CSF rekombinan yang dihasilkan oleh sel *E. coli* sebesar $\sim 18,8$ kDa. Protein G-CSF rekombinan yang diproduksi oleh sel *E. coli* tidak mengalami glikosilasi. Skoko *dkk.* (2003: 263) melaporkan produksi protein rekombinan yang tidak terglykosilasi dari *P. pastoris* terjadi karena tingkat glikosilasi pada tahap pasca translasi lebih rendah daripada proses sintesis polipeptida pada level produksi dan sekresi protein. Enzim yang berperan pada jalur glikosilasi *P. pastoris* kurang mampu mengendalikan laju protein yang dikeluarkan.

Protein dengan berat molekul $\sim 20,5$ kDa (Gambar 4.17.) pada hasil *western blot* diduga merupakan protein G-CSF yang mengalami glikosilasi karena sesuai dengan berat molekul protein target. Welte *dkk.* (1996: 1908) melaporkan berat molekul produk komersial lenograstim sebesar 20--23,5 kDa. Lenograstim merupakan protein G-CSF rekombinan yang diproduksi oleh sel mamalia. Protein G-CSF pada lenograstim mengalami modifikasi translasi seperti glikosilasi.

Analisis *western blot* (Gambar 4.17) menunjukkan pita protein dengan berat molekul $\sim 49,4$ kDa dan $\sim 62,3$ kDa juga terdeteksi oleh antibodi. Pita

protein tersebut dianggap sebagai protein fusi yang mengalami glikosilasi karena berat molekul protein lebih besar dari berat molekul protein target sebesar 20--23 kDa. Hal tersebut terjadi diduga karena proses kultur yang kurang optimum. Berdasarkan Invitrogen (2008:12), sinyal α *mating factor* yang terdapat pada vektor pGAPZ α memiliki tiga situs N-glikosilasi. Maleki *dkk.* (2010: 204) menyatakan bahwa terbentuknya pita protein dengan berat molekul yang lebih tinggi dari yang diharapkan dapat terjadi akibat tidak terpotongnya sinyal α *mating factor* yang disekresikan ke media kultur sebagai protein fusi. Sekresi protein fusi dengan sinyal α *mating factor* ke media kultur disebabkan karena proses kerja KEX2 endoprotease untuk memotong sinyal sekresi α *mating factor* kurang optimal.

Toikkanen *dkk.* (2007: 167) melaporkan dalam analisis enzim GXET rekombinan di *P. pastoris* dalam kultur labu kocok dengan suhu 30° C dan 22° C menghasilkan pita protein yang berbeda. Pada suhu 30° C terbentuk protein dengan berat molekul yang lebih besar dari protein target, sedangkan pada 22° C hanya terbentuk pita protein target. Hal tersebut terjadi karena pemotongan sinyal α *mating factor* yang kurang efisien pada suhu tinggi. Ellgaard dan Helenius (2003: 187) menyatakan bahwa efisiensi sekresi protein, modifikasi pasca translasi, dan proses pemotongan sinyal α *mating factor* dapat ditingkatkan dengan menurunkan suhu kultur.

Berdasarkan data tersebut ekspresi protein G-CSF rekombinan secara konstitutif telah berhasil diperoleh. Namun demikian, ekspresi protein rekombinan juga menunjukkan adanya protein fusi yang mengalami glikosilasi juga terikat oleh antibodi spesifik pada analisis *western blotting* selain protein target. Untuk membuktikan adanya protein fusi yang mengalami glikosilasi dapat dilakukan proses deglikosilasi. Menurut Daly dan Hearn (2005: 133), deglikosilasi adalah proses pemutusan rantai karbohidrat yang terikat pada asam amino spesifik. Deglikosilasi dapat digunakan untuk mengidentifikasi situs glikosilasi dengan menggunakan enzim PNGase atau endoglikosidase.

Oleh sebab itu, data yang dihasilkan dalam penelitian ini dapat digunakan sebagai data awal untuk purifikasi dan karakterisasi protein G-CSF rekombinan lebih lanjut dari kultur *P. pastoris*.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Klona *P. pastoris* transforman berhasil diseleksi dan stabil hingga konsentrasi zeosin 1000 µg/ml.
2. Gen sintetik *CSF3syn* sebesar 567 bp telah berhasil diverifikasi terintegrasi pada genom *P. pastoris* transforman dengan teknik PCR.
3. Gen sintetik *CSF3syn* telah berhasil diekspresikan dengan vektor ekspresi pGAPZα pada *P. pastoris* secara konstitutif.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan proses deglikosilasi yaitu proses pemutusan rantai karbohidrat yang terikat pada asam amino spesifik. Hal tersebut perlu dilakukan untuk membuktikan adanya proses glikosilasi pada protein G-CSF rekombinan dan protein fusi yang dihasilkan oleh *P. pastoris*.
2. Perlu dilakukan perhitungan jumlah sekresi protein G-CSF rekombinan secara kuantitatif dengan teknik ELISA.
3. Perlu dilakukan purifikasi dan karakterisasi protein G-CSF rekombinan.

DAFTAR REFERENSI

- Abd-Elsalam, K.A. 2003. Bioinformatics tools and guideline for PCR primer design. *African Journal Biotechnology* **2**(5): 91--95.
- Ahmed, Z. 2006. Optimization of PCR conditions in vitro for maximum amplification of DNA from *Xanthomonas campestris* 13551. *Journal of Applied Sciences Research* **2**(3): 112--122.
- Amersham Biosciences. 2011. *Operating instructions PR 600 and PR 648 slot blot filtration manifolds*. Amersham Biosciences, San Fransisco: 18 hlm.
- Arfia, P. I. 2010. Subkloning Gen Sintetik CSF3syn (*Colony Stimulating Factor-3*) pada Vektor Ekspresi pGAPZα dan Transformasi Vektor Rekombinan ke dalam *Pichia pastoris*. Skripsi-S1. Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok: xiv + 88 hlm.
- Ausubel, F.M., R.Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 2002. *Current protocols in molecular biology*. Volume I. John Wiley & Sons, Inc., New York: xxxviii + 12.10+A1.29+17 hlm.
- Bahrami, A., S.A. Shojaosadati, R. Khalilzadeh, A.R. Saedinia, E.V. Farahani & J.M. Mosaabadi. 2007. Production of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor by *Pichia pastoris*. *Iranian Journal of Biotechnology* **5**(3): 162--163.
- Bollok, M., D.Resina, F.Valero & P.Ferrer. 2009. Recent patents on the *Pichia pastoris* expression system: expanding the toolbox for recombinant protein production. *Biotechnology* **3**:192--201.
- Boyer, R. F. 1993. *Modern experimental biochemistry*. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., California: xix + 555 hlm.
- Brooker, R.J. 2005. *Genetics: Analysis and Principles*. 2nd ed. McGraw-Hill Companies, Inc., Boston: xxii + 842 hlm.
- Buxbaum, E. 2003. Cationic electrophoresis and electrotransfer of membrane glycoproteins. *Analytical Biochemistry* **314**: 70--76.
- Campbell, N. A., J. B. Reece & L. G. Mitchell. 2002. *Biologi – Jilid I*. Ed. ke-5. Terj. dari *Biology*. 5th ed., oleh Lestari, R., E. I. M. Adil, N. Anita, Andri, W. F. Wibowo & W. Manalu. Penerbit Erlangga, Jakarta: xxi + 438 hlm.

- Carbonero, R. G., J. I. Mayordomo, M.V. Tornamira, M. L.Brea, A.Rueda, V. Guillem, A. Arcediano, A. Yubero, F.Ribera, C. Go´mez, A.Tre´s, Jose´ L P.Gracia, C.Lumbreras, J.Hornedo, H.C.Funes & L. P.Ares. 2001. Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of high-risk febrile neutropenia: a multicenter randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute* **93**(1): 31--38.
- Cheng, H.R. & N. Jiang. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters* **28**: 55--59.
- Cregg, J. M., J.L. Cereghino, J. Shi, & D. R. Higgins.2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology* **16**: 23--52.
- Conde, C., R. Cueva, G. Pablo, J. Polaina, & G. Larriba. 2004. A search for hyperglycosylation signals in yeast glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* **279**(42): 43789--43798.
- Daly, H., & M. T. W. Hearn. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* **18**: 119--138.
- Davis, L.G., W.M. Kuehl & J.F. Battey. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Appleton & Lange, Norwlk: xiii + 763 hlm.
- Demetri, G.D. & James D. G. 1991. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* **78**(11): 2791--2808.
- Dessen, P. 2010. CSF3 (colony stimulating factor 3(granulocyte)). 28 Mei: 5 hlm. http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_CSF3.html. 8 Juni 2010, pk. 21.15.
- Drocourt, D., T. Calmels, J.P. Reynes, M. Baron & G. Tiraby. 1990. Cassettes of the streptoalloteichus hindustanus ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Oxford University Press* **18**(13): 4009.
- Ellgaard, L & Helenius. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**: 181--191.
- Fairbanks, D.J & W.R. Andersen. 1999. *Genetics the continuity of life*. Wadsworth Publishing Company, New York: xiii + 438 hlm.

- Fermentas. 2006. *Molecular biology catalog & product application guide*. Fermentas International, Inc., Canada: x + 453 hlm.
- Fuad, A.M., D.F. Agustiyanti, Yuliawati & A. Santoso. 2009. Konstruksi gen CSF3 sintetik penyandi granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) manusia dengan teknik PCR. *Journal of Applied And Industrial Biotechnology in Tropical Region* 2(2): 1--10.
- Gallagher, S.R. 1995. One dimensional SDS gel electrophoresis protein. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M.Dunn, H.L.Ploegh, D.W.Speicher & P.T. Wingfield. 2003. *Current protocols in protein science*. John Willey & Sons, Inc., Washington: 10.1.1--10.1.34.
- Gellissen, G. 2005. *Production of recombinant proteins novel microbial and eucaryotic expression systems*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: xxv+404 hlm.
- GeneCard. 2010. Colony stimulating factor 3 (Granulocyte). 11 Januari: 9 hlm. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CSF3>. 23 September 2010, pk. 21.10.
- Glick, B.R & J.J. Pasternak. 2003. *Molecular biotechnology*. ASM Press, Washington: xxiii + 760 hlm.
- Helmy, O. M., M. M. M. Hussein, F. E. Murad & H. A. Shoeb. 2010. The preparation of 6x His-tagged granulocyte colony stimulating factor using an improved in vitro expression. *African Journal of Biotechnology* 9(50): 8566--8577,
- Hill, C.P., T.D. Osslund & D. Eisenberg. 1993. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proceeding National Academic Science USA* 90: 5167--5171.
- Invitrogen. 2001. *EasySelectTM pichia expression kit: A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZa in Pichia pastoris*. Invitrogen Corp., California: x + 74 hlm.
- Invitrogen. 2008. *pGAPZ A, B, C, and pGAPZa A, B, C: Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins*. Invitrogen Corp., California: vi + 44 hlm.

- Klug, W.S. & M.R. Cummings. 1994. *Concepts of genetics*. 4th ed. Prentice-Hall Englewood, New Jersey: xvi + 773 hlm.
- Koleva, D., V. Petrova, T. Hristozova & A. Kujumdzieva. 2008. Study of catalase enzyme in methylotrophic yeasts. *Biotechnology and biotechnological* **22**: 762--768
- Kotze, L., 2007. Development of *Pichia pastoris* as a production system for HPV16 L1 virus-like particles as component to a subunit vaccine. Masters of Science in Engineering. Department of Process Engineering University of Stellenbosch, Stellenbosch: vi+87 hlm.
- Labsfhrc. 2010. Genomic DNA miniprep. ? : 1 hlm.
http://www.labs.fhrc.org/breeden/methods/genomic_DNA_miniprep.doc.
27 Januari 2011, pk.10.30.
- Lasnik, M.A., V.G. Porekar & A. Stalc. 2001. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) expressed by methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Springer Verlag* (442): 184--186.
- Leonard, D., Kuehl, & J. Battley. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Appletown & Lange Norwalk, Connecticut: xiv + 777hlm.
- Li, P., A. Anumanthan, X. Gong Gao, K. Ilangovan, V. Suzara, N. Düzgüneş & V. Renugopalakrishnan. 2007. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **142**:105--124.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap, & D.P. Clark. 2009. *Brock: Biology of microorganisms*. 12th ed. Pearson Education, San Francisco xxviii + 1061 + A-12 + G-17 + P-1 + I-36 hlm.
- Martin, R. 1996. *Gel electrophoresis: Nucleid acids*. Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford: xiii + 175 hlm.
- Maleki, A., F.Roohvand, H. Tajerzadeh, H. Khanahmad, M.B. Nobari, A. Beiruti, & A. R. Najafabadi. 2010. High expression of methylotrophic yeast-derived recombinant human erythropoietin in a pH-controlled batch system. *Avicenna Journal Medical Biotechnology* **2**(4): 197-206.
- Melo, S.C.O., C.Pungartnik, J.C.M. Cascardo & M. Brendel. 2006. Rapid and efficient protocol for DNA extraction and molecular identification of the

- basidiomycete *Crinipellis perniciosus*. *Genetics and Molecular Research* **5**(4): 851--855.
- Millipore. 2011. Western blotting. ? : 1 hlm.
http://www.millipore.com/immunodetection/id3/western_blotting. 24 Mei 2011. pk. 20.08.
- Moore, C. 2009. *Introduction to western blotting*. MorphoSys., Oxford: 48 hlm.
- Nagata, S., M. Tsuchiya, S. Asano, O. Yamamoto, Y. Hirata, N. Kubota, M. Oheda, H. Nomura & T. Yamazaki. 1986. The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. *European Molecular Biology Organization Journal*. **5**(3): 575--581.
- Nakamura, T., M. Zámocký, Z. Zdráhal, R. Chaloupkova, M. Monincová, Z. Prokop, Y. Nagata & J. Damborsk. 2005. Expression of glycosylated haloalkane dehalogenase LinB in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **46**: 85--91.
- National Collection of Yeast Cultures. 2011. Yeast Characteristics-*Pichia pastoris*. ? : 1 hlm. <http://www.ncyc.co.uk/search.html>. Rabu 16 Juni 2011. Pk. 10.00.
- Negruta, O., T. Vassu, D. Pelinescu, I. Stoica, O. Csutak, E. Ghiergheata, & E. Sasarman. 2008. Comparative morpho-physiological analysis and mutagenesis of some methylotrophic yeast strains of biotechnological interest. *University of Bucharest* **5**: 1.
- Nikaido, H & A.N. Glazer. 2007. *Microbial biotechnology fundamentals of applied microbiology*. 2nd Edition. University of California, Berkeley: 576 hlm.
- PREMIER Biosoft International. 2007. PCR primer design guidelines. 5 Juni 2007: 5 hlm.
<http://www.premierbiosoft.com/technotes/PrimerDesign.html>. 4 Mei 2011, pk.15.12.
- Pal, Y., A. Khushoo & K. J. Mukherjee. 2006. Process optimization of constitutive human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF)

- expression in *Pichia pastoris* fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**: 650--657.
- Raymer, D. M. & D. E. Smith. 2007. A simple system for staining protein and nucleic acid electrophoresis gel. *Electrophoresis* **28**: 746--748.
- Roux, K.H. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research* **4**: 5185--5194.
- Saeedinia, A., M.Shamsara, A. Bahrami, M. Zeinoddini, M. N. Khalili, R.Mohammadi, N.M.Sabet & H.Sami. 2008. Heterologous expression of human granulocyte-colony stimulating factor in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*: 1--5.
- Sambrook, J. & D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual vol 2*. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: xvii + 3.4--14.53 + 1.44.
- Sanchez, L.2001. TCA protein precipitation protocol. 10 Oktober 2001: 1 hlm. http://www.its.caltech.edu/~bjorker/Protocols/TCA_ppt_protocol.pdf. 15 Februari 2011, pk.21.00.
- Sanyoto, I. 2003. *Uji terapis colony stimulating factor pada neutropenia penderita kemoterapi di rumah sakit dr kariadi semarang*. Universitas Diponegoro Semarang. 30 hlm.
- Sauer, P., M.Muller & J.Kang. 1998. Quantitation of DNA. *Qiagen News* **2**: 23--26.
- Sears, I.B., J. O'Connor, O.W. Rossanese & B.S. Glick. 1998. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*. **14**:783--790.
- Seidman, L. & J. Mowery. 2006. UV spectrophotometry of DNA, RNA, and proteins. 25 September: 9 hlm. http://matcmadison.edu/biotech/resources/methods/labManual/unit_4/exercise_15.htm. 12 Februari 2010, pk.15.55.
- Settanni, L, S. Valmori, D.W. Sinderen, G, Suzzi, A. Paparella & A.Corsetti. 2006. Combination of multiplex PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis for monitoring common sourdough-associated *Lactobacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(5):

3793--3796.

- Skoko, N. B. Argamante, N.K. Grujicic, S.G. Tisminetzky, V. Glisin & G. Ljubijankic. 2003. Expression and characterization of human interferon- β 1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Applied Biochemistry* **38**: 257--265.
- Suh, S.O., M. Blackwell, C. P. Kurtzman & M. Lachance. 2006. Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete. *Mycologia* **98**(6): 1006--1017.
- Sung, L., P.C. Nathan, B. Lange, J. Beyene, & G. R. Buchanan. 2004. Prophylactic granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor decrease febrile neutropenia after chemotherapy in children with cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Clinical Oncology* **22**(16): 3350--3356.
- Tawfeek, K.A., F.A. Al Fassi & E.M. Ramadan. 1989. Selection of methylotrophic microorganism for the formation of single cell protein. *Science* **1**: 25--38.
- Teamwork Microbiology Edc. 2005. Equipments in microbiology laboratory. <http://www.acmastech.com/general>. 2--6 hlm. Jumat 25 Februari 2005, Pk. 16.00.
- Thanonkeo, P., R. Monkeang, W. Saksirirat & S. Thanonkeo. 2010. Cloning and molecular characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from thermotolerant mushroom, *Lentinus polychrous*. *African Journal of Biotechnology* **9**(22): 3242--3251.
- Toikkanen, J.H., M. Paavola, M. Bailey, J. Immanen, E. Rintala, P. Elomaa, Y. Helariutta, T. Teeri & R. Fagers. 2007. Expression of xyloglucan endotransglycosylases of *Gerbera hybrid* and *Betula pendula* in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* **130**: 161--170.
- Vanz, A., G. Renard, M. S. Palma, J. M. Chies, S. L. Dalmora, L. A. Basso & D. S. Santos. 2008. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microbial Cell Factories*. **7**(13): 1--12.

- Vassileva, A., D.A Chugh, S. Swaminathan & N. Khanna. 2001. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotropic yeast *P. pastoris* using the GAP promoter. *Journal of Biotechnology* **88**:21-- 35.
- Waterham, H.R., M.E. Digan, P.J. Koutz, S.V. Lair & J.M. Cregg. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **186**: 37--44.
- Welte, K., J. Gabrilove, M. H. Bronchud, E. Platze & G. Morstyn. 1996. Filgrastim (r-methug-csf): the first 10 years. *Blood* **88**(6). 1907—1929.
- Wolfe, S. L. 1995. *Introduction to cell and molecular biology*. Wardworth Publishing Company, Belmont: xvii + 820 hlm.
- Wong, D.W.S. 1997. *The ABC of gene cloning*. International Thomson Publishing, New York: xiv + 213 hlm.
- Zhang, A. L., J. X. Luo, T. Y. Zhang, Y. W. Pan, Y. H. Tan & C.F. Fu. 2009. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Report* **36**: 1611--1619.
- Zhiming Tu, G., K.X. Li, M. J. Chen, J. Chang, L. Chen, Q. Yao, D. P. Liu, H. Ye, J. Dhi & X. Wu. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology* **8**(1): 113--120.

Lampiran 1. Komposisi dan Cara Pembuatan Larutan dan Dapar yang Digunakan dalam Penelitian

Medium, larutan, dan dapar	Cara pembuatan
<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> (YEPD)	Medium YEPD 1 liter dibuat dengan melarutkan 10 g <i>yeast extract</i> dan 20 g pepton dalam 900 ml akuades. Sebanyak 20 g agar ditambahkan ke dalam larutan tersebut jika membuat medium YEPD padat, kemudian diaduk menggunakan <i>magnetic stirrer</i> hingga homogen. Medium disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 1 atm selama 20 menit. Medium didinginkan sampai suhu 60° C, kemudian ditambahkan 100 ml larutan 10 x <i>dextrose</i> .
YEPDS agar	Medium padat <i>Yeast Extract Peptone Dextrose with Sorbitol</i> (YEPDS agar) terdiri dari <i>yeast extract</i> 1%, pepton 2% dan <i>dextrose</i> 2%, 1 M sorbitol, dan agar 2%. Medium YEPDS padat 1 liter dibuat dengan melarutkan 10 g <i>yeast extract</i> , 182,2 g sorbitol, 20 g pepton dalam 900 ml akuades. Sebanyak 20 g agar ditambahkan ke dalam larutan tersebut, kemudian diaduk menggunakan <i>magnetic stirrer</i> hingga homogen. Medium disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 1 atm selama 20 menit. Medium didinginkan sampai suhu 60° C, kemudian ditambahkan 100 ml larutan 10 x <i>dextrose</i>
Larutan TAE 50x dan 1x	Sebanyak 242 g <i>tris base</i> , 57,1 ml asam asetat glasial, dan 37,29 g Na ₂ EDTA dilarutkan dalam akuades hingga volumenya tepat 1.000 ml untuk menghasilkan larutan <i>stock</i> dapar TAE 50x. Dapar TAE 1x dibuat dengan mencampurkan 10 ml TAE 50x dan akuades hingga volume tepat 500 ml.
Dapar TE	10 mM Tris-Cl dan 1 mM EDTA dilarutkan dalam 90 ml akuades dan pH larutan diatur hingga 7,5.
Larutan SDS	Sebanyak 20 µl NaOH 0,2 N dan 200 µl SDS 10% ditambahkan akuades hingga volume 1 ml.
Larutan 10x D	Sebanyak 200 g D-glukosa dilarutkan dalam akuades hingga volume mencapai 1000 ml.

Larutan <i>electrotransfer</i>	Sebanyak 3,03 g 25 mM Tris dan 14,4 g 192 mM glicine dicampurkan dengan 200 ml metanol. Larutan tersebut kemudian ditambahkan akuades hingga volume satu liter.
Larutan <i>electrorunning</i>	Sebanyak 15,5 g 128 mM Tris, 72 g 959 mM glisin dan 5 g SDS dilarutkan dalam 1 liter akuades.
4x <i>sample buffer</i>	25 ml 4x Tris-Cl pH 6.8, 20 ml gliserol, 4 g SDS, 2 ml 2- <i>mercaptoethanol</i> , 20x DTT (0,4 ml 1M) dan 1 mg <i>bromphenol blue</i> dilarutkan dengan 100 ml akuades.
0,5 µl/ml etidium bromida	Sebanyak 10 µl etidium bromida (10 mg/ml) dilarutkan dalam 200 ml akuades.
<i>Staining solution (Destaining 1)</i>	Sebanyak 40 ml MeOH, 7 ml asam asetat, dan 53 ml akuades dicampur, kemudian dihomogenkan.
<i>Coomassie Blue Staining solution</i>	<i>Coomassie Blue</i> di campurkan dengan larutan <i>staining solution</i> dengan perbandingan 1:8
<i>Destaining 2</i>	Sebanyak 5 ml MeOH, 7 ml Asam asetat, 88 ml dH ₂ O dicampur, kemudian dihomogenkan.
10x <i>Phosphate Buffer Saline (PBS)</i>	82,3 g NaH ₂ PO ₄ , 23,5 g NaH ₂ PO ₄ , dan 40 g NaCl dilarutkan dalam 1 liter dH ₂ O.
<i>Tris Buffer Saline (TBS)</i>	Sebanyak 100 mM Tris Cl, pH 6,5 dicampurkan dengan 150 mM NaCl.
<i>Blocking Buffer</i>	Sebanyak 10 g susu <i>non fat</i> dicampurkan ke dalam 100 ml TBS.
<i>Washing buffer</i>	Sebanyak 0,3 ml tween 20 dicampurkan ke dalam 300 ml TBS.

[Sumber: Invitrogen 2001: 45; Ausubel *dkk.* 2002: A1.12--A1.18; Fermentas 2006:117 & 203.]

Lampiran 2. Komponen dan Volume Reaksi yang Digunakan pada Pembuatan Gel
Poliakrilamid

	Bahan	Volume (ml)
12 % <i>Separating gel</i>	H ₂ O steril	3,35
	1,5 M Tris HCL (pH 8,8)	2,50
	Akrlamid 30 %	4,00
	SDS 10%	0,1
	Amonium Persulfat 10%	0,05
	TEMED	0,005
	H ₂ O steril	6,1
12% <i>Stacking Gel</i>	1,5 M Tris HCL (pH 6,0)	2,5
	Akrlamid 30 %	1,3
	SDS 10%	0,1
	Amonium Persulfat 10%	0,05
	TEMED	0,01

[Sumber: Sambrook dan Russell 2001: A8.44.]

Lampiran 3. Perhitungan Efisiensi Transformasi

Efisiensi transformasi = Transforman cfu/ μ g plasmid DNA

Transforman cfu = $\frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{rasio pengenceran} \times \text{volume total transformasi}}{\text{Volume yang disebar} \times \text{konsentrasi DNA}}$

Transformasi vektor rekombinan ke dalam *Pichia pastoris*

$$\begin{aligned} \text{Efisiensi transformasi} &= \frac{524 \times 1 \times 294,5}{25 \times 1,26} \\ &= 4,9 \times 10^3 \text{ cfu/} \mu\text{g plasmid DNA} \end{aligned}$$

[Sumber: Zhiming Tu *dkk.* 2005 : 117.]

Lampiran 4. Perhitungan Berat Molekul Protein G-CSF Rekombinan pada Ekspresi Skala Kecil

Persamaan garis linear kurva standar: $y = -0,922x + 2,084$

a. Nilai Rf sampel = 0,267

Logaritma berat molekul protein: $y = -0,922 (0,267) + 2,084$

$$y = 1,83813$$

Berat molekul protein : $10^{1,83813} = 68,881 \text{ kDa}$

b. Nilai Rf sampel = 0,467

Logaritma berat molekul protein: $y = -0,922 (0,467) + 2,084$

$$y = 1,65373$$

Berat molekul protein : $10^{1,65373} = 45,05 \text{ kDa}$

c. Nilai Rf sampel = 0,778

Logaritma berat molekul protein: $y = -0,922 (0,778) + 2,084$

$$y = 1,3668$$

Berat molekul protein : $10^{1,3668} = 23,274 \text{ kDa}$

d. Nilai Rf sampel = 0,889

Logaritma berat molekul protein: $y = -0,922 (0,889) + 2,084$

$$y = 1,2644$$

Berat molekul protein : $10^{1,2644} = 18,365 \text{ kDa}$

[Sumber: Gallagher 1995: 10.1.30.]

Lampiran 5. Perhitungan Berat Molekul Protein G-CSF Rekombinan pada
Produksi Protein G-CSF Rekombinan dalam Kultur Labu Kocok

Persamaan garis linear kurva standar: $y = -1,066x + 2,096$

a. Nilai Rf sampel = 0,2830

Logaritma berat molekul protein: $y = -1,066 (0,2830) + 2,096$

$$y = 1,7943$$

Berat molekul protein : $10^{1,7943} = 62,273$ kDa

b. Nilai Rf sampel = 0,3773

Logaritma berat molekul protein: $y = -1,066 (0,3773) + 2,096$

$$y = 1,6937$$

Berat molekul protein : $10^{1,6937} = 49,401$ kDa

c. Nilai Rf sampel = 0,7358

Logaritma berat molekul protein: $y = -1,066 (0,7358) + 2,096$

$$y = 1,3115$$

Berat molekul protein : $10^{1,3115} = 20,492$ kDa

d. Nilai Rf sampel = 0,8113

Logaritma berat molekul protein: $y = -1,066 (0,8113) + 2,096$

$$y = 1,2311$$

Berat molekul protein : $10^{1,2311} = 17,026$ kDa

[Sumber: Gallagher 1995: 10.1.30.]