



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH BERBAGAI KONSENTRASI *ISOPROPYL- $\beta$ -D-THIOGALACTOPYRANOSIDE* (IPTG) TERHADAP EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN *JEMBRANA SUPERFICIAL UNIT* (JSU) pGEX-6P1**

**SKRIPSI**

**RATIH CEMPAKA  
0706264210**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH BERBAGAI KONSENTRASI *ISOPROPYL- $\beta$ -D-THIOGALACTOPYRANOSIDE* (IPTG) TERHADAP EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN *JEMBRANA SUPERFICIAL UNIT* (JSU) pGEX-6P1**

**SKRIPSI**

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**RATIH CEMPAKA**  
**0706264210**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**DEPARTEMEN BIOLOGI**  
**DEPOK**  
**DESEMBER 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 : Ratih Cempaka  
NPM : 0706264210  
Tanda Tangan :   
Tanggal : 27 Desember 2011

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Ratih Cempaka  
NPM : 0706264210  
Program Studi : Biologi S1 Reguler  
Judul Skripsi : Pengaruh Berbagai Konsentrasi *Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside* (IPTG) Terhadap Ekspresi Protein Rekombinan *Jembrana Superficial Unit* (JSU) pGEX-6P1

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi S1 Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Endang Tri Margawati, M.Agr. Sc. (  )  
Pembimbing II : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. (  )  
Penguji I : Dr. Abinawanto (  )  
Penguji II : Dr. Andi Salamah (  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 27 Desember 2011

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas nikmat, rahmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini. Shalawat serta salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Sains Program Studi Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan moril dan material serta bimbingan dari berbagai pihak skripsi ini tidak akan terwujud. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Endang Tri Margawati, M.Agr.Sc dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc, selaku Pembimbing I dan II. Terima kasih atas segala bimbingan, doa, nasihat, perhatian, kesabaran, dukungan, dan saran kepada penulis selama penelitian hingga menyelesaikan skripsi ini.
2. Dr. Abinawanto dan Dr. Andi Salamah, selaku Penguji I dan II. Terima kasih atas segala doa, dukungan, saran, dan perbaikan yang diberikan dalam pembuatan skripsi ini.
3. Dra. Wellyzar Sjamsuridzal M.Sc., Ph.D., selaku Pembimbing Akademik atas segala doa, saran, perhatian, semangat, dan bantuan selama penulis menjalani perkuliahan di Departemen Biologi FMIPA UI.
4. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen, Dr. Dadang Kusmana, M.S. selaku Ketua Sidang, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan, dan segenap staf pengajar atas segala ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis selama berada di Biologi.
5. Seluruh laboran dan karyawan Departemen Biologi FMIPA UI terutama Mbak Asri, Ibu Ida, Ibu Ros, Pak Taryana, Pak Taryono, atas segala bantuan yang telah diberikan selama penyelesaian skripsi ini.
6. A. Zaenal Mustopa, M.Si., Ka Ridwan, Mba Rere, atas segala doa, semangat, dan bantuan dalam menyelesaikan penelitian serta ilmu yang sangat bermanfaat.

7. PT. Telkom Indonesia, Hotel Jayakarta, dan Keluarga Bapak Robert Pasaribu dan Tante Jun yang telah memberikan bantuan material kepada penulis dalam perkuliahan dan penyelesaian skripsi ini.
8. Keluarga tercinta, Ibu (Tuty Ayati), Bapak (Ramli), kakak-kakak (Ka Riesca, Mba Ade, Ka Yono), keponakan-keponakan atas segala doa, kasih sayang, semangat, nasihat, dukungan, dan keceriaan yang selalu diberikan kepada penulis. Semoga penulis dapat membuat Ibu dan Bapak tersenyum bahagia dan bangga.
9. Keluarga Mas Danu & Teh Erni, Mas Candra & Ka Erna, Mas Pipit & Ka Ade, serta Mas Iwan, atas tempat tinggal, doa, dan bantuan yang diberikan kepada penulis selama menyelesaikan skripsi ini.
10. Adela Novisa, sahabat sekaligus rekan kerja yang sama-sama berjuang dalam suka dan duka selama penelitian.
11. Sahabat-sahabat tercinta Windi, Rahma, Ifa, Hanum, Yulita terima kasih atas persahabatan yang selama ini sudah kalian berikan. Terima kasih atas persahabatan yang indah dari Alumni SDN Harapan Baru II (Tito, Gatet, Kris, Masyitah, Okta, Bagas, Risang, Lutfi, Emil, Mirwana), Esha, Lydia, Indri, Keluarga kosan Khairunnisa (Desti, Hesti, Hajar, Gamar, Imas, Endah, Tono, Uwi, Kiki, Riana, Mute, Amal), Lulu, Fajar, Tami, Cumi, Bayu, Wahyu, Putmal, Ncuy, Udin, Aulia, Adis, Ratna dan seluruh anak-anak Blossom (Bio 07) atas dukungan, doa, bantuan, serta pertemanan bagi penulis.

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

Depok, 27 Desember 2011

Penulis

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

---

---

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

Nama : Ratih Cempaka  
NPM : 0706264210  
Program Studi : Biologi S1 Reguler  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis Karya : Skripsi

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:

Pengaruh Berbagai Konsentrasi *Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) terhadap Ekspresi Protein Rekombinan *Jembrana Superficial Unit* (JSU) pGEX-6P1

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari 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 : 27 Desember 2011  
Yang menyatakan



(Ratih Cempaka)

## ABSTRAK

Nama : Ratih Cempaka  
Program Studi : Biologi S1 Reguler  
Judul : Pengaruh Berbagai Konsentrasi *Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) Terhadap Ekspresi Protein Rekombinan *Jembrana Superficial Unit* (JSU) pGEX-6P1

Protein *Jembrana Superficial Unit* (JSU) dapat dijadikan sebagai vaksin untuk pengobatan penyakit Jembrana. Protein JSU, yang dikode oleh gen *env*, disisipkan ke dalam plasmid pGEX-6P1 dan diekspresikan melalui *Escherichia coli* strain BL21 sebagai inangnya. Tujuan penelitian adalah untuk meneliti berbagai pengaruh konsentrasi IPTG terhadap ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1. Sel *E. coli* (pembawa konstruk pGEX-6P1) ditumbuhkan pada medium Luria Betani (LB) cair 50 ml dan diinkubasi pada *shaker incubator* hingga mencapai kepadatan sel (OD) OD<sub>600</sub> 0,6. Induksi *Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) selama 1 jam dengan tiga konsentrasi perlakuan, yaitu 100 μM, 150 μM, dan 200 μM. Sel dipecah dengan dua metode, yaitu *Freeze and thaw* dan sonikasi kemudian pelet hasil pemecahan sel dikoleksi sebagai *inclusion body*. Solubilisasi protein dilakukan dengan menambahkan *solubilize buffer* pada pelet kemudian *dilution buffer* untuk tahap *refolding*. Protein dimurnikan melalui Gluthatione Sepharose 4B dengan metode *batch capture*. Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan ukuran protein JSU pGEX-6P1 yang tepat, yaitu ± 60 kDa pada setiap perlakuan (konsentrasi) IPTG. Pita pada induksi IPTG 100 μM terlihat lebih tebal dibandingkan dengan pita pada induksi 150 μM dan 200 μM. Hasil penelitian disimpulkan bahwa induksi IPTG 100 μM menghasilkan protein rekombinan JSU pGEX-6P1 yang optimal.

Kata kunci : Ekspresi, konsentrasi IPTG, protein rekombinan JSU pGEX-6P1, *refolding*

xiii + 58 hlm : 15 gambar ; 8 lampiran

Daftar referensi : 65 (1979-2011)



## ABSTRACT

Name : Ratih Cempaka  
Study Programme : Reguler Biology S1  
Title : The effect of *Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) Concentrations Againsts the Expression of *Jembrana Superficial Unit* (JSU) pGEX-6P1 Recombinant Protein

*Jembrana Superficial Unit* (JSU) protein can be used as a vaccine material for controlling Jembrana disease. JSU protein that encoded by the env gene was inserted into the plasmid pGEX-6P1 and expressed through the *Escherichia coli* strain of BL21 as a host. The aim of this study was to determine the effect of IPTG concentrations against the expression of JSU pGEX-6P1 recombinant protein. *E. coli* cells (pGEX-6P1 constructs carrier) were grown in 50 ml Luria Bertani (LB) liquid medium and was incubated on a shaker incubator until it reaches the cell density (OD) OD<sub>600</sub> 0.6. Induction of *Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) for 1 hour with three concentrations of the treatment, there are 100 μM, 150 μM, and 200 μM. The cells was disrupted by two methods of cell lysis, Freeze and thaw and sonication, then the pellet was collected as inclusion body. Protein is solubilized by adding a buffer into the pellet and using dilution buffer for refolding step. Proteins purified using Gluthatione Sepharose 4B by batch capture method. The analysis of SDS-PAGE was shown exactly the protein size of JSU pGEX-6P1 ± 60 kDa for each treatment (concentration) IPTG. Band at 100 μM IPTG induction seems thicker than the band on the induction of 150 μM and 200 μM. The study was concluded that 100 μM IPTG induction produces an optimal of JSU pGEX-6P1 recombinant protein.

Keywords : Expression, IPTG concentrations, JSU pGEX-6P1 recombinant protein, *refolding*

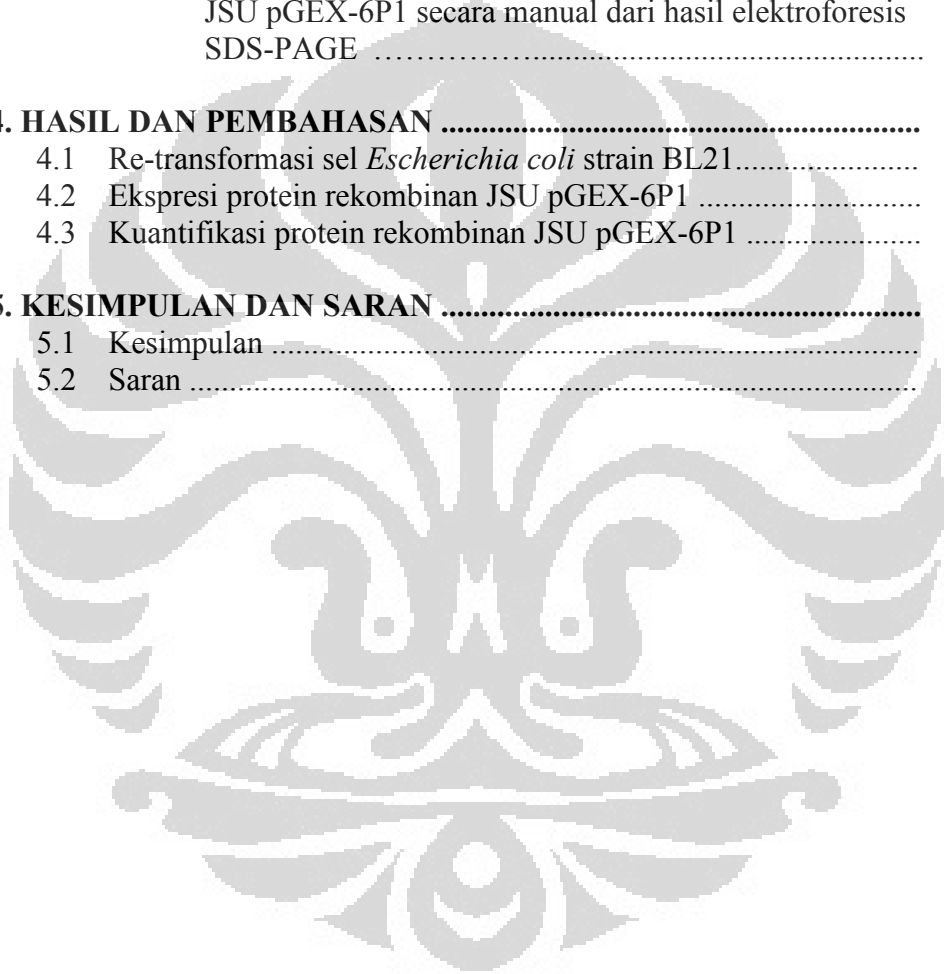
xiii + 58 pages : 15 pictures ; 8 appendages

Reference list : 65 (1979-2011)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....	vii
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACT .....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Penyakit Jembrana .....	4
2.2 Retrovirus .....	5
2.3 Ekspresi gen pada sel prokariot .....	8
2.4 <i>Escherichia coli</i> strain BL21 .....	10
2.5 Vektor ekspresi plasmid pGEX-6P1 .....	11
2.6 <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel</i> (SDS-PAGE) ...	12
2.7 Purifikasi protein .....	14
2.8 Pemecahan sel .....	15
2.9 Solubilisasi protein dan <i>refolding</i> .....	16
2.10 Transformasi sel bakteri .....	18
<b>3. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>19</b>
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	19
3.2 Alat .....	19
3.3 Bahan .....	20
3.3.1 Sampel .....	20
3.3.2 Medium .....	20
3.3.3 Bahan kimia .....	20
3.4 Cara Kerja .....	21
3.4.1 Pembuatan medium, larutan, dan <i>buffer</i> .....	21
3.4.2 Transformasi sel <i>Escherichia coli</i> BL21 .....	21
3.4.2.1 Persiapan cawan petri medium Luria Bertani (LB) padat .....	21
3.4.2.1 Pembuatan sel kompeten <i>Escherichia coli</i> .....	21
3.4.2.3 Transformasi sel <i>Escherichia coli</i> .....	22
3.4.3 Kultur sel <i>Escherichia coli</i> strain BL21 .....	22
3.4.4 Penghitungan <i>optical density</i> (OD) .....	22
3.4.5 Induksi IPTG .....	23
3.4.6 Koleksi pelet .....	23

3.4.7	Pemecahan sel .....	23
3.4.7.1	Metode <i>Freeze and Thaw</i> .....	23
3.4.7.2	Metode sonikasi .....	24
3.4.8	Solubilisasi protein dan <i>refolding</i> .....	24
3.4.8.1	Solubilisasi protein .....	24
3.4.8.2	<i>Refolding</i> .....	24
3.4.9	Purifikasi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 dengan Gluthatione Sepharose 4B.....	25
3.4.10	Analisis protein rekombinan JSU pGEX-6P1 dengan metode SDS-PAGE .....	26
3.4.11	Analisis perhitungan berat molekul protein rekombinan JSU pGEX-6P1 secara manual dari hasil elektroforesis SDS-PAGE .....	27
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>28</b>
4.1	Re-transformasi sel <i>Escherichia coli</i> strain BL21.....	28
4.2	Ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 .....	29
4.3	Kuantifikasi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 .....	37
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>39</b>
5.1	Kesimpulan .....	39
5.2	Saran .....	39



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Peta penyebaran penyakit Jembrana di Indonesia .....	4
Gambar 2.2	Struktur virion Retrovirus .....	6
Gambar 2.3	Proses replikasi Retrovirus .....	8
Gambar 2.4	Struktur molekul <i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside</i> ...	9
Gambar 2.5	Mekanisme <i>operon lac</i> pada sel prokariot .....	10
Gambar 2.6	Peta plasmid pGEX-6P1 .....	12
Gambar 2.7	Perangkat SDS-PAGE .....	13
Gambar 2.8	Prinsip purifikasi dengan protein fusi GST .....	15
Gambar 2.9	Proses pelipatan ( <i>refolding</i> ) protein .....	17
Gambar 4.1	Hasil re-transformasi sel <i>E. coli</i> BL21 .....	29
Gambar 4.2.1	Hasil Elektroforesis SDS-PAGE tahap solubilisasi protein dan <i>refolding</i> (pengulangan 1) .....	30
Gambar 4.2.2	Hasil Elektroforesis SDS-PAGE tahap solubilisasi protein dan <i>refolding</i> (pengulangan 2) .....	32
Gambar 4.2.3	Hasil Elektroforesis SDS-PAGE tahap solubilisasi protein dan <i>refolding</i> (pengulangan 3) .....	33
Gambar 4.2.4	Hasil Elektroforesis SDS-PAGE tahap purifikasi ( <i>inner volume</i> dan <i>washing</i> 1) .....	35
Gambar 4.2.5	Hasil Elektroforesis SDS-PAGE tahap purifikasi (elusi 1 dan elusi 2) .....	36

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.3.1	Hasil kuantifikasi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 (hasil solubilisasi) .....	38
Tabel 4.3.2	Hasil kuantifikasi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 (hasil <i>refolding</i> ) .....	38

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema cara kerja .....	47
Lampiran 2	Pembuatan medium, larutan, dan <i>buffer</i> .....	48
Lampiran 3	Perhitungan konsentrasi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 dari sampel hasil solubilisasi .....	54
Lampiran 4	Proses ekspresi protein rekombinan yang membentuk <i>inclusion body</i> .....	55
Lampiran 5	Marker protein Dual Color .....	56
Lampiran 6	Grafik dan Hasil perhitungan berat molekul protein JSU pGEX-6P1 pada pengulangan 1 .....	57
Lampiran 7	Grafik dan Hasil perhitungan berat molekul protein JSU pGEX-6P1 pada pengulangan 2 .....	58
Lampiran 8	Grafik dan Hasil perhitungan berat molekul protein JSU pGEX-6P1 pada pengulangan 3 .....	59

## BAB 1 PENDAHULUAN

Penyakit jembrana merupakan salah satu penyakit endemis yang hanya menyerang sapi Bali dan ditemukan hanya di Indonesia. Penyakit Jembrana terjadi pertama kali di Desa Sangkaragung, Kabupaten Jembrana, Bali pada tahun 1964. Pada awal penyebarannya, Jembrana telah menginfeksi sekitar 60.000 ekor sapi dari total populasi 300.000 sapi Bali dalam waktu kurang dari satu tahun (Soeharsono 1995: 367). Selain Kabupaten Jembrana, penyakit tersebut juga sudah menyebar ke daerah-daerah lain seperti Tabanan (1971), Karangasem (1981), Lampung (1976), Jawa Timur (1978), Sumatera Barat dan Kalimantan Selatan (1992), dan Bengkulu (1995) (Ditcham 2007: 16). Penyakit Jembrana ditandai dengan demam tinggi, pembengkakkan kelenjar limfe, dan diare yang bercampur dengan darah. Gejala-gejala lain diantaranya depresi, anoreksia, keringat darah, dan pendarahan di bawah kulit (Hartaningsih 2003: 40).

Penyakit Jembrana disebabkan oleh *Jembrana Disease Virus* (JDV) yang termasuk dalam kelompok Retrovirus. *Jembrana Disease Virus* (JDV) mengandung gen yang umum pada Retrovirus seperti gen *gag*, *pol*, *env*, dan *long terminal repeat* (ltr). Gen *gag* mengkode protein kapsid, matriks, dan nukleoprotein; gen *pol* mengkode enzim *polymerase*, integrase, dan *reverse transcriptase*; sementara gen *env* mengkode protein *transmembran* (TM) dan *superficial unit* (SU) yang berada masing-masing pada transmembran dan permukaan virus (Ditcham 2007: 23; Margawati & Ridwan 2009: 167).

Penyakit Jembrana diketahui hanya menyerang sapi Bali yang merupakan komoditas utama sapi potong di Indonesia. Sapi Bali memiliki banyak kelebihan, yaitu memiliki adaptasi lingkungan yang tinggi, tenaga kerja yang tangguh, fertilitas tinggi sekitar 83%, dan memiliki persentase karkas (bagian tubuh ternak yang disembelih selain kepala, kulit, jeroan, kaki bawah, dan ekor) yang tinggi sekitar 60% dibandingkan dengan sapi potong lainnya (Ditcham 2007: 19; Widiyanti *dkk.* 2009: 57). Penyakit Jembrana dapat merugikan dan menghambat pertumbuhan sapi Bali yang hakikatnya memiliki nilai ekonomis tinggi. Oleh

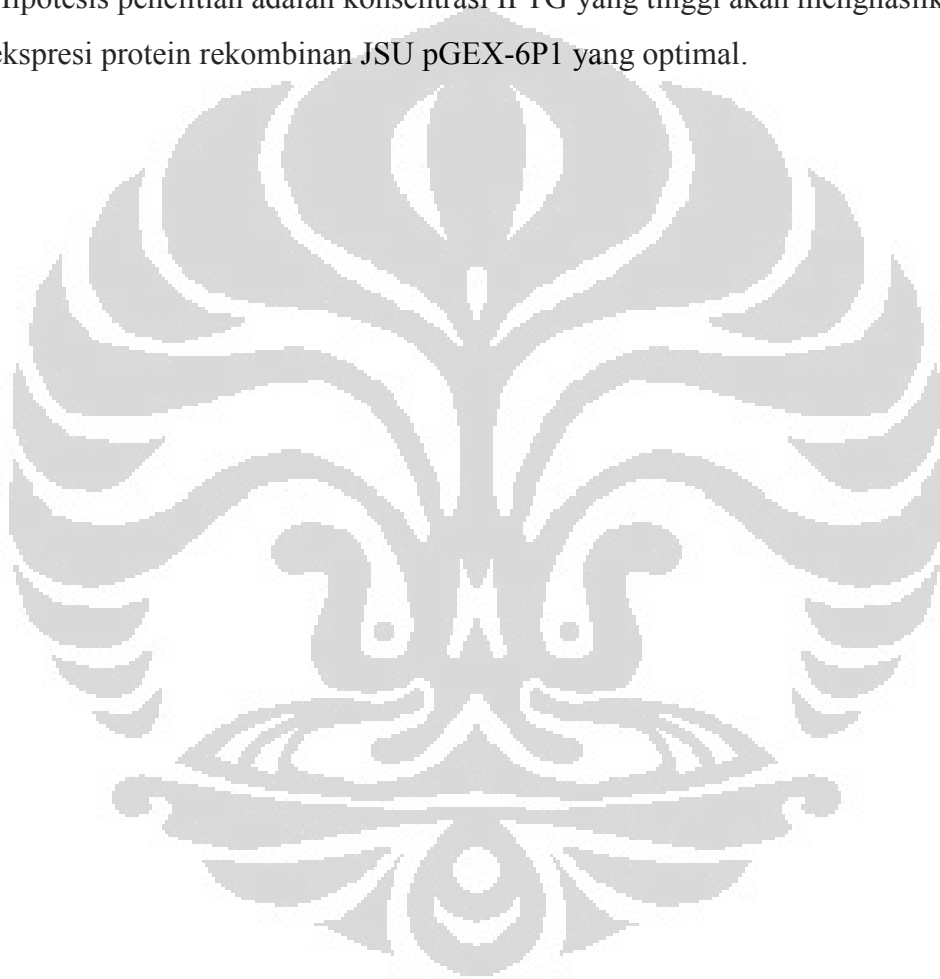
karena itu, pemerintah melakukan berbagai upaya untuk menanggulangi penyebaran penyakit Jembrana di Indonesia.

Upaya pencegahan penyakit Jembrana pertama kali dilakukan dengan menggunakan vaksin yang berasal dari limpa sapi Bali yang terinfeksi *Jembrana Disease Virus* (JDV). Vaksin tersebut dinamakan *crude vaccine*. *Crude vaccine* memiliki kelemahan, yaitu memiliki daya imunogenitas rendah, tidak stabil, mahal, produksinya terbatas, dan hanya mampu menginduksi kekebalan dengan tingkat proteksi 70%, sehingga tidak efektif untuk pencegahan dan penanggulangan penyebaran penyakit Jembrana (Widiyanti *dkk.* 2009: 58). Berdasarkan alasan di atas, maka diperlukan pengembangan vaksin dengan pendekatan teknologi protein rekombinan untuk meningkatkan kualitas vaksin penyakit Jembrana.

Laboratorium Biologi Molekuler Hewan, LIPI, Cibinong, sebelumnya telah melakukan upaya pengembangan vaksin penyakit Jembrana dengan menggunakan protein rekombinan JTat. Protein JTat diproduksi dengan sistem pGEX dan menggunakan GST-tag sebagai fusi protein. Namun, protein JTat pGEX dianggap kurang efektif sebagai vaksin penyakit Jembrana. Hal tersebut dikarenakan ukuran protein JTat pGEX ( $\pm 10,7$  kDa) yang lebih kecil dibandingkan dengan ukuran GST-tag ( $\pm 26$  kDa) sehingga tidak diketahui pasti apakah tubuh sapi merespon GST-tag atau protein JTat tersebut (Margawati *dkk.* 2006: 10). Protein rekombinan lainnya yang dapat digunakan sebagai vaksin Jembrana adalah *Jembrana Superficial Unit* (JSU). Protein JSU memediasi masuknya virus ke dalam sel target dan sangat potensial sebagai vaksin karena dapat menghalangi pengenalan reseptor sehingga dapat mencegah proses masuknya virus ke dalam sel (Ditcham 2007: 50). Penelitian ini menggunakan protein JSU, yang dikode oleh gen *env*, lalu disisipkan ke dalam plasmid pGEX-6P1 dan diekspresikan melalui *Escherichia coli* strain BL21 sebagai inangnya.

Proses produksi vaksin dalam skala besar masih banyak hal yang perlu dipelajari. Salah satu diantaranya adalah diperlukan optimasi untuk mengetahui konsentrasi *Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside* (IPTG) yang tepat dalam menginduksi terjadinya ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1. *Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside* (IPTG) merupakan senyawa yang memiliki struktur

mirip laktosa dan berfungsi sebagai penginduksi ekspresi gen di bawah kontrol promoter *lac* (Yildir *dkk.* 1998: 221). Optimasi induksi IPTG tersebut akan sangat berguna untuk memberikan efisiensi waktu dan biaya produksi vaksin dalam skala besar. Penelitian ini bertujuan untuk meneliti pengaruh berbagai konsentrasi IPTG terhadap ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1. Hasil penelitian akan memberikan informasi tentang konsentrasi IPTG yang tepat untuk menghasilkan ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 yang optimal. Hipotesis penelitian adalah konsentrasi IPTG yang tinggi akan menghasilkan ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 yang optimal.





## BAB 1 PENDAHULUAN

Penyakit jembrana merupakan salah satu penyakit endemis yang hanya menyerang sapi Bali dan ditemukan hanya di Indonesia. Penyakit Jembrana terjadi pertama kali di Desa Sangkaragung, Kabupaten Jembrana, Bali pada tahun 1964. Pada awal penyebarannya, Jembrana telah menginfeksi sekitar 60.000 ekor sapi dari total populasi 300.000 sapi Bali dalam waktu kurang dari satu tahun (Soeharsono 1995: 367). Selain Kabupaten Jembrana, penyakit tersebut juga sudah menyebar ke daerah-daerah lain seperti Tabanan (1971), Karangasem (1981), Lampung (1976), Jawa Timur (1978), Sumatera Barat dan Kalimantan Selatan (1992), dan Bengkulu (1995) (Ditcham 2007: 16). Penyakit Jembrana ditandai dengan demam tinggi, pembengkakkan kelenjar limfe, dan diare yang bercampur dengan darah. Gejala-gejala lain diantaranya depresi, anoreksia, keringat darah, dan pendarahan di bawah kulit (Hartaningsih 2003: 40).

Penyakit Jembrana disebabkan oleh *Jembrana Disease Virus* (JDV) yang termasuk dalam kelompok Retrovirus. *Jembrana Disease Virus* (JDV) mengandung gen yang umum pada Retrovirus seperti gen *gag*, *pol*, *env*, dan *long terminal repeat* (ltr). Gen *gag* mengkode protein kapsid, matriks, dan nukleoprotein; gen *pol* mengkode enzim *polymerase*, integrase, dan *reverse transcriptase*; sementara gen *env* mengkode protein *transmembran* (TM) dan *superficial unit* (SU) yang berada masing-masing pada transmembran dan permukaan virus (Ditcham 2007: 23; Margawati & Ridwan 2009: 167).

Penyakit Jembrana diketahui hanya menyerang sapi Bali yang merupakan komoditas utama sapi potong di Indonesia. Sapi Bali memiliki banyak kelebihan, yaitu memiliki adaptasi lingkungan yang tinggi, tenaga kerja yang tangguh, fertilitas tinggi sekitar 83%, dan memiliki persentase karkas (bagian tubuh ternak yang disembelih selain kepala, kulit, jeroan, kaki bawah, dan ekor) yang tinggi sekitar 60% dibandingkan dengan sapi potong lainnya (Ditcham 2007: 19; Widiyanti *dkk.* 2009: 57). Penyakit Jembrana dapat merugikan dan menghambat pertumbuhan sapi Bali yang hakikatnya memiliki nilai ekonomis tinggi. Oleh

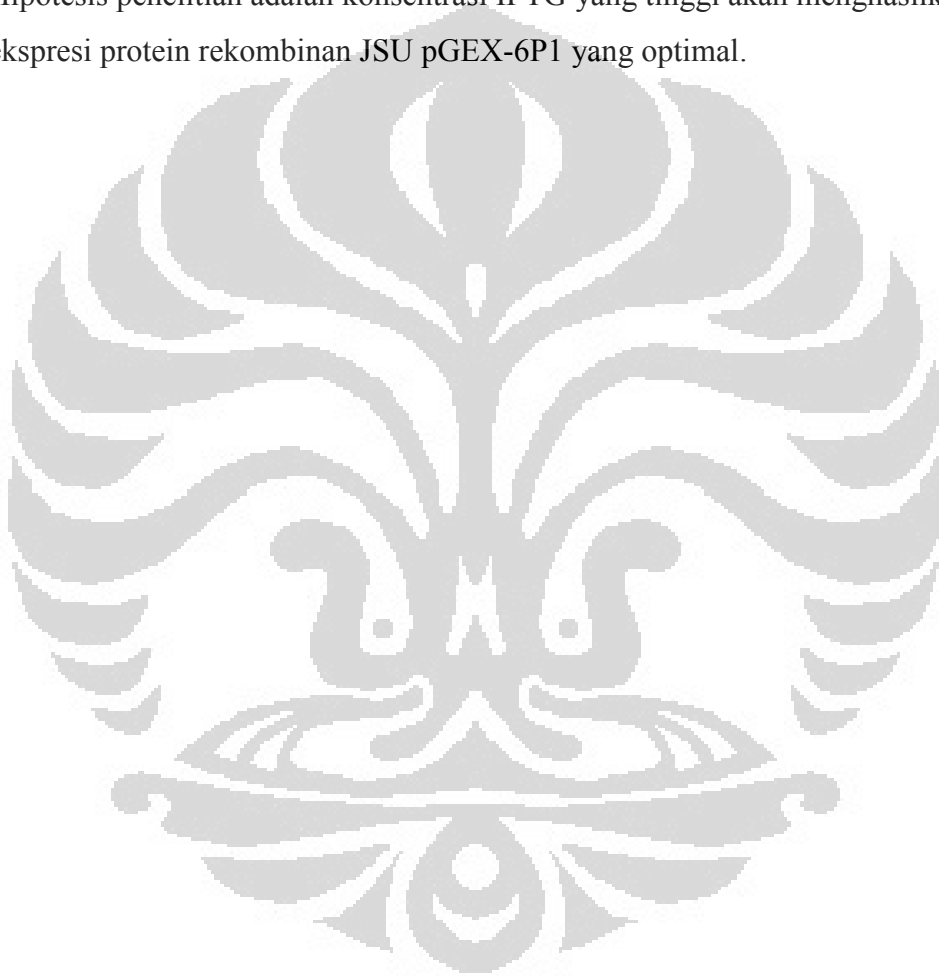
karena itu, pemerintah melakukan berbagai upaya untuk menanggulangi penyebaran penyakit Jembrana di Indonesia.

Upaya pencegahan penyakit Jembrana pertama kali dilakukan dengan menggunakan vaksin yang berasal dari limpa sapi Bali yang terinfeksi *Jembrana Disease Virus* (JDV). Vaksin tersebut dinamakan *crude vaccine*. *Crude vaccine* memiliki kelemahan, yaitu memiliki daya imunogenitas rendah, tidak stabil, mahal, produksinya terbatas, dan hanya mampu menginduksi kekebalan dengan tingkat proteksi 70%, sehingga tidak efektif untuk pencegahan dan penanggulangan penyebaran penyakit Jembrana (Widiyanti *dkk.* 2009: 58). Berdasarkan alasan di atas, maka diperlukan pengembangan vaksin dengan pendekatan teknologi protein rekombinan untuk meningkatkan kualitas vaksin penyakit Jembrana.

Laboratorium Biologi Molekuler Hewan, LIPI, Cibinong, sebelumnya telah melakukan upaya pengembangan vaksin penyakit Jembrana dengan menggunakan protein rekombinan JTat. Protein JTat diproduksi dengan sistem pGEX dan menggunakan GST-tag sebagai fusi protein. Namun, protein JTat pGEX dianggap kurang efektif sebagai vaksin penyakit Jembrana. Hal tersebut dikarenakan ukuran protein JTat pGEX ( $\pm 10,7$  kDa) yang lebih kecil dibandingkan dengan ukuran GST-tag ( $\pm 26$  kDa) sehingga tidak diketahui pasti apakah tubuh sapi merespon GST-tag atau protein JTat tersebut (Margawati *dkk.* 2006: 10). Protein rekombinan lainnya yang dapat digunakan sebagai vaksin Jembrana adalah *Jembrana Superficial Unit* (JSU). Protein JSU memediasi masuknya virus ke dalam sel target dan sangat potensial sebagai vaksin karena dapat menghalangi pengenalan reseptor sehingga dapat mencegah proses masuknya virus ke dalam sel (Ditcham 2007: 50). Penelitian ini menggunakan protein JSU, yang dikode oleh gen *env*, lalu disisipkan ke dalam plasmid pGEX-6P1 dan diekspresikan melalui *Escherichia coli* strain BL21 sebagai inangnya.

Proses produksi vaksin dalam skala besar masih banyak hal yang perlu dipelajari. Salah satu diantaranya adalah diperlukan optimasi untuk mengetahui konsentrasi *Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside* (IPTG) yang tepat dalam menginduksi terjadinya ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1. *Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside* (IPTG) merupakan senyawa yang memiliki struktur

mirip laktosa dan berfungsi sebagai penginduksi ekspresi gen di bawah kontrol promoter *lac* (Yildir *dkk.* 1998: 221). Optimasi induksi IPTG tersebut akan sangat berguna untuk memberikan efisiensi waktu dan biaya produksi vaksin dalam skala besar. Penelitian ini bertujuan untuk meneliti pengaruh berbagai konsentrasi IPTG terhadap ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1. Hasil penelitian akan memberikan informasi tentang konsentrasi IPTG yang tepat untuk menghasilkan ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 yang optimal. Hipotesis penelitian adalah konsentrasi IPTG yang tinggi akan menghasilkan ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 yang optimal.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Penyakit Jembrana

Penyakit Jembrana adalah penyakit viral akut yang dapat menyebabkan kematian pada sapi Bali. Dinamakan Jembrana karena penyakit tersebut pertama kali menyerang sapi Bali di Desa Sangkaragung, Kabupaten Jembrana, Bali pada tahun 1964. Penyakit Jembrana menyerang sapi dewasa dengan kisaran usia 3 - 4 tahun. Peta penyebaran penyakit Jembrana dapat dilihat pada Gambar 2.1. (Hartaningsih 2003: 38; Ditcham 2007: 16).



Gambar 2.1. Peta penyebaran penyakit Jembrana di Indonesia  
[Sumber: Ditcham 2007: 16]

Penyakit Jembrana memiliki masa inkubasi berkisar antara 5-12 hari. Gejala awal penyakit Jembrana ditandai dengan meningkatnya suhu tubuh sapi hingga mencapai 40-42 °C selama 3-5 hari. Kenaikan suhu tersebut disertai dengan hilangnya nafsu makan dan gejala keletihan. Gejala yang muncul berikutnya, yaitu pengeluaran cairan lendir yang berlebihan pada hidung, keluarnya keringat yang menyerupai darah pada daerah panggul, punggung, perut, dan skrotum, dan hipersalivasi. Cairan lendir pada awalnya bersifat encer dan bening, lalu berubah menjadi kental seperti cairan mukosa. Selanjutnya sapi akan

mengalami pembengkakan dan pembesaran kelenjar limfe *superficial*, yang diawali dengan pembengkakan kelenjar limfe preskapularis dan diikuti dengan pembengkakan kelenjar limfe prefemoralis. Pembengkakan tersebut dapat berukuran sebesar kepalan tangan manusia dewasa sehingga mudah terlihat oleh mata. Bulu sapi yang menderita Jembrana menjadi kasar, kurang mengkilat, dan berdiri. Gejala-gejala lain dari penyakit Jembrana adalah pendarahan selaput lendir pada alat kelamin, diare yang bercampur darah, depresi, ritme pernapasan dan denyut nadi cepat (Hartaningsih 2003: 40).

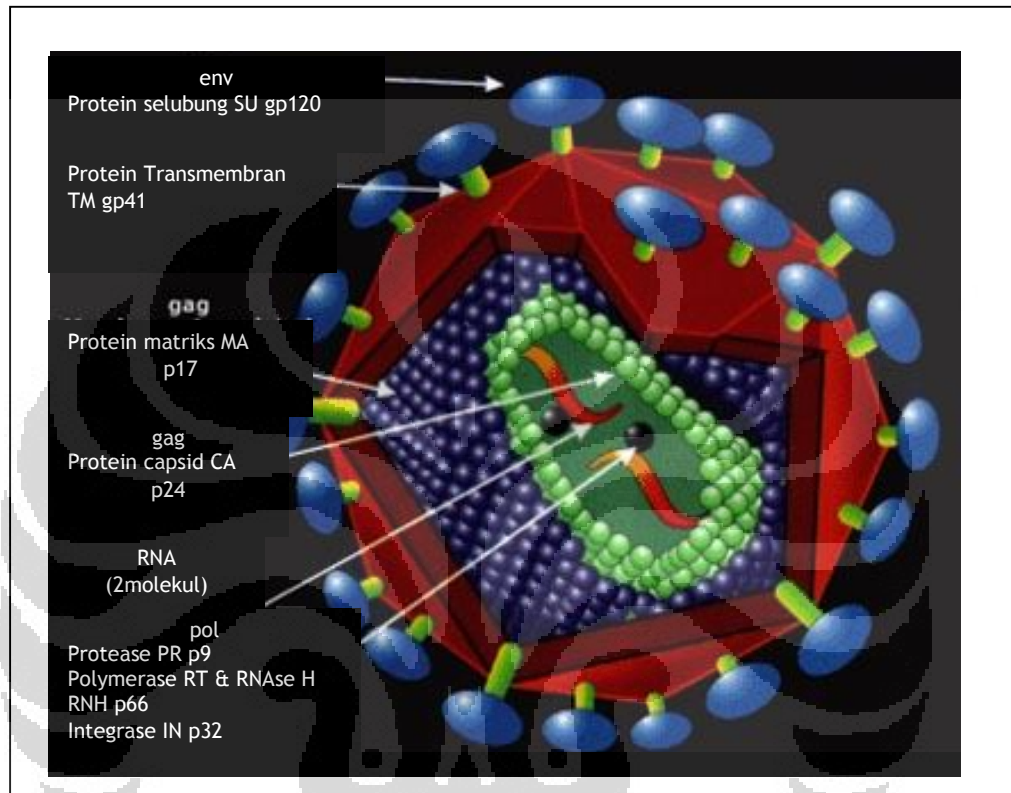
Penyebab penyakit Jembrana adalah *Jembrana Disease Virus* (JDV) yang termasuk dalam famili *Retroviridae* dan genus *Lentivirinae*. *Jembrana Disease Virus* (JDV) memiliki gen yang umum pada Retrovirus seperti gen *gag*, *pol*, *env*, dan *long terminal repeat* (*ltr*) (Margawati & Ridwan 2009: 167). JDV berukuran antara 50-90 nm, gen JDV mengandung nukleotida kecil yang bervariasi hingga 33 bp di daerah gen *env* dan *open reading frame* (ORF) (Hartaningsih 2003: 40).

## 2.2. Retrovirus

Retrovirus merupakan kelompok virus yang termasuk dalam famili *Retroviridae*. Retrovirus terdiri atas satu untai tunggal RNA, dan memerlukan enzim *reverse transcriptase* untuk melakukan transkripsi balik dari RNA menjadi DNA. Bentuk Retrovirus membulat dan memiliki diameter 80-130 nm. Retrovirus memiliki tujuh genus, yaitu *Alpharetrovirinae*, *Betaretrovirinae*, *Gammaretrovirinae*, *Deltaretrovirinae*, *Epsilonretrovirinae*, *Lentivirinae*, dan *Spumavirinae* (Ditcham 2007: 21; Madigan *dkk.* 2009: 262; Widiyanti *dkk.* 2009: 21).

Tiga gen utama pengkode protein virion pada Retrovirus adalah gen *gag*, *pol*, dan *env*. Gen *gag* mengkode protein internal berupa kapsid, matriks, dan nukleoprotein; gen *pol* mengkode enzim *reverse transcriptase*, *polymerase*, dan integrase; serta gen *env* mengkode protein selubung virus, yaitu *Superficial Unit* (SU) dan *Transmembrane* (TM). SU memiliki 422 asam amino, sedangkan TM memiliki 359 asam amino. Struktur virion dan protein yang terdapat pada

Retrovirus dapat dilihat pada Gambar 2.2. Retrovirus memiliki domain gen tambahan, yaitu gen *pro* yang mengkode protease virion virus dan *long terminal repeat* (*ltr*) yang berperan dalam proses replikasi (Coffin 1979: 1; Wolfe 1993: 229; Gaffar 2007: 6; Lewis 2008: 12).



Gambar 2.2. Struktur virion retrovirus  
[Sumber: Nolan 2006: 3]

Proses replikasi Retrovirus secara umum dimulai ketika virus memasuki sel inang sampai terbentuknya partikel virus baru. Proses replikasi Retrovirus dapat dilihat pada Gambar 2.3. Menurut Wolfe (1993: 229-230), Nolan (2006: 6), dan Gaffar (2007: 8), tahapan replikasi Retrovirus secara umum adalah sebagai berikut:

#### 1. Penempelan virion virus

Proses replikasi Retrovirus diawali dengan penempelan protein selubung virus pada reseptor permukaan sel inang yang spesifik. Protein yang dapat mengenali reseptor pada permukaan sel tertentu adalah protein *envelope* virus. Penempelan tersebut menyebabkan terjadinya fusi antara membran sel inang dan virus sehingga virion virus dapat masuk ke dalam sel.

## 2. Penetrasi virion virus dan pelepasan *envelope*

Penetrasi adalah proses masuknya virion virus ke dalam sitoplasma melalui proses endositosis. Virion virus yang telah masuk ke dalam sel kemudian mengalami pelepasan *envelope* dan dilanjutkan dengan proses transkripsi balik RNA genom virus menjadi DNA viral dengan bantuan enzim *reverse transcriptase* (RT).

## 3. Integrasi materi genetik virus

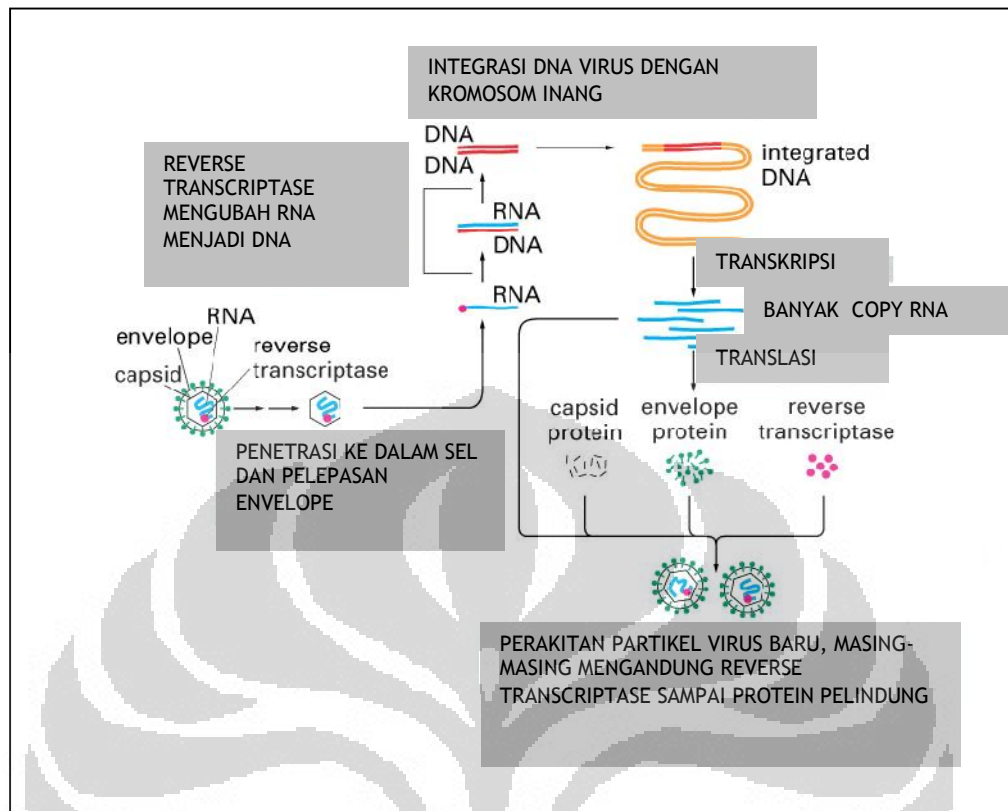
DNA viral yang terbentuk pada proses transkripsi balik akan masuk ke dalam inti sel dan berintegrasi dengan DNA kromosom sel inang dengan bantuan enzim integrase. DNA virus yang telah terintegrasi pada DNA kromosom sel inang disebut dengan provirus.

## 4. Tahap sintesis virus baru

Proses sintesis virus baru diawali dengan teraktivasinya sel inang yang mengandung provirus. Hal tersebut menyebabkan terjadinya proses transkripsi untuk menghasilkan materi genetik (RNA) virus dan proses translasi untuk menghasilkan prekursor enzim serta protein-protein struktural yang dibutuhkan dalam sintesis virion virus baru.

## 5. *Assembly* dan maturasi

Protein virion yang telah dirakit kemudian dikumpulkan dan selanjutnya terjadi proses *budding* (pelepasan virus-virus baru). Virus kemudian mengalami proses maturasi dengan bantuan enzim protease kemudian virus akan keluar dari sel yang telah diinfeksi.



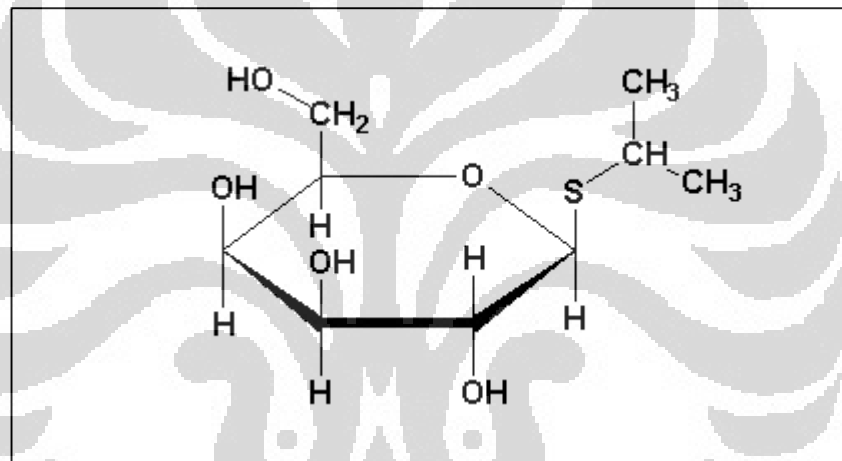
Gambar 2.3. Proses replikasi retrovirus  
[Sumber: Lander 1994: 1]

### 2.3. Ekspresi gen pada sel prokariot

Ekspresi gen merupakan proses transkripsi DNA menjadi RNA yang selanjutnya ditranslasi menjadi polipeptida spesifik (Madigan *dkk.* 2009: 225). Pengaturan ekspresi gen pada sel prokariot dinamakan konsep operon, yaitu proses ekspresi gen struktural dengan menggunakan satu promotor yang sama. Tiga elemen utama gen regulator dalam konsep operon adalah promotor, operator, dan terminator. Promotor adalah sekuen DNA spesifik yang dapat dikenali oleh RNA polimerase sehingga proses transkripsi dapat berjalan. Operator adalah sekuen nukleotida yang terletak diantara promotor dan gen struktural dan merupakan tempat pelekatan protein represor. Terminator adalah sekuen DNA yang terletak di sebelah hilir gen struktural dan berperan dalam memberikan sinyal terhadap RNA polimerase untuk menghentikan proses transkripsi (Yuwono 2005: 138-139 & 141).

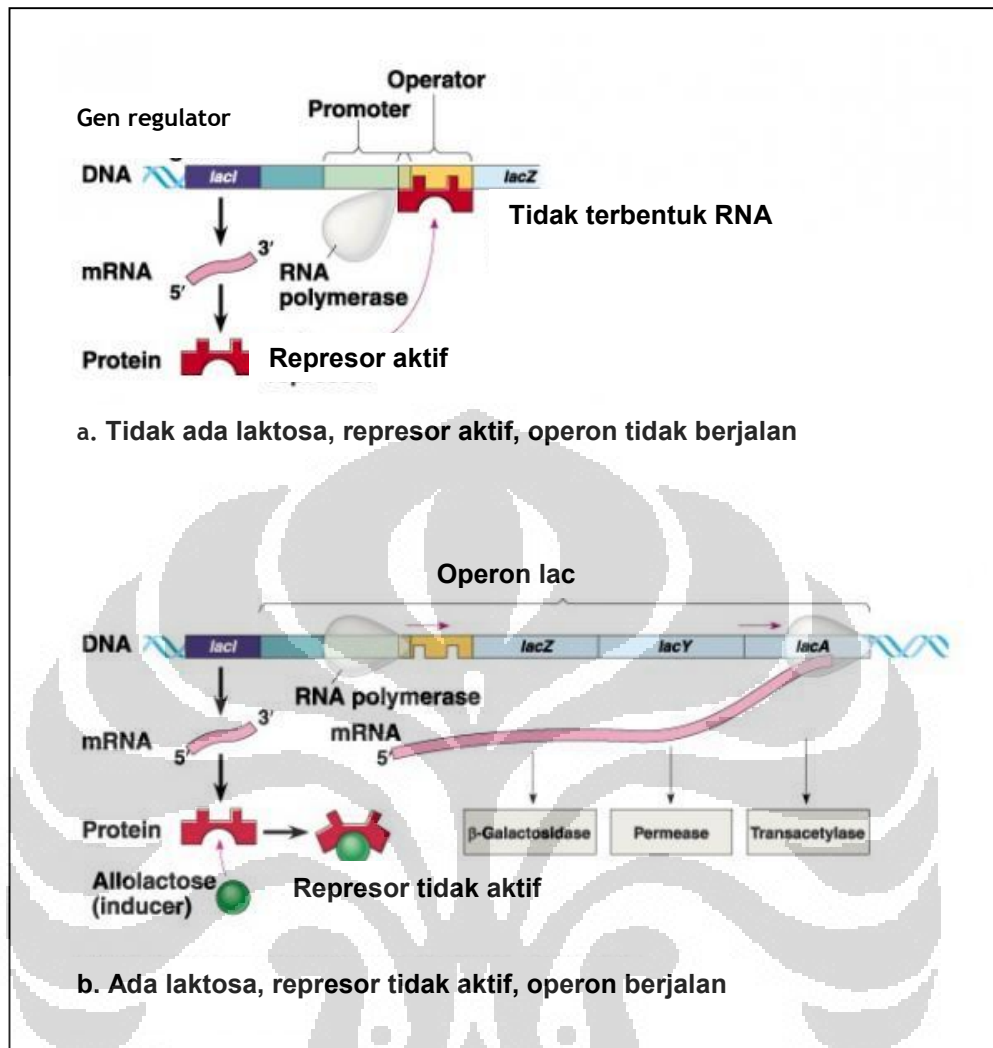


Salah satu konsep operon yang digunakan untuk mengekspresikan gen asing sehingga dapat mengekspresikan suatu protein rekombinan adalah sistem *operon lac* (operon laktosa). *Operon lac* memiliki tiga gen struktural, yaitu *gen lac Z*, *lac Y*, dan *lac A*, yang masing-masing mengatur ekspresi enzim  $\beta$ -galaktosidase, *permease*, dan *trans-asetilase* (Yildir dkk. 1998: 221). Mekanisme ekspresi gen asing dalam sel prokariot seperti *E. coli* dapat dilakukan melalui induksi *Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside* (IPTG). IPTG, seperti dikatakan oleh Yildir dkk. (1998: 221), merupakan senyawa yang memiliki struktur mirip laktosa dan berfungsi sebagai penginduksi ekspresi gen di bawah kontrol promoter *lac*. Struktur molekul IPTG dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Struktur molekul *Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside*  
[Sumber: Jakubowski 2011: 1]

Proses induksi IPTG diawali dengan terjadinya ikatan antara IPTG (*inducer*) dengan protein represor. Ikatan tersebut mengakibatkan represor terinaktivasi dan tidak dapat berikatan dengan operator sehingga RNA polimerase sel inang dapat memulai proses transkripsi gen struktural yang selanjutnya akan ditranslasi menjadi protein yang diinginkan. Apabila tidak terdapat IPTG (*inducer*), maka protein represor akan berikatan dengan operator dan mencegah RNA polimerase untuk dapat mentranskripsi gen asing sehingga tidak dapat ditranslasi menjadi suatu protein rekombinan (Fairbanks & Andersen 1999: 219-220; Snustad & Simmons 2003: 578-579). Mekanisme *operon lac* dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Mekanisme *operon lac* pada sel prokariot  
 [Sumber: Ganesh 2010: 1]

#### 2.4. *Escherichia coli* strain BL21

*Escherichia coli* banyak digunakan sebagai inang untuk ekspresi protein rekombinan. *Escherichia coli* memiliki beberapa keunggulan diantaranya mudah dikultur, genom dapat dimanipulasi, dapat ditransformasi DNA asing, dan dapat bereplikasi dalam waktu yang singkat sehingga dapat menghasilkan protein dalam jumlah besar (Brock *dkk.* 1994: 295). Namun sebagai sistem ekspresi *E. coli* mempunyai kelemahan yaitu tidak mempunyai membran inti atau organel sel lain seperti eukariotik, sehingga protein rekombinan yang dihasilkan umumnya berbentuk pelet (*inclusion body*). Proses ekspresi protein yang membentuk

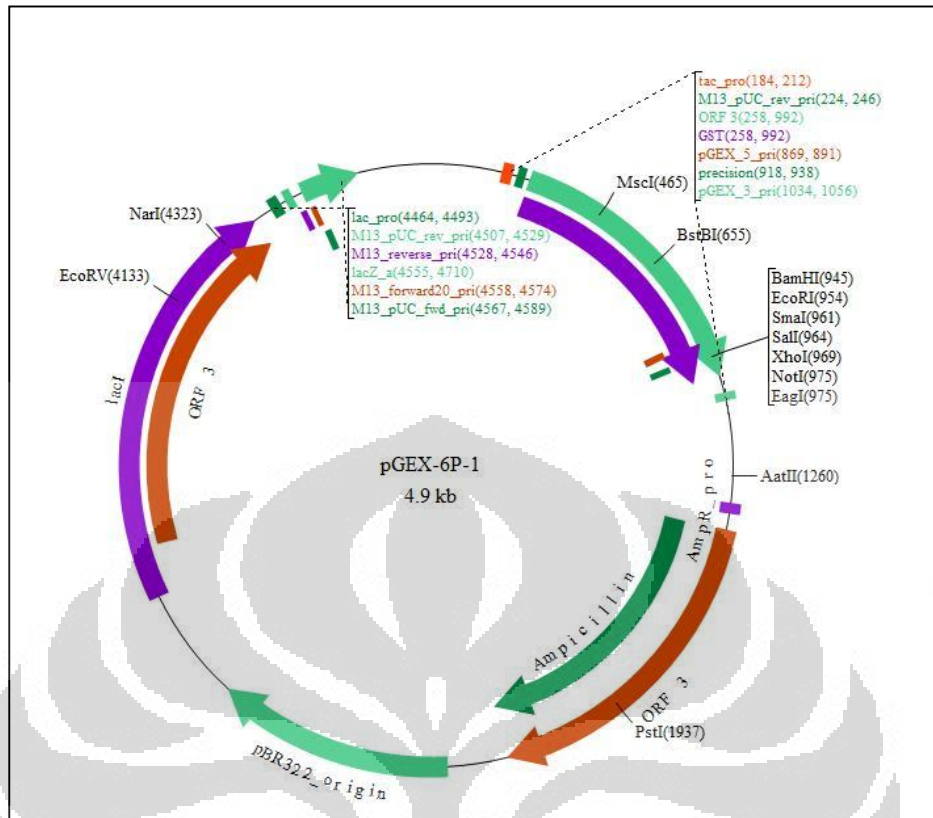
*inclusion body* dapat dilihat pada Lampiran 3. Bakteri *E. coli* berbentuk batang dengan genom sekitar 4,5 juta bp dan memiliki banyak strain yang telah dikarakterisasi (Davis *dkk.* 1994: 47). *Escherichia coli* BL21 memiliki beberapa strain, yaitu *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) pLysE, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (LaVallie 1995: 5.1.1; Muharsini 2005: 105).

Sel *E. coli* BL21 memiliki defisiensi terhadap protease karena terjadinya mutasi pada *gen ompT* dan *lon*. Defisiensi tersebut, menurut Nick (2007: 1), dapat mengurangi terjadinya degradasi protein rekombinan yang diekspresikan di dalam sel inang sehingga dapat menghasilkan protein rekombinan dalam jumlah banyak. Genotipe *E. coli* BL21 terdiri atas F *ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (Nick 2007: 1).

## 2.5. Vektor ekspresi plasmid pGEX-6P1

Vektor merupakan sarana pembawa fragmen gen target ke dalam sel inang. Vektor memiliki beberapa syarat diantaranya harus mampu disisipi DNA asing, dapat diintroduksi ke dalam sel inang, dapat bereplikasi secara independen di dalam sel inang, dan memiliki penanda seleksi. Berdasarkan Wolfe (1993: 281), vektor terdiri atas beberapa macam diantaranya plasmid, *bakteriophage*, kosmid, *bacterial artificial chromosome* (BAC), dan *yeast artificial chromosome* (YAC).

Salah satu plasmid yang dapat digunakan sebagai vektor ekspresi adalah plasmid pGEX-6P1. Plasmid pGEX-6P1 berukuran 4984 bp dan mampu mengekspresikan gen asing yang dapat diinduksi oleh IPTG. Peta plasmid pGEX-6P1 dapat dilihat pada Gambar 2.6. Plasmid pGEX-6P1 digunakan dalam berbagai penelitian untuk menghasilkan protein target dalam sel bakteri *E. coli* (Amersham Biosciences 2002: 9-11).



Gambar 2.6. Peta plasmid pGEX-6P1

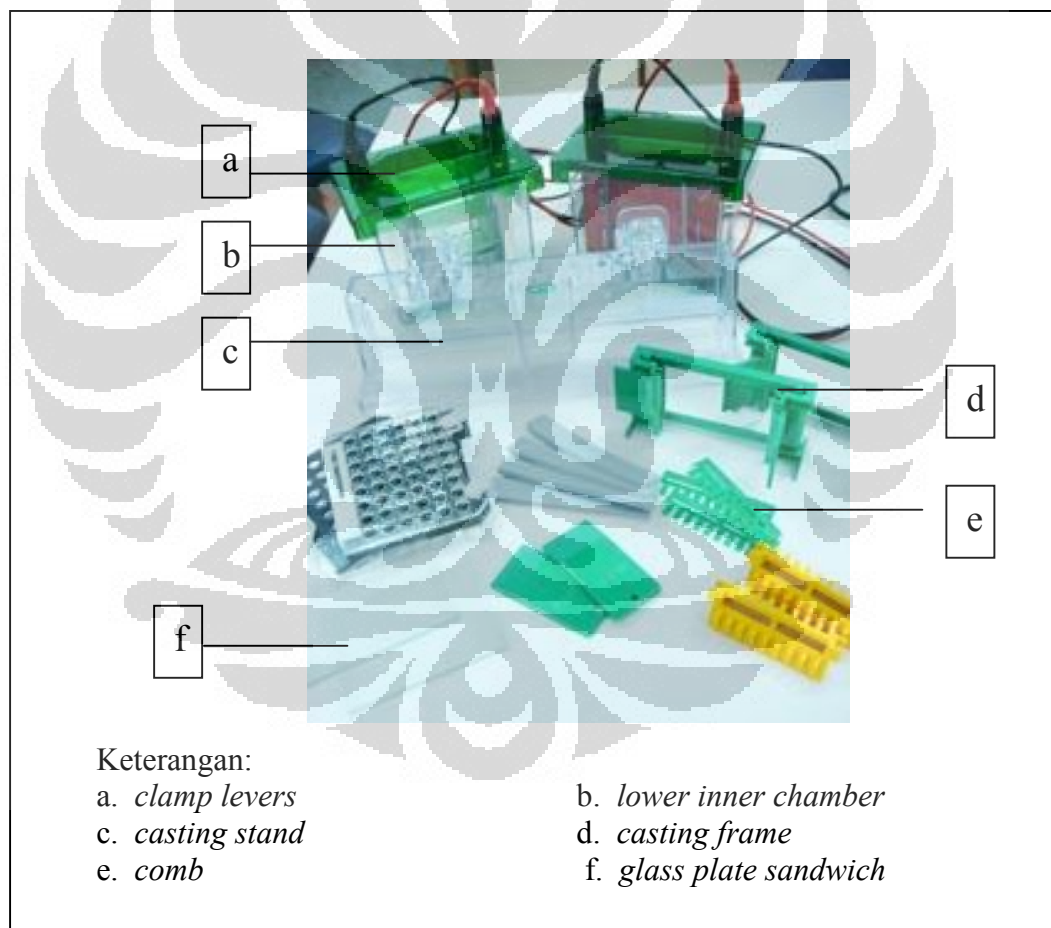
[Sumber: Amersham Bioscience 2002: 1]

## 2.6. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel* (SDS-PAGE)

Elektroforesis merupakan suatu teknik untuk memisahkan molekul bermuatan di dalam medan listrik (Brown 1991: 43). Elektroforesis digunakan untuk memisahkan protein spesifik dan fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda. Teknik tersebut banyak digunakan untuk menentukan ukuran dari suatu fragmen DNA, menentukan berat molekul suatu protein, menentukan titik isoelektrik protein, dan menentukan kemurnian suatu protein yang telah diisolasi. Gel yang umum digunakan sebagai matriks dalam elektroforesis, yaitu agarosa dan poliakrilamid (Seidman & Moore 2000: 582&583).

Teknik SDS-PAGE merupakan metode elektroforesis untuk protein dalam kondisi terdenaturasi. SDS-PAGE dikenal pula dengan istilah elektroforesis gel poliakrilamid. Poliakrilamid merupakan polimer dari akrilamid dan memiliki ukuran pori-pori yang bervariasi tergantung dari konsentrasi akrilamid yang digunakan. Gel poliakrilamid mampu memisahkan molekul DNA

dengan ukuran sekitar 50-500 bp, namun dapat juga digunakan untuk memisahkan DNA sampai ukuran 1000 bp tergantung pada persentase konsentrasi akrilamid yang digunakan. *Sodium dodecyl sulphate* (SDS) adalah senyawa deterjen bermuatan negatif yang dapat melarutkan molekul hidrofobik dan memberikan muatan negatif terhadap protein sehingga protein tersebut bermigrasi menuju kutub positif ketika dialiri arus listrik (Fairbanks & Andersen 1999: 282). Perangkat SDS-PAGE diantaranya adalah *Glass plate sandwich (short plate & spacer plate)*, *casting frame*, *casting stand*, *comb*, *electrode assembly*, *lower inner chamber*, dan *clamp levers* (Gallagher 1995: 10.1.29-30). Perangkat SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7. Perangkat SDS-PAGE

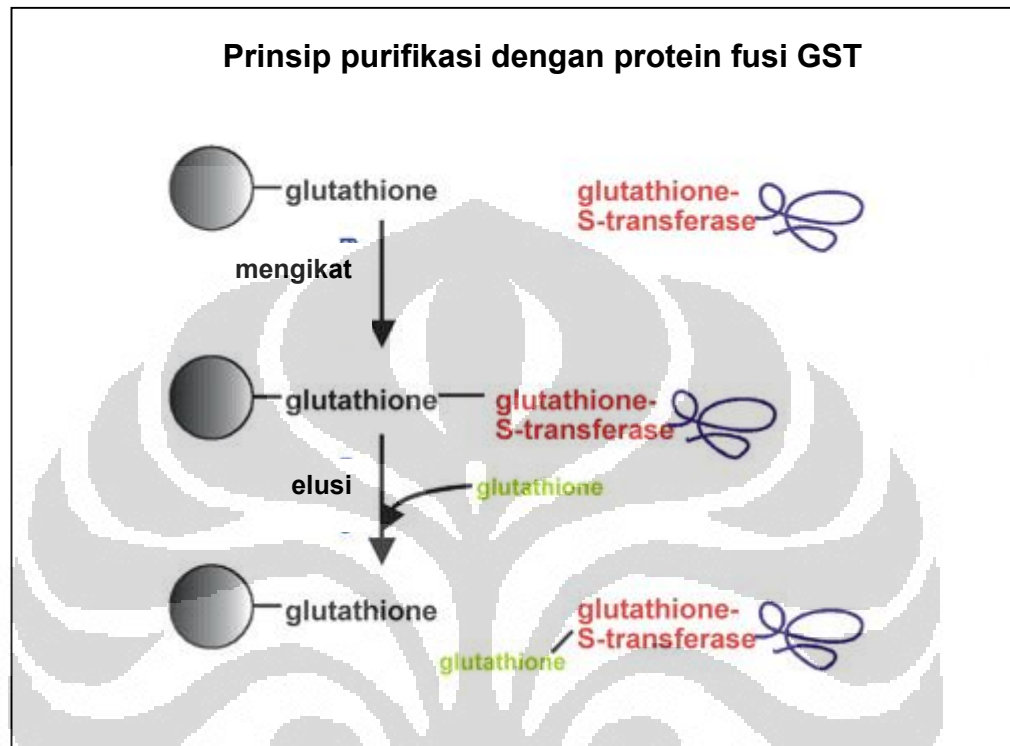
[Sumber: Dissessa 2011: 1]

## 2.7. Purifikasi protein

Purifikasi adalah suatu proses untuk memurnikan protein rekombinan dengan protein lain yang juga diekspresikan dan dihasilkan oleh sel inang (Muhaimin *dkk.* 2005: 31). Menurut Thomas (2011: 1), purifikasi terdiri atas beberapa metode diantaranya filtrasi gel (*size-exclusion chromatography* or SEC), kromatografi pertukaran ion (*ion exchange chromatography*), dan kromatografi afinitas (*affinity chromatography*). Filtrasi gel (*size-exclusion chromatography* or SEC) menggunakan bahan resin berpori untuk memisahkan molekul berdasarkan ukuran. Molekul-molekul besar dikeluarkan dari ruang kecil di dalam resin ketika molekul-molekul kecil memasuki pori-pori resin. Kromatografi pertukaran ion memisahkan molekul berdasarkan kekuatan interaksi ionik dengan fase padat. Kondisi *buffer* dimanipulasi sehingga molekul dengan interaksi ionik terbesar atau terkecil dapat terikat atau dipisahkan dari fase padat. Purifikasi protein dapat juga dilakukan dengan menggunakan teknik kromatografi afinitas, yaitu purifikasi berdasarkan afinitas protein dengan ligannya, seperti enzim dengan inhibitor, afinitas antibodi dengan antigen, atau afinitas hormon dengan reseptor. Prinsip teknik kromatografi afinitas adalah pengikatan spesifik ligan dengan reseptor. Dalam teknik tersebut diperlukan adanya interaksi spesifik antara protein rekombinan dengan suatu ligan. Apabila tidak diketahui ligan spesifik yang dapat berinteraksi dengan suatu protein rekombinan, maka dapat diatasi dengan membuat protein fusi (Thomas 2011: 1).

Salah satu protein fusi yang dapat digunakan adalah *Glutathione S-Transferase* (GST). *Glutathione S-transferase* (GST) terdiri atas 211 asam amino, memiliki ukuran 26 kDa, dan sering diintegrasikan ke dalam vektor ekspresi (pGEX-6P1) untuk produksi protein rekombinan (Amersham Bioscience 2002: 4). Ekspresi protein dalam plasmid pGEX berada di bawah kontrol promoter *lac* setelah diinduksi dengan IPTG. Glutathione merupakan substrat spesifik bagi GST dan mengikat efektif pada pH netral. Protein fusi GST, dalam proses purifikasi, akan mengikat ke matriks protein, lalu dicuci dengan buffer untuk menghilangkan protein non-spesifik yang tidak dapat berikatan dengan GST. Proses pengikatan GST terhadap Glutathione dapat dilihat pada Gambar 2.8.

Protein yang sudah terikat dengan GST kemudian dielusi dan selanjutnya dapat digunakan dalam berbagai aplikasi dan berperan dalam purifikasi kromatografi afinitas pada resin Glutathione (Amersham Bioscience 2002: 4).



Gambar 2.8. Prinsip purifikasi dengan protein fusi GST  
[Sumber: Lowik 2011: 1]

## 2.8. Pemecahan sel

Pemecahan sel merupakan proses pelepasan molekul biologi yang meliputi organel, protein, DNA, RNA, dan lipid dari dalam sel (Margaritis 2007: 4). Metode pemecahan sel, menurut Guthrie (2005: 1), terbagi menjadi dua macam, yaitu pemecahan secara kimiawi dan pemecahan secara mekanik. Pemecahan secara kimiawi diantaranya dengan menggunakan detergen, alkali, osmotik, dan degradasi enzim. Pemecahan secara mekanik diantaranya *freeze and thaw*, sonikasi, dan *homogenizer* (Thomas 2011: 1).

Sonikasi adalah metode pemecahan sel dengan menggunakan gelombang suara frekuensi tinggi untuk menghancurkan sel. Gelombang suara dihantarkan melalui *vibrating probe* yang dapat ditanamkan ke dalam suspensi sel. *Vibrating*

*probe* akan menginisiasi terbentuknya gelembung uap air mikroskopik sementara dan kemudian pecah. Hal tersebut menyebabkan terjadinya kejutan gelombang (*waves shock*) yang memancar melewati sel pada seluruh sampel sehingga menyebabkan sel lisis. Selama proses sonikasi, suspensi sel di letakkan dalam wadah berisi es untuk mencegah kelebihan panas (Thomas 2011: 1).

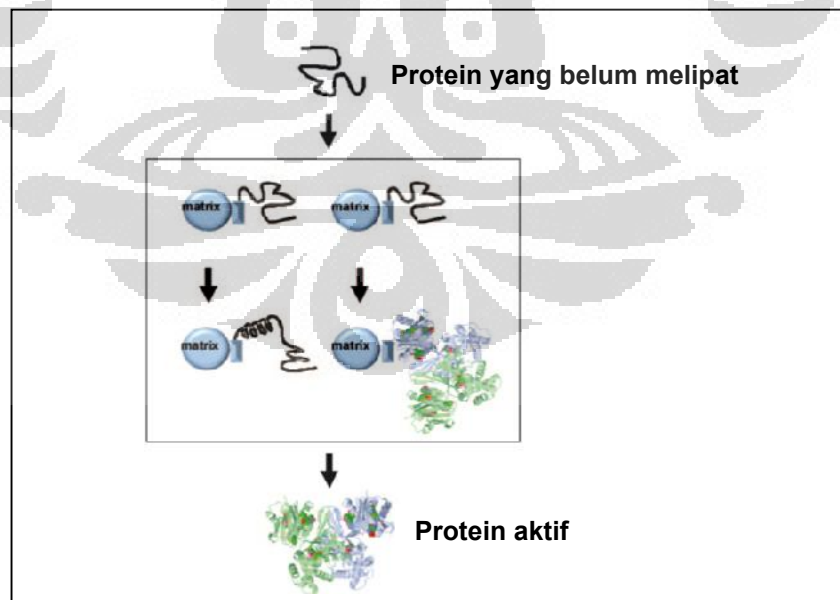
*Freeze and thaw* digunakan untuk memecah sel bakteri dan mamalia. Metode *freeze and thaw* efektif digunakan untuk mengeluarkan protein rekombinan yang berada di dalam sitoplasma bakteri. Proses *freeze and thaw* meliputi pendinginan suspensi sel (*freezing*) dalam *dry ice* atau *freezer* dan pencairan (*thawing*) pada suhu ruang. Sel akan mengembang dan terbentuk sebagai kristal es selama proses *freezing* dan akan berkontraksi selama proses *thawing*. Proses tersebut dilakukan secara berulang untuk mengefisienkan proses pemecahan sel (Thomas 2011: 1).

## 2.9. Solubilisasi protein dan *refolding*

Ekspresi protein rekombinan dalam bakteri sering digunakan dalam bidang industri seperti farmasi dan biokimia. Bakteri menghasilkan protein rekombinan dalam jumlah besar dengan sangat cepat dan terkadang membentuk *inclusion body*. Berdasarkan Glick & Pasternak (2003: 142) *inclusion body* yang terbentuk dapat disebabkan oleh beberapa hal meliputi ekspresi protein rekombinan yang berlebihan, tidak terjadinya pelipatan protein (*misfolding protein*) yang sesuai menjadi protein aktif, dan ada kemungkinan terjadinya pengurangan ikatan disulfida dalam lingkungan intraselular sel *E. coli*. Adanya proses ekspresi yang berlebihan dapat membebani dan menghambat sekresi protein rekombinan oleh sel. Hal tersebut menyebabkan banyak protein tidak dapat disekresikan ke bagian periplasmik sehingga akan membentuk kumpulan atau agregat dari protein yang tidak dapat larut (*inclusion body*). Bagian periplasmik pada *E. coli* merupakan tempat terjadinya pembentukan ikatan disulfida dan pelipatan protein menjadi protein aktif dan matang (Sorenson & Mortensen 2004: 118 & 123).



Proses solubilisasi protein yang membentuk *inclusion body* menggunakan beberapa *buffer* diantaranya *washing buffer* dan *solubilized buffer*. *Washing buffer* yang digunakan untuk proses pencucian *inclusion body* dapat mengandung urea, *guanidium chloride*, Triton X-100, atau *sodium deoxycholate*. *Inclusion body* disolubilisasi dengan menggunakan *buffer* yang mengandung urea, sarkosyl,  $\beta$ -*mercaptoethanol*, dan dithiotreitol (DTT). Protein yang telah disolubilisasi kemudian di *refolding*. Proses pelipatan (*refolding*) protein ke bentuk aktif (*native*) dapat dilihat pada Gambar 2.9. Metode *refolding* yang diklasifikasikan oleh Clark (1998: 1-3), terdiri atas empat metode, yaitu dilusi, dialisis, diafiltrasi, dan filtrasi gel. Dilusi merupakan metode *refolding* yang paling umum digunakan untuk proses *refolding* dalam skala kecil, yaitu dengan menambahkan *buffer* dilusi (*dilution buffer*) ke dalam suspensi protein yang telah melalui tahap solubilisasi. *Refolding* dengan metode dilusi membutuhkan sejumlah *buffer* dan langkah-langkah tambahan setelah renaturasi konsentrasi protein sehingga memerlukan biaya yang tinggi untuk produksi protein. Dialisis didasarkan pada difusi molekul yang lebih kecil dan ion melalui membran sehingga memerlukan waktu yang lama jika digunakan dalam produksi protein skala besar (Sorensen & Mortensen 2004: 119; Singh & Panda 2005: 305).



Gambar 2.9. Proses pelipatan (*refolding*) protein  
[Sumber: Dashivets *dkk.* 2009: 1]

## 2.10. Transformasi sel bakteri

Transformasi adalah penyisipan materi genetik berupa DNA dari sel bakteri yang satu ke bakteri yang lain. Transformasi pertama kali ditemukan oleh Frederick Griffith pada tahun 1928 ketika mencari vaksin untuk mengatasi penyakit pneumonia yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus pneumoniae* (Wang 2002: 1). Transformasi bertujuan untuk mengekspresikan suatu gen tertentu dalam sel inang. Menurut Miesfeld (2000: 1), ekspresi tersebut dapat berupa ekspresi protein rekombinan yang berguna untuk pengobatan (seperti pembuatan vaksin) atau untuk membuat bakteri mampu bertahan di kondisi yang ekstrem (seperti bakteri yang mampu membersihkan kontaminasi lingkungan pada bioremediasi). Proses transformasi, seperti yang dikatakan Ernest & Rosenbaum (1993: 3), meliputi tiga tahap, yaitu pengikatan fragmen DNA sel pendonor ke permukaan sel penerima, pengambilan fragmen DNA oleh sel penerima, dan penggabungan materi genetik sel donor dan sel penerima melalui rekombinasi.

Transformasi terbagi menjadi dua metode, yaitu elektroporasi dan secara kimia (Miesfeld 2000: 1). Elektroporasi merupakan metode transformasi dengan menggunakan medan listrik berkekuatan tinggi. Arus listrik tersebut menyebabkan terbentuknya lubang kecil pada membran sel sehingga DNA plasmid dapat masuk ke dalam sel. Transformasi secara kimiawi, sel-sel ditumbuhkan sampai pertengahan fase log, dipanen, dan ditambahkan kation divalen seperti  $\text{CaCl}_2$  yang berguna untuk membuat dinding sel menjadi permeabel sehingga dapat dilalui oleh DNA plasmid. Perlakuan tersebut merupakan proses kompetensi sel inang. Kompeten sel kemudian ditambahkan plasmid yang berisi materi genetik, lalu dilakukan teknik *heat shock*, yaitu pendinginan, pemanasan, dan pendinginan kembali, sehingga DNA dapat masuk ke dalam sel. Teknik *heat shock* ditemukan pertama kali oleh Stanley Cohen, Annie Chang, dan Leslie Hsu pada tahun 1972 (Miesfeld 2000: 1; Wolf 2002: 1).

## BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong.

Penelitian dilakukan selama 6 bulan dari bulan Februari 2011 sampai dengan Juni 2011, dengan studi pendahuluan pada bulan Januari 2011.

### 3.2. ALAT

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain, yaitu tabung reaksi [Iwaki Pyrex], gelas ukur 10 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml [Piasti brand, Iwaki Pyrex], Erlenmeyer 250 ml & 500 ml [Iwaki Pyrex], botol 500 ml [Schott Duran], *beaker glass* 50 ml [Iwaki Pyrex], autoklaf [Everlight TA-630], timbangan digital [Precisa XT 120A], *magnetic stirrer* [Cimarec 2], gunting, botol semprot [Cienceware], spatula, mikropipet p10, p20, p200, p1000 [Bio-rad & Eppendorf], tip (1000  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, dan 10  $\mu$ l) [Art], bunsen, *laminar flow* [Laboratories], *shaker incubator* [New Brunswick Scientific], tisu [Multi], korek api [Tokai], lakban hitam [Daimaru Tape, kain kasa [Kasa Lestari], kertas timbang [Diva], kapas [Bahana Medika], aluminium foil [Klin Pak], kuvet, spektrofotometri [GeneQuant Pro Amersham Bioscience], tabung eppendorf 1,5 ml [Extra Gene], tabung sentrifugasi, tabung falkon 10 ml & 15 ml [Sarstedt], mesin sentrifugasi [Hermle Z32 K, Z300 K], mesin vorteks [Maxi-Mix], spin [Bio-rad], mesin sonikasi, rotator, timer [Hoseki], plastik wrap [Total], tabung reaksi kecil, sarung tangan [Sensi Gloves], masker [One Med], parafilm [Pechiney], *ice maker*, lemari pendingin 4 °C [Toshiba], *freezer* -20 °C [Gea], *freezer* -70 °C [Foren Scientific], pH meter [Thermo Orion 410A], rak tabung [Biolabs], *cool box* [Marina Cooler], komputer, mesin scan, perangkat SDS PAGE [Bio-rad], marker [Snowman], label [Tom & Jerry], rocker [Biogreen], tangki akuades [Nalgene], oven, *syringe with needle* [Teramo], dan filter steril [Schleicher & Schuell].

### 3.3. BAHAN

#### 3.3.1. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah konstruksi plasmid pGEX-6P1 yang telah disisipi gen *env* pengkode *Jembrana Superficial Unit* (JSU) dan didapat berdasarkan hasil kerjasama dari Murdoch University dengan Laboratorium Biologi Molekuler Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Cibinong, atas nama Ibu Endang Tri Margawati. Konstruksi tersebut telah ditransformasikan ke dalam sel inang *E. coli* strain BL21.

#### 3.3.2. Medium

Medium kultur yang digunakan dalam penelitian adalah medium Luria Bertani (LB) cair dan padat, serta medium *Transformation and Storage Solution* (TSS).

#### 3.3.3. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian meliputi akuades, alkohol 70%, ampisilin [Sigma], bacto trypton [Becton, Dickinson, and Company], yeast extract [Becton, Dickinson, and Company], NaCl [Merck], potasium klorida (KCl) [Merck], Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Merck], KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [Merck], stock JSU, gliserol, *elution buffer*, TRIS [Bio Basic], glutathion reduced [Sigma], *sodium dodecyl sulfat* (SDS) [Biomedicals], glicyne [Sigma], *acrylamid* [Applichem], amonium persulfat (APS) [Biomedicals], temed, IPTG [Sigma], *loading dye* [Fermentas], protein marker [Bio-rad], *glacial acetic acid* [Merck], dan *commasie brilliant blue* [Bio-rad].

### 3.4. CARA KERJA

Skema cara kerja dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### 3.4.1. Pembuatan medium, larutan, dan *buffer*

Pembuatan medium, larutan, dan *buffer* dapat dilihat pada Lampiran 2.

#### 3.4.2. Transformasi sel *Escherichia coli* BL21

##### 3.4.2.1 Persiapan cawan petri medium Luria Bertani (LB) padat

Tiga cawan petri yang berisi medium LB padat masing-masing 25 ml disiapkan. Sebanyak 25  $\mu$ l ampisilin dimasukkan ke dalam dua cawan petri (cawan petri 1 dan 3), sedangkan satu cawan petri (cawan petri 2) tidak diberi penambahan ampisilin. Masing-masing cawan petri diberi label, yaitu cawan petri 1 yang berisi kompeten sel *E. coli*, cawan petri 2 yang berisi kompeten sel *E. coli*, dan cawan petri 3 berisi kompeten sel *E. coli* yang sudah ditambahkan JSU pGEX-6P1.

##### 3.4.2.2 Pembuatan sel kompeten *Escherichia coli*

Sebanyak 1 ml kultur *E. coli* yang telah diinkubasi selama 16-18 jam (*overnight*) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml medium LB cair. Kultur diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 200 rpm, 37 °C, selama 15 menit. OD dianalisis hingga mencapai OD<sub>600</sub> 0,4-0,5. Disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm, 4 °C, selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet kemudian disimpan pada suhu -20 °C. Ke dalam pelet ditambahkan 2 ml medium TSS, kemudian dicampurkan sampai homogen (Chung *dkk.* 1989: 2172).

### 3.4.2.3 Transformasi sel *Escherichia coli*

Sebanyak 100 µl kompeten sel *E. coli*, lalu dipindahkan ke tabung eppendorf 1,5 ml yang baru. Kompeten sel ditambahkan 2 µl plasmid pGEX-6P1 (yang sudah berisi insert JSU). Perlakuan *heatshock* dilakukan dengan cara tabung eppendorf dibenamkan dalam es selama 20 menit, diletakkan dalam air pada suhu 42 °C selama 45 detik, diletakkan kembali dalam es selama 2 menit. Ke dalam tabung eppendorf ditambahkan 400 µl medium LB cair. Tabung eppendorf diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 200 rpm, 37 °C selama 1 jam. Transforman disebar ke dalam cawan petri (yang telah berisi medium LB padat) sebanyak 50 µl. Cawan petri kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 200 rpm, 37 °C, selama 16-18 jam atau *overnight* (Chung dkk. 1989: 2172).

### 3.4.3. Kultur sel *Escherichia coli* strain BL21

Sebanyak 10 µl *E. coli* BL21 yang berisi vektor pGEX-6P1 pembawa gen *env* pengkode JSU dikulturkan ke dalam tabung reaksi berisi 5ml medium LB cair yang sebelumnya telah ditambahkan 5 µl ampisilin (100 g/ml). Kultur sel diinkubasi pada *shaker incubator* 37 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 16-18 jam atau *overnight* (Margawati & Ridwan 2009: 167).

### 3.4.4. Penghitungan *optical density* (OD)

Sebanyak 1ml kultur hasil inkubasi (*overnight*) dimasukkan ke dalam tiga Erlenmeyer 500 ml (Erlenmeyer 1, 2, dan 3) yang masing-masing berisi 50 ml medium LB cair yang telah ditambahkan 50 µl ampisilin (100 g/ml). Kultur diinkubasi pada *shaker incubator* 37 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam 10 menit atau hingga mencapai OD<sub>600</sub> 0,6. Apabila OD<sub>600</sub> mencapai 0,6, ditambahkan IPTG pada masing-masing Erlenmeyer (Margawati & Ridwan 2009: 167).

#### 3.4.5. Induksi IPTG

Induksi IPTG dibedakan menjadi tiga konsentrasi perlakuan, yaitu pada Erlenmeyer 1 ditambahkan 50  $\mu$ l IPTG 100  $\mu$ M, Erlenmeyer 2 ditambahkan 50  $\mu$ l IPTG 150  $\mu$ M, dan pada Erlenmeyer 3 ditambahkan 50  $\mu$ l IPTG 200  $\mu$ M. Erlenmeyer tersebut selanjutnya diinkubasi pada *shaker incubator* 37 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam. Setiap perlakuan konsentrasi IPTG dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Margawati & Ridwan 2009: 167).

#### 3.4.6. Koleksi pelet

Kultur yang telah diinduksi kemudian dipindahkan ke dalam tabung falkon 15 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang, sedangkan pelet disimpan pada *freezer* -20 °C (Margawati & Ridwan 2009: 167).

#### 3.4.7. Pemecahan sel

Pemecahan sel dilakukan dengan dua metode, yaitu metode *Freeze and Thaw* dan metode Sonikasi (Margawati & Ridwan 2009: 166-167).

##### 3.4.7.1. Metode *Freeze and Thaw*

Pelet yang sebelumnya disimpan pada -20 °C dikeluarkan dari dalam *freezer*, kemudian di-*thawing* pada suhu ruang (26 °C -28 °C) sampai pelet agak mencair dan didiamkan selama 15 menit. Pelet dimasukkan kembali ke dalam *freezer* -20 °C selama 20 menit. Proses *freeze and thaw* tersebut dilakukan selama tiga kali. Pelet kemudian ditambahkan 5 ml PBS *buffer*, divorteks, dan selanjutnya dipindahkan ke tabung falkon 10 ml untuk disonikasi.

### 3.4.7.2. Metode Sonikasi

Kultur sel yang sudah diberi perlakuan dengan metode *Freeze and Thaw* kemudian disonikasi. Sonikasi dilakukan selama 15 detik dengan interval waktu 1 menit. Proses sonikasi tersebut dilakukan sebanyak tiga kali. Kultur sel kemudian dipindahkan ke tabung falkon 15 ml, disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung falkon 10 ml, ditambahkan resin Glutathione Sepharose 4B sebanyak 50 µl, kemudian diletakkan di rotator selama 3 jam pada suhu 4 °C. Pelet dipindahkan ke tabung eppendorf 1,5 ml, dan disimpan pada *freezer* -20 °C.

### 3.4.8. Solubilisasi protein dan *refolding*

#### 3.4.8.1. Solubilisasi protein

Pelet hasil sonikasi ditambahkan 1 ml *washing buffer*, kemudian dicampurkan sampai homogen. Larutan tersebut kemudian dipindahkan ke tabung eppendorf 1,5 ml yang baru dan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm, 4 °C, selama 10 menit (supernatan dibuang). Proses pencucian dengan *washing buffer* dilakukan sebanyak 3 kali kemudian ditambahkan 1 ml dH<sub>2</sub>O steril dan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm, 4 °C, selama 10 menit (supernatan dibuang). Ke dalam pelet ditambahkan 1 ml *solubilized buffer* dan dirotator pada suhu 4 °C selama 16-18 jam atau *overnight* (Margawati & Ridwan 2009: 168).

#### 3.4.8.2. *Refolding*

*Beaker glass* 50 ml yang berisi 5 ml *dilution buffer* dimasukkan ke dalam wadah yang berisi es batu. Wadah tersebut kemudian diletakkan di atas *magnetic stirer* dengan kecepatan terendah (tingkat 2 atau 3). Sampel sebanyak 100 µl diteteskan secara perlahan ke dalam *dilution buffer* dengan interval waktu 5 menit. Sampel kemudian dipindahkan ke dalam tabung falkon 5 ml dan disimpan pada



suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sampel dikoleksi sebanyak  $100\ \mu\text{l}$  untuk dikarakterisasi dengan SDS-PAGE (Margawati & Ridwan 2009: 168).

#### 3.4.9. Purifikasi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 dengan Gluthatione Sepharose 4B

Sampel yang telah di-*refolding* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 7 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatan dikoleksi 1ml, dimasukkan ke tabung eppendorf 1,5 ml yang baru, supernatan tersebut dinamakan *inner volume* (IV), dan disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk divisualisasi dengan SDS-PAGE. Sebanyak 5 ml PBS *buffer* ditambahkan pada resin sebagai tahapan pencucian dan selanjutnya disentrifugasi  $4^{\circ}\text{C}$  dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan disebut *washing* 1 (W1). Resin ditambahkan 5 ml PBS *buffer*, disentrifugasi  $4^{\circ}\text{C}$  dengan kecepatan 4000 rpm selama 4 menit. Supernatan yang dihasilkan disebut *washing* 2 (W2). Semua supernatan hasil pencucian (W1 dan W2) disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk divisualisasi dengan SDS-PAGE. Protein rekombinan JSU yang terikat resin dielusi dengan  $200\ \mu\text{l}$  *elution buffer*. Sampel yang telah dielusi, diinkubasi  $4^{\circ}\text{C}$  selama 16-18 jam atau *overnight* diatas rotator. Sampel kemudian disentrifugasi  $4^{\circ}\text{C}$  dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung eppendorf 1,5 ml yang baru dan diberi label elusi 1 (E1). Selanjutnya sampel ditambahkan  $100\ \mu\text{l}$  *elution buffer*, lalu dirotator pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 3 jam. Sampel yang telah diinkubasi selama 3 jam kemudian disentrifugasi  $4^{\circ}\text{C}$  dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung eppendorf 1,5 ml yang baru dan diberi label elusi 2 (E2). Proses elusi dilakukan sebanyak dua kali. Supernatan yang merupakan hasil *washing* (W1 dan W2) dan elusi (E1 dan E2) selanjutnya divisualisasikan dengan SDS-PAGE (Amersham Bioscience 2002: 40-41).

#### 3.4.10. Analisis protein rekombinan JSU pGEX-6P1 dengan metode SDS PAGE

Analisis dan visualisasi hasil ekspresi dan purifikasi protein rekombinan JSU dilakukan dengan SDS-PAGE berdasarkan Sambrook & Russell (2001: 5.44-5.45). Cara kerja SDS-PAGE diawali dengan pembuatan gel (*resolving gel* dan *stacking gel*). *Glass plate sandwich (short plate & spacer plate)* dicuci dengan alkohol 70%. *Glass plate sandwich* digunakan untuk tempat cetakan dalam pembuatan gel. *Short plate* ditempatkan di depan kaca *spacer plate*, lalu dimasukkan dalam *casting frame* dengan posisi kedua kaca sama rata. *Glass plate sandwich* yang sudah terpasang pada *casting frame* kemudian diletakkan pada *casting stand*. *Resolving gel* dibuat sesuai dengan prosedur yang dibutuhkan (Lampiran 1). *Resolving gel* dimasukkan di antara celah kaca *short plate* dan *spacer plate* sampai dua pertiga bagian dengan menggunakan mikropipet. Ditambahkan akuades sampai batas atas kaca dan dibiarkan selama 30 menit hingga gel mengeras.

Larutan *stacking gel* dibuat sesuai prosedur pada Lampiran 2 selama menunggu *resolving gel* mengeras. Air yang terdapat pada bagian atas *resolving gel* yang telah mengeras kemudian dibuang dan dikeringkan dengan menggunakan tisu agar air benar-benar hilang. Larutan *stacking gel* dimasukkan sampai bagian atas kaca, lalu *comb* dimasukkan. Gel didiamkan kembali selama 30 menit hingga mengeras. *Comb* kemudian dilepaskan ketika gel telah mengeras. *Glass plate sandwich* yang berisi gel tersebut dipasang pada *electroda assembly* lalu ditempatkan ke dalam *lower inner chamber* dan kedua *clamp levers* ditutup. *Lower inner chamber* dimasukkan ke dalam tank elektroforesis lalu ditambahkan 1x SDS running.

Sampel (IV, W1, W2, E1, dan E2) diambil sebanyak 20 µl kemudian ditambahkan dengan 10 µl *loading dye* ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml. Campuran tersebut dipanaskan pada suhu 95 °C selama 15 menit, di spin selama 5 detik. Masing-masing sampel sebanyak 20 µl dan 2 µl *protein marker* di-*loading* ke dalam *well*. Kabel elektroda dipasangkan dengan perangkat elektroforesis, kemudian gel di-running pada 100 mA selama 90 menit. Setelah proses *running* selesai, gel diangkat dari *glass plate sandwich* dan direndam dalam larutan

*staining commasie brilliant blue* selama 1 jam. Gel kemudian dibilas dengan larutan *destaining*, di-*rocker* kembali selama 1 jam. Pembilasan dilakukan hingga gel bersih dari larutan *staining*. Gel dibilas kembali dengan akuades, lalu disimpan pada suhu 4 °C untuk selanjutnya didokumentasikan dengan *scanner*.

#### 3.4.11. Analisis perhitungan berat molekul protein rekombinan JSU pGEX-6P1 secara manual dari hasil elektroforesis SDS-PAGE

Analisis perhitungan berat molekul protein rekombinan JSU pGEX-6P1 dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan garis linier yang diperoleh dari kurva standar marker protein yang digunakan. Berat molekul protein JSU pGEX-6P1 dihitung dengan membandingkan nilai mobilitas relatif (Rf) dari sampel protein JSU pGEX-6P1 dengan nilai Rf marker protein standar yang telah diketahui berat molekulnya. Nilai Rf merupakan nilai yang diperoleh dengan cara membagi jarak migrasi pita protein dari bagian atas gel dengan jarak migrasi larutan pada bagian bawah gel (*tracking gel*). Nilai logaritma berat molekul (BW) protein standar diperoleh dengan menghitung nilai logaritma dari masing-masing berat molekul protein standar yang digunakan atau *unstained protein ladder*. Persamaan garis linier ditentukan dari kurva standar yang diperoleh dengan cara memasukkan nilai Rf (x) dan nilai logaritma berat molekul (y) marker protein standar. Nilai logaritma berat molekul sampel (protein JSU pGEX-6P1) didapatkan dengan cara memasukkan nilai Rf protein JSU pGEX-6P1 ke dalam persamaan linier dari kurva standar yang telah diperoleh. Nilai logaritma sampel yang telah diperoleh kemudian diubah ke dalam bentuk anti-log untuk mendapatkan ukuran berat molekul protein yang sebenarnya dalam satuan kDa (Gallagher 1995: 10.1.30).

## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Re-transformasi sel *Escherichia coli* strain BL21

Berdasarkan hasil penelitian awal yang menunjukkan tidak terekspresinya protein JSU pGEX-6P1, maka dilakukan proses transformasi kembali atau *re-transformation*. Proses re-transformasi diawali dengan persiapan tiga cawan petri berisi medium Luria Bertani (LB) padat. Cawan petri 1 sebagai kontrol negatif, cawan petri 2 sebagai kontrol positif, dan cawan petri 3 merupakan sampel JSU pGEX-6P1. Kompeten sel *E. coli* dibuat dengan penambahan medium *Transformation and Storage Solution* (TSS). Re-transformasi dilakukan menggunakan teknik *heatshock*, yang dapat memungkinkan molekul DNA asing yang telah menempel pada dinding sel kompeten terintroduksi ke dalam sitoplasma ( Wolf 2002: 1; Brown 2006: 90-91).

Hasil re-transformasi menunjukkan bahwa pada cawan petri 1 (kontrol negatif) tidak terdapat koloni sel *E. coli*, sedangkan pada cawan petri 2 (kontrol positif) ditemukan adanya koloni *E. coli*. Hal tersebut sesuai dengan Zhiming tu *dkk.* (2005: 116) yang menyatakan bahwa *E. coli* tidak memiliki resistensi terhadap ampisilin sehingga pada cawan petri 1 sel *E. coli* tidak dapat tumbuh. Kontrol positif (cawan petri 2) disebar pada medium tanpa ampisilin untuk melihat kemampuan tumbuh sel kompeten, sedangkan kontrol negatif (cawan petri 1) disebar di atas medium ampisilin untuk melihat kemungkinan terjadinya kontaminasi pada sel kompeten atau pada proses transformasi (Sambrook & Russel 2001: 1.111). Koloni sel *E. coli* juga ditemukan pada cawan petri 3, yaitu 1 koloni sel. Dari hasil yang terlihat pada cawan petri 3 dapat disimpulkan bahwa hasil re-transformasi sel *E. coli* memiliki efisiensi transformasi yang rendah. Hal tersebut diduga karena konsentrasi DNA plasmid yang ditambahkan terlalu sedikit, yaitu hanya sekitar 2  $\mu$ l.

Menurut Anh Hue (2008: 1), Roychoudhury *dkk.* (2009: 398), Li *dkk.* (2010: 8553), efisiensi transformasi dipengaruhi banyak faktor diantaranya kecepatan sentrifugasi, teknik transformasi, konsentrasi DNA plasmid,

penambahan senyawa kimia (seperti dithiothreitol, magnesium, mangan), medium yang digunakan, kepadatan sel dan fase pertumbuhan bakteri. Medium SOC memberikan hasil transformasi yang lebih baik dibandingkan dengan medium LB. Hal penting dalam transformasi adalah bakteri berada pada fase *log* dan tingkat kepadatan sel rendah ( $OD_{600}$  0,35-0,45) karena pada fase tersebut bakteri memiliki daya tahan yang optimal untuk menghadapi kerusakan fisik selama proses transformasi sehingga dapat meningkatkan efisiensi transformasi. Kecepatan sentrifugasi yang tinggi ketika transformasi dapat menurunkan nilai efisiensi transformasi karena dapat merusak sel dan meningkatkan jumlah sel mati yang terdapat pada endapan (Li *dkk.* 2010: 8553; Sigma 2011: 1). Hasil re-transformasi tersebut kemudian dijadikan sebagai sampel untuk proses ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1.



Gambar 4.1. Hasil re-transformasi sel *E. coli* BL21

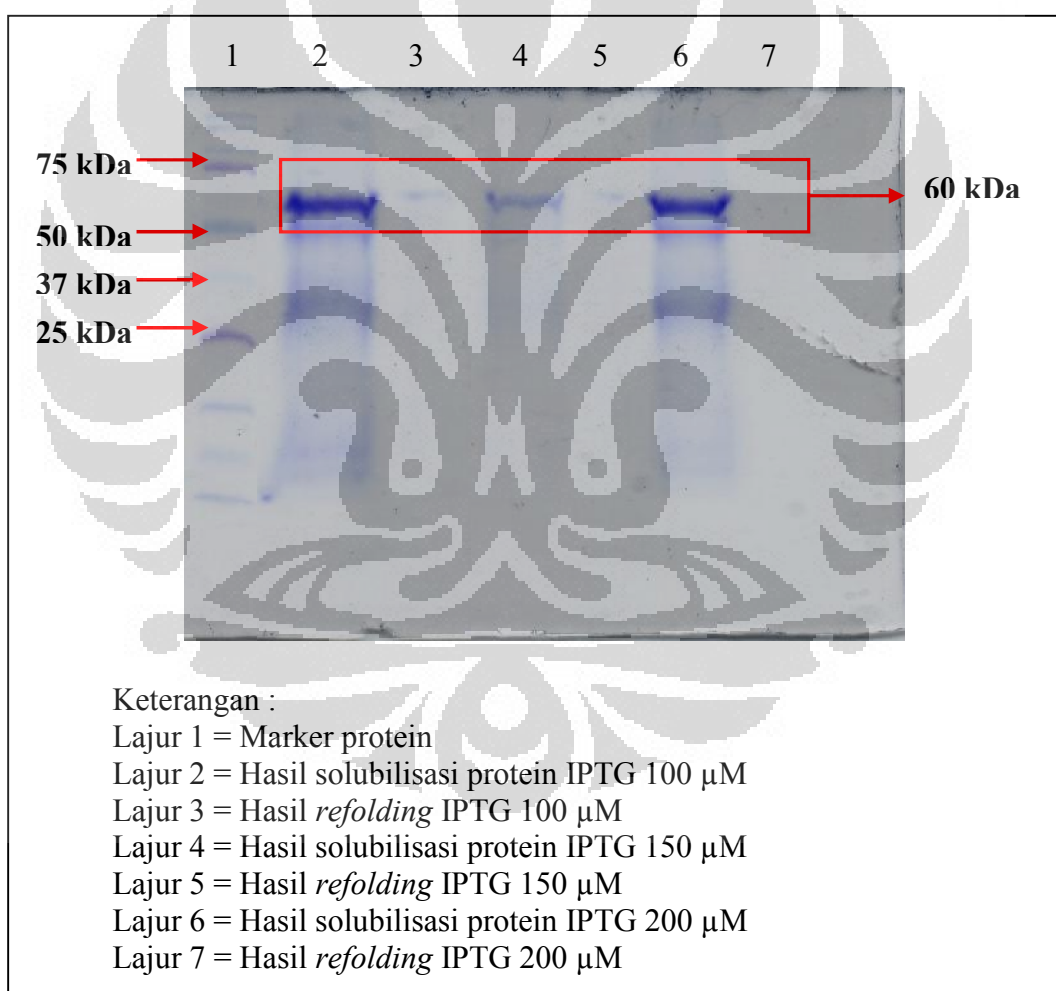
#### 4.2. Ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1

Ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 menggunakan *E. coli* strain BL21 sebagai inang dan dianalisis dengan menggunakan SDS-PAGE. Beberapa proses pada ekspresi protein JSU pGEX-6P1 seperti penginkubasian pada *shaker incubator*, pengkulturan sel *E. coli* BL21 pada suhu 37 °C, dan sentrifugasi pada suhu rendah (4 °C), memiliki tujuan tertentu dalam pelaksanaannya.

Penginkubasian pada *shaker incubator* bertujuan untuk memperbesar kontak yang terjadi antara medium dan *E. coli* sehingga terjadi pemerataan nutrisi dan *E. coli* dapat tumbuh secara optimal (Cappucino & Sherman 2002: 6). Pengkulturan sel *E. coli* BL21 dilakukan pada suhu 37 °C karena suhu tersebut merupakan suhu

optimal *E. coli* untuk tumbuh dan melakukan aktivitas metabolismenya (Holt *dkk.* 1994: 179). Tujuan dilakukannya sentrifugasi pada suhu rendah (4 °C) adalah untuk mencegah terjadinya denaturasi dan degradasi protein rekombinan yang akan diekspresikan (QIAexpressionist 2001: 69).

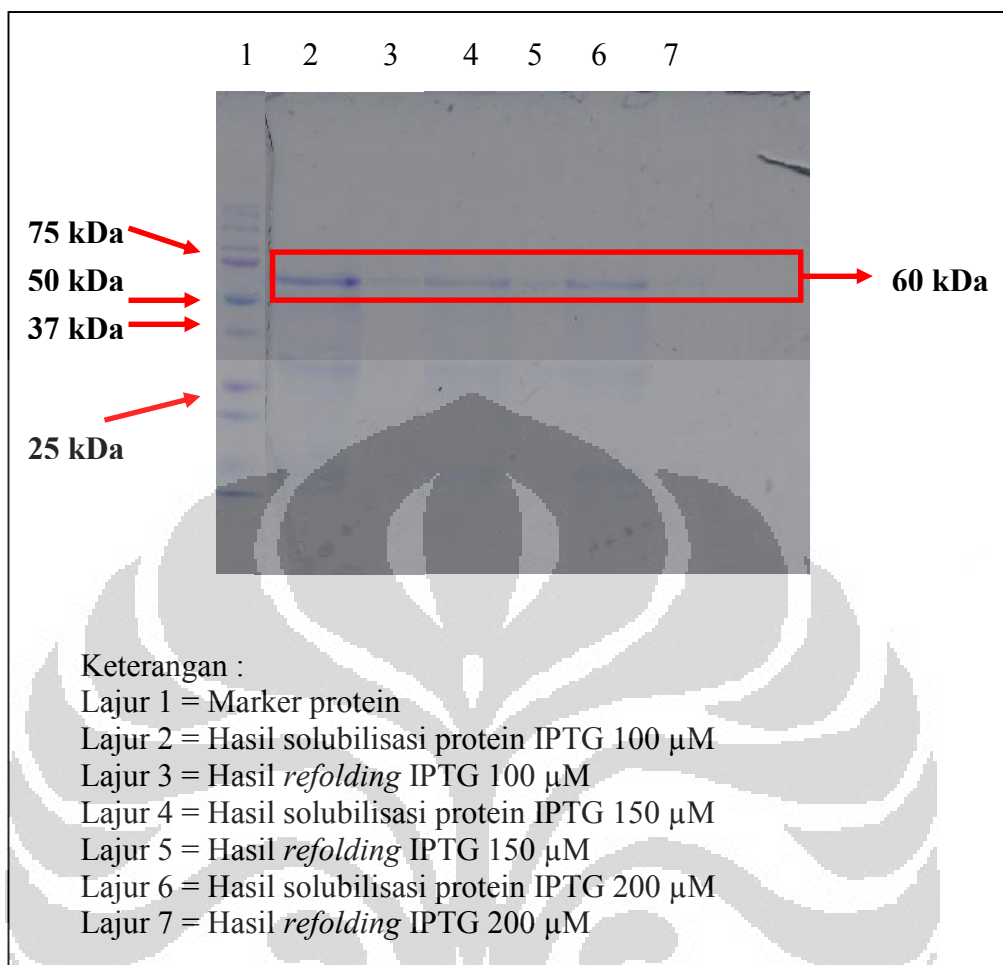
Protein JSU pGEX-6P1 membentuk *inclusion body* dalam proses ekspresinya sehingga perlu dilakukan solubilisasi dan *refolding*. Proses pelipatan protein (*refolding*) dari *inclusion body* dilakukan dengan menghilangkan agen pendenaturasi melalui proses dilusi atau dialisis (Sorensen & Mortensen 2004: 119). Hasil SDS-PAGE tahap solubilisasi protein dan *refolding* dari tiga kali pengulangan dapat dilihat pada Gambar 4.2.1, Gambar 4.2.2, dan Gambar 4.2.3.



Gambar 4.2.1. Hasil Elektroforesis SDS-PAGE tahap solubilisasi protein dan *refolding* (pengulangan 1)

Gambar 4.2.1, yaitu hasil elektroforesis SDS-PAGE tahap solubilisasi dan *refolding* pada pengulangan 1, menunjukkan adanya pita pada hasil solubilisasi

baik pada induksi IPTG 100  $\mu$ M (lajur 1,2), IPTG 150  $\mu$ M (lajur 4,5), dan IPTG 200  $\mu$ M (lajur 6,7). Gambar 4.2.1 juga menunjukkan bahwa JSU pGEX-6P1 yang diekspresikan melalui *E. coli* strain BL21 berada pada ukuran yang tepat, yaitu  $\pm$  60 kDa. Tag GST yang digunakan sebagai protein fusi pada sistem pGEX memiliki ukuran  $\pm$  26 kDa, sedangkan protein JSU memiliki ukuran  $\pm$  34 kDa (Margawati & Ridwan 2009: 168). Berat molekul protein JSU pGEX-6P1 dapat dihitung dengan membandingkan nilai mobilitas relatif (Rf) dari sampel protein JSU pGEX-6P1 dengan nilai Rf marker protein standar yang telah diketahui berat molekulnya, seperti yang dikatakan oleh Gallagher (1995: 10.1.30). Marker protein standar yang digunakan adalah 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa, dan 75 kDa, dengan nilai Rf masing-masing sebesar 0,608; 0,459; 0,324; dan 0,176. Nilai Rf sampel JSU pGEX-6P1 yang diperoleh adalah 0,257. Marker protein yang digunakan adalah Dual color, Bio-Rad (Lampiran 5). Grafik dan hasil perhitungan ukuran protein rekombinan JSU pGEX-6P1 pada pengulangan 1 dapat dilihat pada Lampiran 6. Pita pada induksi IPTG 100  $\mu$ M terlihat lebih tebal dibandingkan dengan pita pada induksi IPTG 150  $\mu$ M dan IPTG 200  $\mu$ M. Berdasarkan hasil SDS-PAGE dan melihat hasil kuantifikasi protein pada Tabel 4.3.1 maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi IPTG 100  $\mu$ M yang paling optimal dalam menginduksi ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 karena dengan konsentrasi protein yang kecil, yaitu sekitar 0,897 mg/ml dapat menghasilkan pita yang tebal pada SDS-PAGE.

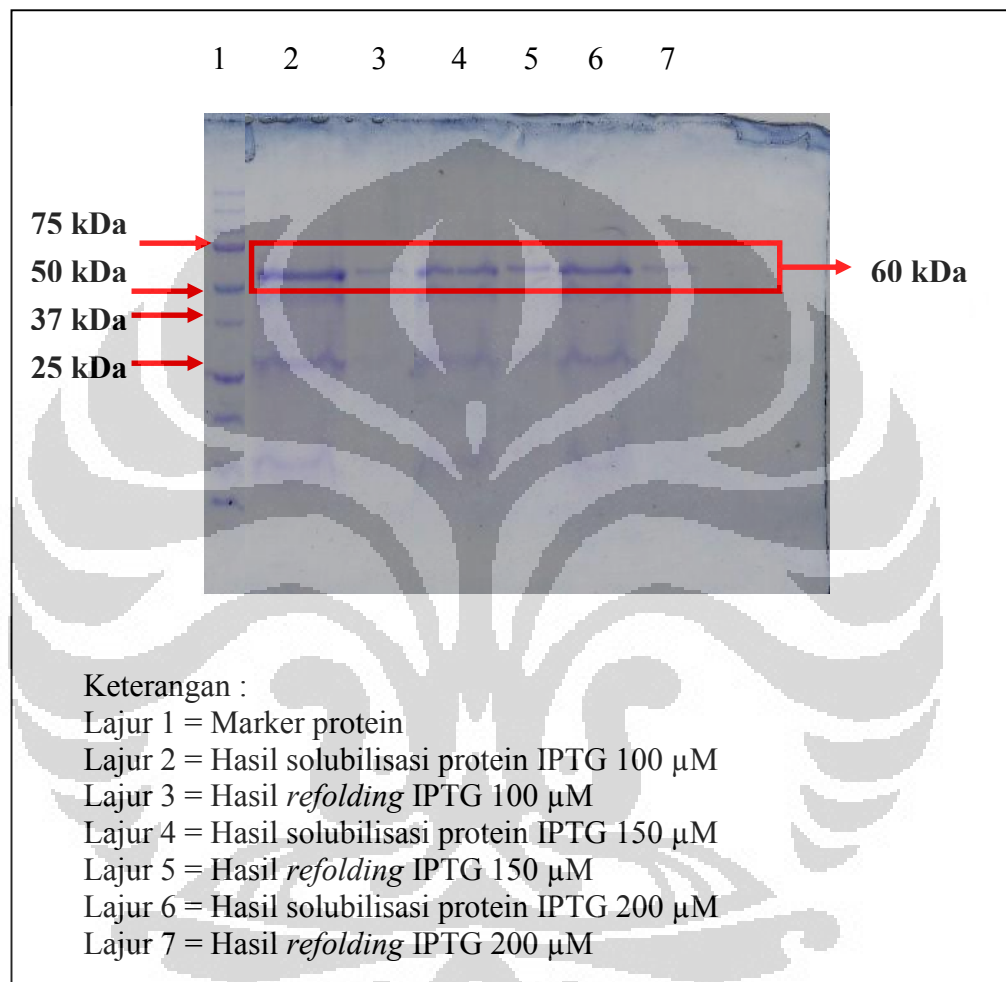


Gambar 4.2.2. Hasil Elektroforesis SDS-PAGE tahap solubilisasi protein dan *refolding* (pengulangan 2)

Gambar 4.2.2 merupakan hasil elektroforesis SDS-PAGE tahap solubilisasi dan *refolding* pada pengulangan 2. Gambar 4.2.2 menunjukkan adanya pita pada hasil solubilisasi baik pada induksi IPTG 100  $\mu\text{M}$  (lajur 1,2), IPTG 150  $\mu\text{M}$  (lajur 4,5), dan IPTG 200  $\mu\text{M}$  (lajur 6,7), yaitu pada ukuran  $\pm$  60 kDa. Nilai Rf yang diperoleh pada masing-masing marker protein standar 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa, 75 kDa, dan sampel JSU pGEX-6P1 adalah sebesar 0,5375; 0,375; 0,275; 0,1625; dan 0,225. Grafik dan hasil perhitungan ukuran protein rekombinan JSU pGEX-6P1 pada pengulangan 2 dapat dilihat pada Lampiran 7. Pita pada induksi IPTG 100  $\mu\text{M}$  terlihat lebih tebal dibandingkan dengan pita pada induksi IPTG 150  $\mu\text{M}$  dan IPTG 200  $\mu\text{M}$ . Hasil kuantifikasi (tahap solubilisasi) diperoleh bahwa konsentrasi protein pada induksi IPTG 100  $\mu\text{M}$  adalah sebesar 1,753 mg/ml, induksi IPTG 150  $\mu\text{M}$  sebesar 1,004 mg/ml, dan



induksi IPTG 200 mg/ml sebesar 1,260 mg/ml (Tabel 4.3.1). Berdasarkan hasil SDS-PAGE dan kuantifikasi protein maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi IPTG 100  $\mu\text{M}$  yang paling optimal dalam menginduksi ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1.



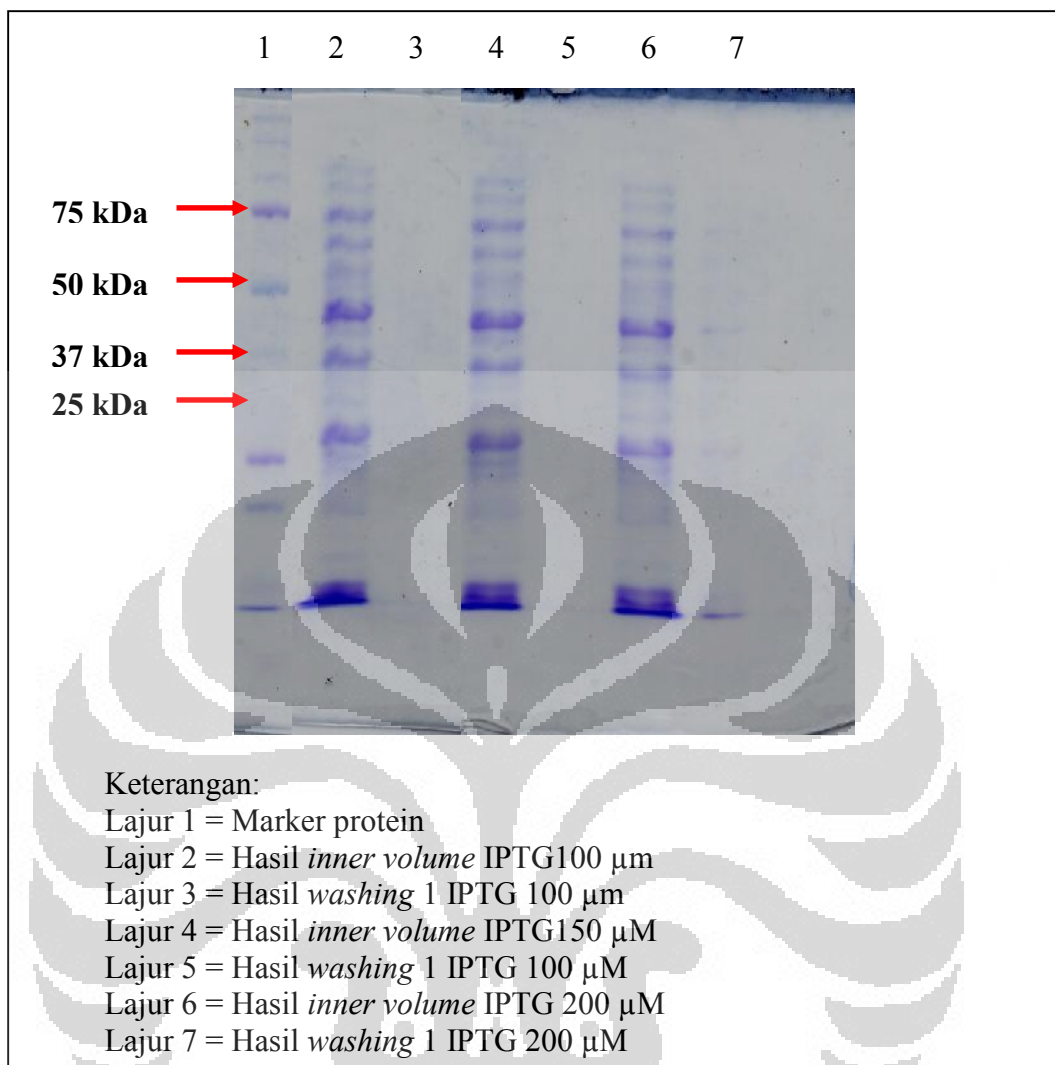
Gambar 4.2.3. Hasil Elektroforesis SDS-PAGE tahap solubilisasi protein dan *refolding* (pengulangan 3)

Gambar 4.2.3, yaitu hasil elektroforesis SDS-PAGE tahap solubilisasi dan *refolding* pada pengulangan 3, menunjukkan adanya pita dengan ukuran yang tepat  $\pm 60$  kDa pada hasil solubilisasi dan *refolding* baik pada induksi IPTG 100  $\mu\text{M}$  (lajur 1,2), IPTG 150  $\mu\text{M}$  (lajur 4,5), dan IPTG 200  $\mu\text{M}$  (lajur 6,7). Nilai Rf yang diperoleh pada masing-masing marker protein standar 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa, 75 kDa, dan sampel JSU pGEX-6P1 adalah sebesar 0,727; 0,568; 0,477; 0,352; dan 0,420. Grafik dan hasil perhitungan ukuran protein rekombinan JSU

pGEX-6P1 pada pengulangan 3 dapat dilihat pada Lampiran 8. Pita pada induksi IPTG 100  $\mu\text{M}$  terlihat lebih tebal dibandingkan dengan pita pada induksi IPTG 150  $\mu\text{M}$  dan IPTG 200  $\mu\text{M}$ . Namun, jika dibandingkan dengan hasil kuantifikasi maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi IPTG 150  $\mu\text{M}$  yang paling optimal karena dengan konsentrasi protein yang rendah, yaitu sekitar 1,023 mg/ml pada hasil solubilisasi dan 0,547 mg/ml pada hasil *refolding* dapat menghasilkan pita yang tebal pada SDS-PAGE. Pita hasil refolding pada pengulangan 3 terlihat jelas dibandingkan dengan hasil refolding pada pengulangan 1 dan pengulangan 2. Hal tersebut menurut Clark (1998: 2) dapat disebabkan oleh kontaminan seperti sel-sel *E. coli* yang tidak mengalami lisis, asam nukleat, komponen membran luar dan peptidoglikan, yang terdapat pada hasil solubilisasi. Kontaminan tersebut dapat menghambat proses *refolding* sehingga mengakibatkan berkurangnya jumlah protein rekombinan yang dihasilkan selama proses *refolding*. pH yang rendah juga dapat menyebabkan protein tidak dapat kembali ke bentuk asalnya atau *native* (Wingfield 2002: 6.1.10 & 6.1.14).

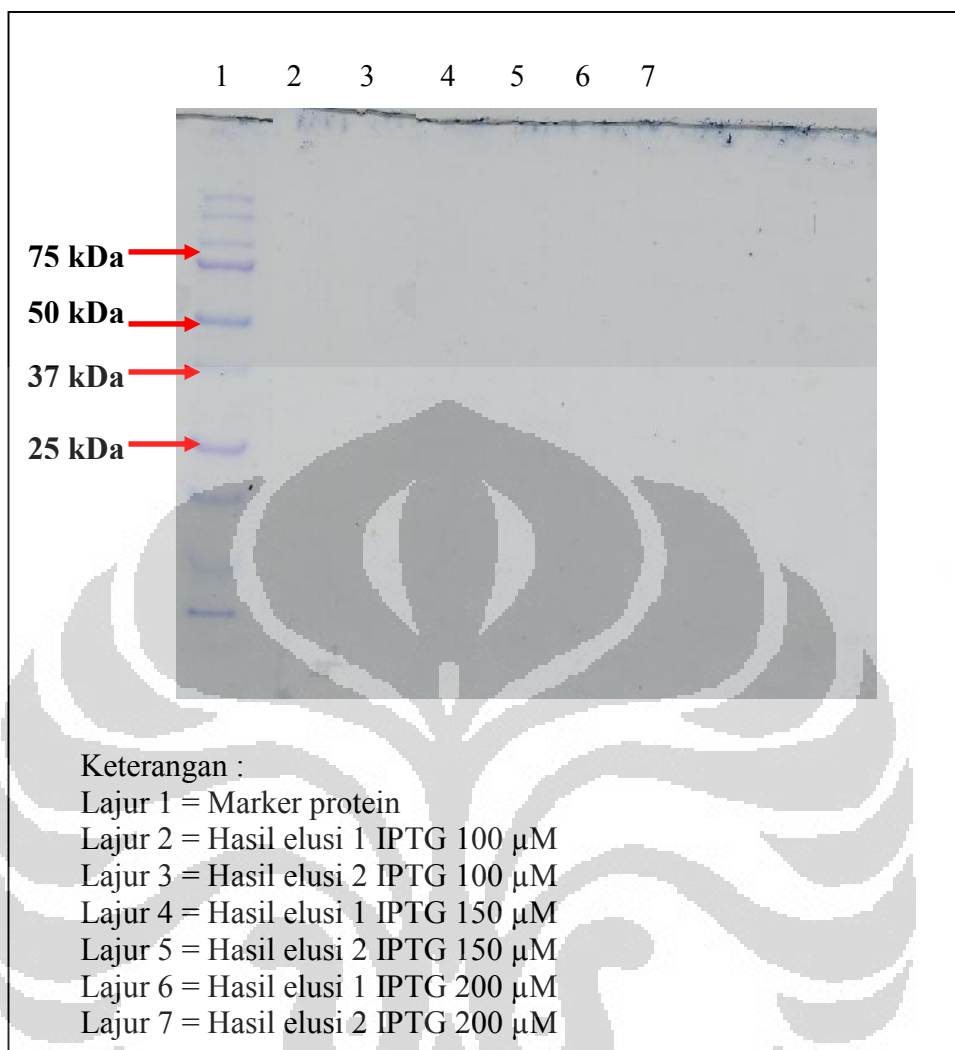
Berdasarkan hasil SDS-PAGE dan kuantifikasi protein dari tiga kali pengulangan dapat disimpulkan bahwa konsentrasi IPTG 100  $\mu\text{M}$  paling optimal dalam menginduksi ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1. Hal tersebut sesuai dengan Sadeghi *dkk.* (2011: 91) dan Baktula & Nolan (2011: 5) yang menyatakan bahwa konsentrasi IPTG 100  $\mu\text{M}$  dapat menghasilkan ekspresi protein rekombinan yang optimal.

Purifikasi protein rekombinan dari *inclusion body* juga dapat dilakukan, tetapi membutuhkan prosedur dan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan purifikasi protein rekombinan dari bagian supernatan (*soluble*) (Glick & Pasternak 2003: 142). Metode purifikasi yang dapat digunakan adalah metode kromatografi afinitas dengan GST sebagai protein fusi. Hasil SDS-PAGE tahap purifikasi dapat dilihat pada Gambar 4.2.4 (hasil *inner volume* dan *washing* 1) dan Gambar 4.2.5 (hasil elusi 1 dan elusi 2).



Gambar 4.2.4. Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Tahap Purifikasi (*inner volume* dan *washing 1*)

Gambar 4.2.4, yaitu protein JSU pGEX-6P1 yang telah dipurifikasi menggunakan resin Glutathione Sepharose 4B dan telah dianalisis dengan SDS-PAGE menunjukkan adanya banyak pita pada *inner volume* baik pada IPTG 100  $\mu\text{M}$  (lajur 1,2), IPTG 150  $\mu\text{M}$  (lajur 4,5), dan IPTG 200  $\mu\text{M}$  (lajur 6,7). *Inner volume* masih mengandung banyak sekali protein karena merupakan tahap awal purifikasi. Oleh karena itu masih terdapat banyak pita pada hasil visualisasi SDS-PAGE. Gambar 4.2.5 hasil elusi pada tahap purifikasi menunjukkan tidak adanya pita yang terlihat baik pada IPTG 100  $\mu\text{M}$  (lajur 1,2), IPTG 150  $\mu\text{M}$  (lajur 4,5), dan IPTG 200  $\mu\text{M}$  (lajur 6,7). Hal tersebut menunjukkan bahwa protein JSU pGEX-6P1 tidak berhasil di purifikasi.



Gambar 4.2.5 Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Tahap Purifikasi (elusi 1 dan elusi 2)

Kegagalan purifikasi diduga karena resin Gluthatione Sepharose 4B yang digunakan sudah tidak mampu mengikat protein rekombinan JSU pGEX-6P1. Pengikatan ligan spesifik (JSU pGEX-6P1 + GST-tag) dengan matriks (Gluthatione Sepharose 4B) terjadi jika keduanya membentuk ikatan kovalen. Sebagian besar ligan pertama kali akan mengikat ke lengan *spacer* dan kemudian berikatan dengan matriks (Paradise 2007: 1). Gabungan ligan-matriks kemudian dielusi dengan *elution buffer* untuk memutuskan ikatan tersebut dan mengeluarkan protein target. *Elution buffer* dapat memutuskan ikatan antara ligan dengan matriks pada kondisi pH yang ekstrem, kadar garam tinggi, atau dengan menggunakan deterjen atau *chaotropic agents* yang dapat mendenaturasi salah satu molekul (Thomas 2011: 1). Menurut Saluta & Bell (1998: 2), kegagalan

purifikasi tersebut dapat diminimalisir dengan beberapa cara diantaranya menurunkan suhu pertumbuhan bakteri antara 20 °C sampai 30 °C, induksi (IPTG) dilakukan dalam waktu singkat, induksi (IPTG) diberikan pada tingkat kepadatan sel yang tinggi dengan waktu induksi yang singkat, dan meningkatkan aerasi.

### 4.3. Kuantifikasi protein rekombinan JSU pGEX-6P1

Hasil solubilisasi protein dan *refolding* JSU pGEX-6P1 dikuantifikasi menggunakan mesin GeneQuant untuk mengetahui konsentrasi protein yang didapatkan pada masing-masing perlakuan konsentrasi IPTG. Total nilai konsentrasi protein JSU pGEX-6P1 dihitung berdasarkan hasil rata-rata pengulangan 1, 2, dan 3 pada setiap perlakuan. Tabel 4.3.1 (konsentrasi protein hasil solubilisasi) menunjukkan bahwa nilai rata-rata protein JSU pGEX-6P1 dengan induksi IPTG 100  $\mu$ M (perlakuan 2) memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan induksi IPTG 150  $\mu$ M (perlakuan 1) dan IPTG 200  $\mu$ M (perlakuan 3). Hasil  $S_{100}$  memiliki total konsentrasi 1,447 mg/ml,  $S_{150}$  memiliki total konsentrasi 1,089 mg/ml,  $S_{200}$  memiliki total konsentrasi 1,304 mg/ml. Konsentrasi protein JSU pGEX-6P1 pada hasil solubilisasi berkisar antara  $\pm 1,089$  mg/ml - 1,447 mg/ml. Tabel 4.3.2 (konsentrasi protein hasil *refolding*) menunjukkan bahwa nilai rata-rata protein JSU pGEX-6P1 dengan induksi IPTG 150  $\mu$ M (perlakuan 2) memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan induksi IPTG 100  $\mu$ M (perlakuan 1) dan IPTG 200  $\mu$ M (perlakuan 3). Hasil  $R_{100}$  memiliki total konsentrasi 0,836 mg/ml,  $R_{150}$  memiliki total konsentrasi 0,840 mg/ml,  $R_{200}$  memiliki total konsentrasi 0,758 mg/ml. Konsentrasi protein JSU pGEX-6P1 pada hasil *refolding* berkisar antara  $\pm 0,758$  mg/ml – 0,840 mg/ml. Berdasarkan data diatas, maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi protein hasil *refolding* lebih kecil dibandingkan dengan hasil solubilisasi. Hal tersebut menurut Clark (1998: 159) terjadi karena proses *refolding* dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya kekuatan ionik, pH, temperatur, dan adanya kontaminan seperti protein selain protein target. Temperatur yang rendah dapat mencegah terjadinya agregasi (pembentukan agregat) selama proses *refolding* (Wingfield 2002: 6.1.10 & 6.1.14).

Tabel 4.3.1 Hasil kuantifikasi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 (hasil solubilisasi)

Pengulangan	Konsentrasi protein (mg/ml)								
	S <sub>100</sub>			S <sub>150</sub>			S <sub>200</sub>		
	260	280	Total	260	280	Total	260	280	Total
1	0,671	0,908	0,897	1,654	1,611	1,240	1,150	1,471	1,406
2	1,315	1,776	1,753	0,651	0,967	1,004	0,884	1,227	1,260
3	1,108	1,635	1,692	0,589	0,949	1,023	1,382	1,482	1,247
Rata-Rata	0,965	1,314	<b>1,447</b>	1,797	1,373	<b>1,089</b>	1,168	1,386	<b>1,304</b>

Tabel 4.3.2 Hasil kuantifikasi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 (hasil *refolding*)

Pengulangan	Konsentrasi protein (mg/ml)								
	R <sub>100</sub>			R <sub>150</sub>			R <sub>200</sub>		
	260	280	Total	260	280	Total	260	280	Total
1	0,334	0,460	0,459	1,554	1,661	1,310	0,723	0,971	0,956
2	1,867	1,872	1,483	0,403	0,626	0,664	0,495	0,737	0,766
3	0,353	0,539	0,567	0,341	0,520	0,547	0,317	0,512	0,553
Rata-Rata	0,851	0,954	<b>0,836</b>	0,766	0,936	<b>0,840</b>	0,511	0,740	<b>0,758</b>

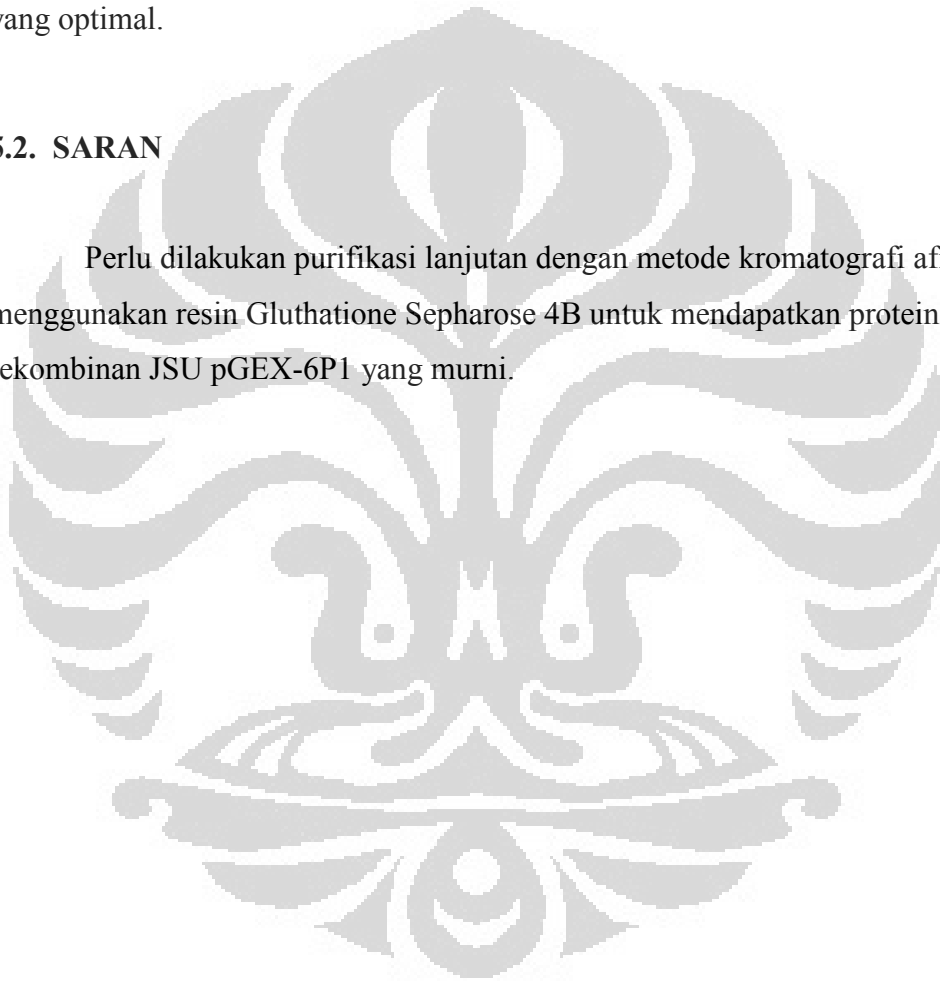
## **BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1. KESIMPULAN**

Berdasarkan tiga konsentrasi IPTG yang diteliti, diketahui bahwa induksi IPTG 100  $\mu$ M dapat menghasilkan ekspresi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 yang optimal.

### **5.2. SARAN**

Perlu dilakukan purifikasi lanjutan dengan metode kromatografi afinitas menggunakan resin Gluthatione Sepharose 4B untuk mendapatkan protein rekombinan JSU pGEX-6P1 yang murni.



## DAFTAR REFERENSI

- Amersham Bioscience. 2002. GST gene fusion system handbook. 110 hlm.  
<http://www.amershambioscience.com>. 22 Maret 2011, pk. 20.15 WIB.
- Anh Hue, T. T. 2008. Transformation of *Escherichia coli* Made Competent by Calcium Chloride Protocol. Agustus 2010: 1 hlm.  
<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3152-transformation-of-escherichia-coli-made-competent-by-calcium-chloride-protocol>. 7 November 2011, pk 19.58 WIB.
- Baktula, A. M., & G. A. Nolan. 2011 . Effect of Variable Isopropyl Beta-Thiogalactoside Concentrations on  $\beta$ -Galactosidase Activity. 2011: 6 hlm.  
<http://bioweb.wku.edu/courses/biol450/Reports/AvinishGenise2ndReport.pdf>. 11 Desember 2011. pk. 21.58 WIB.
- Bio-Rad Laboratories. 2011. Protein standards for blotting. 2011: 1 hlm.  
[http://www3.bio-rad.com/cmc\\_upload/Products/-24891/precisionplus\\_all5.jpg](http://www3.bio-rad.com/cmc_upload/Products/-24891/precisionplus_all5.jpg). 11 Desember 2011. pk. 16.09 WIB.
- Brock, T. D., M. T. Madigan, J. M. Martinko & J. Parker. 1994. *Biology of microorganisms*. 7th ed. Prentice-hall, Inc., New Jersey: xvii + 909 hlm.
- Brown, T.A. 1991. *Genome*. BIOS Scientific Publisher Ltd., Oxford: xxviii + 472 hlm.
- Brown, T. A. 2006. *Gene cloning and DNA analysis: An introduction*. 5th ed. Blackwell Publishing, Oxford: vi + 233 hlm.
- Cappuccino, J.G. & N. Sherman. 2002. *Microbiology: A laboratory manual*. 6th ed. Benjamin Cummings, San Fransisco: xvi + 491 hlm.
- Chung, C. T., S. L. Niemela, & R. H. Miller. 1989. One step preparation of competent sel *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86** : 2172-2175.
- Clark, E.D.B. 1998. Refolding of recombinant proteins. *Current Biology* **9**: 157-163.
- Coffin, J. M. 1979. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: Some unifying hypothesis. *Journal of Genetic Virology* **42**: 1-26.



- Dashivets, T., N. Wood, C. Hergersberg, J. Buchner, & M. Haslbec. 2009. Rapid matrix-assisted refolding of histidine-tagged proteins. 23 Februari 2009: 1 hlm.  
[http://www.cipsm.de/en/publications/researchAreaB/2009/Rapid\\_Matrix-Assisted\\_Refolding\\_of\\_Histidine-Tagged\\_Proteins/index.html?style=0](http://www.cipsm.de/en/publications/researchAreaB/2009/Rapid_Matrix-Assisted_Refolding_of_Histidine-Tagged_Proteins/index.html?style=0). 15 November 2011. pk. 17.52 WIB.
- Davis, L. G., W. M. Kuehl, & J. F. Battey. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Appleton n Lange, Connecticut: xii + 777 hlm.
- Dissessa, D. 2011. Protein electrophoresis. 2011: 1 hlm.  
[http://biosciencetechnology.com/Products/2007/11/Protein-Electrophoresis-\(12105\)/](http://biosciencetechnology.com/Products/2007/11/Protein-Electrophoresis-(12105)/). 7 November 2011. pk. 21.20 WIB.
- Ditcham, W. 2007. The Development of Recombinant Vaccines Against Jembrana Disease. Maret 2007: 200 hlm.  
[researchrepository.murdoch.edu.au/438/2/02whole.pdf](http://researchrepository.murdoch.edu.au/438/2/02whole.pdf). 5 April 2011, pk. 14.21 WIB.
- Ernest, M. J. & N. J. Rosenbaum. 1993. Bacterial transformation. 1993: 14 hlm.  
<http://www.zoo.utoronto.ca/able/volumes/copyright.htm>. 8 November 2011. pk. 15.06 WIB.
- Fairbanks, D. J. & W. R. Andersen. 1999. *Genetics: The continuity of life*. Brooks/Cole Publishing Company, Toronto: xix + 820 hlm.
- Gaffar, S. 2007. Penggunaan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk deteksi retrovirus HTLV (Human T-cell lymphotropic virus). September: 22 hlm.  
[http://www.pustaka.unpad.ac.id/wp-content/uploads/2009/06/pcr\\_untuk\\_deteksi\\_htlv.pdf](http://www.pustaka.unpad.ac.id/wp-content/uploads/2009/06/pcr_untuk_deteksi_htlv.pdf). 09 Februari 2011, pk. 20.01 WIB.
- 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 (eds). 2003. Current protocols in protein science. John Willet & Sons, Inc., Washington: 10.1.1-10.1.34.
- Ganesh, K. 2010. Gene expression regulation in Prokaryotes cells. 2010: 1hlm.  
<http://www.tutorvista.com/biology/gene-expression-in-prokaryotes-cell>. 22 Maret 2011, pk. 20.03 WIB.

- Glick, B.R. & J.J. Pasternak. 2003. *Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA*. ASM Press, Washington DC: xxiii + 760 hlm.
- Guthrie, T. 2005. Cell lysis method protocol. 2011: 1 hlm.  
<http://www.molecularstation.com/cell/cell-lysis/>. 25 Agustus 2011, pk. 15.34 WIB.
- Hartaningsih, N. 2003. Virus Jembrana bentuk natif, susunan genetik dan variasinya. *Buletin Veteriner* **15** (63): 38-42.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stanley & S.T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th.ed. Williams & Wilkins, Baltimore: xviii + 787 hlm.
- Jakubowski, D. R. 2011. Binding and the control of gene expression. 27 April 2011: 1 hlm.  
<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/bind/olbindtranscription.html>. 15 November 2011. pk. 17.29 WIB.
- Lander, E. 1994. The life cycle of a retrovirus. 2009:1 hlm.  
[http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/ecb\\_images/06\\_39\\_retrovirus.gif](http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/ecb_images/06_39_retrovirus.gif). 8 November 2011, pk. 21.09 WIB.
- LaVallie, E. R. 1995. *Production of recombinant proteins in Escherichia coli*. Dalam: Coligan, J.E., B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher & P. T. Wingfield (eds). 2003. *Current protocols in protein science*. John Willey & Sons, Inc., Washington: 5.1.1--5.1.8.
- Lewis, J. 2008. Recombinant Proteins as Vaccines and diagnostic antigens for the control of jembrana disease virus infection in Indonesia: 198 hlm.  
<http://researchrepository.murdoch.edu.au/1806/2/02Whole.pdf>. 25 Agustus 2011, pk. 17.20 WIB.
- Li, X., X. Sui, Y. Zhang, Y. Sun, Y. ZHao, Y. Zhai, & Q. Wang. 2010. An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. *African Journal of Biotechnology* **9** (50): 8549-8554.
- Lowik, C. 2011. Protino GST/4B column. 11 November 2011: 1 hlm.  
<http://www.bioke.com/blobs/Plaatjes/MN/Protino/Principle-GST-tag.jpg>. 13 November 2011. pk. 22.11 WIB.

- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap & D.P. Clark. 2009. *Brock: Biology of microorganisms*. Pearson Benjamin Cummings publishing Inc., San Francisco: xxviii + 1061 + A-12 + G-17 + I-36 hlm.
- Margaritis, A. 2007. Cell disruption method. 2007:1 hlm.  
<http://www.eng.uwo.ca/people/amargaritis/Margaritis%20CBE%20403a%20Fall%202007/CBE%20403a%20Course%20Notes%203%20%28cell%20disruption%20methods%29%20F%202007.pdf>. 25 Agustus 2011, pk. 15.45 WIB.
- Margawati, E. T., A. Utama, W. Probowasito, Indriawati, M. Ridwan, & N. Hasanah. 2006. Pengembangan vaksin jembrana berbasis protein rekombinan J-Tat dengan fusi His-tag. Laporan Akhir Kumulatif. 30 hlm.
- Margawati, E. T. & M. Ridwan. 2009. Expression and characterization of recombinant protein of JSU pGEX either by single or double cell lysis. *Biota* **14** (3): 166-171.
- Miesfeld, R. L. 2000. Transformasi; Ekspresi Gen Asing dalam Sel Bakteri. 9 September 2010: 1. <http://sciencebiotech.net/transformasi-ekspresi-gen-asing-dalam-sel-bakteri/>. 25 Agustus 2011, pk. 16.02 WIB.
- Muhaimin, O. B., L. E. Ratnaningsih, E. Purwantini, & D. S. Retnoningrum. 2005. Purifikasi protein fusi MBP-Mga *Streptococcus pyogenes* hasil ekspresi heterolog di *Escherichia coli*. *Jurnal Matematika dan Sains* **10** (1): 31-36.
- Muharsini, S. 2005. Strategi pengembangan vaksin Myiasis yang disebabkan oleh larva lalat *Chrysomya bezziana* (The old world screwworm fly). *Wartazoa* **15** (2): 102-110.
- Nick. 2007. Choosing a competent *E. coli* strain. 24 September 2007: 14 hlm.  
<http://bitesizebio.com/2007/09/24/choosing-a-competent-ecoli-strain>. 10 Februari 2011, pk. 10.09 WIB.
- Nolan, G. P. 2006. Retroviral life cycle. 2006: 14hlm.  
[http://stanford.edu/group/nolan/tutorials/ret\\_2\\_lifecyc.html](http://stanford.edu/group/nolan/tutorials/ret_2_lifecyc.html). 3 Maret 2011, pk. 19.37 WIB.

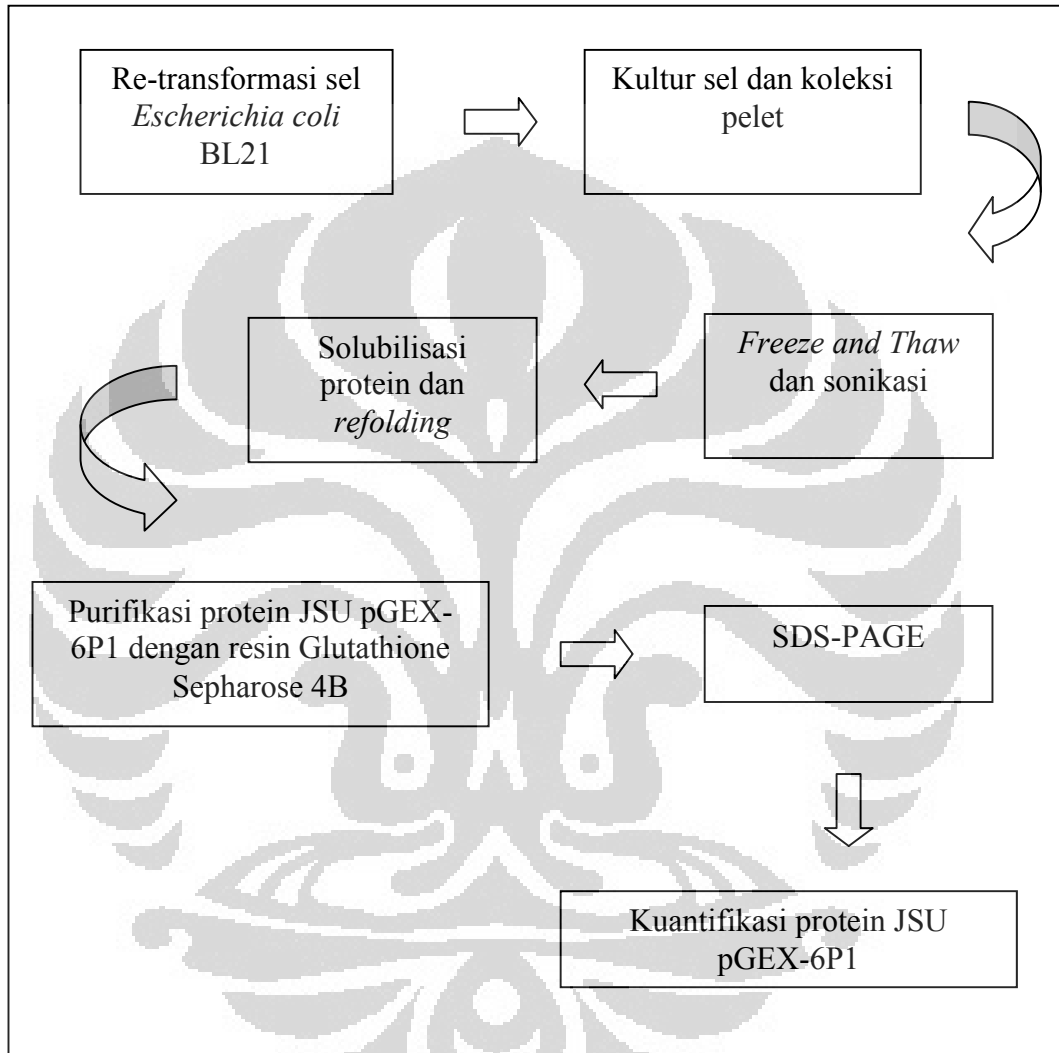
- Paradise, C. 2007. Affinity chromatography. 2007: 1 hlm.  
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/01grnoland/affinchr.html>. 13 November 2011. pk. 21.19 WIB.
- Parr, D. 2001. Safety requirements for electrical equipment for measurement, control and laboratory use. 2 Oktober 2001: 34 hlm.  
<http://www.biochrom.co.uk>. 12 November 2011. pk. 16.56 WIB.
- Pierce Biotechnology. 2009. Thermo scientific Pierce Cell lysis technical handbook: Featuring cell lysis reagent and detergent. Thermo Fisher Scientific, Inc., United States: 50 hlm.
- QIAexpressionist. 2001. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged protein. 5th ed. Qiagen, Valencia: 126 hlm.
- Sorensen, H.P. & K.K. Mortensen. 2004. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115: 113-128.
- Queen-Baker, J. 2000. *The transformation lab: Experiment using Escherichia coli and pFluoroGreen*. MdBiolab: 19 hlm.
- Roychoudhury, A., S. Basu, & D. N. Sengupta. 2009. Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of *E. coli* using two common plasmid vectors. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 46 (5): 395-400.
- Sadeghi, H. M. M., M. Rabbani, E. Rismani, F. Moazen, F. Khodabakhsh, K. Dormiani, & Y. Khazaei. 2011. Optimization of the expression of reteplase in *Escherichia coli*. *Research in Pharmaceutical Sciences* 6 (2): 87-92
- Saluta, A & P.A. Bell. 1998. Troubleshooting GST fusion protein expression in *E. coli*. Amersham Biosciences, Piscataway NJ: 3 hlm.
- Sambrook, J. & D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol. 1. ed ke-3. CSHL Press, New York: xxvii + 7.94 + 1.440 hlm.
- Seidman, L.A. & C.J. Moore. 2000. *Basic laboratory for biotechnology: textbook and laboratory reference*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey: 751 hlm.
- Sigma. 2011. Factors that affect transformation efficiency. 2011: 1.  
<http://www.sigmaldrich.com/life-science/molecular-biology/cloning-and->

- [expression/learning-center/transformation-efficiency.html](#). 7 November 2011, pk. 20.13 WIB.
- Singh, S. M. & A. M. Panda. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body protein. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99** (4): 303-310.
- Snustad, D.P. & M.J. Simmons. 2003. *Principles of genetics*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken: xix + 840 hlm.
- Soeharsono, S., Wilcox G.E., Dharma D.M., Hartaningsih N., Kertayadnya G., Budiantono A. 1995. Species differences in the reaction of cattle to Jembrana disease virus infection. *Journal of Comparative Pathology* **112** (4): 391-402.
- Sorensen, H.P. & K.K. Mortensen. 2004. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **115**: 113-128.
- Thomas, A. 2011. Traditional Methods of Cell Lysis. 2011:1 hlm. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=72F377CD-2581-438C-9B27-5360226EA128>. 25 Agustus 2011, pk. 15.51 WIB.
- Thomas, A. 2011. Pierce GST and His Tag Protein Interaction Pull-Down Kits. 2011:1 hlm. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=42e8e027-6231-4512-8dde-bb026740966b>. 2 November 2011, pk. 14.53 WIB.
- Thomas, A. 2011. Affinity purification. 2011: 1 hlm. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=E9F29426-E119-45F2-9625-8A5296BF3E92>. 7 November 2011. pk. 20.59 WIB.
- Wang, C. 2002. Bacterial Transformation Efficiency. 2011:1. [www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project\\_ideas/BioChem\\_p013.shtml](http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/BioChem_p013.shtml) - 114k. 25 Agustus 2011, pk. 16.13 WIB.
- Widiyanti, Ni Luh P. M., K. Suata, Nyoman Mantik Astawa, & Hartaningsih. 2009. Respon Antibodi Antikapsid pada Mencit yang Divaksin Vaksin Limpa dan Vaksin Kultur Virus Penyakit Jembrana. *Jurnal Veteriner* **10** (2): 57-62.
- Wingfield, P.T. 2002. *Overview of the purification of recombinant proteins*

- produced in Escherichia coli*. Dalam: Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher & P.T. Wingfield (eds). 2003. Current protocols in protein science. John Willey & Sons, Inc., Washington: 6.1.1-6.1.37.
- Wolf, J.B. 2002. Transformation of *E. coli* by Electroporation. 3 Februari 2010:1. <http://userpages.umbc.edu/~jwolf/m7.htm>. 25 Agustus 2011, pk. 16.28 WIB.
- Wolfe, S. L. 1993. *Molecular and cellular biology*. Wadsworth Publishing Company, California: xviii + 1145 hlm.
- Yildir, C., Z. I. Onsan & B. Kirdar. 1998. Optimization of starting time and period of induction and inducer concentration in production of the restriction enzyme EcoRI from recombinant. *Turkish Journal of Chemistry* 22: 221-226.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi molekular*. Erlangga, Jakarta: xiii + 269 hlm.
- Zhiming Tu, Guangyuan He, Kexiu X. Li, Mingjie J. Chen, Junli Chang, Ling Chen, Qing Yao, & Dongping P. Liu. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Journal of Biotechnology* 8 (1): 114-120.

Lampiran 1

Skema cara kerja



## Lampiran 2

Pembuatan medium, larutan, dan *buffer*

Medium, larutan, dan <i>buffer</i>	Komposisi	Cara pembuatan
Medium Luria Bertani (LB) cair 300ml	Bacto trypton, yeast extract, NaCl, dan akuades	Sebanyak 3 g bacto trypton; 1,5 g yeast extract; dan 1,5 g NaCl dicampurkan, kemudian ditambahkan akuades hingga volume mencapai 300 ml. Campuran diaduk dengan <i>magnetic stirrer</i> sampai semua larut, disterilisasi dalam autoklaf 121 °C, 2 atm selama 15-20 menit.
Medium Luria Bertani (LB) padat 100 ml	Bacto trypton, bacto agar, yeast extract, NaCl, dan akuades	Sebanyak 1 g bacto trypton; 1,5 g bacto agar; 0,5 g yeast extract; dan 0,5 g NaCl dicampurkan, kemudian ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml. Campuran diaduk dengan <i>magnetic stirrer</i> sampai semua larut, disterilisasi dalam autoklaf 121 °C, 2 atm selama 15-20 menit.
TSS medium 6,25 ml pH 6,5	Medium Luria Bertani (LB) cair, PEG 6000, DMSO, 1 M MgCl <sub>2</sub>	Sebanyak 5,3125 ml medium LB cair; 0,625 g PEG 6000 dicampurkan kemudian pH diukur hingga mencapai pH 6,5. Larutan disterilisasi dalam autoklaf 121 °C, 2 atm selama 15-20 menit. Larutan ditambahkan 0,3125 ml DMSO, 0,625 ml MgCl <sub>2</sub> .



## Lanjutan

		diaduk, dan disimpan pada suhu 4 °C.
PBS <i>buffer</i> 500 ml	NaCl, KCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , dan akuades	Sebanyak 4,0908 g NaCl; 0,1006 g KCl; 0,7098 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; dan 0,1225 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> dicampurkan, kemudian ditambahkan akuades hingga volume mencapai 500 ml. Campuran diaduk dengan <i>magnetic stirer</i> sampai semua larut, disterilisasi dalam autoklaf 121 °C, 2 atm selama 15-20 menit.
<i>Elution buffer</i> 3,5 ml	50 mM TRIS pH 8 dan 10 mM <i>glutation reduced</i>	Sebanyak 0,0107 g <i>glutation reduced</i> dicampurkan ke dalam 3,5 ml TRIS pH 8, diaduk, dan disimpan pada suhu 4 °C
10% SDS 50 ml	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (SDS) dan akuades	Sebanyak 5 g SDS dicampurkan ke dalam 50 ml akuades. Campuran diaduk dengan menggunakan <i>magnetic stirer</i> hingga larutan bening.
5x SDS <i>running</i> pH 8,3 500 ml	TRIS, <i>glycine</i> , SDS, dan akuades	Sebanyak 9 g TRIS; 43,2 g <i>glycine</i> ; 3 g SDS dicampurkan, kemudian ditambahkan 450 ml akuades. Campuran diaduk dengan <i>magnetic stirer</i> sampai tercampur, kemudian pH diukur dengan pH meter hingga mencapai pH 8,3 (ditambahkan HCl 6N). Larutan ditambahkan akuades hingga volume mencapai 500 ml dan disimpan pada suhu 4 °C.
<i>Resolving gel</i>	1,5 mM TRIS pH 8, 10% SDS, akrilamid, <i>ammonium persulphate</i>	Sebanyak 3,5 ml TRIS pH 8; 0,1 ml 10% SDS, 4,15 ml akrilamid, 50 µl

## Lanjutan

	(APS), TEMED, dan akuades	APS, 15 $\mu$ l TEMED, dan 3,2 ml akuades dicampurkan. Larutan gel diletakkan pada <i>glass plate sandwich</i> yang telah diletakkan pada <i>casting stand</i> . Gel dibiarkan hingga mengeras.
<i>Stacking gel</i>	0,5 mM TRIS pH 6,8, 10% SDS, akrilamid, APS, TEMED, dan akuades	Sebanyak 1,25 ml TRIS pH 6,8; 0,05 ml 10% SDS, 0,65 ml akrilamid, 25 $\mu$ l APS, 5 $\mu$ l TEMED, dan 3,05 ml akuades dicampurkan. Larutan gel diletakkan pada <i>glass plate sandwich</i> yang telah diletakkan pada <i>casting stand</i> setelah <i>resolving gel</i> mengeras. <i>Stacking gel</i> dibiarkan hingga mengeras.
<i>Washing buffer</i> 200 ml	100 mM TRIS pH 8, 5 mM EDTA, dan 1% Triton X-100	0,372 g EDTA; 2 ml Triton X-100; ditambahkan TRIS pH 8 hingga volume mencapai 200 ml, diaduk. Larutan disimpan pada suhu ruang.
<i>Solubilized buffer</i> 10 ml	2 M TRIS pH 12, 2 M urea, 20 mM DTT, 1 mM PMSF, dan akuades	1,2 g urea; 0,03 g DTT; 100 $\mu$ L PMSF; ditambahkan TRIS pH 12 hingga volume mencapai 10 ml, diaduk. Larutan disimpan pada suhu ruang.
<i>Dilution buffer</i> 30 ml	20 mM TRIS pH 8, 21 mM DTT, 0,1% CHAPS, dan akuades	0,073 g TRIS; 0,03 g 0,1% CHAPS; 0,046 g DTT; ditambahkan 25 ml akuades, diukur hingga pH 8; ditambahkan akuades hingga volume mencapai 30 ml, diaduk. Laruan disimpan pada suhu ruang.

## Lanjutan

Larutan <i>staining commasie brilliant blue</i> 500ml	<i>Commasie brilliant blue</i> , methanol, <i>glacial acetic acid</i> , dan akuades	Sebanyak 0,25 gr <i>commasie brilliant blue</i> ; 225 ml methanol; 50 ml <i>glacial acetic acid</i> dicampurkan, kemudian ditambahkan 500 ml akuades. Larutan diaduk sampai tercampur rata dan disimpan pada suhu 4 °C.
Larutan <i>destain commasie blue</i> 1000 ml	<i>Glacial acetic acid</i> , methanol, dan akuades	Sebanyak 100 ml <i>glacial acetic acid</i> ; methanol 400 ml dicampurkan, ditambahkan 500 ml akuades. Larutan diaduk sampai tercampur rata dan disimpan pada suhu 4 °C.
Ampisilin	Ampisilin dan <i>distiled water</i>	Sebanyak 1 g ampisilin dicampurkan ke dalam 10 ml <i>distiled water</i> , kemudian diaduk. Campuran di- <i>aliquot</i> masing-masing 1 ml ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang baru dengan menggunakan filter steril 0,22 µM dan disimpan pada suhu -20 °C.
<i>Ammonium persulphate</i> (APS) 10%	<i>Ammonium persulphate</i> (APS) dan akuades	Sebanyak 1 g <i>Ammonium persulphate</i> (APS) dicampurkan dengan 10 ml akuades, kemudian diaduk. Campuran di- <i>aliquot</i> masing-masing 1 ml ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang baru dengan menggunakan filter steril 0,22 µM dan disimpan pada suhu -20 °C.
<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside</i> (IPTG) 100 µM 5 ml	IPTG dan akuades	Sebanyak 0,119 g IPTG dicampurkan dengan 5 ml akuades, kemudian diaduk. Campuran di-

## Lanjutan

		<i>aliquot</i> masing-masing 1 ml ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang baru dengan menggunakan filter steril 0,22 $\mu$ M dan disimpan pada suhu -20 $^{\circ}$ C.
<i>Isopropyl-<math>\beta</math>-D-thiogalactopyranoside</i> (IPTG) 150 $\mu$ M 5 ml	IPTG dan akuades	Sebanyak 0,179 g IPTG dicampurkan dengan 5 ml akuades, kemudian diaduk. Campuran di- <i>aliquot</i> masing-masing 1 ml ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang baru dengan menggunakan filter steril 0,22 $\mu$ M dan disimpan pada suhu -20 $^{\circ}$ C.
<i>Isopropyl-<math>\beta</math>-D-thiogalactopyranoside</i> (IPTG) 200 $\mu$ M 5 ml	IPTG dan akuades	Sebanyak 0,234 g IPTG dicampurkan dengan 5 ml akuades, kemudian diaduk. Campuran di- <i>aliquot</i> masing-masing 1 ml ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang baru dengan menggunakan filter steril 0,22 $\mu$ M dan disimpan pada suhu -20 $^{\circ}$ C.
<i>Loading dye</i>	0,5 M TRIS pH 6,8, gliserol, 10% SDS, 0,05% <i>bromophenol blue</i> , 2-Mercaptoethanol, dan akuades	Sebanyak 1 ml TRIS pH 6,8; 0,8 ml gliserol; 1,6 ml SDS; 0,2 ml <i>bromophenol blue</i> , 0,4 ml 2-Mercaptoethanol, dan 4 ml akuades dicampurkan. Campuran di- <i>aliquot</i> masing-masing 1 ml ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml, ditutup dengan <i>aluminium foil</i> , dan disimpan pada suhu -20 $^{\circ}$ C.
0,5 M TRIS pH 6,8 100 ml	TRIS dan akuades	Sebanyak 6,057 g TRIS dicampurkan ke dalam

## Lanjutan

		80 ml akuades. pH diukur hingga mencapai pH 6,8 (ditambahkan 6N HCl). Larutan ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml dan disimpan pada suhu 4 °C.
1,5 M TRIS pH 8,8 100 ml	TRIS dan akuades	Sebanyak 18,171 g TRIS dicampurkan ke dalam 80 ml akuades. pH diukur hingga mencapai pH 8,8 (ditambahkan 6N HCl). Larutan ditambahkan akuades kembali hingga volume mencapai volume 100 ml dan disimpan pada suhu 4 °C.

[Sumber Sambrook & Russell 2001: A1.1-A2.12; Chung *dkk.* 1989: 2172; Margawati & Ridwan 2009: 167-168)

## Lampiran 3

Perhitungan konsentrasi protein rekombinan JSU pGEX-6P1 dari sampel hasil solubilisasi

---

Hasil kuantifikasi IPTG 100  $\mu\text{M}$  ( $S_{100}$ ) pengulangan 1:

Konsentrasi protein Absorbansi 260 = 0,671 A

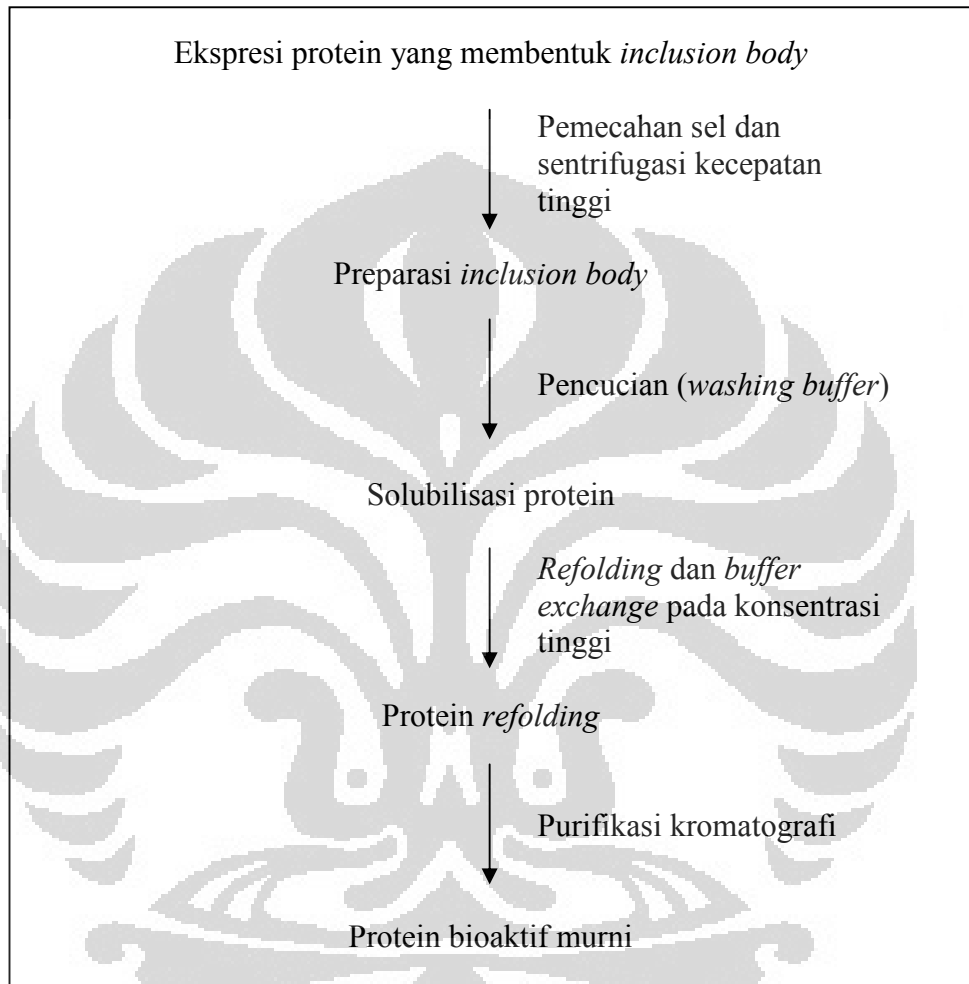
Konsentrasi protein Absorbansi 280 = 0,908 A

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi protein (mg/ml)} &= (1,55 \times \text{Abs 280}) - (0,76 \times \text{Abs 260}) \\ &= (1,55 \times 0,908) - (0,76 \times 0,671) \\ &= 1,4074 - 0,50996 \\ &= 0,89744\end{aligned}$$

Kesimpulan: Konsentrasi protein JSU pGEX-6P1 induksi IPTG 100  $\mu\text{M}$  ( $S_{100}$ ) pengulangan 1 adalah 0,89744 mg/ml

[Sumber: Parr 2001: 12]

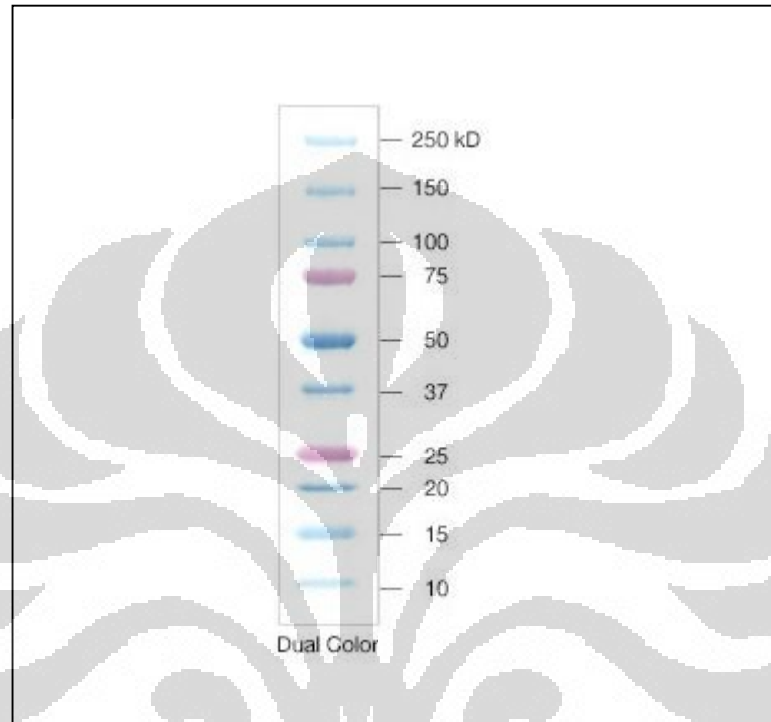
## Lampiran 4

Proses ekspresi protein rekombinan yang membentuk *inclusion body*

[Sumber: Singh & Panda 2005: 307]

## Lampiran 5

## Marker protein Dual Color



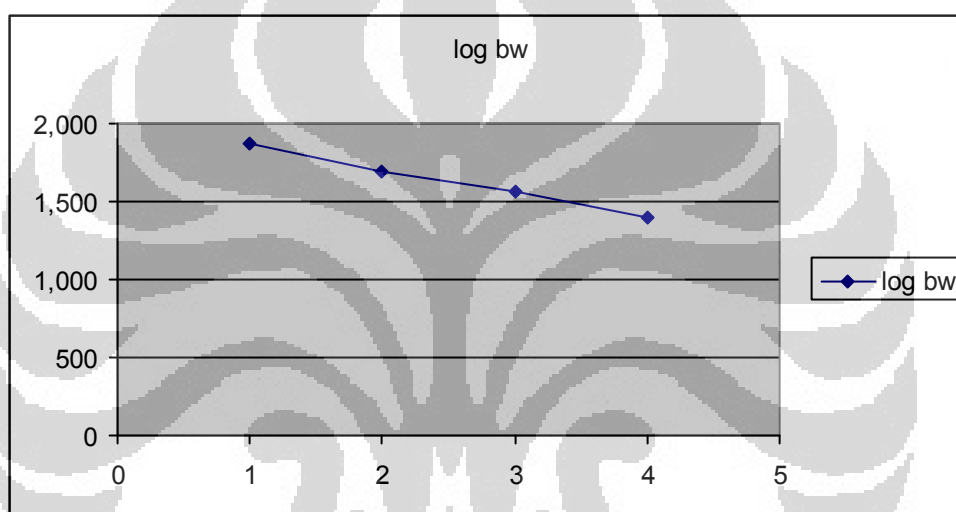
[Sumber: Bio-Rad Laboratories 2011: 1]



## Lampiran 6

Grafik dan Hasil perhitungan berat molekul protein JSU pGEX-6P1 pada pengulangan 1

BW	Jarak Migrasi	Total Migrasi	Rf (x)	Log BW (y)
75	0,65	3,7	0,176	1,875
50	1,2	3,7	0,324	1,698
37	1,7	3,7	0,459	1,568
25	2,25	3,7	0,608	1,397
Sampel	0,95	3,7	0,257	



$$y = 2,06296 + (-1,093696)x$$

$$R^2 = 0,9993$$

Keterangan : Rf (x) = Jarak migrasi : Total migrasi

**x** = Rf sampel

$$y = a + bx$$

$$= 2,06296 + (-1,093696)(0,257)$$

$$= 2,06296 - 0,281$$

$$= 1,78188$$

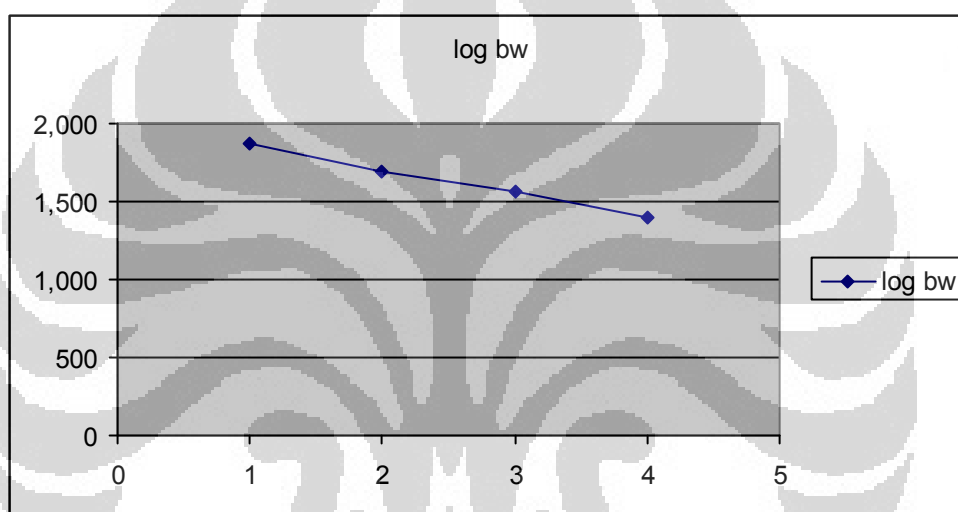
$$\text{Antilog } 1,78188 = \mathbf{60,5 \text{ kDa}}$$

[Sumber: Gallagher 1995: 10.1.30]

## Lampiran 7

Grafik dan Hasil perhitungan berat molekul protein JSU pGEX-6P1 pada pengulangan 2

BW	Jarak Migrasi	Total Migrasi	Rf (x)	Log BW (y)
75	0,65	4	0,1625	1,875
50	1,1	4	0,275	1,698
37	1,5	4	0,375	1,568
25	2,15	4	0,5375	1,397
Sampel	0,9	4	0,225	



$$y = 2,06139 + (-1,2649)x$$

$$R^2 = 0,995$$

Keterangan : Rf (x) = Jarak migrasi : Total migrasi

**x** = Rf sampel

$$y = a + bx$$

$$= 2,06139 + (-1,2649)(0,225)$$

$$= 2,06296 - 0,2846$$

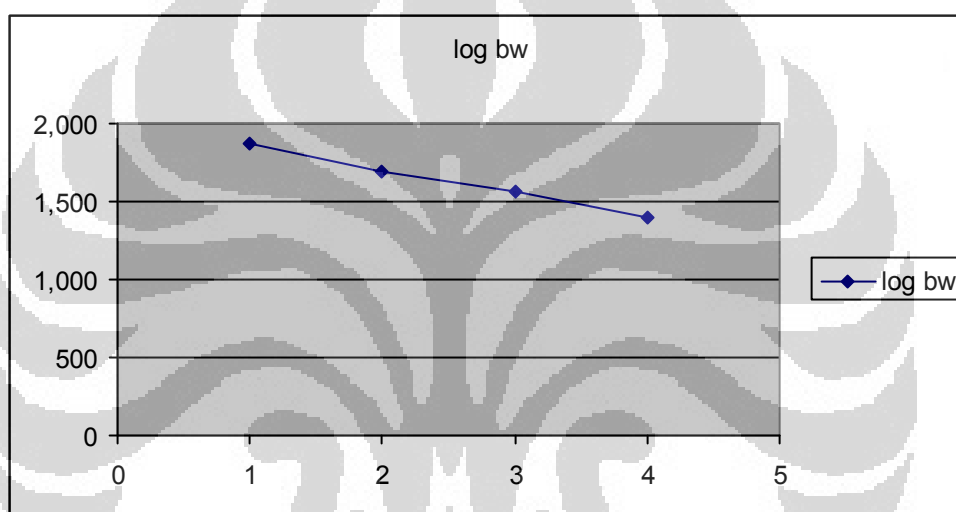
$$= 1,7768$$

$$\text{Antilog } 1,7768 = \mathbf{59,81 \text{ kDa}}$$

## Lampiran 8

## Grafik dan Hasil perhitungan berat molekul protein JSU pGEX-6P1 pada pengulangan 3

BW	Jarak Migrasi	Total Migrasi	Rf (x)	Log BW (y)
75	1,55	4,4	0,352	1,875
50	2,1	4,4	0,477	1,698
37	2,5	4,4	0,568	1,568
25	3,2	4,4	0,727	1,397
Sampel	1,85	4,4	0,420	



$$y = 2,3129 + (-1,2776)x$$

$$R^2 = 0,9971$$

Keterangan : Rf (x) = Jarak migrasi : Total migrasi

**x** = Rf sampel

$$y = a + bx$$

$$= 2,3129 + (-1,2776)(0,420)$$

$$= 2,06296 - 0,5366$$

$$= 1,7763$$

$$\text{Antilog } 1,7763 = \mathbf{59,75 \text{ kDa}}$$

Nilai rata-rata berat molekul protein JSU pGEX-6P1 =  $(60,5 + 59,81 + 59,75) : 3$

$$= 180,06 : 3 = \mathbf{60,02 \text{ kDa}}$$