

## BAB V

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

## 5.1 Hasil Penelitian

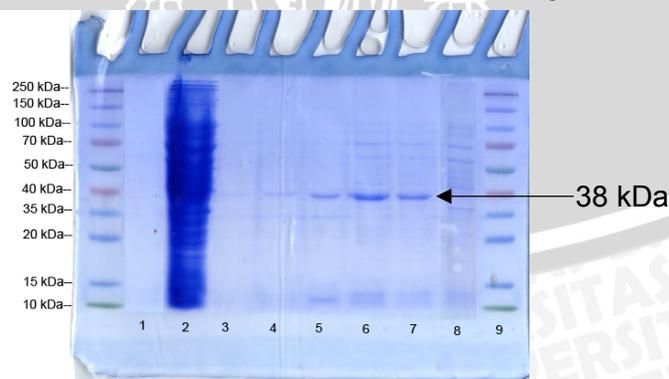
Pada penelitian ini, telah dilakukan eksperimen untuk meningkatkan pemurnian protein rekombinan Ag38 kDa dari *M. tuberculosis* yang berbentuk *inclusion bodies* dengan cara mendenaturasi dan merenaturasi protein dengan urea. Urea merupakan agen denaturasi dengan rumus kimia  $(\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$ . Urea dianggap mampu mendenaturasi protein secara langsung dengan berikatan dengan protein itu sendiri atau secara tidak langsung dengan cara mengubah lingkungan pelarutnya (*solvent environment*). Pemberian urea dengan konsentrasi yang berbeda-beda dicobakan untuk mencapai tingkat kemurnian maksimal. Konsentrasi tersebut kemudian dibandingkan dengan kontrol negatif, yaitu purifikasi tanpa menggunakan urea.

Purifikasi dilakukan menggunakan kit Protino® Ni-TED *Packed Column* 1000, masing-masing diberi perlakuan dengan menambahkan urea dengan konsentrasi 8 M, 4 M, dan 2 M pada *denaturing solubilization buffer* dan *elution buffer*. Tahapan-tahapan purifikasi protein yang dilakukan, meliputi isolasi *inclusion bodies* dari sel bakteri, solubilisasi *inclusion bodies*, ekuilibrasi kolom, proses *binding*, *washing*, dan yang terakhir adalah proses elusi. Setelah itu, tiap hasil tahapan divisualisasi dengan SDS-PAGE.

Pertama-tama, peneliti menambahkan konsentrasi tertinggi, 8 M urea, pada *denaturing solubilization buffer* dan *denaturing elution buffer*. Namun demikian, terjadi *overload* protein pada proses *binding*. Pada tahap elusi, pita protein dengan massa 38 kDa tidak nampak pada SDS-PAGE. Hal ini dikarenakan pada saat proses solubilisasi *inclusion bodies*, penghancuran

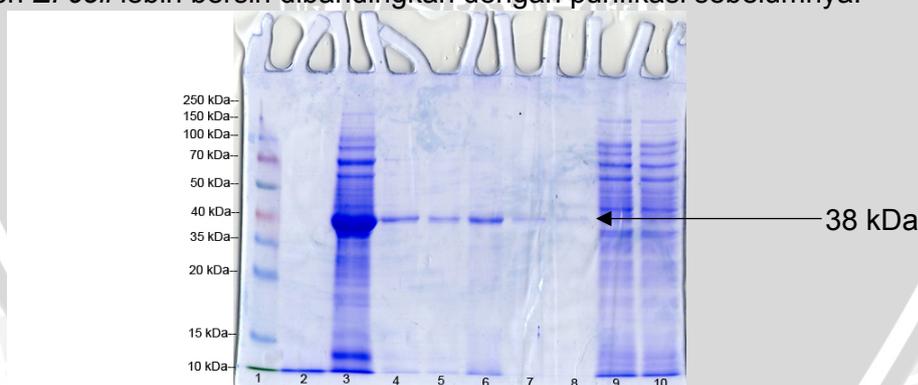
*inclusion bodies* menggunakan vortex, setelahnya tidak dilakukan penyaringan dengan filter membran 0.45  $\mu\text{m}$  pada supernatan, sehingga terjadi penyumbatan pada kit (*clogging*).

Pada gambar profil protein tampak kolom 1 merupakan visualisasi dari proses *binding*. Pada kolom berikutnya, merupakan proses *washing* 1. Terjadi *overload* sehingga banyak protein yang melewati kolom (tidak tertangkap  $\text{Ni}^{2+}$  yang berada di resin). Meskipun demikian, dapat dilihat adanya penebalan pita pada berat molekul 38 kDa (di antara 35 dan 40 kDa). Kolom ke-3 dan ke-4 merupakan proses *washing* 2 dan 3. Hampir tidak didapatkan pita pada berat molekul 38 kDa. Dengan demikian, tahap *washing* sudah benar karena diasumsikan bahwa protein antigen terikat pada resin Ni-NTA. Sedangkan pada proses elusi (kolom 5, 6, dan 7) dimana pada protein yang terikat pada resin dibilas dengan larutan penyangga yang mengandung imidazol, terdapat penebalan. Namun, pita yang paling tebal berada pada kolom keenam (proses elusi 2). Tipisnya pita diakibatkan karena hanya sedikit protein yang berikatan dengan *resin bed* sehingga protein yang terpurifikasi juga sedikit. Kolom ke-8 merupakan supernatan dari hasil pemecahan sel (sonikasi). Pita protein pada 38 kDa tidak muncul, berarti seluruh *inclusion bodies* ada di pellet, tidak menunjukkan adanya penebalan pada berat molekul 38 kDa (gambar 5.1.1)



**Gambar 5.1.1 Hasil SDS PAGE Purifikasi Protein Rekombinan Ag38 kDa dengan Konsentrasi Urea 8 M : *Binding* (1); *Washing* 1 (2); *Washing* 2 (3); *Washing* 3 (4); *Elusi* 1 (5); *Elusi* 2 (6); *Elusi* 3 (7); *Supernatan* (*flow through*) (8); *Marker* (9)**

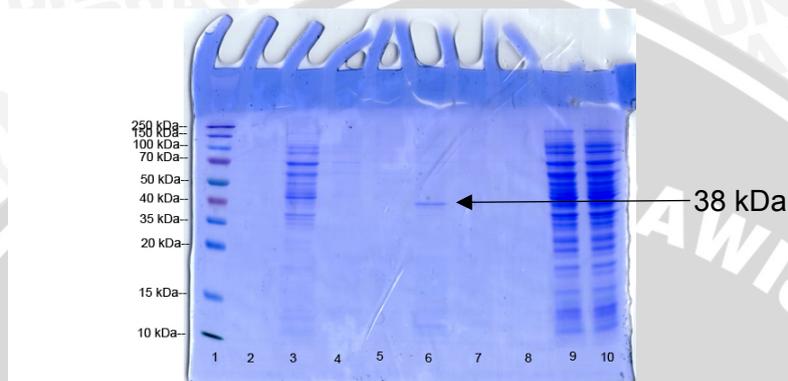
Pada proses purifikasi berikutnya, konsentrasi diturunkan dari 8 M menjadi 4 M yang ditambahkan pada larutan penyangga. Pada kolom 9 dan 10 yang berisi supernatan terlihat jelas tidak adanya protein antigen. Berarti, seluruh *inclusion bodies* ada di pellet (kolom 2-8). Tahap *washing* 1 (kolom 3) menunjukkan masih adanya *overload* protein, meskipun tidak seperti eksperimen sebelumnya. Pada tahap *washing*, banyak protein Ag38 pita setinggi 38 kDa terlihat tebal. Lebih lanjut di tahap *washing* 2 (kolom 4), terlihat adanya pita protein 38 kDa, namun masih terdapat pita lain di atas maupun di bawahnya, artinya bahwa masih banyak *copurified* protein yang ikut terelusi. Protein ini merupakan milik *E. coli*. Pada tahap *washing* 1, 2, dan 3 (kolom 3-5) terlihat masih banyak protein Ag38 yang tercuci (terguyur) meskipun tidak setebal dengan menggunakan urea 8 M. Namun demikian, tampak perbedaan yang mencolok pada tahap elusi 1 jika dibandingkan dengan tahap yang sama dengan menggunakan konsentrasi urea 8 M, yaitu bahwa pita protein Ag38 lebih tebal pada purifikasi dengan menggunakan urea berkonsentrasi 4 M. Selain itu, protein endogen *E. coli* lebih bersih dibandingkan dengan purifikasi sebelumnya.



**Gambar 5.1.2 Hasil SDS PAGE Purifikasi Protein Rekombinan Ag38 kDa dengan Konsentrasi Urea 4 M : Marker (1); Binding (2); Washing 1 (3); Washing 2 (4); Washing 3 (5); Elusi 1 (6); Elusi 2 (7); Elusi 3 (8); Supernatan 1 (9); Supernatan 2 (10)**

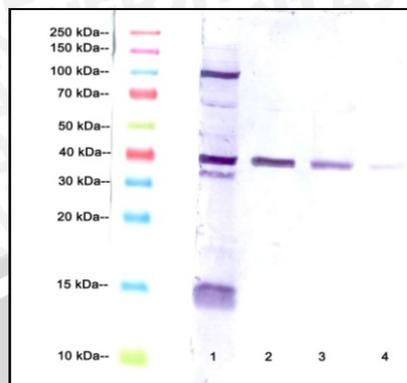
Purifikasi dengan menggunakan konsentrasi urea yang lebih rendah, 2 M, menunjukkan hasil yang lebih baik, khususnya pada tahap *washing* 1, antigen 38 tidak ikut tercuci. Pada tahap *washing* sudah tidak ada lagi pita Ag38. Artinya

bahwa seluruh protein terikat pada resin. Sebagai gantinya, tampak pita protein 38 kDa pada tahap elusi (kolom 6, 7, dan 8). Dengan demikian, protein Ag38 sebagian besar sudah terelusi. Pada elusi 1 (kolom 6), pita protein rekombinan Ag38 kDa lebih tebal dan protein *endogenous* dari bakteri *E. coli* nampak lebih tipis dibandingkan dengan perlakuan sebelumnya.



**Gambar 5.1.3 Hasil SDS PAGE Purifikasi Protein Rekombinan Ag38 kDa dengan Konsentrasi Urea 2 M : Marker (1); Binding (2); Washing 1 (3); Washing 2 (4); Washing 3 (5); Elusi 1 (6); Elusi 2 (7); Elusi 3 (8); Supernatan 1 (9); Supernatan 2 (10)**

Dari keseluruhan purifikasi dengan 3 perlakuan urea dengan konsentrasi berbeda yang divisualisasikan dengan metode SDS-PAGE perlu dilakukan konfirmasi apakah pada 38 kDa benar-benar Ag38 kDa. Untuk itu, kami menggunakan *western blot* yang memfasilitasi perikatan antigen 38 dengan anti antigen 38 (antibody). Hasilnya, pita protein Ag38 kDa hasil purifikasi dengan urea konsentrasi 2 M sebagai agen denaturasi dan renaturasi lebih tebal dibandingkan konsentrasi 4 M dan 8 M. Dengan demikian, memang benar bahwa yang ada di kolom elusi pada tiap eksperimen adalah protein rekombinan Ag38.



**Gambar 5.1.4 Hasil *Western Blot* Protein Rekombinan Ag38 kDa : *Marker* (1); Supernatan 0 M Urea (2); 2 M Urea (3); 4 M Urea (4); 8 M Urea (5)**

