



UNIVERSITAS INDONESIA

**PRODUKSI DAN PURIFIKASI PROTEIN
*HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULATING
FACTOR* DARI *Pichia pastoris* REKOMBINAN**

SKRIPSI

**ENNY RIMITA SEMBIRING
0806364542**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PRODUKSI DAN PURIFIKASI PROTEIN
*HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULATING
FACTOR* DARI *Pichia pastoris* REKOMBINAN**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi

**ENNY RIMITA SEMBIRING
0806364542**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Enny Rimita Sembiring

NPM : 0806364542

Tanda Tangan : 

Tanggal : 19 Januari 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Enny Rimita Sembiring
NPM : 0806364542
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Produksi dan Purifikasi Protein *Human Granulocyte Colony Stimulating Factor* dari *Pichia pastoris* Rekombinan

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Herman Suryadi, MS., Apt.


(.....)

Pembimbing II : Dr. Asrul M. Fuad, M.Si.


(.....)

Penguji : Prof. Dr. Maksum Radji, M.Biomed., Apt. (.....)



Penguji : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc., Apt.


(.....)

Penguji : Dra. Rosmala Dewi, Apt.

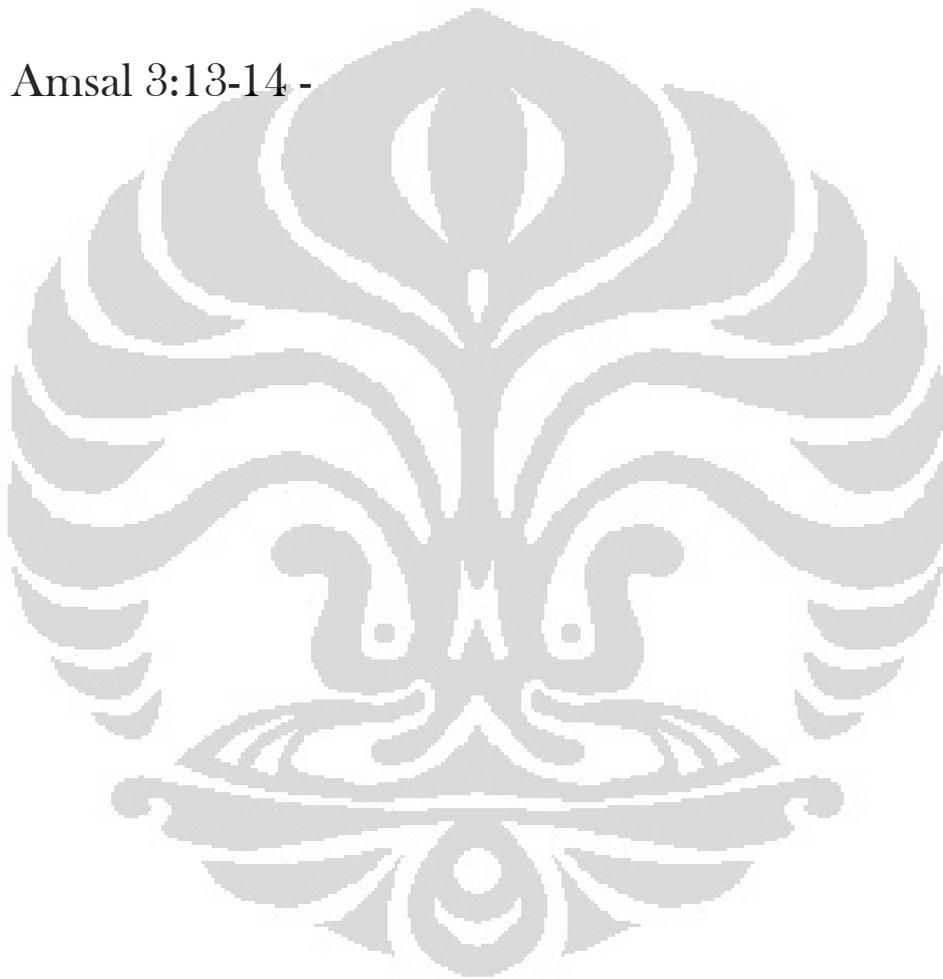

(.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 19 Januari 2012

“Berbahagialah orang yang mendapat hikmat, orang yang memperoleh kepandaian, karena keuntungannya melebihi keuntungan perak dan hasilnya melebihi emas”

- Amsal 3:13-14 -



*Kupersembahkan kepada
Bapak dan Mamaku tercinta*

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur dan terima kasih penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas kasih karunia dan berkatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Penulisan skripsi dengan judul Produksi dan Purifikasi Protein *Human Granulocyte Colony Stimulating Factor* dari *Pichia pastoris* Rekombinan ini diajukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sangatlah sulit untuk dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu secara khusus penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Herman Suryadi, MS., Apt. selaku pembimbing I atas segala pengarahan, bimbingan, ilmu serta dukungan moril selama penelitian dan penyusunan hingga terselesaikannya skripsi ini.
2. Bapak Dr. Asrul M. Fuad, M.Si selaku pembimbing II atas segala bimbingan, bantuan, ilmu, motivasi dan dukungan dana berupa kesempatan dalam mengerjakan proyek penelitian di laboratorium Rekayasa Protein dan Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI.
3. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt. selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
4. Ibu Dra. Azizahwati, MS., Apt. selaku Ketua Program Studi Ekstensi Farmasi, Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melakukan penelitian di luar kampus UI.
5. Bapak Dr. Satya Nugroho selaku Kepala Bidang Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI yang telah memberikan izin dan kesempatan melanjutkan pendidikan bidang Farmasi di Departemen Farmasi FMIPA UI.
6. Ibu Dra. Retnosari Andrajati, MS., Ph.D., Apt. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan nasehat, saran dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
7. Seluruh staf laboratorium Rekayasa Protein dan Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Mbak Ai Hertati, Mbak Aminah, Mbak Dian, Yona, Mbak Goli dan Pretty yang telah membantu penelitian ini.

8. Seluruh staf laboratorium Kelompok Penelitian Padi, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI yang telah membantu dalam peminjaman alat dan bahan, terutama Ibu Dr. Enung S.M., M.Si. dan Ibu Dr. Syamsidah Rahmawati, M.Si.
9. Seluruh staf pengajar, laboran dan karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI.
10. Bapak, Mama, adik-adikku Natalia dan David tercinta atas segala doa, motivasi, semangat dan dukungan yang tak henti-hentinya.
11. Teman-teman di laboratorium Rekayasa Protein dan Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Maya dan Rithami atas keceriannya.
12. Sahabat-sahabatku terutama Tiarta, Kak Meyland, Kak Nova, Mbak Eva, Mario, Rosandi dan Eko atas bantuan, semangat, saran, nasehat dan doa.
13. Mbak-mbakku di Mess Putri Bioteknologi, terima kasih atas pengertian dan bantuannya selama ini, terutama Mbak Ita.
14. Seluruh rekan-rekan Farmasi Ekstensi 2008, terutama rekan-rekan seperjuanganku, Ratna, Melisa, Roselyndiar, Fitri, Riza, Nori dan Mbak Era.
15. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga terselesaikannya skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun, baik dari segi ilmiah maupun penulisannya.

Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya bidang Farmasi.

Penulis

2012

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

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

Nama : Enny Rimita Sembiring
NPM : 0806364542
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
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:

Produksi dan Purifikasi Protein *Human Granulocyte Colony Stimulating Factor* dari *Pichia pastoris* Rekombinan

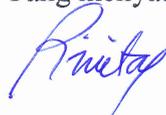
Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia bebas menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 19 Januari 2012

Yang menyatakan



(Enny Rimita Sembiring)

ABSTRAK

Nama : Enny Rimita Sembiring
Program Studi : Farmasi
Judul : Produksi dan Purifikasi Protein *Human Granulocyte Colony Stimulating Factor* dari *Pichia pastoris* Rekombinan

Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) merupakan faktor pertumbuhan hematopoetik yang berfungsi merangsang proliferasi dan diferensiasi neutrofil. Protein G-CSF rekombinan yang dikembangkan dan diproduksi menggunakan sel inang *Escherichia coli* dan *Chinese Hamster Ovary* (CHO) masih memiliki kelemahan, sehingga pada penelitian ini dikembangkan suatu produk biosimilar G-CSF rekombinan menggunakan sel inang *Pichia pastoris*. Fokus penelitian ini adalah memproduksi dan mempurifikasi protein G-CSF rekombinan. Produksi protein rekombinan dilakukan dengan menginduksi kultur menggunakan metanol konsentrasi 0,5% tiap 12 jam dan dilakukan sampling terhadap kultur pada jam ke-0, 12, 24, 36 dan 48. Hasil analisis *western blot* menunjukkan adanya peningkatan produksi protein rekombinan tiap 12 jam. Protein G-CSF rekombinan dipresipitasi menggunakan amonium sulfat konsentrasi 80%, kemudian didialisis. Konsentrasi protein total diukur dengan spektrofotometer menggunakan metoda Bicinchoninic Acid (BCA). Hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi protein total tertinggi adalah sampel protein yang dipresipitasi dengan 80% amonium sulfat. Selanjutnya, purifikasi dilakukan menggunakan teknik kromatografi afinitas dengan resin Ni-NTA. Hasil analisis SDS PAGE menunjukkan protein G-CSF rekombinan berukuran 18,5 kDa dan dengan analisis *slot blot* terdeteksi berwarna ungu.

Kata Kunci : *Pichia pastoris*, *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF), produksi protein, kromatografi afinitas.

xv + 77 halaman : 11 gambar; 28 lampiran

Daftar Pustaka : 67 (1985 – 2011)

ABSTRACT

Name : Enny Rimita Sembiring
Program Study : Pharmacy
Judul : Production and Purification Protein of Human granulocyte
Colony Stimulating Factor from Recombinant *Pichia pastoris*

Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) is a hematopoietic growth factor that acts to stimulate neutrophilic proliferation and differentiation. Recombinant protein G-CSF developed and produced using cellular host *Escherichia coli* and Chinese hamster ovary (CHO) still has a weakness, so that in this study we developed a biosimilar product of recombinant G-CSF using cellular host *Pichia pastoris*. The aim of this research was to produce and purify recombinant protein G-CSF. Production of recombinant protein was done by inducing culture with methanol 0.5% every 12 hours and sampling was carried out at 0, 12, 24, 36 and 48 hours. The results of western blot analysis showed an increase the production of recombinant protein every 12 hours. Recombinant protein G-CSF was precipitated using ammonium sulfate 80% of concentration, and then dialyzed. Concentration of total protein was measured by a spectrophotometer using the Bicinchoninic Acid (BCA) method. The measurement results showed the highest concentrations of total protein was present in samples that precipitated with 80% ammonium sulfate. Furthermore, purification performed using affinity chromatography techniques with Ni-NTA resin. The results of SDS PAGE analysis showed the recombinant protein G-CSF sized 18.5 kDa and with a slot blot analysis detected a purple color.

Keywords : *Pichia pastoris*, Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), production protein, affinity chromatography.

xv + 77 pages : 11 pictures; 28 appendixes

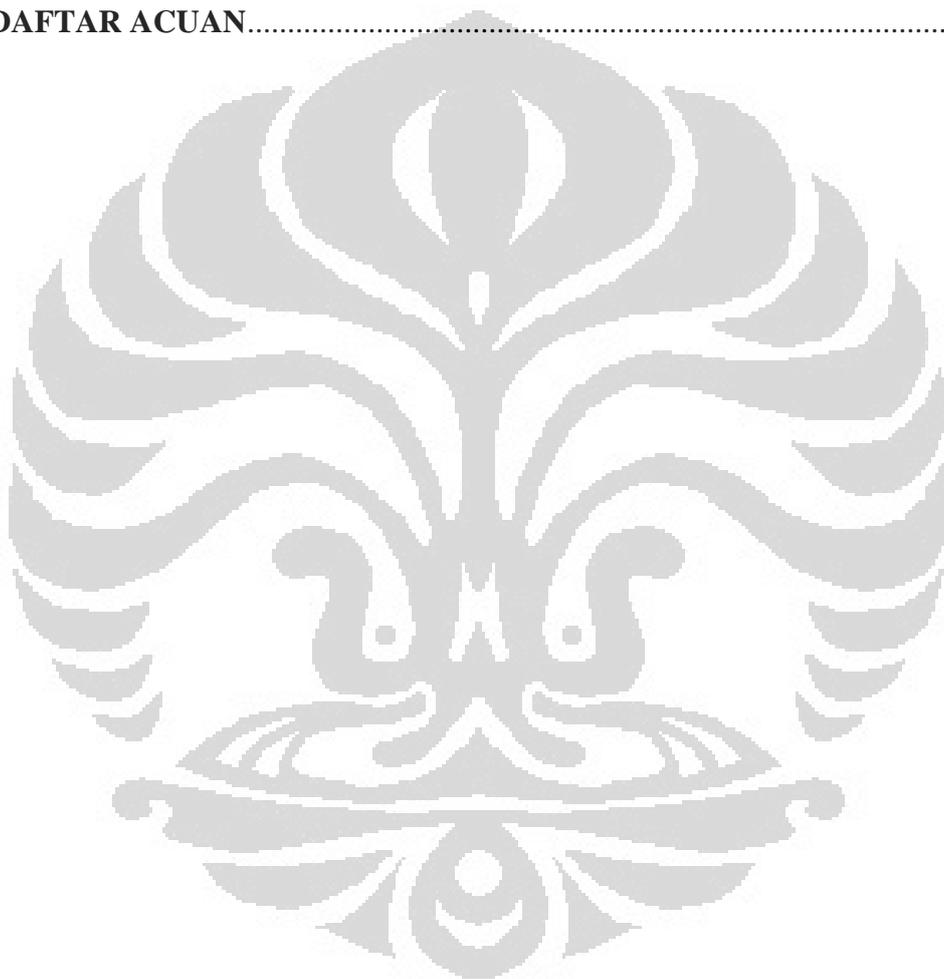
Bibliography : 67 (1985 – 2011)

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 | xiii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiv |
| BAB 1 PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Tujuan Penelitian..... | 3 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1. Sistem Ekspresi <i>P. pastoris</i> | 4 |
| 2.2. Galur Ekspresi <i>P. pastoris</i> | 5 |
| 2.3. Vektor Ekspresi pPICZa | 6 |
| 2.4. <i>Human Granulocyte Colony Stimulating Factor</i> (hG-CSF) | 8 |
| 2.5. Neutropenia | 9 |
| 2.6. Presipitasi Protein..... | 10 |
| 2.7. Dialisis Protein | 11 |
| 2.8. Elektroforesis Gel Poliakrilamid (SDS PAGE) | 12 |
| 2.9. Kromatografi Afinitas | 13 |
| 2.10. <i>Immunoblotting</i> | 15 |
| 2.11. Pengukuran Konsentrasi Protein Menggunakan Metoda Bicinchoninic Acid (BCA)..... | 16 |
| BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN | 17 |
| 3.1. Lokasi Penelitian | 17 |
| 3.2. Bahan..... | 17 |
| 3.2.1 Mikroorganisme | 17 |
| 3.2.2 Medium | 17 |
| 3.2.3 Bahan Kimia/Reagen..... | 17 |
| 3.3. Alat..... | 18 |
| 3.4. Pembuatan Medium..... | 19 |
| 3.4.1 <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> (YPD) Agar | 19 |
| 3.4.2 <i>Buffered Glycerol-complex Medium</i> (BMGY) Cair..... | 19 |
| 3.4.3 <i>Buffered Methanol-complex Medium</i> (BMMY) Cair | 20 |
| 3.5. Cara Kerja | 20 |
| 3.5.1 Pemiakan Kultur <i>P. pastoris</i> | 20 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.5.2 | Produksi Sel <i>P. pastoris</i> dan Produksi Protein G-CSF Rekombinan Skala Kecil | 20 |
| 3.5.3 | Pengamatan Sel <i>P. pastoris</i> Secara Mikroskopis | 21 |
| 3.5.4 | Pengukuran Berat Kering Sel | 22 |
| 3.5.5 | Presipitasi Protein G-CSF Rekombinan yang Diinduksi Menggunakan Metanol 0,5% Tiap 12 Jam dengan Larutan <i>Trichloroacetic Acid</i> (TCA) | 22 |
| 3.5.6 | Analisis Ekspresi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan Elektroforesis Gel Poliakrilamid (SDS PAGE)..... | 23 |
| 3.5.7 | Analisis Ekspresi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan <i>Western Blot</i> | 24 |
| 3.5.8 | Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan | 26 |
| 3.5.8.1 | Presipitasi Protein G-CSF Rekombinan dengan Beberapa Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat | 26 |
| 3.5.8.2 | Dialisis Protein G-CSF Rekombinan Hasil Presipitasi dengan Amonium Sulfat..... | 26 |
| 3.5.8.3 | Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan dengan Teknik Kromatografi Afinitas Menggunakan Resin Ni-NTA | 27 |
| 3.5.9 | Penentuan Protein Total Menggunakan Metoda Bicinchoninic Acid (BCA)..... | 28 |
| 3.5.10 | Analisis Hasil Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan Elektroforesis Gel Poliakrilamid (SDS PAGE)..... | 29 |
| 3.5.11 | Analisis Hasil Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan <i>Slot Blot</i> | 29 |
| BAB 4 | HASIL DAN PEMBAHASAN | 31 |
| 4.1 | Pembiakan Kultur <i>P. pastoris</i> | 31 |
| 4.2 | Produksi Sel <i>P. pastoris</i> dan Produksi Protein G-CSF Rekombinan Skala Kecil | 31 |
| 4.3 | Pengamatan Sel <i>P. pastoris</i> Secara Mikroskopis | 34 |
| 4.4 | Pengukuran Berat Kering Sel..... | 34 |
| 4.5 | Presipitasi Protein G-CSF Rekombinan yang Diinduksi Menggunakan Metanol 0,5% Tiap 12 Jam dengan Larutan <i>Trichloroacetic Acid</i> (TCA) | 35 |
| 4.6 | Analisis Ekspresi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan Elektroforesis Gel Poliakrilamid (SDS PAGE) | 36 |
| 4.7 | Analisis Ekspresi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan <i>Western Blot</i> | 38 |
| 4.8 | Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan | 40 |
| 4.8.1 | Presipitasi Protein G-CSF Rekombinan dengan Beberapa Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat..... | 40 |
| 4.8.2 | Dialisis Protein G-CSF Rekombinan Hasil Presipitasi dengan Amonium Sulfat..... | 41 |
| 4.8.3 | Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan dengan Teknik Kromatografi Afinitas Menggunakan Resin Ni-NTA..... | 42 |

| | | |
|---|---|----|
| 4.9 | Penentuan Protein Total Menggunakan Metoda Bicinchoninic Acid (BCA) | 44 |
| 4.10 | Analisis Hasil Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan Elektroforesis Gel Poliakrilamid (SDS PAGE)..... | 46 |
| 4.11 | Analisis Hasil Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan <i>Slot Blot</i> | 47 |
| BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN | | 49 |
| 5.1 | Kesimpulan..... | 49 |
| 5.2 | Saran..... | 49 |
| DAFTAR ACUAN | | 50 |



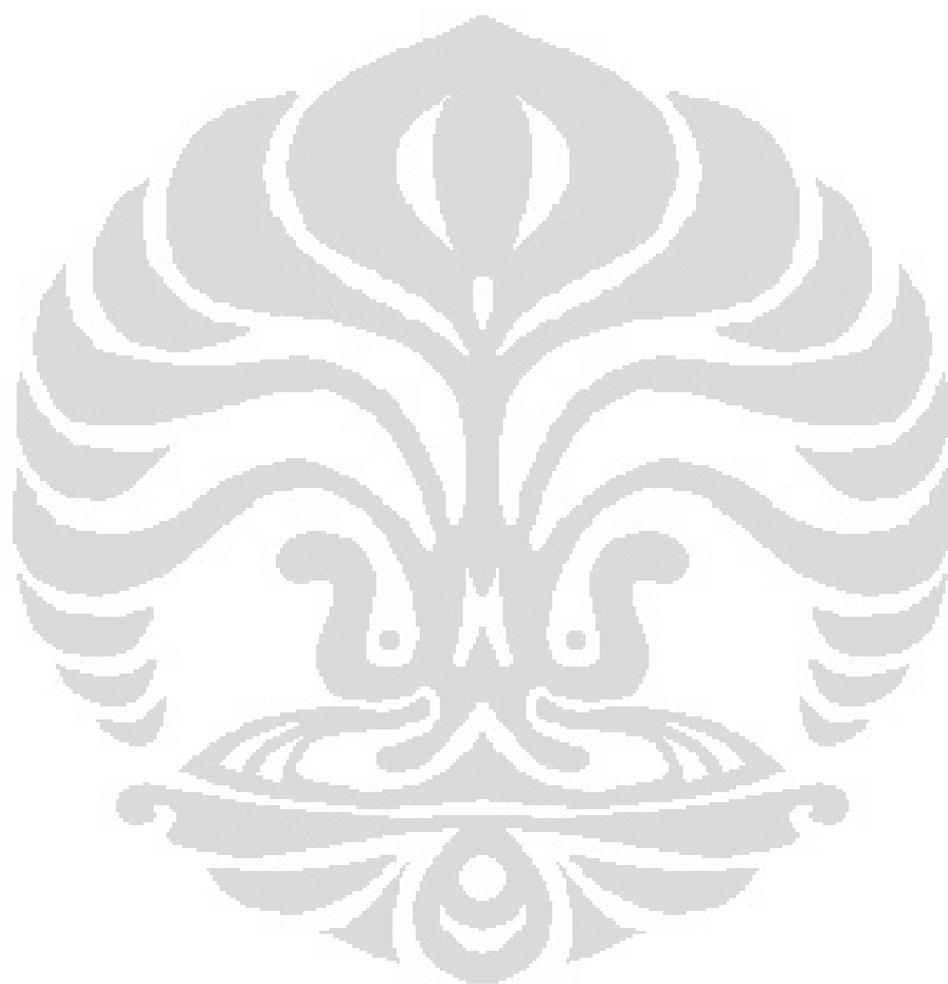
DAFTAR GAMBAR

| | | |
|------------|--|----|
| Gambar 2.1 | Peta vektor pPICZ α (Invitrogen, 2004b)..... | 7 |
| Gambar 2.2 | Lokasi gen CSF3 pada kromosom nomor 17 lokus q21-q22 (GeneCard, 2011)..... | 8 |
| Gambar 2.3 | Diagram pita rhG-CSF menggunakan program MOLSCRIPT (Hill, C.P., Oslund, T.D., & Eisenberg, D., 1993) | 9 |
| Gambar 4.1 | Morfologi sel <i>P. pastoris</i> dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali..... | 34 |
| Gambar 4.2 | SDS PAGE ekspresi protein G-CSF rekombinan yang diinduksi menggunakan metanol konsentrasi 0,5% tiap 12 jam | 37 |
| Gambar 4.3 | <i>Western Blot</i> ekspresi protein G-CSF rekombinan yang diinduksi menggunakan metanol konsentrasi 0,5% tiap 12 jam ... | 39 |
| Gambar 4.4 | SDS PAGE hasil presipitasi protein G-CSF rekombinan dengan amonium sulfat konsentrasi 40%, 60% dan 80% | 42 |
| Gambar 4.5 | Kurva kalibrasi <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) diukur pada panjang gelombang 562 nm..... | 44 |
| Gambar 4.6 | Konsentrasi protein total sampel yang dipresipitasi dengan 40%, 60% dan 80% amonium sulfat | 45 |
| Gambar 4.7 | SDS PAGE hasil purifikasi protein G-CSF rekombinan dengan teknik kromatografi afinitas menggunakan resin Ni-NTA..... | 47 |
| Gambar 4.8 | <i>Slot blot</i> hasil purifikasi protein G-CSF rekombinan dengan teknik kromatografi afinitas menggunakan resin Ni-NTA..... | 48 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|-------------|---|----|
| Lampiran 1 | Kultur <i>P. pastoris</i> GS115 transforman (pPICZ α -G-CSF-Ye-04) pada medium YPD agar yang mengandung ampisilin 0,05 μ g/ml dan zeocin 0,1 μ g/ml..... | 56 |
| Lampiran 2 | Kultur <i>P. pastoris</i> GS115 non transforman pada medium YPD agar yang mengandung ampisilin 0,05 μ g/ml | 56 |
| Lampiran 3 | Kultur <i>P. pastoris</i> GS115 transforman (pPICZ α -G-CSF-Ye-04) pada medium BMGY yang mengandung ampisilin 0,05 μ g/ml ... | 57 |
| Lampiran 4 | Hasil panen kultur <i>P. pastoris</i> GS115 transforman (pPICZ α -G-CSF-Ye-04) dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C setelah diinduksi selama 48 jam | 57 |
| Lampiran 5 | Hasil panen kultur <i>P. pastoris</i> GS115 non transforman dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C setelah diinduksi selama 48 jam | 58 |
| Lampiran 6 | Alat elektroforesis | 58 |
| Lampiran 7 | Alat sentrifus dengan pendingin | 59 |
| Lampiran 8 | Alat <i>slot blot</i> | 59 |
| Lampiran 9 | <i>Incubator shaker</i> | 60 |
| Lampiran 10 | Rotator | 60 |
| Lampiran 11 | Spektrofotometer UV-Vis | 61 |
| Lampiran 12 | Alat <i>moisture balance</i> dilengkapi timbangan analitik..... | 61 |
| Lampiran 13 | Kondisi kultur <i>P. pastoris</i> GS115 transforman dan non transforman yang diinduksi menggunakan metanol konsentrasi 0,5% tiap 12 jam..... | 62 |
| Lampiran 14 | Berat kering sel dan nilai OD ₆₀₀ kultur <i>P. pastoris</i> per 10 ml suspensi..... | 63 |
| Lampiran 15 | Konsentrasi amonium sulfat dan hasil dialisis dari 50 ml supernatan..... | 63 |
| Lampiran 16 | Komposisi larutan standar BSA dalam volume akhir 1000 μ l..... | 64 |
| Lampiran 17 | Komposisi larutan sampel dalam volume akhir 1000 μ l..... | 64 |
| Lampiran 18 | Absorbansi larutan standar BSA yang diukur pada panjang gelombang 562 nm | 65 |
| Lampiran 19 | Konsentrasi dan absorbansi larutan sampel yang diukur pada panjang gelombang 562 nm..... | 65 |
| Lampiran 20 | Perhitungan berat kering sel | 66 |
| Lampiran 21 | Perhitungan berat amonium sulfat untuk konsentrasi 40%, 60% dan 80% | 66 |
| Lampiran 22 | Komposisi dan cara pembuatan larutan stok, reagen dan dapar.... | 67 |
| Lampiran 23 | Sertifikat analisis antibodi G-CSF..... | 72 |
| Lampiran 24 | Sertifikat analisis anti- <i>rabbit</i> IgG konjugasi dengan alkalin fosfatase | 73 |
| Lampiran 25 | Sertifikat analisis membran dialisis Spectra/Por® | 74 |
| Lampiran 26 | Sertifikat analisis substrat alkalin fosfatase..... | 75 |

| | | |
|-------------|-------------------------------|----|
| Lampiran 27 | Penanda protein | 76 |
| Lampiran 28 | Diagram alir penelitian | 77 |



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pertumbuhan dan perkembangan sel darah dikendalikan dalam sumsum tulang untuk memproduksi jumlah yang sesuai dari setiap jenis sel darah agar menjaga tubuh tetap sehat. Sekitar 120 ribu sel darah putih diproduksi setiap detik dan dapat bertahan hidup selama 8 jam. (Bolyard, A.A., Cottle, T., Edwards, C., Kinsey, S., Schwinzer, B., & Zeidler, C., 1994; Stevens, L., 1994).

Neutropenia merupakan suatu gambaran keadaan dimana jumlah neutrofil dalam darah sangat sedikit. Neutrofil memiliki peran sangat penting dalam mempertahankan tubuh terhadap infeksi bakteri. Pasien dengan jumlah neutrofil terlalu sedikit lebih rentan terhadap infeksi bakteri yang seringkali berakibat fatal (Kumar & Robbins, 1987; Bolyard, A.A., Cottle, T., Edwards, C., Kinsey, S., Schwinzer, B., & Zeidler, C., 1994). Neutropenia dapat terjadi karena berbagai sebab, antara lain kemoterapi pada pasien penderita kanker, infeksi bakteri, efek samping penggunaan beberapa obat, pemajanan racun atau kekurangan nutrisi tertentu seperti vitamin B₁₂ dan asam folat. Beberapa orang dapat dilahirkan dengan neutropenia, tetapi dalam beberapa kasus tidak diketahui penyebabnya. (The Neutropenia Association, 1993; Bolyard, A.A., Cottle, T., Edwards, C., Kinsey, S., Schwinzer, B., & Zeidler, C., 1994; Hoffbrand, A.V., Petit, J.E., & Moss, P.A.H., 2005).

Salah satu cara pengobatan untuk neutropenia adalah dengan pemberian G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) yang merupakan faktor pertumbuhan hematopoetik yang diproduksi oleh tubuh manusia. G-CSF secara spesifik menstimulasi proses proliferasi dan diferensiasi neutrofil (Nagata, S., et al, 1986).

Saat ini G-CSF rekombinan digunakan secara luas sebagai obat untuk mengatasi neutropenia yang diakibatkan oleh berbagai sebab. Beberapa produk G-CSF rekombinan yang telah diproduksi secara komersial menggunakan sel mamalia dan sel bakteri, antara lain adalah Filgrastim[®] (Neupogen) dan

Pegfilgrastim[®] (Neulasta) yang telah berhasil dikembangkan dan diproduksi dari *Escherichia coli*, sedangkan Lenograstim[®] (Ligand Pharmaceuticals) diproduksi dari kultur sel indung telur hamster cina (*Chinese Hamster Ovary/CHO*), dimana masing-masing protein G-CSF rekombinan komersil tersebut masih memiliki kekurangan.

Kelemahan protein G-CSF rekombinan yang diproduksi dari *E. coli* adalah ekspresi proteinnnya sering mengarah pada pembentukan agregat protein tidak larut yang disebut badan inklusi, selain itu tidak dapat melakukan modifikasi pasca translasi sehingga protein rekombinan yang diproduksi oleh *E. coli* mungkin tidak terlipat dengan tepat, tidak stabil atau aktifitas biologinya kurang (Glick, B.R., & J.J Pasternak, 2003), sedangkan protein G-CSF rekombinan yang diproduksi dari sel CHO dapat melakukan modifikasi pasca translasi, namun tingkat produksi pada sel CHO relatif lebih rendah dan biaya produksinya sangat mahal (Christi, L., Clogston, C. L., Hu, S., Boone, T. C., & Lu, H. S., 1993)

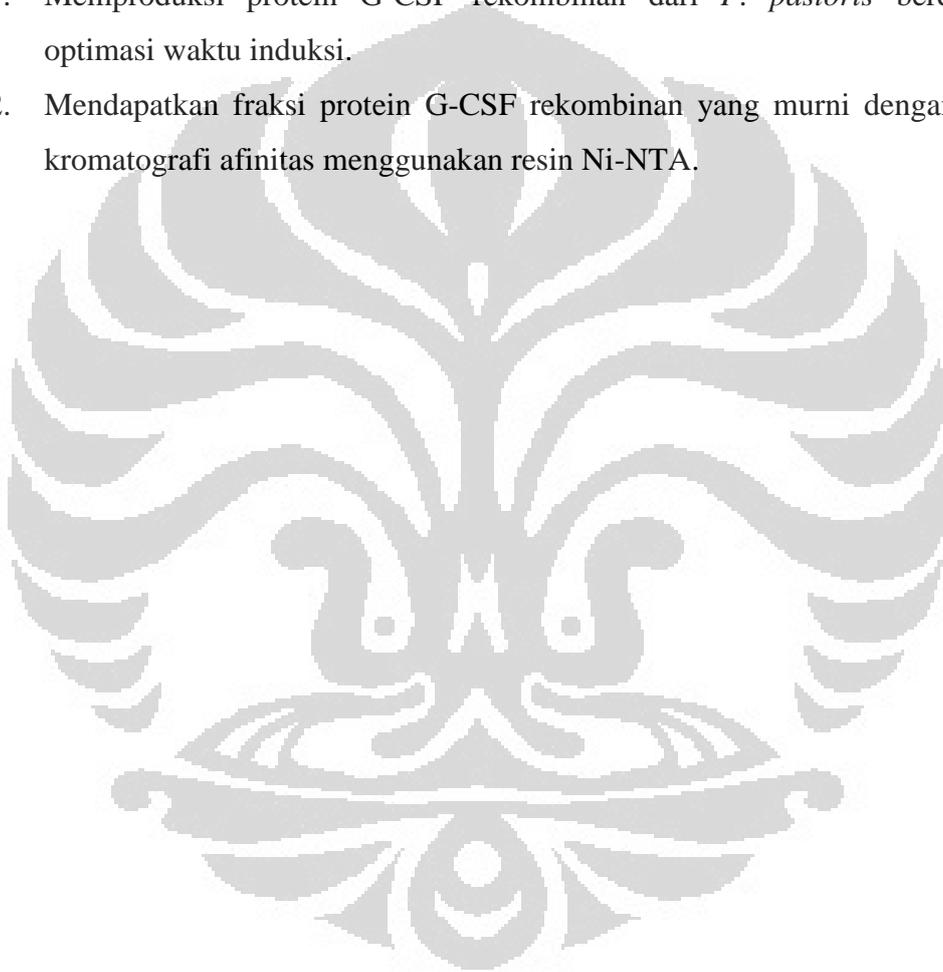
Pada penelitian ini upaya yang dilakukan adalah mengembangkan suatu produk biosimilar G-CSF rekombinan dengan menggunakan sel inang dari khamir yaitu *Pichia pastoris* yang diharapkan dapat mengurangi kesulitan dan kekurangan dari produk protein G-CSF rekombinan dari *E. coli* dan sel CHO. Keuntungan utama sel inang *P. pastoris* adalah dapat melakukan modifikasi pasca translasi seperti pelipatan protein, glikosilasi dan pembentukan ikatan disulfida sehingga dihasilkan protein yang lebih stabil, produksi protein rekombinan yang tinggi, biaya produksi dan baku yang relatif murah (Christi, L., Clogston, C. L., Hu, S., Boone, T. C., & Lu, H. S., 1993).

Gen penyandi G-CSF yang digunakan adalah gen sintetik *CSF3syn* dan vektor pPICZ α . Vektor ini memiliki beberapa bagian penting, diantaranya promotor gen alkohol oksidase, *AOX1* yang mempunyai *inducible promoter* yang kuat oleh metanol dan sekuen polihistidin *tag* (6x His) untuk memudahkan purifikasi. Promotor gen *AOX1* ini memungkinkan penggunaan metanol sebagai sumber karbon dan energi. Promotor AOX terinduksi kuat oleh metanol namun dapat ditekan oleh adanya glukosa. Biasanya gen untuk protein yang diinginkan dibawah kontrol promotor gen *AOX1* berarti produksi protein dapat diinduksi dengan penambahan metanol (Kranthi, B.V., Natarajan B. & Pundi N.R., 2006).

Pemurnian protein G-CSF rekombinan pada penelitian ini adalah dengan menggunakan kromatografi afinitas. Teknik pemurnian ini dipilih karena pada vektor yang dikonstruksi memiliki polihistidin *tag* (6x His) yang dapat berikatan cukup kuat dengan ion logam Ni^{2+} yang terikat pada matriks *nitrilotriacetic acid* (NTA).

1.2 Tujuan Penelitian

1. Memproduksi protein G-CSF rekombinan dari *P. pastoris* berdasarkan optimasi waktu induksi.
2. Mendapatkan fraksi protein G-CSF rekombinan yang murni dengan teknik kromatografi afinitas menggunakan resin Ni-NTA.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sistem Ekspresi *P. pastoris*

P. pastoris adalah khamir metilotropik yang saat ini merupakan salah satu sistem yang paling efektif dan serbaguna untuk memproduksi protein rekombinan (Sauer, M., et al, 2004; Potvin, G., Ahmad, A. & Zhang, Z, 2010). Sel *P. pastoris* berbentuk oval dan memiliki tunas multipolar. Koloni *P. pastoris* berwarna putih kekuningan, tidak berfilamen dan bertekstur lembut (Mycobank, 2011).

Klasifikasi *P. pastoris* menurut NCBI tahun 2011:

| | |
|---------|--------------------------|
| Kingdom | : Fungi |
| Filum | : Ascomycota |
| Kelas | : Saccharomycetes |
| Ordo | : Saccharomycetales |
| Famili | : Saccharomycetaceae |
| Genus | : Pichia |
| Spesies | : <i>Pichia pastoris</i> |

Sebagai eukariot, *P. pastoris* menawarkan banyak keuntungan, yaitu memiliki promotor yang diregulasi dengan ketat, yaitu gen *AOXI* yang mengkode enzim alkohol oksidase (AOX) yang dapat diinduksi oleh metanol. Tidak mengandung endotoksin yang membuat protein yang dihasilkan cocok untuk digunakan sebagai terapi. *P. pastoris* mampu tumbuh dalam kepadatan sel yang tinggi, sehingga dapat diproduksi dalam jumlah yang besar. Selain itu dapat melakukan modifikasi pasca translasi, seperti proses proteolitik, pelipatan protein, pembentukan ikatan disulfida dan glikosilasi serta mensekresi protein endogen yang relatif sedikit, namun mensekresi protein rekombinan dalam jumlah besar ke dalam medium yang akan memudahkan pemurnian protein (Xianzong Shi, Karkut, T., Chamankhah, M., Alting-Mees, M., Hemmingsen, S.M., & Hegedus, D., 2002; Ren, H.T., Yuan, J.Q. & Bellgardt, K.-H., 2003). Sistem *P. pastoris* umumnya juga dianggap lebih cepat, murah, mudah dan menghasilkan protein

rekombinan yang tinggi dan tidak mengandung pirogen, patogen atau inklusi virus daripada sistem ekspresi yang berasal dari eukariot yang lebih kompleks seperti serangga dan sistem kultur jaringan sel mamalia (Çelik, E & Çalik, P., 2011; Cregg, J., 2011).

P. pastoris merupakan salah satu dari spesies khamir yang mampu memetabolisme metanol (Cregg, J., 2011). Spesies lainnya adalah *Hansenula polymorpha*, *Pichia methanolica* dan *Candida boidinii* (Hartner, F.S & Glieder, A., 2006; Çelik, E & Çalik, P., 2011). Ada dua gen yang mengkode enzim alkohol oksidase pada *P. pastoris*, yaitu AOX1 dan AOX2. Pola regulasi kedua gen tersebut identik, namun sebagian besar aktivitas enzim AOX dalam sel diatur oleh gen AOX1 (Potvin, G., Ahmad, A. & Zhang, Z., 2010). Jalur metabolisme metanol tampaknya sama pada semua khamir dan melibatkan seperangkat unik enzim. Langkah pertama dalam metabolisme metanol adalah metanol dioksidasi menghasilkan formaldehida (H_2CO) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh enzim AOX. Untuk menghindari toksisitas H_2O_2 , reaksi ini terjadi dalam organel khusus yang disebut peroksisom. H_2O_2 yang dihasilkan oleh reaksi di atas dikonversi oleh enzim katalase peroksisom menjadi H_2O (Daly, R., & Hearn, M.T.W., 2005).

Ada tiga jenis galur *P. pastoris* sehubungan dengan kemampuannya memetabolisme metanol, yaitu:

1. Mut⁺ (*Methanol Utilization Plus*) dimana gen AOX2 tidak berfungsi normal namun pertumbuhan fenotif pada galur Mut⁺ sama seperti *wild type* yang mampu memetabolisme metanol sebagai sumber karbon.
2. Mut^S (*Methanol Utilization Slow*) dimana gen AOX1 tidak berfungsi sehingga pertumbuhan fenotif akan lamban dengan adanya metanol.
3. Mut⁻ (*Methanol Utilization Minus*) dimana gen AOX1 dan AOX2 tidak berfungsi sama sekali sehingga sel tidak dapat tumbuh pada sumber karbon metanol (Inan, M., & Meagher, M.M., 2001; Hartner, F.S., & Glieder, A., 2006).

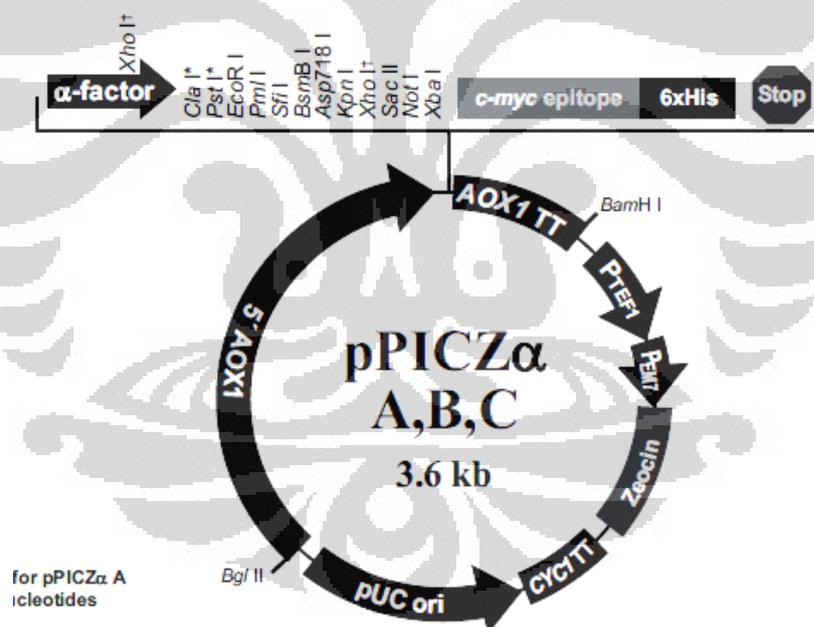
2.2 Galur Ekspresi *P. pastoris*

Sejumlah galur *P. pastoris* dengan berbagai genotif dan fenotif sekarang tersedia. Beberapa galur *P. pastoris* yang memiliki fenotif Mut⁺, yaitu SMD1168,

GS115, SMD1165 dan SMD1163. Galur yang paling sering digunakan adalah GS115. Galur *P. pastoris* fenotif Mut^s adalah KM71 dan fenotif Mut⁻ adalah MC100-3. Galur GS115 memiliki genotif his4 dan fenotif His⁻, dimana hal ini menyebabkan galur transforman ini dapat tumbuh dalam media yang tidak mengandung histidin (Daly, R., & Hearn, M.T.W., 2005).

2.3 Vektor Ekspresi pPICZα

Vektor merupakan molekul DNA yang berfungsi membawa gen asing ke dalam sel inang sehingga dapat bereplikasi dalam sel inang atau terintegrasi ke dalam genom sel inang. Vektor mempunyai beberapa komponen penting, yaitu situs replikasi (*origin of replication*), situs restriksi, marka gen selektif yang umumnya berupa gen resisten terhadap antibiotik dan sinyal ekspresi berupa promotor, agar gen yang disisipkan dapat ditranskripsi dan ditranslasi (Snustad, D.P. & M.J. Simmons, 2003).



Gambar 2.1 Peta vektor pPICZα (Invitrogen, 2004b)

Ada banyak tersedia vektor komersial yang dapat digunakan untuk mengekspresikan protein asing pada *P. pastoris*. Generasi pertama vektor ekspresi pada *P. pastoris* adalah pHIL-D2 atau pPIC9 (Daly, R., & Hearn, M.T.W., 2005). Vektor lainnya adalah pPICZα, yang mengandung gen *Sh ble* dari

Streptoalloteichus hindustanus. Gen ini berukuran 375 bp dan memiliki resisten terhadap antibiotik zeocin yang berfungsi sebagai seleksi pada *E. coli*, *P. pastoris* dan eukariot lain (Invitrogen, 2001a; Cregg, J., 2011).

Karakteristik vektor pPICZ α , yaitu :

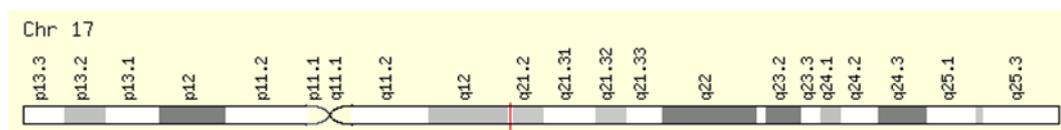
1. Berukuran 3,6 kb.
2. Mempunyai promotor AOX1 yang terinduksi kuat oleh metanol.
3. Signal sekresi faktor α yang berfungsi untuk sekresi protein rekombinan.
4. Beberapa situs kloning dengan 10 situs restriksi unik yang berfungsi untuk menyisipkan gen asing ke dalam vektor.
5. C-terminal myc epitope tag untuk mendeteksi fusi protein menggunakan antibodi anti-myc atau antibodi anti-myc-HRP.
6. C-terminal polihistidin tag untuk purifikasi dengan resin *metal-chelating*.
7. Sekuen terminasi transkripsi AOX1 untuk terminasi transkripsi dan signal poliadenilasi dari gen AOX1 yang memungkinkan proses 3' mRNA efisien dan meningkat.
8. Promotor TEF1 untuk transkripsi elongasi gen promotor faktor 1 dari *Saccharomyces cerevisiae* yang mendorong ekspresi gen Sh ble pada *P. pastoris* yang memiliki sifat resisten terhadap antibiotik zeocin.
9. EM7 (Promotor sintetik prokariot) untuk promotor konstitutif yang mendorong ekspresi gen Sh ble pada *E. coli* yang memiliki sifat resisten terhadap antibiotik zeocin.
10. Gen Sh ble (berasal dari spesies *Streptoalloteichus hindustanus*) yang bersifat resisten terhadap antibiotik zeocin.
11. Situs terminasi CYC1 yang memungkinkan proses 3' mRNA dari gen Sh ble efisien dan meningkat.
12. pUC origin yang memungkinkan replikasi dan pemeliharaan plasmid pada *E. coli*.
13. Sac I, Pme I, BstX I, situs restriksi yang memungkinkan vektor pada lokus AOX1 linier sehingga integrasi ke dalam genom *P. pastoris* efisien. (Invitrogen, 2004b).

2.4 *Human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF)*

Human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) adalah protein manusia yang merangsang proliferasi dan diferensiasi neutrofil (Morstyn G., & Burgess A.W., 1988; Bahrami, A., Shojaosadati, S.A., Khalilzadeh, R., Saedinia, A.R., Farahani, E.V., & Mohammadian-Mosaabadi, J., 2007). Protein ini terdiri atas 4 jenis, yaitu:

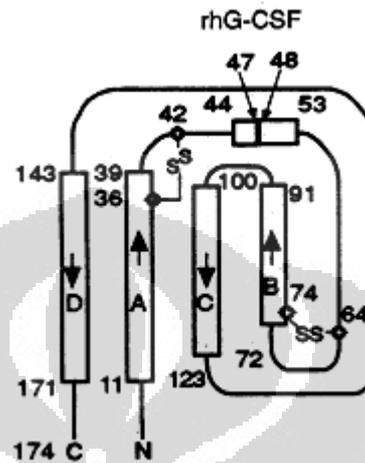
- Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)* merupakan protein yang bekerja pada granulosit dan makrofag.
- Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)* adalah protein yang bekerja spesifik pada proliferasi makrofag.
- Interleukin-3 (IL-3) adalah protein yang tidak hanya merangsang pembentukan dan proliferasi granulosit dan makrofag, tetapi juga eosinofil, megakariosit dan sel mast.
- Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)* berfungsi merangsang proliferasi dan diferensiasi sel progenitor granulosit, khususnya neutrofil (Nagata, S., et al, 1986).

Gen CSF3 yang mengkode hG-CSF telah berhasil diisolasi dari *squamous carcinoma cell line* sejak tahun 1986 (Nagata, S., et al, 1986). Gen CSF3 pada manusia terletak pada kromosom nomor 17 lokus q21-q22. Gen tersebut terdiri atas 2500 nukleotida dan memiliki 5 ekson yang dipisahkan oleh 4 intron. Gen CSF3 menghasilkan 3 macam mRNA yang mengkode 3 isoform preprotein G-CSF manusia, meskipun begitu hanya dua isoform yang ditemukan di dalam tubuh, yaitu isoform preprotein a dengan panjang 177 asam amino dan isoform b dengan panjang 174 asam amino. Kedua isoform G-CSF sama-sama memiliki bioaktivitas, akan tetapi isoform b memiliki aktivitas yang lebih baik, sehingga G-CSF isoform b banyak digunakan dalam pengembangan produk farmasi dengan teknologi DNA rekombinan (Nagata, S., et al, 1986; Souza, L., et al, 1986).



Gambar 2.2 Lokasi gen CSF3 pada kromosom nomor 17 lokus q21-q22 (GeneCard, 2011)

Protein G-CSF merupakan glikoprotein dengan berat molekul 19,6 kDa, memiliki 4 ikatan α -heliks, 1 situs O-glikosilasi yang berfungsi melindungi molekul dari agregasi tanpa mempengaruhi pengikatan reseptor, 2 buah ikatan disulfida pada asam amino Cys36-Cys42 dan Cys67-Cys77.



Keterangan: Ikatan α -heliks A (residu 11-39) (A); ikatan α -heliks B (residu 71-91) (B); ikatan α -heliks C (residu 100-123) (C); ikatan α -heliks D (residu 143-172); ikatan disulfida (rantai Cys36-Cys42 dan Cys67-Cys77).

Gambar 2.3 Diagram pita rhG-CSF menggunakan program MOLSCRIPT (Hill, C.P., Oslund, T.D., & Eisenberg, D., 1993).

Teknologi DNA rekombinan yang telah berkembang pesat memungkinkan pengembangan teknologi gen sintetis. Gen CSF3 yang digunakan dalam penelitian ini bukan gen CSF3 alami, tetapi gen sintetis CSF3syn. Gen sintetis CSF3syn sama seperti gen CSF3 alami mengkode protein G-CSF, akan tetapi basa nukleotidanya berbeda. Gen tersebut telah dikonstruksi secara *in vitro* dengan teknik PCR dan dikloning pada vektor PTZ57R/T (Fermentas). Subkloning dilakukan ke dalam vektor ekspresi pPICZ α , kemudian ditransformasikan ke dalam sel inang *P. pastoris* (Fuad, A.M., Agustiyanti, D.F., Yuliyawati, Fidyani, C., Aminah, & Santoso, A., 2008).

2.5 Neutropenia

Neutropenia adalah suatu keadaan dimana jumlah neutrofil di dalam darah sangat rendah sehingga tubuh rentan terhadap infeksi bakteri. Neutrofil merupakan bagian dari sel darah putih (leukosit) yang dikategorikan sebagai granulosit polimorfonukleus dan memiliki jumlah terbanyak yaitu 60 – 70% dari

jumlah normal leukosit. Sekitar 120 ribu sel darah putih diproduksi setiap detik dan dapat bertahan hidup selama 8 jam (Bolyard, A.A., Cottle, T., Edwards, C., Kinsey, S., Schwinzer, B., & Zeidler, C., 1994; Stevens, L., 1994; Sherwood, L., 2001).

Neutropenia dapat dikategorikan dalam 4 tingkatan berdasarkan jumlah neutrofil, yaitu:

- a) Neutropenia ringan, jumlah neutrofil 1.000 – 1.500 sel/mm³.
- b) Neutropenia sedang, jumlah neutrofil berkisar antara 500 – 1.000 sel/mm³.
- c) Neutropenia berat, jumlah neutrofil 200 - 500 sel/mm³.
- d) Neutropenia sangat berat, jumlah neutrofil kurang dari 200 sel/mm³.

Neutropenia dapat terjadi karena bawaan sejak lahir atau karena disebabkan oleh sesuatu misalnya infeksi oleh bakteri, virus atau jamur, efek samping suatu obat, pemajanan racun, kemoterapi kanker atau kekurangan nutrisi tertentu seperti vitamin B₁₂ dan asam folat (The Neutropenia Association, 1993; Hoffbrand, A.V., Petit, J.E., & Moss, P.A.H., 2005). Kemoterapi tidak hanya menekan pertumbuhan sel-sel kanker, tetapi juga menekan pertumbuhan neutrofil sehingga jumlah neutrofil dalam tubuh berkurang (Stevens, L., 1994).

2.6 Presipitasi Protein

Presipitasi protein bertujuan untuk memekatkan protein. Salah satu cara presipitasi protein adalah dengan peningkatan konsentrasi garam. Garam yang sering digunakan adalah amonium sulfat. Beberapa kelebihan presipitasi dengan menggunakan amonium sulfat adalah, dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme, tidak merusak protein, mudah larut dalam air dan mudah mendapatkan protein yaitu dengan cara sentrifugasi (Seidman, L. & Mowery, J., 2011).

Proses presipitasi menggunakan amonium sulfat disebut juga metode *salting-out*. Pada umumnya protein memiliki daya larut dalam air yang berbeda satu sama lain. Bila ditambahkan amonium sulfat ke dalam larutan protein, maka akan terjadi persaingan antara amonium sulfat dengan protein dalam mengikat air. Tertariknya molekul air oleh ion garam menyebabkan menurunnya jumlah molekul air yang terikat pada protein. Hal ini terjadi karena ion garam memiliki

densitas muatan yang lebih besar dibandingkan protein (Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2002; Seidman, L. & Mowery, J., 2011).

Kekuatan ionik garam pada konsentrasi tinggi semakin kuat sehingga garam dapat mengikat lebih banyak molekul air. Menurunnya jumlah molekul air yang terikat pada protein menyebabkan gaya tarik-menarik antar molekul protein lebih kuat bila dibandingkan dengan gaya tarik menarik antara molekul protein dan air (mempertinggi interaksi hidrofobik), sehingga protein akan mengendap dari larutan (Seidman, L. & Mowery, J., 2011).

Molekul-molekul protein akan mengendap pada konsentrasi amonium sulfat yang berbeda. Umumnya molekul-molekul protein berukuran besar dapat mengendap dengan konsentrasi garam yang rendah, sedangkan protein yang ukuran molekulnya kecil mengendap pada konsentrasi garam yang tinggi. Proses pengendapan harus dilakukan dalam kondisi dingin sehingga protein akan mengendap tanpa mengalami denaturasi (Seidman, L. & Mowery, J., 2011).

2.7 Dialisis Protein

Dialisis merupakan metode pemisahan molekul kecil dan molekul besar dengan gaya difusi selektif melalui membran semipermeabel. Sampel yang mengandung protein umumnya mengandung komponen lain yang tidak diinginkan, seperti garam dapur (Tris, PBS dan lain-lain). Dialisis dapat membuang garam amonium sulfat dari proses pengendapan protein menggunakan dapur *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Sampel dimasukkan ke dalam kantong dialisis, sedangkan larutan dapur PBS ditempatkan di luar kantong dialisis. Sampel yang terdapat pada sisi dalam kantong dialisis akan berinteraksi dengan larutan dapur PBS. Molekul sampel yang terdapat pada kantong dialisis akan berdifusi melalui pori-pori membran hingga tercapai keseimbangan. Dialisis (difusi) akan berhenti pada saat kondisi sudah seimbang. Oleh sebab itu larutan dialisis harus diganti dalam kurun waktu tertentu agar terbentuk konsentrasi awal yang memicu proses dialisis (Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2002).

Membran semipermeabel kantong dialisis memiliki pori dengan kisaran ukuran yang berbeda-beda. Kisaran ukuran pori-pori membran ini disebut *molecular weight cut off* (MWCO). Kisaran ukuran pori-pori membran yang

dipilih harus dapat menahan molekul sampel minimal 90%. Oleh karena itu penggunaan MWCO yang tepat adalah MWCO dengan ukuran setengah dari berat molekul sampel yang akan ditahan (Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2002).

2.8 Elektroforesis Gel Poliakrilamid (SDS PAGE)

Elektroforesis gel poliakrilamid merupakan suatu metoda yang cepat dan sensitif untuk menganalisis protein (Walker, J.M., 1986). Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul organik yang bermuatan pada sebuah gel berdasarkan kecepatan migrasi dalam suatu medan listrik. Molekul yang bermuatan negatif akan bermigrasi menuju kutub positif (anoda), sedangkan molekul yang bermuatan positif akan bermigrasi menuju kutub negatif (katoda). Teknik ini merupakan teknik pemisahan yang bergantung pada ukuran dari molekul yang dipisahkan. Pada bidang biologi molekuler teknik pemisahan ini digunakan untuk memisahkan protein maupun asam nukleat (DNA), sehingga dapat diperkirakan ukurannya dengan cara membandingkan dengan penandanya (Holme, D.J., & Hazel Peck, 1998)

SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) adalah teknik pemisahan protein, dimana gel poliakrilamid tersebut terbentuk dari polimerisasi dari akrilamid dan bis-akrilamid. Polimerisasi dimulai setelah penambahan amonium persulfat (APS) dan N,N,N,N-tetrametilendiamin (TEMED). Semakin tinggi persentase gel, semakin kecil ukuran pori-porinya dan semakin baik dalam memisahkan molekul yang berukuran kecil. Persentase gel yang digunakan tergantung pada berat molekul dari protein yang dipisahkan. Gel 5% digunakan untuk memisahkan protein dengan ukuran mulai dari 60.000 sampai 200.000 dalton, gel 10% untuk 16.000 sampai 70.000 dalton dan gel 15% untuk 12.000 hingga 45.000 dalton. Secara umum, molekul protein yang memiliki berat molekul lebih rendah akan bergerak lebih jauh dari sumuran dibandingkan dengan molekul protein yang memiliki berat molekul lebih besar (Holme, D.J., & Hazel Peck, 1998 dan Caprette, D. R., 2005).

Umumnya protein mempunyai muatan negatif dan positif dari campuran asam-asam amino bermuatan pembentuknya. Untuk membuat protein menjadi bermuatan negatif dan linier maka digunakan deterjen anionik SDS, agen pereduksi 2-merkapttoetanol yang disertai dengan pemanasan, sehingga menyebabkan struktur tiga dimensi protein rusak akibat terputusnya ikatan disulfida. Hal ini menghasilkan rantai polipeptida lurus yang terselubungi oleh muatan negatif dari molekul SDS. Pada metoda ini digunakan RSB (*Reducing Sample Buffer*) yang merupakan campuran larutan SDS, gliserol, tris-Cl pH 6,8, *Ethylendiamine Tetraacetic Acid* (EDTA), agen pereduksi 2-merkapttoetanol serta pewarna bromophenol biru. Adanya gliserol membuat sampel lebih padat, sehingga sampel akan tetap berada di dasar sumur sehingga tidak keluar. Tris-Cl bertindak sebagai penyangga pH. EDTA adalah pengawet yang mengurangi aktivitas enzim proteolitik. Pewarna bromofenol biru berfungsi untuk mewarnai sampel pada saat elektroforesis berlangsung (Caprette, D. R., 2005).

Pewarna yang umum digunakan untuk mendeteksi pita-pita protein dari hasil elektroforesis adalah *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). CBB dapat mendeteksi hingga 1 μg protein yang ada di dalam sampel. Pewarna ini dapat menembus gel keseluruhan, namun hanya menempel secara permanen dengan protein. Pewarna bromofenol biru akan menghilang selama proses tersebut. Kelebihan pewarna ini dihilangkan dengan larutan *destaining* yang mengandung campuran asam asetat dan metanol. Pita-pita protein akan terlihat berwarna biru dengan latar belakang yang jernih. Gel dapat dikeringkan atau difoto sebagai dokumentasi untuk analisis selanjutnya (Caprette, D. R., 2005).

2.9 Kromatografi Afinitas

Kromatografi afinitas merupakan salah satu cara yang cukup baik untuk memurnikan protein. Teknik ini didasarkan pada sifat protein yang dapat berikatan secara spesifik dan reversibel dengan suatu senyawa atau unsur yang biasa disebut dengan ligan. Interaksi spesifik terjadi antara ligan dan ligat akan mempertahankan protein target pada matriks *nitrilothreeacetic acid* (NTA), sedangkan komponen lainnya akan melewati matriks (Qiagen, 2000). Hanya protein-protein tertentu saja yang dapat berikatan dengan ligan-ligan tertentu,

misalnya protein yang memiliki deretan asam amino histidin dapat berikatan cukup kuat dengan ion logam Ni^{2+} yang terikat pada matriks *nitrilothreacetic acid* (NTA). Molekul-molekul protein yang tidak terikat pada ligan dapat dihilangkan dengan mencuci kolom menggunakan dapar pencuci, sedangkan protein target yang terikat pada ligan dapat dilepaskan ikatannya dengan mengelusi kolom menggunakan dapar yang mengandung senyawa yang dapat berkompetisi dengan protein dalam hal mengikat ligan misalnya imidazol. Elusi protein juga dapat menggunakan agen pengkelat EDTA, tetapi agen pengkelat logam atau EDTA mungkin akan mengganggu dalam uji maupun aktivitas protein. Kapasitas resin Ni-NTA dalam mengikat protein cukup tinggi, yaitu 5 sampai 10 per ml resin (Schmitt, J., Hess, H. & Stunnenberg, H.G., 1993).

Pemurnian protein dengan menggunakan resin Ni-NTA dapat dilakukan pada protein dengan kondisi terdenaturasi ataupun tidak. Pada kondisi terdenaturasi dapat terjadi karena interaksi antara resin Ni-NTA tidak memerlukan konformasi tertentu dari protein. Oleh karena itu protein dapat dimurnikan dalam kondisi terdenaturasi. Pada kondisi protein *native* afinitas ikatan resin Ni-NTA yang tinggi memungkinkan pengikatan yang efisien bahkan dalam larutan yang sangat encer seperti pada protein yang disekresikan dalam medium kultur. Tetapi perlu waktu yang lebih lama karena kolom harus dimuatkan perlahan-lahan (Schmitt, J., Hess, H. & Stunnenberg, H.G., 1993).

Kromatografi afinitas, menggunakan resin Ni-NTA memiliki beberapa keuntungan, antara lain:

1. Protein dapat dielusi dari resin Ni-NTA tanpa mengganggu konformasi protein rekombinan sehingga aktivitas biologisnya dapat dipertahankan.
2. Resin Ni-NTA juga dapat digunakan dalam kondisi protein terdenaturasi.
3. Resin Ni-NTA stabil pada rentang pH yang lebar (pH 2,5 hingga 13), stabil terhadap deterjen SDS, urea atau pelarut etanol.
4. Stabilitasnya yang tinggi memungkinkan penggunaan resin berulang kali.
5. Relatif murah dan bisa digunakan pada pemurnian skala besar.
6. Resin Ni-NTA tidak dipengaruhi oleh adanya enzim protease atau nuklease dalam sampel (Schmitt, J., Hess, H. & Stunnenberg, H.G., 1993).

2.10 *Immunoblotting*

Immunoblotting merupakan suatu teknik untuk memindahkan atau transfer protein dari gel poliakrilamid ke permukaan membran. Umumnya membran yang digunakan adalah membran nitroselulosa atau *Polyvinylidene Difluoride* (PVDF). *Immunoblotting* merupakan teknik analisis protein yang memanfaatkan reaksi antibodi dan antigen sebagai pendeteksi protein target. Protein dideteksi dengan cara penambahan antibodi spesifik yang disebut sebagai antibodi primer. Antibodi primer ini mempunyai sifat antigenisitas yang dapat berikatan dengan protein spesifik pada permukaan membran. Setelah itu ditambahkan antibodi sekunder konjugat yang akan berikatan dengan antibodi-protein membentuk kompleks. Penambahan substrat akan bereaksi dengan konjugat sehingga menimbulkan pita protein yang dapat terlihat pada permukaan membran. Visualisasi pita protein target dapat menggunakan substrat *alkaline phosphatase*, *peroksidase*, substrat kromogenik atau X-Ray (Kurien, B. T., Dorri, Y., Dillon, S., Dsouza, A., & Scofield, R.H., 2011).

Membran nitroselulosa atau PVDF sebelumnya diblok terlebih dahulu untuk menghindari timbulnya reaksi dari protein-protein non target dan menekan terjadinya pewarnaan pada latar belakang membran yang dapat mempengaruhi ketajaman pita protein. Membran diblok dengan cara mereaksikannya dengan protein lain, seperti bovine serum albumin atau kasein, untuk mencegah pengikatan protein yang tidak spesifik dengan antibodi (Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2002).

Contoh teknik *immunoblotting* antara lain *slot blot* dan *western blot*. Teknik *slot blot* atau *immunodot blot* merupakan teknik sederhana yang dapat mendeteksi banyak sampel secara bersamaan. *Slot blot* merupakan teknik yang menggunakan filtrasi vakum untuk mentransfer protein ke membran. Hasil transfer protein tersebut kemudian divisualisasi dengan metode deteksi imunologi. Hasil visualisasi protein dengan menggunakan metode *slot blot* akan memberikan informasi kualitatif protein, tetapi tidak dapat memberikan informasi berat molekul protein (Kurien, B. T., Dorri, Y., Dillon, S., Dsouza, A., & Scofield, R.H., 2011).

Western blot adalah suatu teknik deteksi protein yang ditransfer ke permukaan membran nitoselulosa atau PVDF. Sebelum ditransfer terlebih dahulu dilakukan analisis dengan SDS PAGE. Teknik tersebut menggabungkan teknik elektroforesis dan teknik transfer protein pada membran. Hasil visualisasi protein dengan menggunakan teknik *western blot* akan memberikan informasi kualitatif dan berat molekul protein yang terdapat di dalam sampel (Kurien, B. T., Dorri, Y., Dillon, S., Dsouza, A., & Scofield, R.H., 2011).

2.11 Pengukuran Konsentrasi Protein Menggunakan Metoda Bicinchoninic Acid (BCA)

Metoda Bicinchoninic Acid (BCA), pertama kali dijelaskan oleh Smith, P.K., et al, 1985. Metoda ini mirip dengan metoda Lowry, dimana tergantung pada konversi dari Cu^{2+} menjadi Cu^+ dalam suasana basa. Cu^+ kemudian dideteksi oleh reaksi dengan BCA. Dua metoda yang memiliki sensitivitas sama, tapi karena BCA stabil di dalam suasana basa, maka metoda ini memiliki keuntungan karena hal ini dapat dilakukan dalam satu langkah dibandingkan dengan metoda Lowry yang membutuhkan dua langkah. Hasil reaksi akan menghasilkan warna ungu yang dapat diukur pada absorbansi maksimum 562 nm. Dalam pengujian ini, Cu^+ yang dihasilkan dari reaksi diatas berfungsi sebagai konsentrasi protein selama inkubasi. Konsentrasi protein sampel yang tidak diketahui dapat ditentukan secara spektrofotometri dengan cara membandingkan dengan standar protein *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang diketahui konsentrasinya (Smith, P.K., et al, 1985; Walker, J.M., 1986; Thermo Scientific, 2011).

Keuntungan lain dari Metoda BCA adalah umumnya lebih toleran terhadap adanya senyawa lain yang pada metoda Lowry akan mengganggu. Metoda BCA tidak terpengaruh oleh berbagai deterjen dan agen denaturing seperti urea dan klorida guanidinium, meskipun lebih sensitif terhadap adanya gula pereduksi. BCA dapat larut dalam larutan garam natrium dan merupakan reagen sensitif, stabil, dan sangat spesifik untuk Cu^+ (Smith, P.K., et al, 1985; Walker, J.M., 1986; Thermo Scientific, 2011).

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Rekayasa Protein dan Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong. Penelitian dilakukan dari bulan Maret 2011 sampai bulan November 2011.

3.2 Bahan

3.2.1 Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah khamir *Pichia pastoris* GS115 transforman (pPICZ α -G-CSF-Ye-04) dan *Pichia pastoris* GS115 non transforman. Galur transforman ini mengandung gen sintetik *CSF3syn* penyandi protein G-CSF hasil penelitian Laboratorium Rekayasa Protein dan Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI (Fuad, A.M., Agustiyanti, D.F., Yuliawati, Fidyani, C., Aminah, & Santoso, A., 2008).

3.2.2 Medium

Medium yang digunakan adalah medium pertumbuhan *yeast extract peptone dextrose* (YPD) agar (Invitrogen, USA), Medium produksi sel *buffered glyserol-complex medium* (BMGY) cair (Invitrogen, USA) dan medium induksi *buffered methanol-complex medium* (BMMY) cair (Invitrogen, USA).

3.2.3 Bahan Kimia/Reagen

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam klorida (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Sigma Aldrich, Jerman), natrium klorida (AppliChem, USA), kalium klorida (Sigma Aldrich, Jerman), kalium hidrogen fosfat (Merck, Jerman), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman), gliserol (Bio Basic, Kanada), glisin (IBI Scientific, USA), asam asetat glasial (Merck, Jerman), tris (hidroksimetil) aminometan (Merck, Jerman), bromofenol biru (Pharmacia, Swedia), metanol (Merck, Jerman), D-glukosa anhidrat (Sigma

Aldrich, Jerman), di-natrium EDTA (Sigma Aldrich, Jerman), resin Ni-NTA (Qiagen, Jerman), di-natrium hidrogen fosfat (Merck, Jerman), susu skim non fat (Tropicana Slim, Indonesia), tween 20 (BioRad, Inggris), Bovine Serum Albumin (BSA) (Thermo Scientific, USA), Bichinchoninic Acid (BCA) reagent protein assay kit (Thermo Scientific, USA), aquadest, aquabidest steril (Ikapharmindo Putramas, Indonesia), Sodium Dodesil Sulfat (SDS) (Invitrogen, USA), 2-merkaptotanol (Sigma Aldrich, Jerman), akrilamid/bis-akrilamid (BioRad, Inggris), Amonium Persulfat (APS) (BioRad, Inggris), TEMED (N,N,N,N-tetrametilendiamin) (AppliChem, USA), PageRuler™ prestained protein ladder low molecular (BioRad, Inggris), *yeast extract* (Conda Pronadisa, Spanyol), pepton (Himedia, India), biotin (Invitrogen, USA), *zeocin* (Invitrogen, USA), agar (Bio Basic, Kanada), *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (Bio Basic, Kanada), etanol (Merck, Jerman), natrium hidrogen fosfat (Merck, Jerman), antibodi primer (G-CSF Poliklonal) (Santa Cruz, USA), antibodi sekunder (anti *rabbit*) (Promega, USA), developer (*alkaline phosphatase*) (Promega, USA), minyak imersi, es batu, PhastGel Blue (Pharmacia, Swedia), His Buffer Kit (Stok buffer fosfat 8x & larutan Imidazol 2 M) (GE Healthcare, Swedia).

3.3 Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah cawan petri (Pyrex, Jepang), tabung reaksi (Pyrex, Jepang), labu erlenmeyer (Pyrex, Jepang), rak tabung reaksi, gelas ukur (Duran, Jerman), sumbat kapas steril, gelas beaker (Pyrex, Jepang), Botol Schott (Duran, Jerman), ose, bunsen, pipet volume (DIN, Jerman), bulb, tabung sentrifus (Nalgene, USA), tabung falcon (Iwaki, Jepang), tube eppendorf (Extragene, USA), sarung tangan (Sensi Gloves, Indonesia), oven, microwave (Frigidaire, Swedia), masker, *magnetic stirrer*, vorteks (Vortex-Genie, USA), mikrosentrifuse (Heraeus, Jerman), mikrosentrifuse dengan pendingin (Jouan, USA), sentrifus dengan pendingin (Jouan, USA), membran filter 0,22 µm (Sartorius AG, Jerman), mikropipet (Witeg, Jerman; Gilson, Australia), tips, incubator shaker (Thermolyne, USA), inkubator, parafilm (Pechiney, Prancis), pemanas (Thermolyne, USA), autoklaf (Iwaki, Jepang), *Laminar Air Flow Cabinet* (Esco, Cina), pH meter (Australia), timbangan digital (Precisa, Swiss),

timbangan analitik (Ohaus, USA), timbangan neraca, *Freezer* -20°C (Modena, Indonesia), lemari pendingin (Toshiba, Indonesia; Sansio, Indonesia), termometer, rotator, moisture balance HA 300 (Precisa, Swiss), kertas pH universal (Merck, Jerman), mikroskop, kaca objek, kaca penutup, peralatan untuk elektroforesis Mini-Protean II (BioRad, Inggris), Spektrofotometer (Beckman, USA), cuvet 3 ml (Beckman, USA), cuvet semi mikro (QS), botol semprot (Scienceware, USA), peralatan untuk *western blot* (BioRad, Inggris), *ice maker* (Scotsman, Inggris), kamera digital (Canon, USA), scanner (Canon, USA), membran nitroselulosa dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam laboratorium.

3.4 Pembuatan Medium

3.4.1 *Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) Agar*

Sebanyak 1 g *yeast extract* dan 2 g pepton dilarutkan dalam 90 ml aquadest steril, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Selanjutnya medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit. Selanjutnya medium didinginkan hingga suhu 60 °C, kemudian ditambahkan 2 g agar dan 10 ml larutan dekstrosa 20%. Medium disimpan dalam lemari pendingin suhu 4 °C. Medium YPD agar digunakan untuk pembiakan sel *P. pastoris* (Invitrogen, 2004b)

3.4.2 *Buffered Glycerol-complex Medium (BMGY) Cair*

Sebanyak 10 g *yeast extract* dan 20 g pepton dilarutkan dalam 700 ml aquadest steril, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Selanjutnya medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit. Selanjutnya medium didinginkan hingga suhu ruang, kemudian ditambahkan 100 ml larutan dapar kalium fosfat 1 M, pH 6,0; 100 ml larutan *yeast nitrogen base* 13,4%; 2 ml larutan biotin 0,02% dan 100 ml larutan gliserol 10%. Medium disimpan dalam lemari pendingin suhu 4 °C. Medium BMGY cair digunakan untuk memproduksi sel *P. pastoris* sebelum diinduksi (Invitrogen, 2004b).

3.4.3 *Buffered Methanol-complex Medium (BMMY) Cair*

Sebanyak 10 g *yeast extract* dan 20 g pepton dilarutkan dalam 700 ml aquadest steril, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Selanjutnya medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit. Selanjutnya medium didinginkan hingga suhu ruang, kemudian ditambahkan 100 ml larutan dapar kalium fosfat 1 M, pH 6,0; 100 ml larutan *yeast nitrogen base* 13,4%; 2 ml larutan biotin 0,02% dan 100 ml larutan metanol 5%. Medium disimpan dalam lemari pendingin suhu 4 °C. Medium BMMY cair digunakan untuk memproduksi protein G-CSF rekombinan dengan cara diinduksi dengan metanol (Invitrogen, 2004b).

3.5 Cara Kerja

3.5.1 *Pembiakan Kultur P. pastoris*

Pembiakan galur *P. pastoris* GS115 non transforman dan transforman (pPICZ α -G-CSF-Ye-04) dilakukan dengan cara menggores satu ose kultur ke medium YPD agar. Pembiakan dilakukan pada tabung reaksi dan cawan petri yang berisi medium YPD agar, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Pada medium galur non transforman mengandung antibiotik ampisilin dengan konsentrasi 50 μ g/ml dan pada medium galur transforman selain mengandung antibiotik ampisilin dengan konsentrasi 50 μ g/ml juga mengandung antibiotik *zeocin* dengan konsentrasi 100 μ g/ml.

3.5.2 *Produksi Sel P. pastoris dan Produksi Protein G-CSF Rekombinan Skala Kecil*

Produksi sel *P. pastoris* dilakukan dengan cara menginokulasikan sebanyak satu ose koloni tunggal *P. pastoris* transforman ke dalam tabung reaksi yang berisi 2 ml medium BMGY cair yang mengandung 50 μ g/ml antibiotik ampisilin dan 100 μ g/ml antibiotik *zeocin* secara aseptik dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C dan dikocok dengan kecepatan 175 rpm. Selanjutnya, prainokulum tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 23 ml medium BMGY cair yang mengandung 50 μ g/ml antibiotik ampisilin dan inkubasi dilanjutkan selama 24 jam pada suhu 30 °C dan dikocok dengan kecepatan 175

rpm hingga OD_{600} kultur mencapai 2 – 6. Setelah itu, inokulum tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 225 ml medium BMGY cair yang mengandung 50 $\mu\text{g/ml}$ antibiotik ampisilin dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C dan dikocok dengan kecepatan 175 rpm hingga kultur mencapai fase log pertumbuhan dimana nilai OD_{600} 2 - 6. Kemudian kultur sel dipanen dengan cara dimasukkan ke dalam tabung sentrifus steril dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Kultur untuk produksi sel ini dibuat dengan 3 ulangan untuk galur transforman.

Produksi protein G-CSF rekombinan dimulai pada saat sel dimasukkan ke dalam medium BMMY cair, dimana kultur sel yang telah disentrifus dipisahkan dari supernatannya. Kemudian pelet sel diresuspensikan ke dalam erlenmeyer yang berisi 250 ml medium BMMY cair yang mengandung 50 $\mu\text{g/ml}$ antibiotik hingga nilai OD_{600} kultur ± 3 . Sebelum kultur diinduksi, supernatan diambil sebanyak 5 ml tiap 12 jam untuk mengukur OD_{600} dan analisis SDS PAGE dan *Western blot*. Setelah itu dilakukan induksi menggunakan metanol dengan konsentrasi 0,5% tiap 12 jam yaitu pada jam ke-0, 12, 24, 36 dan 48. Setelah induksi selesai, kultur sel dimasukkan ke dalam tabung sentrifus steril dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dipisahkan dari pelet sel dengan cara menuang supernatan ke dalam botol schott steril dan disimpan di lemari pendingin 4 °C.

Kultur non transforman dibuat 2 ulangan dan dilakukan dengan cara yang sama dengan kultur transforman. Namun pada kultur non transforman, medium produksi sel BMGY cair dan medium induksi BMMY cair yang digunakan hanya mengandung 50 $\mu\text{g/ml}$ antibiotik ampisilin tetapi tidak mengandung antibiotik *zeocin*. Kultur non transforman dibuat sebagai kontrol negatif pada saat analisis SDS PAGE dan *Immunoblotting*.

3.5.3 Pengamatan Sel *P. pastoris* Secara Mikroskopis

Sebanyak 1 ose kultur sel *P. pastoris* dalam medium cair diambil dan digoreskan pada kaca objek. Kemudian kaca penutup diletakkan di atas kaca objek. Setelah itu dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop pada

perbesaran yang dikehendaki. Untuk perbesaran 1000 kali maka diatas kaca penutup diteteskan minyak imersi.

3.5.4 Pengukuran Berat Kering Sel

Sel *P. pastoris* diinokulasikan ke dalam medium BMGY cair yang mengandung antibiotik ampisilin 50 µg/ml. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C dan dikocok dengan kecepatan 175 rpm.

Untuk pengukuran berat kering sel, terlebih dahulu ditimbang membran filter ukuran 0,22 µm. Kemudian sebanyak 10 mL suspensi sel *P. pastoris* yang telah ditumbuhkan tersebut difiltrasi dengan menggunakan membran filter. Selanjutnya membran filter ditimbang untuk mengetahui berat basah sel dan dikeringkan dengan menggunakan *moisture balance*. Setelah itu membran filter ditimbang kembali untuk mengetahui berat kering sel. Untuk pengukuran berat sel kering ini dilakukan sebanyak 3 ulangan.

Untuk mendapatkan nilai konversi dari nilai absorbansi dan berat kering sel, maka suspensi sel yang sama diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sehingga didapatkan berat sel per volume medium.

3.5.5 Presipitasi Protein G-CSF Rekombinan yang Diinduksi Menggunakan Metanol 0,5% Tiap 12 Jam dengan Larutan Trichloroacetic Acid (TCA)

Salah satu teknik presipitasi protein adalah dengan menggunakan larutan TCA, dimana larutan TCA akan mengendapkan protein yang terlarut dalam supernatan. Perbandingan volume supernatan dan larutan TCA 100% adalah 4 : 1. Sebanyak 800 µl supernatan yang mengandung protein G-CSF rekombinan ditambahkan 200 µl larutan TCA 100% dingin. Kemudian diinkubasi dengan menggunakan rotator pada suhu 4 °C selama 24 jam. Selanjutnya campuran tersebut disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C dan supernatan dibuang. Kemudian pelet protein dicuci dengan etanol 98% dingin sebanyak 200 µl, kemudian disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit pada suhu 4 °C dan etanol dibuang. Kemudian pelet protein dicuci sekali

lagi dengan etanol 98% dingin sebanyak 200 μ l, kemudian disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit pada suhu 4 °C dan etanol dibuang. Selanjutnya pelet protein dikeringkan pada suhu ruang selama \pm 15 menit untuk menguapkan etanol yang tersisa. Selanjutnya pelet protein tersebut dianalisis dengan menggunakan SDS PAGE dan *Western blot* untuk melihat profil pita protein.

3.5.6 Analisis Ekspresi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan Elektroforesis Gel Poliakrilamid (SDS PAGE)

Sebelum melakukan analisis protein dengan SDS PAGE terlebih dahulu dibuat larutan dan dapar yang diperlukan untuk elektroforesis maupun untuk pembuatan gel. Gel yang digunakan ada dua macam yaitu gel penahan dan gel pemisah. Konsentrasi gel penahan yang digunakan adalah 3,9% dan gel pemisah adalah 15%. Kaca cetakan untuk gel yang digunakan dengan ukuran tebal 0,75 mm, sehingga tebal gel yang dihasilkan adalah 0,75 mm. Maksimal volume sampel yang dapat dimuatkan ke dalam sumuran adalah 20 μ l.

Selanjutnya kaca cetakan untuk gel dilapisi parafilm dan dipasang pada alat casting gel. Kemudian bahan-bahan untuk gel pemisah dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditutup dengan parafilm dan dikocok. Setelah tercampur rata, dipipet ke dalam kaca cetakan hingga \pm 1 cm dari batas atas kaca cetakan. Setelah itu aquadest steril dimasukkan ke dalam kaca cetakan hingga penuh, untuk mencegah agar gel pemisah tidak pecah dan terbentuk gelembung udara pada saat membeku.

Setelah gel pemisah membeku maka buang aquadest steril dengan meletakkan tisu pada bagian atas kaca cetakan dan membalikkannya. Kemudian bahan-bahan untuk gel penahan dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditutup dengan parafilm dan dikocok. Setelah tercampur rata, dipipet ke dalam kaca cetakan hingga memenuhi seluruh kaca cetakan. Setelah itu pasang sisir yang akan digunakan untuk mencetak sumuran gel.

Setelah gel penahan membeku sebaiknya dibiarkan minimal selama 1 jam sebelum dipergunakan agar proses polimerisasi sempurna. Setelah gel siap digunakan, kaca cetakan dilepaskan dari alat casting gel kemudian dipasangkan

pada alat elektroforesis dan dimasukkan dapar *elektorunning* dalam *chamber*. *Chamber* atas harus diisi penuh dengan dapar *elektorunning* sehingga semua sumuran terendam.

Sebanyak 800 µl sampel yang telah diendapkan dengan TCA dilarutkan dengan 20 µl *Reducing Sample Buffer* (RSB). Campuran itu kemudian dipanaskan dalam air suhu 95 °C selama 10 menit, kemudian sampel tersebut dipipet dan dimasukkan ke dalam tiap-tiap sumuran gel poliakrilamid. Untuk penanda/marker protein dipipet sebanyak 5 µl.

Setelah itu alat dihubungkan dengan elektroda pada tegangan 90 volt selama ± 120 menit atau telah mencapai batas bawah gel pemisah. Setelah selesai, gel poliakrilamid diwarnai dengan cara dimasukkan ke dalam wadah yang berisi larutan *Commassie Brilliant Blue* (CBB) selama semalam. Kemudian gel dicuci dengan larutan *destaining* 1 selama 30 menit dan larutan *destaining* 2 selama 30 menit. Setelah selesai, gel didokumentasikan dengan menggunakan *digital scanner*.

3.5.7 Analisis Ekspresi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan Western Blot

Terlebih dahulu dibuat dapar dan disiapkan bahan-bahan serta alat yang diperlukan untuk *western blot*. Sebelum dilakukan analisis *western blot*, sampel dianalisis dengan SDS PAGE. Kemudian membran nitroselulosa dipotong sesuai ukuran gel dan dibasahi dengan larutan dapar elektroforesis transfer beserta kertas saring whatman dan fiber *pad*.

Setelah SDS PAGE selesai, gel dikeluarkan dari kaca cetakan dan disusun tumpukan untuk *western blot* dalam kaset dengan susunan sebagai berikut: fiber *pad*, kertas saring whatman, gel poliakrilamida, membran nitroselulosa, kertas saring whatman, fiber *pad*. Pada saat menyusun tumpukan, gelembung udara antara gel dan membran dihilangkan. Kemudian kaset gel ditutup dengan rapat agar tumpukan tidak bergeser.

Setelah itu kaset gel dipasang pada alat *western blot* dan dimasukkan wadah yang berisi es ke dalam alat tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam *chamber*. Kemudian *chamber* diisi dengan larutan dapar elektroforesis transfer

hingga kaset gel terendam seluruhnya. Kemudian alat *western blot* dimasukkan ke dalam wadah plastik yang lebih besar dan diberi es batu dan air hingga hampir penuh. Kemudian alat *western blot* dihubungkan dengan elektroda 90 volt selama 2 jam.

Setelah selesai, membran dikeluarkan dari kaset dan direndam dalam larutan susu skim non fat 10% dalam TBS, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang menggunakan rotator. Selanjutnya susu dibuang dan membran dicuci 3 kali dengan tween 0,1% dalam TBS masing-masing dengan interval waktu 5 menit menggunakan rotator pada suhu ruang untuk menghilangkan sisa susu.

Setelah itu dipipet susu skim non fat 10% dalam TBS sebanyak 7 ml ke atas membran dan ditambahkan sebanyak 2 μ l antibodi primer sehingga perbandingan antara antibodi dan susu 1 : 3500. Kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang menggunakan rotator. Selanjutnya campuran susu dan antibodi primer dibuang dan membran dicuci 3 kali dengan tween 0,1% dalam TBS masing-masing dengan interval waktu 5 menit menggunakan rotator pada suhu ruang untuk menghilangkan sisa susu dan antibodi primer.

Selanjutnya dilakukan konjugasi yang bertujuan untuk mendeteksi dan mengikat antibodi primer. Untuk konjugasinya dipipet susu skim non fat 10% dalam TBS sebanyak 7 ml ke atas membran dan ditambahkan sebanyak 2 μ l antibodi sekunder (anti *rabbit* alkaline fosfatase) sehingga perbandingan antara antibodi dan susu 1 : 3500. Kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang menggunakan rotator. Selanjutnya campuran susu dan antibodi sekunder dibuang dan membran dicuci 3 kali dengan tween 0,1% dalam TBS masing-masing dengan interval waktu 5 menit menggunakan rotator pada suhu ruang untuk menghilangkan sisa susu dan antibodi sekunder.

Selanjutnya untuk mendeteksi pita protein, membran direndam dengan menggunakan larutan developer alkaline fosfatase. Perendaman dilakukan pada suhu ruang selama \pm 15 menit atau sampai pita protein tampak jelas. Perendaman tidak boleh ada cahaya karena dapat menyebabkan reaksi deteksi ini berhenti. Pita protein yang positif mengandung G-CSF rekombinan akan tampak berwarna ungu.

Setelah selesai membran dicuci dengan tween 0,1% dalam TBS atau aquadest steril untuk menghentikan reaksi deteksi. Perendaman dengan developer tidak boleh terlalu lama karena dapat menyebabkan warna gelap pada membran sehingga pita protein tidak jelas. Setelah selesai, membran didokumentasikan menggunakan *digital scanner*.

3.5.8 Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan

3.5.8.1 Presipitasi Protein G-CSF Rekombinan dengan Beberapa Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat

Presipitasi protein G-CSF rekombinan dilakukan dengan penambahan garam amonium sulfat jenuh (*salting-out*) yang konsentrasinya divariasikan untuk melihat pada konsentrasi berapa protein paling banyak mengendap. Konsentrasi amonium sulfat yang digunakan adalah 40%, 60% dan 80%.

Sampel tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan amonium sulfat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga larut. Setelah itu inkubasi sampel selama semalam sambil tetap diaduk dengan *magnetic stirrer*. Pengendapan ini dilakukan di ruang suhu 4 °C. Selanjutnya pindahkan sampel ke tabung sentrifus dan sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Kemudian larutkan sampel dengan dapar PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4 sebanyak 1 ml hingga seluruh endapan protein larut.

3.5.8.2 Dialisis Protein G-CSF Rekombinan Hasil Presipitasi Dengan Amonium Sulfat

Dialisis bertujuan untuk membuang sisa-sisa garam pada saat presipitasi agar tidak mengganggu protein. Sampel protein yang telah dilarutkan dengan larutan PBS pH 7,4 kemudian dimasukkan ke dalam kantong dialisis. Kantong dialisis merupakan membran semipermeabel yang memiliki ukuran pori 3500 Da, dimana protein yang berukuran 3500 Da atau kurang dari itu akan keluar melewati pori membran sedangkan protein dengan ukuran molekul lebih besar akan tertahan di dalam kantong dialisis. Selanjutnya kantong dialisis dimasukkan ke dalam gelas beker yang telah berisi 500 ml larutan PBS pH 7,4 sambil diaduk

dengan *magnetic stirrer*. Dialisis dilakukan selama 2 hari dengan mengganti larutan PBS pH 7,4 setiap 24 jam. Setelah didialisis maka sampel bertambah volumenya. Pertambahan volume tiap sampel berbeda-beda. Untuk menyeragamkan volume sampel tersebut, maka masing-masing ditambahkan dapar PBS pH 7,4 hingga volume akhir masing-masing sampel menjadi 5 ml. Dari hasil pemekatan dengan amonium sulfat diatas maka didapat faktor pemekatan sampel 10 kali.

3.5.8.3 Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan dengan Teknik Kromatografi Afinitas Menggunakan Resin Ni-NTA

Sebelum memulai purifikasi protein maka terlebih dahulu disiapkan dapar pengikat, dapar pencuci dan dapar elusi. Setelah itu disiapkan kolom polipropilen ukuran 10 ml dan dipasangkan pada statif dan klem. Kemudian dipipet bubuk resin Ni-NTA sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam kolom. Bubur resin Ni-NTA disimpan dalam wadah yang berisi matriks Ni-NTA dan etanol 20% dengan perbandingan 1 : 1. Jadi apabila diambil sebanyak 2 ml berarti matriks Ni-NTA hanya 1 ml. Sebelum purifikasi dimulai maka matriks harus di preparasi dan dicuci untuk menghilangkan etanol dan siap untuk dipurifikasi.

Kolom yang berisi bubuk resin dibuka tutup bagian bawah dan atasnya sehingga etanol mengalir mengikuti laju gravitasi. Kemudian cuci matriks dengan menggunakan aquadest steril sebanyak 2 ml, buka tutup kolom dan buang aquadest. Lakukan langkah ini sebanyak 2 kali, hingga seluruh etanol yang tersisa habis.

Selanjutnya masukkan dapar pengikat sebanyak 1 ml, buka tutup kolom dan buang dapar pengikat. Lakukan langkah ini sebanyak 2 kali hingga matriks benar-benar bersih dan siap untuk digunakan.

Setelah itu sampel protein G-CSF rekombinan yang telah dipekatkan dengan amonium sulfat konsentrasi 80% dimasukkan sebanyak 4 ml. Biarkan sampel dan matriks terikat dengan cara diagitasi perlahan selama 6 jam. Kemudian buka tutup kolom dan tampung supernatan di tabung eppendorf. Setelah itu dapar pencuci dimasukkan sebanyak 500 μ l ke dalam kolom. Kemudian buka tutup kolom dan tampung di tabung eppendorf. Lakukan langkah

ini sebanyak 3 kali pada tabung yang terpisah. Selanjutnya elusi sampel dengan dapar elusi yang mengandung imidazol dengan konsentrasi 500 mM sebanyak 200 μ l. Kemudian buka tutup kolom dan tampung di tabung eppendorf. Lakukan langkah ini sebanyak 6 kali pada tabung yang terpisah. Semua fraksi yang telah ditampung di tabung eppendorf kemudian disimpan di lemari pendingin pada suhu 4 °C untuk dianalisis menggunakan SDS PAGE dan *slot blot* untuk melihat hasil purifikasi.

3.5.9 Penentuan Protein Total Menggunakan Metoda Bicinchoninic Acid (BCA)

Penentuan kadar protein dengan metode Bicinchoninic (BCA) didasarkan atas pengukuran serapan pada panjang gelombang 562 nm dari senyawa kompleks antara protein dengan *working reagent* sehingga menghasilkan warna ungu dalam suasana basa. Adapun *working reagent* terdiri dari reagen A (Na_2CO_3 , NaHCO_3 , *bicinchoninic acid* dan natrium tartrat dalam 0.1 M NaOH) dan reagen B (4% CuSO_4). Kedua reagen tersebut dicampur dengan perbandingan (reagen A : reagen B) 50 : 1 lalu dikocok hingga campuran berwarna hijau jernih. Campuran ini disebut *working reagent*.

Selanjutnya dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai protein standar. Larutan stok BSA adalah 2000 μ g/ml. Kemudian dibuat seri pengenceran larutan stok dengan konsentrasi akhir BSA 10 μ g/ml; 12,5 μ g/ml; 15 μ g/ml; 20 μ g/ml; 25 μ g/ml; 30 μ g/ml.

Untuk membuat seri konsentrasi BSA, maka sejumlah tertentu larutan stok BSA dipipet dan dimasukkan ke dalam tube eppendorf. Kemudian dipipet *working reagent* dengan perbandingan (volume BSA : volume *working reagent*) adalah 1 : 8. Setelah itu ditambahkan aquabidest hingga volume 1 ml dan tabung di bolak-balik hingga larutan tercampur. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C. Sebanyak 600 μ l campuran dipipet ke dalam cuvet semimikro dan diukur serapannya pada panjang gelombang 562 nm. Selanjutnya dibuat persamaan kurva kalibrasi dari hasil serapan yang diperoleh. Hal yang sama juga dilakukan terhadap sampel.

3.5.10 Analisis Hasil Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan Elektroforesis Gel Poliakrilamid (SDS PAGE)

Penyiapan larutan, dapar dan preparasi gel penahan dan gel pemisah untuk SDS PAGE sama seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Konsentrasi gel penahan yang digunakan adalah 3,9% dan gel pemisah adalah 15%. Kaca cetakan untuk gel yang digunakan dengan ukuran tebal 1,5 mm, sehingga tebal gel yang dihasilkan adalah 1,5 mm. Maksimal volume sampel yang dapat dimuatkan ke dalam sumuran adalah 40 μ l.

Sebanyak 50 μ l sampel yang telah dipurifikasi dengan resin Ni-NTA ditambahkan dengan 10 μ l *Reducing Sample Buffer* (RSB). Campuran itu kemudian dipanaskan dalam air suhu 95 $^{\circ}$ C selama 10 menit, kemudian sampel tersebut dipipet sebanyak 40 μ l dan dimasukkan ke dalam tiap-tiap sumuran gel poliakrilamid. Untuk penanda/marker protein dipipet sebanyak 5 μ l.

Setelah itu alat dihubungkan dengan elektroda pada tegangan 90 volt selama \pm 120 menit atau telah mencapai batas bawah gel pemisah. Setelah selesai, gel poliakrilamid diwarnai dengan cara dimasukkan ke dalam wadah yang berisi larutan *Commasie Brilliant Blue* (CBB) selama semalam. Kemudian gel dicuci dengan larutan *destaining 1* selama 30 menit dan larutan *destaining 2* selama 30 menit. Setelah selesai, gel didokumentasikan menggunakan *digital scanner*.

3.5.11 Analisis Hasil Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan Slot Blot

Metode *slot blot* dapat digunakan untuk mendeteksi protein rekombinan secara kualitatif. Prosedur kerja *slot blot* dilakukan sesuai dengan prosedur dari Amersham Biosciences. Alat *slot blot* disiapkan dan diletakkan kertas saring yang telah dibasahi dengan larutan dapar *Tris Buffer Saline* (TBS). Setelah itu diletakkan membran nitroselulosa di atas kertas saring tersebut, lalu alat dipasang dan dihubungkan dengan pompa vakum. Sebanyak 100 μ l larutan protein dimasukkan ke dalam sumuran. Pompa vakum dinyalakan agar protein tertransfer ke membran nitroselulosa. Pompa vakum dimatikan jika semua sampel sudah tertransfer ke membran.

Membran dikeluarkan dari alat *slot blot* dan direndam dalam larutan susu skim non fat 10% dalam TBS, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang menggunakan rotator. Selanjutnya susu dibuang dan membran dicuci 3 kali dengan tween 0,1% dalam TBS masing-masing dengan interval waktu 5 menit menggunakan rotator pada suhu ruang untuk menghilangkan sisa susu.

Setelah itu dipipet susu skim non fat 10% dalam TBS sebanyak 7 ml ke atas membran dan ditambahkan sebanyak 2 μ l antibodi primer sehingga perbandingan antara antibodi dan susu 1 : 3500. Kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang menggunakan rotator. Selanjutnya campuran susu dan antibodi primer dibuang dan membran dicuci 3 kali dengan tween 0,1% dalam TBS masing-masing dengan interval waktu 5 menit menggunakan rotator pada suhu ruang untuk menghilangkan sisa susu dan antibodi primer.

Selanjutnya dilakukan konjugasi yang bertujuan untuk mendeteksi dan mengikat antibodi primer. Untuk konjugasinya dipipet susu skim non fat 10% dalam TBS sebanyak 7 ml ke atas membran dan ditambahkan sebanyak 2 μ l antibodi sekunder (anti *rabbit* alkalin fosfatase) sehingga perbandingan antara antibodi dan susu 1 : 3500. Kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang menggunakan rotator. Selanjutnya campuran susu dan antibodi sekunder dibuang dan membran dicuci 3 kali dengan tween 0,1% dalam TBS masing-masing dengan interval waktu 5 menit menggunakan rotator pada suhu ruang untuk menghilangkan sisa susu dan antibodi sekunder.

Selanjutnya untuk mendeteksi pita protein, membran direndam dengan menggunakan larutan developer alkalin fosfatase. Perendaman dilakukan pada suhu ruang selama \pm 15 menit atau sampai pita protein tampak jelas. Perendaman tidak boleh ada cahaya karena dapat menyebabkan reaksi deteksi ini berhenti. Sampel protein positif mengandung G-CSF rekombinan jika terbentuk warna ungu.

Setelah selesai membran dicuci dengan tween 0,1% dalam TBS atau aquadest steril untuk menghentikan reaksi deteksi. Perendaman dengan developer tidak boleh terlalu lama karena dapat menyebabkan warna gelap pada membran sehingga pita protein tidak jelas. Setelah selesai, membran didokumentasikan menggunakan *digital scanner*.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pembiakan Kultur *P. pastoris*

Tahap awal penelitian ini adalah pembiakan galur *P. pastoris* GS115 non transforman dan transforman (pPICZ α -G-CSF-Ye-04). Galur non transforman ditumbuhkan pada medium YPD agar yang mengandung ampisilin dengan konsentrasi 0,05 $\mu\text{g/ml}$ yang berfungsi untuk mencegah pertumbuhan bakteri, sedangkan pada galur transforman selain mengandung ampisilin dengan konsentrasi 0,05 $\mu\text{g/ml}$ juga mengandung *zeocin* dengan konsentrasi 0,1 $\mu\text{g/ml}$. *Zeocin* yang ditambahkan berfungsi sebagai penyeleksi terhadap galur transforman dan non transforman. Pada medium YPD agar biakan kultur *P. pastoris* berupa koloni-koloni yang berwarna putih kekuningan, berbentuk bulat dengan tekstur lembut. Berdasarkan Mycobank (2011), koloni *P. pastoris* memiliki warna koloni putih kekuningan, tidak berfilamen dan bertekstur lembut..

4.2. Produksi Sel *P. pastoris* dan Produksi Protein G-CSF Rekombinan Skala Kecil

Selanjutnya dari hasil pembiakan kultur *P. pastoris*, diambil *single colony* untuk ditumbuhkan dalam medium cair. Pada tahap inilah dilakukan produksi sel dan produksi protein rekombinan.

Pada penelitian ini ada dua fase yang dilakukan yaitu memproduksi sel *P. pastoris* dan protein G-CSF rekombinan. Untuk memproduksi sel *P. pastoris* digunakan medium kompleks BMGY cair. Medium BMGY mengandung gliserol sebagai sumber karbon yang dapat memacu pertumbuhan sel. Menurut Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L., & Valero, F. (2006) bahwa gliserol yang digunakan sebagai sumber karbon pada medium BMGY dapat menstimulasi pertumbuhan sel lebih maksimum dibandingkan bila menggunakan metanol sebagai sumber karbon, hal ini disebabkan karena adanya gliserol dapat menekan gen *AOX* pada *P. pastoris*. Menurut Hartner, F.S., & Glieder, A. (2006) dan Jungo, C. (2007) kedua gen *AOX1* dan *AOX2* pada *P. pastoris* ditekan selama fase ini oleh karena

adanya gliserol. Jadi pada fase ini gliserol yang digunakan sebagai sumber karbon hanya dipakai untuk peningkatan pertumbuhan sel sebelum dilakukan induksi. Pertumbuhan sel *P. pastoris* dilakukan mulai dari tahap pra inokulum selama 24 jam, inokulum selama 24 jam dan kultur produksi sel selama 24 jam. Menurut Bahrami, A., Shojaosadati, S.A., Khalilzadeh, R., & Farahani, E.V. (2008) laju pertumbuhan sel *P. pastoris* yang maksimal sebelum induksi akan meningkatkan produksi protein G-CSF rekombinan. Menurut Holmes, W.J., Darby, R.A.J, Wilks, M.D.B, Smith, R., & Bill, R.M. (2009) peningkatan biomasa sel pra induksi akan meningkatkan protein rekombinan.

Pada fase induksi medium yang digunakan adalah medium kompleks BMMY cair. Medium ini mengandung metanol sebagai sumber karbon. Kultur sel pada medium BMGY dipanen dengan cara disentrifus pada suhu 4 °C dengan kecepatan 6000 rpm. Kemudian pelet sel diresuspensikan ke dalam medium BMMY. Setelah itu kultur dalam medium BMMY ini diinduksi dengan metanol konsentrasi 0,5% tiap 12 jam. Konsentrasi metanol yang digunakan tidak boleh terlalu tinggi karena konsentrasi metanol yang terlalu tinggi akan menjadi toksik terhadap sel sehingga menyebabkan produksi protein terhambat. Menurut Cregg, J. (2011) penambahan metanol lebih dari 4% – 5% akan menyebabkan toksisitas pada sel sehingga ekspresi protein akan terganggu.

Pada penelitian ini kultur diinduksi selama 48 jam. Waktu induksi yang dipilih selama 48 jam karena induksi yang terlalu lama akan menyebabkan peningkatan enzim protease yang disekresikan ke dalam medium sehingga akan semakin meningkat pula protein rekombinan yang terdegradasi. Hasil analisis *western blot* penelitian Januari, A.D. (2011) menunjukkan pita protein G-CSF rekombinan semakin menipis setelah diinduksi lebih dari 48 jam. Hasil penelitian Sinha, J., Plantz, B.A., Inan, M., & Meagher, M.M. (2004) protein rekombinan yang disekresikan oleh *P. pastoris* semakin terdegradasi setelah 48 jam diinduksi dan laju degradasi semakin meningkat sampai akhir fermentasi yaitu pada jam ke-72. Penyebab terdegradasinya protein rekombinan karena adanya protease. Pada medium yang mengandung gliserol sebagai sumber karbon protease yang dihasilkan lebih rendah daripada medium yang mengandung metanol sebagai sumber karbon, sehingga dapat disimpulkan bahwa metanol memberikan

kontribusi dalam peningkatan aktivitas proteolitik sehingga menyebabkan degradasi protein rekombinan. Hasil

Menurut Bahrami, A., Shojaosadati, S.A., Khalilzadeh, R., Saeedinia, A.R., Farahani, E.V., & Mohammadian-Mosaabadi, J. (2007) *P. pastoris* diketahui dapat tumbuh pada rentang pH yang luas, yaitu dari pH 3 hingga 7. Namun penggunaan pH yang tidak sesuai telah terbukti secara signifikan mempengaruhi protein rekombinan yang disekresikan akibat aktivitas dari enzim protease dalam medium. Invitrogen (2001a) menyatakan penggunaan medium yang diatur pH-nya dengan larutan dapar pada pH 6,0 akan menghambat kerja dari enzim protease yang disekresikan ke dalam medium, sehingga protein G-CSF rekombinan yang disekresikan tidak langsung terdegradasi. Berdasarkan hal itu pada penelitian ini medium yang digunakan pada proses produksi sel maupun ketika proses induksi merupakan *buffer medium* yaitu medium yang diatur pada pH 6,0. Pengaturan ini dimaksudkan untuk mengoptimalkan produksi protein G-CSF rekombinan. Dalam penelitian ini pH awal kultur induksi dari jam ke-0 hingga 24 adalah 6,0. Peningkatan pH terjadi pada induksi jam ke-36 hingga waktu panen kultur pada jam ke-48, yaitu menjadi 6,5.

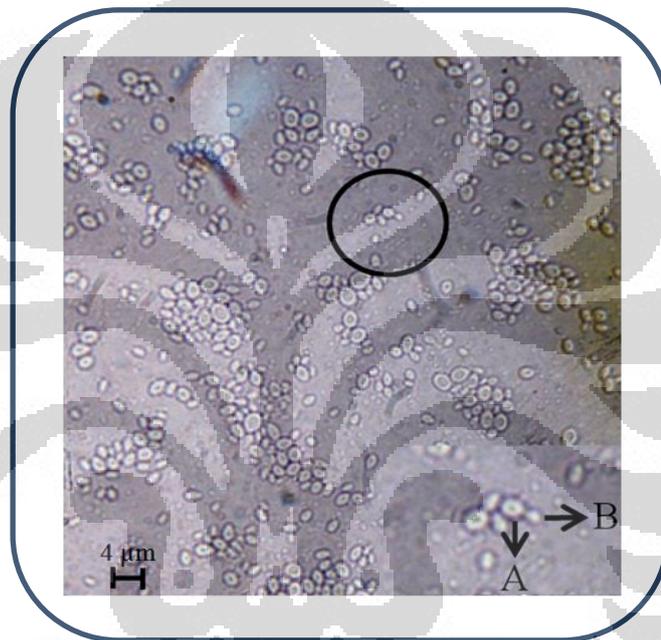
Menurut Jenzsch, M., Lange, M., Bär, J., Rahfeld, J.-U., & Lübbert, A. (2004) dalam pertumbuhannya *P. pastoris* membutuhkan oksigen terutama dalam proses metabolisme metanol sebagai sumber karbon, sehingga diperlukan aerasi yang cukup. Dalam penelitian ini kultur dikocok dengan kecepatan 175 rpm untuk memenuhi kebutuhan oksigen kultur.

Kultur yang telah diinduksi selama 48 jam kemudian dipanen dengan cara sentrifus agar terpisah antara supernatan dan selnya. Dalam penelitian ini hanya supernatan yang mengandung protein G-CSF rekombinan yang dianalisis lebih lanjut, sedangkan selnya tidak digunakan. Selanjutnya supernatan yang mengandung protein G-CSF rekombinan ini disimpan dalam lemari pendingin suhu 4 °C agar tidak terdenaturasi.

4.3. Pengamatan Sel *P. pastoris* Secara Mikroskopis

Selanjutnya sel dari hasil produksi protein yang telah dipanen tersebut diambil sedikit selnya untuk diamati dengan menggunakan mikroskop.

Pengamatan sel *P. pastoris* secara mikroskopis bertujuan untuk mengetahui karakter morfologi selnya. Menurut Mycobank (2011) sel *P. pastoris* berbentuk oval dengan tunas multipolar. Pada pengamatan sel *P. pastoris* dari kultur cair yang berumur 48 jam menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali sel *P. pastoris* berbentuk oval dan memiliki sel tunas. Adanya sel tunas menunjukkan bahwa pertumbuhan masih berlangsung pada saat pemanenan. Sel tunas berukuran lebih kecil daripada sel induk dan melekat pada sel induk. Hanya sebuah sel tunas yang menempel pada satu sel induk



Keterangan: Pengamatan terhadap sel *P. pastoris* transforman memperlihatkan adanya sel tunas dan sel induk. Sel tunas berasal dari sel induk dan berukuran lebih kecil. Sel induk (A) dan sel tunas (B).

Gambar 4.1 Morfologi sel *P. pastoris* dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali

4.4. Pengukuran Berat Kering Sel

Pengukuran berat kering sel dilakukan untuk mengetahui berat kering sel dari kultur yang diinduksi menggunakan metanol konsentrasi 0,5% tiap 12 jam.

Berdasarkan data nilai OD₆₀₀ kultur induksi didapatkan total berat kering sel yang diinduksi tiap 12 jam. Pertumbuhan sel *P. pastoris* transforman dan non transforman yang diinduksi hingga umur kultur mencapai 48 jam terlihat semakin meningkat. Berat kering sel tertinggi *P. pastoris* transforman dicapai pada umur

kultur 48 jam, yaitu 6,3806 mg/ml, sedangkan pada non transforman 5,3153 mg/ml. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kultur setelah berumur 48 jam masih menunjukkan pertumbuhan. Kultur transforman mengalami peningkatan jumlah sel tertinggi pada induksi jam ke-0 hingga 12. Setelah itu peningkatan sel tidak terlalu tinggi, namun cukup stabil. Peningkatan sel terendah yaitu pada induksi jam ke-12 hingga 24. Sedangkan pada kultur non transforman peningkatan jumlah sel cukup stabil pada tiap rentang waktu induksi. Peningkatan jumlah sel terendah terjadi pada jam induksi yang sama dengan kultur transforman, yaitu jam ke-12 hingga 24.

4.5. Presipitasi Protein G-CSF Rekombinan yang Diinduksi Menggunakan Metanol 0,5% Tiap 12 Jam dengan Larutan *Trichloroacetic Acid* (TCA)

Selanjutnya supernatan protein rekombinan hasil induksi tiap 12 jam dianalisis dengan SDS PAGE dan *western blot*. Sebelum dianalisis dengan SDS PAGE dan *western blot*, supernatan tersebut dipresipitasi terlebih dahulu dengan larutan TCA 100%. Presipitasi ini bertujuan untuk meningkatkan konsentrasi protein. Protein yang terlalu sedikit dalam sampel dapat mengakibatkan pita protein yang dihasilkan tipis atau tidak terlihat, sedangkan protein yang terlalu banyak dalam sampel mengakibatkan pita yang sangat tebal dan berimpit satu sama lain membentuk noda yang besar dan menyatu, sehingga tidak terlihat dengan jelas pemisahan antara pita yang satu dengan lainnya. Hal ini terjadi karena gel poliakrilamid memiliki keterbatasan kapasitas terhadap protein (Caprette, D. R., 2005).

Endapan protein rekombinan dari hasil presipitasi dengan larutan TCA dicuci dengan larutan etanol absolut untuk menghilangkan kelebihan TCA, garam-garam dan zat pengotor yang bukan protein. Setelah itu endapan dikeringanginkan di suhu ruang hingga larutan etanol menguap. Dari hasil eksperimen presipitasi supernatan protein rekombinan dengan larutan TCA 100% yang dilakukan, sebanyak 800 µl supernatan protein rekombinan menghasilkan pita yang cukup baik pada gel poliakrilamid.

4.6. Analisis Ekspresi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan Elektroforesis Gel Poliakrilamid (SDS PAGE)

Selanjutnya endapan protein rekombinan yang telah dipresipitasi dengan larutan TCA dilarutkan dengan *Reducing Sample Buffer* (RSB) yang mengandung *reducing agent* berupa 2-merkaptotanol yang berfungsi untuk memutuskan ikatan disulfida dalam struktur protein sehingga protein terurai membentuk rantai polipeptida yang lurus. Sedangkan SDS yang terkandung dalam RSB berfungsi untuk menyelubungi molekul protein dengan muatan negatif. Hal ini bertujuan agar protein memiliki mobilitas elektroforetik sehingga dapat bergerak dari katoda menuju anoda saat dielektroforesis. Pemanasan pada suhu 95 °C bertujuan untuk lebih mendenaturasi protein. Dalam RSB juga terkandung gliserol yang berfungsi sebagai pemberat, sehingga protein dapat turun ke sumuran saat dimuatkan dan tetap berada di dasar sumuran (Caprette, D. R., 2005).

Gel poliakrilamid terbentuk dari monomer akrilamid dan bisakrilamid. Proses polimerisasi adalah reaksi berantai radikal bebas yang diprakarsai oleh amonium persulfat dan TEMED (Walker, J.M., 1986). Persentase gel yang digunakan pada penelitian ini adalah 15%. Persentase gel yang digunakan tergantung pada berat molekul dari protein yang dianalisis. Semakin tinggi persentase gel, semakin kecil ukuran pori-porinya dan semakin baik dalam memisahkan molekul yang berukuran kecil. Gel 15% baik untuk memisahkan protein dengan ukuran mulai dari 12000 hingga 45000 dalton (Holme, D.J., & Hazel Peck, 1998; Caprette, D. R., 2005). Lempengan gel ada dua bagian, yaitu bagian atas dan bagian bawah. Bagian atas adalah gel penahan dengan persentase 3,9%. Pada gel penahan inilah terdapat sumuran untuk memuatkan sampel yang dibentuk oleh sisir pada saat reaksi polimerisasi. Setiap sampel protein yang dimuatkan ke dalam sumur akan melalui gel penahan yang berfungsi mengumpulkan sampel protein sehingga bergerak bersamaan pada saat proses elektroforesis berlangsung sebelum memasuki gel pemisah. Sedangkan bagian bawah adalah gel pemisah dengan persentase 15%. Sesuai dengan namanya gel ini berfungsi memisahkan molekul protein berdasarkan berat molekulnya (Walker, J.M., 1986).

Hasil visualisasi SDS PAGE memperlihatkan pita protein kontrol positif filgrastim terletak sejajar dengan pita marker protein ukuran 18,5 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa berat molekul filgrastim adalah 18,5 kDa. Pita protein *P. pastoris* transforman pada induksi jam ke-0, 12, 24, 36 dan 48 didapatkan pita-pita protein dengan ukuran yang beragam. Menurut Carter, C.R.D., Whitmore, K.M. & Thorpe, R. (2004) berat molekul protein G-CSF adalah 18 – 20 kDa. Hasil visualisasi SDS PAGE tidak terlihat jelas (samar) pita protein dengan berat molekul 18,5 kDa pada *P. pastoris* transforman yang diinduksi dari jam ke-0 hingga 48. Pita protein yang samar disebabkan karena konsentrasi protein yang rendah, sedangkan protein lain yang dihasilkan oleh *P. pastoris* terlihat lebih tebal. Beberapa pita protein kurang tajam dan melebar (*smear*). Hal ini dapat terjadi karena proses SDS-PAGE yang kurang baik.



Keterangan: (M) Marker protein *prestained low molecular* [BioRad]; (F) Filgrastim; (1) Supernatan *P. pastoris* transforman yang diinduksi pada jam ke- 0; (2) jam ke-12; (3) jam ke-24; (4) jam ke-36; (5) jam ke-48; (6) Supernatan *P. pastoris* non transforman yang diinduksi pada jam ke-0; (7) jam ke-24; (8) jam ke-48.

Gambar 4.2 SDS PAGE ekspresi protein G-CSF rekombinan yang diinduksi menggunakan metanol konsentrasi 0,5% tiap 12 jam

P. pastoris transforman memiliki pita protein mencolok yang cukup tebal pada daerah ukuran antara 27,5 kDa hingga 32,5 kDa dan pada ukuran 49,5 kDa.

Pita protein tersebut mulai terlihat pada induksi jam ke-12 dan semakin tebal seiring waktu induksi. Pita protein tersebut terlihat paling tebal pada akhir induksi yaitu jam ke-48.

Sebagai kontrol negatif, *P. pastoris* non transforman yang telah diinduksi dengan waktu dan cara yang sama dengan transforman juga dianalisis dengan SDS PAGE untuk membandingkan ekspresi protein yang dihasilkan. Hasil Visualisasi SDS PAGE *P. pastoris* non transforman pada induksi jam ke-0, 24 dan 48 jam menunjukkan adanya pita-pita protein tetapi lebih tipis dan berbeda profilnya dari pita protein *P. pastoris* transforman. Supernatan *P. pastoris* non transforman yang dianalisis dengan SDS PAGE adalah hasil induksi jam ke-0, 24 dan 48. Untuk mendeteksi protein G-CSF rekombinan secara spesifik maka dilakukan analisis dengan metoda *western blot*.

4.7. Analisis Ekspresi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan *Western Blot*

Selain dengan SDS PAGE, keberadaan protein rekombinan juga dapat dianalisis menggunakan metoda *western blot*. Namun adanya protein yang memiliki berat molekul yang sama atau hampir sama dengan protein target akan mempengaruhi ketebalan pita protein rekombinan yang dianalisis dengan SDS PAGE. Tetapi pada metoda *western blot* hal tersebut tidak terjadi karena deteksi protein menggunakan antibodi yang secara spesifik mengenali protein target.

Metoda SDS-PAGE digunakan untuk melihat profil protein secara keseluruhan, sedangkan metoda *western blot* digunakan untuk mendeteksi protein rekombinan secara spesifik. Deteksi protein tertentu secara spesifik dapat dilakukan karena protein rekombinan dapat berikatan dengan antibodi spesifik. Analisis *western blot* terhadap protein G-CSF rekombinan dilakukan dengan menggunakan antibodi yang spesifik, yaitu antibodi G-CSF sebagai antibodi primer dan *anti rabbit alkaline phosphatase* konjugat sebagai antibodi sekunder.

Hasil pengamatan dengan menggunakan metoda *western blot* menunjukkan adanya protein G-CSF rekombinan dengan berat molekul sekitar 18,8 kDa. Pita protein G-CSF rekombinan ini mulai terlihat pada induksi jam ke-24 dan terlihat paling tebal pada lajur ke-5 yaitu waktu induksi jam ke-48. Hal ini

menunjukkan bahwa protein G-CSF rekombinan yang dihasilkan menunjukkan peningkatan tiap 12 jam induksi dan paling banyak pada induksi jam ke-48. Pita yang terdeteksi tidak lurus dan melebar (*smear*). Hal ini dapat diakibatkan oleh proses SDS-PAGE yang kurang baik, sehingga mempengaruhi hasil *western blot*.

Pada lajur ke-6 hingga ke-8 merupakan hasil ekspresi *P. pastoris* non transforman yang diinduksi pada jam ke-0, 24 dan 48. Hasil analisis dengan *western blot* tidak menunjukkan adanya pita protein. Hal tersebut membuktikan bahwa *P. pastoris* non transforman tidak mengekspresikan protein G-CSF, sehingga tidak bereaksi dengan antibodi yang digunakan. *P. pastoris* non transforman tidak membawa vektor rekombinan yang mengandung gen sintetik CSF3syn, sehingga tidak menghasilkan protein G-CSF.

Filgrastim digunakan sebagai kontrol positif pada analisis dengan metoda *western blot* ini. Tetapi pita protein filgrastim pada lajur F tidak terdeteksi. Hal tersebut dapat disebabkan karena filgrastim tidak terikat pada membran nitroselulosa yang digunakan pada *western blot*.



Keterangan: (M) Marker protein *prestained low molecular* [BioRad]; (F) Filgrastim; (1) Supernatan *P. pastoris* transforman yang diinduksi pada jam ke- 0; (2) jam ke-12; (3) jam ke-24; (4) jam ke-36; (5) jam ke-48; (6) Supernatan *P. pastoris* non transforman yang diinduksi pada jam ke-0; (7) jam ke-24; (8) jam ke-48.

Gambar 4.3 *Western Blot* ekspresi protein G-CSF rekombinan yang diinduksi menggunakan metanol konsentrasi 0,5% tiap 12 jam

4.8. Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan

4.8.1 Presipitasi Protein G-CSF Rekombinan dengan Beberapa Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat

Tahap selanjutnya adalah presipitasi protein G-CSF rekombinan dari hasil induksi selama 48 jam. Sebanyak 50 ml supernatan yang mengandung protein G-CSF rekombinan dipresipitasi dengan amonium sulfat. Proses *salting-out* dengan amonium sulfat ini dimaksudkan untuk memekatkan fraksi protein.

Perhitungan berat amonium sulfat yang ditimbang untuk membuat konsentrasi tertentu diambil dari tabel jumlah amonium sulfat yang diperlukan untuk mencapai derajat kejenuhan (GE Healthcare, 2007). Untuk membuat amonium sulfat konsentrasi 40%, ditimbang sebanyak 242 gr amonium sulfat per liter, untuk amonium sulfat konsentrasi 60%, ditimbang sebanyak 390 gr amonium sulfat per liter, sedangkan untuk amonium sulfat konsentrasi 80%, ditimbang sebanyak 561 gr amonium sulfat per liter.

Proses presipitasi dengan amonium sulfat ini dilakukan dengan cara menambahkan amonium sulfat ke dalam supernatan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Amonium sulfat ditambahkan sedikit demi sedikit dan dibiarkan hingga larut agar proses pengendapan sempurna. Setelah seluruh amonium sulfat larut, supernatan diinkubasi pada suhu 4 °C selama semalam sambil tetap diaduk dengan *magnetic stirrer*. Proses pengendapan harus dilakukan dalam kondisi dingin agar protein mengendap tanpa mengalami denaturasi.

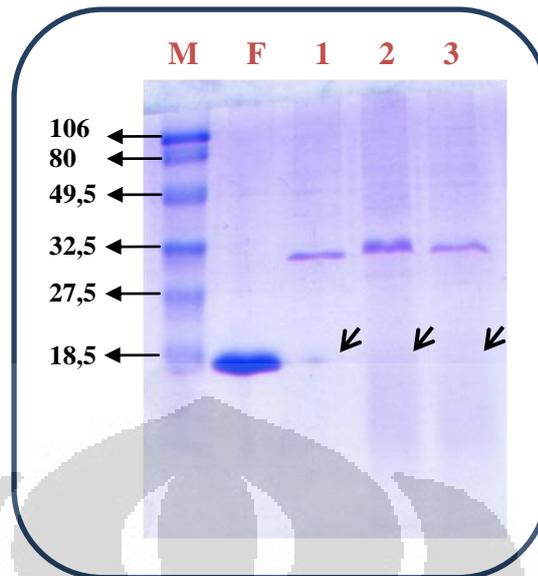
Pengamatan secara visual hasil pengendapan dengan amonium sulfat memperlihatkan perbedaan yang signifikan antara ketiga supernatan. Urutan endapan terbanyak yang diperoleh adalah pada supernatan yang diendapkan dengan 80%, 60% dan 40% amonium sulfat. Kemudian warna endapan juga diamati dan terlihat endapan berwarna krem kecoklatan. Warna endapan pada sampel yang dipekatkan dengan 80% amonium sulfat terlihat lebih gelap dibanding sampel yang dipekatkan dengan 60% amonium sulfat. Warna endapan paling muda terlihat pada sampel yang dipekatkan dengan 40% amonium sulfat.

4.8.2 Dialisis Protein G-CSF Rekombinan Hasil Presipitasi dengan Amonium Sulfat

Selanjutnya protein yang hasil presipitasi dengan amonium sulfat didialisis menggunakan kantong dialisis. Tujuan dari dialisis adalah untuk membuang sisa-sisa garam pada saat presipitasi agar tidak mengganggu protein. Protein yang telah diendapkan dengan amonium sulfat tersebut kemudian dilarutkan dengan larutan PBS sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam kantong dialisis. Kantong dialisis merupakan membran semipermeabel yang memiliki kisaran ukuran pori atau *molecular weight cut off* (MWCO) 3,5 kDa. Protein-protein yang berukuran sekitar 3,5 kDa dan yang lebih kecil dari itu akan dapat melewati membran ini melalui pori-porinya, sedangkan protein yang berat molekulnya lebih besar dari 3,5 kDa akan tertahan di dalam kantong dialisis. Protein target dalam penelitian ini adalah protein G-CSF rekombinan yang berukuran sekitar 18,5 kDa. Protein G-CSF rekombinan ini dapat dipastikan akan tertahan di dalam kantong dialisis karena ukuran pori-pori membran hanya dapat dilewati oleh protein yang berukuran 3,5 kDa atau yang lebih kecil dari itu.

Hasil dialisis menyebabkan volume sampel dalam kantong dialisis bertambah akibat difusi larutan dialisis ke dalam kantong dialisis. Volume hasil dialisis dari sampel tersebut berbeda-beda. Semua sampel yang telah didialisis dipipet ke dalam tube eppendorf dan disamakan volumenya dengan menambahkan dapar PBS, sehingga tiap volume sampel hasil presipitasi dengan amonium sulfat konsentrasi 40%, 60% dan 80% sama banyak. Volume akhir setelah penambahan dapar PBS adalah 5 ml.

Selanjutnya sampel protein tersebut dianalisis dengan SDS PAGE untuk melihat pita protein yang dihasilkan. Hasil visualisasi SDS PAGE tidak menunjukkan pita protein G-CSF rekombinan ukuran 18,5 kDa yang memiliki ketebalan signifikan antara presipitasi dengan amonium sulfat konsentrasi 40%, 60% atau 80%.



Keterangan: **(M)** Marker protein *prestained low molecular* [BioRad]; **(F)** Filgrastim; **(1)** Supernatan *P. pastoris* transforman yang dipekatkan dengan 40% amonium sulfat; **(2)** 60% amonium sulfat; **(3)** 80% amonium sulfat;

Gambar 4.4 SDS PAGE hasil presipitasi protein G-CSF rekombinan dengan amonium sulfat konsentrasi 40%, 60% dan 80%

4.8.3 Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan dengan Teknik Kromatografi Afinitas Menggunakan Resin Ni-NTA

Berdasarkan hasil pengukuran protein total dengan metoda BCA maka sampel protein yang telah dipekatkan dengan amonium sulfat konsentrasi 80% dipilih untuk dipurifikasi. Sassenfeld, H. (1991) menyebutkan bahwa Watson, et al pada tahun 1986 melakukan penelitian untuk mempurifikasi protein G-CSF rekombinan yang sebelumnya dipekatkan menggunakan amonium sulfat dengan konsentrasi 80%. Menurut Seidman, L., & Mowery, J. (2011) umumnya molekul-molekul protein berukuran besar dapat mengendap dengan konsentrasi garam yang rendah, sedangkan protein yang ukuran molekulnya kecil mengendap pada konsentrasi garam yang tinggi.

Purifikasi dilakukan dengan menggunakan resin Ni-NTA (Qiagen) dan His Buffer Kit (GE Healthcare) dengan menggunakan kolom kapasitas 10 ml. Terlebih dahulu disiapkan dapar pengikat, dapar pencuci dan dapar elusi. Dapar pengikat mengandung imidazol dengan konsentrasi final 10 mM, dapar pencuci

mengandung imidazol dengan konsentrasi final 20 mM dan dapat elusi mengandung imidazol dengan konsentrasi final 500 mM.

Tahap pertama adalah mencuci matriks dengan aquadest steril. Tujuan pencucian dengan menggunakan aquadest steril untuk menghilangkan etanol dari matriks agar tidak mengganggu purifikasi protein. Kemudian dimasukkan dapat pengikat ke dalam matriks yang bertujuan agar matriks dapat terikat dengan baik dan menjaga matriks tidak kering.

Selanjutnya memasukkan sampel yang telah dipekatkan dengan 80% amonium sulfat ke dalam kolom yang berisi matriks, kemudian diagitasi perlahan selama kurang lebih 6 jam pada suhu 4 °C. Tujuan agitasi selama 6 jam agar terjadi kontak yang intens antara sampel protein dan matriks, sehingga protein yang terikat pada matriks lebih maksimal. Hal ini dilakukan pada kondisi dingin untuk mencegah protein terdenaturasi. Setelah itu fraksinya ditampung dan disimpan untuk di analisis dengan SDS PAGE dan *slot blot*.

Setelah itu mencuci matriks dengan dapat pencuci yang mengandung imidazol dengan konsentrasi 20 mM. Tujuannya adalah untuk menghilangkan protein-protein non spesifik. Fraksi yang diperoleh kemudian ditampung dan disimpan untuk dianalisis dengan SDS PAGE dan *slot blot*.

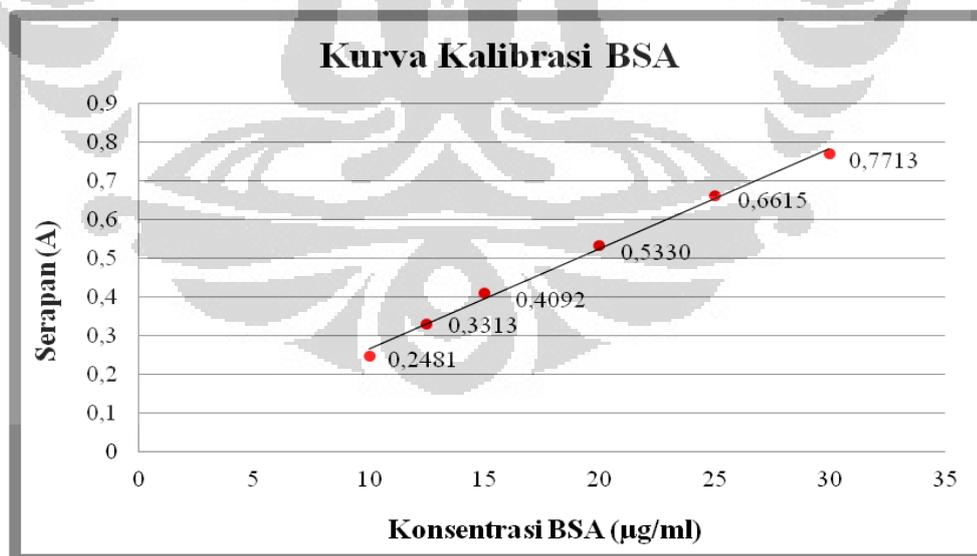
Selanjutnya matriks dielusi dengan dapat elusi yang mengandung imidazol dengan konsentrasi 500 mM. Protein rekombinan yang tertahan dalam kolom dapat dilepaskan dari ion logam Ni^{2+} dengan zat yang dapat berkompetisi dalam hal berikatan dengan ion Ni^{2+} . Salah satu zat yang memiliki afinitas yang kuat terhadap logam Ni^{2+} yaitu imidazol konsentrasi tinggi, sehingga ikatan antara *tag* asam amino histidin dengan ion logam digantikan oleh imidazol. Konsentrasi imidazol yang tinggi diperlukan agar dapat melepaskan ikatan antara protein rekombinan dengan logam Ni^{2+} (Mikkelsen, S.R., & E. Corton, 2004). Fraksi protein rekombinan hasil elusi kemudian ditampung dalam tube eppendorf untuk selanjutnya dianalisis dengan metoda SDS PAGE dan *slot blot*.

Teknik pemurnian kolom afinitas atau yang dikenal dengan nama *Immobilized Metal-chelate Affinity Chromatography* (IMAC), dimana protein yang mengandung deretan asam amino histidin akan berikatan secara reversibel dengan ion logam Ni^{2+} yang terdapat pada matriks. Protein rekombinan yang

telah dikonstruksi dengan suatu *tag* berupa deretan asam amino histidin dapat dimurnikan dengan teknik ini karena *tag* yang berupa deretan asam amino histidin sebanyak 6 kali pada protein rekombinan akan berikatan secara reversibel dengan ion logam Ni^{2+} sehingga tertahan dalam kolom. Sementara itu protein-protein lain yang tidak memiliki *tag* asam amino histidin akan lolos dari kolom karena tidak membawa *tag* berupa deretan asam amino histidin tersebut. Protein rekombinan yang tertahan dalam kolom dapat dilepaskan dari ion logam Ni^{2+} dengan zat yang afinitas ikatannya lebih besar terhadap logam Ni^{2+} yaitu imidazol dengan konsentrasi tinggi. Ikatan antara *tag* asam amino histidin dengan ion logam Ni^{2+} akan digantikan oleh imidazol, sehingga protein target akan terelusi (Mikkelsen, S.R., & E. Corton, 2004).

4.9 Penentuan Protein Total Menggunakan Metoda Bicinchoninic Acid (BCA)

Selanjutnya fraksi protein hasil dialisis diukur konsentrasi protein totalnya dengan menggunakan metoda Bicinchoninic Acid (BCA). Presipitasi dengan amonium sulfat menghasilkan fraksi protein dengan pemekatan 10 kali dari semula.

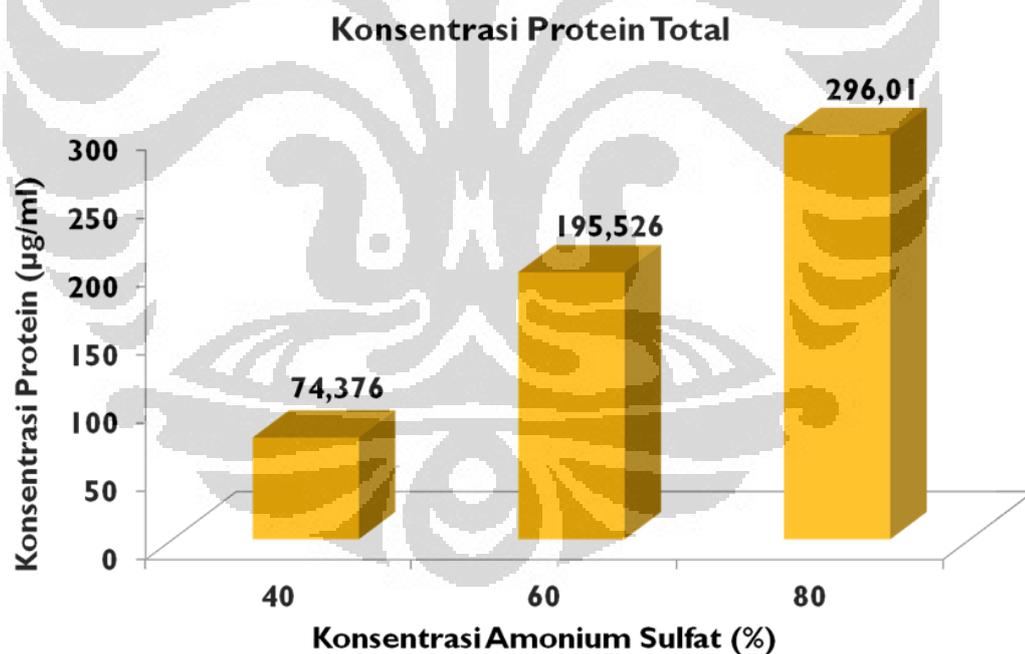


Keterangan: $a = 0,00597$; $b = 0,02594$; $r = 0,99805$
 $Y = 0,00597 + 0,02594.X$

Gambar 4.5 Kurva kalibrasi *Bovine Serum Albumin* (BSA) diukur pada panjang gelombang 562 nm

Sebelumnya dibuat seri pengenceran larutan standar *Bovine Serum Albumin* (BSA). Absorbansi yang dihasilkan oleh larutan standar BSA dibuat persamaan kurva kalibrasinya untuk menentukan konsentrasi protein sampel. Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh adalah $Y = 0,00597 + 0,02594 X$ dengan $r = 0,99805$.

Selanjutnya dengan cara yang sama sampel juga diukur absorbansinya. Konsentrasinya ditentukan menggunakan persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh. Absorbansi yang dihasilkan oleh sampel diukur sebanyak tiga kali. Rata-rata absorbansi pada sampel yang dipresipitasi dengan amonium sulfat konsentrasi 40% = 0,2008; konsentrasi 60% = 0,5123 dan konsentrasi 80% = 0,7707. Nilai absorbansi tersebut diukur menggunakan persamaan kurva kalibrasi, maka konsentrasi protein pada sampel 40% amonium sulfat = 74,376 $\mu\text{g/ml}$; sampel 60% amonium sulfat = 195,526 $\mu\text{g/ml}$ dan sampel protein 80% amonium sulfat = 296,010 $\mu\text{g/ml}$.



Gambar 4.6 Konsentrasi protein total sampel yang dipresipitasi dengan 40%, 60% dan 80% amonium sulfat

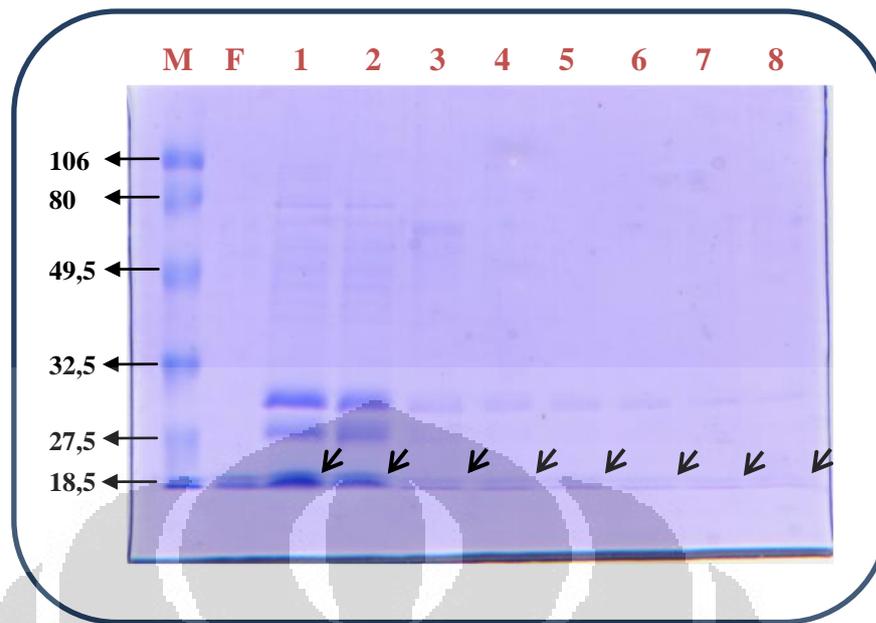
Prinsip pengukuran konsentrasi protein dengan menggunakan metoda BCA adalah berdasarkan serapan yang dihasilkan dari senyawa kompleks akibat

reaksi antara protein dengan *working reagent* yang mengandung *bicinchoninic acid* dan tembaga sehingga menghasilkan warna ungu dalam suasana basa. Pengukuran menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 562 nm (Smith, P.K., et al, 1985; Walker, J.M., 1986; Thermo Scientific, 2011).

4.10 Analisis Hasil Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan Elektroforesis Gel Poliakrilamid (SDS PAGE)

Sampel hasil purifikasi menggunakan teknik kromatografi afinitas dengan resin Ni-NTA selanjutnya dianalisis dengan metoda SDS PAGE.

Hasil visualisasi dengan SDS PAGE menunjukkan pita protein kontrol positif filgrastim terletak sejajar dengan pita marker protein ukuran 18,5 kDa. Pada lajur 1 yaitu protein yang dipresipitasi dengan 80% amonium sulfat terdapat banyak pita-pita protein. Pita protein target dengan ukuran 18,5 kDa terlihat cukup tebal meskipun terdapat juga pita protein yang jauh lebih tebal, yaitu pita protein dengan ukuran antara 27,5 kDa hingga 32,5 kDa. Pada lajur 2 yaitu fraksi hasil *flow through* dimana profil pita protein yang dihasilkan tidak jauh berbeda dengan lajur 1 dan terlihat adanya pita protein target yang cukup tebal. Pada lajur 3 adalah fraksi hasil pencucian dengan dapar pencuci, dimana masih terdapat beberapa pita protein, tetapi lebih tipis dari pita protein sebelumnya. Pada lajur 4 hingga 8 adalah fraksi hasil elusi 1 hingga 5, dimana terlihat ada 2 buah pita protein. Satu buah pita protein berat molekulnya adalah 18,5 kDa, merupakan protein target. Namun pita protein yang berukuran antara 27,5 kDa dan 32,5 kDa adalah protein non target. Terdeteksinya pita protein non target tersebut diduga karena memiliki deretan asam amino histidin sehingga dapat terikat dengan resin Ni-NTA dan terelusi dengan dapar elusi. Dalam hal ini fraksi elusi belum murni, karena masih ada protein non target. Untuk itu perlu dilakukan purifikasi lanjutan menggunakan metoda kromatografi *size exclusion* dimana prinsip pemisahannya berdasarkan perbedaan berat molekul.



Keterangan: (M) Marker protein *prestained low molecular* [BioRad]; (F) Filgrastim; (1) Supernatan protein G-CSF yang dipekatkan dengan 80% amonium sulfat; (2) *Flow through*; (3) Fraksi dapar pencuci; (4) Fraksi dapar elusi 1; (5) Fraksi dapar elusi 2; (6) Fraksi dapar elusi 3; (7) Fraksi dapar elusi 4; (8) Fraksi dapar elusi 5.

Gambar 4.7 SDS PAGE hasil purifikasi protein G-CSF rekombinan dengan teknik kromatografi afinitas menggunakan resin Ni-NTA

4.11. Analisis Hasil Purifikasi Protein G-CSF Rekombinan Menggunakan *Slot blot*

Selanjutnya hasil purifikasi tersebut kemudian dianalisis dengan metoda *slot blot*. Hasil visualisasi *slot blot* pada jalur A yaitu aquadest steril tidak menunjukkan adanya warna ungu. Pada jalur F yaitu filgrastim juga tidak terdapat warna ungu. Hal ini diduga bahwa filgrastim tidak terikat dengan pada membran nitroselulosa. Pada jalur 1 dan 2 adalah medium induksi BMMY dan *P. pastoris* non transforman yang dipresipitasi dengan 80% amonium sulfat, dimana keduanya digunakan sebagai kontrol negatif. Pada kedua jalur tersebut ada warna violet yang tipis dan berbeda intensitas warnanya dari kultur transforman. Hal tersebut disebabkan pada kedua kontrol tidak dihasilkan protein G-CSF, sehingga deteksi imunologi yang dilakukan tidak menimbulkan warna ungu pada membran. Pada jalur 3 adalah *P. pastoris* transforman yang dipresipitasi dengan 80% amonium sulfat, dimana terdapat bercak berwarna ungu yang pekat. Hal ini

menunjukkan bahwa protein G-CSF rekombinan yang terdapat dalam sampel banyak. Pada jalur 4 dan 5 merupakan fraksi *flow through* dan fraksi hasil pencucian dengan dapar pencuci, dimana terlihat bercak warna ungu yang tidak sepekat sebelumnya. Hal ini menunjukkan bahwa protein G-CSF rekombinan dalam sampel lebih sedikit daripada sampel sebelumnya. Pada jalur 6, 7 dan 8 merupakan fraksi dengan dapar elusi, dimana bercak warna ungu yang terlihat semakin menipis. Hal ini menunjukkan protein G-CSF rekombinan yang terdapat dalam sampel sedikit. Semakin pekat warna ungu yang tervisualisasi, maka diduga semakin banyak protein G-CSF rekombinan yang terdapat dalam sampel.



Keterangan: (A) Aquadest steril; (F) Filgrastim; (1) Medium BMMY; (2) Supernatan *P. pastoris* non transforman yang dipekatkan dengan 80% amonium SO_4 ; (3) Supernatan *P. pastoris* transforman yang dipekatkan dengan 80% amonium sulfat; (4) *Flow through*; (5) Fraksi dapar pencuci; (6) Fraksi dapar elusi 1; (7) Fraksi dapar elusi 2; (8) Fraksi dapar elusi 3.

Gambar 4.8 *Slot blot* hasil purifikasi protein G-CSF rekombinan dengan teknik kromatografi afinitas menggunakan resin Ni-NTA

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

1. Induksi kultur *P. pastoris* selama 48 jam menunjukkan produksi protein G-CSF rekombinan yang optimal pada jam ke-48 yang dibuktikan dengan hasil analisis *western blot*.
2. Fraksi hasil purifikasi dengan teknik kromatografi afinitas menggunakan resin Ni-NTA yang dianalisis dengan SDS PAGE menunjukkan berat molekul protein G-CSF rekombinan 18,5 kDa. Berdasarkan hasil analisis *slot blot* protein G-CSF rekombinan terdeteksi berwarna ungu.

5.2. SARAN

1. Perlu dilakukan optimasi produksi protein G-CSF rekombinan seperti optimasi terhadap suhu inkubasi dan medium yang digunakan agar protein rekombinan yang dihasilkan lebih optimal.
2. Perlu dilakukan purifikasi dengan menggunakan volume supernatan yang besar agar didapat fraksi elusi yang mengandung protein G-CSF rekombinan dalam jumlah banyak.
3. Perlu dilakukan purifikasi lanjutan dengan teknik kromatografi *size exclusion* untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul.

DAFTAR ACUAN

- Anjali, A. D., Somani, S., Mandal G., Soorapaneni, S., & Padmanabhan, S. (2009). Over Expression and Analysis of O-glycosylated Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor in *Pichia pastoris* Using Agilent 2100 Bioanalyzer. *Journal of Biotechnology*, 143:44-50.
- Bahrami, A., Shojaosadati, S.A., Khalilzadeh, R., Saeedinia, A.R., Farahani, E.V., & Mohammadian-Mosaabadi, J. (2007). Production of Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor by *Pichia pastoris*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(3): 162-169
- Bahrami, A., Shojaosadati, S.A., Khalilzadeh, R., & Farahani, E.V. (2008). Two-stage Glycerol Feeding for Enhancement of Recombinant hG-CSF Production in A Fed-batch Culture of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 30:1081-1085.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2002). *Biochemistry Fifth Edition*. USA: W.H. Freeman and Company.
- Bolyard, A.A., Cottle, T., Edwards, C., Kinsey, S., Schwinzer, B., & Zeidler, C. (1994). *Understanding Severe Chronic Neutropenia: A Handbook for Patients and Their Families*. California, USA: Severe Chronic Neutropenia International Registry.
- Caprette, D. R. (2005). *Preparing SDS-Gels*. Experimental Bioscience. Introductory Laboratory-Bios 211. Texas: Rice University.
- Carter, C.R.D., Whitmore, K.M. & Thorpe, R. (2004). The Significance of Carbohydrates on G-CSF: Differential Sensitivity of G-CSFs to Human Neutrophil Elastase Degradation. *Journal of Leukocyte Biology*, 75:515-522.
- Çelik, E & Çalik, P. (2011). Production of Recombinant Protein by Yeast Cells. *Journal of Biotechnology Advances*. JBA-06495:1-11.
- Chao Zhan Wang, Jiang Feng Liu, & Xin Du Geng. (2005). Refolding with Simultaneous Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-stimulating Factor from *Escherichia coli* Using Strong Anion Exchange Chromatography. *Chinese Chemical Letters*, 16(3):389-392.
- Christi, L., Clogston, C. L., Hu, S., Boone, T. C., & Lu, H. S. (1993). Glycosidase Digestion, Electrophoresis and Chromatographic Analysis of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Glycoforms Produced in Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of Chromatography*, 637:55-62.

- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L., & Valero, F. (2006). Operational Strategies, Monitoring and Control of Heterologous Protein Production in The Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris* Under Different Promoters: A Review. *Microbial Cell Factories*, 5(17): 1-20.
- Crea, F., Giovannetti, E., Zinzani, P.L., & Danesi, R. (2009). Pharmacologic Rationale for Early G-CSF Prophylaxis in Cancer Patients and Role of Pharmacogenetics in Treatment Optimization. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 72:21-44.
- Cregg, J. (2011). *The Pichia System*. 20 September 2011. Retrieved from Pichia Yeast Protein System:..http://www.pichia.com/pichia_system.pdf.
- Daly, R., & Hearn, M.T.W. (2005). Expression of Heterologous Proteins in *Pichia pastoris*: A Useful Experimental Tool in Protein Engineering and Production. *Journal of Molecular Recognition*, 18:119-138.
- Demetri, G.D., & Griffin, J.D. (1991). Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Receptor. *The Journal of The American Society of Hematology*, 78(11):2791-2808.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Frampton J.E., Lee C.R., & Faulds D. (1994). Filgrastim A Review of Its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Neutropenia. *Drugs*, 48:731-760.
- Fuad, A.M., Agustiyanti, D.F., Yuliawati, Fidyani, C., Aminah, & Santoso, A. (2008). Construction of A CSF3-Synthetic Gene for Recombinant Human G-CSF Expression in Yeast Using A TBIO (Thermodynamically Balanced Inside-Out) Method. *Journal of Biotechnology Research in Tropical Region*, 1:1-7.
- GE Healthcare. (2007). *Products for Life Sciences 2007, Bringing Science to Life*. Denmark: GE Life Sciences.
- GeneCard. 2011. *Colony stimulating factor 3 (Granulocyte)*. 9 Agustus 2011. Retrieved from GeneCard: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CSF3&search=g+csf>.
- Gerngross, T.U. (2004). Advances in The Production of Human Therapeutic Proteins in Yeasts and Filamentous Fungi. *Nature Biotechnology*, 22(11):1409-1414.

- Gervais, V., Zerial, A., & Oschkinat, H. (1997). NMR Investigations of The Role of The Sugar Moiety in Glycosylated Recombinant Human Granulocyte-colony-stimulating Factor. *European Journal of Biochemistry*, 247:386-395.
- Glick, B.R., & J.J Pasternak. (2003). *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. (Third edition). Washington DC: ASM Press.
- Hartner, F.S., & Glieder, A. (2006). Regulation of Methanol Utilisation Pathway Genes in Yeasts. *Microbial Cell Factories*, 5:1-21.
- Hill, C.P., Oslund, T.D., & Eisenberg, D. (1993). The Structure of Granulocyte-Colony-Stimulating Factor and Its Relationship to Other Growth Factors. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 90:5176-5171.
- Hoffbrand, A.V., Petit, J.E., & Moss, P.A.H. (2005). *Kapita Selekt Hematologi*. Edisi 4. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Holme, D.J., & Hazel Peck. (1998). *Analytical Biochemistry*. (Third edition). London: Addison Wesley Longman.
- Holmes, W.J., Darby, R.A.J, Wilks, M.D.B, Smith, R., & Bill, R.M. (2009). Developing A Scalable Model of Recombinant Protein Yield from *Pichia pastoris*: The Influence of Culture Conditions, Biomass and Induction Regime. *Microbial Cell Factories* 8:1-14.
- Inan, M., & Meagher, M.M. (2001). Non-Repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (AOXI) Promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(6):585-589.
- Invitrogen. (2001a). *EasySelect™ Pichia Expression Kit: A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZα in Pichia pastoris*. California: Invitrogen Corporation.
- Invitrogen. (2004b). *EasySelect™ Pichia Expression Kit: A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZα in Pichia pastoris*. California: Invitrogen Corporation.
- Januari, A. D. (2011). *Ekspresi Gen CSF3SYN dengan Promotor Terinduksi PAOXI pada Pichia pastoris*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Depok. Universitas Indonesia.
- Jenzsch, M., Lange, M., Bär, J., Rahfeld, J.-U., & Lübbert, A. (2004). Bioreactor Retrofitting to Avoid Aeration with Oxygen in *Pichia pastoris* Cultivation Processes for Recombinant Protein Production. *Chemical Engineering Research and Design*, 82(A9):1144-1152.

- Jungo, C. (2007). *Quantitative Characterization of A Recombinant Pichia pastoris Mut⁺ Strain Secreting Avidin Using Transient Continuous Cultures*. Swiss: École Polytechnique Federale de Lausanne.
- Kranthi, B.V., Natarajan B. & Pundi N.R. (2006). Isolation of A Single-Stranded DNA-Binding Protein from The Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris* and Its Identification As Zeta Crystalline. *Nucleic Acid Research*, 34(16):4060-4068.
- Kubota N., Orita, T., Hattori, K., Oh-eda, M., Ochi, N., & Yamazaki, T. (1990). Structural Characterization of Natural and Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factors. *Journal of Biochemistry*, 107:486-492.
- Kumar & Robbins. (1987). *Buku Ajar Patologi II*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Kurien, B. T., Dorri, Y., Dillon, S., Dsouza, A., & Scofield, R.H. (2011). An Overview of Western Blotting for Determining Antibody Specificities for Immunohistochemistry. *Signal Transduction – Immunohistochemistry: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 717:55-67.
- Lasnik, M.A., Porekar, V.G., & Štalc, A. (2001). Human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) Expressed by Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *European Journal of Physiology*, 442:184-186.
- Mikkelsen, S.R., & E. Corton. (2004). *Bioanalytical Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Morstyn G., & Burgess A.W. (1988). Hemopoietic Growth Factors: A Review. *Cancer Res.*, 48:5624-5637.
- Mycobank. (2011). Fungal databases nomenclature and species banks online taxonomic novelties submission. Retrieved from Mycobank: <http://www.mycobank.org/mycotaxo.aspx>. 11 November 2011.
- Nagata, S., et al. (1986). The Chromosomal Gene Structure and Two mRNAs for Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor. *European Molecular Biology Organization Journal*, 5(3):575-581.
- NCBI. (2011). *Pichia pastoris* CBS 7435. 3 September 2011. Retrieved from National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=981350&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.

- Oh-eda, M., et al. (1990). O-Linked Sugar Chain of Human Granulocyte Colony-stimulating Factor Protects It Against Polymerization and Denaturation Allowing It to Retain Its Biological Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(20):11432-11435.
- Potvin, G., Ahmad, A. & Zhang, Z. (2010). Bioprocess Engineering Aspects of Heterologous Protein Production in *Pichia pastoris*: A Review. *Biochemical Engineering Journal*, BEJ-5199:1-15.
- Qiagen. (2000). *Ni-NTA Spin Handbook for Ni-NTA Spin Kit, Ni-NTA Spin Columns*. Germany: Qiagen.
- Ren, H.T., Yuan, J.Q. & Bellgardt, K.-H. (2003). Macrokinetic Model for Methylotrophic *Pichia pastoris* Based On Stoichiometric Balance. *Journal of Biotechnology*, 106:53-68.
- Saeedinia, A., Shamsara, M., Bahrami, A., Zeinoddini, M., Naseeri-Khalili, M.A., Mohammadi, R., Sabet, N.M., & Sami, H. (2008). Heterologous Expression of Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 7(3):569-573.
- Sassenfeld, H. (1991). Purification of G-CSF. *United States Patent Documents*.
- Sauer, M., Branduardi, P., Gasser, B., Valli, M., Maurer, M., Porro, D., & Mattanovich, D. (2004). Differential Gene Expression in Recombinant *Pichia pastoris* Analysed by Heterologous DNA Microarray Hybridisation. *Microbial Cell Factories*, 3(17):1-14.
- Schmitt, J., Hess, H. & Stunnenberg, H.G. (1993). Affinity Purification of Histidine-tagged Proteins. *Molecular Biology Reports*, 18:223-230.
- Seidman, L. & Mowery, J. (2011). Salting Out Study Guide. 15 September 2011. Retrived from Biotech Matcmadison: <http://biotech.matcmadison.edu/resources/proteins/purification/saltingGuide.htm>.
- Sherwood, L. (2001). *Fisiologi Manusia: dari Sel ke Sistem*. Edisi Kedua. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Sinha, J., Plantz, B.A., Inan, M., & Meagher, M.M. (2004). Causes of Proteolytic Degradation of Secreted Recombinant Proteins Produced in Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*: Case Study With Recombinant Ovine Interferon-T. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(1):101-112.

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* (150):76-85.
- Snustad, D.P. & M.J. Simmons. (2003). *Principles of Genetics*. (Third edition). John Wiley & Sons, Inc.
- Souza, L.M., Boone, T.C., Gabrilove, J., Lai, P.H., Zsebo, K.M., Murdock, D.C., Chazin, V.R., Bruszewski, J., Hsieng Lu, Chen, K.K., Barendt, J., Platzer, E., Moore, M.A.S., Mertelsmann, R., & Welte, K. (1986). Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor: Effect on Normal and Leukemic Myeloid Cells. *Science Reports*, 232:61-65.
- Stevens, L. (1994). Chemotherapy and Neutropenia. 3 hlm. 22 Februari 2011. http://www.neutropenia.ca/about/chemotherapy_and_neutropenia.html.
- Takeuchi, M. & Kobata, A. (1991). Structures and Functional Roles of The Sugar Chains of Human Erythropoietins. *Glycobiology*, 1(4):337-346.
- The Neutropenia Association. (1993). What is Neutropenia. 26 Februari 2011. <http://www.neutropenia.ca/about/index.html>.
- Thermo Scientific. (2011). Instructions Pierce[®] BCA Protein Assay Kit. USA: Pierce Biotechnology.
- Tsuchiya, M., Nomura, H., Asano, S., Kaziro, Y., & Nagata, S. (1987). Characterization of Recombinant Human Granulocyte-Colony-Stimulating Factor Produced in Mouse Cells. *The Embo Journal*, 6(3):611-616.
- Vervecken, W., Kaigorodov, V., Callewaert, N., Geysens, S., De Vusser, K., & Contreras, R. (2004). In Vivo Synthesis of Mammalian-Like, Hybrid-Type N-Glycans in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (5):2639-2646.
- Walker, J.M. (1986). *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins: Determination of Protein Molecular Weights and High-Resolution Silver Staining*. Clifton, New Jersey: Humana Press.
- Walker, J.M. (1996). *The Protein Protocols Handbook*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Xianzong Shi, Karkut, T., Chamankhah, M., Alting-Mees, M., Hemmingsen, S.M., & Hegedus, D. (2002). Optimal Conditions for The Expression of A Single-Chain Antibody (scFv) Gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 28:321-330.

Lampiran 1 Kultur *P. pastoris* GS115 transforman (pPICZ α -G-CSF-Ye-04) pada medium YPD agar yang mengandung ampisilin 0,05 μ g/ml dan zeocin 0,1 μ g/ml



Lampiran 2 Kultur *P. pastoris* GS115 non transforman pada medium YPD agar yang mengandung ampisilin 0,05 μ g/ml



Universitas Indonesia

Lampiran 3 Kultur *P. pastoris* GS115 transforman (pPICZ α -G-CSF-Ye-04) pada medium BMGY yang mengandung ampisilin 0,05 μ g/ml



Lampiran 4 Hasil panen kultur *P. pastoris* GS115 transforman (pPICZ α -G-CSF-Ye-04) dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C setelah diinduksi selama 48 jam



Universitas Indonesia

Lampiran 5 Hasil panen kultur *P. pastoris* GS115 non transforman dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C setelah diinduksi selama 48 jam



Lampiran 6 Alat elektroforesis



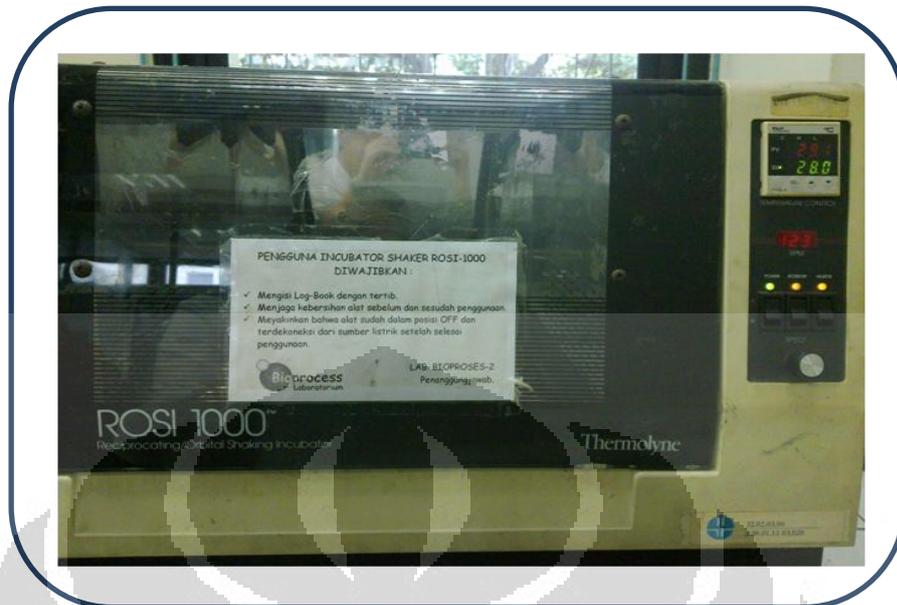
Universitas Indonesia

Lampiran 7 Alat sentrifus dengan pendingin



Lampiran 8 Alat slot blot



Lampiran 9 *Incubator shaker***Lampiran 10** *Rotator*

Universitas Indonesia

Lampiran 11 Spektrofotometer UV-Vis



Lampiran 12 Alat *moisture balance* dilengkapi timbangan analitik



Universitas Indonesia

Lampiran 13 Kondisi kultur *P. pastoris* GS115 transforman dan non transforman yang diinduksi menggunakan metanol konsentrasi 0,5% tiap 12 jam.

| Induksi Jam | Parameter | Transforman 1 | Transforman 2 | Transforman 3 | Non transforman 1 | Non transforman 2 |
|----------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|----------------------|
| 0 | A ₆₀₀ | 0,3561 | 0,3546 | 0,3753 | 0,3012 | 0,3004 |
| | Pengenceran | 10x | 10x | 10x | 10x | 10x |
| | OD ₆₀₀ | 3,561 | 3,546 | 3,753 | 3,012 | 3,004 |
| | pH | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Berat kering sel (mg/ml) | 1,2724 | 1,2670 | 1,3410 | 1,0762 | 1,0734 |
| 12 | A ₆₀₀ | 0,3695 | 0,3708 | 0,3701 | 0,3112 | 0,3105 |
| | Pengenceran | 25x | 25x | 25x | 20x | 20x |
| | OD ₆₀₀ | 9,2375 | 9,270 | 9,2525 | 6,224 | 6,210 |
| | pH | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Berat kering sel (mg/ml) | 3,3006 | 3,3122 | 3,3060 | 2,2239 | 2,2189 |
| 24 | A ₆₀₀ | 0,4437 | 0,4446 | 0,4468 | 0,4387 | 0,4335 |
| | Pengenceran | 25x | 25x | 25x | 20x | 20x |
| | OD ₆₀₀ | 11,0925 | 11,115 | 11,170 | 8,774 | 8,670 |
| | pH | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | Berat kering sel (mg/ml) | 3,9634 | 3,9715 | 3,9911 | 3,1350 | 3,0979 |
| 36 | A ₆₀₀ | 0,5645 | 0,5654 | 0,5712 | 0,5741 | 0,5716 |
| | Pengenceran | 25x | 25x | 25x | 20x | 20x |
| | OD ₆₀₀ | 14,1125 | 14,135 | 14,280 | 11,482 | 11,432 |
| | pH | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 |
| | Berat kering sel (mg/ml) | 5,0425 | 5,0505 | 5,1023 | 4,1026 | 4,0847 |
| 48 | A ₆₀₀ | 0,7111 | 0,7132 | 0,7143 | 0,7438 | 0,7436 |
| | Pengenceran | 25x | 25x | 25x | 20x | 20x |
| | OD ₆₀₀ | 17,7775 | 17,830 | 17,8575 | 14,876 | 14,872 |
| | pH | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 |
| | Berat kering sel (mg/ml) | 6,3520 | 6,3708 | 6,3806 | 5,3153 | 5,3139 |

Lampiran 14 Berat kering sel dan nilai OD₆₀₀ kultur *P. pastoris* per 10 ml suspensi

| Sampel | Berat membran awal (gr) | Berat membran basah (gr) | Berat membran dan sel setelah dikeringkan (gr) | Berat kering sel (gr/10 ml) | Kelembaban (%) | A ₆₀₀ | Pengenceran | OD ₆₀₀ |
|-----------|-------------------------|--------------------------|--|-----------------------------|----------------|------------------|-------------|-------------------|
| 1 | 0,0958 | 0,4872 | 0,1602 | 0,0644 | 44,60 | 0,6051 | 30x | 18,153 |
| 2 | 0,0951 | 0,4923 | 0,1599 | 0,0648 | 32,54 | 0,5946 | 30x | 17,838 |
| 3 | 0,0958 | 0,4714 | 0,1587 | 0,0629 | 32,81 | 0,5924 | 30x | 17,772 |
| Rata-rata | 0,095567 | 0,483633 | 0,1596 | 0,064033 | 35,65 | 0,597367 | 30x | 17,921 |

Lampiran 15 Konsentrasi amonium sulfat dan hasil dialisis dari 50 ml supernatan

| Konsentrasi Amonium Sulfat (%) | Volume sampel (ml) | Berat amonium sulfat yang ditimbang (gr) | Volume setelah dialisis (ml) | Faktor pemekatan |
|--------------------------------|--------------------|--|------------------------------|------------------|
| 40 | 50 | 12,10 | 5 | 10x |
| 60 | 50 | 19,50 | 5 | 10x |
| 80 | 50 | 28,05 | 5 | 10x |

Lampiran 16 Komposisi larutan standar BSA dalam volume akhir 1000 μl

| Larutan stok BSA [2000 $\mu\text{g/ml}$] (μl) | Perbandingan (BSA : <i>Working reagent</i>) | <i>Working reagent</i> (μl) | Aquabidest (μl) | Konsentrasi BSA ($\mu\text{g/ml}$) |
|--|---|---|---------------------------------|---|
| 5 | 1 : 8 | 40 | 955 | 10 |
| 6,25 | 1 : 8 | 50 | 943,75 | 12,5 |
| 7,5 | 1 : 8 | 60 | 932,5 | 15 |
| 10 | 1 : 8 | 80 | 910 | 20 |
| 12,5 | 1 : 8 | 100 | 887,5 | 25 |
| 15 | 1 : 8 | 120 | 865 | 30 |

Lampiran 17 Komposisi larutan sampel dalam volume akhir 1000 μl

| Sampel hasil presipitasi amonium sulfat (%) | Volume sampel (μl) | Perbandingan (Sampel : <i>Working reagent</i>) | <i>Working reagent</i> (μl) | Aquabidest (μl) |
|--|------------------------------------|--|---|---------------------------------|
| 40 | 25 | 1 : 8 | 200 | 775 |
| 60 | 25 | 1 : 8 | 200 | 775 |
| 80 | 25 | 1 : 8 | 200 | 775 |

Lampiran 18 Absorbansi larutan standar BSA yang diukur pada panjang gelombang 562 nm

| Konsentrasi larutan standar BSA ($\mu\text{g/ml}$) | A ₁ | A ₂ | A ₃ | A _{rata-rata} |
|---|----------------|----------------|----------------|------------------------|
| 10 | 0,2486 | 0,2479 | 0,2477 | 0,2481 |
| 12,5 | 0,3309 | 0,3312 | 0,3319 | 0,3313 |
| 15 | 0,4091 | 0,4092 | 0,4093 | 0,4092 |
| 20 | 0,5327 | 0,5330 | 0,5333 | 0,5330 |
| 25 | 0,6614 | 0,6615 | 0,6615 | 0,6615 |
| 30 | 0,7710 | 0,7713 | 0,7715 | 0,7713 |

Lampiran 19 Konsentrasi dan absorbansi larutan sampel yang diukur pada panjang gelombang 562 nm

| Sampel hasil presipitasi amonium sulfat (%) | A ₁ | A ₂ | A ₃ | A _{rata-rata} | Y = A + Bx | Faktor pemekatan | Konsentrasi protein total ($\mu\text{g/ml}$) |
|--|----------------|----------------|----------------|------------------------|-------------|------------------|---|
| 40 | 0,2007 | 0,2008 | 0,2010 | 0,2008 | X = 7,4376 | 10x | 74,376 |
| 60 | 0,5120 | 0,5123 | 0,5127 | 0,5123 | X = 19,5526 | 10x | 195,526 |
| 80 | 0,7704 | 0,7708 | 0,7709 | 0,7707 | X = 29,6010 | 10x | 296,010 |

Lampiran 20 Perhitungan berat kering sel

Berat kering sel = Berat membran dan sel setelah dikeringkan – Berat membran awal

$$\begin{aligned}
 &= 0,1596 - 0,095567 \text{ gr/10 ml suspensi sel} \\
 &= 0,064033 \text{ gr/10 ml suspensi sel} \\
 &= 6,4033 \text{ mg/ml suspensi sel}
 \end{aligned}$$

Perhitungan untuk mengukur berat kering sel dari suatu kultur adalah:

$$\frac{\text{Berat kering sel} \times \text{Nilai OD}_{600} \text{ kultur yang akan diukur}}{\text{Nilai rata-rata OD}_{600}}$$

Lampiran 21 Perhitungan berat amonium sulfat untuk konsentrasi 40%, 60% dan 80%

Perhitungan berat amonium sulfat yang ditimbang:

$$\frac{\text{Berat amonium sulfat berdasarkan tabel GE Healthcare (2007)} \times \text{Volume sampel}}{1000 \text{ ml}}$$

*Konsentrasi 40% amonium sulfat untuk 50 ml sampel:

$$\begin{aligned}
 &= \frac{242 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 50 \text{ ml} \\
 &= 12,10 \text{ gr}
 \end{aligned}$$

*Konsentrasi 60% amonium sulfat untuk 50 ml sampel:

$$\begin{aligned}
 &= \frac{390 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 50 \text{ ml} \\
 &= 19,50 \text{ gr}
 \end{aligned}$$

*Konsentrasi 80% amonium sulfat untuk 50 ml sampel:

$$\begin{aligned}
 &= \frac{561 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 50 \text{ ml} \\
 &= 28,05 \text{ gr}
 \end{aligned}$$

Lampiran 22 Komposisi dan cara pembuatan larutan stok, reagen dan dapar

| Larutan stok, reagen dan dapar | Cara pembuatan |
|-------------------------------------|---|
| HCl 1 N | Sebanyak 8,4 ml HCl 37% dilarutkan dalam 100 ml aquadest, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C, selama 15 menit. |
| NaOH 1 N | Sebanyak 4 g NaOH ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. |
| KOH 1 N | Sebanyak 5,6 g KOH ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. |
| K ₂ HPO ₄ 1 M | Sebanyak 136,09 g K ₂ HPO ₄ ditimbang dan dilarutkan dalam 1000 ml aquadest steril, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. |
| KH ₂ PO ₄ 1 M | Sebanyak 174,18 g KH ₂ PO ₄ ditimbang dan dilarutkan dalam 1000 ml aquadest steril, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. |
| Dekstrosa 20% | Sebanyak 200 g D-glukosa ditimbang dan dilarutkan dalam 1000 ml aquadest, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. |
| Biotin 0,02% | Sebanyak 20 mg biotin ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril dan difiltrasi dengan membran filter ukuran 0,22 µm. |
| Dapar kalium fosfat 1 M pH 6,0 | Sebanyak 132 ml larutan K ₂ HPO ₄ 1 M dan 868 ml larutan KH ₂ PO ₄ 1 M dicampur hingga homogen dan ditetesi KOH 1 N hingga tercapai pH 6,0. Kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. |

| Larutan stok, reagen dan dapar | Cara pembuatan |
|---|--|
| <i>Yeast Nitrogen Base</i> 10x (13,4% <i>Yeast Nitrogen Base</i> dengan amonium sulfat) | Sebanyak 34 g <i>Yeast Nitrogen Base</i> (YNB) tanpa amonium sulfat dan 100 g amonium sulfat ditimbang. Kemudian keduanya dilarutkan dalam 1000 ml aquadest steril sambil diaduk menggunakan <i>magnetic stirrer</i> sambil dipanaskan diatas <i>hot plate</i> suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ hingga larut sempurna. Selanjutnya difiltrasi dengan membran filter ukuran 0,22 μm . |
| Metanol 5% | Sebanyak 5 ml metanol dicampur dengan 95 ml aquadest steril dan difiltrasi dengan membran filter ukuran 0,22 μm . |
| Gliserol 10% | Sebanyak 100 ml gliserol dicampur dengan 900 ml aquadest. Kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 $^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. |
| Gel pemisah 15% | Sebanyak 2,35 ml aquadest steril; 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl; 5 ml 30% Akrilamida (29% akrilamida + 1% bisakrilamida); 0,1 ml 10% SDS; 0,05 ml 10% APS (Amonium Persulfat) dan 0,05 ml TEMED. Campuran tersebut dikocok dan segera dimasukkan ke dalam cetakan gel. |
| Gel penahan 3,9% | Sebanyak 3,05 ml aquadest steril; 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl; 0,65 ml 30% Akrilamida (29% akrilamida + 1% bisakrilamida); 0,05 ml 10% SDS; 0,0025 ml 10% APS (Amonium Persulfat); 0,0025 ml TEMED. Campuran tersebut dikocok dan segera dimasukkan ke dalam cetakan gel. |
| SDS 10% | Larutkan 10 g SDS dalam 90 ml aquadest steril, kemudian diaduk dengan <i>magnetic stirrer</i> . |
| Tris-Cl 1,5 M, pH 8,8 | Sebanyak 18,15 g tris <i>base</i> ditimbang dan dilarutkan dalam 70 ml aquadest steril. Selanjutnya ditetesi HCl 1 N hingga tercapai pH 8,8 dan ditambahkan aquadest steril hingga volume akhir 100 ml. |

| Larutan stok, reagen dan dapar | Cara pembuatan |
|---|---|
| Tris-Cl 0,5 M, pH 6,8 | Sebanyak 6 g tris <i>base</i> ditimbang dan dilarutkan dalam 70 ml aquadest steril. Selanjutnya ditetesi HCl 1 N hingga tercapai pH 6,8 dan ditambahkan aquadest steril hingga volume akhir 100 ml. |
| <i>Reducing Sample Buffer</i> (RSB) | Sebanyak 2 mg <i>bromphenol blue</i> ditimbang dan dilarutkan dalam 1 ml metanol absolut. Kemudian larutan <i>bromphenol blue</i> dicampur dengan 25 ml Tris-Cl 0,5 M pH 6,8; 50 ml gliserol; 4 g SDS; 2 ml 2-merkaptotanol dan ditambahkan aquadest steril hingga volume 100 ml. |
| Dapar <i>elektrorunning</i> 5x | Sebanyak 15,1 g tris <i>base</i> ; 72 g glisin dan 5 g SDS ditimbang dan dilarutkan dalam 1000 ml aquadest steril. |
| Dapar <i>Elektrorunning</i> 1x | Sebanyak 200 ml larutan dapar <i>elektrorunning</i> 5x dicampur dengan 800 ml aquadest steril. |
| Amonium Persulfat (APS) 10% | Sebanyak 100 mg amonium persulfat (APS) ditimbang dan ditambahkan 1 ml aquadest steril. Selanjutnya divorteks hingga larut |
| <i>Commassie Brilliant Blue</i> (CBB) 10x | Sebanyak 1 buah tablet CBB dilarutkan dalam 80 ml aquadest steril dan diaduk dengan <i>magnetic stirrer</i> hingga larut. Selanjutnya ditambahkan 120 ml metanol absolut dan disaring dengan kertas saring. |
| <i>Commassie Brilliant Blue</i> (CBB) 1x | Campuran larutan dibuat dengan perbandingan sebagai berikut: CBB 10x : (metanol : asam asetat glasial : aquadest steril) 1 : 9 (3 : 1 : 6) |
| <i>Destaining</i> 1 | Campuran larutan dibuat dengan perbandingan sebagai berikut: 40% metanol : 7% asam asetat glasial : 53% aquadest |
| <i>Destaining</i> 2 | Campuran larutan dibuat dengan perbandingan sebagai berikut: 5% metanol : 7% asam asetat glasial : 88% aquadest |

| Larutan stok, reagen dan dapar | Cara pembuatan |
|--|---|
| Dapar <i>Electrotransfer</i> | Sebanyak 3,03 g tris <i>base</i> dan 14,4 g glisin ditimbang dan dilarutkan dalam 800 ml aquadest steril. Kemudian ditambahkan sebanyak 200 ml methanol absolut dan dikocok hingga homogen. |
| <i>Tris Buffer Saline</i> (TBS) pH 7,5 | Sebanyak 12,114 g tris <i>base</i> dan 8,775 g NaCl ditimbang dan dilarutkan dalam 500 ml aquadest steril. Kemudian diatur pH 7,5 dengan penambahan HCl 1 N. Selanjutnya ditambahkan aquadest steril hingga volume 1000 ml. |
| <i>Phosphate Buffer Saline</i> (PBS) pH 7,4 | Sebanyak 0,2 g KCl; 0,24 g KH ₂ PO ₄ ; 8 g NaCl dan 1,44 g Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O ditimbang dan dilarutkan dalam 500 ml aquadest steril. Kemudian diatur pH 7,5 dengan penambahan larutan HCl 1 N. Selanjutnya ditambahkan aquadest steril hingga volume 1000 ml. |
| Susu 10% dalam TBS pH 7,5 | Sebanyak 10 g susu skim non fat ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml larutan TBS pH 7,5. |
| Tween 0,1% dalam TBS pH 7,5 | Sebanyak 0,1 ml tween 20 dilarutkan dalam 100 ml larutan TBS pH 7,5. |
| <i>Trichloroacetic Acid</i> (TCA) 100% | Sebanyak 28,5 g <i>Trichloroacetic Acid</i> (TCA) ditimbang dan dilarutkan dalam 20 ml aquadest steril. |
| <i>Working Reagent</i> (BCA <i>Reagent Protein Assay kit</i>) | Sebanyak 50 ml reagen A (mengandung Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃ , <i>bicinchoninic acid</i> dan natrium tartrat dalam 0.1 M NaOH) dicampur dengan 1 ml reagen B (mengandung 4% CuSO ₄), kemudian dikocok hingga campuran homogen dan berwarna hijau jernih. |

| Larutan stok, reagen dan dapar | Cara pembuatan |
|---|---|
| Dapar Pengikat (<i>His Buffer Kit</i>) | Sebanyak 6,25 ml larutan stok dapar fosfat 8x pH 7,4 (mengandung 0,16 M fosfat dan 4 M NaCl) dan 0,25 ml larutan stok imidazol 2 M dicampur dan ditambahkan aquabidest steril hingga 50 ml. Konsentrasi final imidazol dalam larutan dapar pengikat 10 mM. |
| Dapar Pencuci (<i>His Buffer Kit</i>) | Sebanyak 6,25 ml larutan stok dapar fosfat 8x pH 7,4 (mengandung 0,16 M fosfat dan 4 M NaCl) dan 0,5 ml larutan stok imidazol 2 M dicampur dan ditambahkan aquabidest steril hingga 50 ml. Konsentrasi final imidazol dalam larutan dapar pengikat 20 mM. |
| Dapar Elusi (<i>His Buffer Kit</i>) | Sebanyak 6,25 ml larutan stok dapar fosfat 8x pH 7,4 (mengandung 0,16 M fosfat dan 4 M NaCl) dan 12,5 ml larutan stok imidazol 2 M dicampur dan ditambahkan aquabidest steril hingga 50 ml. Konsentrasi final imidazol dalam larutan dapar pengikat 500 mM. |

Lampiran 23 Sertifikat analisis antibodi G-CSF

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

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



The Power of Quality

BACKGROUND

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

REFERENCES

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

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: CSF3 (human) mapping to 17q21.1; Csfb3 (mouse) mapping to 11 D.

SOURCE

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

RESEARCH USE

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

PRODUCT

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

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

APPLICATIONS

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

Suitable for use as control antibody for G-CSF siRNA (h): sc-39389, G-CSF siRNA (m): sc-39390, G-CSF shRNA Plasmid (h): sc-39389-SH, G-CSF shRNA Plasmid (m): sc-39390-SH, G-CSF shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-39389-V and G-CSF shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-39390-V.

Molecular Weight of G-CSF: 19 kDa.

Positive Controls: human bladder tissue.

RECOMMENDED SECONDARY REAGENTS

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

SELECT PRODUCT CITATIONS

1. Ward, A.C., et al. 1998. The Src-like tyrosine kinase Hck is activated by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and docks to the activated G-CSF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251: 117-123.
2. Chen, X., et al. 2005. Expression of granulocyte colony-stimulating factor is induced in injured rat carotid arteries and mediates vascular smooth muscle cell migration. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 288: C81-C88.
3. Fievez, L., et al. 2007. Stat5 is an ambivalent regulator of neutrophil homeostasis. *PLoS ONE* 2: e727.
4. Ingersoll, M.A., et al. 2008. G-CSF induction early in uropathogenic *Escherichia coli* infection of the urinary tract modulates host immunity. *Cell. Microbiol.* 10: 2568-2578.

STORAGE

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

Santa Cruz Biotechnology, Inc. 1.800.457.3801 831.457.3800 fax:831.457.3801 Europe +00800 4573 8000 49 6221 4503 0 www.scbt.com

Lampiran 24 Sertifikat analisis anti-rabbit IgG konjugasi dengan alkalin fosfatase

Product Contents

Anti-Rabbit IgG (Fc) Alkaline Phosphatase Conjugate:

| Part No. | Size |
|----------|-------|
| S373B | 100µl |

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

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

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

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

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

Promega Product Information

Anti-Rabbit IgG (Fc), AP Conjugate

Catalog# S3731
System Lot# 271025

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

For Laboratory Use. For in vitro use only.

Madison, WI

Peel Label Here

ADS3731 2710259

Promega

| Promega Corporation | |
|----------------------------|-----------------|
| 2800 Woods Hollow Road | |
| Madison, WI 53711-5399 USA | |
| Telephone | 608-274-4330 |
| Toll Free | 800-356-9626 |
| Fax | 608-277-2516 |
| Internet | www.promega.com |

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

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

© 1999-2007 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

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

Lampiran 25 Sertifikat analisis membran dialisis Spectra/Por®



SPECTRUM LABORATORIES, INC.
18617 BROADWICK STREET, RANCHO DOMINGUEZ, CA 90220
PHONE: 800.634.3300 FAX: 800.445.7330

Certificate of Compliance

Product: Spectra/Por® 3 Dialysis Membranes P/N 132720

This is to certify that Spectra/Por® 3 Dialysis Membranes from Lot Number **3235859** was manufactured in January of 2008 and comply with the following descriptions and specifications:

Product Description: Seamless, semi-permeable, regenerated cellulose dialysis tubing

Physical Data: Approximate Molecular Weight Cut Off (MWCO) is **3,500 Daltons**
Thickness (nominal) is **0.0012 inches**
Flat width (nominal) is **18 mm**

Chemical Data: Hydroxyl group functionality
Minimal non-specific protein binding (<1 ng/g)
May be autoclaved up to 250° F
No resistance to cellulase enzyme
Stable in pH range of 5-9
Compatible with most organics (alcohols, ethers, hydrocarbons, etc)

Shelf life: 5 years from the date of manufacture

David Goldberg, PhD
Director of QA/RA
This document is valid without a signature

WARRANTY

Standard Limited Warranty. Distributor shall pass on to its customers Manufacturer's standard limited warranty. Manufacturer's standard limited warranty covers the replacement of a defective product for a period of one hundred twenty (120) days after shipment to the Distributor or for a period of ninety (90) days after shipment to a customer, whichever occurs first. This warranty is contingent upon proper use of a Product in the application for which it was intended and does not cover Products which have been modified without Manufacturer's approval or that were subjected by the customer to unusual physical stress.

No Other Warranty. EXCEPT FOR THE EXPRESS WARRANTY SET FORTH ABOVE, MANUFACTURER GRANTS NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, BY STATUTE OR OTHERWISE REGARDING THE PRODUCTS, THEIR FITNESS FOR ANY PURPOSE, THEIR QUALITY, THEIR MERCHANTABILITY, OR OTHERWISE.

Limitation of Liability. MANUFACTURER'S LIABILITY UNDER THE WARRANTY SHALL BE LIMITED TO A REFUND OF THE CUSTOMER'S ORIGINAL PURCHASE PRICE. IN NO EVENT SHALL MANUFACTURER BE LIABLE FOR THE COST OF PROCUREMENT OF SUBSTITUTE GOODS BY THE CUSTOMER FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES FOR BREACH OF WARRANTY."

Goods Policy: Spectrum Laboratories accepts returned and unused products sent to you in error or which do not meet your requirements. To return products contact Customer Service for a Return Materials Authorization (RMA) number. Credit will be issued once the product has been returned to Spectrum, provided it is unused and in the original packaging. Products with expiration dates must be return within 15 days of shipment from Spectrum to receive credit. All other returns must be received within 90days. A 30% restocking fee will be charged on all products returned to Spectrum for reasons other than fulfillment errors or quality issues.

Universitas Indonesia

Lampiran 26 Sertifikat analisis substrat alkalin fosfatase

Certificate of Analysis

Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase

Lot# 30428601

Cat.#
S3841

Size
100ml



Instructions for use of this product can be found in the ProtoBlot® II AP System with Stabilized Substrate including Western Express® Fast Blotting Protocol Technical Manual #TM026, available online at: www.promega.com/tbs

Description: Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase is a mixture of NBT and BCIP in a proprietary, stabilizing buffer. It is ready to use in immunoscreening and western blotting protocols for detection of alkaline phosphatase; no dilution is required. This product is not recommended for use in repeated applications.

Storage Conditions: Store at 22–25°C.

Quality Control Assays

This lot passes the following Quality Control specifications:

Dot Blot Assay:

- The test lot of Western Blue® must detect 50pg of AP conjugated anti-mouse IgG.
- The blot must have a low background.

Signed by:

J. Stevens

J. Stevens, Quality Assurance

AF9PIS384=P30428601



Promega

Promega Corporation
2800 Woods Hollow Road
Madison WI 53711-5399 USA
Telephone: 608-274-4330
Toll-Free: 800-356-9526
Fax: 608-277-2516
Internet: www.promega.com

PRODUCT USE LIMITATIONS, WARRANTY, DISCLAIMER

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

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

ProtoBlot, Western Blue, and Western Express are registered trademarks of Promega Corporation.

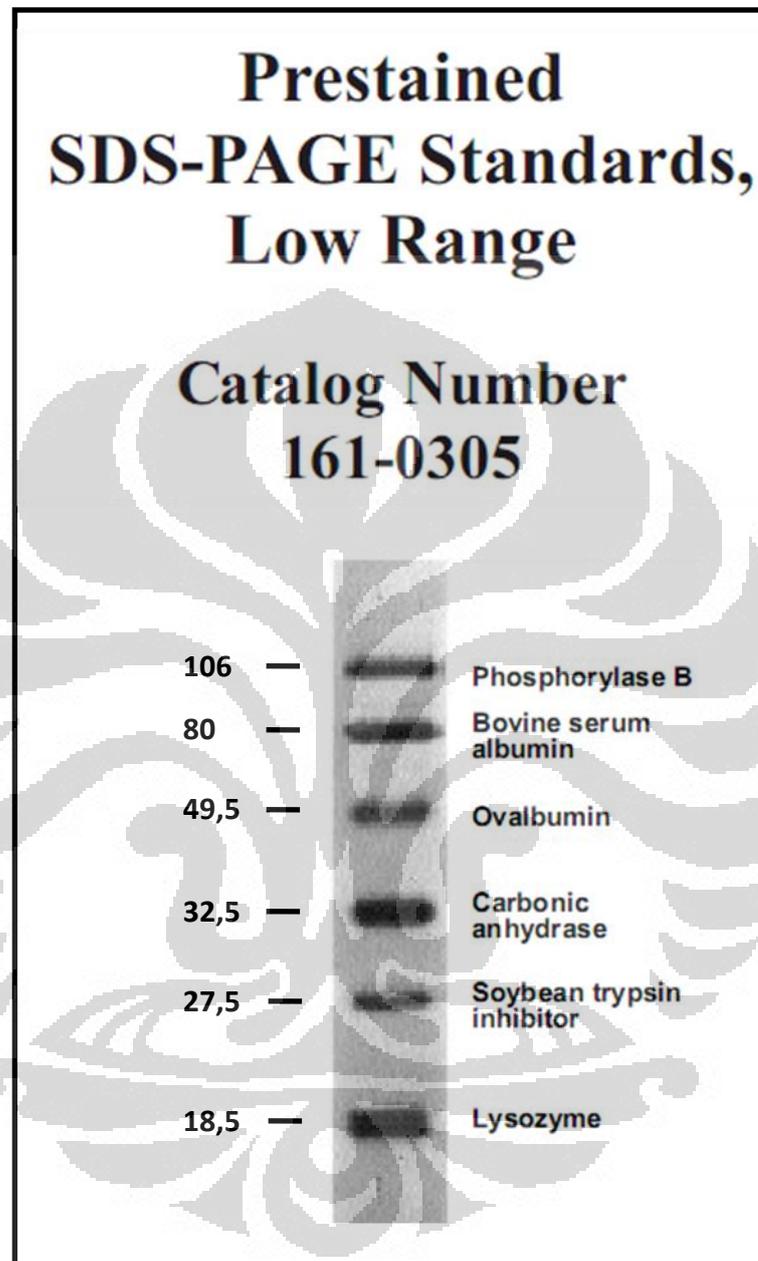
© 2010 Promega Corporation. All Rights Reserved. All specifications are subject to change without prior notice.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

TMP-01rev0
Revision 04
S3841

Universitas Indonesia

Lampiran 27 Penanda protein

Lampiran 28 Diagram alir penelitian

