



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN *JEMBRANA
TRANSMEMBRANE (JTM-pGEX)* PADA BERBAGAI
TINGKAT KEPADATAN SEL *Escherichia coli* BL21**

SKRIPSI

**ADELA NOVISA CHARASWATI
0706263611**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN *JEMBRANA*
TRANSMEMBRANE (JTM-pGEX) PADA BERBAGAI
TINGKAT KEPADATAN SEL *Escherichia coli* BL21**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**ADELA NOVISA CHARASWATI
0706263611**

**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 yang dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Adela Novisa Charaswati

NPM : 0706263611

Tanda Tangan : *SapaSuwati*





Tanggal : 27 Desember 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Adela Novisa Charaswati
NPM : 0706263611
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Uji Ekspresi Protein Rekombinan *Jembrana Transmembrane* (JTM-pGEX) Pada Berbagai Tingkat Kepadatan Sel *Escherichia coli* BL21

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

Assalamua'laikum Wr. Wb. Segala puji bagi Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-NYA sehingga saya dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Saya juga menyadari banyaknya pihak-pihak yang turut membantu saya selama masa perkuliahan, penelitian hingga penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, saya ingin menghaturkan ucapan terima kasih kepada:

- (1) Dr. Endang Tri Margawati, M.Agr.Sc. sebagai Pembimbing I dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. sebagai Pembimbing II yang telah memberikan waktu, pikiran, dan tenaga untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (2) Dr. Abinawanto sebagai Penguji I dan Dr. Andi Salamah sebagai Penguji II yang telah banyak memberikan saran dan kritik yang bermanfaat dalam penyusunan skripsi ini.
- (3) Retno Lestari, M.Si. sebagai Penasehat Akademik yang telah banyak memberikan nasehat dan perhatian selama masa perkuliahan.
- (4) Dr. Mufti P. Patria, M.Sc. sebagai Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. sebagai Sekretaris Departemen, Dra. Titi Soedjiarti S.U. sebagai Koordinator Pendidikan, Dr. Dadang Kusmana, M.S. sebagai Ketua Sidang dan seluruh staf pengajar atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan selama masa perkuliahan.
- (5) Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong, para laboran Laboratorium Biologi Molekular Hewan LIPI (Kak Ridwan, Mbak Rere, dan Kak Ogi) dan Bpk. A. Zainal Mustopa, M.Si yang telah banyak membantu penulis selama penelitian untuk mendapatkan data yang diperlukan.
- (6) Seluruh laboran dan karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, terutama mbak Asri, Mbak Ida, Ibu Ros atas segala bantuan.
- (7) Keluarga tercinta, Papa (Achmad Fauzi), Mama (Lilis Koesmalawati) dan adik-adik (Fahriza R dan Fahmi R) yang telah memberikan doa, dukungan moril dan material kepada penulis.
- (8) Keluarga besar Liga Tari Krida Budaya Universitas Indonesia yang telah mengajarkan ilmu berorganisasi, membentuk penulis menjadi pribadi yang

kuat dan memberikan banyak pengalaman baik di ajang nasional maupun internasional.

- (9) Ndy one yang telah memberikan kata, makna dan rasa untuk penulis.
- (10) Sahabat-sahabat terbaik penulis, Ratih Cempaka, Retno Ayu, Lulu Moulfia, Fajar Muhamad dan Capungel (Yudo, Anis, Shawie, Darw, Valine) yang telah memberikan semangat dan canda tawa selama ini.
- (11) Teman-teman BLOSSOM yang telah memberikan persahabatan dan dukungan selama masa perkuliahan.

Akhir kata penulis memohon maaf atas segala kesalahan yang telah dilakukan. Penulis mengharapkan adanya kritik dan saran untuk penulisan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi generasi biologi selanjutnya dan kemajuan ilmu pengetahuan.

Depok, 27 Desember 2011

Penulis

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

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

Nama : Adela Novisa Charaswati
NPM : 0706263611
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:

Uji Ekspresi Protein Rekombinan *Jembrana Transmembrane* (JTM-pGEX) Pada Berbagai Tingkat Kepadatan Sel *Escherichia coli* BL21

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/memformat-kan, mengubah 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



(Adela Novisa Charaswati)

ABSTRAK

Nama : Adela Novisa Charaswati
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Uji ekspresi protein rekombinan *Jembrana Transmembrane* JTM-pGEX pada berbagai tingkat kepadatan sel *Escherichia coli* BL21.

Penyakit Jembrana adalah penyakit viral akut yang hanya menyerang sapi Bali (*Bos sondaicus*). *Jembrana Transmembrane* (JTM) merupakan salah satu protein viral yang dapat digunakan sebagai bahan pembuatan vaksin Jembrana. Penelitian bertujuan untuk mendapatkan nilai optimum kepadatan sel *Escherichia coli* BL21 terhadap ekspresi protein rekombinan JTM pGEX. Re-transformasi dilakukan untuk mendapatkan transforman baru yang memiliki plasmid yang masih aktif. Hasil re-transformasi diperoleh dua koloni transforman. Ekspresi protein rekombinan JTM-pGEX dilakukan dengan menggunakan induksi IPTG 100 mM pada nilai OD₆₀₀ 0,4; 0,6; dan 0,8. Hasil penelitian menunjukkan ekspresi protein rekombinan JTM-pGEX paling tinggi didapatkan pada nilai OD₆₀₀ = 0,6 (hasil *refolding*) dan OD₆₀₀ = 0,4 (hasil solubilisasi).

Kata Kunci : *Escherichia coli* BL21, *Jembrana transmembrane* (JTM), penyakit Jembrana, uji ekspresi protein rekombinan.
xiii + 50 halaman : 15 gambar; 3 tabel; 8 lampiran
Daftar Referensi : 70 (1989-2011)

ABSTRACT

Name : Adela Novisa Charaswati
Programme Study : Biology of S1 Regular
Judul : Expression of recombinant protein *Jembrana Transmembrane* (JTM-pGEX) on various optical density of *Escherichia coli* BL21.

Jembrana disease is an acute viral disease in Bali cattle (*Bos sondaicus*). *Jembrana Transmembrane* (JTM) is one of viral protein which can be utilized as a material for Jembrana vaccine. The aim of the research was to determine the best value of *Escherichia coli* BL21 optical density in order to get optimal expression of recombinant protein JTM-pGEX. Re-transformation was conducted to get new transformant which have an active DNA plasmid. The result showed two transformant colonies of *Escherichia coli* BL21. Expression of recombinant protein JTM-pGEX was carried out using induction IPTG 100 mM in OD₆₀₀ 0.4; 0.6; and 0.8. The result revealed that the best value of OD₆₀₀=0.6 produced the highest expression of recombinant protein JTM-pGEX after refolding while OD₆₀₀ 0.4 produced the highest expression of recombinant protein JTM-pGEX after solubilization.

Key Words : *Escherichia coli* BL21, Jembrana disease, *Jembrana Transmembrane* (JTM), Protein expression.
xiii + 50 pages : 15 pictures; 3 tables; 8 appendixes
Bibliography : 70 (1989-2011)

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
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Penyakit Jembrana.....	4
2.2 Retrovirus.....	5
2.3 Ekspresi gen pada prokariot.....	7
2.4 Vektor ekspresi pGEX.....	9
2.5 <i>Escherichia coli</i>	10
2.6 Pertumbuhan sel <i>Escherichia coli</i>	11
2.7 Teknik-teknik dasar biologi molekular.....	12
2.7.1 Transformasi.....	12
2.7.2 Pemecahan sel.....	14
2.7.2 Solubilisasi dan <i>Refolding</i>	16
2.7.4 Purifikasi protein.....	18
2.7.5 <i>Sodium dodecylsulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i> (SDS-PAGE).....	19
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	22
3.1 Lokasi dan waktu penelitian.....	22
3.2 Alat.....	22
3.3 Bahan.....	23
3.3.1 Mikroorganisme, vektor ekspresi, dan sumber protein rekombinan.....	23
3.3.2 Medium.....	23
3.3.3 Larutan dan <i>buffer</i>	23
3.3.4 Bahan kimia.....	24
3.3.5 Marka protein.....	24
3.4 Cara kerja.....	24
3.4.1 Pembuatan larutan dan <i>buffer</i>	24
3.4.2 Pembuatan medium.....	24

3.4.2.1	Medium Luria bertani (LB) cair.....	24
3.4.2.2	Medium Luria bertani (LB) padat.....	25
3.4.2.3	<i>Transformation and storage</i> solution (medium TSS).....	25
3.4.3	Sterilisasi alat dan medium.....	25
3.4.4	Re-transformasi ke dalam <i>Escherichia coli</i> BL21.....	26
3.4.4.1	Preparasi medium.....	26
3.4.4.2	Pembuatan sel kompeten <i>Escherichia coli</i> BL21	26
3.4.4.3	Transformasi sel kompeten <i>Escherichia. coli</i> BL21.....	27
3.4.5	Pembuatan <i>working culture</i> sel <i>Escherichia coli</i> BL2..	27
3.4.6	Pengecekan kepadatan sel <i>Escherichia coli</i> BL21.....	27
3.4.7	Induksi IPTG dan koleksi pelet.....	28
3.4.8	Pemecahan sel.....	28
3.4.8.1	Metode <i>freeze & thaw</i>	28
3.4.8.2	Metode sonikasi.....	29
3.4.9	Solubilisasi dan <i>refolding</i> protein rekombinan JTM-pGEX.....	29
3.4.10	Purifikasi protein rekombinan JTM-pGEX.....	30
3.4.11	Analisis dan visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX dengan SDS-PAGE.....	31
3.4.11.1	Pembuatan gel.....	31
3.4.11.2	Denaturasi sampel.....	32
3.4.11.3	<i>Running sampel</i>	32
3.4.11.4	Pewarnaan.....	32
3.4.11.5	Dokumentasi.....	32
3.4.11.6	Pengolahan dan analisis data.....	33
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1	Re-transformasi sel <i>E. coli</i> BL21.....	34
4.2	Analisis dan visualisasi protein hasil solubilisasi dan <i>refolding</i>	37
4.3	Penentuan konsentrasi protein rekombinan JTM-pGEX dari hasil solubilisasi dan <i>refolding</i>	42
4.3.1	Konsentrasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil solubilisasi.....	42
4.3.2	Konsentrasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil <i>refolding</i>	43
4.4	Analisis dan visualisasi protein hasil purifikasi	44
4.5	Perhitungan Berat Molekul Protein Rekombinan JTM-pGEX	46
5.	KESIMPULAN.....	48
5.1	Kesimpulan.....	48
5.2	Saran.....	48
	DAFTAR REFERENSI.....	49
	LAMPIRAN.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2(1)	Struktur retrovirus.....	6
Gambar 2.2(2)	Struktur organisasi genom retrovirus.....	7
Gambar 2.3(1)	Struktur operon <i>lac</i>	8
Gambar 2.3(2)	Ekspresi operon <i>lac</i> pada <i>Escherichia coli</i>	9
Gambar 2.6(1)	Kurva pertumbuhan bakteri.....	12
Gambar 2.7.1(1)	Pembuatan sel kompeten dengan CaCl ₂ dan transformasi dengan metode <i>heatshock</i>	13
Gambar 2.7.1(2)	Transformasi dengan metode elektroporasi...	14
Gambar 2.7.5(1)	Konstruksi SDS-PAGE.....	20
Gambar 2.7.5(2)	Perangkat SDS-PAGE.....	21
Gambar 4.1(1)	Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil purifikasi.....	35
Gambar 4.1(2)	Sel <i>E. coli</i> transforman.....	36
Gambar 4.2(1)	Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil solubilisasi dan <i>refolding</i> pada pengulangan 1	38
Gambar 4.2(2)	Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil solubilisasi dan <i>refolding</i> pada pengulangan 2	40
Gambar 4.2(3)	Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil solubilisasi dan <i>refolding</i> pada pengulangan 3	41
Gambar 4.4(1).	Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil <i>inner volume</i> dan <i>washing</i> 1	44

DAFTAR TABEL

Tabel 3.4.11.1(1)	Komposisi <i>resolving gel & stacking gel</i>	31
Tabel 4.5(1)	Kuantifikasi protein hasil solubilisasi.....	42
Tabel 4.5(1)	Kuantifikasi protein hasil <i>refolding</i>	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema kerja penelitian.....	55
Lampiran 2	Pembuatan larutan dan buffer.....	56
Lampiran 3	Mekanisme replikasi retrovirus.....	58
Lampiran 4	Perhitungan konsentrasi protein hasil kuantifikasi....	59
Lampiran 5	Marka protein <i>Bio-Rad</i>	60
Lampiran 6	Perhitungan berat molekul dan kurva standar protein rekombinan JTM-pGEX (pengulangan 1).....	61
Lampiran 7	Perhitungan berat molekul dan kurva standar protein rekombinan JTM-pGEX (pengulangan 2).....	62
Lampiran 8	Perhitungan berat molekul dan kurva standar protein rekombinan JTM-pGEX (pengulangan 3).....	63

BAB 1 PENDAHULUAN

Jembrana disease merupakan penyakit yang hanya menyerang sapi Bali (*Bos sondaicus*). Penyakit tersebut pertama kali menyerang sapi Bali di desa Sangkarung, kabupaten Jembrana Bali pada tahun 1964 (Hartaningsih 2003: 38). Penyakit tersebut kemudian menjadi wabah terbesar yang terjadi di beberapa kabupaten di propinsi Bali seperti: Gianyar, Klungkung, Tabanan, Buleleng dan Badung pada tahun 1967 (Soeharsono & Temadja 1996: 2). Dalam waktu singkat, penyakit tersebut dapat menyebabkan kematian 60.000 ekor sapi dari 300.000 jumlah sapi di pulau Bali (Wilcox *dkk.* 2009: 1).

Penyakit Jembrana timbul karena adanya infeksi dari *Jembrana disease virus* (JDV). Virus Jembrana termasuk dalam famili *Retroviridae*. Virus tersebut mampu membentuk replika *deoxyribonucleic acid* (DNA) dari *ribonucleic acid* (RNA)-nya sendiri dengan menggunakan enzim *reverse transcriptase*, setelah menginfeksi sel (Radji 2010: 97). Lebih spesifik lagi, virus tersebut digolongkan dalam genus *Lentivirus* dari famili *retroviridae*. Kelompok lentivirus memiliki tiga jenis gen utama yaitu gen *gag*, *pol*, dan *env* yang dapat mengkode protein yang dibutuhkan oleh virus untuk bereplikasi. Gen *env* mengkode protein *transmembrane* (TM) dan *superficial unit* (SU) pada masing-masing daerah transmembran dan permukaan virus (Margawati & Ridwan 2009: 166--167).

Penyakit Jembrana pada umumnya menyerang sapi Bali dewasa dengan kisaran umur 3--4 tahun. Gejala klinis penyakit Jembrana ditandai dengan depresi, anoreksia, demam, pendarahan ekstensif di bawah kulit dan pembengkakan jaringan limfa serta diare berdarah. Namun demikian, perkembangan virus tersebut dilaporkan bereaksi sangat lambat dan jarang ditemukan gejala klinisnya (Chadwick 1995: 189; Wilcox *dkk.* 2009: 2).

Direktorat Jenderal Peternakan RI (2008: 1) melaporkan bahwa adanya perdagangan bebas antar daerah menyebabkan penyakit Jembrana terjadi di daerah lain di Indonesia. Dari data yang di dapatkan penyakit Jembrana tersebut juga terjadi di daerah Lampung (1976), Banyuwangi (1978), Sumatera Barat (1992), Kalimantan Selatan (1993) dan Bengkulu (1995). Laporan terakhir

menunjukkan bahwa penyakit Jembrana ditemukan di Kabupaten Banjar, Kota Banjarbaru dan di Kabupaten Barito Kuala, Kalimantan Selatan.

Upaya pencegahan terhadap penyakit Jembrana telah dilakukan pemerintah melalui vaksinasi menggunakan *crude vaccine*. Namun demikian pembuatan *crude vaccine* tersebut tidak dapat dilakukan secara besar-besaran karena keterbatasan bahan dasar yaitu limpa sapi Bali yang positif terinfeksi virus penyakit Jembrana. Selain itu, satu limpa sapi Bali yang digunakan untuk pembuatan vaksin hanya dapat memproduksi 1500 dosis vaksin penyakit Jembrana (Dirjen Peternakan 2008:1). *Crude vaccine* juga dinilai kurang efektif mencegah terjadinya penyebaran virus Jembrana karena vaksin tersebut memiliki masa imunitas yang relatif pendek yaitu sekitar 3 bulan. Masalah lain yang juga menjadi hambatan pembuatan *crude vaccine* yaitu biaya produksi yang mahal karena vaksin tersebut didapatkan dengan mematikan hewan ternaknya (Margawati *dkk.* 2007a: 145).

Usaha lain yang dilakukan pemerintah selanjutnya untuk mencegah penyebaran penyakit Jembrana yaitu dengan mengembangkan vaksin heterolog. Vaksin heterolog bekerja karena adanya kesamaan antigen yang menyebabkan pembentukan antibodi dari satu virus. Antibodi yang terbentuk dari virus tersebut akan bereaksi silang dengan antigen virus lain dalam tubuh hewan yang terinfeksi dan terjadi proses netralisasi. Vaksin heterolog untuk *Jembrana disease virus* (JDV) dikembangkan dengan memanfaatkan *bovine immunodeficiency virus* (BIV). Hasil penelitian menunjukkan BIV dan JDV secara antigenik bereaksi silang. Diharapkan adanya infeksi BIV dapat memberikan perlindungan (*cross-protection*) pada hewan ternak yang positif terinfeksi penyakit Jembrana (Suwiti 2009: 21--25). Penerapan kedua produk vaksin tersebut ternyata belum dapat menghambat penyebaran virus penyakit Jembrana. Oleh karena itu, diperlukan suatu terobosan baru dalam pembuatan vaksin yaitu dengan teknologi protein rekombinan. Salah satu diantaranya yaitu mengembangkan vaksin dengan mengkonstruksi gen *Tat* ke dalam plasmid pET. Konstruksi tersebut kemudian diekspresikan dan dihasilkan protein rekombinan yang akan menjadi bahan pembuatan vaksin Jembrana. Pengembangan protein rekombinan tersebut

diharapkan dapat memproduksi vaksin Jembrana secara massal (Margawati *dkk.* 2007: 148--149).

Penelitian untuk pembuatan vaksin Jembrana dengan protein rekombinan telah diawali dengan kerjasama riset antara Pemerintah Indonesia (LIPI, Balitvet, Balai Peயidikan dan Penelitian Veteriner /BPPV Denpasar) dan Pemerintah Australia (Murdoch University) di bawah Australian Centre for International Agricultural Research /ACIAR Project. Pembuatan vaksin dengan metode rekombinan memanfaatkan protein virus yang dihasilkan oleh *Jembrana disease virus* (JDV). Salah satu jenis protein yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan vaksin yaitu protein *Jembrana Transmembrane* (JTM) (Narayani *dkk* 1996: 152). Laboratorium Biologi Molekular Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI telah berhasil mendapatkan hasil ekspresi protein rekombinan *Jembrana Transmembrane* (JTM) melalui vektor plasmid pET. Penelitian sebelumnya dengan Laboratorium Virologi, Murdoch University, telah didapatkan hasil ekspresi protein rekombinan *Jembrana Tat* (JTat) melalui plasmid pGEX dengan sel inang *Escherichia coli* BL21 (Margawati *dkk.* 2007b: 11).

Studi berikutnya yang perlu dipelajari yaitu tingkat kepadatan sel *Escherichia coli* BL21 terhadap ekspresi protein rekombinan *Jembrana Transmembrane* (JTM). Penelitian tersebut bertujuan untuk mendapatkan nilai kepadatan sel yang tepat terhadap ekspresi protein rekombinan JTM-pGEX. Hipotesis penelitian adalah ekspresi protein rekombinan paling optimal didapatkan pada tingkat kepadatan sel yang lebih tinggi atau OD 0,6. Data yang didapatkan berfungsi sebagai tolak ukur nilai kepadatan sel *Escherichia coli* BL21 yang digunakan untuk mendapatkan ekspresi optimal dari protein rekombinan JTM-pGEX. Data hasil penelitian ini juga diharapkan dapat menjadi sumber informasi efisiensi waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi protein rekombinan *Jembrana Transmembrane* (JTM).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Jembrana

Sapi Bali merupakan jenis sapi potong utama yang banyak dternakan oleh para peternak di Indonesia. Keunggulan dari sapi Bali antara lain memiliki tingkat reproduksi tinggi, tahan terhadap musim kering, resisten terhadap serangan parasit internal maupun eksternal kecuali gangguan liver, dan memiliki kualitas daging yang baik dibandingkan jenis sapi lain (Ditcham 2007 : 19). Penyakit Jembrana yang menyerang sapi Bali tersebut dapat menyebabkan terhambatnya kebutuhan protein hewani dan menurunnya pendapatan peternak sapi Bali (Copland 1996: 32).

Diketahui bahwa sapi yang terserang penyakit Jembrana akan mengalami demam hingga mencapai 42°C selama 3--5 hari kemudian terjadi pembengkakan kelenjar limfe *prescapularis* dan *prefemoralis*. Gejala-gejala lain yang terlihat yaitu mencret (diare) yang disertai adanya darah dalam tinja, munculnya keringat darah, anoreksia, dan leukopenia disertai leukositosis (Hartaningsih 2003: 38). Selain itu, penyakit Jembrana tidak memandang jenis kelamin sapi Bali. Penyakit tersebut apabila menginfeksi sapi betina yang bunting di atas 6 bulan, dapat menyebabkan terjadinya keguguran (Dharma 1996: 26).

Penularan penyakit Jembrana diketahui dapat terjadi melalui vektor yaitu serangga penghisap darah (*Culicoides* sp. dan nyamuk) yang dapat memindahkan penyakit secara mekanis. Selain itu penularan juga dapat terjadi melalui infeksi jarum suntik (Putra & Sulistiyana 1995: 2). Berdasarkan laporan Departemen Pertanian (2006: 7) diketahui pula bahwa sapi Bali yang telah sembuh dari infeksi penyakit Jembrana akan kebal terhadap infeksi ulang virus Jembrana, namun dapat menjadi karier penyebaran virus tersebut.

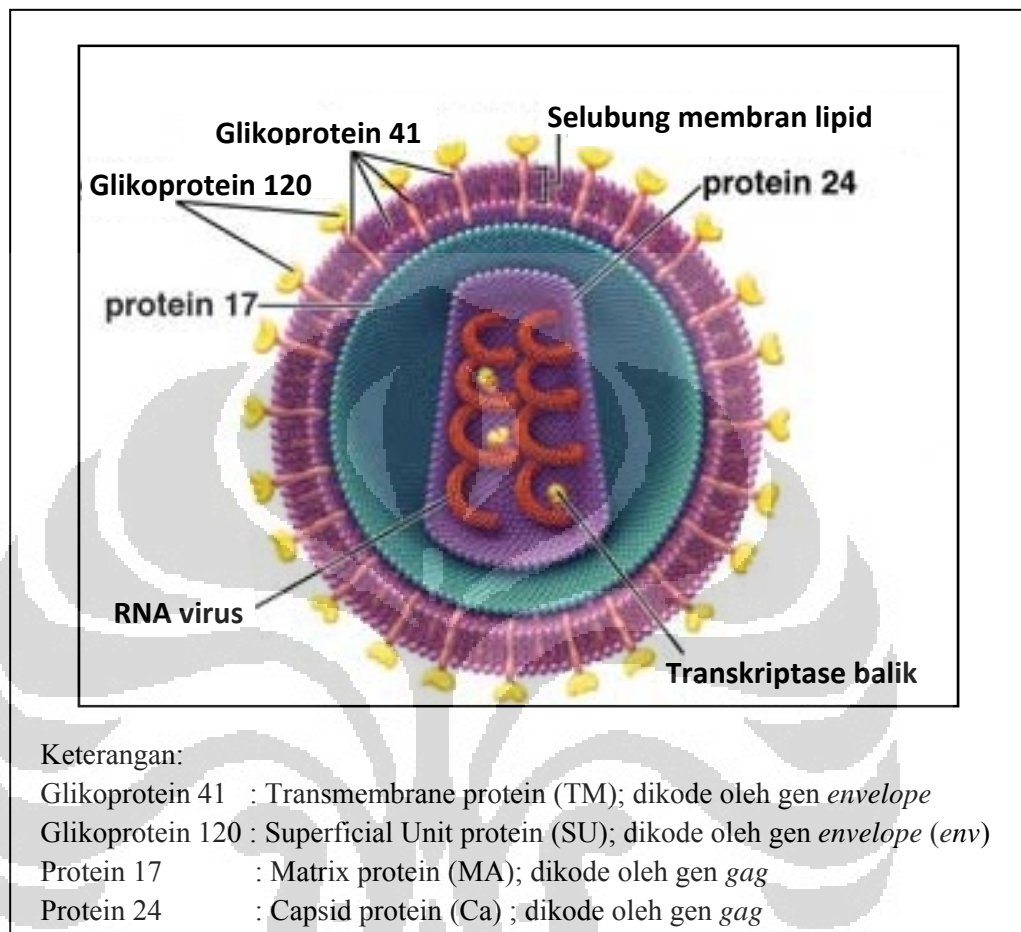
2.2 Retrovirus

Virus Jembrana merupakan anggota famili *Retroviridae*, subfamili *Lentivirinae*, dan genus *Lentivirus*. Berdasarkan struktur asam nukleatnya, lentivirus tergolong ke dalam kelompok retrovirus dengan genom asam ribonukleat (RNA) untai tunggal (*single stranded RNA viruses*) (Radji 2010: 97). Kelompok tersebut dapat membentuk DNA dari RNA-nya dengan menggunakan enzim *reverse transcriptase*. Mekanisme replikasi retrovirus tersebut merupakan proses transkripsi balik yang berlawanan dengan alur *central dogma* (Madigan dkk. 2009: 262).

Replikasi retrovirus dimulai dari fase penempelan virus pada reseptor yang terdapat pada permukaan sel inang. Selanjutnya virus memasuki fase penetrasi dimana virus tersebut masuk ke dalam sel inang setelah melepaskan selubungnya. Virus kemudian mengubah RNANYA menjadi DNA yang komplementer terhadap RNA virus tersebut. DNA virus baru akan menyisipkan diri ke dalam kromosom sel inang. DNA yang telah terintegrasi ke dalam kromosom sel inang disebut DNA provirus. DNA provirus selanjutnya memasuki proses transkripsi menjadi RNA kembali sebagai genom virus baru dan menjadi mRNA untuk memproduksi protein kapsid. Genom virus baru tersebut akan bergabung dengan protein kapsid membentuk virion baru. Fase berikutnya adalah fase perakitan dan pelepasan virus. Virion yang telah terbentuk akan diselubungi oleh simpai yang berasal dari membran plasma sel inang melalui proses *budding*. Virus baru selanjutnya dilepaskan dari sel inang dan dapat menginfeksi sel-sel lain (Ditcham 2007: 34; Radji 2010: 108--109). Mekanisme replikasi retrovirus dapat dilihat pada Lampiran 3.

Seperti telah diuraikan di atas, semua kelompok retrovirus memiliki 3 jenis gen utama yaitu gen *gag*, *pol*, dan *envelope (env)*. Gen *gag* mengkode informasi tentang sintesis protein internal virion yang membentuk matriks, kapsid dan struktur nukleoprotein. Gen *pol* mengkode informasi tentang enzim *reverse-transcriptase* dan *integrase*. Gen *env* mengkode informasi pembentukan komponen permukaan dan transmembran dari protein viral *env* (Gaffar 2007: 6). Selain itu, retrovirus juga memiliki domain gen tambahan yaitu gen *pro* yang

mengkode protease virion virus (Thulasirajah 2007: 4). Secara umum, struktur virus yang termasuk dalam kelompok retrovirus dapat dilihat pada Gambar 2.2(1).

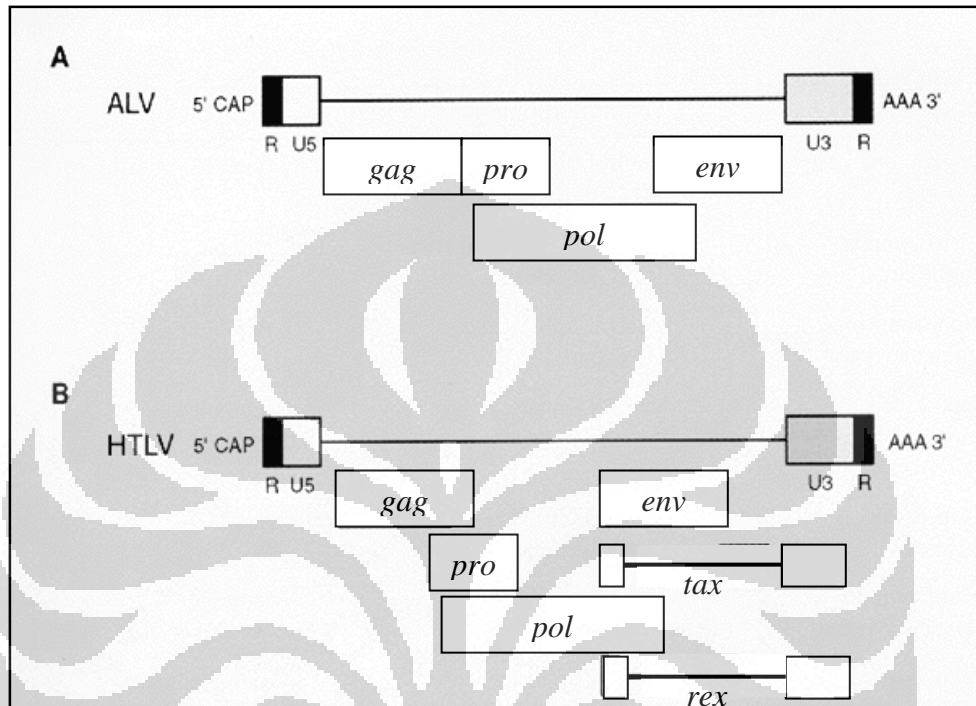


Gambar 2.2(1) Struktur retrovirus

[Sumber: McGraw-Hill 2002: 1, dengan modifikasi.]

Retrovirus pertama kali ditemukan oleh Vilhelm Ellermann dan Oluf Bang pada tahun 1908 (Cann 2009: 1). Berdasarkan organisasi genomnya, Ellermann dan Bang membagi famili virus tersebut menjadi dua kelompok yaitu kelompok retrovirus sederhana dan retrovirus kompleks. Perbedaan antar kedua kelompok tersebut terletak pada informasi yang dibawa masing-masing genom kelompok retrovirus. Retrovirus sederhana hanya membawa informasi daerah awal genomnya. Berbeda dengan retrovirus sederhana, retrovirus kompleks selain membawa informasi genomnya, kelompok tersebut dapat mengkode protein regulator (*tax* dan *rex*) serta memiliki gen regulator dan aksesori (gen *vif*, *vpu*, *nef*, *tat*, *ref*, dan *vpr*) (Thulasirajah 2007: 2--4; Gaffar 2007: 6). Struktur organisasi

genom retrovirus sederhana dan retrovirus kompleks dapat dilihat pada Gambar 2.2(2). Contoh kelompok retrovirus sederhana adalah *murine leukemia virus* (MLV), sedangkan contoh kelompok retrovirus kompleks adalah *jembrana disease virus* (JDV) dan *immunodeficiency virus* (HIV).

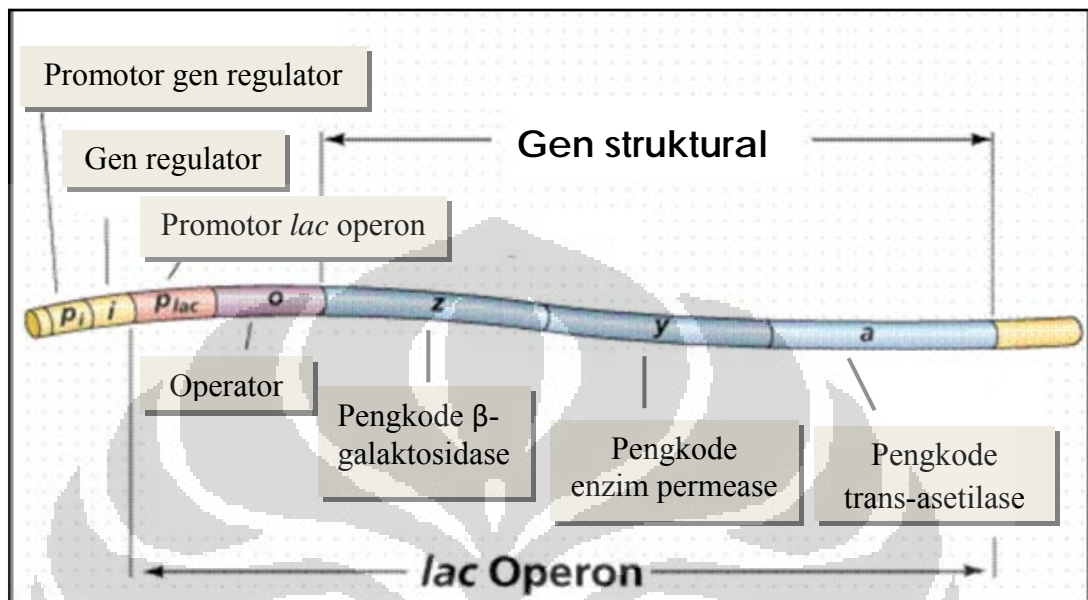


Gambar 2.2(2). Struktur organisasi genom retrovirus. (A) genom retrovirus sederhana. (B) genom retrovirus kompleks. [Sumber: Tsulasirajah 2007: 4, dengan modifikasi.]

2.3 Ekspresi gen pada prokariot

Ekspresi gen adalah proses pengendalian (regulasi) gen dari organisasi genom makhluk hidup. Ekspresi gen pada prokariot dikenal dengan istilah sistem operon. Pada sistem operon terdapat sekelompok gen struktural yang ekspresinya dikendalikan oleh satu promoter yang sama. Salah satu organisme prokariot yang memiliki sistem operon yaitu bakteri *Escherichia coli*. *E. coli* mampu melakukan metabolisme laktosa karena memiliki sistem operon yang disebut operon *lac* (Robert 2006: 1). Operon *lac* terdiri dari satu gen regulator (gen *lacI*) dan tiga gen struktural yaitu gen *lacZ*, *lacY*, dan *lacA*. Struktur operon *lac* dapat dilihat pada Gambar 2.3(1). Gen *lacZ* mengkode β -galaktosidase yang berfungsi menghidrolisis laktosa menjadi monosakarida yaitu galaktosa dan glukosa; gen

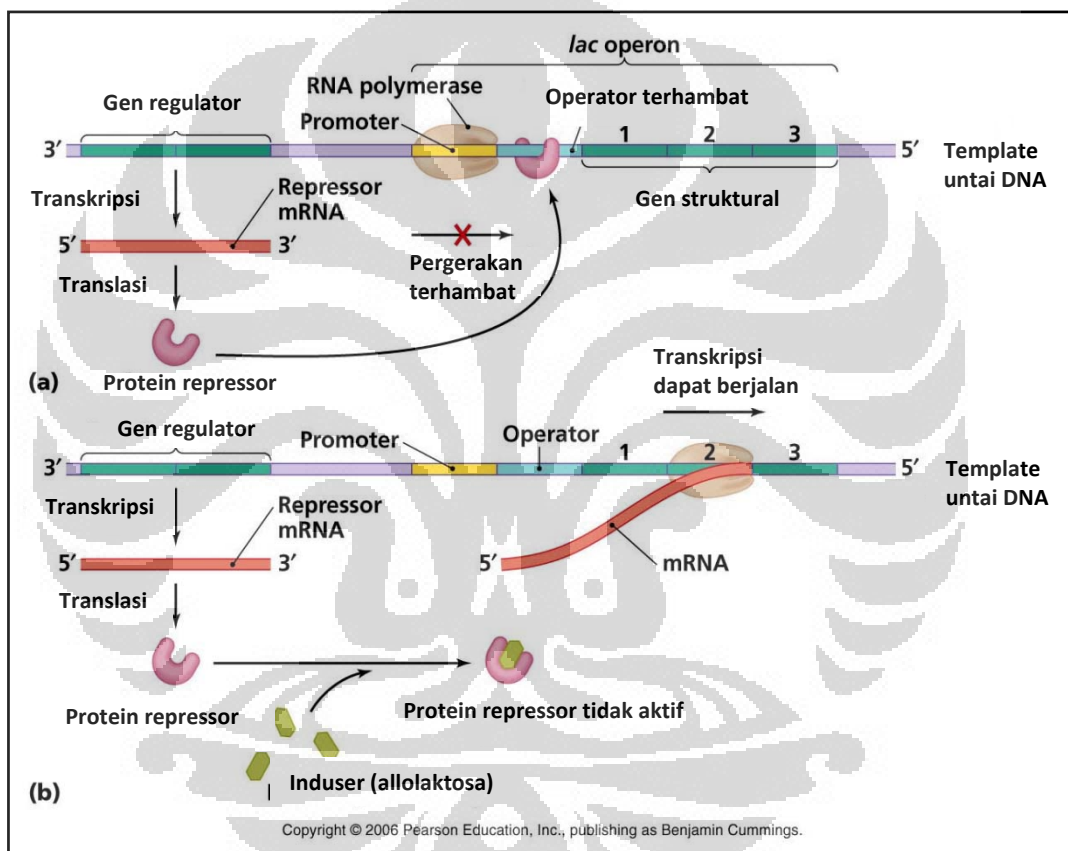
lacY mengkode enzim permease yang berfungsi meningkatkan permeabilitas sel sehingga laktosa dapat diangkut dari luar sel ke dalam sel; dan gen *lacA* mengkode trans-asetilase (King 1996: 2--3).



Gambar 2.3(1). Struktur operon *lac*
[Sumber: Farabee 2007: 1, dengan modifikasi.]

Sistem operon dapat dikendalikan secara positif maupun secara negatif. Produk ekspresi gen regulator pada sistem operon *lac E. coli* berperan menentukan terjadinya pengendalian positif dan pengendalian negatif dari sistem operon tersebut (Yuwono 2002: 153). Pengendalian negatif dilakukan oleh protein repressor yang dikode oleh gen regulator (*lacI*). Apabila tidak terdapat laktosa sebagai induser, protein repressor akan terus menempel pada bagian operator. Penempelan tersebut menyebabkan RNA polymerase tidak dapat melakukan transkripsi gen-gen struktural (gen *lacZ*, *lacY*, dan *lacA*). Ketika bakteri *E. coli* memanfaatkan laktosa sebagai sumber makanannya, laktosa diubah menjadi allolaktosa oleh enzim β -galaktosidase. Allolaktosa berperan sebagai induser yang akan berikatan dengan protein repressor sehingga daerah operator dapat dilalui oleh RNA polimerase dan proses transkripsi dapat berjalan (Yuwono 2002: 156--159). Ekspresi operon *lac* pada *Escherichia coli* dapat dilihat pada Gambar 2.3(2).

Pengendalian positif terjadi karena adanya aktivator berupa protein regulator yang dikenal dengan sebutan *catabolite activator protein* (CAP) dan suatu molekul efektor yaitu cAMP. CAP kemudian membentuk kompleks CAP-cAMP dan berikatan dengan promotor. Pengikatan tersebut menyebabkan RNA polimerase juga dapat berikatan dengan promotor sehingga membentuk kompleks promotor tertutup. Selanjutnya kompleks promotor tertutup akan menjadi kompleks promotor terbuka dan proses transkripsi dapat berjalan (King 1996: 1--2; Yuwono 2002: 159--160).



Gambar 2.3(2). Ekspresi operon *lac* pada *Escherichia coli*. (A) Sistem *lac* operon tanpa induksi IPTG. (B) Sistem operon *lac* dengan induksi IPTG. [Sumber: Roberts 2006: 1, dengan modifikasi.]

2.4 Vektor ekspresi pGEX

Vektor ekspresi merupakan mediator yang digunakan untuk mengekspresikan gen asing sehingga dapat dikenali oleh sel inang. Pengenalan

sinyal gen asing oleh sel inang (*E. coli*) dapat memberi informasi adanya gen *insert* dalam vektor ekspresi. Contoh vektor ekspresi yang banyak digunakan yaitu plasmid. Plasmid adalah molekul DNA yang dapat membawa gen asing yang apabila ditransformasikan ke dalam sel inang dapat bereplikasi (Campbell *dkk.* 2002: 392). Plasmid terletak di luar kromosom (*extracromosomal*), berbentuk sirkular, terdapat pada mikroorganisme (khususnya bakteri), mempunyai ukuran kira-kira 1- 200 Kb dan dapat bereplikasi otonom (Jenkins 1990: 468). Plasmid tidak berhubungan dengan DNA kromosom, namun plasmid dapat bereplikasi dan berpindah ketika terjadi pembelahan sel bakteri (Wolfe 1995: 420).

Penggunaan plasmid pada teknik rekombinan didasarkan pada beberapa alasan, yaitu ukurannya kecil, tingkat replikasi plasmid tinggi dalam host selnya, resistan terhadap antibiotik, memiliki beberapa situs restriksi yang unik (Paolella 1998: 180—181). Salah satu jenis plasmid yang digunakan dalam vektor ekspresi yaitu pGEX 6p-1. pGEX 6p-1 berukuran 4900 bp dan memiliki *tac promoter* yang dapat diinduksi dengan isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). IPTG merupakan bahan penginduksi yang dapat meningkatkan ekspresi protein target dalam sel *E. coli* (Amersham 2009: 1).

2.5 *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan organisme prokariot yang paling banyak digunakan sebagai sel inang dalam penelitian ekspresi. *E. coli* memiliki karakteristik ideal sebagai sel inang yaitu dapat memperbanyak diri dalam waktu singkat dan stabil, memiliki tingkat ekspresi yang tinggi, bersifat non-patogen dan dapat diintroduksi berbagai gen asing yang mengkode protein target (Brock *dkk.* 1994: 295; Stratagene 2001: 1). Bakteri *E. coli* berbentuk batang dengan ukuran genom sebesar 4,5 Kb, dapat tumbuh cepat dalam medium pengayaan dan memiliki banyak *strain* yang telah dikarakterisasi seperti *E. coli* BL21, *E. coli* BL21 (DE3), dan *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Promega 2009: 2; Invitrogen 2010: 2).

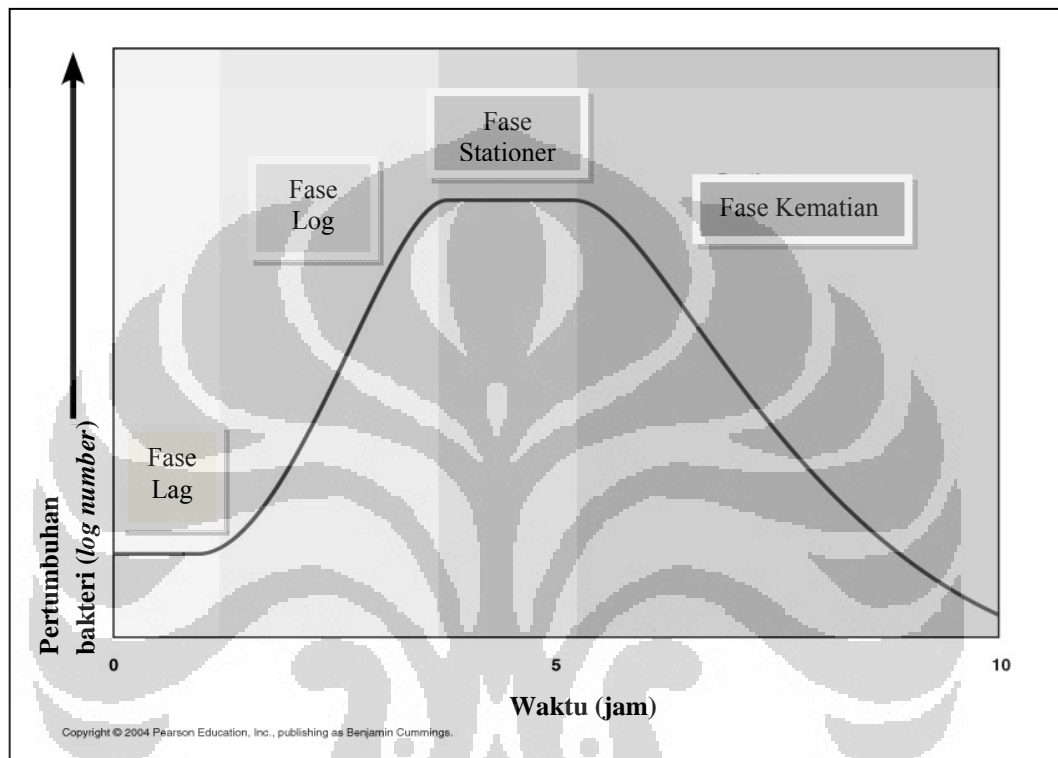
Genotipe dari *E. coli* BL21 terdiri atas F^- , *ompT*, *hsdS_B* (r_B^- , m_B^-), *dcm*, *gal*, (DE3), *pLysS*, Cm^r (Promega 2009: 2). Simbol F^- berarti bahwa bakteri *E. coli* tersebut tidak memiliki *fertility factor* sehingga memungkinkan berbagai plasmid dapat diintroduksi ke dalamnya (Prescott 2002: 295). *E. coli* BL21 diketahui tidak mengandung *lon* protease dan mengalami defisiensi pada bagian *outer membrane protease* (*ompT*). Kekurangan protease tersebut dapat mengurangi terjadinya degradasi protein rekombinan yang diekspresikan pada *strain E. coli* BL21 (Invitrogen 2010: 2).

Simbol *hsdS_B* (r_B^- , m_B^-) berarti bahwa *E. coli* BL21 memiliki kemampuan mencegah terjadinya pemotongan sekuens DNA yang tidak termetilasi serta memungkinkan vektor yang dimasukkan dapat membawa gen *insert*. Simbol *dcm* berfungsi dalam mengkode DNA *cytosine methylase* yang dapat mencegah terjadinya pemotongan oleh enzim restriksi. Simbol *gal* berarti bahwa *strain* memiliki gen *gal* yang berperan dalam metabolisme galaktosa (Stratagene 2001: 7).

2.6 Pertumbuhan sel *Escherichia coli*

Pertumbuhan sel *E. coli* terjadi dalam empat tahapan yaitu fase lag, fase log, fase stasioner dan fase kematian. Fase lag merupakan tahapan adaptasi *E. coli* terhadap medium baru. Pada fase ini, tidak terjadi reproduksi sehingga tidak terjadi peningkatan jumlah sel. Fase kedua yaitu fase log merupakan tahapan dimana sel *E. coli* telah aktif membelah. Sebagian besar sel *E. coli* berada pada puncak aktivitas metaboliknya. Tingkat pertumbuhan *E. coli* pada fase log dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan komposisi medium kultur yang digunakan. *E. coli* dapat tumbuh dengan baik pada suhu 37°C di dalam medium pengkayaan seperti Luria Bertani (LB). Fase log akan berakhir ketika nutrisi penting yang terkandung di dalam medium tersebut habis atau ketika medium tersebut terakumulasi oleh sisa metabolik *E. coli* (Yancoupolus 1999: 14--15). Fase selanjutnya yaitu fase stasioner. Pada fase ini, jumlah sel *E. coli* berada dalam keadaan konstan, artinya jumlah sel yang diproduksi sama dengan jumlah sel yang mati. Selain itu, *E. coli* berada pada tingkat aktivitas metabolik dan penggunaan energi terendah yang memungkinkan mereka tetap hidup. Fase

terakhir yaitu fase kematian. Pada fase ini, *E. coli* tidak lagi memiliki kemampuan untuk bereproduksi. Hal tersebut dapat dibuktikan ketika sel *E. coli* yang telah berada pada fase kematian dipindahkan pada medium baru dengan kondisi ideal, sel tidak akan tumbuh (Yancoupolus 1999: 16--17). Kurva pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Gambar 2.6(1).



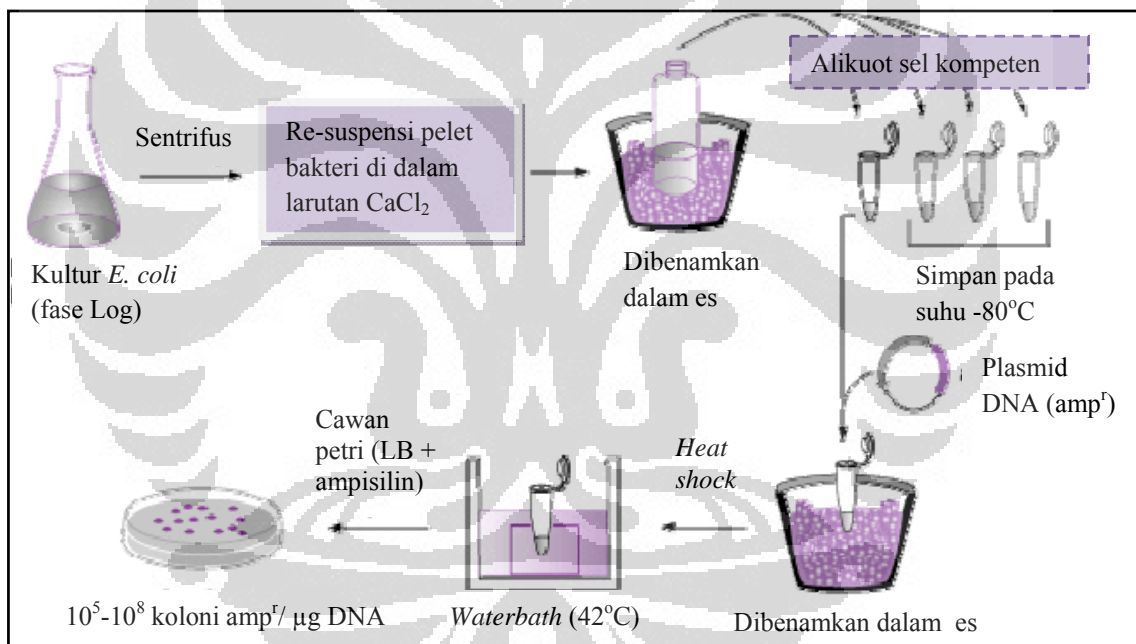
Gambar 2.6(1) Kurva pertumbuhan bakteri
[Sumber: Roberts 2006: 1, dengan modifikasi.]

2.7 Teknik-teknik dasar biologi molekular

2.7.1 Transformasi

Transformasi adalah proses introduksi DNA asing ke dalam sel inang. Ada dua metode yang dapat digunakan dalam proses transformasi yaitu metode *heatshock* dan metode elektroporasi. Sel kompeten yang akan ditransformasi dengan metode *heatshock* sebelumnya diberi perlakuan secara kimiawi. Perlakuan tersebut dapat dilakukan dengan larutan CaCl_2 atau dengan menggunakan *transformation and storage solution* (TSS) (Miesfeld 2000: 1).

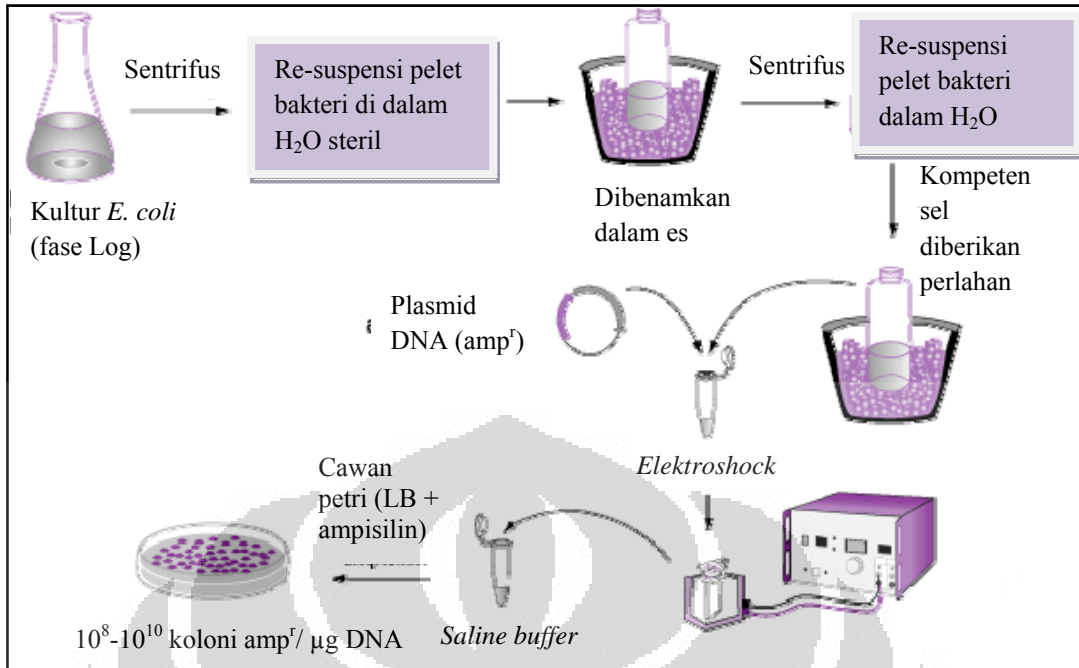
TSS medium mengandung sejumlah bahan kimia yang dapat meningkatkan efisiensi transformasi sel *E. coli*. TSS medium mengandung *polyethylene glycol* (PEG) yang berfungsi sebagai perantara DNA plasmid ketika diintroduksi ke dalam sel *E. coli*. *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) yang berfungsi meningkatkan efisiensi transformasi (Chung *dkk* 1989: 2172) dan Mg^{2+} merupakan divalen kation yang berfungsi membuat dinding sel menjadi permeabel dan dapat dilalui oleh DNA plasmid (Sciencebiotech 2011: 1). Metode *heatshock* dilakukan dengan mendinginkan, memanaskan dan mendinginkan kembali sel bakteri. Metode ini ditemukan oleh beberapa peneliti yang terdiri dari Stanley Cohen, Annie Chang dan Lesliu Hsu pada tahun 1972 (Sciencebiotech 2011: 1). Transformasi dengan metode *heatshock* dapat dilihat pada Gambar 2.7.1(1).



Gambar 2.7.1(1). Persiapan sel kompeten dengan $CaCl_2$ dan transformasi dengan *heatshock*.

[Sumber: Miesfeld 2000: 1, dengan modifikasi.]

Elektroforasi merupakan metode transformasi yang dilakukan dengan mengejutkan sel bakteri dengan medan listrik bertegangan tinggi (10-20 kV/cm) (Gambar 2.7.1(2)). Kejutan listrik tersebut akan menyebabkan pori-pori dinding sel bakteri dapat dimasuki oleh DNA plasmid. Selanjutnya pori-pori tersebut dapat menutup dengan sendirinya (Sciencebiotech 2011: 1).



Gambar 2.7.1(2). Transformasi dengan metode elektroporasi.
[Sumber: Miesfeld 2000: 1, dengan modifikasi.]

2.7.2 Pemecahan Sel

Pemecahan sel merupakan suatu metode yang digunakan untuk mendapatkan molekul-molekul seperti DNA, RNA, protein, lipid serta organel-organel dari dalam sel. Ada tiga faktor yang mempengaruhi pemecahan sel yaitu volume sel, jumlah sampel, dan jenis sel. Setiap jenis sel memiliki tingkat kesulitan yang berbeda untuk dilisiskan. Volume sampel dan jumlah sampel yang berbeda juga menentukan metode yang akan digunakan untuk melisiskan dinding sel (Guthrie 2005: 1--3). Beberapa metode yang digunakan untuk melisiskan dinding sel yaitu:

1. *Mechanical disruption*

Mechanical disruption merupakan metode pemecahan dinding sel yang dilakukan secara mekanis. Misalnya pada *blender* untuk menggiling dan memecah kompleks jaringan menjadi lebih sederhana dan dalam jumlah yang cukup banyak. Metode ini dapat digunakan untuk sampel sel sebanyak 1 ml (Thermo scientific 2009: 3).

2. *Liquid homogenization*

Liquid homogenization merupakan metode pemecahan sel yang dapat digunakan untuk sampel dengan jumlah sedikit. Metode tersebut dilakukan dengan melewatkan suspensi sel pada celah sempit dengan tujuan agar membran sel terkelupas, sehingga sel kehilangan membrannya. Ada tiga jenis *liquid homogenization* yang dapat digunakan untuk melisiskan sel, yaitu *dounce homogenizer*, *Potter-Elvehjem homogenizer* dan *French press*. *Dounce homogenizer* dan *Potter-Elvehjem homogenizer* dapat digunakan untuk berbagai ukuran sampel, sedangkan *French press* biasa digunakan untuk sampel sebanyak 40--250 ml (Thermo scientific 2009: 4).

3. *Freeze & thaw*

Freeze & thaw merupakan salah satu metode yang dinilai efektif untuk mendapatkan protein rekombinan dari dalam sitoplasma sel bakteri maupun sel mamalia. Metode tersebut dilakukan dengan membekukan suspensi sel kemudian mencairkannya kembali dengan meletakkan suspensi sel tersebut pada suhu ruang (28--30°C). Pembekuan suspensi sel tersebut menyebabkan sel membengkak kemudian berubah menjadi bentuk kristal es, sedangkan proses pencairan menyebabkan sel berkontraksi. Setelah dilakukan *freeze and thaw* diharapkan dinding sel *E. coli* sudah menjadi rapuh. Pembekuan suspensi sel dapat dilakukan di dalam *freezer*, *dry ice* atau dengan menggunakan *ethanol* (Thermo scientific 2009: 4).

4. Sonikasi

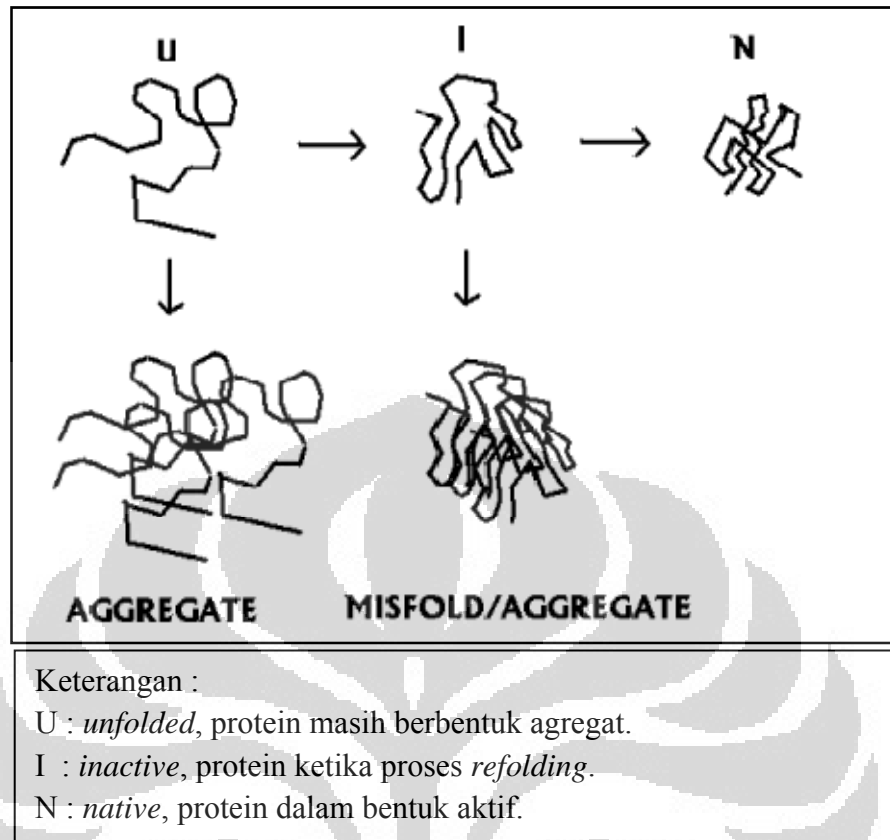
Sonikasi merupakan metode pemecahan sel yang memanfaatkan getaran dari gelombang suara dengan frekuensi tinggi untuk melisiskan sel. Sonikasi dilakukan dengan menggunakan alat yang disebut sonikator. Di dalam sonikator tersebut, terdapat *vibrating probe* yang dapat menghasilkan gelombang suara. Gelombang suara tersebut dikirimkan melalui *vibrating probe* yang dicelupkan ke dalam suspensi sel. Energi mekanik dari *probe* tersebut kemudian menginisiasi pembentukan partikel uap air dalam suspensi sel. Partikel uap air yang semakin

banyak menimbulkan *shockwave* dan meradiasi sampel sehingga sel dalam suspensi sel lisis. Selama dilakukan proses sonikasi, suspensi sel diletakan di dalam es agar panas yang dihasilkan oleh sonikator tidak menyebabkan protein yang didapatkan tidak terdegradasi. Sonikasi biasa digunakan untuk sampel dengan volume < 100 ml (Thermo scientific 2009: 4).

2.7.3 Solubilisasi dan *Refolding*

Solubilisasi merupakan proses yang dilakukan untuk mengubah protein *insoluble* (tidak terlarut) menjadi protein *soluble* (terlarut). Pencucian pelet dilakukan dengan menggunakan *washing buffer*. *Washing buffer* yang mengandung Triton X-100 berfungsi menghilangkan kontaminan yang mungkin masuk selama proses pemecahan sel (Clark 1998: 157). Setelah dilakukan tahap pencucian, pelet ditambahkan *solubilize buffer* untuk melarutkan protein *insoluble*. *Solubilize buffer* terdiri atas *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) sebagai inhibitor yang dapat mencegah terjadinya degradasi protein oleh protease dan *dithiothreitol* (DTT) sebagai denaturan yang dapat memecah ikatan disulfida antara sistein protein dengan peptida (Lilie *dkk.* 1998: 498). Urea 6M merupakan denaturan kuat yang dapat memecah ikatan non-kovalen rantai polipeptida. Penambahan Urea 6M pada proses solubilisasi dapat mempercepat proses pelarutan protein yang berbentuk agregat (Chauduri 1994: 107).

Refolding merupakan proses perubahan protein dari bentuk yang tidak teratur (*unfolded*) atau dari bentuk agregat menjadi bentuk terlipat teratur (*folded*) (Tsumoto 2003: 3). Proses *refolding* dari protein yang telah disolubilisasi dimulai dengan menghilangkan agen pendenaturasi dari sampel protein. Penambahan *dilution buffer* berfungsi untuk menghilangkan denaturan sehingga memungkinkan molekul-molekul protein terlarut mengalami pelipatan membentuk struktur natif-nya (Chauduri 1994: 108). Perubahan struktur protein dapat dilihat pada Gambar 2.7.3(1)



Gambar 2.7.3(1). Perubahan bentuk protein rekombinan dari agregat menjadi natif (protein aktif)
 [Sumber: Tsumoto 2003: 3]

Refolding dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu:

1. Dialisis

Refolding yang dilakukan dengan menurunkan konsentrasi larutan solubilisasi dalam sampel protein selama proses dialisis sehingga memungkinkan protein melipat (*refold*) optimal (Tsumoto 2003: 4).

2. *Slow dilution*

Refolding dengan metode *slow dilution* dilakukan dengan meneteskan perlahan-lahan *dilution buffer* ke dalam sampel protein (Tsumoto 2003: 6)

3. *Rapid dilution*

Metode *rapid dilution* dilakukan dengan menambahkan agen pelarut ke dalam *refolding buffer*. Perlakuan tersebut dapat mengurangi pembentukan agregat protein (EMBL 2009: 1).

4. *Pulsed renaturation*

Pulsed renaturation dilakukan dengan menambahkan *refolding buffer* pada aliquot protein. Penambahan tersebut dilakukan dengan interval waktu tertentu sehingga konsentrasi protein tetap rendah (Lilie *dkk.* 1998: 498).

2.7.4 Purifikasi protein

Purifikasi protein merupakan tahapan yang perlu dilakukan sebelum menganalisis protein. Protein harus dipurifikasi terlebih dahulu agar struktur dan mekanisme kerja suatu protein dapat dipelajari. Hal tersebut karena setiap protein memiliki kelarutan dan ukuran massa yang berbeda-beda. Semakin besar ukuran suatu protein, semakin mudah dan efisien pemisahannya (Lodish 2004: 86).

Purifikasi bertujuan untuk menghilangkan kontaminan, mendapatkan konsentrasi protein murni dari suatu suspensi dan dapat memindahkan protein yang diinginkan ke lingkungan stabil agar protein tersebut siap digunakan. Salah satu metode yang digunakan untuk purifikasi protein adalah metode kromatografi. Kromatografi terdiri dari beberapa jenis yaitu:

1. *Ion-exchange chromatography* (IEXC), pemisahan protein dengan metode IEXC dilakukan dengan menggunakan dua kolom yang berisi muatan berbeda. Kolom anion berisi muatan positif yang akan menarik muatan negatif, sebaliknya kolom kation berisi muatan negatif yang akan menarik muatan positif (Hedhammar *dkk.* 2006: 5)
2. *Size-exclusion chromatography* (SEC), metode pemisahan protein dengan SEC dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran molekul protein. Protein yang berukuran lebih besar akan lebih cepat bergerak melalui polimer dalam kolom kromatografi. Akan tetapi, protein yang berukuran kecil yang dapat masuk melalui pori-pori polimer tersebut (Hedhammar *dkk.* 2006: 27).
3. *Reverse-phase chromatography* (RPC), pemisahan protein dengan metode RPC dilakukan berdasarkan sifat hidrofobisitas protein. Metode RPC sangat selektif, namun membutuhkan pelarut organik yang dapat menyebabkan beberapa jenis protein terdenaturasi permanen dan kehilangan fungsinya (Hedhammar *dkk.* 2006: 13).

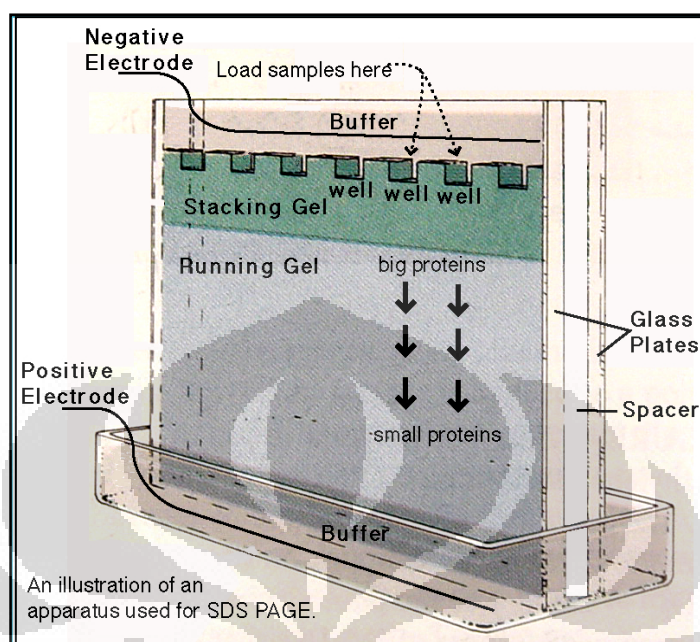
4. *Affinity chromatography*, prinsip kerja metode *affinity chromatography* adalah pengikatan spesifik ligan dengan reseptor (Hedhammar *dkk.* 2006: 16). Purifikasi protein dengan metode tersebut termasuk purifikasi satu tahap. Dalam proses purifikasi satu tahap dibutuhkan adanya interaksi antara protein rekombinan dengan suatu ligan spesifik. Apabila tidak diketahui ligan yang dapat berikatan secara spesifik, maka tidak dapat dilakukan pemurnian satu tahap. Namun, hal tersebut dapat tetap dilakukan dengan menggunakan tag protein. Contoh tag protein yaitu *Glutathione-S-Transferase* (GST), *maltose binding protein* (MBP), *His-tag*, dsb. (Muhaimin *dkk.* 2005: 31). Purifikasi dengan *affinity chromatography* umumnya memberikan hasil yang paling murni dan spesifitas protein tertinggi dibandingkan dengan metode yang lain.

2.7.5 *Sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)

SDS-PAGE merupakan metode yang dilakukan untuk memisahkan dan menganalisis protein. Prinsip dari SDS-PAGE adalah protein yang berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat dibanding protein berukuran besar dalam gel yang dialiri muatan listrik (Lodish 2004: 87). *Sodium dodecylsulfate* yang digunakan dalam metode SDS-PAGE adalah sejenis detergen bermuatan negatif yang dapat mengikat protein sehingga protein tersebut dapat bermigrasi ke ujung muatan listrik positif pada gel (Frank 2011: 1). Konstruksi SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 2.7.5(1)

Ada dua jenis gel yang digunakan dalam SDS-PAGE yaitu *resolving gel* dan *stacking gel*. *Stacking gel* berfungsi membentuk *well* atau sumur yang menjadi tempat *loading* sampel, sedangkan *resolving gel* berfungsi sebagai tempat migrasi protein (Saw 2011: 3). Kedua gel tersebut berada pada dua lempeng kaca dan mengalami polimerisasi karena terjadi ikatan antara poliakrilamid dengan *cross-linking solution* (APS dan TEMED) sehingga gel menjadi matriks semisolid. Pori-pori gel yang digunakan dapat berbeda-beda, tergantung dari konsentrasi poliakrilamid dan *cross-linking solution* tersebut. Konsentrasi pori-

pori gel dan kekuatan arus listrik yang digunakan dapat memengaruhi kecepatan migrasi protein (Lodish 2004: 87--88).

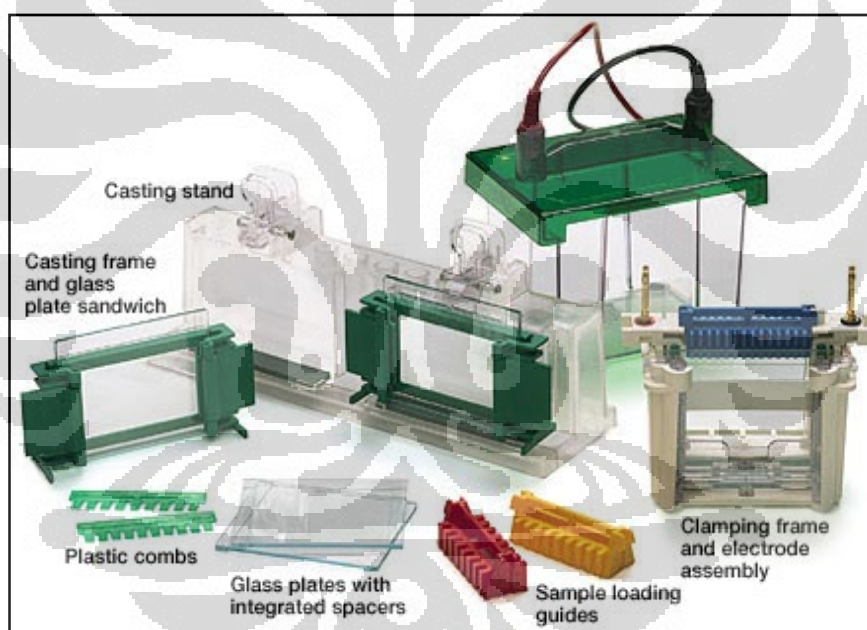


Gambar 2.7.5(1) Konstruksi SDS-PAGE
[Sumber: Williams 2011: 1.]

Komponen gel yang digunakan juga memiliki fungsi masing-masing, yaitu akrilamid, akan membentuk poliakrilamid yaitu polimer pembentuk matriks yang berfungsi sebagai tempat untuk protein berpindah dan memisahkan protein tersebut berdasarkan berat molekulnya (Frank 2011: 1). *Ammonium persulfate* (APS) yang bersifat tidak stabil, apabila terjadi kerusakan, akan menghasilkan ion SO_4^- yang akan bereaksi dengan molekul akrilamid dan menginisiasi terjadinya polimerisasi keduanya. TEMED berfungsi sebagai katalis yang dapat mempercepat kerusakan APS. 0.5 M Tris pH 6.8 dan 1.5 M Tris pH 8.8 berfungsi sebagai larutan penyangga atau buffer. Semua bahan kimia yang digunakan dalam pembuatan gel dapat disimpan pada suhu ruang selama beberapa bulan kecuali APS. APS yang akan digunakan sebaiknya dibuat setiap minggu dan disimpan pada suhu 4°C agar menjadi stabil. Jika gel yang telah dibuat tidak mengalami polimerisasi maka hal tersebut dikarenakan APS yang digunakan dalam kondisi tidak baik (Shaw 2001: 13--14).

SDS-PAGE membutuhkan beberapa peralatan yang digunakan dalam pembuatan gel dan *running*. Perangkat SDS-PAGE terdiri atas *casting stand*,

casting frame, glass plate sandwich, plastic comb, glass plate with integrated spacer, sample loading guides, clamping frame dan electrode assembly. Perangkat SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 2.7.5(2). *Casting stand* digunakan tempat untuk meletakkan *casting frame*. *Casting frame* berfungsi sebagai tempat untuk meletakkan cetakan gel dalam pembuatan gel SDS-PAGE. *Glass plate sandwich* dan *glass plate with integrated spacer* digunakan sebagai tempat cetakan gel dan *running* sampel. *Plastic comb* berfungsi sebagai cetakan *well* atau sumur pada gel. *Sample loading guides* digunakan sebagai penunjuk *well* pada gel ketika dilakukan *loading* sampel. *Clamping frame* berfungsi sebagai tempat untuk meletakkan *glass plate sandwich* dan *glass plate with integrated spacer* ketika *running* SDS-PAGE. *Electrode assembly* berfungsi sebagai pemasok arus listrik dalam *running* SDS-PAGE (Bio-Rad 2001: 3--4).



Gambar 2.7.5(2) Perangkat SDS-PAGE
[Sumber: Bio-Rad 2001: 1.]

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekular Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong, Bogor, Indonesia. Penelitian dilakukan selama enam bulan, dimulai dari bulan Januari 2011 hingga Juni 2011, termasuk penelitian awal (studi pendahuluan) pada bulan Januari 2011.

3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tabung falcon 10 ml [Sarstedt]; mikropipet 0,5--10 μ l; 20--200 μ l; 100--1000 μ l [Bio-Rad] dan 2--20 μ l [Eppendorf]; pipet [Brand]; tip kuning; putih [Art] dan biru [Rainin]; Marka Protein [Bio-RAD]; botol semprot alkohol 500 ml [DX]; botol semprot aquades [Ciencaware]; tangki aquades [Nalgene]; mesin *rocker* [Bio-Green]; mesin sentrifus [*Hermle*]; mesin vortex [Maxi-Mix]; mesin *spinning* [Bio-Rad]; *ice maker* [Scotman]; sarung tangan [Sensi Gloves]; masker [One Med]; apparatus SDS-PAGE [Bio-Rad]; pengatur tegangan listrik [Bio-Rad]; parafilm [Pechiney]; *shaker incubator* [New Brunswick scientific]; inkubator 37°C [Heraeus]; autoklaf [Everlight TA630]; laminar flow [Laboratories]; Erlenmeyer 250 ml dan 500 ml [Pyrex]; botol kaca 100 ml; 500 ml; 1000 ml [Schott Duran]; cawan petri; timbangan digital [Precisa xT 120A]; gelas ukur 10 ml [Pyrex] dan 100 ml; 500 ml; 1000 ml [Plasti Brand]; lemari pendingin 4°C [Toshiba]; *plastic wrap* [Total]; timbangan [Ω]; tabung sentrifus; tabung Eppendorf 1,5 ml [Extra Gene]; syringe [Becton Dickinson & Co]; aluminium foil [KlinPak]; kertas timbang [Diva]; plastik tahan panas [Mascot]; koran; spatula; beaker glass 100 ml; 500 ml; 1000 ml [Pyrex]; *magnetic stirrer*; sonikasi; *deep freezer* -70°C [Forma Scientific] dan -20°C [Gea]; timer [Hoseki]; *ice box* [Marina Cooler]; rak tabung [Biolabs]; tabung reaksi; pH meter; kertas pH [Merck]; ose; rotor [M. Biotech]; kuvet; spektrofotometri [GeneQuant]; corong; boks plastik untuk *staining & destaining*

[SnapPack]; bunsen; korek api [Tokai]; oven; thermometer; panci; kapas [Bahana Medika]; kain kasa [Kasa Lestari]; tisu [Multi]; bolpoin; spidol [Snowman]; lakban hitam; lakban coklat [Daimaru Tape]; dan kompor gas [Rinnai].

3.3 Bahan

3.3.1 Mikroorganisme, vektor ekspresi, dan sumber protein rekombinan

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* BL21. Vektor ekspresi yang digunakan yaitu plasmid pGEX 6p-1 [GE Healthcare] dengan ukuran 4900 bp. Laboratorium Biologi Molekular Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong memiliki konstruksi pGEX yang telah disisipi dengan *gen envelope* pengkode protein *Jembrana Transmembrane* (JTM).

3.3.2 Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium Luria bertani cair, medium Luria bertani padat, dan *transformation and storage solution* (medium TSS).

3.3.3 Larutan dan *buffer*

Larutan dan *buffer* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1,5 M Tris 100 ml pH 8,8; 0,5 M Tris pH 6,8 100 ml; *coomasie blue staining for protein* 500 ml; *destain coomasie blue* 1000 ml; PBS *buffer*; 10% SDS; 5x SDS *running* pH 8,3; *elution buffer* 3,5 ml; *stacking gel*; *resolving gel*; 50 Mm DTT; larutan *stock* ampicilin 100 mg/μl; *washing buffer*; *dilution buffer*; dan *solubilize buffer*.

3.3.4 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah *loading dye* [Fermentas]; acrylamid [Applichem]; ddH₂O; Bacto™ Tryptone [Dickinson & Company]; BBL™ Yeast Extract [Dickinson & Company]; Bacto™ Agar [Dickinson & Company]; NaCl [Merck]; KCl [Merck]; Na₂HPO₄ [Merck]; KH₂PO₄ [Merck]; gliserol [Sigma]; methanol [Merck]; *glycine*; *glacial acetic acid* [Merck]; NaOH; TEMED [Amresco]; amonium persulfate (APS) [Biomedicals]; ampicilin [Sigma]; resin [sepharose]; IPTG [Sigma] alkohol; *glutation reduced* [Sigma]; tris [Bio-basic]; dan *sodium dodecyl sulfat* (SDS).

3.3.5 Marka Protein

Marka protein yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Presicion Plus Protein Standards-*Dual color* [Bio-Rad]. Marka protein tersebut memiliki ukuran berat molekul 10-250 kDa. Marka protein dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.4 Cara kerja

Skema alur kerja penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.4.1 Pembuatan larutan dan *buffer*

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

3.4.2 Pembuatan medium

3.4.2.1 Medium Luria bertani (LB) cair

Sebanyak 1,5 g *bacto tryptone*; 0,75 g *yeast extract*; dan 0,75 g NaCl ditimbang dengan timbangan digital. Semua bahan yang telah ditimbang, dimasukkan ke dalam *beaker glass* 250 ml. ddH₂O ditambahkan hingga volume

mencapai 150 ml. Medium dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 ml masing-masing 50 ml. Medium disterilisasi dengan autoklaf (121°C, 2 atm, 15 menit).

3.4.2.2 Medium Luria bertani (LB) padat

Sebanyak 1 g *bacto trypton*; 1,5 g *bacto agar*; 0,5 g NaCl dan 0,5 g *yeast extract* dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer 250 ml. Selanjutnya ddH₂O ditambahkan hingga volume mencapai 100 ml. Medium kemudian di autoklaf (121°C, 2 atm, 15 menit). Setelah medium selesai di autoklaf, medium didiamkan pada suhu ruang hingga tidak terlalu panas. Kemudian medium ditambahkan 10 mg/μl ampisilin. Medium dituang ke dalam petri sebanyak 25 ml untuk 1 cawan petri. Proses penuangan dan penambahan ampisilin dilakukan di dalam *laminar flow*. Selanjutnya medium didiamkan pada suhu ruang. Medium yang telah mengeras, disimpan dalam suhu 4°C hingga digunakan.

3.4.2.3 Transformation and storage solution (medium TSS)

Sebanyak 5,3125 ml LB medium cair ditambahkan 0,625 g PEG 6000 kemudian dilakukan pengukuran pH. pH yang dibutuhkan yaitu 6,5. Selanjutnya campuran di autoklaf (121°C, 2 atm, 15 menit). Campuran yang telah di autoklaf diletakan pada suhu ruang hingga tidak terlalu panas kemudian ditambahkan DMSO sebanyak 0,3125 ml dan 1M MgCl₂ sebanyak 0,625 ml. Selanjutnya medium TSS disimpan dalam suhu 4°C hingga digunakan.

3.4.3 Sterilisasi alat dan medium

Sterilisasi alat dan medium dilakukan untuk mengurangi adanya kontaminasi yang mungkin terdapat pada alat dan medium yang akan digunakan. Ada dua jenis sterilisasi yang digunakan yaitu sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Sterilisasi basah digunakan dengan menggunakan mesin autoklaf. Autoklaf dilakukan pada suhu 121°C, pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

Sterilisasi basah biasanya digunakan untuk medium –medium yang akan dipakai dalam penelitian.

Sterilisasi kering digunakan dengan menggunakan oven. Oven diatur pada suhu 150°C selama \pm 2 jam. Sterilisasi kering biasanya dilakukan untuk mensterilisasi alat-alat kaca yang akan digunakan dalam penelitian.

3.4.4 Re-transformasi ke dalam *Escherichia coli* BL21

Proses re-transformasi dilakukan untuk mendapatkan transforman baru. Tahapan proses re-transformasi meliputi preparasi medium, pembuatan sel kompeten, dan transformasi (Chung *dkk.* 1989: 2172--2175).

3.4.4.1 Preparasi medium

Medium yang dibutuhkan dalam proses re-transformasi yaitu medium LB padat, medium LB cair dan medium TSS. Medium LB padat disiapkan sebanyak 3 cawan petri yang terdiri atas 1 cawan petri berisi LB padat tanpa ampisilin (sebagai kontrol positif) dan 2 cawan petri berisi LB padat yang mengandung ampisilin (sebagai medium pertumbuhan dan kontrol negatif).

3.4.4.2 Pembuatan sel kompeten *Escherichia coli* BL21

Sebanyak 10 μ l sel *E. coli* diinokulasikan ke dalam 5 ml medium LB cair. Suspensi kemudian diinkubasi selama 16-17 jam (*overnight*) pada suhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm. Selanjutnya sebanyak 1 ml sel *E. coli* diinokulasikan ke dalam 50 ml medium LB cair dan dilakukan pengecekan *optical density* (OD) pada kultur sel. Nilai OD kultur sel sebaiknya berada pada kisaran 0.4--0.5. Kultur sel selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Pelet kemudian ditambahkan 2 ml medium TSS dan di-*pipetting*. Supernatan dibuang.

3.4.4.3 Transformasi sel kompeten *Escherichia coli* BL21

Sebanyak 100 μ l suspensi (pelet + TSS) ditambahkan 2 μ l plasmid DNA (pGEX). Tahapan selanjutnya dilakukan *heatshock* yang meliputi 3 tahapan yaitu suspensi dibenamkan di dalam es selama 20 menit, selanjutnya suspensi diletakan pada *waterbath* dengan suhu 42°C, terakhir suspensi dibenamkan kembali di dalam es selama 2 menit. Tahapan transformasi selanjutnya ditambahkan 400 μ l LB cair (tanpa ampisilin) dan suspensi diinkubasi dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 37°C selama 60 menit. Selanjutnya suspensi di sebar ke dalam 3 cawan petri berisi medium LB padat dan diinkubasi dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 37°C, *overnight*.

3.4.5 Pembuatan *working culture* sel *Escherichia coli* BL21

Pembuatan *working culture* mengikuti metode dari Margawati & Ridwan (2009: 167). Sebanyak 10 μ l plasmid pGEX yang telah membawa gen *envelope* pengkode protein *Jembrana Transmembrane* (JTM) dari *stock culture* diinokulasikan ke dalam 5 ml LB cair yang telah diberi 5 μ l ampisilin (100 mg/ μ l). Kultur sel selanjutnya diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm selama 17 jam (*overnight*).

3.4.6 Pengecekan kepadatan sel *Escherichia coli* BL21

Pengecekan kepadatan sel *E. coli* mengikuti metode dari Margawati & Ridwan (2009: 167--168) dengan modifikasi. Sebanyak 1 ml kultur dari *working culture* diinokulasikan ke dalam 50 ml LB cair. Medium tersebut sebelumnya telah ditambahkan 50 μ l ampisilin (100 mg/ μ l). Kultur sel diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm selama \pm 1 jam. Selanjutnya dilakukan pengecekan *optical density* (OD) setiap 20--30 menit untuk mendapatkan nilai OD yang menjadi variabel dalam penelitian ini.

Nilai OD yang ingin didapatkan yaitu tabung I (OD 0,4), tabung II (OD 0,6), dan tabung III (OD 0,8). Pengukuran OD₆₀₀ dilakukan dengan menggunakan

spektrofotometri. Sebanyak 1 ml medium LB cair diambil sebagai larutan blanko. Selanjutnya sebanyak 1 ml kultur sel *E. coli* dari kultur sel *E. coli* 50 ml diambil sebagai larutan sampel.

3.4.7 Induksi IPTG untuk ekspresi protein rekombinan JTM-pGEX

Induksi IPTG dan koleksi pelet mengikuti metode dari Margawati & Ridwan (2009: 167). Sebanyak 50 μ l IPTG 100 μ M ditambahkan ke dalam kultur sel yang telah mencapai nilai OD yang telah ditentukan. Selanjutnya kultur sel diinkubasi selama 1 jam di dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, kultur sel dipindahkan ke dalam tabung sentrifus. Selanjutnya kultur sel disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4°C selama 1 menit. Supernatan dibuang, kemudian pelet dikoleksi dan disimpan pada suhu -20°C.

3.4.8 Pemecahan sel *Escherichia coli* BL21

Pemecahan sel dilakukan dengan dua metode yaitu metode *freeze & thaw* dan sonikasi. Proses pemecahan sel mengikuti metode dari Margawati & Ridwan (2009: 166--167) dengan modifikasi.

3.4.8.1 Metode *freeze & thaw*

Pelet yang disimpan dalam *freeze* -20°C dikeluarkan. Selanjutnya pelet di-*thawing* pada suhu ruang (28--30°C) selama 10 menit (hingga pelet mencair). Setelah itu pelet dimasukkan kembali ke dalam *freezer* -20°C selama 15 menit. *Freeze & thaw* tersebut diulang sebanyak 3 kali pengulangan. Selanjutnya pelet ditambahkan 5 ml PBS *buffer*, campuran divorteks, kemudian dipindahkan ke dalam tabung falcon.

3.4.8.2 Metode sonikasi

Suspensi sel selanjutnya disonikasi selama 15 detik dengan interval waktu 1 menit. Perlakuan tersebut diulang sebanyak 3 kali. Setelah itu, suspensi dipindahkan kembali ke dalam tabung sentrifus. Suspensi sel disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Pelet dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml.

3.4.9 Solubilisasi dan *refolding* protein rekombinan JTM-pGEX

Sebelum dilakukan proses *refolding* pada sampel protein, dilakukan tahapan solubilisasi terlebih dahulu. Pelet hasil sonikasi ditambahkan 1 ml *washing buffer* kemudian dicampurkan. Selanjutnya suspensi dipindahkan ke tabung Eppendorf 1,5 ml baru. Suspensi disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang. Pencucian protein dengan *washing buffer* diulang sebanyak 3 kali. Selanjutnya suspensi ditambahkan 1 ml dH₂O steril dan disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang. Pelet ditambahkan 1 ml *solubilize buffer* kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Suspensi dirotator pada suhu 4°C, *overnight*.

Tahapan *refolding* protein dilakukan dengan menggunakan metode *slow dilution*. *Beaker glass* berukuran 100 ml diletakan didalam wadah berisi es dengan suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Wadah tersebut kemudian diletakan di atas *magnetic stirrer*. Sebanyak 5 ml *dilution buffer* kemudian dimasukan ke dalam *beaker glass* dan di-*stirrer* dengan kecepatan rendah. Dalam interval waktu 5 menit, sampel protein diteteskan perlahan sebanyak 100 μl . Setiap sampel disisakan sebanyak $\pm 100 \mu\text{l}$ untuk dilakukan analisis SDS-PAGE. Sampel kemudian dipindahkan ke dalam tabung falcon 5 ml. Jika sampel protein yang telah didapatkan akan dipurifikasi, sampel diberikan 50 μl resin *gluthatione sepharose 4B*. Kemudian sampel dirotator (*batch capture*) pada suhu 4°C, *overnight* (Clark 1998: 15--159).

3.4.10 Purifikasi protein rekombinan JTM-pGEX

Proses purifikasi dilakukan dengan mengikuti metode dari Amersham Bioscience (2002: 40--41). Sampel protein yang telah dirotator kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 7 menit. Selanjutnya sebanyak 1 ml supernatan diambil, kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Supernatan tersebut disebut *inner volume* (IV). Sisa supernatan dibuang, kemudian IV disimpan pada suhu -20 °C.

Selanjutnya pelet ditambahkan PBS *buffer* 5 ml, kemudian digoyangkan perlahan hingga tercampur merata. Suspensi kemudian disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Sebanyak 1 ml supernatan diambil, kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Supernatan tersebut disebut *washing* 1 (W_1). Sisa supernatan dibuang, kemudian W_1 disimpan pada suhu -20°C.

Selanjutnya pelet ditambahkan PBS *buffer* 5 ml, kemudian digoyangkan perlahan hingga tercampur merata. Setelah itu suspensi disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4°C selama 4 menit. Supernatan diambil sebanyak 1 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Supernatan tersebut disebut *washing* 2 (W_2). Sisa supernatan dibuang dan W_2 disimpan pada suhu -20°C.

Tahapan berikutnya pelet ditambahkan *elution buffer* sebanyak 200 µl. Protein di-rotator (*batch capture*) pada suhu 4°C selama 17 jam (*overnight*). Setelah itu protein disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 1 menit. Sebanyak 100 µl supernatan diambil. Supernatan tersebut disebut *elution* 1 (E_1). Selanjutnya pelet kembali ditambahkan *elution buffer* sebanyak 100 µl. Selanjutnya protein di-rotator (*batch capture*) pada suhu 4°C selama 3 jam. Setelah itu, protein disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 1 menit. Supernatan diambil sebanyak 100 µl. Supernatan tersebut disebut *elution* 2 (E_2). Pelet yang tersisa diberi label R. R dan E_2 disimpan pada suhu -20°C

3.4.11 Analisis dan visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX dengan SDS-PAGE

Analisis dan visualisasi protein dengan menggunakan metode SDS-PAGE meliputi beberapa tahapan yaitu pembuatan gel (*stacking gel* dan *resolving gel*), denaturasi sampel, *running* sampel, pewarnaan (*staining* dan *destaining*), dan dokumentasi. Metode SDS-PAGE dilakukan mengikuti metode dari Lodish (2004: 87--89).

3.4.11.1 Pembuatan gel

Stacking gel dan *resolving gel* dibuat dengan komposisi seperti pada Tabel 3.4.11.1(1).

Tabel 3.4.11.1(1) Komposisi *resolving gel* & *stacking gel*

<i>Resolving gel</i>	Jumlah	<i>Stacking gel</i>	Jumlah
ddH ₂ O	3,2 ml	ddH ₂ O	3,05 ml
1,5 M Tris pH 8,8	3,5 ml	0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10% SDS	0,1 ml	10% SDS	0,05 ml
Acrylamid	4,15 ml	Acrylamid	0,65 ml
Amonium sulfate (APS)	50 µl	Amonium sulfate (APS)	25 µl
TEMED	15 µl	TEMED	5 µl

Resolving gel dibuat terlebih dahulu, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan *stacking gel* setelah *resolving gel* mengeras. Semua bahan dicampurkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Larutan gel kemudian diaduk perlahan agar semua bahan tercampur merata. Sebanyak 1 ml larutan gel diambil kemudian dimasukkan ke dalam celah antara *glass plate sandwich* dengan *glass plate with integrated spacer* (cetakan gel). Selanjutnya ddH₂O ditambahkan diatas *resolving gel*. Setelah *resolving gel* mengeras, sisa ddH₂O diserap dengan menggunakan kertas tisu. Selanjutnya *stacking gel* dimasukkan di atas permukaan

resolving gel, kemudian *comb* dimasukan. Gel ditunggu hingga mengeras kemudian *comb* diangkat.

3.4.11.2 Denaturasi sampel

Sampel dikeluarkan dari *freezer* -20°C , kemudian di-*thawing* hingga mencair. Sebanyak 20 μl sampel ditambahkan 10 μl *loading dye* kemudian dimasukan ke dalam tabung Eppendorf. Campuran di-*pipetting* sehingga menjadi homogen. Selanjutnya campuran diinkubasi pada suhu 95°C selama 15 menit. Campuran kemudian di-*spinning*.

3.4.11.3 *Running* sampel

Sampel yang telah didenaturasi dimasukan ke dalam *well* pada gel SDS. Gel kemudian dimasukan ke dalam tangki elektroforesis dan diberikan larutan 1x SDS *running*. Sampel di-*running* selama 60 menit dengan besar arus listrik 100A.

3.4.11.4 Pewarnaan

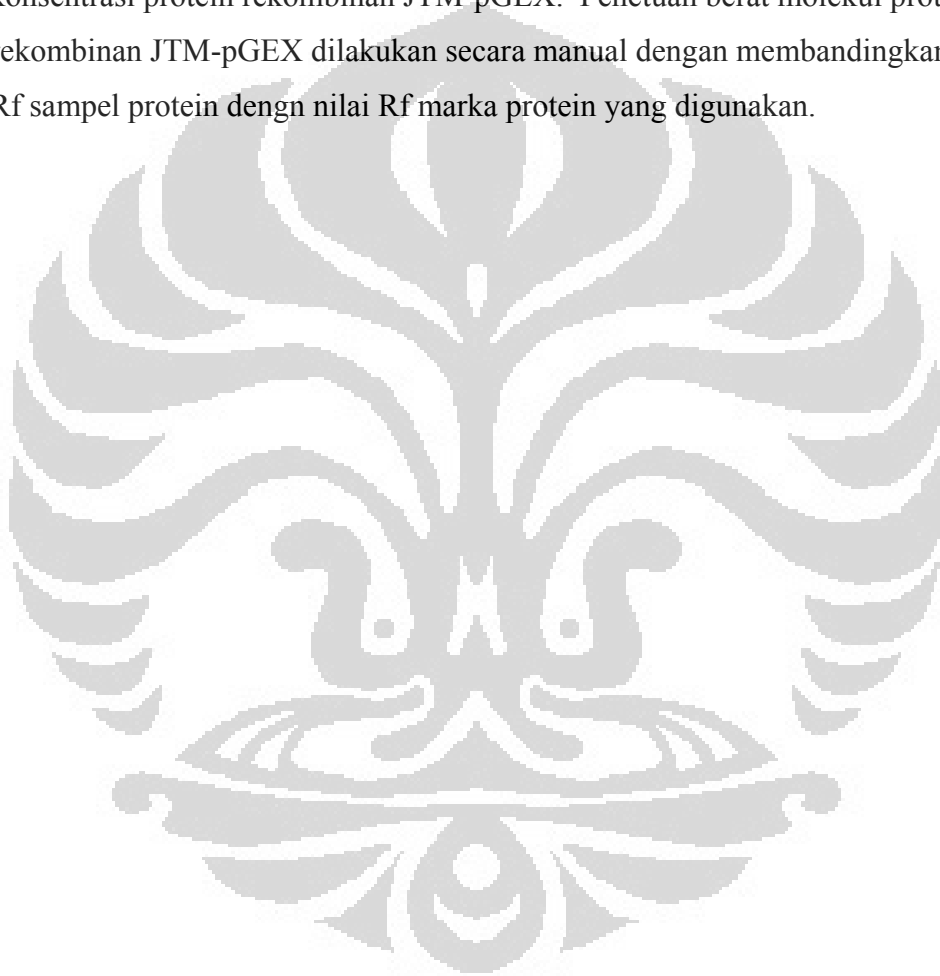
Gel hasil *running* SDS-PAGE diberi larutan *coomasie blue staining for protein*. Selanjutnya gel digoyang-goyangkan dengan *rocker* selama 3 jam. Gel kemudian dicuci dengan larutan *destain coomasie blue* selama 1 jam sambil digoyang-goyangkan kembali dengan *rocker*. Pencucian tersebut dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

3.4.11.5 Dokumentasi

Gel yang telah dicuci kemudian diberi akuades. Selanjutnya sebanyak 1 ml gliserol ditambahkan agar gel tidak mudah patah. Gel diletakkan di dalam plastik mika, kemudian didokumentasikan dengan *scanner* dan kamera digital.

3.4.11.6 Pengolahan dan analisis data

Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental. Hasil visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX dengan SDS-PAGE diolah dan dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif, ketebalan pita protein pada hasil SDS-PAGE menjadi parameter untuk melihat ekspresi protein rekombinan JTM-pGEX paling tinggi. Secara kuantitatif, dilakukan kuantifikasi protein untuk mengetahui konsentrasi protein rekombinan JTM-pGEX. Penentuan berat molekul protein rekombinan JTM-pGEX dilakukan secara manual dengan membandingkan nilai R_f sampel protein dengan nilai R_f marka protein yang digunakan.



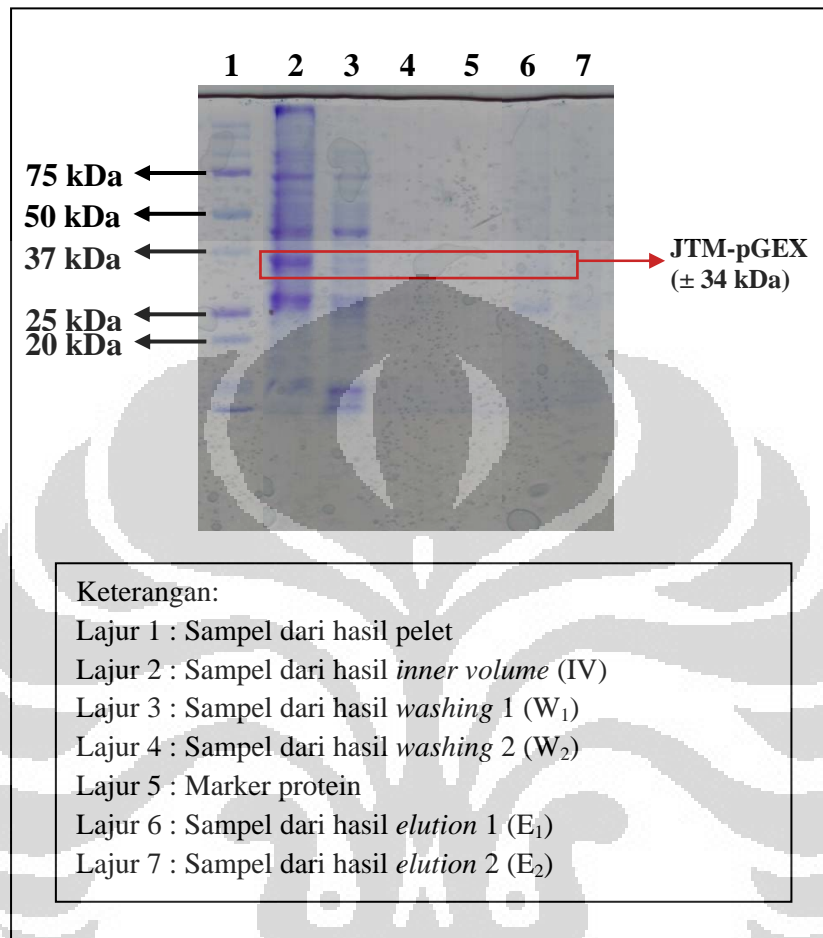
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Re-transformasi sel *E. coli* BL21

Re-Transformasi merupakan tahapan yang dilakukan untuk mendapatkan transforman baru yang memiliki gen insert aktif. Gen insert tersebut merupakan gen pengkode protein rekombinan yang dikonstruksi ke dalam plasmid kemudian diekspresikan melalui sel inang. Berdasarkan hasil pra penelitian, ekspresi protein rekombinan JTM-pGEX didapatkan pada sampel pelet, *inner volume* (IV) dan elusi 1 (E_1). Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX pada sampel pelet menunjukkan adanya pita protein yang muncul di bawah marka protein berukuran 37 kDa (Gambar 4.1(1) lajur 2). Namun demikian, perlu dilakukan purifikasi untuk mendapatkan protein rekombinan JTM-pGEX murni. Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX pada tahapan purifikasi diambil dari sampel *inner volume* (IV) (Gambar 4.1(1) lajur 3). Hasil visualisasi tersebut menunjukkan bahwa terdapat pita protein rekombinan JTM-pGEX di bawah marka protein berukuran 37 kDa (± 34 kDa), akan tetapi pita protein yang didapatkan sangat tipis. Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX selanjutnya diambil dari sampel protein hasil *washing* 1 (W_1) dan *washing* 2 (W_2). Hasil visualisasi tidak menunjukkan adanya pita protein rekombinan JTM-pGEX (Gambar 4.1(1) lajur 4 dan 5). Hal tersebut dikarenakan pada sampel dari tahapan pencucian memang tidak diperoleh kemunculan pita protein.

Studi berikutnya, visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX diambil dari sampel hasil elusi 1 (E_1) dan elusi 2 (E_2) (Gambar 4.1(1) lajur 6 dan 7). Hasil visualisasi ditunjukkan pada Gambar 4.1(1) lajur 6 terdapat munculnya pita protein rekombinan JTM-pGEX di bawah marka protein berukuran 37 kDa (± 34 kDa), akan tetapi pita protein tersebut hampir tidak terlihat pada gambar hasil *scanner*. Hal tersebut dikarenakan ekspresi protein yang dihasilkan kurang optimal. Beberapa kemungkinan yang dapat mempengaruhi tingkat ekspresi protein antara lain kondisi kultur *E. coli* yang digunakan dan diduga plasmid pGEX yang berisi gen *envelope* dalam bakteri *E. coli* BL21 sudah tidak aktif.

Oleh karena itu, perlu dilakukan proses re-transformasi (transformasi ulang) pada sel *E. coli* BL21.



Gambar 4.1(1). Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil purifikasi.

Sebelum dilakukan re-transformasi, dilakukan pembuatan sel kompeten *E. coli* BL21. Sel *E. coli* BL21 tanpa mengandung plasmid ditumbuhkan pada medium LB cair tanpa ampisilin. Medium LB cair yang digunakan tidak diberikan ampisilin karena sel *E. coli* BL21 yang tidak mengandung plasmid, tidak memiliki sifat resisten terhadap ampisilin. Kultur sel *E. coli* BL21 yang digunakan dipanen pada kisaran nilai *optical density* (OD) sebesar 0,4--0,5. Menurut Zhiming Tu, *dkk.* (2005: 117), kisaran OD merupakan tahapan fase logaritmik awal pada kurva pertumbuhan bakteri. Sel *E. coli* yang berada pada fase log awal sedang aktif membelah sehingga memudahkan adanya introduksi DNA asing. Selain itu, penggunaan sel *E. coli* yang berada pada tahapan fase

logaritmik awal tersebut dapat menghasilkan transforman yang memiliki nilai efisiensi transformasi tinggi (Chung *dkk* 1989: 2174).

Transformasi selanjutnya dilakukan dengan metode *heatshock* (kejutan panas). Pemberian kejutan panas berfungsi untuk mempermudah proses introduksi DNA asing ke dalam sel kompeten *E. coli* BL21. Kejutan panas dilakukan pada suhu 42°C karena pada suhu tersebut efisiensi transformasi optimum dapat dicapai (Chung *dkk.* 1989: 2174). Sel transforman selanjutnya dikultur dengan medium LB cair tanpa ampisilin. Pengkulturan tersebut bertujuan agar sel cepat pulih setelah diberikan kejutan panas (Zhiming Tu 2005: 116).

Hasil penelitian menunjukkan terdapat dua koloni *E. coli* BL21 hasil re-transformasi yang tumbuh pada medium LB agar (Gambar 4.1(2)). Medium LB agar yang digunakan mengandung ampisilin 100 mg/μl. Sel *E. coli* BL21 yang tumbuh pada medium selektif tersebut adalah sel yang berhasil ditransformasi. Hal tersebut dikarenakan sel *E. coli* yang telah mengandung plasmid pGEX akan memiliki sifat resisten terhadap ampisilin (Zhiming Tu 2005: 116--117).



Gambar 4.1(2). Sel *E. coli* transforman

Plasmid yang ditambahkan ketika dilakukan proses transformasi dalam penelitian hanya sebanyak 2 μ l. Berdasarkan hasil penelitian, banyaknya jumlah plasmid yang digunakan dapat mempengaruhi jumlah transforman yang dihasilkan. Menurut Martien *dkk.* (2007: 5), semakin banyak plasmid yang ditambahkan pada proses transformasi dapat menaikkan kemungkinan terjadinya introduksi plasmid ke dalam sel bakteri. Selain itu faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil transformasi antara lain metode transformasi, kecepatan sentrifugasi, medium kultur dan nilai kepadatan sel yang digunakan.

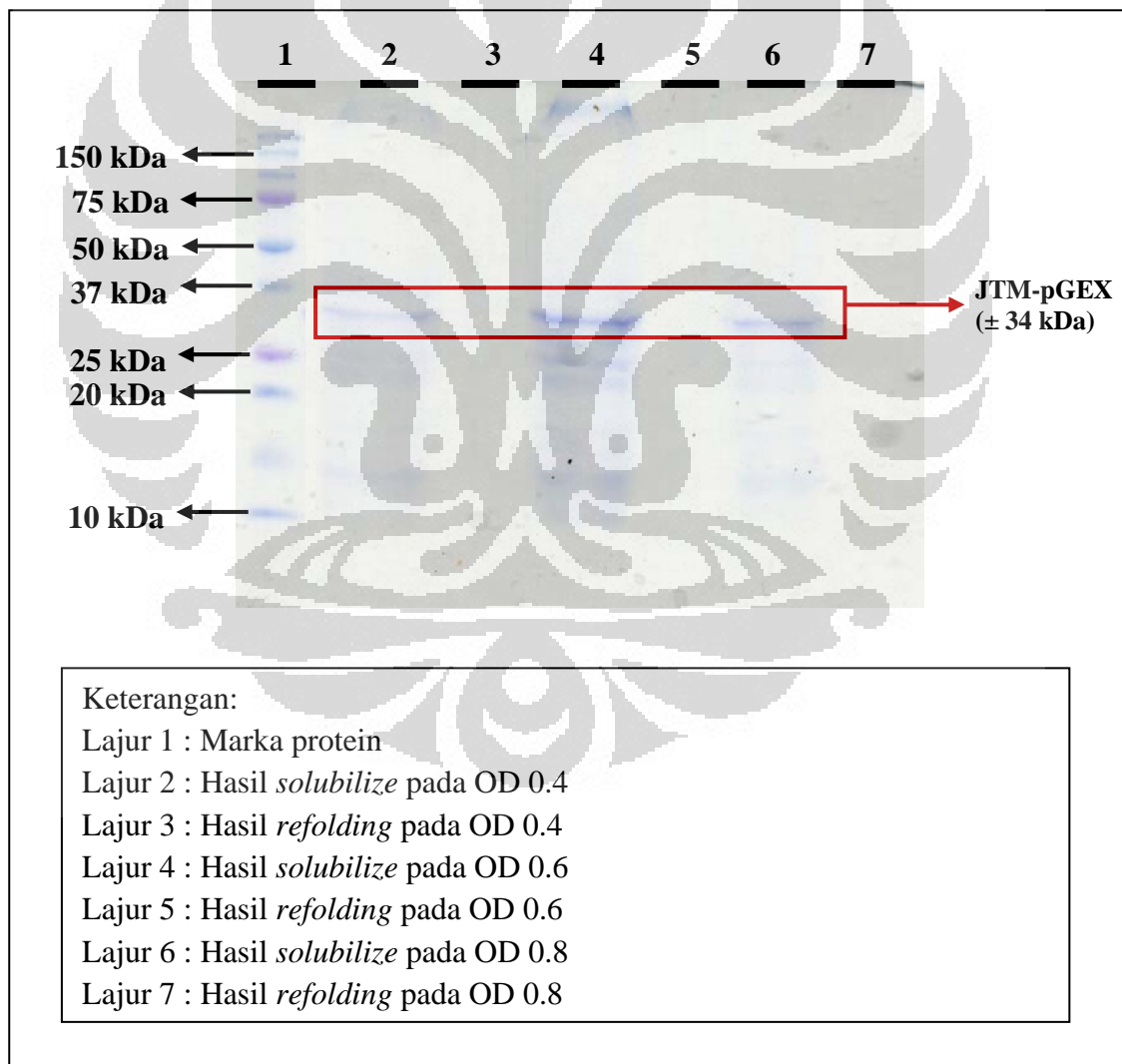
Parameter keberhasilan transformasi lainnya dapat dilihat dari kontrol positif dan kontrol negatif sel kompeten *E. coli* BL21. Pembuatan kontrol positif dilakukan untuk mengetahui kemampuan tumbuh sel kompeten. Hasil kontrol positif menunjukkan bahwa sel kompeten *E. coli* BL21 dapat tumbuh pada medium LB agar tanpa ampisilin. Hasil kontrol negatif menunjukkan bahwa tidak ada sel kompeten yang tumbuh pada medium LB agar yang mengandung ampisilin. Pembuatan kontrol negatif dilakukan untuk melihat adanya kemungkinan terjadinya kontaminasi pada sel kompeten *E. coli* BL21 (Sambrook & Russel 2001: 1.111; Zhiming Tu 2005: 116--117).

4.2 Analisis dan visualisasi protein hasil solubilisasi dan *refolding*

Solubilisasi dan *refolding* merupakan tahapan yang dilakukan untuk mendapatkan protein aktif dari *inclusion body*. *Inclusion body* terbentuk akibat terjadinya ekspresi protein berlebihan didalam sel *E. coli*. Protein yang terekspresi membentuk agregat/ gumpalan protein yang tidak terlarut. Namun demikian protein rekombinan yang membentuk *inclusion body* memiliki beberapa kelebihan yaitu memiliki tingkat ekspresi protein tinggi, lebih sedikit kemungkinan terjadinya degradasi protein yang terekspresi, resisten terhadap serangan proteolitik enzim protease yang dihasilkan sel *E. coli* dan adanya homogenitas protein dalam *inclusion body* mempermudah proses purifikasi protein (Singh & Panda 2005: 303--304).

Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil solubilisasi dan *refolding* dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan untuk melihat tingkat kepadatan sel

yang paling tepat untuk mendapatkan ekspresi protein paling tinggi. Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX pada pengulangan 1 ditunjukkan pada Gambar 4.2(1). Hasil visualisasi tersebut menunjukkan bahwa pada lajur 2, 4 dan 6 terlihat adanya pita protein rekombinan JTM-pGEX di bawah marka protein berukuran 37 kDa (± 34 kDa). Sampel yang digunakan untuk visualisasi tersebut masing-masing diambil dari hasil solubilisasi kultur sel *E. coli* dengan kepadatan sel sebesar 0,4; 0,6; dan 0,8. Hasil visualisasi dengan SDS-PAGE tersebut menunjukkan bahwa pita protein paling tebal ditunjukkan oleh Gambar 4.2(1) lajur 4. Oleh karena itu, hasil analisis sampel solubilisasi pada pengulangan 1 diketahui bahwa ekspresi protein paling tinggi dicapai dengan kepadatan sel 0,6.

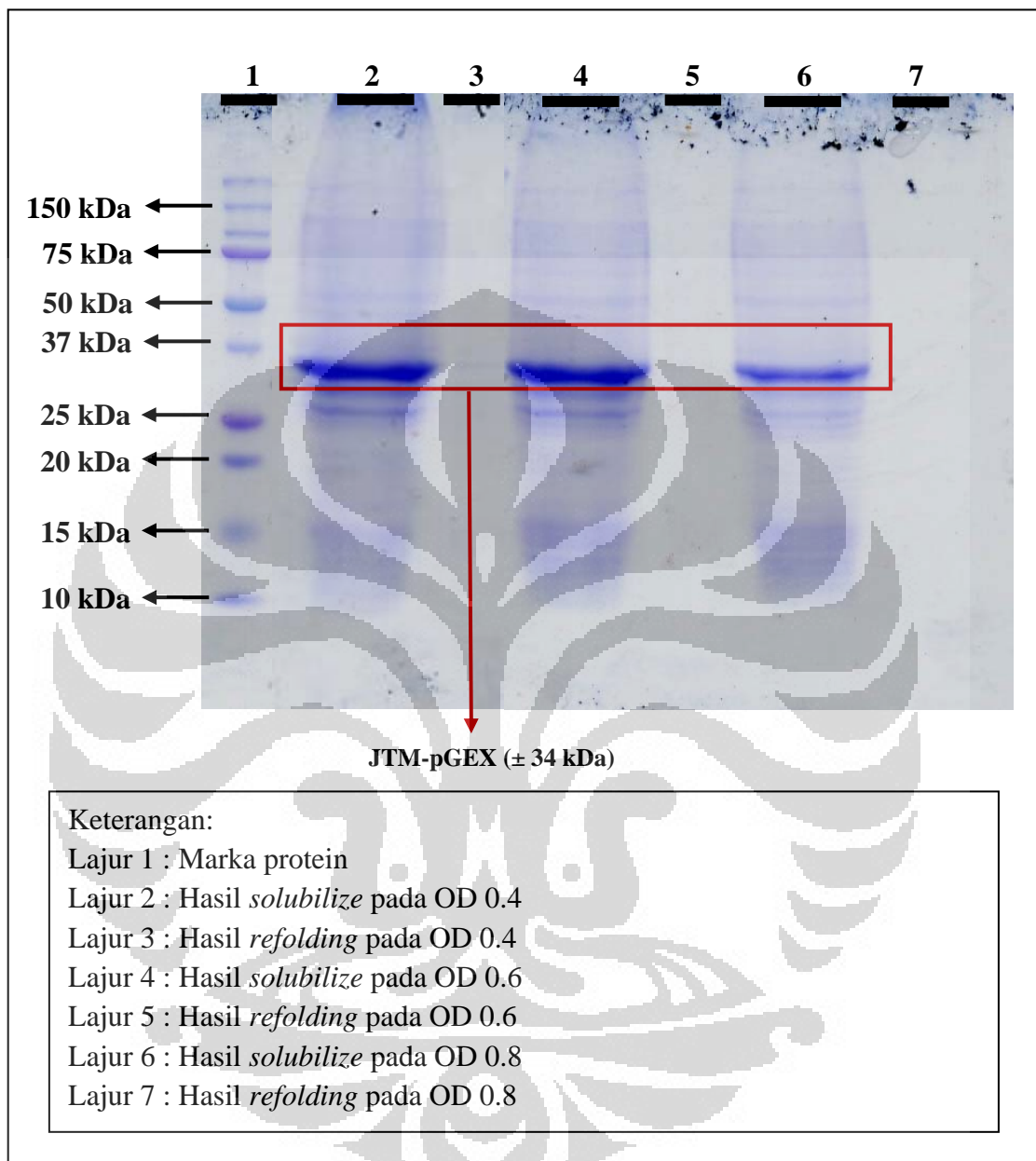


Gambar 4.2(1). Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil solubilisasi dan *refolding* pada pengulangan 1

Hasil visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX pada Gambar 4.4(1) lajur 3, 5 dan 7 tidak menunjukkan adanya pita protein. Sampel yang digunakan pada lajur 3, 5 dan 7 masing-masing diambil dari hasil *refolding* dengan kepadatan sel 0,4; 0,6 dan 0,8. Hasil tersebut dimungkinkan karena konsentrasi protein rekombinan JTM-pGEX sangat kecil ketika dilakukan proses *refolding*.

Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil solubilisasi dan *refolding* protein pada pengulangan 2 ditunjukkan oleh Gambar 4.2(2). Hasil visualisasi dari sampel solubilisasi pada lajur 2, 4 dan 6 menunjukkan munculnya pita protein. Pita protein rekombinan JTM-pGEX tersebut terletak di bawah marka protein dengan ukuran 37 kDa (\pm 34 kDa). Hasil visualisasi dengan SDS-PAGE tersebut menunjukkan bahwa pita protein paling tebal dapat dilihat pada lajur 2 dan lajur 4. Secara kualitatif, dari hasil visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX pada pengulangan 2 belum dapat ditentukan kepadatan sel yang tepat untuk mendapatkan ekspresi protein rekombinan JTM-pGEX paling tinggi. Oleh karena itu, selanjutnya dilakukan kuantifikasi protein rekombinan JTM-pGEX dari hasil solubilisasi.

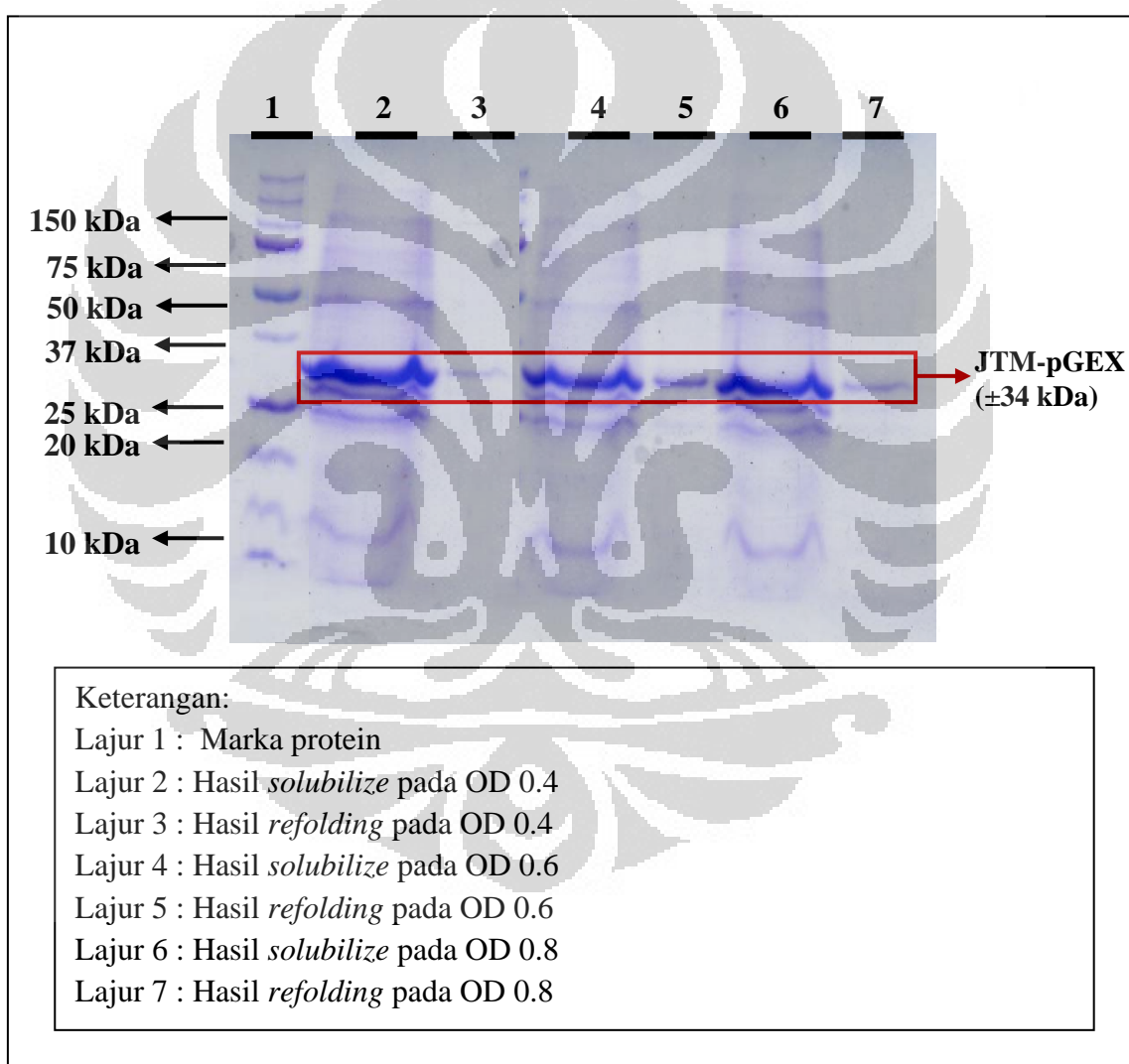
Hasil *refolding* protein rekombinan JTM-pGEX pada pengulangan 2 ditunjukkan oleh Gambar 4.2(2) lajur 3, 5 dan 7. Sampel hasil *refolding* tersebut masing-masing diambil dari kultur sel *E. coli* dengan kepadatan sel 0,4; 0,6; dan 0,8. Hasil visualisasi dengan SDS-PAGE tersebut tidak menunjukkan adanya pita protein rekombinan JTM-pGEX. Hal tersebut sama dengan yang terjadi pada hasil *refolding* pada pengulangan 1. Kemungkinan ketika dilakukan *refolding*, konsentrasi protein rekombinan JTM-pGEX menjadi sangat kecil sehingga tidak tampak pada hasil SDS-PAGE. Menurut Chauduri (1994: 108) ketika proses *refolding*, sebagian molekul protein yang telah melipat sering kali membentuk agregat yang bersifat *irreversibel*. Pembentukan agregat tersebut dapat diminimalisir dengan menjaga konsentrasi protein tetap rendah (10-100 μ g/ml) selama proses *refolding*.



Gambar 4.2(2). Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil solubilisasi dan *refolding* pada pengulangan 2

Visualisasi protein rekombinan hasil solubilisasi dan *refolding* pada pengulangan 3 ditunjukkan oleh Gambar 4.2(3). Hasil visualisasi menunjukkan pada lajur 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 terdapat pita protein rekombinan JTM-pGEX yang terletak di bawah marka protein berukuran 37 kDa (\pm 34 kDa). Gambar 4.4(3) lajur 2, 4 dan 6 menunjukkan hasil solubilisasi dari kultur sel *E. coli* masing-

masing dengan kepadatan sel 0,4; 0,6 dan 0,8. Gambar 4.2(3) lajur 3, 5 dan 7 menunjukkan hasil *refolding* dari kultur sel *E. coli* masing-masing pada tingkat kepadatan sel 0,4; 0,6 dan 0,8. Hasil visualisasi dengan SDS-PAGE tersebut menunjukkan bahwa pita protein paling tebal untuk hasil solubilisasi ditunjukkan oleh Gambar 4.4(3) lajur 2, sedangkan hasil *refolding* paling tebal ditunjukkan oleh Gambar 4.2(3) lajur 5. Oleh karena itu, dari hasil visualisasi pada pengulangan 3 tersebut dapat terlihat bahwa ekspresi protein rekombinan hasil solubilisasi paling tinggi dapat dicapai dengan kepadatan sel 0,4.



Gambar 4.2(3). Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil solubilisasi dan *refolding* pada pengulangan 3

4.3 Penentuan konsentrasi protein rekombinan JTM-pGEX dari hasil solubilisasi dan *refolding*

4.3.1 Konsentrasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil solubilisasi

Berdasarkan tiga kali pengulangan visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX dari sampel solubilisasi, secara kualitatif belum dapat ditentukan kepadatan sel yang tepat untuk mendapatkan protein rekombinan JTM-pGEX yang paling tinggi. Oleh karena itu, dilakukan analisis secara kuantitatif yaitu dengan menghitung nilai konsentrasi protein rekombinan JTM-pGEX. Perhitungan tersebut dilakukan dengan mengkuantifikasi hasil solubilisasi protein rekombinan JTM-pGEX pada 3 ulangan menggunakan mesin spektrofotometri, GeneQuant [Amersham Bioscience].

Berdasarkan hasil kuantifikasi yang ditunjukkan pada Tabel 4.3.1(1) dapat dilihat bahwa rata-rata total konsentrasi protein hasil solubilisasi kultur sel *E. coli* dengan kepadatan sel 0,4; 0,6 dan 0,8 masing-masing sebesar 1,304 mg/ml; 1,207 mg/ml dan 1,260 mg/ml. Hasil kuantifikasi tersebut menunjukkan bahwa ekspresi protein rekombinan JTM-pGEX paling tinggi dapat dicapai dengan kepadatan sel 0,4.

Tabel 4.3.1(1) Kuantifikasi protein hasil solubilisasi

Pengulangan	Konsentrasi protein (mg/ml)								
	S _{0,4}			S _{0,6}			S _{0,8}		
	260	280	Total	260	280	Total	260	280	Total
1	1,124	1,608	1,638	0,716	0,847	0,769	1,077	1,118	0,914
2	0,519	0,549	0,457	1,831	1,759	1,335	1,134	1,316	1,178
3	1,253	1,786	1,816	0,992	1,513	1,519	1,295	1,725	1,690
Rata-Rata	0,965	1,314	1,304	1,179	1,373	1,207	1,168	1,386	1,260

4.3.2 Konsentrasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil *refolding*

Berdasarkan hasil kuantifikasi yang ditunjukkan pada Tabel 4.3.2(1) dapat dilihat bahwa total konsentrasi protein hasil *refolding* kultur sel *E. coli* dengan kepadatan sel 0,4; 0,6 dan 0,8 masing-masing sebesar 0,907 mg/ml; 0,770 mg/ml dan 0,744 mg/ml. Dari hasil tersebut dapat dilihat, konsentrasi protein paling tinggi dihasilkan oleh hasil *refolding* dengan kepadatan sel 0,4. Namun demikian jika dibandingkan dengan hasil visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX, dapat terlihat bahwa ekspresi protein paling optimal didapatkan pada hasil *refolding* dengan kepadatan sel 0,6. Hal tersebut dikarenakan hasil *refolding* dengan kepadatan 0,6 dapat menghasilkan pita protein yang tebal dengan nilai konsentrasi yang lebih kecil.

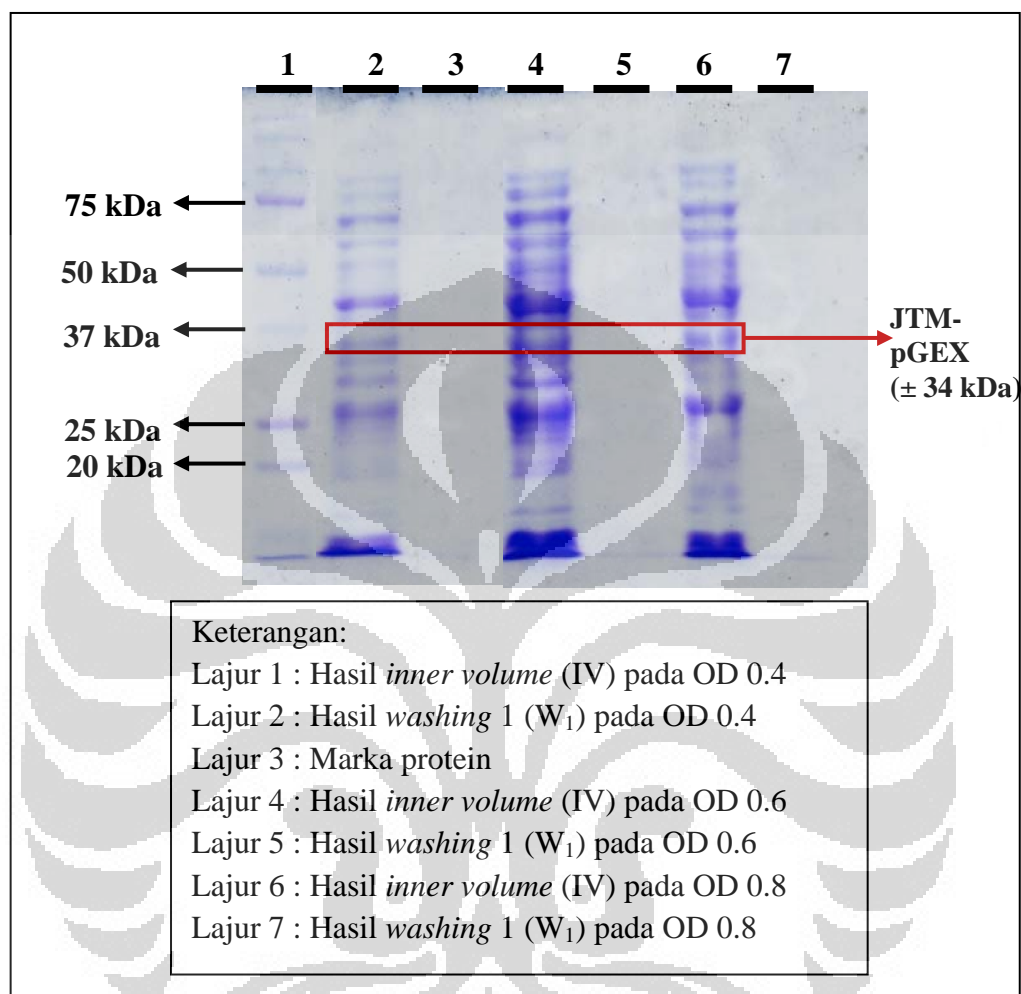
Tabel 4.3.2(1). Kuantifikasi protein hasil *refolding*

Pengulangan	Konsentrasi protein (mg/ml)								
	R _{0,4}			R _{0,6}			R _{0,8}		
	260	280	Total	260	280	Total	260	280	Total
1	1,112	1,324	1,207	1,131	1,303	1,160	0,324	0,373	0,332
2	0,465	0,725	0,770	0,427	0,596	0,599	0,931	1,057	0,931
3	0,979	0,960	0,744	0,363	0,534	0,552	0,723	0,980	0,970
Rata-Rata	0,852	1,003	0,907	0,640	0,811	0,770	0,659	0,803	0,744

4.4 Analisis dan visualisasi protein hasil purifikasi

Berdasarkan hasil visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX dari tiga kali pengulangan, pada hasil *refolding* ulangan ketiga terdapat kemunculan pita protein rekombinan JTM-pGEX. Oleh karena itu, selanjutnya dilakukan purifikasi protein untuk mendapatkan protein rekombinan JTM-pGEX yang murni. Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX pada tahapan purifikasi diambil dari sampel *inner volume* (IV) dan *washing 1* (W₁) ditunjukkan oleh Gambar 4.4(1). Hasil visualisasi protein hasil *inner volume* pada Gambar 4.4(1) lajur 2, 4, dan 6 menunjukkan adanya pita protein rekombinan JTM-pGEX di

bawah marka protein berukuran 37 kDa (± 34 kDa). Namun demikian, hasil tersebut menunjukkan pita protein yang sangat tipis.



Gambar 4.4(1). Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil *inner volume* dan *washing* 1

Sebelum sampel protein hasil *inner volume* diambil, protein dari hasil *refolding* ditambahkan resin *Gluthatione Sepharose 4B*. Penambahan resin tersebut bertujuan untuk mempermudah proses purifikasi protein rekombinan JTM-pGEX. Protein rekombinan JTM-pGEX yang telah dilabel dengan tag GST akan berikatan dengan ligan afinitas (*Gluthatione*) ketika suspensi protein di-*rotator* (Amersham Pharmacia Biotech 2001: 15 & 18). Akan tetapi daya afinitas/ daya ikat dari resin tersebut kemungkinan telah melemah, sehingga tidak banyak protein rekombinan JTM-pGEX yang terikat (GE Healthcare 2008: 13).

Hal tersebut menyebabkan protein yang divisualisasi dari hasil *inner volume* memperlihatkan ekspresi protein yang sangat kecil (Gambar 4.4(1) lajur 1, 4 dan 6).

Gambar 4.4(1) pada lajur 3, 5 dan 7 tidak menunjukkan adanya pita protein. Sampel pada ketiga lajur tersebut diambil dari hasil *washing* 1 (W_1). Hasil tersebut karena tahapan *washing* merupakan tahapan pencucian protein. Hasil visualisasi SDS-PAGE dari sampel *washing* dapat dikatakan berhasil apabila tidak terdapat kemunculan pita protein rekombinan (Margawati & Ridwan, 2009: 168).

Visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX pada tahapan purifikasi selanjutnya diambil dari hasil elusi 1 (E_1) dan elusi 2 (E_2). Lajur 1 dan 2 merupakan sampel E_1 dan E_2 dari protein rekombinan JTM-pGEX dari kultur sel *E. coli* dengan kepadatan sel 0,4. Lajur 3 merupakan marka protein. Lajur 4 dan 5 merupakan sampel E_1 dan E_2 dari protein rekombinan JTM-pGEX dari kultur sel *E. coli* dengan kepadatan sel 0,6. Lajur 6 dan 7 merupakan sampel E_1 dan E_2 dari protein rekombinan JTM-pGEX dari kultur sel *E. coli* dengan kepadatan sel 0,8.

Protein hasil elusi sebelumnya dicuci pada tahapan *washing* agar protein lain yang tidak berikatan dengan ligan afinitas dapat dihilangkan. *Elution buffer* yang ditambahkan pada tahapan elusi berfungsi untuk melepas ikatan antara protein rekombinan JTM-pGEX dengan ligan afinitas (*Gluthatione*) sehingga akan didapatkan protein rekombinan JTM-pGEX murni (GE Healthcare 2008: 13). Namun demikian, hasil visualisasi protein rekombinan JTM-pGEX dari sampel elusi tidak menunjukkan adanya pita protein pada lajur 1, 2, 4, 5, 6, dan 7. Hal tersebut kemungkinan disebabkan ikatan yang terjadi antara protein rekombinan JTM-pGEX dengan molekul-molekul *gluthatione* terlepas. Pelepasan tersebut menyebabkan protein rekombinan tersebut diperkirakan terlarut bersama protein lain ketika dilakukan tahapan pencucian (*washing* 1 dan *washing* 2).

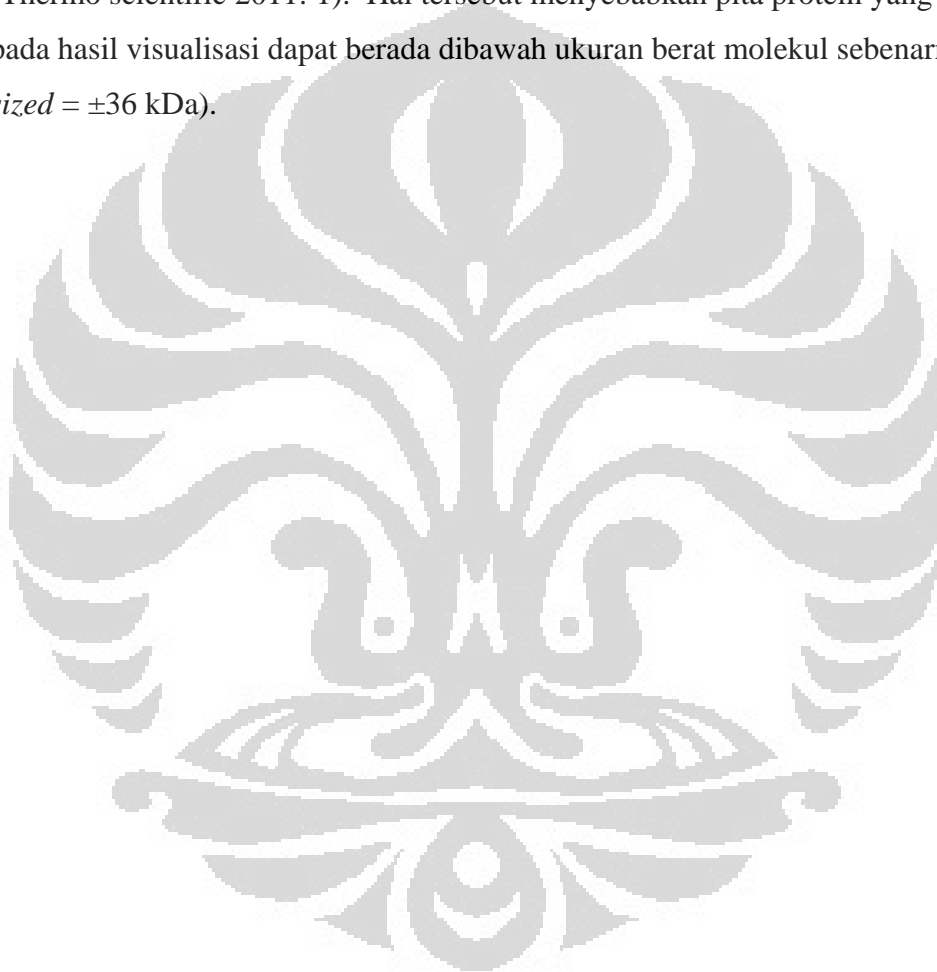
4.5 Perhitungan Berat Molekul Protein Rekombinan JTM-pGEX

Perhitungan berat molekul protein rekombinan JTM-pGEX dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan garis linier dari kurva standar protein (Gallagher 1995: 10.1.30). Kurva tersebut dihasilkan dari perbandingan nilai mobilitas relatif (Rf) sampel (protein rekombinan JTM-pGEX) dengan nilai Rf marka protein yang digunakan (*Bio-rad dual color*). Nilai Rf diperoleh dengan cara membagi jarak migrasi awal pita protein dari bagian atas gel dengan jarak total migrasi larutan pada bagian bawah gel. Data X diambil dari nilai Rf marka protein, sedangkan data Y diambil dari nilai logaritma berat molekul protein standar yang telah diketahui. Marka protein yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 5. Persamaan garis linier ($y = ax + b$) didapatkan dengan cara memasukan data X dan data Y ke dalam kurva standar protein. Nilai logaritma sampel (y) didapatkan dengan memasukan nilai jarak sampel (x) ke dalam persamaan garis linier. Nilai logaritma sampel yang diperoleh kemudian di-anti LOG untuk mengetahui ukuran berat molekul protein yang sebenarnya.

Berdasarkan kurva standar protein pada pengulangan pertama, didapatkan persamaan linier $y = -0,972x + 2,125$ dan nilai $R^2 = 0,997$. Berat molekul protein rekombinan JTM-pGEX yang didapatkan dari persamaan tersebut sebesar ~33.4 kDa. Perhitungan berat molekul dan kurva standar protein pada pengulangan pertama dapat dilihat pada Lampiran 6. Pada ulangan kedua, didapatkan persamaan linier $y = -1,418x + 2,274$ dan nilai $R^2 = 0,988$. Berat molekul protein rekombinan JTM-pGEX yang didapatkan dari persamaan tersebut sebesar ~34.1 kDa. Perhitungan berat molekul dan kurva standar protein pada pengulangan kedua dapat dilihat pada Lampiran 7. Dari hasil persamaan linier $y = -1,331x + 2,306$ dan nilai $R^2 = 0,986$ pada kurva standar protein pengulangan ketiga, didapatkan berat molekul protein rekombinan JTM-pGEX sebesar ~34 kDa. Perhitungan berat molekul dan kurva standar protein pada pengulangan kedua dapat dilihat pada Lampiran 8.

Berdasarkan ketiga hasil perhitungan persamaan linier pada pengulangan 1, 2 dan 3, didapatkan perkiraan berat molekul protein rekombinan JTM-pGEX sebesar ± 34 kDa. Protein *Jembrana Transmembrane* (JTM) memiliki berat

molekul protein sebesar $\pm 40\text{-}42$ kDa (*full length*) (Lewis 2008: 33; Narayani *dkk.* 1996: 152; Burkala *dkk.* 1996: 150). Menurut Ditcham (2007: 73), protein JTM yang dapat digunakan sebagai bahan vaksin memiliki berat molekul sebesar ± 10 kDa (*truncated*). Tag GST yang digunakan memiliki berat molekul sebesar 26 kDa. Akan tetapi, tag GST yang berukuran relatif besar tersebut memiliki kekurangan yaitu struktur GST yang telah berfusi dengan protein rekombinan, mudah terdegradasi ketika dilakukan analisis protein dengan gel elektroforesis (Thermo scientific 2011: 1). Hal tersebut menyebabkan pita protein yang muncul pada hasil visualisasi dapat berada dibawah ukuran berat molekul sebenarnya (*full sized* = ± 36 kDa).



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Berdasarkan visualisasi dan kuantifikasi hasil solubilisasi, nilai kepadatan sel 0,4 dapat menghasilkan ekspresi protein rekombinan JTM-pGEX paling tinggi.
2. Berdasarkan visualisasi hasil *refolding*, nilai kepadatan sel 0,6 menghasilkan ekspresi protein rekombinan JTM-pGEX paling tinggi.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan *western blotting* untuk mendapatkan visualisasi ekspresi protein rekombinan JTM-pGEX yang lebih jelas.
2. Perlu dilakukan kuantifikasi pada hasil purifikasi protein rekombinan JTM-pGEX.

DAFTAR REFERENSI

- Amersham Bioscience. 2001. *Handbook: Protein purification*. Amersham plc., Sweden: 95 hlm.
- Amersham. 2009. *pGEX vector, GST gene fusion systems*. GE Healthcare Bio-Science, Sweden: 1 hlm.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 1990. *Current protocols in molecular biology*. Volume I. John Wiley & Sons, Inc., New York: xx + 1.0.1--9.9.3.
- Bio-Rad. 2001. *Mini-PROTEAN[®] 3 Cell: Instruction Manual*. Bio-Rad Laboratories, Inc., United States: 24 hlm.
- Bio-Rad. 2004. Standards for electrophoresis and blotting., Bio-Rad Laboratories, Inc., United States: 8 hlm.
- Brock, T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko & J. Parker. 1994. *Biology of microorganism*. 7th ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey: xvii + 909 hlm.
- Burkala, E., I. Narayani, & G.E. Wilcox. 1996. Expression of Recombinant Jembrana Disease Virus Env Protein in Escherichia coli. *ACIAR Proceeding 75*: 150—151.
- Campbell, N.A., J.B. Reece & L.G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Ed. Ke-5. Terj. dari *Biology*, 5th ed. Oleh Lestari, R., E.I.M. Adil, N. Anita, Andri, W.F. Wibowo & W. Manalu. Penerbit Erlangga, Jakarta: xxi + 438 hlm.
- Cann, A. 2009. Retroviruses. 8 April: 1 hlm.
<http://www.microbiologybytes.com/virology/Retroviruses.html>. 19 September 2011, pk 20.46.
- Caprette, D.R. 1995. Absorbance assay (280). 1 hlm.
<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/abs280.html>. 29 Oktober 2011, pk. 12.13.
- Capucino, J.G. & N. Sherman. 2002. *Microbiology: A laboratory manual*. 6th ed. Benjamins Cummings, San Fransisco: xvi + 491 hlm.
- Chadwick, B.J., R.J. Coelen, L.M. Sammels, G. Kertayadnya & G.E. Wilcox. 1995. Genomic sequence analysis identifies Jembrana disease virus as a new bovine lentivirus. *General virology 76*: 189--192.

- Chaudhuri, J.B. 1994. Refolding recombinant protein-protein chemistry vs protein engineering. *Elsevier Science*: 107--110.
- Chung, C.T., S.L. Niemela & R.H. Miller. 1989. One step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Biochemistry* **86**: 2172--2175.
- Copland, J.W. 1996. Bali Cattle: origins in Indonesia. *Dalam*: Wilcox, G.E., Soeharsono, S., Dharma, D.M.N. and Copland, J.W. 1997. *Jembrana disease and the bovine lentiviruses*. Watson Ferguson & Co., Brisbane: 42 hlm.
- De Bernardez, C.E. 1998. Refolding of recombinant protein. *Current opinion of biotechnology* **9**: 157--163.
- Deptan (=Departemen Pertanian). 2006. *Pedoman pengendalian Jembrana*. Direktorat Kesehatan Hewan, Jakarta: iii + 157 hlm.
- Dharma, D.M.N. 1996. The pathology of Jembrana disease. *ACIAR Proceeding*. **75**: 26--28.
- DirJen Peternakan RI (=Direktorat Jenderal Peternakan Republik Indonesia). 2008. 1 hlm. <http://www.ditjennak.go.id/berita.asp?id=47>. 10 September 2011, pk. 20.10.
- Ditcham, W. 2007. The development of recombinant vaccines against Jembrana disease. Skripsi-S2. Murdoch University, Perth: 200 hlm.
- EMBL(=European Molecular Biology Laboratory). 2011. Protein purification, extraction and clarification. 1 hlm. http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/extraction_clarification/invitro_denaturation_refolding/. 6 Oktober 2011, pk. 22.13.
- 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. 10 Februari 2011, pk. 20.54.
- GE Healthcare. 2008. Gluthationed Sepharose 4B. 26 hlm. www.gelifesciences.com/protein-purification. 16 November 2011, pk. 22.44.

- Farabee, M.J. 2007. Control of gene expression. 1 hlm.
<http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/biobookgenctrl.html>. 17 November 2011, pk. 21.21.
- Frank, C. 2011. SDS-PAGE (polyacrilamid gel electrophoresis). 1 hlm.
http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/sdspage.html. 14 September 2011, pk. 13.16.
- Gallagher, S.R. 1995. One-dimentional 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 Willey & Sons, Inc., Washington: 10.1.1--10.1.34.
- Guthrie, T. 2005. Cell lysis method protocol. 3 hlm.
<http://www.molecularstation.com/cell/cell-lysis/>. 3 Oktober 2011, pk. 23.37.
- Hartiningsih, N. 2003. Review virus Jembrana bentuk natif, susunan genetik dan variasinya. *Buletin veteriner* **15**(63): 38--42.
- Hedhammar, M., A.E. Karlstrom & S. Hober. 2006. *Chromatographic methods for protein purification*. Departement of Biotechnology Albanova University, Stockholm: 31 hlm.
- Invitrogen. 2010. BL21 Star(DE3) One Shot, BL21 Star (DE3) pLysS One Shot, Chemically Competent Cells. 24 hlm. <http://www.invitrogen.com>. 11 Februari 2011, pk. 20.45.
- Jenkins, J.B. 1990. *Human genetics*. 2nd ed. Harper Collins Publishers, Inc., New York: xv + 544 hlm.
- King, M.W. 2011. Control of gene expression. 27 Oktober: 12 hlm.
<http://themedicalbiochemistrypage.org/gene-regulation.html>. 7 November 2011, pk. 9.40.
- Lewis, J. 2008. Recombinant proteins as vaccines and diagnostic antigens for the control of Jembrana disease virus infection in Indonesia. Skripsi-S2. Murdoch University, Perth: 164 hlm.
- Lilie, H., E. Schwarz & R. Rudolf. 1998. Advances in refolding of proteins produces in *E. coli*. *Biotechnology* **9**: 497--501.
- Lodish, H.F. 2004. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. W.H Freeman and Company, New York: 973 hlm.

- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap & D.P. Clark. 2009. *Brock: Biology of microorganism*. Pearson Benjamin Cummings publishing Inc., San Fransisco: xxviii + A-12 + G-17 + I-36 hlm.
- Margawati, E.T., A. Utama, & Indriawati. 2007a. Re-konstruksi Jembrana Tat (J-Tat) kedalam plasmid pET-21b mengandung *6his-tag*. *Prosiding seminar nasional bioteknologi*: 145--149.
- Margawati, E. T., A. Utama, W. Probawasito, Indriawati, M. Ridwan, & N. Hasanah. 2007b. Pengembangan vaksin Jembrana berbasis protein rekombinan J-Tat dengan fusi *His-Tag*. Laporan akhir kumulatif kegiatan program kompetitif LIPI tahun anggaran 2006-2007. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong: 30 hlm.
- Margawati, E.T. & M. Ridwan. 2009. Expression and characterization of recombinant protein of J-SU pGEX either by single or double cell lysis. *Biota* **14**(3): 166--171.
- Martien, R., A. Kusumawati., & J.S Widada. 2007. Ekspresi protein rekombinan dari gen *gag-ca* sebagai calon vaksin penyakit Jembrana. Program pascasarjana Universitas Gajah Mada, Yogyakarta: 21 hlm.
- McGraw-Hill. 2002. Pokeweed Antiviral Protein. Maret: 1 hlm.
http://www.mhhe.com/biosci/pae/botany/botany_map/articles/article_46.html
. 22 Maret 2011, pk. 23.02.
- Miesfeld, R.L. 2000. Lecture 4 - E. coli host and plasmid biology. 4 September: 4 hlm.<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture4/Lecture4.html>. 7 November 2011, pk. 9.39.
- MolecularHUB. 2011. SDS-PAGE: principle and procedure. 18 Januari: 1 hlm.
<http://molecularhub.com/sds-page-principle-and-procedure/>. 12 Maret 2011, pk. 22.48.
- Muhaimin, Oei Ban Liang, 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.

- Narayani, I., E. Burkala & G.E. Wilcox. 1996. Cloning and expression of Jembrana disease and bovine immunodeficiency virus pada sapi Bali. *ACIAR Proceeding* **75**: 152--153.
- Ni Ketut Suwiti. 2009. Fenomena Jembrana disease dan bovine immunodeficiency virus pada sapi Bali. *Udayana* **1**(1): 21--25.
- Paolella, P. 1998. *Introduction to molecular biology*. McGraw-Hill Companies, Inc., Boston: xiii + 241 hlm.
- Pommier, Y., A.A. Johnson, & C. Marchand. 2005. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nature* (4): 236--248.
- Prescott, L.M. 2002. *Microbiology. 5th ed.* The McGraw-Hill Companies, San Fransisco. xxvi + 1026 hlm.
- Promega. 2009. *E. coli competent cells*. Promega corporation, New York: 8 hlm.
- Putra, A.A.G & K. Sulistiyana. 1995. Penularan penyakit Jembrana: peranan serangga penghisap darah. Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional VI, Denpasar: 7 hlm.
- Radji, M. 2010. *Imunologi & Virologi*. PT. ISFI Penerbitan, Jakarta: x + 323 hlm.
- Robert, K.J. 2006. Regulation. 1 hlm.
<http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%207/regulation.html>. 11 November 2011, pk. 11.51.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 18.136 + A. 14.1 + R.22 + 1.44 hlm.
- Shaw, G. 2011. SDS-PAGE. 4 hlm. <http://www.encorbio.com/protocols/SDS-PAGE.htm>. 12 Februari 2011, pk.13.15.
- Sciencebiotech. 2011. Transformasi. 1 hlm. <http://www.Sciencebiotech.net>. 28 September 2011, pk. 12.08.
- Singh, S.M & A.K. Panda. 2005. Review: Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *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. & I G.N.T. Temadja. 1996. The occurrence and History of Jembrana Disease in Indonesia. *ACIAR Proceeding*. **75**: 2--4.

- Stratagene. 2001. *BL21(DE3) competent cells, BL21(DE3) pLysS component cells, and BL21 competent cells*. Stratagene, California: 15 hlm.
- Thermo scientific. 2009. *Cell lysis technical handbook: version 2*. Thermo Fisher Scientific, Inc., United States: 50 hlm.
- Thermo scientific. 2011. GST- tagged protein. 1 hlm.
<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4A8ADF29-5056-8A76-4EC6-63375BA024E7>. 19 Desember 2011, pk. 23.30.
- Thulasiraja, S. 2007. Retroviridae: The study of a virus family. 9 hlm.
http://tolweb.org/treehouses/?treehouse_id=4426. 11 Februari 2011, pk. 22.04.
- Tsumoto, K., E. Daijima, I. Kumagai, & T. Arakawa. 2003. Practical consideration in refolding proteins from inclusion bodies. *Academic*. **28**: 1--8.
- Wilcox, G.E., M. Desport, A. Hughes, S. Peterson, J. Rachmat, I.W.M. Tenaya, T. McNab, & A.Ducki. 2009. Virus Jembrana. 1 hlm.
www.vetbiomed.murdoch.edu.au/research/virology. 5 Januari, pk.19.22
- Williams, L. 2011. SDS gel. 1 hlm.
[http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse Information/4581/techniques/gel elect/gel.jpg](http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse%20Information/4581/techniques/gel%20elect/gel.jpg). 12 Februari 2011. pk. 13.17.
- Wolfe, S. L. 1995. *Introduction to cell and molecular biology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont: xvii + 820 hlm.
- Yancoupolus, B. 1999. *Methods for cloning and analysis of eukaryotic genes*. Jones and Barlett publishers, inc., Boston: xii + 324 hlm.
- Yuwono, T. 2002. *Biologi molekular*. Erlangga, Jakarta: xiii + 269 hlm.
- Zhiming T., Guangyuan H., Kexiu X.L., Mingjie J.C., Junli C., Ling C., Qing Y., Dongping P.L., Huan Y., Jiantao S., & Xuqian W. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmidtransformation using different *Escherichia coli* strains. *Biotechnology* **8**(1): 114--120.

Lampiran 1
Skema kerja penelitian



Lampiran 2

Pembuatan larutan dan *buffer*

Larutan/Buffer	Cara Pembuatan
PBS <i>buffer</i>	Sebanyak 4,090 g 140 mM NaCl; 0,100 g 2,7 mM KCL; 0,709 g 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 0,122 g 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ditambahkan ddH ₂ O hingga volume mencapai 500 ml. Larutan kemudian diaduk. Ukur pH larutan dan disimpan dalam suhu 4°C.
10% SDS	Sebanyak 5 g SDS ditambahkan ddH ₂ O hingga volume 50 ml. larutan diaduk perlahan dengan <i>magnetic stirrer</i> hingga larut dan berwarna bening. Larutan disimpan pada suhu ruang.
5x SDS <i>running</i> pH 8.3	Sebanyak 9 g Tris; glisine 43,2 g; SDS 3 g ditambahkan ddH ₂ O hingga mencapai volume 600 ml. Larutan diaduk, kemudian disimpan didalam suhu 4°C.
<i>Coomasie blue stain for proteins</i>	Sebanyak 0,25 g <i>coomasie brilliant blue</i> ; 225 ml methanol; 50 ml <i>glacial acetic acid</i> ditambahkan ddH ₂ O hingga mencapai volume 225 ml
<i>Destain coomasie blue</i>	Sebanyak 100 ml <i>glacial acetic acid</i> ; 400 ml methanol ditambahkan ddH ₂ O hingga volume 1000 ml. Larutan diaduk dan disimpan pada suhu ruang.
0,5 M Tris pH 6.8	Sebanyak 6,057 g Tris ditambahkan ddH ₂ O hingga 100 ml. Larutan diaduk, kemudian ukur pH dengan menggunakan pH meter dan disimpan dalam suhu 4°C.
1,5 M Tris pH 8.8	Sebanyak 18,171 g Tris ditambahkan ddH ₂ O hingga 100 ml. Larutan diaduk, kemudian ukur pH dengan menggunakan pH meter dan disimpan dalam suhu 4°C.
50 mM DTT	Sebanyak 0,0771 g DTT ditambahkan 10 ml akuades steril. Kemudian larutan di- <i>aliquot</i> ke tabung eppendorf 1,5 ml masing-masing 1 ml. Simpan pada suhu -20°C.

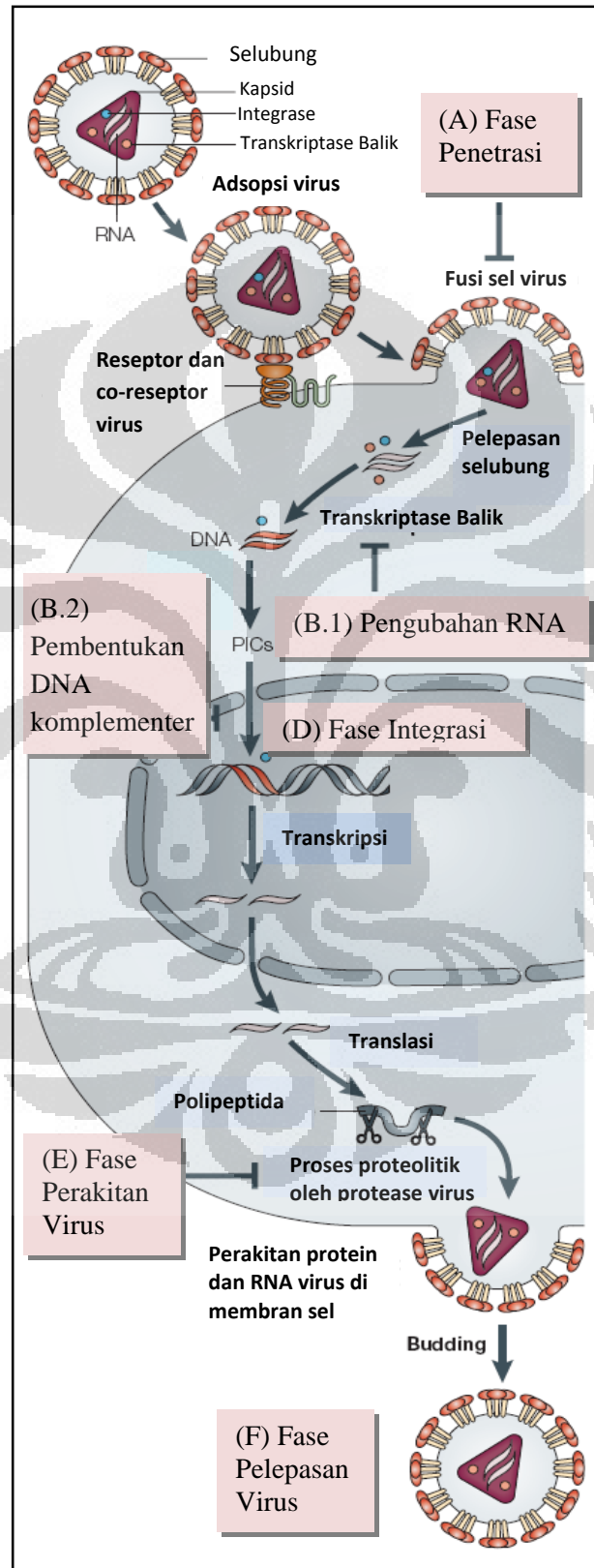
(Lanjutan)

<i>Washing buffer</i> (200 ml)	Sebanyak 0,372 g EDTA dimasukan ke dalam 100 mM Tris-HCl pH 8 sebanyak 100 ml, kemudian ditambahkan 2 ml Triton X-100. Selanjutnya 100 mM Tris-HCl pH 8 ditambahkan kembali hingga volume mencapai 200 ml. Larutan diaduk hingga bening.
<i>Solubilized buffer</i> (10 ml)	Sebanyak 1,2 g urea; 0,03 g DTT; 100 µl PMSF dimasukan ke dalam 2M Tris pH 12 sebanyak 5 ml. Selanjutnya ditambahkan kembali 2M Tris pH 12 hingga volume mencapai 10 ml. Larutan diaduk hingga bening.
<i>Dilution buffer</i> (200 ml)	Sebanyak 0,01 g CHAPS; 50 mM DTT 2 ml dimasukan ke dalam 20 mM Tris-pH 8 sebanyak 100 ml. Selanjutnya ditambahkan kembali 20 mM Tris-pH 8 hingga volume mencapai 200 ml. Larutan diaduk hingga bening.

[Sumber : Ausubel *dkk.* 1990: A.2.3; Sambrook & Russel 2001: A 1.1--A. 2.12.]

Lampiran 3

Mekanisme replikasi retrovirus



[Sumber: Pommier *dkk.* 2005: 237, dengan modifikasi.]

Lampiran 4

Perhitungan kuantifikasi protein rekombinan JTM-pGEX hasil solubilisasi

❖ RUMUS

$$\text{Konsentrasi protein (mg/ml)} = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

❖ PERHITUNGAN

Pengulangan 1

$$(S_{0,4}) \rightarrow A_{280} = 1,608; A_{260} = 1,124$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi protein} &= (1,55 \times 1,608) - (0,76 \times 1,124) \\ &= 2,492 - 0,854 \\ &= 1,638 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

$$(S_{0,6}) \rightarrow A_{280} = 0,847; A_{260} = 0,716$$

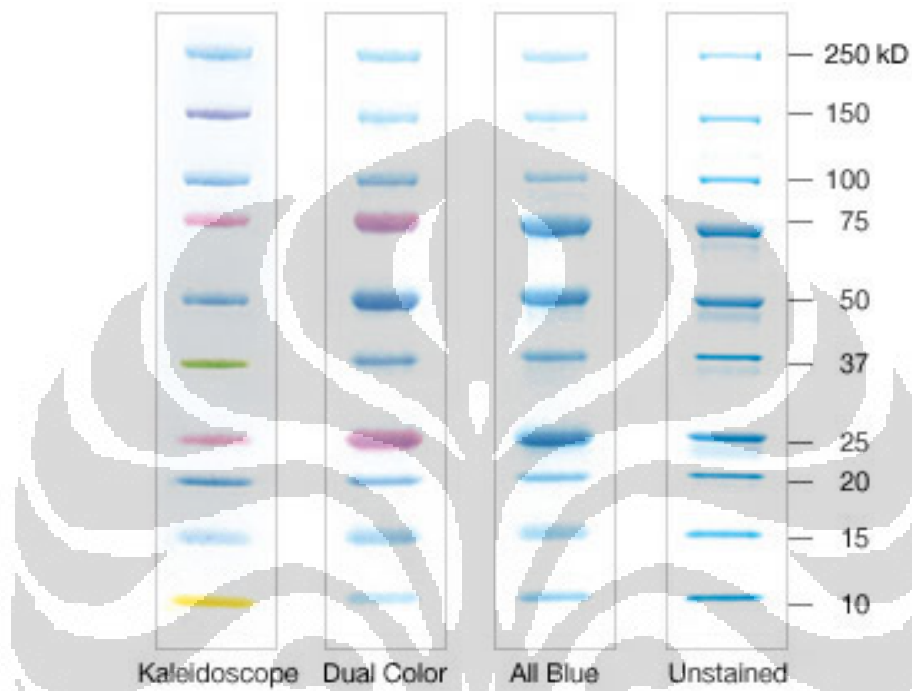
$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi protein} &= (1,55 \times 0,847) - (0,76 \times 0,716) \\ &= 1,312 - 0,544 \\ &= 0,769 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

$$(S_{0,8}) \rightarrow A_{280} = 1,118; A_{260} = 1,077$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi protein} &= (1,55 \times 1,118) - (0,76 \times 1,077) \\ &= 1,732 - 0,818 \\ &= 0,914 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

[Sumber: Caprette 1995: 1]

Lampiran 5

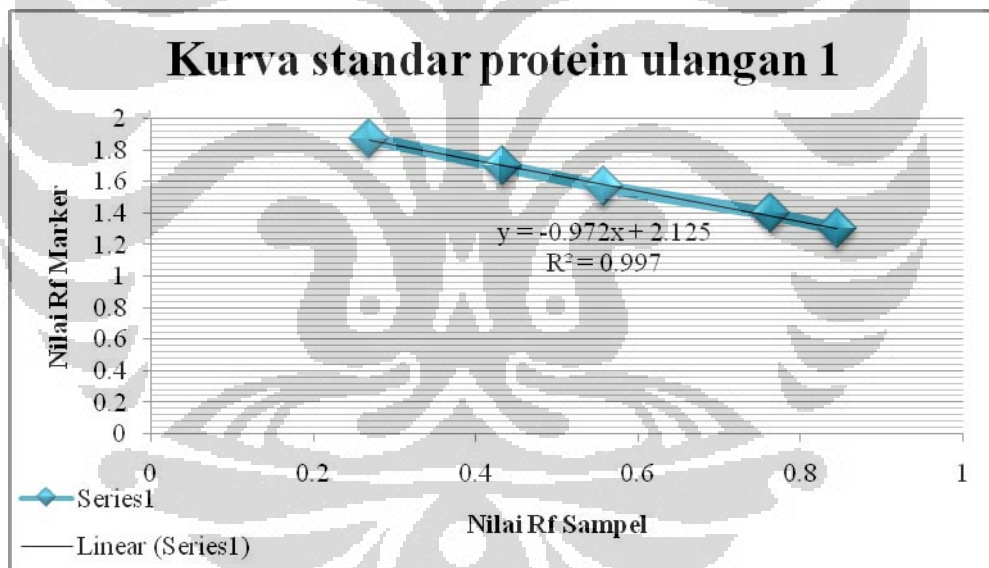
Marka Protein *Bio-Rad*

Marka protein *Bio-Rad* (*Dual color*) yang digunakan dalam penelitian
[Sumber: Bio-Rad 2004: 3]

Lampiran 6

Perhitungan berat molekul dan kurva standar protein rekombinan JTM-pGEX
(pengulangan 1)

Berat Molekul Marka Protein (<i>Bio Rad- dual color</i>)	Jarak migrasi (JM) marka protein	Total migrasi l (TM) sampel	JM/TM (Data X)	Log marker (Data Y)
75	1.3	4.85	0.268041	1.875
50	2.1	4.85	0.43299	1.698
37	2.7	4.85	0.556701	1.568
25	3.7	4.85	0.762887	1.397
20	4.1	4.85	0.845361	1.301



⌘ Persamaan linier pengulangan 1

$$y = -0,972x + 2,215$$

$$y = -0,972(0,618) + 2,215$$

$$y = 1,524304$$

$$\text{anti-LOG} = \sim 33,4 \text{ kDa}$$

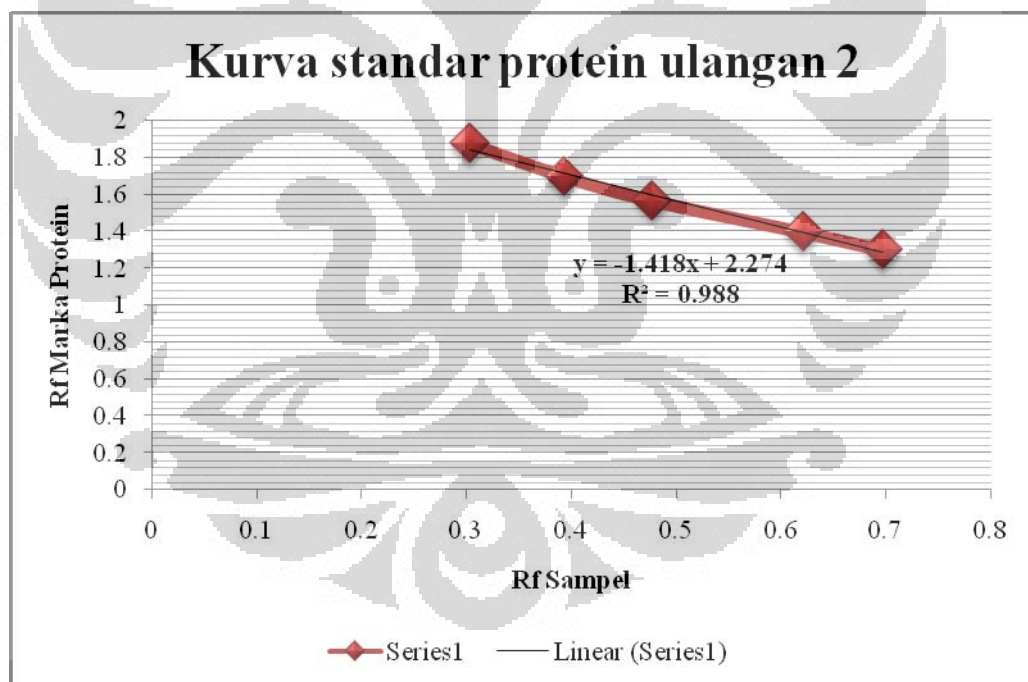
Nilai x = jarak migrasi
sampel : total migrasi
sampel

$$x = 3 / 4,85 = 0,6185$$

Lampiran 7

Perhitungan berat molekul dan kurva standar protein rekombinan JTM-pGEX
(pengulangan 2)

Berat Molekul Marka Protein (<i>Bio Rad- dual color</i>)	Jarak migrasi (JM) marka protein	Total migrasi 1 (TM) sampel	JM/TM (Data X)	Log marker (Data Y)
75	2	6.6	0.30303	1.875
50	2.6	6.6	0.393939	1.698
37	3.15	6.6	0.477273	1.568
25	4.1	6.6	0.621212	1.397
20	4.6	6.6	0.69697	1.301



⌘ Persamaan linier pengulangan 2

$$y = -1,418x + 2,274$$

$$y = -1,418(0,5227) + 2,274$$

$$y = 1,532773$$

$$\text{anti-LOG} = \sim 34,1 \text{ kDa}$$

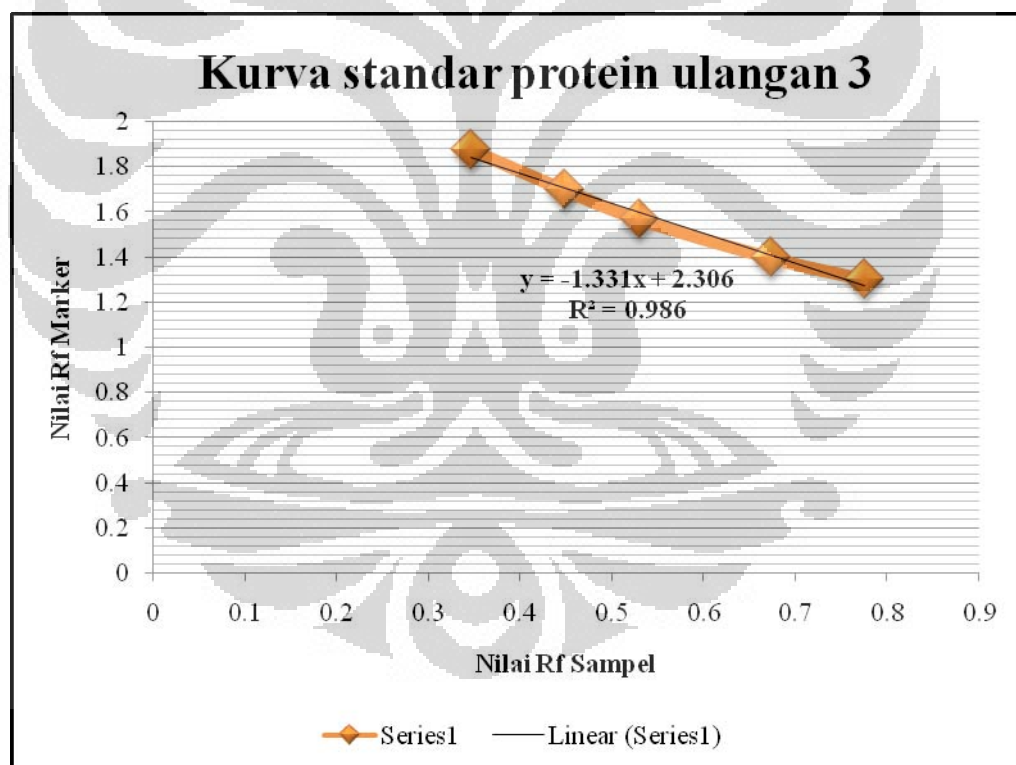
Nilai x = jarak migrasi
sampel : total migrasi
sampel

$$x = 3,45/6,6 = 0,5227$$

Lampiran 8

Perhitungan berat molekul dan kurva standar protein rekombinan JTM-pGEX
(pengulangan 3)

Berat Molekul Marka Protein (<i>Bio Rad- dual color</i>)	Jarak migrasi (JM) marka protein	Total migrasi l (TM) sampel	JM/TM (Data X)	Log marker (Data Y)
75	1.7	4.9	0.346939	1.875
50	2.2	4.9	0.44898	1.698
37	2.6	4.9	0.530612	1.568
25	3.3	4.9	0.673469	1.397
20	3.8	4.9	0.77551	1.301



⌘ Persamaan linier pengulangan 3

$$y = -1,331x + 2,306$$

$$y = -1,331(0,5816) + 2,306$$

$$y = 1,53147$$

$$\text{anti-LOG} = \sim 34 \text{ kDa}$$

Nilai x = jarak migrasi
sampel : total migrasi
sampel

$$x = 2,85/4,9 = 0,5816$$