



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMURNIAN REKOMBINAN PROTEIN APOPTIN DARI
DUA SEL INANG *Bacillus subtilis* 168 DAN *Escherichia coli*
BL21 Star™**

SKRIPSI

RADITYA IMAMUL KHALID

0806460572

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMURNIAN REKOMBINAN PROTEIN APOPTIN DARI
DUA SEL INANG *Bacillus subtilis* 168 DAN *Escherichia coli*
BL21 Star™**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik
program studi Teknologi Bioproses, Departemen Teknik Kimia**

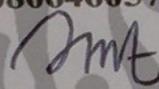
RADITYA IMAMUL KHALID

0806460572

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPOK
JUNI 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 : Raditya Imamul Khalid
NPM : 0806460572
Tanda Tangan : 
Tanggal : 3 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Raditya Imamul Khalid
NPM : 0806460572
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul Skripsi :

Pemurnian Protein Rekombinan Apoptin Dari Dua Sel Inang *Bacillus subtilis* 168 Dan *Escherichia coli* Bl21 Star™

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknologi Bioproses, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Eng Muhamad Sahlan, S. Si, M. Eng (.....)

Pembimbing II: Dr. Amarila Malik, Apt., M. Si (.....)

Penguji I : Dr. Tania Surya Utami, ST, MT (.....)

Penguji II : Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng (.....)

Penguji III : Dr. Ing. Donni Adinata, ST., M. Eng. Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok, Jawa Barat, Indonesia

Tanggal : 2 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas karunia dan rahmat – Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Pemurnian Rekombinan Protein Apoptin Dari Dua Sel Inang *Bacillus subtilis* 168 Dan *Escherichia coli* Bl21 Star™” untuk memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik pada Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- (1) Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S. Si., M. Eng., selaku dosen pembimbing I dalam penelitian ini yang memberikan masukan, arahan dan bimbingan dalam menyelesaikan skripsi ini.
- (2) Dr. Amarila Malik, Apt., M. Si., selaku dosen pembimbing II yang telah menyediakan waktu untuk mengajarkan banyak hal yang belum saya mengerti dalam penelitian ini.
- (3) Ir. Rita Arbianti M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah menyediakan waktu dan membantu permasalahan akademik perkuliahan selama ini.
- (4) Para dosen Departemen Teknik Kimia FTUI yang telah memberikan ilmu dan wawasannya.
- (5) Orangtua dan keluarga saya dan yang selalu memberi dukungan dan semangat berupa keceriaan setiap harinya selama mengerjakan skripsi.
- (6) Rekan satu bimbingan: Yongki Suharya, Muhammad Iqbal N., Agastya Sesarianda, Kenny Lischer, Khotib Sarbini, Darul Hamdi terutama Desi Anggarawati yang sudah membantu dalam berbagi informasi dan pengetahuan serta pengalaman yang berkaitan dengan penulisan ini, serta

Pauline Leon Artha dan Ibu Imelda yang memberikan arahan dan pengetahuan tentang penelitian ini.

- (7) Rekan satu laboratorium Mikrobiologi – Bioteknologi Farmasi UI: Furqon, Basyar, Mei, Rahmi, Olla, Nisa, Neti, Edith dan Lina yang senantiasa membantu saya selama mengerjakan penelitian.
- (8) Mas Tri dan Mbak Catur, laboran Mikrobiologi – Bioteknologi Farmasi UI yang selalu memberi arahan, saran dan peminjaman alat selama saya meneliti, serta
- (9) Semua pihak yang telah membantu penyusunan skripsi ini secara langsung maupun tidak langsung;

Saya menyadari bahwa dalam makalah skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, saya mengharapkan kritik dan saran yang membangun sehingga dapat menyempurnakan skripsi ini dan melaksanakan perbaikan di masa yang akan datang. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan bagi dunia pendidikan dan ilmu pengetahuan.

Depok, 2 Juli 2012

Raditya Imamul Khalid

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

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

Nama : Raditya Imamul Khalid

NPM : 0806460572

Program Studi : Teknologi Bioproses

Departemen : Teknik Kimia

Fakultas : Teknik

Jenis Karya : Skripsi

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

PEMURNIAN PROTEIN REKOMBINAN APOPTIN DARI DUA SEL

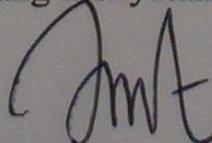
INANG *Bacillus subtilis* 168 DAN *Escherichia coli* BL21 Star™

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak 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 : 2 Juli 2012

Yang menyatakan



(Raditya Imamul Khalid)

ABSTRAK

Nama : Raditya Imamul Khalid
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul : Pemurnian Rekombinan Protein Apoptin dari Dua Sel
Inang *Bacillus subtilis* 168 dan *Escherichia coli* B121
Star™

Kanker adalah salah satu penyakit mematikan yang pengobatannya terus dikembangkan. Apoptin adalah molekul protein yang berpotensi untuk dijadikan obat kanker karena mempunyai aktivitas menginduksi proses kematian sel secara selektif hanya pada sel kanker saja. Kloning apoptin telah berhasil dilakukan dengan amplifikasi gen menggunakan PCR dengan menambahkan 12-histidin dan 8-arginin pada C-terminal kemudian diligase ke plasmid pOXGW dengan sistem *Gateway*, lalu diekspresikan ke dalam bakteri *Bacillus subtilis* 168. Plasmid pOXGW – apoptin – 12His8Arg dapat terekspresi di *B. subtilis*. Dalam penelitian ini *Bacillus subtilis* yang membawa plasmid diproduksi pada medium dengan variasi *xylose* sebagai substrat pemicu dan sebagai pembanding bakteri *Escherichia coli* B121 Star™ ditransformasi dengan plasmid pOGW – apoptin – 12His untuk kemudian dilakukan pemurnian. Hasil penelitian menunjukkan apoptin rekombinan dari *B. subtilis* 168 yaitu 568 µg/ml, sedikit lebih banyak dari jumlah protein rekombinan *E. coli* B121 Star™, 421 µg/ml.

Kata kunci: Apoptin, *Bacillus subtilis* 168, plasmid pOXGW – apop – 12His8Arg, *Escherichia coli* B121 Star™, pOGW – apop – 12His, dan *xylose*.

ABSTRACT

Name : Raditya Imamul Khalid
Study Program : Bioprocess Technology
Title : Purification of Recombinant Protein Apoptin from Two Cell Host *Bacillus subtilis* 168 and *Escherichia coli* B121 Star™

Cancer is a deadly disease so that the medicinal treatment constantly developed. Apoptin is a protein molecule that has potential to be used as a cancer drug because of its activity to induce cell death selectively to the cancer cells only. Cloning apoptin has been successfully performed by amplify gene using PCR with 12-histidine and 8-arginine to be added at C-terminal then ligated into plasmid pOXGW with Gateway system, and then expressed in *Bacillus subtilis* 168. Plasmids with pOXGW – apop – 12His8Arg can be expressed in *B. subtilis*. In this study, *Bacillus subtilis* carrying plasmid was produced with variations of xylose as substrate trigger on liquid medium and as a comparison, *Escherichia coli* B121 Star™ transformed with a plasmid pOGW – apop – 12His and then performed for purification of apoptin. The results showed that the recombinant apoptin obtain from *B. subtilis* 168 compared to *Escherichia coli* B121 Star™ is slightly higher, i.e. 568 µg/ml and 421 µg/ml, respectively.

Keywords: Apoptin, *Bacillus subtilis* 168, *Escherichia coli* B121 Star™, plasmid pOXGW – apop – 12His8Arg, pOGW – apop – 12His, and xylose.

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Batasan Masalah	4
1.5. Sistematika Penulisan	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Apoptin	6
2.2.1. Selektivitas Induksi Apoptin	8
2.2. Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	8
2.3. Transformasi Plasmid Pada <i>Bacillus subtilis</i>	10
2.4. Pemurnian Protein	10
2.4.1. Pemurnian Protein dengan IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography)	11
2.5. SDS – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE)	12
2.6. BCA Protein Assay Sebagai Analisis Konsentrasi Protein	14
2.6.1. Kompabilitas Zat Kimia	14
2.7. State Of The Art	16
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	20
3.1. Diagram Alir Keseluruhan Penelitian	20

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
3.3. Metode Penelitian	22
3.4. Variabel Penelitian.....	22
3.4.1. Variabel Bebas	22
3.4.2. Variabel Kontrol.....	23
3.4.3. Variabel Terikat.....	23
3.5. Alat dan Bahan.....	23
3.5.1. Alat	23
3.5.2. Bahan	24
3.6. Prosedur Penelitian	29
3.6.1. Pemiakan dan Kultur Bakteri.....	29
3.6.2. Pemurnian Apoptin.....	31
3.6.3. Pengujian Analisis Konsentrasi Protein	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1. Pemiakan Dan Kultur Bakteri.....	36
4.1.1. Pemiakan Bakteri	36
4.1.2. Transformasi Bakteri <i>Escherichia coli</i> BI21 Star™.....	37
4.1.3. Kultur Dan Panen Sel.....	40
4.2. Pemurnian Apoptin	41
4.3. Elektroforesis Gel Poliakrilamid.....	44
4.4. BCA Protein Assay	46
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	50
5.1. Kesimpulan	50
5.2. Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1. Penyakit umum dan penyebab kematian.....	1
Gambar 1.2 <i>Eshecerichia coli</i>	2
Gambar 2.1. Struktur <i>sequence</i> Apoptin.....	7
Gambar 2.2. Hepatoma manusia (HepG2) pada tikus telanjang sebelum dan sesudah pengobatan terapi gen Apoptin.....	8
Gambar 2.3. Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> ditumbuhkan dalam media agar	9
Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian Keseluruhan.....	20
Gambar 3.2. Bagan detil pemurnian apoptin.....	21
Gambar 3.3 Tahap Purifikasi His SpinTrap®	32
Gambar 3.4. Tahapan SDS - PAGE.....	34
Gambar 4.1. Hasil Pembiakan Bakteri.....	36
Gambar 4.2. Hasil transformasi <i>E. coli</i> BL21 Star™	39
Gambar 4.3. Penggoresan 8 koloni.....	39
Gambar 4.4. Penggoresan teknik diagonal.....	40
Gambar 4.5. Pelet sel rekombinan.....	41
Gambar 4.6. Alat sonikator yang digunakan.....	42
Gambar 4.7. Alat HisSpinTrap 600 µl.....	43
Gambar 4.8. Hasil SDS – PAGE gel 12% sampel duplo <i>B. subtilis</i> 168 induksi <i>xylose</i> 3%.....	45
Gambar 4.9. Hasil SDS – PAGE gel 12%.....	46
Gambar 4.10. Kurva kalibrasi larutan standar BSA	48

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Karakteristik HisSpin Trap™	12
Tabel 2.2 Inkompatibel Zat Kimia	15
Tabel 2.3 Zat Kimia Kompatibel Dengan BCA Protein Assay.....	16
Tabel 2.4. State Of The Art penelitian.....	18
Tabel 3.1. Peralatan yang digunakan dalam penelitian	23
Tabel 3.2. Bahan yang digunakan	24
Tabel 3.3. Larutan untuk <i>assay</i> standar	34
Tabel 3.4 Preparasi Reagen BCA.....	35
Tabel 4.1. Hasil absorbansi larutan standar BSA.....	47
Tabel 4.2. Hasil uji <i>BCA assay</i> pada protein rekombinan	48

DAFTAR LAMPIRAN

A. Marker Protein SDS – PAGE	54
B. Alat Elektroforesis	55



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit yang paling mematikan kedua di dunia (Rath, 2001). Berdasarkan data dari WHO, 8 dari 10 orang di dunia meninggal akibat gagal jantung atau kanker, seperti yang terlihat pada Gambar 1.1 (Rath, 2001). Pengobatan kanker ada berbagai macam, secara umum merupakan kombinasi antara operasi, radiasi dan kimia (kemoterapi). Tumor jinak jika mengganggu, biasanya dioperasi dan diangkat dan selanjutnya kekambuhan jarang terjadi. Tumor jinak tidak memerlukan terapi radiasi maupun kemoterapi. Berbeda dengan tumor ganas, hanya kanker stadium awal saja yang penyembuhannya bisa dengan operasi semata, selebihnya biasanya diterapi kombinasi antar ketiga macam jenis terapi di atas.

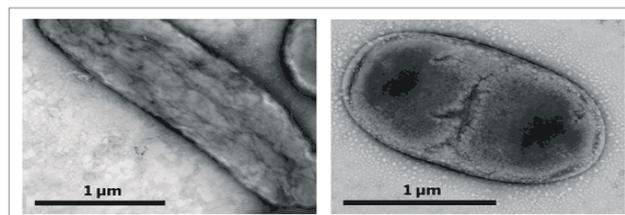
Teknik pengobatan kemoterapi mempunyai kelemahan yaitu tidak hanya menyerang sel tumor, tetapi juga sel normal yang memiliki kemampuan membelah secara cepat seperti sel rambut, sumsum tulang dan sel pada traktus gastrointestinal (Noteborn, 2009). Akibat yang timbul bisa berupa perdarahan dan depresi sum-sum tulang yang memudahkan terjadinya infeksi. Pada traktus gastro intestinal bisa terjadi mual, muntahan oreksia dan ulserasi saluran cerna, sedangkan pada sel rambut mengakibatkan kerontokan rambut.



Gambar 1.1. Penyakit umum dan penyebab kematian. (Rath, 2001)

Sekarang ini, ada pengobatan yang lebih menjanjikan untuk menyembuhkan tumor yaitu pengobatan dengan molekul yang bersifat selektif hanya membunuh sel kanker saja. Salah satunya adalah protein apoptin yang berasal dari virus anemia ayam. Pada ayam muda, infeksi virus ini menyebabkan penipisan timus yang disebabkan oleh apoptosis. Apoptin ditunjukkan untuk menginduksi apoptosis sel ganas dari burung, tikus dan manusia yang terkena *carcinoma*, *sarcoma*, *melanoma*, *lymphoma*, dan kanker darah, tanpa mengenai sel target normal (Leliveld dkk, 2003).

Untuk lebih mengetahui efek protein secara langsung sebagai agen antitumor, dilakukan kloning gen apoptin ke dalam organisme lain untuk memudahkan pada proses produksi protein rekombinan apoptin. Penelitian yang dilakukan hingga saat ini kloning dilakukan pada *E. coli* dan sel eukariotik akan tetapi baik *E. coli* maupun sel eukariotik seringkali memproduksi protein rekombinan dalam bentuk agregat tak terlarut atau disebut juga badan inklusi (*inclusion bodies*) pada sitoplasma, yang ditunjukkan dalam Gambar 1.2. Hal ini disebabkan oleh ketidakmampuannya membentuk struktur tersier yang benar sehingga protein menjadi tidak aktif. *Molecular chaperone* adalah protein yang berinteraksi dengan polipeptida yang baru sebagian terlipat ataupun terlipat tidak sempurna, kemudian menjembatani jalur *folding* yang benar (Nelson dkk, 2005). Badan inklusi sering terjadi setelah rekombinan protein ditransformasikan ke *E. coli*, kemudian sel *E. coli* dilisis dan disentrifugasi. Supernatan yang diambil ternyata masih mengandung *inclusion bodies* (badan inklusi).



Gambar 1.2 *Escherichia coli*.

Bagian kiri menunjukkan *E. coli* normal, sedangkan bagian kanan menunjukkan *E. coli* dengan badan inklusi.
(Ahsan, N. dkk, 2005)

Untuk menghindari badan inklusi, ekspresi protein dilakukan ke dalam bakteri *Bacillus subtilis*. Terdapat sejumlah alasan untuk mengklon di dalam *B. subtilis*. Pertama, *Bacillus* spp. merupakan Gram positif yang umumnya aerob obligat dibandingkan dengan *E. coli* yang berjenis Gram negatif dan anerob fakultatif sehingga kedua kelompok organisme ini diprediksi memiliki lingkungan internal yang berbeda. Kedua, *Bacillus subtilis* mampu melakukan sporulasi dan sebagai akibatnya juga digunakan sebagai model untuk diferensiasi prokariotik. Penggunaan manipulasi gen sangat memudahkan studi mengenai hal ini. Ketiga, *Bacillus subtilis* sangat banyak digunakan untuk industri fermentasi, terutama untuk produk eksoenzim. *Bacillus subtilis* dapat diatur untuk mensekresi produk-produk dari gen eukariotik yang terklon. Terakhir, dari sudut pandang bahaya biologis, *B. subtilis* merupakan organisme yang aman karena hingga kini diketahui tidak ada interaksi patogenik dengan manusia atau binatang. Bakteri ini di belahan dunia Timur bahkan dijadikan makanan dalam jumlah besar.

Dalam penelitian ini dilakukan produksi protein apoptin rekombinan dengan menggunakan sel inang *Bacillus subtilis* 168 yang telah ditransformasi dengan plasmid penyandi apotpin kemudian dimurnikan dengan kolom kromatografi nikel, dengan parameter variasi penambahan larutan induksi *xylose* untuk mengetahui pengaruh jumlah produksi apoptin. Sebagai kontrol, *Escherichia coli* B121 Star™ juga ditransformasikan dengan plasmid penyandi apoptin untuk mengetahui perbandingan jumlah protein yang dihasilkan.

1.2. Rumusan Masalah

Masalah yang dikaji dalam penelitian kali ini adalah bagaimana teknik mengkultur sel *B. subtilis* 168 hasil kloning yang dapat mengekspresikan apoptin dalam jumlah 500 ml dan teknik pemurnian apoptin dari dua sel inang *Bacillus subtilis* 168 dan *Escherichia coli* B121 Star™.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan pemurnian protein apoptin yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* 168, dengan plasmid pOXGW – apopt – 12His8Arg dan *Escherichia coli* B121 Star™ dengan plasmid pOGW – apopt – 12His.

1.4. Batasan Masalah

Nutrien yang digunakan adalah Luria Bertani (LB). *Bacillus subtilis* yang digunakan telah ditransformasi dengan plasmid pOXGW – apopt – 12His8Arg mempergunakan sistem *Gateway* (dibiayai oleh JSPS young researcher invitation program, NAIST, Jepang). Karakter spesifiknya belum diuji. Bakteri *Escherichia coli* B121 Star™ kompeten yang digunakan untuk transformasi plasmid merupakan bakteri komersil dari Invitrogen. Produksi apoptin ini dilakukan pada skala laboratorium dimana volum cair sebesar 500 mL.

1.5. Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

BAB I : PENDAHULUAN

Berisi latar belakang, rumusan masalah, tujuan penulisan, batasan masalah, serta sistematika penulisan yang digunakan pada penelitian ini.

BAB II : TINJAUAN PUSTAKA

Berisi informasi dan tinjauan pustaka lebih lanjut mengenai Apoptin, Selektivitas Apoptin, Bakteri *Bacillus subtilis*, Transformasi Plasmid, Pemurnian Protein, *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC), Teknik SDS – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE), dan BCA Assay Protein sebagai uji analisis konsentrasi protein.

BAB III : METODOLOGI PENELITIAN

Pada bagian bab ini berisi mengenai penjelasan tentang metodologi, tahap-tahap penelitian yang dilakukan dari awal hingga akhir, serta alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini mencakup prosedur penelitian.

BAB IV: HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini berisi mengenai hasil dari penelitian yang dilakukan disertai analisis hasilnya.

BAB V: KESIMPULAN DAN SARAN

Berisi kesimpulan akhir dari penelitian serta saran terkait penelitian lanjutan yang akan dilakukan terkait hasil penelitian sekarang.

DAFTAR PUSTAKA

Berisi sumber literatur yang penulis rujuk untuk penelitian ini.

LAMPIRAN

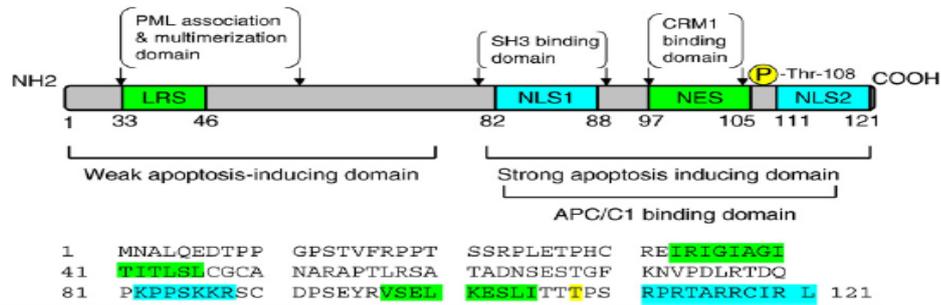
Berisi mengenai hal yang berhubungan secara langsung maupun tidak terhadap penelitian ini.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Apoptin

Apoptin adalah protein yang mengandung 121 macam asam amino dan terdeteksi pada 14 kDa, merupakan isolasi dari virus anemia ayam (CAV). Apoptin merupakan protein virus nonstructural dikodekan oleh gen virus VP3 (Noteborn, 2004). Protein ini diteliti bisa menginduksi apoptosis, proses matinya sel, pada berbagai jenis tumor manusia dan sel yang bertransformasi. Hal ini berpotensi untuk bisa digunakan pada aplikasi medis untuk mengobati kanker karena protein ini bisa mengenali sel normal manusia yang terkena kanker dan menginduksi agar terjadi apoptosis ketika proses berlangsung tanpa menginduksi sel normal (Danen Van Oorschot dkk, 1997).

Ujung C-terminal Apoptin mempunyai *bipartite nuclear localization sequence* (NLS): NLS1 mempunyai rentang asam amino 82-88, dan NLS2 rentang asam amino 111-121, serta *putative nuclear export sequence* (NES) pada rentang asam amino 97-105, seperti pada Gambar 2.1. NLS1, NLS2, dan NES merupakan *sequence* yang digunakan Apoptin untuk keluar dan masuk nukleus. Terdapat suatu peregangan pada Apoptin yang kaya akan leusin (aa 33-46). Peregangan leusin ini berfungsi sebagai pengikatan protein *promyelocytic* leukemia. Hal ini menunjukkan bahwa bentuk aktif biologi dari rekombinan Apoptin dapat membentuk pengikatan globular multimer yang terdiri dari 30 – 40 monomer yang berikatan secara non – kovalen. Formasi kompleks multimer dapat dilakukan melalui interaksi dengan prolin di N-terminus (aa 1-69).



Gambar 2.1. Struktur *sequence* Apoptin.

Panel bawah menunjukkan urutan Apoptin (UniProtKB/Swiss-Prot entry P54094). Asam amino yang berwarna hijau dan biru menunjukkan domain pada panel atas. (Los, M., S. Panigrahi, dkk, 2009)

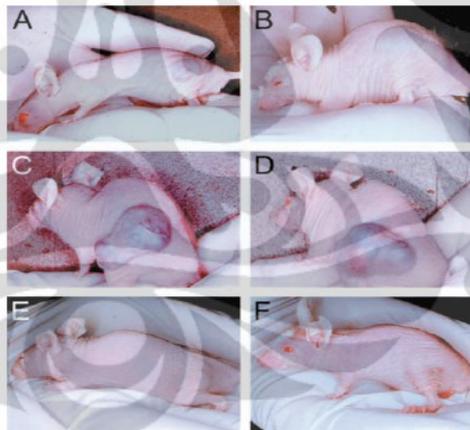
C-terminal pada setiap monomer mengandung NLS dengan situs fosforilasi (Thr 108) yang dapat melakukan interaksi dengan protein lain dan pemodifikasian oleh kinase. Mikroinjeksi multimer Apoptin ke dalam sitoplasma sel tumor menunjukkan bahwa kompleks Apoptin dapat melakukan translokasi ke nukleus.

Bentuk apoptin sangat stabil, multimerik aktif biologis kompleks terdiri dari 30 – 40 monomer dan nukleoprotein kompleks tingkat tinggi dengan konformasi DNA ditemukan dominan dalam aktif transkripsional, replikasi dan DNA rusak. Karena itu, apoptin mungkin dapat memicu apoptosis dengan menginterferensi transkripsi dan sintesis DNA. (Leliveld dkk, 2003). Struktur NLS dalam terminal C berperan penting bagi apoptin untuk keluar masuk nukleus ketika proses apoptosis. Sedangkan penyisipan tag pada terminal C tidak memengaruhi aktivitas antikanker dari apoptin, karena itu, penyisipan tag dilakukan pada terminal C (Yan dkk, 2010).

Beberapa laporan menunjukkan apoptin menginduksi beberapa sel kanker agar terjadi proses apoptosis secara selektif termasuk *osteosarcoma*, *hepatoma*, *cholangiocarcinoma*, *melanoma*, kanker usus besar, kanker paru, kanker payudara, prostat, serviks dan lainnya, dengan tidak berdampak pada sel normal (Danen Van Oorschot dkk, 1997). Sayangnya, mekanisme selektivitas induksi apoptosis tumor sel oleh apoptin masih diteliti. Salah satu alasannya adalah sifat biofisika masih belum jelas menyebabkan kesulitan untuk mengekspresikan protein apoptin rekombinan dalam bentuk *native*.

2.2.1. Selektivitas Induksi Apoptin

Apoptin dapat menginduksi kematian sel secara selektif yang berasal dari tumor manusia seperti melanoma, hepatoma, limfoma, kanker usus, kanker payudara, dan kanker paru-paru (Noteborn, 2009). Apoptin tidak menginduksi apoptosis pada sel normal, termasuk sel endothel manusia, hepatosit, dan sel-sel induk hematopoietik. Dengan demikian, sensitifitas terhadap apoptin tergantung alterasi yang berhubungan dengan keadaan sel yang mengalami transformasi. Apoptin secara efektif dapat menyebabkan apoptosis pada sel tumor dapat dibuktikan melalui tikus telanjang, seperti pada Gambar 2.2. Tikus tersebut sudah diberikan *xenografted* sel hepatoma manusia. Kemudian, tikus tersebut diinjeksikan intratumoral dengan rekombinan apoptin. Tikus tersebut akhirnya mengalami penurunan pertumbuhan sel tumor (Noteborn dan van der Eb, 1998).



Gambar 2.2. Hepatoma manusia (HepG2) pada tikus telanjang sebelum dan sesudah pengobatan terapi gen Apoptin. HepG2 tumbuh di bawah kulit. HepG2 disuntik lima kali pada hari bergantian. A,B: Contoh tumor HepG2 di awal pengobatan. C,D: Contoh tumor HepG2 yang diobati lacZ. E,F: Regresi tumor dengan diberikan Apoptin. (Noteborn dan van der Eb, 1998)

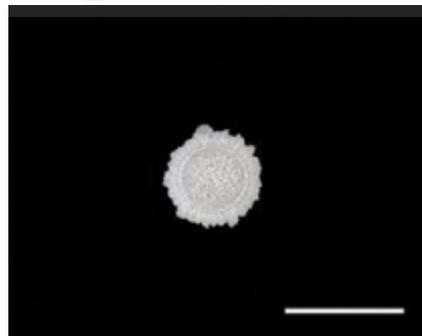
2.2. Bakteri *Bacillus subtilis*

Bacillus merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang, memiliki endospora, bersifat motil dan tergolong ke dalam bakteri aerob atau fakultatif anaerob. Genus *Bacillus* merupakan bakteri yang sangat baik digunakan sebagai kandidat agen biokontrol karena dapat menghasilkan beberapa

metabolit aktif seperti antibiotik, proteinase dan bakteriosin. Pada umumnya antimikrob yang dihasilkan *Bacillus* berupa polipeptida seperti bakteriosin dan antibiotik. Klasifikasi bakteri *Bacillus subtilis* adalah sebagai berikut ini (Cohn, 1872 dikutip Wikipedia.org):

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Firmicutes
 Kelas : Bacilli
 Ordo : Bacillales
 Famili : Bacillaceae
 Genus : Bacillus
 Species : *Bacillus subtilis*.

Bacillus merupakan perwakilan dari bakteri genus Gram – positif yang terdapat di alam (tanah, air, dan debu di udara). Beberapa spesies merupakan flora normal di saluran interestin manusia. Gambar 2.3 menunjukkan ketika ditumbuhkan di media Luria Bertani (LB) agar, *Bacillus* bertumbuh dan berkembang banyak, menyebar, menciptakan koloni yang berbentuk lingkaran dan berwarna abu - abu dengan pinggiran yang tidak rata. Bakteri ini bersifat aerobik oleh karena itu dalam proses fermentasi, aerasi merupakan salah satu hal yang perlu diperhatikan. Karakteristik yang unik dari bakteri ini adalah kemampuan untuk membentuk endospora ketika kondisi lingkungan yang tertekan. Spora ini dapat bertahan 60 tahun atau lebih pada kondisi lingkungan yang ekstrem.



Gambar 2.3. Bakteri *Bacillus subtilis* 168 ditumbuhkan dalam agar Mggg (Earl dkk., 2008)

2.3. Transformasi Plasmid Pada *Bacillus subtilis*

Penggunaan *B. Subtilis* sebagai inang plasmid apoptin memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan *E. coli*. Pertama, *Bacillus* spp. merupakan Gram positif dan umumnya aerob obligat dibandingkan dengan *E. coli* yang Gram-negatif dan anaerob fakultatif. Jadi, kedua kelompok organisme ini mungkin memiliki lingkungan internal yang sangat berbeda. Kedua, *Bacillus* spp. mampu melakukan sporulasi dan sebagai akibatnya juga digunakan sebagai model untuk diferensiasi prokariotik. Penggunaan manipulasi gen sangat memudahkan studi mengenai hal ini. Ketiga, *Bacillus* spp. sangat banyak digunakan untuk industri fermentasi, terutama untuk produk eksoenzim. *Bacillus* spp. dapat diatur untuk mensekresi produk-produk dari gen eukariotik yang terklon. Terakhir, dari sudut pandang bahaya biologis, *B. subtilis* merupakan organisme yang sangat aman karena hingga kini diketahui tidak ada interaksi patogenik dengan manusia atau binatang, bahkan bakteri ini di belahan dunia sebelah Timur biasa dimakan dalam jumlah besar.

Salah satu ciri penting dari eksperimen pengklonan yang melibatkan plasmid adalah transformasi dari sel penerima dengan DNA rekombinan. Tidak seperti *E. coli*, maka galur-galur *B. subtilis* yang dikembangkan secara genetik secara alami dapat ditransformasi dan kondisi untuk memaksimalkan kemampuan ini telah diketahui dengan baik. Meskipun mudah untuk mentransformasi *B. subtilis* dengan fragmen-fragmen DNA kromosom masih terdapat masalah yang berkaitan dengan transformasi melalui molekul plasmid. *B. subtilis* strain bisa ditransformasi agar resistan terhadap antibiotik dengan menggunakan plasmid DNA dari *S. aerus*. Efisiensi hasil transformasi ini cukup tinggi sehingga bisa dilakukan dalam skala lab dengan menggunakan sel kompeten dan plasmid DNA.

2.4. Pemurnian Protein

Pemurnian protein adalah serangkaian proses untuk mengisolasi satu jenis protein dari campuran kompleks. Tahapan ini sangat penting untuk karakterisasi fungsi, struktur dan interaksi protein yang diteliti. Material

awal biasanya jaringan biologis atau kultur mikroorganisme. Beberapa langkah pada proses pemurnian dapat melepaskan protein dari matriks yang menahannya, memisahkan bagian protein dan bukan protein dari campuran, dan terakhir memisahkan protein yang diinginkan dari jenis protein lain. Pemisahan satu protein dari jenis protein lainnya adalah tahapan pemisahan yang menyita banyak tenaga. Langkah pemisahan bisa ditinjau dari ukuran, sifat fisika – kimia, ikatan afinitas dan aktivitas biologisnya.

2.4.1. Pemurnian Protein dengan IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*)

Immobilized Metal Affinity Chromatography merupakan suatu teknik pemisahan protein yang menggunakan senyawa pengkelat yang terikat secara kovalen pada zat padat pendukung kromatografi dan zat padat ini dapat mengikat ion logam (Gabere-Porekrar dkk, 2001). Prinsip dari IMAC ini yaitu interaksi reversible antara beberapa rantai samping asam amino dan *immobilized* ion metal.

Banyak protein rekombinan yang direkayasa agar mengandung paling sedikit 6 residu histidin pada N atau C terminalnya dan protein ini sering disebut sebagai protein His-Tag. Kehadiran His-Tag ini memfasilitasi proses pemurnian protein berdasarkan afinitas selektif protein dengan polihistidin tersebut terhadap adsorben yang dilengkapi dengan pengkelat metal seperti Ni^{2+} atau Co^{2+} . Interaksi antara residu histidin dengan ion logam ini bersifat reversibel dan protein yang terikat dapat dielusi dengan imidazole atau dengan merendahkan nilai pH. Karena imidazole identik dengan rantai samping histidin, maka pada saat konsentrasi imidazole ditingkatkan, imidazole akan menggantikan posisi polihistidin pada resin dan polihistidin akan terelusi keluar.

Salah satu jenis IMAC untuk proses purifikasi adalah His SpinTrap™ (GE Healthcare, 2005) kolom putar sekali pakai untuk proses purifikasi cepat dan seleksi protein yang memiliki tag – histidin. Kolom ini dapat digunakan dengan mikrosentrifuge standar, dan sekali proses purifikasi membutuhkan sekitar 10 menit. His SpinTrap™

mengandung medium Ni Sepharose™ berkinerja tinggi sehingga kapasitas pengikatan protein tinggi, rendah kebocoran ion Nikel (Ni²⁺), dan kompatibilitas yang sangat baik dengan zat pendaturasi ditambah jangkauan bahan aditif yang luas. Tabel 2.1 menjelaskan karakteristik dari His SpinTrap™.

Tabel 2.1 Karakteristik HisSpin Trap™ (GE Healthcare, 2005)

Bahan Kolom	Tabung Polipropilen, <i>Frits</i> polietilen
Medium	Ni Sepharose Berkemampuan Tinggi
Ukuran <i>Bead</i> Rata - Rata	34 µm
Kapasitas Pengikat Protein	Berkisar 750 µg protein tag histidin/kolom
Volum Dasar	100 µl
Kecocokan Selama Penggunaan	Stabil Pada Semua Larutan Penyangga Umum, Agen Pereduksi, Pendenaturasi Dan Deterjen
Larutan Penyangga Terlarang	Agen Chelating, seperti EDTA, EGTA, Sitrat
Penyimpanan	0,15% Kathon™ CG
Suhu Penyimpanan	4 - 30 °C

2.5. SDS – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE)

Elektroforesis adalah ilmu yang mempelajari pergerakan muatan molekul dalam medan elektrik. Medium yang biasa digunakan adalah selulosa atau gel tipis yang terbuat dari poliakrilamida atau *agarose*. Selulosa digunakan sebagai medium pendukung untuk molekul biokimia yang beratnya rendah, seperti asam amino atau karbohidrat, sedangkan gel agarose atau poliakrilamida sering digunakan untuk molekul yang lebih besar, seperti protein.

Gel poliakrilamida terbentuk setelah polimerisasi dari monomer akrilamida menjadi ikatan polimerik poliakrilamida dan *cross – linking* dari ikatan *N,N'-methylenebisacrylamide*. Reaksi polimerisasi dimulai dengan menambahkan amonium persulfat (APS) kemudian diakselerasi dengan TEMED, yang mengkatalis pembentukan radikal bebas dari ammonium persulfat. Karena oksigen menghambat proses polimerisasi, deaerasi larutan gel sebelum penambahan katalis akan mempercepat proses ini. Pemisahan protein dengan teknik ini bergantung kepada seberapa besar konsentrasi

akrilamid dan bis – akrilamid. Konsentrasi yang rendah akan menghasilkan gel berpori besar sehingga baik digunakan untuk pemisahan protein dengan molekul besar sedangkan konsentrasi yang tinggi menghasilkan gel berpori lebih kecil sehingga protein dengan berat molekul lebih kecil dapat terikat (Boyer, R., 2000).

Teknik umum elektroforesis tidak bisa digunakan untuk mengukur berat molekul dari molekul biologis karena pergerakan dari suatu zat dalam gel dipengaruhi oleh ukuran dan muatan. Untuk mengatasi hal tersebut, jika sampel biologis diperlakukan sedemikian rupa sehingga muatannya sejenis, sehingga pergerakan elektroforesisnya akan dipengaruhi oleh ukuran. Berat molekular protein bisa diestimasi jika ada penggunaan deterjen Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) dan agen pereduksi mercaptoethanol (β ME). Ketika sampel dikontak dengan SDS, deterjen ini mendenaturasi struktur sekunder, tersier dan kuartener dari protein dan menyebabkan rantai protein polipeptida menjadi linier, merkaptanol berguna untuk membantu denaturasi protein dengan mereduksi ikatan disulfida. Reaksi denaturasi membentuk muatan negatif dan menghasilkan mobilitas elektroforetik dalam medan listrik sehingga kompleks SDS – protein dapat terelusi pada gel (Boyer, R., 2000).

Metode yang sering digunakan untuk diskontinyu gel elektroforesis adalah metode Laemmli (1970). Pada sistem diskontinyu, pertama sampel melewati *stacking gel*, yang berpori besar. Pelarut *stacking gel* ini mengandung ion klorin (disebut ion utama) yang mobilitas elektroforesisnya lebih besar dibanding protein pada sampel. Buffer elektroforesis mengandung ion glisin (disebut ion pengikut) yang mobilitas elektroforesisnya lebih rendah dibanding protein. Hasilnya adalah migrasi antar ion dari zona konduktivitas rendah dan migrasi protein. Gradien voltage yang lebih tinggi pada zona ini memudahkan protein untuk bergerak lebih cepat ke *stack* di zona antara ion utama dan pengikut. Setelah melewati gel *stacking*, protein masuk ke gel pemisah. Gel ini mempunyai pori yang lebih kecil, konsentrasi garam lebih besar dan pH lebih tinggi dibanding gel *stacking*. Pada gel pemisah, ion glisin pindah melewati protein dan protein

terpisah berdasarkan berat molekular di gel denaturasi (SDS) atau bentuk, ukuran dan muatan molekul pada gel nondenaturasi.

2.6. BCA Protein Assay Sebagai Analisis Konsentrasi Protein

Uji Protein BCA berdasarkan reaksi biuret, reduksi dari Cu^{2+} menjadi Cu^{1+} oleh protein dalam larutan basa, dan konsentrasinya bergantung pada deteksi dari ion tembaga monovalen (Cu^{1+}) yang dihasilkan. *Bicinchoninic Acid* adalah reagen kromogenik yang ber – *chelate*, senyawa dari kompleks kation dengan senyawa organik menghasilkan struktur cincin, dengan tembaga tereduksi, menghasilkan reaksi ungu kompleks dengan absorbansi kuat pada 562 nm (Smith, P. K., et al., 1985). Kit ini dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dalam kisaran 20-2,000 ug/ml pada pengujian larutan standar atau pengukuran *microassay*. Komponen Kit cukup untuk mendeteksi 500 reaksi skala standar (50 ml sampel protein ditambah 1 ml pereaksi) atau 2.500 skala mikro reaksi (25 ml sampel protein ditambah 200 ml reagen di plate – 96). Pada kit juga terdapat serum bovine albumin (BSA) standar (2 mg/ml), untuk pembuatan kurva standar konsentrasi protein. Assay Protein BCA dapat digunakan untuk mendeteksi beberapa senyawa kimia dan deterjen. Beberapa reagen, termasuk agen *chelating*, asam kuat atau basa, dan agen pereduksi mengganggu reaksi reduksi dan *chelating* pada saat uji ini berlangsung.

2.6.1 Kompabilitas Zat Kimia

2.6.1.1 Zat Kimia Inkompatibel

Ada beberapa zat kimia yang bisa mengintervensi Kit Uji Protein BCA pada konsentrasi yang kecil dan harus dihindari sebagai komponen pada dapar sampel. Jika zat kimia tersebut tidak bisa dihilangkan, maka uji proteinnya harus menggunakan Non – Interfering Protein Assay™ Kit (Cat. No. 488250). Tabel 2.2 berikut ini tidak menyeluruh, dan belum dipastikan apakah zat kimia lain bisa mengintervensi dengan *assay*.

Tabel 2.2 Inkompatibel Zat Kimia (Novagen, 2011)

No	Substance
1	Asorbic acid
2	Catecholamines
3	Creatinine
4	Cysteine
5	EGTA
6	Glycerol (impure)
7	Hydrogen peroxide
8	Hydrazides
9	Iron
10	Lipids
11	Melibiose
12	Phenol Red
13	Sucrose (impure)
14	Tryptophan
15	Tyrosine
16	Uric acid

2.7.1.2 Kompatibel Zat Kimia

Tabel 2.3 berikut merupakan substansi yang sesuai dengan uji reaksi BCA, namun tabel ini masih belum komprehensif dan belum diketahui substansi lain bisa menginterferensi dengan *assay*.

Tabel 2.3 Zat Kimia Kompatibel Dengan BCA Protein Assay (Novagen, 2011)

Substansi	Konsentrasi	Substansi	Konsentrasi
ACES, pH 7,8	25 mM	Gliserol (murni)	10%
Aseton	10%	Guanidine-HCl	4 M
Asetonitrit	10%	HEPES	100 mM
Amonium Sulfat	1,5 M	Asam Hidroklorik	100 mM
Aprotinin	10 mg/L	Imidazol, pH 7	50 mM
Bisin, pH 8,4	20 mM	Insect PopCulture® Reagen (Cat. No. 71187)	tak terdilusi
Bis - Tris, pH 6,5	33 mM	Leupeptin	10 mg/L
Borate, pH 8,5	50 mM	2-Merkaptoetanol	0,01%
Brij®-35	5%	MES, pH 6,1	100 mM
Brij-56, Brij-58	1%	Metanol	10%
BugBuster®, Reagen Ekstraksi Protein (Cat. No. 70584)	tak terdilusi	MOPS, pH 7,2	100 mM
Kalsium Klorida (pada TBS, pH 8)	10 mM	Nikel Klorida (pada TBS, pH 8)	10 mM
Cesium Bikarbonat	100 mM	Nonidet P-40 (NP-40)	5%
CHAPS	5%	Oktil β-tioglukosida	5%
CHAPSO	5%	Oktil β-tioglukopiranosida	5%
CHES, pH 9	100 mM	PIPES, pH 6,8	100 mM
Kobalt Klorida (pada TBS, pH 8)	0,8 mM	PMSF	1 mM
CytoBuster™ Reagen Ekstraksi Protein (Cat. No. 71009)	tak terdilusi	PopCulture Reagen (Cat. No. 71092)	tak terdilusi
Asam Deoksiklorik	5%	Potassium tiosinat	3 M
DMF	10%	Reportasol™ Dapar Ekstraksi (Cat. No. 70909)	tak terdilusi
DMSO	10%	SDS	5%
DTE	1 mM	Sodium asetat, pH 4,8	200 mM
DTT	0,5 mM	Sodium azida	0,2%
EDTA	10 mM	Sodium Bikarbonat	100 mM
EPPS, pH 8	100 mM	Sodium Klorida	1 M
Etanol	10%	Sodium Sitrat, pH 4,8/pH 6,4	200 mM
Besi Klorida (pada TBS pH 8)	10 mM	Sodium Hidroksida	100 mM
Glukosa	10 mM	Sodium Fosfat	100 mM
Glisin-Hcl, pH 2,8	100 mM	Sukrosa	40%

2.7. State Of The Art

Dalam melakukan rekombinan protein ke dalam *Eschericia coli* seringkali terjadi badan inklusi. Ketika rekombinan protein apoptin berhasil ditransformasikan ke sel inang (*E. coli*), sel *E. coli* dilisis dengan

sentrifugasi. Supernatan yang terbentuk ternyata masih mengandung badan inklusi. Hal ini disebabkan ketidakmampuan protein untuk membentuk struktur tersier yang benar sehingga protein menjadi tidak aktif. *Inclusion bodies* umumnya terbentuk dari protein asing selain apoptin yang diproduksi oleh rekombinan mikroorganisme.

Berdasarkan Tabel 2.4, ekspresi protein apoptin banyak dilakukan pada *host cell E. coli*, dengan strain dan penggunaan tag yang berbeda. Hasilnya memang bisa didapatkan protein apoptin, namun *E. coli* masih memproduksi protein rekombinan dalam bentuk agregat tak terlarut. Selain itu, untuk memproduksi protein rekombinan dengan jumlah yang maksimal, ditambahkan konsentrasi IPTG ketika melakukan inokulum cair. Meskipun berhasil secara produksi, namun secara ekonomi bahan ini tidak efisien. Oleh karena itu, penelitian ini mencoba untuk menghindari bentuk agregat tak terlarut dengan menggunakan bakteri *Bacillus subtilis* sebagai sel inang dengan pOXGW – apop – 12His8Arg sebagai tag penghasil apoptin. Penambahan IPTG diganti dengan *Xylose*, yang secara ekonomi lebih terjangkau. *Escherichia coli* B121 Star™ dengan plasmid pOGW – apop – 12His digunakan sebagai pembanding apoptin rekombinan. Induksi xylose digunakan pada *B. subtilis* 168 dan divariasikan, sedangkan IPTG digunakan untuk *E. coli* B121 Star™.

Tabel 2.4. State Of The Art penelitian

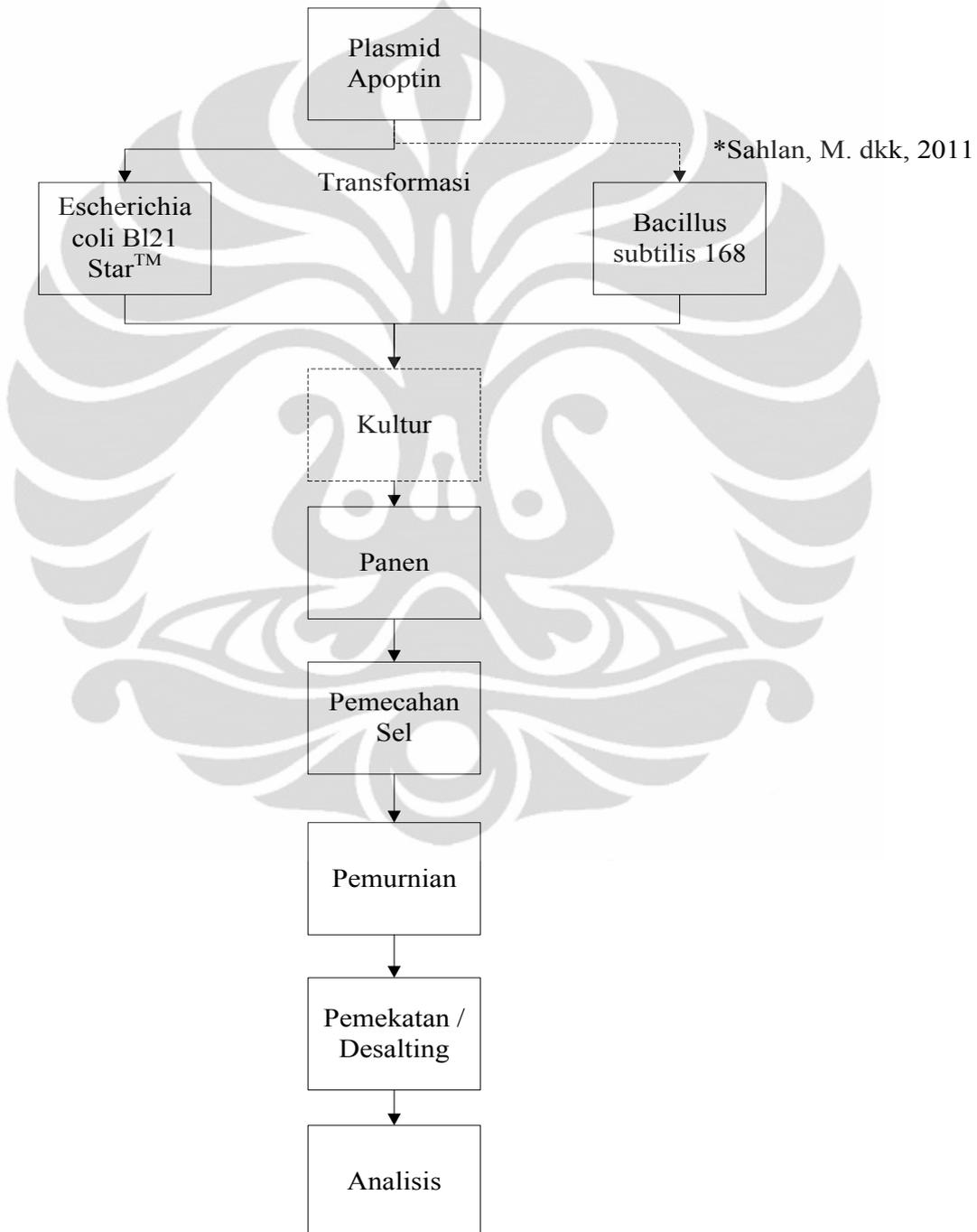
No	Nama Peneliti	Host Cell	Tag	Hasil	Referensi
1	S.R. Leliveld, R. T. Dame, J. L. Rohn, M. H. M. Noteborn, J. P. Abrahams	-	MBP-Apoptin(1 – 80) – 6His pada N terminal Apoptin – MBP pada C terminal	Studi in vitro menunjukkan kedua apoptin N terminal dan C terminal secara terpisah memiliki afinitas yang rendah dibanding apoptin secara lengkap. Karena itu, tingkat induksinya juga menjadi setengah dari apoptin lengkap.	Leliveld, S. R., et al. (2003)
2	Eliana Ottati Nogueira-Dantas, Antonio J Piantino Ferreira, Claudete Serrano Astolfi- Ferreira, Liana Brentano	<i>E. coli</i> TOP10	Protein rekombinan VP3 6His tag pada C terminal	Protein rekombinan konsentrasi tinggi didapatkan pada bentuk terlarut. Tetapi, solubilisasi dari protein tidak sempurna, dan VP3 masih ditemukan pada fraksi tidak larut.	Nogueira-Dantas, E.O. et al. (2007)
3	Meng-Shiou Lee, Yi-Yang Lien, Shin-Huei Feng, Ray-Ling Huang, Ming-Cheng Tsai, Wen-Te Chang, Hsi-Jien Chen	<i>E. coli</i> strain BL-21 (DE3)	-	Pada rekombinan VP1, overekspresi berhasil dengan jumlah protein 26.2 mg/L. hasil tertinggi untuk rekombinan VP2 sebesar 15.5 mg/L, lebih sedikit dari rekombinan VP1. Hasil produksi ini dapat ditingkatkan dengan optimasi medium kultur dan protein refolding	Lee, M-S., et al. (2009)

4	Jun Sun, Ying Yan, Xiao-Ting Wang, Xiao-Wen Liu, Dong-Jun Peng, Min Wang, Yi-Qiang Zong, Ying-Hui Zhang, , Mathieu H.M. Noteborn, Jun Tian dan Shen Qu	Bacterial strain BL21(DE3)PlysS	PTD4 – Apoptin pada N terminal	PTD4 - apoptin dimasukkan ke dalam sel tumor manusia, sel bisul kanker (HepG2) dan sel bisul kanker serviks (HeLa) serta sel normal manusia sebagai kontrol. Kemudian diuji aktivitasnya dengan flow cytometric dan TUNEL. Hasilnya PTD4 - apoptin hanya menginduksi sel tumor HepG2, tapi tidak sel normal.	Sun, J., et al. (2009)
5	Suna Zhou, Mingxin Zhang, Jiansheng Wang	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (EcN)	TAT – apoptin pada C terminal	Apoptin dapat menginduksi apoptosis spesifik tumor in vitro dan in vivo, lebih lanjut dapat membalikkan, menekan atau mencegah perkembangan karsinogenik. Sampai batas tertentu, efek samping dan efek beracun belum diamati lebih lanjut.	Zhou, S., Zhang, M., Wang, J. (2011)
6	Raditya Imamul Khalid	<i>Bacillus subtilis</i> 168, <i>Escherichia coli</i> B121 Star™	pOXGW – apop – 12His8Arg, pOGW – apop – 12His	-	-

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

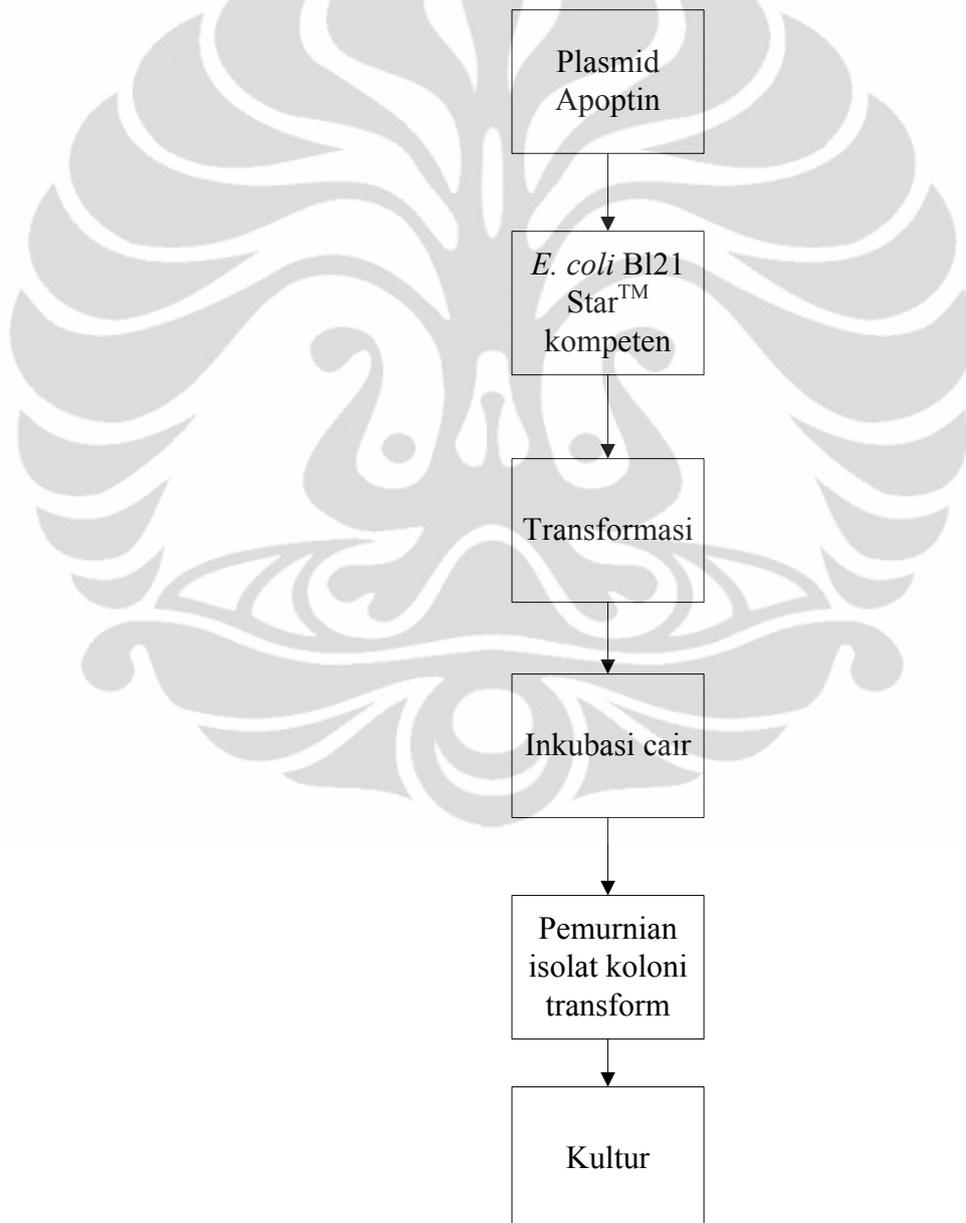
3.1. Diagram Alir Keseluruhan Penelitian

Secara garis besar, urutan penelitian yang akan dilakukan seperti pada Gambar 3.1 berikut:



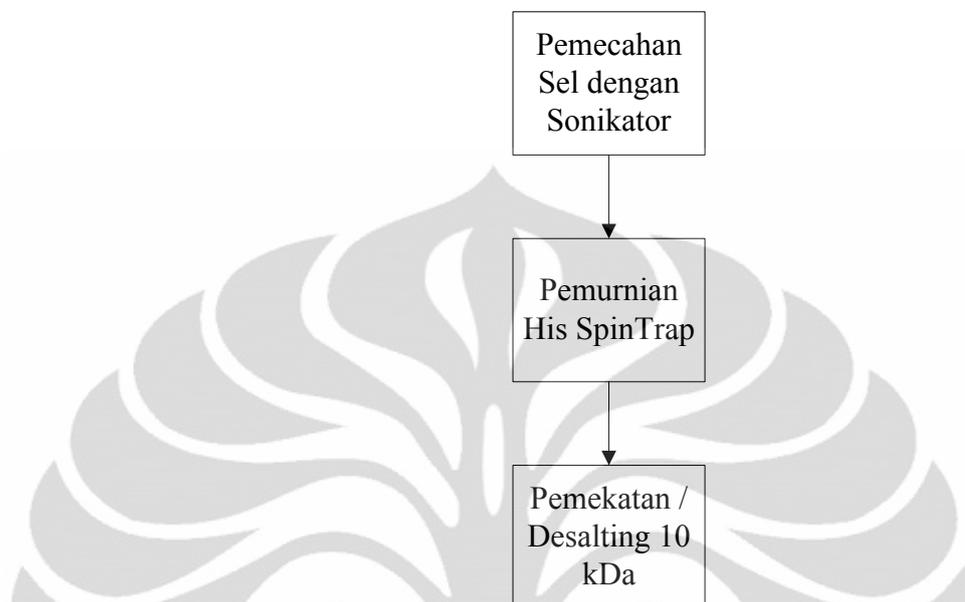
Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian Keseluruhan (Sahlan, M. dkk, 2011)

Pada bagan tersebut, transformasi dilakukan hanya pada sel inang *Escherichia coli* B121 Star™, untuk *Bacillus subtilis* 168, transformasi telah dilakukan sebelumnya oleh Sahlan, M. dkk (2011). Modifikasi dari penelitian ini adalah penggunaan variasi *xylose* sebagai induksi pada saat proses kultur cair untuk *Bacillus subtilis* 168, selain itu juga modifikasi dilakukan pada penggunaan HisSpin Trap sebagai metode untuk pemurnian. Tahapan rincian dapat dilihat pada Gambar 3.2 sebagai berikut.



Gambar 3.2. Bagan detail transformasi plasmid

Bagan tahapan pemurnian seperti pada Gambar 3.3 berikut:



Gambar 3.3. Bagan pemurnian apoptin rekombinan

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi – Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok dan waktu penelitian dari bulan Februari 2012 – Mei 2012.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu meliputi tahapan kultur bakteri *Bacillus subtilis* 168 dan *Escherichia coli* BL21 Star™ dalam medium cair skala laboratorium sebanyak 500 mL, ekspresi protein apoptin dan pemurnian apoptin. Tahap selanjutnya uji analisis pemurnian dan konsentrasi protein.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang divariasikan dengan besar nilai tertentu. Variabel bebas umum dalam penelitian ini yaitu sel inang yang

digunakan, yaitu *Bacillus subtilis* 168 dengan *Escherichia coli* B121 Star™. Untuk induksi *xylose* divariasikan secara khusus pada *Bacillus subtilis* 168.

3.4.2. Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang dikendalikan atau dibuat dalam keadaan konstan. Variabel kontrol dalam penelitian ini yaitu perlakuan proses kultur yang sama pada kedua sel inang.

3.4.3. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang terjadi akibat adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu jumlah protein apoptin yang dihasilkan dari ekspresi sel inang.

3.5. Alat dan Bahan

3.5.1. Alat

Dalam penelitian ini, terdapat alat yang digunakan seperti yang dipaparkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Peralatan yang digunakan dalam penelitian

No	Peralatan	Merk
1	<i>shaking incubator</i>	Orbital Shaker Incubator
2	<i>static incubator</i>	Memmert
3	Autoklaf	Hirayama
4	timbangan analitik	Acculab, Scout
5	Sentrifuge berpendingin	Tomy
6	Mikrosentrifuge berpendingin	Sorvall Fresco
7	hotplate stirrer	Torrey Pins Scientific
8	laminar air flow	Esco
9	pipet mikro	Gilson
10	tabung sentrifuse 15 & 50 ml	Falcon
11	Spektrofotometer	GeneQuant™ 100
12	alat gelas	Pyrex

13	Disposal plate	-
14	pH meter	Eutech Instruments pH510 CyberScan
15	Kolom <i>Affinity</i> Nikel	His SpinTrap [®]
16	Freezer -20°C	GEA
17	Ultra Low Temperature Freezer -80°C	New Brunswick Scientific U101 Innova
18	SDS - PAGE	Biometra
19	Sonikator	LABSONIC [®] M
20	Electrophoresis power supply EPS 301	GE Healthcare
21	Oven Pengering	LAB - Line
22	Oven Penyimpan	WTB Binder

3.5.2. Bahan

Bahan kimia yang digunakan adalah seperti pada Tabel 3.2 berikut:

Tabel 3.2. Bahan yang digunakan

No	Bahan	Merk / Nama
1	<i>Bacillus subtilis</i> 168 rekombinan	
2	<i>Escherichia coli</i> B121 Star TM	Invitrogen
3	Plasmid apoptin	pOXGW – 12His8Arg – apoptin, pOGW – 12His - apoptin
4	Luria Bertani (LB)	USB
5	Bacto Agar	USB
6	Aquabidest	PT. Ikapharmindo Putramas
7	Xylose	Merck
8	IPTG	Wako
9	Tetrasiklin	Sigma
10	Tris Base	Amersham Bioscience
11	HCl	Merck
12	NaCl	Merck
13	Na ₂ EDTA	Merck

14	Imidazol	Merck
15	Gliserol 100%	Aldrich
16	Isopropanol	Aldrich
17	Asam asetat	Aldrich
18	Tetrasiklin	Sigma
19	BSA	Fermentas
20	SDS	Wako
21	Premixed preweighed akrilamid/bisakrilamid	BioRad
22	Amonium persulfat	Merck
23	Loading buffer	Fermentas
24	2 - merkaptoetanol	Fermentas
25	TEMED	Merck
26	Protein Staining Solution	Fermentas
27	Protein Destaining Solution	Fermentas
28	BCA Assay Kit	Novagen

3.5.2.1. Pembuatan Medium

Medium yang digunakan adalah medium agar dan cair LB. Medium agar digunakan untuk meremajakan kultur bakteri sedangkan medium cair digunakan untuk membuat kultur inokulum dan kultur cair bakteri.

Untuk membuat 250 ml medium agar LB ditimbang LB broth 5 gr dan Bacto Agar 3,75 gr dan dilarutkan dalam aquadest pada labu bulat. Medium kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium yang sudah steril, didinginkan pada suhu ruang dan setelah agak dingin, ditambah tetrasiklin sehingga medium agar LB mengandung 5 µg/ml (untuk *Escherichia coli*), atau mengandung 10 µg/ml (untuk *Bacillus subtilis*). Medium segera dituang pada *disposal plate* secara aseptis dan dibiarkan mendingin dan mengeras. Medium yang sudah beku ditaruh pada inkubator 37 °C semalam.

Untuk membuat 500ml medium cair LB ditimbang 10 g serbuk LB broth dan dilarutkan dalam 500ml aquadest dalam labu bulat. Medium yang sudah jadi selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah agak dingin, ditambahkan larutan tetrasiklin konsentrasi 5 mg/ml sehingga medium mengandung 5 µg/ml tetrasiklin (untuk *Escherichia coli*) atau 10 µg/ml (untuk *Bacillus subtilis*). Medium cair selanjutnya dapat langsung digunakan untuk pembuatan kultur cair atau disimpan dalam lemari pendingin untuk digunakan keesokan harinya.

3.5.2.2. Pembuatan Larutan, Dapar dan Pereaksi

3.5.2.2.1. Dapar Fosfat pH 6,8

Sebanyak 2,7 g KH_2PO_4 ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest lalu pH diatur dengan penambahan K_2HPO_4 hingga tercapai pH 6,8. Dapar fosfat yang sudah jadi selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.2.2.2. Larutan IPTG 1 M

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

3.5.2.2.3. Larutan Tetrasiklin 5 mg/ml

Sebanyak 5 mg ditimbang dan dicampur dengan etanol absolut volum 7 ml untuk kemudian dilarutkan seluruhnya menggunakan *vortex*. Tambah 3 ml aquabidest steril dan di – *vortex* lalu difilter dan disimpan pada mikrotube steril.

3.5.2.2.4. Larutan xylose 20% (b/v)

Sebanyak 10 gr ditimbang dan ditambahkan dengan aquabidest steril hingga volumenya mencapai 50 ml.

3.5.2.2.5. Dapar 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (Bio – Rad, 2012)

Sebanyak 27,23 gr Tris base ditimbang kemudian dilarutkan dalam aquabidest kurang lebih 80 ml. Atur pH dengan penambahan larutan HCl 1 N hingga tercapai pH 8,8. Aquabidest ditambahkan lagi sehingga volum totalnya mencapai 150 ml. Kemudian dapar disimpan dalam lemari pendingin suhu 4 °C.

3.5.2.2.6. Dapar 0,5 M Tris – HCl pH 6,8 (Bio – Rad, 2012)

Sebanyak 6 gr Tris base ditimbang kemudian dilarutkan dalam aquabidest kurang lebih 60 ml. Atur pH dengan penambahan larutan HCl 1 N hingga tercapai pH 6,8. Aquabidest ditambahkan lagi sehingga volum totalnya mencapai 100 ml. Kemudian dapar disimpan dalam lemari pendingin suhu 4 °C.

3.5.2.2.7. 10% (w/v) SDS (Bio – Rad, 2012)

Sebanyak 10 g SDS ditimbang dan dilarutkan dalam 90 ml aquadest dan divortex hingga larut, kemudian tambahkan lagi sampai 100 ml.

3.5.2.2.8. Acrylamide/Bis (30% T, 2.67% C) (Bio – Rad, 2012)

Sebanyak 87,6 g acrylamide dan 2,4 g N'N'-bis-methylene-acrylamide (0.8 g/100 ml) kemudian ditambah aquabidest steril 300 ml lalu difilter and disimpan pada 4 °C dalam keadaan gelap (maksimal penyimpan 30 hari) atau bisa menggunakan larutan Preweighed Acrylamide/Bis, 37.5:1 (30%T, 2.67% C) (Bio-Rad catalog nomor 161-0125, 150 g).

3.5.2.2.9. APS 10% (Bio – Rad, 2012)

Sebanyak 100 mg ammonium persulfat ditimbang dan dilarutkan dalam 1 ml aquabidset.

3.5.2.2.10. 10x Electrode (Running) Buffer, pH 8.3 (volum 1 liter) (Bio – Rad, 2012)

Sebanyak 30.3 g Tris base, 144.0 g Glycine, 10.0 g SDS ditimbang kemudian dilarutkan dan ditambah aquadest sampai volumenya mencapai 1 liter. pH tidak diatur dengan asam atau basa kemudian simpan dalam 4 °C. Jika presipitasi muncul, taruh dalam suhu ruang sebelum digunakan.

3.5.2.2.11. Larutan Fiksasi (Coligan et al., 1995)

Larutan fiksasi mengandung 25% isopropanol dan 10% asam asetat, dibuat dengan cara mencampur 125 ml isopropanol dan 50 ml asam asetat kemudian tambahkan aquadest hingga volumenya mencapai 500 ml.

3.5.2.2.12. Larutan Dapar Fosfat $1,23 \times 10^{-1}$ M pH 6,8

Sebanyak 1,67 gr KH_2PO_4 ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml aquabidest steril lalu atur pH dengan menambahkan larutan NaOH 1 N hingga pH mencapai 6,8.

3.5.2.2.13. Larutan Dapar Fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8

Sebanyak 40,65 ml larutan dapar fosfat $1,23 \times 10^{-1}$ M pH 6,8 diambil dan diencerkan dengan aquabidest sampai volumenya 100 ml.

3.5.2.2.14. Larutan Stok 2 M Imidazol (His SpinTrap[®] Kit Manual, 2005)

Sebanyak 34,05 gr Imidazol ditimbang dan ditambahkan 200 ml aquabidest kemudian dilarutkan sampai tidak ada suspensi. Atur pH sampai 7,4 dengan HCl 1 N, setelah itu menambahkan volum hingga 250 ml.

3.5.2.2.15. Larutan Dapar Pencuci Kolom Afinitas (His SpinTrap[®] Kit Manual, 2005)

Larutan dapar pencuci kolom afinitas mengandung 20 mM fosfat, 500 mM NaCl dan 60 mM imidazol. Larutan dibuat dengan menimbang 0,44 gr K_2HPO_4 ; 0,35 gr KH_2PO_4 ; dan 7,3 gr NaCl dan ditambah 7,5 ml

larutan stok 2 M imidazole. Tambahkan aquabidest 200 ml dan larutkan seluruhnya. Atur pH dengan menambahkan 1 N HCl sehingga menjadi 7,4. Tambahkan lagi aquabidest hingga volumenya 250 ml. Larutan dapat selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin suhu 4 °C.

3.5.2.2.16. Larutan Dapar Pengelusi Kolom Afinitas (His SpinTrap[®] Kit Manual, 2005)

Larutan dapar pengelusi kolom afinitas mengandung 20 mM fosfat, 500 mM NaCl dan 500 mM imidazol. Larutan dibuat dengan menimbang 0,44 gr K₂HPO₄; 0,35 gr KH₂PO₄; dan 7,3 gr NaCl dan ditambah 62,5 ml larutan stok 2 M imidazole. Tambahkan aquabidest 200 ml dan larutkan seluruhnya. Atur pH dengan menambahkan 1 N HCl sehingga menjadi 7,4. Tambahkan lagi aquabidest hingga volumenya 250 ml. Larutan dapar selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin suhu 4 °C.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1. Pemiakan dan Kultur Bakteri

3.6.1.1. Pemiakan Bakteri

Bakteri yang digunakan adalah *Bacillus subtilis* 168 (pOXGW – apop – 12His8Arg) rekombinan yang telah membawa gen penyandi Apoptin rekombinan dan *Escherichia coli* B121 Star[™] kompeten yang akan disisipkan plasmid penyandi apoptin (pOGW – apop – 12His) sebagai pembanding. Pemiakan kultur dilakukan dengan cara menggosokkan sebanyak 1 ose ke dalam media LB agar yang mengandung tetrasiklin secara aseptis dan diinkubasi pada suhu 37°C selama ±16 jam. Kultur bakteri selanjutnya ditaruh dalam lemari pendingin dan diremajakan setiap 2 minggu sekali pada medium agar yang masih baru. Selain itu juga dilakukan kontrol dengan menumbuhkan bakteri *Escherichia coli* B121 Star[™] yang tidak mengandung plasmid ke medium agar yang mengandung tetrasiklin.

3.6.1.2. Transformasi Bakteri *Escherichia coli* B121

Transformasi plasmid penyandi apoptin (pOGW – apop – 12His) dilakukan pada bakteri *E. coli* B121 Star™ kompeten komersil (Invitrogen). Bakteri diambil dari *Low Temperature Freezer* -80 °C dan ditaruh dalam penangas es sampai mencair. Sebanyak 10 µl bakteri kompeten diambil sebagai media kontrol transformasi plasmid. Kedua tube masing – masing diberi 100 µl 0,1 M CaCl₂ dingin, ± 4°C dan ditaruh dalam penangas es selama 30 menit. Langkah selanjutnya adalah melakukan *heat shock* bakteri selama 1 menit dalam *water bath* 42 °C. Kedua bakteri kompeten ditaruh dalam penangas es selama 3 menit untuk selanjutnya ditambahkan LB cair non antibiotik 37 °C sebanyak 500 µl dan diinkubasi pada *shaker incubator* 37 °C 100 rpm. Tube yang berisi bakteri transform, diambil dan sebanyak 50 µl diambil dan ditaruh pada plate 1 – 7. Pada plate ke 7, sebelum ditaruh cairan LB, *tube* lebih dulu dipadatkan dengan cara disentrifugasi berpendingin. Untuk cawan ke 8, ditambahkan 50 µl bakteri *E. coli* B121 tanpa plasmid sebagai kontrol plasmid.

Cairan bakteri yang telah dimasukkan ke plate kemudian ditaruh sejumlah *glass bead* yang telah disterilisasi dengan tujuan adalah bakteri bisa menyebar secara merata di dalam *plate* dan cairan akan lebih cepat kering. Plate kemudian diinkubasi *overnight* (±16jam) dalam inkubator 37 °C. Cawan yang terdapat *E. coli* B121 Star™ transform dipilih salah satu, lalu diambil 8 koloni tunggal untuk kemudian ditaruh dalam cawan berisi LB Agar yang mengandung tetrasiklin 5 µg/ml.

3.6.1.3. Kultur Bakteri

100 µL aliquot bakteri *Bacillus subtilis* 168 yang mengandung plasmid disebar pada cawan LB yang mengandung 10 µg/mL tetrasiklin, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu malam. Setelah itu, diambil beberapa koloni tunggal dari *Bacillus subtilis* 168 dan *Escherichia coli* B121 Star™ transform dengan menggunakan tusuk gigi steril atau alat ose kemudian masing – masing dimasukkan kedalam 5 mL LB

medium cair yang mengandung tetrasiklin diinkubasi pada suhu 37 °C selama ± 16jam. Prekultur yang telah diinkubasi dimasukkan kedalam 500 ml LB medium cair yang mengandung tetrasiklin dan diinkubasi pada suhu 37°C shaking 200 rpm sampai OD₆₀₀ mencapai 0,6 – 0,8 (± selama 3 jam). Penambahan persentase *xylose* divariasikan (untuk *Bacillus subtilis* 168) sedangkan untuk *Escherichia coli* BL21 Star™ ditambahkan IPTG sehingga molaritasnya menjadi 1mM dalam LB cair dan inkubasi pada suhu 30°C shaking 200 rpm selama 1,5 jam.

Pemanenan sel dilakukan dengan cara sentrifugasi 5000 x g selama 20 min. Hasil panen sel disimpan didalam pendingin -20°C, sehingga siap dilakukan pemurnian.

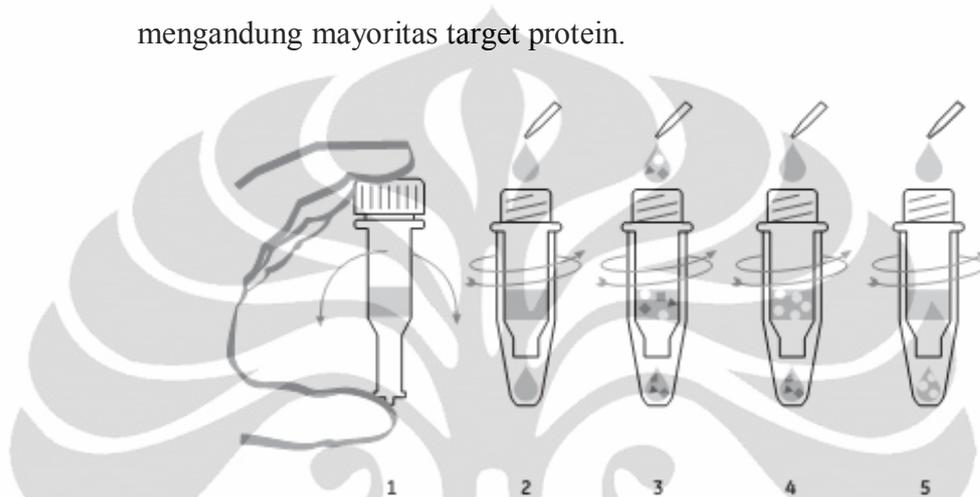
3.6.2. Pemurnian Apoptin

2 jenis larutan buffer, yaitu buffer pencuci dan buffer pengelusi, dibuat berdasarkan komposisi pada subbab sebelumnya. Hasil panen sel dilarutkan dalam dapar fosfat 0,05 M pH 6,8 dan dilakukan proses pemecahan sel dengan mempergunakan sonikator sampai larutan terlihat bening. Hasil sonikasi disentrifugasi dan diambil supernatannya. Supernatannya sebelumnya dimasukkan ke dalam konsentrator (Millipore Corporation, 2003) dan disentrifugasi 7500 x G selama 10 menit suhu 4 °C, kemudian sampel dimasukkan ke dalam affinitas nikel kolom HisSpinTrap®. Langkah pemurnian protein adalah sebagai berikut:

Mikrotube standar digunakan ketika melakukan pemurnian. Kolom ditempatkan di atas mikrotube 1,5 ml untuk menampung cairan selama sentrifugasi. Mikrotube baru dan steril harus selalu digunakan pada setiap langkah.

1. Kolom dikocok dan dibalik berulang kali untuk meresuspensi medium awal. Tutup atas dibuka seperempat putaran dan bagian bawah dipotong. Kolom ditempatkan dalam tabung mikrosentrifuge 1,5 ml dan sentrifugasi selama 30 detik pada 70 × G untuk menghilangkan cairan yang terdapat pada kolom.
2. Tutup atas dibuang kemudian ditambah 600 µl larutan pencuci untuk menyeimbangkan kolom dan disentrifugasi selama 30 detik pada 70 × G.

3. Sampel hasil sonikasi ditambahkan sebanyak 600 μ l dan disentrifugasi selama 30 detik pada 70 x G.
4. Kolom dicuci dengan larutan pencuci sebanyak 600 μ l dan disentrifugasi 30 detik pada 70 x G.
5. Protein dielusi dengan dapar pengelusi dua kali sebanyak 200 μ l dan sentrifugasi selama 30 detik pada 70 x G. Pada pengelusan pertama kali mengandung mayoritas target protein.



Gambar 3.4 Tahap Purifikasi His SpinTrap®
(His SpinTrap® Manual Kit, 2005)

3.6.3 Pengujian Analisis Konsentrasi Protein

3.6.3.1 Pengecekan Protein Apoptin dengan SDS – PAGE

SDS PAGE yang digunakan adalah didasarkan atas sistem Laemmli (1970). SDS PAGE sistem Laemmli dilakukan dengan memakai empat komponen utama yaitu dapar elektroforesis, larutan sampel, *separating gel* dan *stacking gel*. Pada penelitian ini yang digunakan adalah *separating gel* 12% (b/v) bervolum 10 ml dengan komposisinya adalah 2,5 ml Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 3 ml larutan akrilamid/bis-akrilamid 30% (b/v); 4,35 ml aquadest; 100 μ l SDS 10% (b/v); 50 μ l amonium persulfat (APS) 10% (b/v); 5 μ l TEMED (Coligan dkk, 1995).

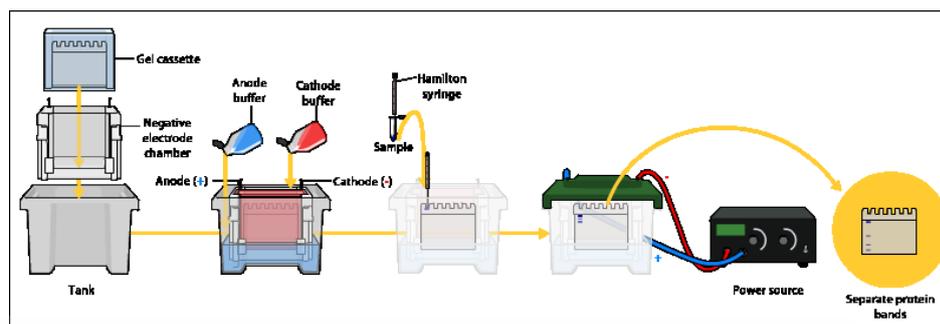
Sedangkan *Stacking gel* 4,0% (b/v) komposisinya adalah 630 μ l Tris-HCl 0,5 M pH 6.8; 1,59 ml aquadest; 25 μ l SDS 10% (b/v); 250 μ l larutan akrilamid/bis-akrilamid 30% (b/v); 12,5 μ l amonium persulfat 10% (b/v); 2,5 μ l TEMED (Coligan dkk., 1995).

Separating gel 12% (b/v) sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam alat pencetak lempengan gel dari *Mini Protean II Bio Rad* pada bagian bawah sampai larutan mencapai 2 cm dari atas kaca gel kemudian ditambah isopropanol sampai sejajar dengan gel. *Separating gel* kemudian akan mengeras dan setelah itu dimasukkan *stacking gel* 4,0% (b/v) sebanyak 2 ml di atas *separating gel*, lalu pada *stacking gel* yang masih cair dimasukkan sisir untuk membuat sumur. Sumur - sumur ini digunakan untuk memasukkan sampel protein yang akan dikarakterisasi pada gel. Gel yang telah dipersiapkan dimasukkan ke dalam alat elektroforesis.

Bufe elektroforesis di masukkan dalam tangki. Sampel sekitar 5 μ l dicampur dengan 10 μ l bufer sampel yang mengandung 2 μ l 2 – merkaptoetanol dan 8 μ l *loading buffer*, dididihkan selama 3 menit dalam *drybath* suhu 94 °C. Campuran ini dan marker protein dimasukkan ke sumur-sumur gel pada alat elektroforesis sebanyak 10 μ l.

Elektroforesis dilakukan pada tegangan mula 30 V 10 mA sampai laju pita segaris dengan batas bawah gel pemisah. Laju voltasi dan ampere kemudian diubah menjadi 150 V 30 mA ketika sudah masuk gel pemisah sampai pita melewati sumur.

Gel kemudian direndam dalam larutan fikasasi selama 15 menit, setelah itu dicuci dengan aquadest berkali – kali sampai gel tidak berbau. Gel hasil elektroforesis diwarnai dengan larutan pewarna (*staining*) selama 1 malam (Firdausi, 2009). Gel hasil elektroforesis yang telah diwarnai dimasukkan ke dalam larutan *destaining* untuk menghilangkan warna pada gel yang tidak mengandung pita protein dan direndam dalam aquadest. Pita pada gel hasil elektroforesis tersebut didokumentasikan dengan *scanner*. Tahapan umum untuk gel elektroforesis ditunjukkan pada Gambar 3.5.



Gambar 3.5. Tahapan SDS - PAGE

3.6.3.2 BCA Protein Assay

Tabel 3.3 memberikan pedoman dalam penyusunan standar larutan BSA. Setiap standar ditaruh dalam botol bersih. Untuk memastikan dampak yang ditimbulkan dari buffer, pengenceran dibuat dalam buffer yang sama dengan sampel. Air deionisasi dapat digunakan sebagai pengganti buffer sampel, namun setiap intervensi dari buffer tidak akan dikoreksi dalam kurva standar BSA. Terdapat beberapa zat kimia yang kompatibel pada uji BSA ini, seperti yang terdapat pada tinjauan pustaka.

Tabel 3.3. Larutan untuk *assay* standar

Tube	Volum BSA	Volum Diluent	Konsentrasi Final BSA
1	250 μ l dari larutan 2 mg/ml	250 μ l	1000 μ g/ml
2	250 μ l dari tube 1	250 μ l	500 μ g/ml
3	250 μ l dari tube 2	250 μ l	250 μ g/ml
4	300 μ l dari tube 3	300 μ l	125 μ g/ml
5	100 μ l dari tube 4	400 μ l	25 μ g/ml
6	0	400 μ l	0 μ g/ml

3.6.3.3 Preparasi Reagen BCA

Tabel 3.4 berikut menjelaskan cara menyiapkan reagen BCA untuk perhitungan *assay* standar. Reagen dipersiapkan dengan mencampurkan 50 bagian larutan BCA dengan 1 bagian 4% *cupric sulfate*. Volum reagen BCA untuk microtube standar berdasarkan 1 ml reagen per reaksi. Volum ini cukup jika pembacaan absorbansi pada micro kuvet (0,7 ml). Jika

ukuran kuvet lebih besar, volum reagen yang digunakan berjumlah 3 ml per reaksi.

Tabel 3.4 Preparasi Reagen BCA

	Tiap Sampel	x 20
Assay Sampel Tube		
Larutan BCA	1 ml	20 ml
4% Asam Kuprik	20 μ l	400 μ l
Assay Skala Mikro		
Larutan BCA	200 μ l	4 ml
4% Asam Kuprik	4 μ l	80 μ l

3.6.3.4 Langkah Assay

Untuk prosedur assay standar, sampel yang digunakan 50 μ l sehingga efek senyawa yang mengintervensi menjadi minimal karena rasio reagen BCA dengan sampel 20:1.

1. 50 μ l dipipet pada setiap larutan standar dan sampel protein ke tube yang sudah dilabeli. 1 ml reagen BCA ditambahkan kemudian di – *vortex* sedemikian rupa. Reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit atau pada suhu ruangan selama 2 – 16 jam.
2. Tube didinginkan pada suhu ruang. 1 ml aquadest ditaruh pada kuvet bersih dan atur bacaan absorbansi pada 562 nm menjadi nol (blanko).
3. Larutan standar hasil reaksi dipindahkan pada kuvet bersih. Absorbansi (A562) dicatat pada setiap reaksi selama 10 menit. Nilai absorbansi blanko dikurangi dengan nilai larutan standar dan sampel protein untuk mendapatkan nilai absorbansi yang benar.
4. Absorbansi versus massa yang diketahui dari standar BSA diplot untuk menghasilkan kurva standar. Rekaman pembacaan absorbansi sampel diinterpolasi menggunakan kurva standar dalam rentang linier kurva.
5. Jumlah protein dalam sampel dihitung dengan mengoreksi pengenceran dan volum sampel.

BAB IV

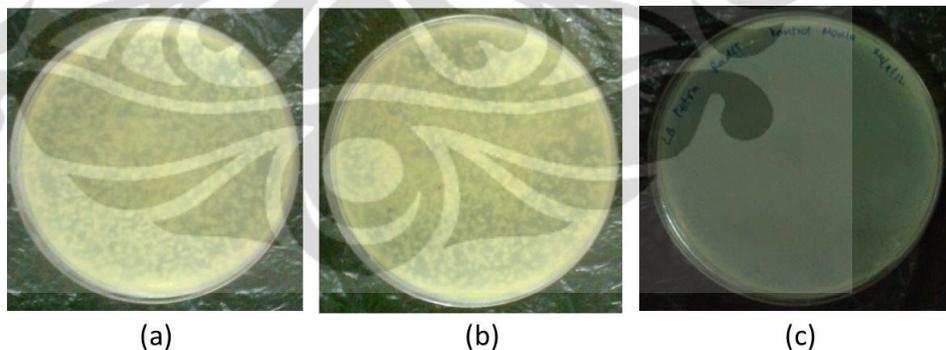
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini akan dijelaskan tentang hasil dan data yang didapatkan dari penelitian yang telah dilakukan kemudian dianalisis apakah hasil yang dicapai sesuai dengan tujuan akhir penelitian ini.

4.1. Pemiakan Dan Kultur Bakteri

4.1.1. Pemiakan Bakteri

Pada tahapan ini, dilakukan pembiakan dan hasilnya baik bakteri *Bacillus subtilis* 168, pada Gambar 4.1a, maupun *Escherichia coli* B121 Star™ transform yang mengandung penyandi apoptin, pada Gambar 4.1b, dapat tumbuh pada medium agar LB yang mengandung 10 µg/ml dan 5 µg/ml tetrasiklin. Sedangkan pada kontrol plasmid, yaitu *E. coli* B121 kompeten tidak tumbuh dalam medium, seperti pada Gambar 4.1c, membuktikan bahwa plasmid yang ditransformasikan telah berhasil karena dalam plasmid terdapat gen resistan terhadap tetrasiklin.



Gambar 4.1. Hasil Pemiakan Bakteri
(a) *Bacillus subtilis* 168 (b) *Escherichia coli* B121 Star™ transform (c) *Escherichia coli* B121 Star™ kompeten

Bakteri setiap 2 minggu sekali digoreskan pada medium LB Agar baru bertujuan untuk menjaga nutrisi dari bakteri bisa tetap hidup dan mencegah bakteri tidak tua ketika digunakan. Hal yang perlu diperhatikan adalah ketika melakukan peremajaan berulang kali, ada kemungkinan

plasmid yang disisipkan akan hilang karena gen plasmid tersebut bukan berasal dari gen asli dalam tubuh bakteri (Baheri, 2000).

4.1.2. Transformasi Bakteri *Escherichia coli* B121 Star™

Langkah awal dalam penelitian ini adalah melakukan transformasi plasmid yang membawa gen apoptin ke dalam mikroorganisme, dalam hal ini *Bacillus subtilis* 168 dan *Escherichia coli* B121 (Invitrogen). Pada *B. subtilis* 168, tidak dilakukan transformasi plasmid penyandi apoptin karena telah didapat stok beku yang telah ditransformasi dari penelitian sebelumnya oleh Sahlan dkk (2011) di NAIST, Jepang. Persiapan awal dalam kultur dari stok beku yaitu mensterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan dengan *autoclave* (Hirayama, Jepang). Kondisi autoklaf pada saat proses sterilisasi yaitu 121 °C, tekanan 2 atm, dengan waktu proses selama 15 menit. Alat yang bersentuhan langsung dengan bakteri harus disterilisasi untuk menghilangkan kontaminan yang mungkin ada, begitu juga dengan LB Agar dan LB cair. LB Agar yang digunakan bervolum 250 ml untuk ditaruh dalam 8 cawan disposal dengan masing – masing volum dalam cawan ±30 ml.

Kultur agar tusuk (*stab*) dari lemari pendingin lalu ditambahkan aquabides steril sebanyak 2 ml kemudian dilakukan pencampuran menggunakan *vortex*. Cairan bakteri diambil dengan menggunakan mikropipet steril 1 ml dan disebar pada medium agar LB yang mengandung tetrasiklin sebanyak 10 µg/ml. Tujuan dari penggunaan tetrasiklin adalah mencegah bakteri lain untuk tumbuh di dalam LB Agar dan hanya *B. subtilis* 168 saja yang bisa tumbuh karena di dalamnya membawa plasmid vektor yang mengandung gen penanda resistensi tetrasiklin.

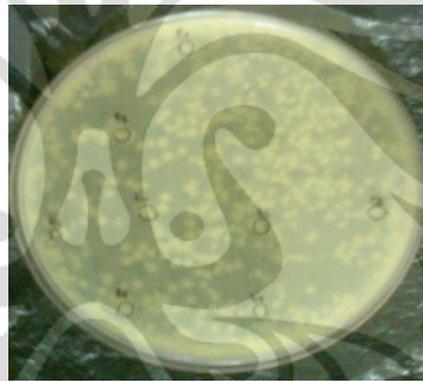
Transformasi plasmid penyandi apoptin (pOGW – *apop* – 12His) dilakukan pada bakteri *E. coli* B121 Star™ kompeten komersil (Invitrogen) yang terdapat di laboratorium Mikrobiologi – Bioteknologi Fakultas Farmasi UI. Bakteri diambil dari *Low Temperature Freezer* -80 °C dan ditaruh dalam penangas es sampai mencair. Sebanyak 10 µl bakteri

kompeten diambil sebagai media kontrol transformasi plasmid. Kedua *tube* masing – masing diberi 100 µl 0,1 M CaCl₂ dingin, ± 4°C dan ditaruh dalam penangas es selama 30 menit. Tujuan penambahan larutan ini adalah membantu untuk mengikat dua fosfolipid, karena CaCl₂ bersifat kation divalen, sehingga membuat membran bakteri menjadi kaku, larutan yang dingin lebih membantu untuk memperlambat gerakan membran. Hal ini juga membantu DNA plasmid itu sendiri menyusut dan sifat larutan yang hipertonik kepada media menyebabkan bakteri menjadi mengerut karena kehilangan sebagian air sehingga penyisipan plasmid bisa dilakukan. Langkah selanjutnya adalah melakukan *heat shock* bakteri selama 1 menit dalam *waterbath* 42 °C. Tahapan ini sangat penting dalam proses transformasi karena ketika proses pemanasan ini berlangsung, membran yang ada pada bakteri akan mengalami pembengkakan seiring kenaikan suhu. Membran yang pecah kemudian menghisap plasmid, berhenti sendiri dari pecah sepenuhnya, dan akan membran akan kembali menutup. Banyak bakteri yang tidak hidup dalam proses ini, sehingga waktu pemanasan perlu diperhatikan dengan baik agar ada bakteri kompeten yang selamat dan tetap hidup. (Flyn dkk., 2012)

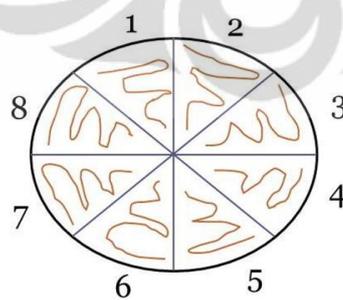
Kedua bakteri kompeten ditaruh dalam penangas es selama 3 menit untuk selanjutnya ditambahkan LB cair non antibiotik 37 °C sebanyak 500 µl dan diinkubasi pada *shaker incubator* 37 °C 100 rpm. *Tube* yang berisi bakteri transform, diambil dan sebanyak 50 µl diambil dan ditaruh pada cawan 1 – 7. Pada plate ke 7, sebelum ditaruh cairan LB, *tube* lebih dulu dipekatkan dengan cara disentrifugasi berpendingin. Tujuannya adalah untuk lebih meningkatkan probabilitas hidup bakteri dan mengantisipasi jika pada cawan 1 – 6 yang tidak dipekatkan, bakteri kompeten tidak tumbuh. Untuk cawan ke 8, ditambahkan 50 µl bakteri *E. coli* BL21 Star™ tanpa plasmid sebagai kontrol plasmid. Hasil transformasi dapat dilihat pada Gambar 4.2.

Cairan bakteri yang telah dimasukkan ke cawan kemudian ditaruh sejumlah *glass bead* yang telah disterilisasi dengan tujuan adalah bakteri bisa menyebar secara merata di dalam cawan dan cairan akan lebih cepat

kering. Plate kemudian diinkubasi *overnight* (± 16 jam) dalam inkubator 37 °C. Berdasarkan hasil yang didapat dapat disimpulkan bahwa konsentrasi tetrasiklin yang digunakan telah dapat menghambat bakteri lain sehingga hanya *B. subtilis* 168 dan *E. coli* B121 Star™ rekombinan saja yang dapat tumbuh. Dipilih 1 cawan yang terdapat *E. coli* B121 Star™ transform, lalu diambil 8 koloni tunggal untuk kemudian ditaruh dalam cawan berisi LB Agar yang mengandung tetrasiklin 5 $\mu\text{g/ml}$ dan digores seperti pada Gambar 4.3. Pada *B. subtilis* 168 transform, diambil beberapa koloni untuk kemudian digores secara persegi empat diagonal, seperti pada Gambar 4.4. Tujuan dari teknik penggoresan ini adalah pada saat di garis penggoresan ke 3 atau 4 didapat beberapa koloni tunggal.



Gambar 4.2. Hasil transformasi *E. coli* B121 Star™

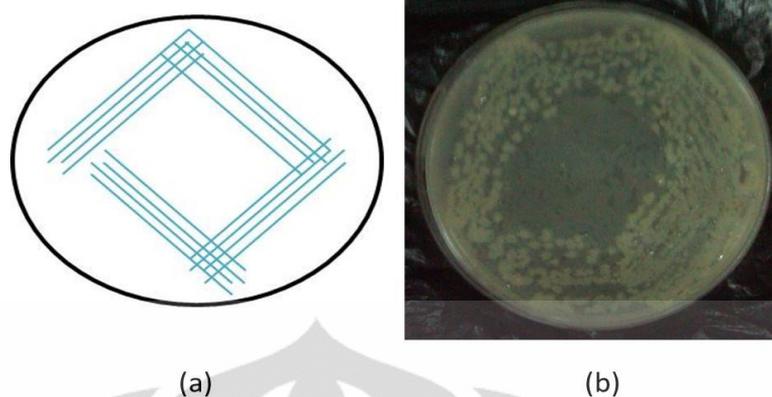


(a)



(b)

Gambar 4.3. Penggoresan 8 koloni
(a) Ilustrasi (b) *E. coli* B121 Star™ transform



Gambar 4.4. Penggoresan teknik diagonal
(a) Ilustrasi (b) Hasil gores *Bacillus subtilis* 168

4.1.3 Kultur Dan Panen Sel

Bakteri koloni tunggal yang telah digores pada medium selanjutnya diambil secara aseptis dengan alat ose dan dimasukkan ke LB cair 5 ml yang mengandung tetrasiklin sebagai prekultur cair. Langkah ini bertujuan untuk membuat bakteri lebih cepat beradaptasi terhadap pergantian medium, jika dibandingkan langsung memasukkan koloni ke 500 ml LB cair. LB cair 5 ml kemudian diinkubasi 37 °C selama \pm 16 jam. LB cair akan menjadi keruh dan terdapat semacam suspensi dalam cairan, menandakan bakteri tetap hidup. LB cair 5 ml kemudian dituang ke dalam Erlenmeyer 1 L yang terdapat 500 ml LB cair yang mengandung tetrasiklin kemudian diinkubasi 37 °C *shaking* 200 rpm. Setiap jam setelah inkubasi, dilakukan pengukuran OD₆₀₀ sampai nilainya berkisar 0,3 – 0,6 untuk kemudian ditambahkan larutan induksi. Kisaran nilai OD tersebut bertujuan agar sel masih aktif membelah pada saat mulai diinduksi (Nester dkk, 2001). Penambahan induksi pada saat kisaran nilai OD sedemikian rupa agar tidak terjadi overekspresi protein rekombinan sehingga bisa dipurifikasi menggunakan kolom afinitas (Amersham Pharmacia Biotech, 2000).

Induksi ditambahkan pada masing – masing bakteri, *B. subtilis* 168 dengan variasi *xylose* 1 – 3% (b/v) dan *E. coli* B121 Star™ dengan 1 mM IPTG agar bakteri hanya memproduksi protein rekombinan saja. Penggunaan larutan induksi yang berbeda ini bertujuan untuk membandingkan jumlah apoptin rekombinan, dan diharapkan induksi

xylose akan lebih banyak atau sama dengan IPTG, hal ini karena bahan baku *xylose* lebih ekonomis daripada IPTG sehingga ke depannya bisa diaplikasikan secara nyata. Suhu inkubasi diturunkan menjadi 30 °C dan diinkubasi selama 1,5 jam setelah ditambahkan induksi untuk memperpendek waktu tumbuh sehingga diharapkan sel tidak tumbuh terlalu cepat dan tidak terjadi overekspresi protein.

Pemanenan sel dilakukan dengan cara sentrifugasi 5000 x G selama 20 menit suhu 4 °C. Hasil sentrifugasi berupa pelet sel berwarna kuning kecoklatan seperti pada gambar 4.5, disimpan dalam freezer -20 °C sebelum dilakukan pemurnian. Hasil pemanenan sel rekombinan dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5. Pelet sel rekombinan

4.2. Pemurnian Apoptin

Pelet sel dari *freezer* disuspensikan dengan dapar fosfat 0,05 M pH 6,8 sebagai dapar sonikasi untuk pemecahan membran sel menggunakan sonikator seperti pada Gambar 4.6. Pemecahan sel dilakukan di atas penangas es untuk menjaga agar suhu pada sampel tidak naik akibat sonikasi sehingga protein rekombinan tidak terdenaturasi maupun kehilangan aktivitas biologisnya. Sonikasi dilakukan dengan keadaan 1 *cycle* dan 100% amplitude selama ± 30 menit dan larutan menjadi bening, kemudian debris

sel dipisahkan dengan sentrifugasi 6000 x G suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan diambil untuk dilakukan tahap pemurnian protein rekombinan.



Gambar 4.6. Alat sonikator yang digunakan

Tahap pemekatan protein rekombinan dilakukan sebelum pemurnian dengan menggunakan konsentrator yang berukuran 10 kDa, pori – pori yang dimiliki konsentrator ini mampu menahan molekul yang memiliki berat di atas 10 kDa, sehingga molekul di bawah 10 kDa lolos dari pori tersebut. Tahap ini bisa memudahkan dalam purifikasi karena bisa mengeliminasi protein kontaminan yang mungkin bisa menjadi pengganggu protein rekombinan. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui berat molekul apoptin berada di kisaran 14 kDa – 55 kDa (Los dkk, 2009; Zhang dkk, 2003) sehingga secara teori tidak masalah menggunakan konsentrator 10 kDa. Penggunaan konsentrator juga untuk mengurangi jumlah volum yang akan dimurnikan karena volum kolom His SpinTrap[®] hanya mampu memuat sampel maksimal 600 μ l. Volum akhir ketika selesai dikonsentrasi didapat 1 ml.

Teknik pemurnian dengan kolom afinitas yang berisi ion logam transisi Ni^{2+} pada matriks penahan memiliki spesifikasi mekanisme untuk mengikat suatu asam amino, contohnya histidin, sehingga hanya molekul yang memiliki ikatan histidin saja yang terikat dalam kolom, sedangkan

molekul lain akan lolos dari matriks penahan. Protein apoptin rekombinan yang telah disisipi *tag* berupa histidin pada plasmid ketika dimasukkan ke dalam kolom akan berikatan dengan ion Ni^{2+} . Ketika sampel dimasukkan, dapar pencuci ditambahkan untuk mengeluarkan protein lain yang mungkin masih bersisa dalam kolom. Untuk melepaskan ikatan dari kolom, diperlukan senyawa yang memiliki ikatan ion lebih besar agar protein rekombinan keluar dari kolom afinitas. Dapar elusi yang mengandung 20 mM fosfat, 500 mM NaCl dan 500 mM imidazol digunakan karena konsentrasi imidazol yang tinggi bisa menggantikan ikatan antara ion Ni^{2+} dengan protein rekombinan, sehingga sampel yang mengandung protein rekombinan murni bisa diambil dari kolom. Gambar 4.7 menunjukkan alat pemurnian yang digunakan.



Gambar 4.7. Alat HisSpinTrap 600 µl

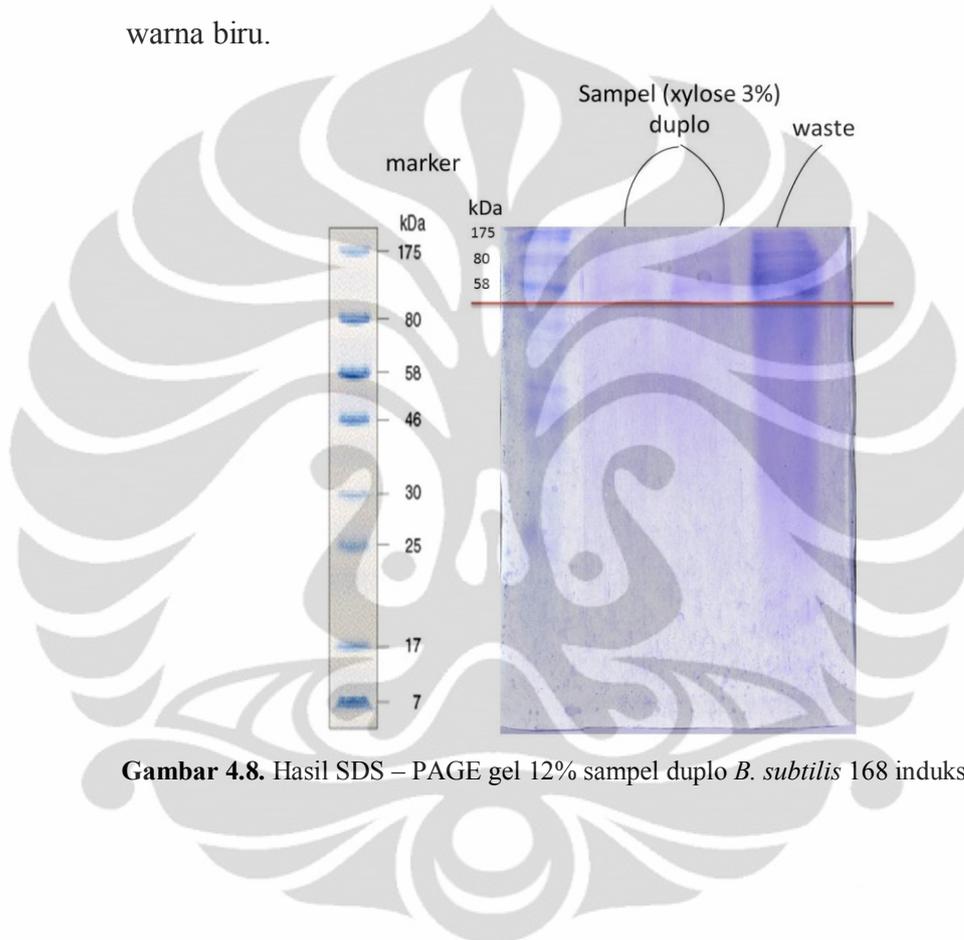
Pemurnian dilakukan dengan His SpinTrap terhadap 4 sampel, yaitu *B. subtilis* 168 dengan induksi xylose 1%, 2%, 3% dan *E.coli* B121 Star™. Sampel dielusi 2 kali masing – masing sebanyak 200 µl sehingga dihasilkan 4 sampel protein rekombinan berjumlah 400 µl. Sampel kemudian diuji kualitatif dengan elektroforesis gel untuk mengetahui apakah terdapat protein rekombinan berhasil dimurnikan atau tidak.

4.3. Elektroforesis Gel Poliakrilamid

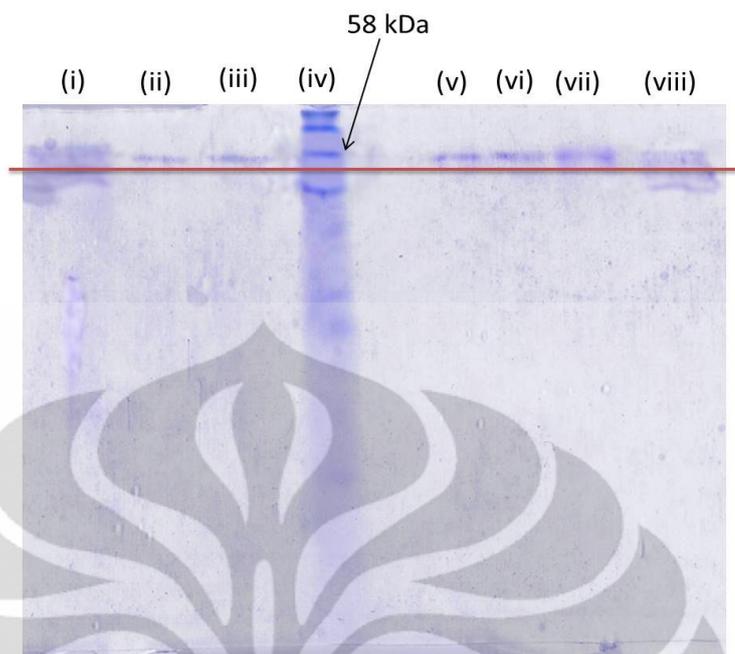
Gel poliakrilamid adalah gel yang sering digunakan untuk menguji secara kualitatif, memisahkan dan menentukan ukuran protein. Gel terbentuk dari polimerisasi antara akrilamid dengan bis – akrilamid dan menggunakan katalis berupa APS dan TEMED untuk membuat gel lebih cepat mengeras. Konsentrasi polimerisasi bergantung pada komposisi campuran akrilamid bis – akrilamid dengan aquadest, dalam penelitian ini digunakan campuran 37:1. Gel yang digunakan ada dua macam, gel penahan dan gel pemisah. Pada gel penahan, kadar gel dibuat pada 4%. Fungsi dari gel penahan ini agar sampel dan marker yang dimasukkan memiliki titik gerak yang sama ketika memasuki gel pemisah. Kadar gel penahan ditentukan sebesar 12% karena dianggap yang paling baik dibanding dengan 10% maupun 15%. Pada nilai 10%, gel cenderung rapuh sehingga dikhawatirkan akan mudah rusak. Selain itu, pori – pori pada gel masih renggang, sehingga sampel protein dikhawatirkan sulit terpisah. Pada 15%, gel terlalu keras dan pori – porinya rapat ada kemungkinan protein rekombinan terlalu cepat terpisah pada bagian atas gel pemisah, sehingga akan sulit untuk dinilai secara kualitatif. Fungsi gel pemisah yaitu memisahkan protein berdasarkan ukuran berat molekulnya.

Sampel protein sebanyak 5 μ l dicampur dengan 2 μ l 2 – merkaptoetanol dan 8 μ l *loading buffer*. Penambahan merkaptoetanol bertujuan untuk memutus ikatan disulfida pada protein sehingga hanya akan terbentuk rantai panjang polipeptida saja. Pada *loading buffer* yang mengandung SDS berfungsi untuk membuat sampel memiliki ion negatif sehingga gerak elektroforesik dapat terjadi pada saat gel dicelupkan dalam *running buffer*. Selain itu juga kandungan glisin pada *loading buffer* berfungsi memberikan efek pemberat pada sampel sehingga dapat bergerak ke bawah mengikuti gaya gravitasi pada saat memasuki gel penahan. Pemanasan 94 °C selama 3 menit dilakukan agar protein sampel terdenaturasi lebih banyak sehingga akan lebih memudahkan untuk terpisah pada gel.

Hasil elektroforesis dapat dilihat setelah gel direndam dalam staining solution yang mengandung *Coomassie Brilliant Blue*. Prinsip dari proses staining ini adalah protein dapat mengikat zat warna *Coomassie Brilliant Blue* dan selanjutnya kelebihan zat warna dapat dihilangkan dengan cara dicuci berkali-kali dengan aquadest steril. Hanya bagian gel yang terdapat protein saja yang akan membentuk pita warna biru.



Gambar 4.8. Hasil SDS – PAGE gel 12% sampel duplo *B. subtilis* 168 induksi *xylose* 3%.



Gambar 4.9. Hasil SDS – PAGE gel 12%.

Keterangan: (i) waste *E. coli* BI21 Star™ (ii) fraksi protein rekombinan *E. coli* BI21 Star™ (iii) fraksi rekombinan duplo *E. coli* BI21 Star™ (iv) marker protein (v) fraksi protein rekombinan *B. subtilis*168 induksi xylose 1% (vi) xylose 2% (vii) xylose 3% (viii) waste fraksi xylose 1%

Berdasarkan hasil elektroforesis gel, pada Gambar 4.8 dan Gambar 4.9, dapat dilihat bahwa protein telah berhasil dimurnikan dengan kolom His SpinTrap, namun belum secara sempurna karena pada waste masih terdapat pita protein rekombinan. Hal ini disebabkan kolom pemurnian yang digunakan berkapasitas kecil, yaitu 600 μ l, sehingga tidak banyak protein rekombinan yang bisa diikat pada matriks penahan dan sisanya langsung turun dari kolom. Berat molekul protein hasil pemurnian menunjukkan nilai yang cukup tinggi, sebesar 58 kDa, berdasarkan marker protein (Biolabs). Berat molekul yang cukup tinggi ini akibat ikatan polihistidin yang berinteraksi terhadap protein (Sahlan dkk., 2011).

4.4. BCA Protein Assay

Protein dari *B. subtilis* dengan variasi induksi xylose dan *E. coli* BI21 dihitung dengan menggunakan assay protein BCA. Sampel sebelumnya telah mengandung gliserol sebanyak 40% (v/v) untuk

penyimpanan dalam freezer -20°C . Serapan larutan standar BSA dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil absorbansi larutan standar BSA

No	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi (λ 562 nm)
1	0	0,054
2	25	0,061
3	125	0,091
4	250	0,126
5	500	0,194
6	1000	0,328

Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh adalah:

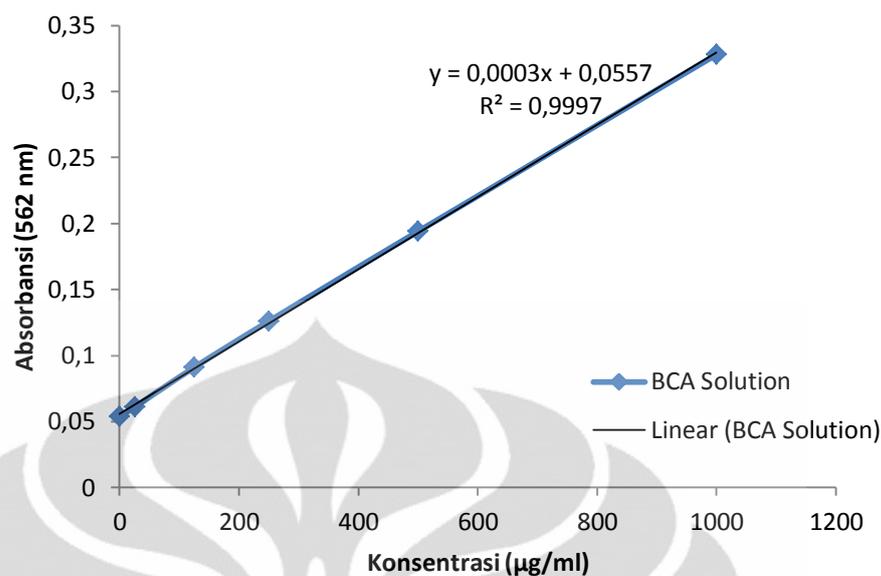
$$Y = 0,0003x + 0,0557 \dots\dots\dots (4.1.)$$

$$r = 0,99$$

Dari persamaan kalibrasi di atas, didapatkan persamaan untuk mendapatkan nilai x

$$x = \left(\frac{-0,0557+Y}{0,0003} \right) \dots\dots\dots (4.2.)$$

Dengan x sebagai nilai konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) dan y sebagai nilai absorbansi pada λ 562 nm. Untuk menghitung nilai protein sampel, perlu dibuat kurva kalibrasi protein standar dengan sumbu x sebagai nilai konsentrasi, dan y sebagai nilai absorbansi. Kurva kalibrasi protein dapat dilihat pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10. Kurva kalibrasi larutan standar BSA

Sebanyak 50 µl sampel masing – masing dicampur dalam BCA solution 1 ml karena dengan perbandingan 1:20 bisa meminimalkan intervensi komponen lain. Untuk lebih memastikan nilai yang tepat, serapan gliserol 40% juga dihitung dengan mencampurkan 50 µl ke dalam 1 ml BCA solution. Hasil serapan masing–masing sampel dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2. Hasil uji *BCA assay* pada protein rekombinan

Sampel	Absorbansi (λ 562 nm)	Konsentrasi		Jumlah Apoptin (mg)	Efisiensi (mg/kultur)
		Nilai	Satuan		
B.sub 168 (xylose 3%)	0,116	201,00	µg/ml	0,06	0,06
B.sub 168 (xylose 2%)	0,114	194,33	µg/ml	0,06	0,06
B.sub 168 (xylose 1%)	0,101	151,00	µg/ml	0,05	0,05
B.sub 168 (450 µl)	0,142	287,67	µg/ml	0,13	0,04
B sub 168 (450 µl)	0,14	281,00	µg/ml	0,13	0,04
E. coli B121 (300 µl)	0,182	421,00	µg/ml	0,13	0,04

Hasil absorbansi tersebut merupakan serapan yang telah dikurangi oleh serapan gliserol yang bernilai 0,08. Volum sampel yang dimasukkan pada kuvet spektrofotometer sebanyak 490 µl. Konsentrasi diplot dengan menggunakan persamaan 4.1, dengan absorbansi diplot sebagai y, sehingga akan mendapat nilai x sebagai konsentrasi. Pada Tabel 4.2 terlihat bahwa

sampel *B. subtilis* 168 dengan variasi *xylose* sebagai induksi bisa meningkatkan konsentrasi protein rekombinan, meskipun jumlahnya tidak terlalu signifikan. Sampel *B. subtilis* 168 dengan variasi *xylose* dijadikan satu tempat untuk kemudian dipekatkan kembali menggunakan konsentrator 10 kDa untuk mendapat rekombinan protein dari *B. subtilis* 168, dengan volum total berjumlah 900 μ l, masing – masing dibagi 450 μ l dalam 2 mikrotube steril. Sampel ini dihitung kembali serapannya untuk mengetahui jumlah konsentrasi yang ada. Protein rekombinan *E. coli* Star™ B121 yang didapat setelah dimurnikan dan dipekatkan adalah 300 μ l juga dihitung konsentrasinya sebagai pembanding. Hasil perhitungan konsentrasi kemudian diolah agar mendapat jumlah apoptin total dalam satuan milligram dengan mengalikan nilai konsentrasi dan jumlah volum. Efisiensi dihitung dari jumlah apoptin dibagi volum kultur medium cair.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Apoptin rekombinan dengan sel inang *Bacillus subtilis* 168 dan *Escherichia coli* B121 Star™ transform berhasil dimurnikan dan telah dikonfirmasi dengan SDS – PAGE 12%. Adanya *tag* histidin pada plasmid menyebabkan protein menjadi lebih berat molekulnya menjadi 58 kDa, berdasarkan berat marker protein.

Jumlah persentase *xylose* sebagai induksi pada sel inang *B. subtilis* 168 memengaruhi jumlah apoptin rekombinan yang dihasilkan. Pada 1% (w/v) total protein yang dihasilkan adalah 151 µg/ml; 2% menghasilkan 194,3 µg/ml dan 3% menghasilkan 201 µg/ml.

Jumlah apoptin rekombinan total dari *B. subtilis* 168 yaitu 568 µg/ml, sedikit lebih banyak dari jumlah protein rekombinan dari *E. coli* B121 Star™, 421 µg/ml. Hal ini bisa disimpulkan *Bacillus subtilis* 168 sebagai sel inang untuk protein rekombinan bisa menggantikan *Escherichia coli* B121, selain menghasilkan protein lebih banyak, induksi *xylose* memiliki nilai keekonomisan yang lebih baik dibandingkan dengan IPTG.

5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai jumlah optimal yang digunakan untuk induksi persentase *xylose* pada saat proses penumbuhan *Bacillus subtilis* agar produksi protein rekombinan maksimal. Pemurnian dengan cara lain juga menjadi pertimbangan agar mendapat protein apoptin rekombinan dengan berat molekul yang lebih rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahsan, N., Aoki, H., Watabe, S. 2005. Overexpression in *Escherichia coli* and functional reconstitution of anchovy trypsinogen from the bacterial inclusion body. *Molecular Biotechnology* 30(3): 193-205
- Amersham Pharmacia Biotech. 2000. The recombinant protein handbook. Protein amplification and simple purification. Björkgatan: Amersham Bioscience.
- Baheri, H. R., Hill, G. A., Roesler, W. J. 2000. Modelling plasmid instability in batch and continuous fermentors. *Biochemical Engineering Journal*. 8: 45 – 50.
- Boyer, R., 2000. *Modern Experimental Biochemistry*. California: Addison Wesley.
- Brunelle, J. K., Zhang, B. 2010. Apoptosis assays for quantifying the bioactivity of anticancer drug products. *Drug Resistance Update*. 13: 172 – 179.
- Carlsson, N., Borde, A., Wolfel, S., Akerman, B., Larsson, A. 2011. Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers. *Analytical Biochemistry*. 411: 116 - 121.
- Coligan, J.E., Dunn, B. M., Speicher, D. W., Wingfield, P. T. 1995. Current protocols in protein science, Volume 1 Editorial Board. USA: John Wiley & Sons.
- Danen – Van Oorschot, A. A. A. M., Fischer, D. F., Grimbergen, J. M., Klein, B., Zhuang, S – M., Falkenburg, J. H. F., Backendorf, C., Quax, P. H. A., Van Der Eb, A. J., Noteborn, M. H. M. 1997. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 94(11): 5843-5847.
- Dr. Mario Lebendiker, “PAGE – SDS Laemmli Protocol”, http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/Page_SDS.html (Diakses tanggal 2 Februari 2012)

- Earl, A. M., Losick, R., Kolter, R. 2008. Ecology and genomic of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* Vol. 16 No. 6.
- Ehrlich, S. D., 1977. Replication and Expression of Plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74 (4), pp. 1680-1682.
- Firdausi, W. 2009. Karakterisasi Enzim Sukrase dari Isolat-isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dengan SDS PAGE. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Kathy Flynn, David Martinez, Jim Wolf, “Transformation $CaCl_2$ ”, www.canyons.edu/host/biotechoutreach/ (Diakses tanggal 3 Juni 2012).
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *Nature* (227) 680–685.
- Lee, M – S., Lien, Y – Y., Feng, S – H., Huang., R – Y., Tsai, M – C., Chang., W – T., Chen, H – J. 2009. Production of chicken anemia virus (CAV) VP1 and VP2 protein expressed by recombinant *Eschericia coli*. *Procces Biochemistry*. 44: 390 – 395.
- Leliveld, S. R., Dame, R. T., Mommaas, M. A., Koerten, H. K., Wyman, C., Danen – Van Oorschot, A. A. A. M., Rohn, J. L., Noteborn, M. H. M., Abrahams, J. P. 2003. Apoptin protein multimers form distinct higher-order nucleoprotein complexes with DNA. *Nucleic Acids Research* 31(16): 4805-4813.
- Leliveld, S. R., Zhang, Y – H., Rohn, J. L., Noteborn., M. H. M., Abrahams., J. P. 2003. Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer. *Journal of Biological Chemistry* 278(11): 9042-9051.
- Los, M., Panigrahi, S., Rashedi, I., Mandal, S., Stetefeld, J., Essmann, F., Schulze – Osthoff, K. 2009. Apoptin, a tumor-selective killer. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 1335-42.
- Nester, E.W. 2001. *Microbiology: A human perspective* 3rd edition. New York: McGraw Hill.
- Nogueira – Dantas, E. O., Ferreira, A. J. P., Astolfi – Ferreira, C. S., Bretano, L. 2007. Cloning and expression of chicken anemia virus VP3 protein in

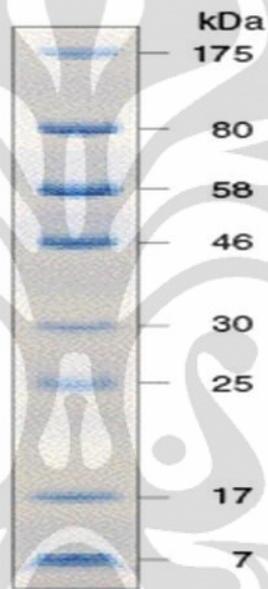
- Escherichia coli*. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 30: 133 – 142.
- Noteborn, M. H. M. 1999. Apoptin-induced apoptosis: a review. *Apoptosis*, 4, 317-9.
- Noteborn, M. H. M. 2004. Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms. *Veterinary Microbiology* 98(2): 89-94.
- Noteborn, M. H. M. 2009. Proteins selectively killing tumor cells. *Eur J Pharmacol*, 625, 165-73.
- Rath, M. 2001. Cellular Health Series: Cancer. MR Publishing, Inc., Santa Clara, CA 95054.
- Sahlan, M., Savitri, I. K., Prasetyo, A. A., Chumsakul, O., Ishikawa, S., Malik, A., Ogasawara, N. 2011. Efficient Expression of Recombinant Soluble Apoptin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification Journal*.
- Sun, J., Yan, Y., Wang, X – T., Liu, X – W., Peng, D – J., Wang, M., Tian, J., Zong, Y – Q., Zhang, Y – H., Noteborn, M. H. M., Qu, S. 2009. PTD4 – apoptin protein therapy inhibits tumor growth *in vivo*. *International Journal Cancer*. 124: 2973 – 2981.
- Yan, L., Xiangwei, M., Xiao, L., Peng, G., Chang, L., Mingyao, T., Encheng, Y., Xiaohong, X., Peng, J., Shifu, K., Zhongmei, W., Ningyi, J. 2010. Construction, expression and characterization of a dual cancer – specific fusion protein targeting carcinoembryonic antigen in intestinal carcinomas. *Protein Expr Purif*. 69: 120 – 125.
- Zhang, Y – H., Leliveld, S. R., Kooistra, K., Molenaar, C., Rohn, J. L., Tanke, H. J., Abrahams, J. P., Noteborn, M. H. M. 2003. Recombinant Apoptin multimers kill tumor cells but are nontoxic and epitope – shielded in a normal – cell – specific fashion. *Experimental Cell Research*. 289: 36 – 46.
- Zor, T., Selinger, Z. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem*. 236: 302–308.

LAMPIRAN

A. Marker Protein SDS – PAGE



Prestained Protein Marker
Broad Range (7-175 kDa)



(Biolabs[®] Inc., 2012)

B. Alat Elektroforesis

