

TEKNIK PEMEKATAN, PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN REKOMBINAN

Dedi Noviendri dan Sugiyono

*Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi
Kelautan dan Perikanan*

PENDAHULUAN

Informasi teknik pemekatan, purifikasi (pemurnian) dan karakterisasi protein sangat diperlukan untuk memperoleh protein rekombinan dengan kualitas, aktivitas dan kemurnian yang tinggi. Dengan mengetahui informasi dan sekaligus menguasai teknik-teknik dalam memproduksi protein rekombinan, diharapkan dapat menghasilkan produk protein rekombinan yang memiliki tingkat kemurnian yang sangat tinggi (>99%) untuk keperluan diagnostik dan terapeutik yang dapat dikonsumsi manusia. Protein yang digunakan untuk terapi atau tujuan diagnostik secara *in vivo* biasanya harus melalui proses purifikasi yang sangat ketat karena apabila ada sedikit saja molekul pengotor dapat menyebabkan efek klinis yang tidak diinginkan.

Protein rekombinan ini dapat diisolasi dari mikroba, sel tanaman dan sel hewan. Protein hasil isolasi

ini merupakan protein campuran sehingga perlu dikarakterisasi untuk menentukan bahwa protein target telah berada dalam campuran tersebut. Kemudian protein hasil pemurnian perlu dikarakterisasi untuk menentukan bahwa protein murni tersebut adalah benar protein yang diinginkan. Metode karakterisasi protein pada umumnya didasarkan pada berat molekul, muatan total protein dan reaksi imunokimia. Karakterisasi protein berdasarkan berat molekul maupun muatan pada umumnya menggunakan elektroforesis, sedangkan untuk reaksi imunokimia dapat menggunakan analisis *Western Blot*.

Apa Itu Protein Rekombinan?

Sebelum membahas definisi protein rekombinan, terlebih dulu harus diketahui definisi protein. Menurut Rachman (2005), protein adalah kelompok biopolimer yang merupakan hasil ekspresi infor-

masi genetik yang terdiri atas rangkaian monomer alfa-asam amino yg dihubungkan oleh ikatan peptida. Struktur protein terdapat dalam empat tingkatan, yaitu struktur primer, sekunder, tersier dan kuarterner. Protein hanya berfungsi pada kondisi alaminya (baik dalam bentuk struktur tersier maupun kuarterner).

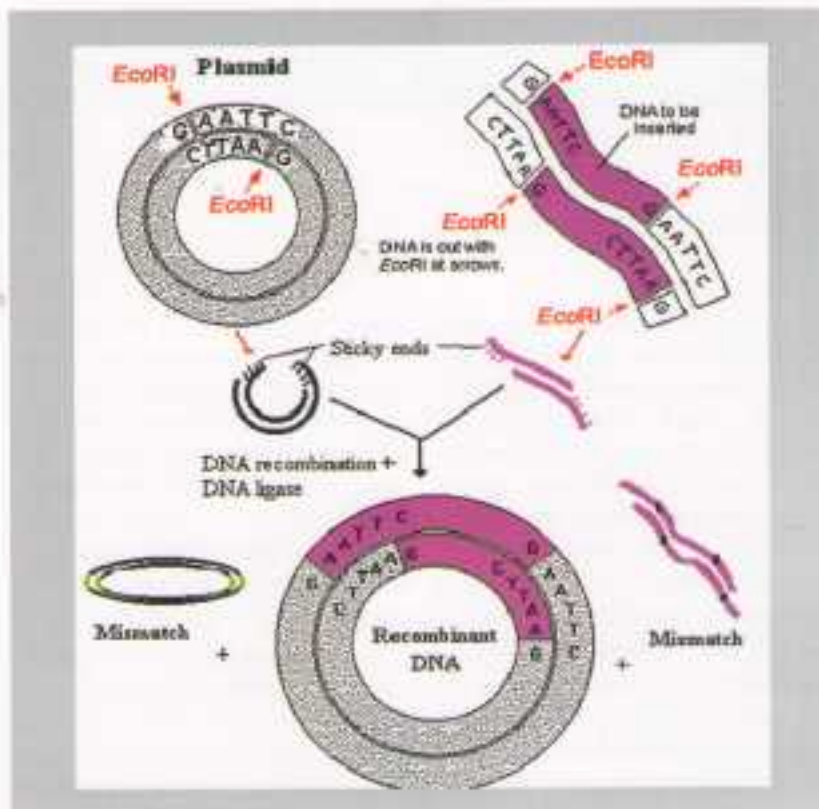
Menurut Retnoningrum (2005), protein rekombinan adalah protein yang diproduksi oleh sel yang DNANYA telah dimodifikasi dengan rekombinasi genetik (rekayasa genetika). Protein rekombinan dihasilkan untuk tujuan medis (insulin, interferon dan lain-lain) atau untuk industri (enzim). Protein rekombinan yang telah diproduksi dengan teknik genetik dapat dilihat pada Tabel 1. Rekayasa genetika protein adalah suatu proses yang berdasarkan pada: (1). Penggunaan vektor ekspresi (bakteri, virus, plasmid dan lain sebagainya) yang berfungsi sebagai pembawa gen penyandi protein yang diinginkan (Gambar 1); (2). Penggunaan sel inang yang melaksanakan instruksi yang disediakan oleh gen tersebut untuk mensintesis protein yang diinginkan; (3). Produksi massa protein yang diinginkan; (4). Pemisahan dan ekstraksi protein dari kulturnya, kemudian dilanjutkan dengan purifikasinya.

Isolasi dan Pemurnian Protein

Tahap awal dari proses pemurnian adalah mengisolasi protein dari sumber yang memproduksinya, baik sel tanaman, hewan, maupun

Tabel 1. Protein target yang diproduksi dengan teknik genetik (Gusdinar, 2005)

Protein rekombinan	Penggunaan
Insulin	Pengobatan diabetes
Interleukin	Antikanker
Interferon	Antiviral, antikanker
Alfa1-antitripsin	Pencegahan <i>life-threatening emphysema</i>
Hepatitis B <i>surface antigen</i>	Vaksin Hepatitis B
Hormon pertumbuhan	Induksi pertumbuhan
<i>Chymosin</i>	Hidrolisis kasein dalam produksi keju
<i>Phytase</i>	Pelepasan gugus fosfat dari asam fitat



Gambar 1. Penyisipan (insersi) sampel DNA target ke dalam vektor plasmid.

mikroorganisme. Protein ekstraseluler yang disekresikan ke dalam medium diperoleh melalui pemisahan sel dari media fermentasi dengan teknik filtrasi dan sentrifugasi. Protein target berada dalam medium bebas sel yang biasanya dalam bentuk yang sangat encer. Sedangkan untuk protein intraseluler, sel dipanen dan diresuspensi dalam larutan dapar (*buffer*) atau air kemudian dipecahkan agar dapat diambil proteinnya (Ellyasheva & Rachman, 2005).

Pemekatan Protein

Protein target biasanya berada dalam bentuk terlarut sehingga perlu dilakukan proses pemekatan. Metode pemekatan yang umum dilakukan di laboratorium adalah: (1) pemekatan dengan pengendapan/presipitasi menggunakan garam amonium sulfat atau pelarut; (2) pemekatan dengan meng-

gunakan ultrafiltrasi. Pengendapan menggunakan amonium sulfat adalah salah satu cara yang paling sering digunakan dan populer karena kelarutannya yang tinggi, murah, tidak menyebabkan denaturasi protein dan memiliki efek stabilitas pada protein. Penambahan amonium sulfat dapat meningkatkan kelarutan protein (*salting-in*) dan penambahan garam selanjutnya akan mendestabilisasi protein sehingga protein akan mengendap (*salting-out*). Pemekatan dengan pengendapan

garam biasanya tidak memberikan peningkatan kemurnian yang tinggi, namun memberikan rendemen (*yield*) tinggi (Nurachman, 2006). Pelarut yang biasa digunakan dalam pemekatan protein adalah etanol; isopropanol, aseton dan dietil eter. Namun penggunaan pelarut ini memiliki kelemahan, karena proses ini harus dilakukan pada suhu 0°C atau lebih rendah lagi untuk mencegah denaturasi protein. Larutan protein dapat juga dipekatkan dengan menggunakan ultrafiltrasi. Pemekatan protein menggunakan ultrafiltrasi dengan ukuran pori membran 1-20 nm cukup untuk menahan protein berbobot molekul (BM) rendah (Ellyasheva & Rachman, 2005).

Pemurnian Protein

Setelah protein yang diinginkan dipisahkan dari selnya, tahap selanjutnya adalah memurnikan protein tersebut dari kontaminan yang tidak diinginkan. Hal ini dapat dicapai dengan menggunakan kolom kromatografi. Prosedur ini dipakai secara luas untuk memurnikan protein (Nurachman, 2006). Metode ini dapat memisahkan protein berdasarkan sifat karakteristiknya, karena setiap protein memiliki ukuran, bentuk, muatan dan permukaan hidrofobik yang sangat bervariasi. Tiap-tiap teknik pemurnian protein dengan kromatografi kolom (Tabel 2) memiliki kinerja berbeda-beda. Kromatografi kolom yang sering digunakan antara lain kromatografi gel filtrasi, penukar ion,

Tabel 2. Pemurnian protein berdasarkan sifatnya (Nurachman, 2006)

Sifat protein	Teknik kromatografi kolom
Muatan	Penukar ion
Ukuran	Filtrasi gel
Kehidrofoban	Interaksi hidrofob, fase terbalik
Kespesifikan ligan	Afinitas

hidrofobik dan kromatografi afinitas (Ellyasheva & Rachman, 2005). Adapun prinsip pemurnian protein menggunakan kolom menurut Ellyasheva (2005) adalah sebagai berikut: (1) campuran protein dimasukkan ke dalam kolom; (2) protein yang diinginkan terikat di dalam kolom; (3) protein yang tidak diinginkan dicuci; dan (4) protein yang diinginkan dielusi.

Derajat kemurnian protein target tergantung pada keperluan penggunaan (Tabel 3). Protein-protein yang akan digunakan untuk terapi harus memiliki kemurnian yang sangat tinggi (di atas 99%) dan tidak boleh mengandung pirogen (zat-zat yang dapat menimbulkan demam). Untuk mempelajari sifat dan struktur protein diperlukan kemurnian antara 95-99%. Protein dengan kemurnian sedang (di bawah 95%) dipakai untuk produksi antibodi (Nurachman, 2006).

Kromatografi Afinitas

Kromatografi afinitas merupakan salah satu tipe kromatografi adsorpsi, dimana molekul yang akan dimurnikan diadsorpsi secara bolak-balik menggunakan senyawa pengikat komplementer (ligan) yang dimobilisasi pada matriks (Fardiaz & Fardiaz, 1987). Dengan kemajuan biokimia, banyak protein telah diketahui ligannya. Sifat ini dapat digunakan untuk pemurnian protein dengan cara melekatkan ligan pada suatu matriks dan menggunakan matriks ini untuk purifikasi satu tahap. Kromatografi afinitas memisahkan protein-protein atas dasar interaksi reversibel antara protein dan ligan spesifik yang terikat pada matriks kromatografi. Kromatografi afinitas sangat selektif, oleh karena itu teknik ini memiliki resolusi tinggi dan cocok untuk mendapatkan protein spesifik. Secara umum, kromatografi afinitas dapat

Tabel 3. Derajat kemurnian protein target (Nurachman, 2006)

Derajat kemurnian	Keperluan penggunaan
Sangat tinggi (>99%)	Untuk terapi, studi <i>in vivo</i>
Tinggi (95-99%)	Studi struktur dengan kristalografi sinar-X, karakterisasi sifat fisikokimia
Sedang (<95%)	Untuk produksi antibodi, penentuan urutan ujung-N

digunakan untuk memisahkan protein yang mengenal ligan melalui: adsorpsi pada ligan yang terikat secara kovalen ke kolom; penambahan campuran protein ke kolom, lalu dicuci dengan *buffer* untuk memindahkan protein yang tidak terikat, kemudian mengelusi protein yang diinginkan dengan menambahkan bentuk terlarut ligan berkonsentrasi tinggi (Nurachman, 2006).

Dengan kemajuan teknologi DNA rekombinan, kini dapat dilakukan purifikasi protein yang ligannya tidak diketahui. Cara yang dilakukan adalah dengan menggabungkan fragmen DNA yang akan dipurifikasi dengan fragmen DNA pengkode suatu protein yang ligannya diketahui secara definitif. Fragmen rekombinan ini ketika diekspresikan

menghasilkan suatu protein fusi yang dapat dipurifikasi dengan kromatografi afinitas menggunakan ligannya yang ditempelkan pada suatu matriks. Sebagai contoh adalah suatu vektor ekspresi yang menyediakan fragmen DNA penyandi polihistidin (His-Tag). Polihistidin dapat membentuk kelat dengan logam nikel, sehingga prinsip ini dapat digunakan untuk pemurnian protein fusi dengan polihistidin. Gambar 2 memperlihatkan bahwa protein rekombinan yang berdifusi dengan polihistidin dapat dimurnikan dengan kolom afinitas nikel (Ellyasheva & Rachman, 2005).

Karakterisasi Protein

Protein hasil pemurnian perlu dikarakterisasi untuk menentukan



Gambar 2. Proses pemurnian protein dengan kromatografi kolom afinitas (kolom nikel).

bahwa protein murni tersebut adalah benar protein yang diinginkan. Metode karakterisasi protein umumnya didasarkan pada: (1) bobot molekul (BM) dengan menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*); (2) muatan total protein dengan menggunakan IEF (*Isoelectric Focusing*); dan (3) reaksi imunokimia (kemampuan protein sebagai antigen yang mengenali antibodi) dengan menggunakan *Western Blot* (Ernawati & Kembaren, 2005; Kembaren & Rachman, 2005)

SDS-PAGE

Protein yang didenaturasi dengan SDS akan menghasilkan protein yang bermuatan negatif sehingga bila diletakkan pada suatu medan listrik akan bergerak ke kutub positif atau anoda. Migrasi protein pada gel proporsional terhadap ukurannya sehingga protein yang lebih kecil akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan protein berukuran besar. Agar protein yang bergerak dalam medan listrik tersebut terpisah berdasarkan berat molekulnya, maka diperlukan suatu matriks yang berpori. Matriks yang digunakan adalah poliakrilamid, suatu polimer

Tabel 5. Konsentrasi akrilamid yang digunakan untuk memisahkan protein dalam berbagai BM (Ernawati & Kembaren, 2005)

Konsentrasi akrilamid (%)	Resolusi pemisahan ukuran protein (kDa)
15,0	14-45
12,5	15-50
10,0	18-75
7,5	30-120
5,0	60-212

yang monomernya akrilamid (Kembaren & Rachman, 2005). Konsentrasi akrilamid yang digunakan untuk memisahkan protein dalam berbagai BM dapat dilihat pada Tabel 4 dan 5.

Elektroforesis protein dengan SDS-PAGE terdiri dari dua lapis gel poliakrilamid dengan pH dan konsentrasi yang berbeda serta dicetak pada pelat kaca. Gel poliakrilamid lapisan bawah disebut sebagai *separating gel* yang berperan pada pemisahan protein berdasarkan BM. Gel poliakrilamid lapisan atas disebut sebagai *stacking gel* yang berfungsi untuk menempatkan sampel. Untuk menentukan BM protein, elektroforesis dilakukan bersamaan dengan suatu marka protein yang

telah diketahui BM-nya. Deteksi sampel setelah elektroforesis dapat dilakukan secara kualitatif menggunakan *Comassie blue* dan untuk meningkatkan sensitivitasnya dapat menggunakan pewarnaan perak nitrat (*silver staining*) (Kembaren & Rachman, 2005). Adapun batas deteksi untuk *Comassie blue* adalah 36-47 ng, dan untuk *silver staining* adalah 0,5-1,2 ng (Ernawati & Kembaren, 2005).

Tahap-tahap proses elektroforesis protein dengan SDS-PAGE adalah sebagai berikut:

- (1). Alat elektroforesis protein (misalnya, Bio-Rad Mini Protean II) disiapkan, lempengan kaca, spacer, dan alat pencetak gel yang bersih disusun;
- (2). Untuk memastikan lempengan kaca yang disisipi spacer tidak bocor, dimasukkan akuades ke ruang pencetak gel;
- (3). Disiapkan *separating gel* dan *stacking gel*;
- (4). Sisir pencetak sumur diselipkan pada *stacking gel* secara hati-hati sampai menyentuh bagian atas dari *separating gel*;
- (5). Chamber elektroforesis disiapkan dan diisi dengan gel sandwich;
- (6). Chamber diisi dengan *buffer* elektroforesis hingga sumur penuh;
- (7). Preparasi marka protein dan sampel protein;
- (8). Marka dan sampel protein dimasukkan hingga sumur terisi penuh;
- (9). Semua sampel protein dan marka telah masuk ke dalam

Tabel 4. Konsentrasi akrilamid yang digunakan untuk memisahkan protein dalam berbagai BM (Nuswantara, 2004)

Konsentrasi akrilamid		Interval BM (Da)
%T	%C	
5	2,6	250.000 – 300.000
10	2,6	15.000 – 100.000
10	3,0	1000 – 100.000
15	2,6	1200 – 50.000

Keterangan:

%C= persentase crosslinker = $\frac{[g \text{ crosslinker}]}{[g \text{ akrilamid} + g \text{ crosslinker}]} \times 100\%$

%T= persentase monomer + crosslinker = $\frac{[g \text{ akrilamid} + g \text{ crosslinker}]}{\text{total volume (ml)}} \times 100\%$



Gambar 3. Beberapa tahap proses elektroforesis protein dengan SDS-PAGE: (1) persiapan alat dan gel (2) *chamber* diisi gel dan *buffer* elektroforesis; (3) pengisian sampel dan marka ke dalam sumur gel; (4) *running* elektroforesis; (5) pemotongan gel; (6) pewarnaan (*staining*) gel; (7) penghilangan warna (*destaining*) pada gel; dan (8) hasil elektroforesis berupa pita-pita protein dan marka.

semua sumur pada gel, dan siap dilakukan *running* elektroforesis; (10). *Running* dilakukan pada tegangan listrik dan waktu tertentu hasil optimasi; (11). Selesai *running*, gel diambil; (12). Gel dipotong

dan dirapikan pada bagian yang tidak diperlukan; (13). Gel dibilas dengan akuades; (14). Gel diwarnai (*staining*) dengan merendamnya dalam *staining solution*, dalam hal ini dalam *Coomassie blue* selama

15 menit; (15). Gel didestaining untuk menghilangkan sisa *staining* pada gel yang tidak mengandung pita protein; (16). Diperoleh gel elektroforesis yang mengandung pita-pita protein dan marka. BM protein dapat diketahui dengan cara membandingkan pita protein yang dihasilkan terhadap pita-pita protein pada marka.

Secara garis besar tahap-tahap di atas, dapat dilihat pada Gambar 3.

Analisis Protein dengan *Western Blot*

Karakterisasi protein dengan metode ini dilakukan berdasarkan kemampuan protein sebagai antigen yang mengenali antibodi (Ernawati & Kembaren, 2005). Untuk melakukan analisis *Western Blot* diperlukan antibodi yang spesifik mengenali protein target. Tahap pertama pada analisis *Western Blot* adalah SDS-PAGE, dimana protein dipisahkan terlebih dahulu berdasarkan BM-nya. Protein yang berada pada gel tersebut

Tabel 6. Jenis-jenis membran dan karakteristiknya (Nuswantara, 2004)

Karakteristik	Jenis membran		
	Nitroselulosa	Nylon netral	Nylon bermuatan
Kapasitas (mg DNA/cm ²)	80-120	100	400-500
Ukuran asam nukleat untuk penempelan maksimum (bp)	> 400	> 50	> 50
<i>Buffer</i> transfer	Daya ionik tinggi pada pH netral	Daya ionik rendah pada berbagai interval pH	
Immobilisasi (fiksasi)	Pemanasan pada oven vakum pada 80°C selama 2 jam	Pemanasan pada oven biasa pada 70°C, metode alkalin atau irradiasi UV	

ditransfer ke suatu membran dalam hal ini nitroselulosa dengan metode elektroforesis. Membran ditempatkan pada kutub positif, sedangkan gel diletakkan pada kutub negatif, sehingga protein bermigrasi ke kutub positif, dimana akhirnya protein ditransfer ke membran.

Membran yang telah membawa protein selanjutnya diinkubasi dengan antibodi (antibodi primer) terhadap protein target. Membran kemudian dicuci, lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder yg telah berkonyugasi dengan alkalin fosfatase atau *horseradish peroxidase* yang dapat menguraikan substrat tertentu dan menghasilkan warna (Kembaren & Rachman, 2005). Jenis membran yang dapat digunakan dalam analisis ini dapat dilihat pada Tabel 6.

Tahap-tahap analisis protein dengan *Western Blot* adalah sebagai berikut:

(1).Membran dalam hal ini nitroselulosa disiapkan, lalu digunting sesuai ukuran gel; (2).Kertas saring dan membran nitroselulosa dibasahi dengan merendamnya dalam *buffer* transfer; (3).Gel hasil SDS-PAGE ditempatkan di atas membran; (4).Gel disusun seperti *sandwich* pada alat yang tersedia terdiri dari berturut-turut, busa, 3 lembar kertas Whatman 3 MM/kertas saring, gel akrilamid, membran nitro-selulosa, 3 lembar kertas Whatman 3 MM dan busa; (5).Model *sandwich* siap ditempatkan dalam *chamber* elektroforesis; (6).Membran nitroselulosa ditempatkan pada daerah yang menjadi anoda (kutub positif); (7).Proses transfer protein, dilakukan semalam pada tegangan 100 Volt pada suhu 4 °C; (8).Setelah 1 malam, selanjutnya membran dikeringudarkan selama 30-60 menit. Kemudian membran di-rendam berturut-turut dalam *buffer* PBS, antibodi primer, *buffer* TBS,



Gambar 4. Beberapa tahap analisis protein dengan *Western Blot*: persiapan membran (1); penyusunan gel dan membran (2); proses transfer protein (3); perendaman membran (4), dan hasil *Western Blot* (5).

antibodi sekunder, *buffer* TBS, *buffer* alkalin fosfatase. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan merendam membran dalam *buffer* alkalin fosfatase yang mengandung NBT dan BCIP; (9).Setelah reaksi dihentikan dengan memindahkan membran ke dalam *buffer* TBS yang mengandung EDTA, lalu dikeringudarkan. Diperoleh hasil *Western Blot* berupa spot-spot hasil hibridisasi protein dan antibodi pada membran.

Secara garis besar, tahap-tahap di atas dapat dilihat pada Gambar 4.

DAFTAR PUSTAKA

Ellyasheva, R. 2005. *Purifikasi Protein*. Makalah kursus singkat: Perkembangan terkini dan Prospek Protein Rekombinan dalam Bidang Industri. School of Pharmacy ITB, Bandung. 13-17 Desember 2005. p 1-10.

Ellyasheva, R. dan Rachman, E.A.G. 2005. *Purifikasi Protein*. Makalah kursus singkat: Perkembangan terkini dan Prospek Protein Rekombinan dalam Bidang Industri. School of Pharmacy ITB, Bandung. 13-17 Desember 2005. p. 20-26

Ernawati dan Kembaren, R.F. 2005. *Karakterisasi Protein Rekombinan*. Makalah kursus singkat: Perkembangan terkini dan Prospek Protein Rekombinan dalam Bidang Industri. School of Pharmacy ITB, Bandung. 13-17 Desember 2005. p.1-12.

Fardiaz, D. dan Fardiaz, S.1987. *Teknik Penelitian Protein*. Lab. Kimia dan Biokimia Pangan, PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor. 305 pp.

Gusdinari, T. 2005. *Enzim Rekombinan dalam Bidang Farmasi*. Makalah kursus singkat: Perkembangan terkini dan Prospek Protein Rekombinan dalam Bidang Industri. School of Pharmacy ITB, Bandung. 13-17 Desember 2005. p. 49-58.

Kembaren, R.F. dan Rachman, E. A. G. 2005. *Karakterisasi Protein Rekombinan*. Makalah kursus singkat: Perkembangan terkini dan Prospek Protein Rekombinan dalam Bidang Industri. School of Pharmacy ITB, Bandung. 13-17 Desember 2005. p. 27-30.

Nurachman, Z. 2006. *Pemurnian Protein*. Makalah The Gruber-Soedigdo Lecture 2006. Workshop Carbohydrate Acting Enzymes: Structure, Modelling and

- Application. Biochemistry Lab. ITB, Bandung. 21-22 Juni 2006. p. 24-39.
- Nuswantara, S. 2004. *Kuliah dan Pelatihan Elektroforesis DNA, Protein, Biot-transfer DNA & Protein*. Makalah kuliah dan pelatihan. Laboratorium Terpadu Universitas Islam Negeri Jakarta. 27-29 Desember 2004. 48 pp.
- Rachman, E. A. G. 2005. *Protein dan Modifikasinya*. Makalah kursus singkat: Perkembangan terkini dan Prospek Protein Rekombinan dalam Bidang Industri. School of Pharmacy ITB, Bandung. 13-17 Desember 2005. p. 1-7.
- Retnoningrum, D. S. 2005. *Protein Rekombinan untuk Vaksin*. Makalah kursus singkat: Perkembangan terkini dan Prospek Protein Rekombinan dalam Bidang Industri. School of Pharmacy ITB, Bandung. 13-17 Desember 2005. p. 104-107.