

TEKNIK DETEKSI PROTEIN REKOMBINAN IRIDOVIRUS DENGAN METODE SDS-PAGE (SODIUM DODECYL SULPHATE POLY ACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)

Sri Suratmi, Ketut M. Arya Sudewa, dan Slamet Haryanto

Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan
Jl. Br. Gondol Kec. Gerokgak Kab. Buleleng, Kotak Pos 140, Singaraja 81101, Bali
E-mail: info.gondol@gmail.com

ABSTRAK

Analisa SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Elektroforesis) bertujuan untuk mengetahui susunan protein berdasarkan berat molekulnya. Dalam percobaan ini dilakukan analisa SDS-PAGE terhadap bakteri *Escherichia coli* strain BL21 yang telah disisipkan (transformasi) plasmid iridovirus untuk membentuk protein rekombinan iridovirus. Sel bakteri tersebut dilisis dengan metode enzimatik dan mekanis menggunakan *enzyme lysozyme*, *freeze-thawing*, dan sonikasi. Lisis sel bakteri dielektroforesis dan diwarnai dengan comasi *blue*. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya garis/*band* yang tebal dengan berat molekul 60 kDa. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa sel bakteri *E. coli* strain BL21 mampu mengekspresikan protein rekombinan iridovirus dengan berat molekul 60 kDa.

KATA KUNCI: bakteri *Escheria coli* strain BL21; protein rekombinan iridovirus; metode SDS-PAGE

PENDAHULUAN

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Elektroforesis (SDS-PAGE) merupakan suatu teknik elektroforesis yang menggunakan *polyacrylamide* sebagai bahan pemisah. SDS-PAGE banyak digunakan dalam bidang biologi molekuler, genetika, biokimia, dan biomedik. SDS-PAGE biasanya digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. Protein yang dipisahkan dengan SDS-PAGE dapat dikarakterisasi berdasarkan berat molekulnya dengan satuan Kilo Dalton (kDa). Satu dalton sama dengan satu hidrogen molekul (Anonim, 2015).

Protein adalah bahan yang paling penting dari semua bahan yang membentuk organisme hidup. Sedangkan, rekombinan protein adalah suatu bentuk manipulasi dari protein, yang dihasilkan dalam berbagai cara untuk menghasilkan sejumlah besar protein, memodifikasi urutan gen dan memproduksi produk komersial yang bermanfaat. Pembentukan protein rekombinan dilakukan melalui perantara khusus yang dikenal sebagai vector. Teknologi rekombinan adalah proses yang terlibat dalam pembentukan protein rekombinan (Kurnia, 2016).

Teknologi rekombinan telah berhasil diaplikasikan pada gen iridovirus di Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan (BBRBLPP), Gondol-Bali (Mahardika & Mastuti, 2015). Protein rekombinan

iridovirus dihasilkan dari proses ligasi gen iridovirus dengan vector pET SUMO, yang ditransformasi ke dalam bakteri *E. coli* strain Mach1™ -T1R. Selanjutnya, plasmid hasil transformasi ditransformasikan lagi ke bakteri *E. coli* strain BL21 untuk ekspresi proteinnya. Untuk memastikan bahwa bakteri *E. coli* strain BL21 telah membawa protein rekombinan iridovirus, maka dilakukan analisa SDS-PAGE. Tujuan dari tulisan ini adalah untuk mengetahui berat molekul protein rekombinan iridovirus yang dibawa oleh bakteri *E. coli* strain BL21.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan: kultur bakteri *E. coli* strain BL21, IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), 200 mM lysozyme, 2x *sample buffer*, gel polyacrilamid, 10-200 kDa protein marker, *buffer* elektroforesis, dan larutan pewarna (*staining*) serta penghilang warna (*destaining*).

Alat

Alat: Mikropipet beserta tip 0,5-10 μL, mikropipet 10-100 μL, 100-1.000 μL, *ependorf tube*, *tube* 15 mL, *water bath*, *deep freezer* (-80°C), sentrifius, dan alat SDS-PAGE (Biometra).

Metode

Pembuatan Media dan Larutan Stok

a. Media LB broth

10 g *bacto trypton*, 5 g *yeast* ekstrak, 10 gram NaCl dan dilarutkan dalam 1 L akuades kemudian diautoklaf pada suhu 121°C.

Ambil media LB *broth* sesuai dengan kebutuhan kemudian tambahkan stok ampicilin 1 mL/liter.

b. Larutan 100 mM IPTG

Sebanyak 0,238 g Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG) dilarutkan dalam 10 mL akuades, kemudian disaring dengan mikrofilter 0,45 μ L. Larutan stok disimpan dalam freezer -20°C.

c. RSB/reducing sample buffer (2x sample buffer)

2x *sample buffer* dibuat dengan mencampurkan sebanyak 2,5 mL dari 0,5 M Tris-CL (pH 6,8); 2 mL dari 100% glycerol; 0,4 mL beta-merkaptioethanol; 0,02 g bromo phenol blue; 4 g SDS; dan akuades steril sampai volume total 10 mL. Larutan stok disimpan dengan tube 15 mL pada suhu 4°C.

d. SDS (sodium dodesil sulfat) 10%

1 g SDS stok dalam 10 mL akuades steril

e. Polyacrylamide 30%

29 g acrylamide ditambahkan 1 g bis acrylamide dalam 100 mL akuades steril

f. APS (amonium persulfat) 10%

1 g APS stok dalam 10 mL akuades steril

g. Buffer elektroforesis

3 g 1,5 M Tris, 14,4 g lisin dan 1 g SDS dilarutkan ke dalam 1000 mL akuades steril

h. Larutan *destaining* (penghilang warna)

Sebanyak 10 mL glacial acetic acid dan 50 mL methanol dilarutkan ke dalam 40 mL akuades steril. Larutan stok disimpan dalam suhu 4°C.

i. Larutan *staining* (pewarna)

Larutan *staining* dibuat dengan mencampurkan 0,2 g comasi blue dalam 100 mL larutan *destaining*.

Persiapan protein rekombinan untuk SDS-PAGE

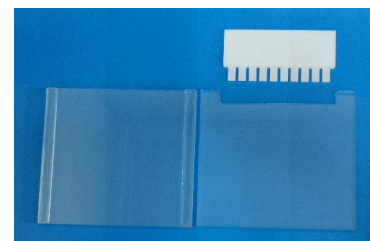
Sebanyak 20 mL kultur bakteri *E. coli* strain BL21 dalam media LB *broth* yang telah diinduksi semalam dengan IPTG, disentrifius dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. *Pellet* (*precipitatel* endapan/sel bakteri) ditambahkan PBS (*phosphate buffer saline*) sebanyak 100 μ L dan dilisiskan secara enzimatis dengan lysozyme dan mekanis dengan beku-cair (*freeze-thawing*), serta sonikasi. Metode enzimatis dilakukan dengan menginkubasikan 100 μ L *pellet* dalam 150 μ L

dari 200 mM lysozyme pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya, *pellet* tersebut dilisiskan dengan metode beku-cair pada suhu beku di -80°C selama 5 menit dan dicairkan pada suhu 42°C selama 5 menit. Metode beku-cair dilakukan secara berulang sampai 30 kali, dan dilanjutkan dengan sonikasi sebanyak 4 x 15 menit. Cairan sel selanjutnya disentrifius dengan kecepatan maksimum (15.000 rpm) selama 1 menit. Sebanyak 25 μ L supernatan diambil dan digunakan untuk analisa SDS-PAGE.

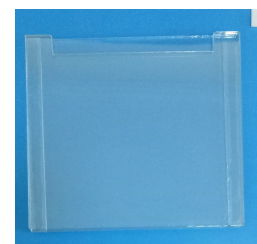
Pembuatan gel dan proses SDS-PAGE

a. Persiapan alat pembuat agar

Sepasang kaca cetakan gel (Gambar 1a & 1b) yang sudah bersih ditempatkan pada *plate* agar (Gambar 2) dengan posisi yang sejajar dan dikunci dengan memutar pengunci yang ada di sisi kanan dan kiri alat tersebut. *Plate* agar tersebut selanjutnya ditempatkan pada tatakan cetakan pembuat gel (Gambar 3) yang di bawahnya telah dilengkapi dengan karet platisin agar gel tidak tumpah atau mengalir ke luar cetakan kaca gel.



a

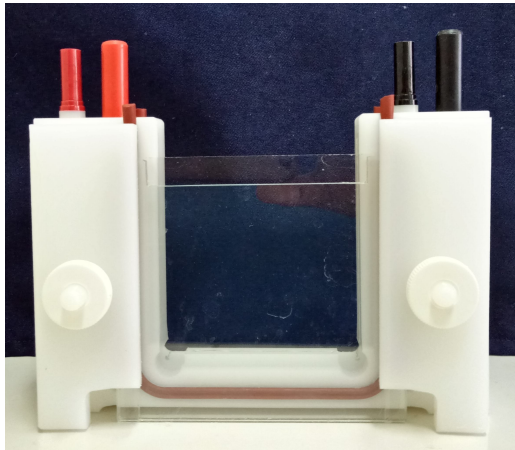


b

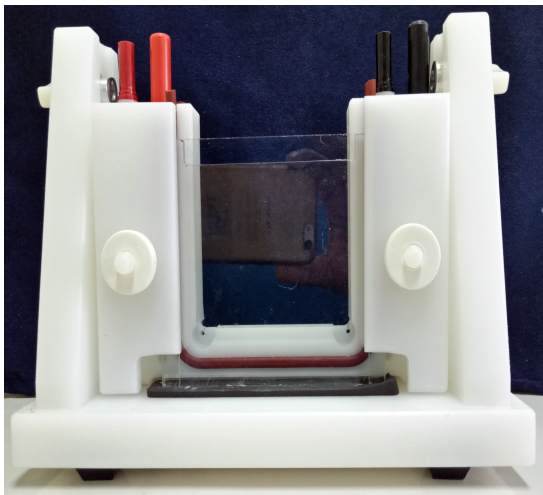
Gambar 1. Sepasang kaca cetakan gel dengan sisir putih pembentuk lubang untuk menyuntikkan sampel ke dalam gel (a); Kaca cetakan gel yang telah disatukan. Cetakan kaca ini dapat membentuk lembaran tipis (1 mm) gel acrylamide di dalamnya (b).

b. Separating gel 12,5%

Separating gel dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan ke dalam tabung falkon 15 mL secara berurutan yaitu polyacrylamide 30% sebanyak 3,19 mL,



Gambar 2. Cetakan kaca gel yang dipasang dalam *plate* agar.



Gambar 3. *Plate* agar yang diletakkan di atas tatakan pembuat gel.

1,5 M tris pH 8,8 sebanyak 1,9 mL; 0,079 mL SDS 10%; 2,831 mL aquades. Larutan tersebut diaduk rata dengan pipet dan ditambahkan 80 μ L APS 10%, dan 8 μ L TEMED. Selanjutnya, larutan dituang dalam cetakan kaca gel menggunakan mikro pipet 1 mL (dijaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai tanda batas. Gel didiamkan hingga sedikit memadat, dan ditambahkan alkohol absolut (100%) agar gelembung udara hilang dan permukaan gel tidak bergelombang. Gel dibiarkan memadat sempurna kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan di antara batas air dan gel yang terbentuk). Setelah itu, alkohol di atas gel di buang.

c. *Stacking* gel 5%

Stacking gel dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan seperti: polyacrylamide 30% sebanyak 0,6 mL; 1,5 M tris pH 6,8 sebanyak 0,5 mL; 0,06 mL SDS 10%; 2,84 mL aquades. Larutan tersebut dicampur rata dengan pipet dan ditambahkan 40 μ L APS 10%, dan 4

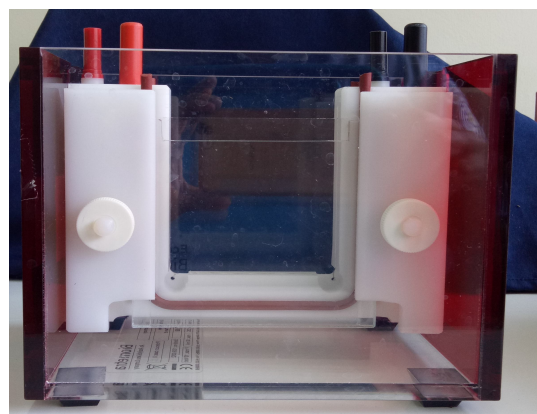
μ L TEMED. *Stacking* gel dibuat dalam tabung falkon 15 mL. Selanjutnya, larutan dituang di atas separating gel yang telah memadat. Kemudian sisir dipasang pada *stacking* gel dan dibiarkan hingga memadat sempurna. Setelah padat, lepaskan sisir dan rapikan sumuran yang terbentuk dengan jarum-spuit.

d. Persiapan sampel lisis bakteri *E. coli*

Sebanyak 25 μ L supernatan dari lisis bakteri *E. coli* yang mengandung protein rekombinan ditambahkan dengan 25 μ L RSB (2x *sample buffer*). Campuran tersebut kemudian dipanaskan dalam air mendidih (100 °C) selama 5 menit, dan didinginkan dalam suhu ruang.

e. Pemasangan gel dalam *chamber* beserta proses elektroforesisnya

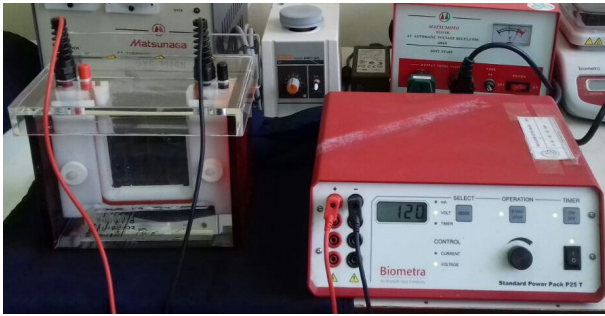
Setelah gel di cetakan kaca dalam *plate* agar memadat sempurna, *plate* agar kemudian *plate* berisi gel tersebut dimasukkan dalam *chamber* elektroforesis (Gambar 4). Selanjutnya dituang *running buffer* hingga bagian atas dan bawah gel terendam larutan. Selanjutnya sampel yang telah disiapkan dimasukkan dalam sumuran sesuai peta sumuran yang telah dibuat. Untuk memulai *running*, perangkat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* (Gambar 5), selanjutnya *running* dilakukan pada arus 200 volt selama 45 menit atau sampai *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel. Setelah selesai matikan listrik dan buang *running buffer* dan kaca gel diambil dari *plate* gel. Secara perlahan-lahan salah satu kaca dilepas dengan bantuan pinset tipis. Gel yang melekat pada kaca dilepas dan ditaruh ke dalam *petridish*.



Gambar 4. *Plate* agar beserta gel *acrilamide* dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis.

f. *Staining* (Pewarnaan)

Pewarnaan gel dilakukan dengan merendam gel dalam larutan staining sambil digoyang dalam alat *waterbath shaker* selama 1 jam. Setelah itu, larutan



Gambar 5. Chamber yang telah ditutup dan dialiri dengan listrik dari *standard power pack* (kanan). Proses elektroforesis berlangsung.

staining dibuang dan gel dicuci dengan aquades beberapa kali hingga bersih.

g. *Destaining* (penghilangan warna)

Setelah pewarnaan, selanjutnya gel direndam dalam larutan *destaining* selama 30 menit atau hingga band terlihat sambil digoyang dalam *waterbath shaker*. Selanjutnya gel dibiarkan direndam dalam satu malam. Gel dicuci dengan aquades beberapa kali hingga bersih.

h. Dokumentasi

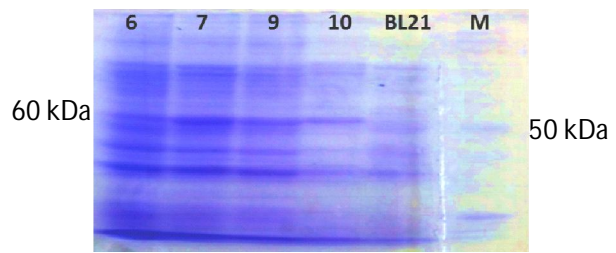
Agar yang telah di-*destaining*, diletakkan kembali di atas kaca gel dan diambil fotonya dengan latar belakang putih.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil

Preparasi sel bakteri *E. coli* yang membawa protein rekombinan iridovirus secara enzimatik dan mekanis (menggunakan enzim lisosim, *freeze-thawing* dan sonikasi) dapat memecah dan melisiskan sel-sel bakteri tersebut untuk mengeluarkan protein rekombinan yang dibawanya ke dalam supernatan. Selanjutnya, supernatan yang mengandung protein rekombinan iridovirus dapat bereaksi dengan RSB (2x *sample buffer*) untuk menghasilkan separasi protein dalam gel elektroforesis.

Hasil gel polyacrylamide-elektroforesis dari lisis bakteri *E. coli* yang membawa protein rekombinan iridovirus menunjukkan adanya beberapa *band/garis*. Dalam beberapa garis tersebut terdapat satu garis tebal di 60 kDa (berat molekul protein = kilo Dalton atau kDa) yang menunjukkan bahwa bakteri *E. coli* strain BL21 hasil *kloning* (transformasi) dengan gen iridovirus berhasil membawa protein rekombinan iridovirus dengan berat molekul 60 kDa (Gambar 6).



Gambar 6. Hasil analisa SDS-PAGE dari lisis bakteri *E. coli* isolat 6, 7, 9, dan 10 yang membawa protein rekombinan iridovirus terlihat adanya band tebal dengan berat molekul 60 kDa, jika dibandingkan dengan lisis bakteri *E. coli* strain BL21 yang tidak membawa protein rekombinan tidak menunjukkan adanya *band* tebal pada 60 kDa. M: marker protein.

Bahasan

Protein merupakan rangkaian rantai panjang dari asam amino sama seperti DNA yang juga merupakan rantai panjang dari nukleotida. Terdapat 20 asam amino pada keberadaan protein dan setiap organisme menggunakan 20 asam amino tersebut dalam kombinasi yang berbeda-beda untuk membentuk setiap protein. Urutan asam amino ini sangat penting karena urutan tersebut memberikan bentuk akhir dari protein (Kurnia, 2016). Lebih lanjut dijelaskan penggunaan bakteri sebagai pembawa protein rekombinan karena bakteri memiliki kode genetik di dalamnya. Namun bakteri tersebut tidak akan segera memulai membuat suatu protein rekombinan. Para ilmuwan harus merekayasa bagian promotor untuk melampirkan kode yang diinginkan sebelumnya dan kemudian mereka dapat mengaktifkannya. Setelah semua ini ditambahkan ke dalam bakteri atau organisme lain, sel-sel mulai membuat protein baru, karena urutan dari asam amino yang sama maka produk protein akan 100% identik dengan sumbernya dan karena itu lebih aman untuk digunakan.

Protein rekombinan yang terbentuk dalam sel bakteri pembawa dapat dibuktikan dengan analisa laboratorium, salah satunya adalah SDS-PAGE. Elektroforesis gel poliakrilamid merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk, dan ukuran. Elektroforesis dapat digunakan untuk memisahkan makromolekul seperti protein dan asam nukleat. Posisi molekul yang memisah pada gel dapat dideteksi

dengan pewarnaan atau autoradiografi, ataupun melalui kuantifikasi dengan densitometer (Artha, 2012).

Hasil elektroforesis dari protein rekombinan iridovirus dalam tulisan ini menunjukkan adanya *band* yang tebal dengan berat molekul 60 kDa. Menurut Mahardika & Mastuti (2015), yang transformasi (*kloning*) plasmid iridovirus isolat Gondol, Bali yang mengkode daerah MCP (*major capsid protein*) ke dalam sel bakteri *E. coli strain BL21* mampu membuat protein baru, yang mana sekuen protein tersebut melalui analisa BLAST menghasilkan 99% identik dengan MCP dari red sea bream iridovirus (gi | 29,467,056 | BAC66968.1), MCP-infectious spleen and kidney necrosis virus (gi | 315454 520 | ADU25248.1), MCP-grouper sleepy disease iridovirus (gi | 30,909,113 | AAP37443.1), MCP-infectious spleen and kidney necrosis virus (gi | 57,233,193 | AAW48183.1).

KESIMPULAN

Analisa SDS-PAGE terhadap bakteri *E. coli strain BL21* yang membawa protein rekombinan iridovirus dapat mengekspresikan protein iridovirus dengan berat molekul 60 kDa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Dr. drh. Ketut Mahardika dan Ibu Indah Mastuti, S.Pi., M.Si. yang telah memberi arahan dan masukan pada tulisan ini.

DAFTAR ACUAN

- Anonim. (2015). Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Elektroforesis (SDS-PAGE). <http://microbiologimolekuler.blogspot.co.id/2015/05/sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide.html>. Diakses 9 Mei 2018.
- Artha, P.L. (2012). *Pemurnian protein rekombinan sukrosafosforilase dari Leuconostoc mesenteroides MBFWRS-3(1) yang diekspresikan di Escherichia coli BL21DE*. Program Studi Teknologi Bioproses, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia. Skripsi.
- Kurnia. (2016). Protein rekombinan. <https://ashfarkurnia.files.wordpress.com/2016/06/6-protein-rekombinan.pdf>. hlm. 69-85. Diakses 9 Mei 2018.
- Mahardika, K. & Mastuti, I. (2015). The Effect of Crude Recombinant Viral Protein Vaccines Against Grouper Sleepy Disease Iridovirus (GSDIV) On Humpback Grouper (*Cromileptes altivelis*). *Indonesian Aquaculture Journal*, 10(2), 163-172.