

Volume 23 Nomor 2, Juli 2022

eISSN 2442-5613

# **Jurnal ILMU DASAR**

JID

Terakreditasi SINTA Kemenristekdikti No. 200/M/KPT/2020

Jurnal ILMU DASAR	Vol. 23	No. 2	Hlm. 81 - 148	Jember Juli 2022	eISSN 2442-5613
-------------------	---------	-------	---------------	---------------------	--------------------

Jurnal ILMU DASAR (JID) is a national peer-reviewed and open access journal that publishes research papers encompasses all aspects of natural sciences including Mathematics, Physics, Chemistry and Biology JID publishes 2 issues in 1 volume per year. First published, volume 1 issue 1, in January 2000 and available in electronically since 2012. Jurnal ILMU DASAR is accredited by the Ministry of Research, Technology and Higher Education of the Republic of Indonesia (RISTEKDIKTI), No. 200/M/KPT/2020 (December. 23, 2020). All accepted manuscripts will be published worldwide JID has been indexed in:



## Editorial Team

1. Purwatiningsih, University of Jember - **Chief Editor**  
SCOPUS ID. [55341566700](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5982555](#)
2. Dwi Indarti, University of Jember  
[Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6648735](#)
3. Arie Srihardyastutie, University of Brawijaya, Malang  
SCOPUS ID. [56549015100](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6003114](#)
4. Eva Tyas Utami, University of Jember  
[Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6109055](#)
5. Miftahul Ilmi, Gadjah Mada University, Yogyakarta  
SCOPUS ID. [57190191276](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [258133](#)
6. Hasih Pratiwi, Universitas Sebelas Maret (UNS), Surakarta  
SCOPUS ID. [56233603300](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6028915](#)
7. Fiber Monado, Sriwijaya University, Palembang  
SCOPUS ID. [55330195600](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [53558](#)
8. Kahar Muzakhar, University of Jember  
SCOPUS ID. [56737119300](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5989819](#)
9. Bambang Piluharto, University of Jember  
SCOPUS ID. [37056268800](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5993961](#)
10. Siswoyo - University of Jember  
SCOPUS ID. [57193830395](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [257755](#)
11. Bowo Eko Cahyono, The University of Jember, Indonesia  
SCOPUS ID. [57163498200](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6007108](#)
12. Abduh Riski, University of Jember  
SCOPUS ID. [57213518392](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [257613](#)
13. Yoyok Yulianto - University of Jember

## Reviewer

1. Irminda Kris Murwani, ITS Surabaya, Indonesia  
SCOPUS ID. - [6603061145](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5975665](#)
2. Widodo, Brawijaya University, Indonesia  
SCOPUS ID. - [57190247745](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5982480](#)
3. Bambang Irawan, Airlangga University, Indonesia  
SCOPUS ID. [6508239454](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5984560](#)
4. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Airlangga University, Indonesia  
SCOPUS ID. [23006120200](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5987035](#)
5. I Gede Putu Wirawan, Udayana University, Indonesia  
SCOPUS ID. [7801466336](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5987692](#)
6. Sutrisno, University of Jambi, Indonesia  
SCOPUS ID. [7801466336](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6032103](#)
7. Asni Johari, University of Jambi, Indonesia  
SCOPUS ID. [56603909900](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6145337](#)
8. Andik Wijayanto, State University of Malang  
SCOPUS ID. ID [57200989059](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5974281](#)
9. Siti Latifatus Siriyah, Universitas Singaperbangsa Karawang  
SINTA ID. [6019844](#)
10. Didik Sulistyanto, University of Jember, Indonesia  
SCOPUS ID. [6506964916](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6013751](#)
11. Bambang Sugiharto, University of Jember, Indonesia  
SCOPUS ID. [6602309159](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6083420](#)
12. Agus Subekti, University of Jember, Indonesia  
SCOPUS ID. [6602710755](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [55068](#)
13. Kusno, Universitas Pendidikan Mandalika, Indonesia  
SCOPUS ID. [57202199759](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6720430](#)
14. Slammin, University of Jember, Indonesia  
SCOPUS ID. [7409555666](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [55671](#)
15. Dafik, University of Jember, Indonesia  
SCOPUS ID. [24281263600](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5982062](#)
16. Suratno, University of Jember, Indonesia  
SCOPUS ID. [57201780551](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5986355](#)
17. Ramadhani Eka Putra, Bandung Institute of Technology (ITB), Indonesia  
SCOPUS ID: [26326479700](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5998784](#)
18. Purkan, Airlangga University, Indonesia

[Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5983068](#)

19. Titik Taufikurohmah, UNESA, Surabaya, Indonesia

[Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [259056](#)

20. Rahmat Gunawan, Mulawarman University, Indonesia

[Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [5975285](#)

21. Sujito, University of Jember, Indonesia

[Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6009313](#)

22. Achmad Sjaifullah, University of Jember, Indonesia

[Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [55272](#)

23. Sentot Achmadi, Institut Teknologi Nasional Malang, Indonesia

SCOPUS ID. [57022229500](#) - [Google Scholar Profile](#) - SINTA ID. [6104645](#)

## EDITORIAL

---

- [Cover JID Volume 23 No 2 \(2022\)](#)

- [PDF](#)

- [Editorial Board](#)

- [PDF](#)

## GENERAL

---

- [Artificial Neural Network Performance on Pakcoy Leaf Fresh Weight Model](#)

Riza Yuli Rusdiana, Laily Ilman Widuri, Didik Pudji Restanto

81-86

- [PDF](#)

- [The Effect of Pattern and Infill Percentage in 3D Printer for Phantom Radiation Applications](#)

Aditya Prayugo Hariyanto; Kurnia Hastu Christianiti; Agus Rubiyanto, Nasori Nasori, Mohammad Haekal, Endarko Endarko

87-92

- [PDF](#)
- **Flooded Area Mapping and Its Relationship to the Land Use, Soil Type, and Rainfall in North Konawe Regency**

Bowo Eko Cahyono, Ervina Ikke Septiyas Putri, Agung Tjahjo Nugroho

93-100

- [PDF](#)
- **The Profile of Reproductive Hormones of Nypa Palm Worm *Namalycastis rhodochorde* (Polychaeta: Neriedidae)**

Junardi Junardi, Tri Rima Setyawati, Ari Hepi Yanti

101-106

- [PDF](#)
- **Optimized Purification of CIDR $\alpha$ -PfEMP1 *Plasmodium falciparum* Recombinant Protein with Affinity Chromatography**

Eqiel Navadz Akthar Alami, Erma Sulistyaningsih, Irawan Fajar Kusuma, Sheilla Rachmania

107-112

- [PDF](#)
- **The 32 kDa Outer Membrane Proteins of *Klebsiella pneumoniae* Acts as A Bacterial Adhesin**

Dini Agustina, M. Ali Shodikin, Bima Setia Sandya Nugraha, Diana Chusna Mufida, Enny Suswati, Bagus Hermansyah

113-120

- [PDF](#)
- **Antioxidant of Effervescent Tablet Formulated from Combination of Secang Wood and Red Ginger Extracts**

Titik Mardiyanti Sofyah, Tukiran Tukiran, Suyatno Sutoyo

121-126

- [PDF](#)
- **The Binding Prediction of 6-Paradol and its Derivatives on TRPV1 Agonist as a New Compound for Treating Painful Diabetic Neuropathy**

Finas Rahmayanti, Dwi Koko Pratoko, Fifteen Aprila Fajrin

127-132

- [PDF](#)
- **Biological Aspects of Three Species Family Gobiidae in the Bilah River, Labuhanbatu Regency, Sumatera Utara Province**

Khairul Khairul, Ika Nazira Lubis

133-138

- [PDF](#)
- **Production of The Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* using Starch Rich Substrate and Its Infectivity against *Tribolium castaneum***

Lutfi Afifah, Dhiya Mutsa Afifah, Tatang Surjana, Anik Kurniati, Rosalia Maryana

139-148

- [PDF](#)

## Optimasi Purifikasi Protein Rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1 *Plasmodium falciparum* dengan Kromatografi Afinitas

### *Optimized Purification of CIDR $\alpha$ -PfEMP1 Plasmodium falciparum Recombinant Protein with Affinity Chromatography*

Eqiel Navadz Akthar Alami<sup>1</sup>, Erma Sulistyaningsih<sup>1,2\*</sup>, Irawan Fajar Kusuma<sup>1</sup>,  
Sheilla Rachmania<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

<sup>2</sup>Center for Excellence of Agromedicine (CEAMED), Universitas Jember

\*E-mail: sulistyaningsih.fk@unej.ac.id

#### ABSTRACT

Interaction of Cysteine-rich Interdomain Region (CIDR) $\alpha$ -*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein (PfEMP1) and Endothelial Cell Receptors especially CD36 on host cells is main malaria pathogenesis, makes this domain as a malaria vaccine candidate. Recently, the development of the malaria vaccine is conducted by recombinant technology, and the purification of the CIDR $\alpha$ -PfEMP1 recombinant protein is a pivotal step. This study aimed to determine an optimal condition to purify the CIDR $\alpha$ -PfEMP1 recombinant protein by affinity chromatography through imidazole and NaCl concentration. The purified recombinant protein was visualized using SDS-PAGE and its concentration was measured using Image J software and Bradford Assay. The data were analyzed using SPSS 26 software, and the Paired T-Test analysis was conducted to compare the concentration of purified recombinant protein from two different methods. The result showed that the target band of purified recombinant protein was 27 kDa. The thickest target protein band was observed in purified recombinant protein using 140 mM imidazole and 300 mM NaCl. The recombinant protein concentration using Image J software was 0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , while the Bradford Assay was 0.56  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . The Paired T-Test analysis has a significance value of 0.010 ( $p < 0.05$ ), meaning there was a significant difference between the concentration measurement using Image J software and Bradford Assay. In conclusion, the optimized condition to purify the CIDR $\alpha$ -PfEMP1 recombinant protein by affinity chromatography was using 140 mM imidazole and 300 mM NaCl. It is suggested to measure the purified CIDR $\alpha$ -PfEMP1 recombinant protein concentration using the Bradford Assay method due to its convenience and sensitivity.

**Keywords:** Purification, affinity chromatography, CIDR $\alpha$ , PfEMP1.

#### PENDAHULUAN

Malaria merupakan sebuah penyakit endemis dengan prevalensi cukup tinggi. Total kasus malaria pada tahun 2018 adalah 228 juta kasus, dengan kematian sejumlah 405 ribu jiwa yang tersebar di seluruh dunia (World Health Organization, 2019). Prevalensi malaria di Indonesia berdasarkan diagnosis positif malaria melalui pemeriksaan darah mencapai total 1.017.290 kasus pada tahun yang sama (Riskesdas, 2018). Pengembangan vaksin malaria merupakan salah satu strategi untuk memberantas penyakit malaria. Pendekatan biomolekular dilakukan untuk mengidentifikasi protein-protein imunogenik yang dapat dijadikan kandidat vaksin malaria (Sulistyaningsih *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2019). Protein imunogenik merupakan protein yang dapat menginduksi antibodi pada tubuh (Dewi *et al.*, 2018).

Salah satu protein imunogenik kandidat vaksin malaria adalah *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1). Protein ini merupakan mediator yang dapat berikatan dengan berbagai reseptor sel hospes, terutama *Endothelial Cell Receptors* (ECRs) dan mengakibatkan sitoadherens, penyebab utama patogenesis malaria (Lubiana *et al.*, 2020). Domain utama dari PfEMP1 adalah *Duffy Binding-Like* (DBL), terdiri dari empat tipe utama ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , dan  $\delta$ ) dan *Cysteine-rich Interdomain Region* (CIDR), terdiri atas tiga tipe utama ( $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\gamma$ ). Eritrosit yang terinfeksi oleh *P. falciparum* dapat mengikat reseptor CD36 sel hospes, ketika domain PfEMP1 yang terlibat dalam pengikatannya adalah domain CIDR $\alpha$  (Smith, 2014).

Domain CIDR $\alpha$  dari PfEMP1 memperantarai pengikatan beberapa reseptor hospes, antara lain *Cluster of Differentiation 36* (CD36), CD31, dan *Chondroitin sulfate A*



(CSA) yang berperan dalam proses sitoadherens. Penelitian sebelumnya melaporkan protein CIDR $\alpha$  terdiri atas 174 asam amino dan berukuran sebesar 27 kDa. CIDR $\alpha$ -PfEMP1 menjadi salah satu protein kandidat vaksin malaria karena diduga memiliki kemampuan penginduksi antibodi dan epitop sel B (Dewi *et al.*, 2018; Sulistyanyingsih *et al.*, 2021).

Pendekatan teknologi rekombinan banyak digunakan untuk mendapatkan protein imunogenik. Tahapan penting yang harus dilakukan antara lain produksi dan purifikasi protein rekombinan untuk mendapatkan protein rekombinan berkualitas tinggi. Kromatografi afinitas adalah metode yang paling banyak digunakan, karena menawarkan selektivitas tinggi, resolusi tinggi, dan menghasilkan protein kapasitas tinggi. Metode ini menggunakan beberapa *buffer* untuk membantu proses pemurniannya, seperti NaCl dan imidazol. NaCl berfungsi sebagai dapar pengikat protein untuk menghindarkan protein dari kontaminan, sedangkan imidazol sebagai dapar pemisah antara ikatan ligan dan protein, sehingga protein dapat dihasilkan sesuai dengan harapan (IBA Lifesciences, 2012; Puspitaningrum *et al.*, 2018).

Penelitian sebelumnya telah membahas peran imidazol dan NaCl dalam proses purifikasi protein (Oliveira & Domingues, 2018; Putri *et al.*, 2015; Simaremare *et al.*, 2015). Penelitian terkait optimasi *buffer* purifikasi maupun metode pengukuran konsentrasi protein rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1 belum pernah dilakukan, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mencari kondisi optimum konsentrasi NaCl dan imidazol dalam proses purifikasi protein rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1 dengan metode kromatografi afinitas, serta mengukur konsentrasi protein rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1 menggunakan metode *Bradford Assay* dan software Image J untuk membandingkan keduanya. Metode *Bradford Assay* dipilih karena memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi untuk menugukur protein secara kuantitatif, sedangkan software Image J digunakan karena merupakan *domain public* yang mudah digunakan, memungkinkan memproses gambar dari berbagai media, dan dapat menganalisis penghitungan gambar, segmentasi, pengukuran fitur spasial dari elemen biologis dan penelitian biomolekuler yang sangat penting untuk penelitian. Kedua metode ini juga relatif mudah digunakan

dibanding metode lainnya (Ernst & Zor 2010; Ferreira & Rasband 2012; Reinking 2007).

## METODE

### *Ethical Clearance*

Penelitian ini telah mendapat ijin kelayakan etik oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember dengan No 1.467/H25.1.11/KE/2021.

### **Purifikasi Protein Rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1 dengan Kromatografi Afinitas**

Purifikasi dengan kromatografi afinitas dilakukan sesuai metode dari *kit* resin Ni-NTA QIAGEN *expressionist* (Qiagen, 2003). Penelitian ini menggunakan variasi konsentrasi *buffer* purifikasi, yaitu NaCl dan imidazole. Konsentrasi NaCl yang digunakan mengacu pada penelitian sebelumnya adalah 300 mM, 600 mM, 900 mM, dan 1000 mM. Konsentrasi imidazol yang digunakan sebagai *buffer lysis* adalah 5 mM, sedangkan sebagai *buffer washing* adalah 10 mM, 20 mM, dan 40 mM. Imidazol yang digunakan sebagai *elution buffer* adalah 60 mM, 80 mM, 100 mM, 120 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 180 mM, serta 200 mM (Dewi *et al.*, 2018). Lisat protein rekombinan yang digunakan sebanyak 4 mL, untuk kemudian dicampurkan dengan resin. Campuran ini kemudian dimasukkan ke *orbital shaker* dan diinkubasi selama satu jam. Pencucian kolom purifikasi berisi campuran dilakukan setelah inkubasi satu jam dan dilakukan secara bertingkat (Rachmania *et al.*, 2021).

### **Visualisasi hasil purifikasi dengan metode Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

Protein hasil purifikasi dianalisis menggunakan SDS PAGE. Protein didenaturasi melalui proses pemanasan menggunakan *dry heat block*. Sebanyak 50  $\mu$ L sampel protein ditambahkan *buffer* sampel dengan volume 50  $\mu$ L. Sampel protein yang telah tercampur, dipanaskan menggunakan *dry heat block* selama 5 menit. Konsentrasi *gel* yang digunakan untuk *upper gel* adalah 4,5%, sedangkan *lower gel* adalah 15%. Sebanyak 10  $\mu$ L dimasukkan ke dalam kolom *gel*. *Running buffer* dituang ke *chamber*. *Gel* dijalankan dengan voltase 50 V selama 1 jam untuk *upper gel* dan 80 V selama 3 jam untuk *lower gel*. Pewarnaan menggunakan *Commasie Brilliant Blue* (CBB) diberikan pada *gel* untuk memudahkan visualisasi (Sawitri *et al.*, 2016).

### **Analisis Software Image J**

Analisis menggunakan metode Software Image J didahului dengan membuat kurva standar. Kurva ini didapat dari analisis densitometri dari *running protein Bovine Serum Albumin* (BSA). Analisis semi kuantitatif ini dilakukan dengan menilai densitas dari protein sampel, untuk kemudian dimasukkan dalam kurva standar BSA. Konsentrasi protein target didapat dari nilai akhir rumus persamaan linear.

### **Analisis Bradford Assay**

Kurva standar terlebih dahulu dibuat dengan menilai

absorbansi campuran BSA dan reagen *Bradford Assay*. Sampel protein hasil purifikasi diambil 5  $\mu$ L untuk dicampurkan dengan larutan reagen *Bradford Assay* sebanyak 995  $\mu$ L ke dalam *microtube*. Campuran ini diinkubasi selama 10 menit. Analisis absorbansi dari larutan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm.

#### Analisis Statistik

Data dianalisis menggunakan uji *Paired T-Test* dengan SPSS untuk menguji perbedaan hasil analisis konsentrasi protein antara dua metode.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

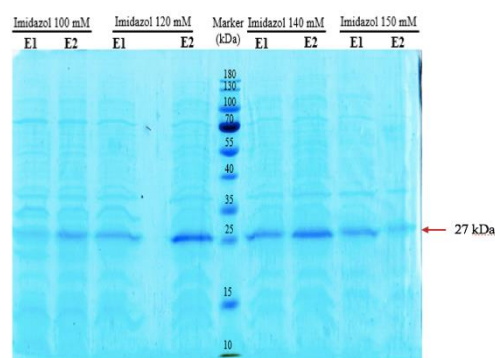
### Hasil Analisis SDS PAGE

Analisis SDS PAGE pada penelitian ini menunjukkan *band* protein target cukup tebal pada posisi 27 kDa. *Band* paling tebal dan bersih ditemukan pada protein hasil purifikasi menggunakan 300 mM NaCl serta 140 mM imidazole atau elusi kelima tahap dua (Gambar 1). *Band* yang tervisualisasi sesuai dengan ukuran target protein rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1 yaitu sebesar 27 kDa (Dewi *et al.*, 2018; Sulistyansih *et al.*, 2021).

Hasil ini relevan dengan referensi lain tentang konsentrasi imidazole yang direkomendasikan untuk purifikasi berkisar antara 10-20 mM sebagai buffer lysis dengan pengurangan 1-5 mM untuk hasil optimal, 10-50 mM sebagai buffer purifikasi untuk proses washing, sedangkan untuk proses elusi untuk mendapatkan protein target sesuai harapan bisa diberikan konsentrasi lebih tinggi yaitu >100 mM. Untuk konsentrasi NaCl yang digunakan juga sesuai dengan referensi dimana minimal penggunaan NaCl adalah sebanyak 300 mM dan dapat ditingkatkan sebanyak 2 M (Qiagen, 2003).

Analisis protein hasil purifikasi yang murni dapat ditunjukkan dengan menggunakan metode kuantifikasi seperti *Bradford Assay* dan software Image J. Sementara itu, kegunaan dari elektroforesis SDS PAGE adalah dapat memberikan gambaran atau visualisasi tentang ukuran protein target, kemungkinan terdapat protein pengotor lainnya. Semakin banyak protein pengotor, maka visualisasi tersebut menunjukkan kualitas purifikasi yang kurang baik. Sementara itu, kualitas hasil purifikasi yang baik ditunjukkan dengan visualisasi pita protein tunggal atau *single band* yang tebal dan minim kontaminan. Pada penelitian ini protein rekombinan yang terpurifikasi berukuran 27 kDa tampak sebagai *band* dengan tingkat ketebalan paling menonjol diantara *band-band*

yang lain. *Band* protein kontaminan atau pengotor tampak lebih tipis daripada *band* target sebesar 27 kDa. Protein kontaminan ini dapat muncul dikarenakan beberapa kemungkinan, diantaranya ko-purifikasi protein dari bakteri *E. coli* yang mengandung *his-tagged* protein rekombinan. Problem ini umum terjadi pada protein purifikasi, terutama apabila tingkat ekspresi protein rekombinan rendah. Kontaminan ini mengandung banyak residu histidin dan molekul pendamping yang dapat mengikat resin atau protein rekombinan secara langsung. Resin juga memiliki kapasitas afinitas yang terbatas, sehingga memungkinkan berikatan dengan kontaminan (Gräslund *et al.*, 2008).



Gambar 1. Visualisasi protein rekombinan terpurifikasi pada SDS-PAGE. Gambaran penebalan sebuah *band* berukuran 27 kDa pada beberapa konsentrasi imidazole. E1: elusi tahap 1, E2: elusi tahap 2.

### Analisis Konsentrasi Protein Rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1 menggunakan Metode Software Image J

Hasil analisis konsentrasi protein rekombinan menggunakan metode software Image J menunjukkan nilai variatif. Nilai ini diperoleh dari analisis konsentrasi sampel protein yang telah dipilih berdasarkan kualitas *band* terbaik. Terdapat empat sampel yang dianalisis. Empat sampel ini mewakili dari empat jenis purifikasi yang dilakukan. Sampel protein yang dipilih adalah sampel dengan perlakuan 300 mM NaCl dan 140 mM imidazol, 600 mM NaCl dan 140 mM imidazol, 900 mM NaCl dan 140 mM imidazol, dan 1000 mM NaCl dan 140 mM imidazol.

Nilai konsentrasi protein tertinggi didapat dari sampel protein dengan perlakuan 300 mM

NaCl dan 140 mM imidazol, dengan konsentrasi 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Tabel 1). Nilai konsentrasi protein ini didapatkan dari profil *band* target yang direpresentasikan menjadi rata-rata nilai skala abu-abu atau densitas optik. Perhitungan dari kepadatan optik ini menggunakan salinan 8-bit dari 16-bit gambar asli. Densitas optik dikalibrasi menggunakan standar protein BSA. Densitas optik digunakan juga sebagai korelasi antara protein sampel yang dianalisis dan protein standar, sehingga ditemukan nilai *mean* dari keduanya. Nilai *mean* inilah yang dimasukkan ke dalam rumus persamaan linear untuk mendapatkan nilai konsentrasi protein sampel. Hasil konsentrasi protein pada metode ini akan sangat bergantung dari kondisi gambaran *gel* SDS PAGE, terutama gambaran protein standar dan kualitas latar belakang dari *gel* hasil SDS PAGE yang akan mempengaruhi kualitas densitas optik. Penelitian lainnya menyebutkan keuntungan metode ini adalah dapat menggunakan *marker* protein untuk kuantifikasi protein dalam *gel* SDS PAGE tanpa protein standar. Hal ini dikarenakan sifat *marker* yang dapat berperan sebagai protein standar jika melakukan analisis protein menggunakan software Image J (María *et al.*, 2020).

Tabel 1. Hasil analisis konsentrasi protein rekombinan menggunakan Software Image J

No.	Konsentrasi Imidazol (mM)	Konsentrasi NaCl (mM)	Konsentrasi Protein ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
1	140	300	0,025
2	140	600	0,022
3	140	900	0,018
4	140	1000	0,007

#### Analisis Konsentrasi Protein Rekombinan CIDR- $\alpha$ PfEMP1 menggunakan Metode Bradford Assay

Analisis *Bradford Assay* juga dilakukan pada empat sampel terbaik. Nilai konsentrasi protein tertinggi didapat dari sampel protein dengan perlakuan 300 mM NaCl dan 140 mM imidazol, dengan konsentrasi 0,56  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Tabel 2). Analisis ini menggunakan prinsip absorbansi cahaya dari perubahan cahaya berwarna kebiruan yang mengindikasikan protein telah berikatan dengan *dye Coomassie Blue G250* pada kondisi asam.

Metode ini sangat mudah digunakan dengan sensitivitas cukup tinggi. Semakin warna larutan menjadi biru, nilai absorbansi larutan semakin tinggi, yang menandakan tingkat

konsentrasi protein yang tinggi pula. Prinsip analisis ini sangat berkaitan dengan keterikatan protein, seperti residu arginine dan lysine yang mengakibatkan adanya ikatan ionik. Adanya pola ikatan arginine dan lysine yang jauh lebih mudah dengan *dye Coomassie Blue G250* ini sebenarnya menjadi salah satu kerugian pada analisis konsentrasi protein menggunakan metode *Bradford Assay*, dikarenakan preferensi ikatan *dye* dengan asam amino lainnya dapat menimbulkan respon variatif dari proses pengujian pada protein yang berbeda (Walker, 2002). Pada referensi lain disebutkan bahwa permukaan molekul terbuka seperti domain PfEMP1 bermuatan positif dikarenakan berlimpahnya residu arginine dan lysine pada sekuennya (Flick *et al.*, 2004). Komposisi sampel sangat penting hubungannya dengan pemilihan uji protein. Protein dengan kandungan residu arginin yang banyak akan menghasilkan hasil yang baik atau tinggi secara artifisial jika menggunakan Uji *Bradford Assay*. Uji protein lainnya juga demikian, akan memiliki keuntungan lainnya jika digunakan pada sampel yang sesuai, misalnya uji Lowry atau *BCA Assay* akan lebih baik jika digunakan pada sampel dengan campuran kompleks protein (Olson & Markwell, 2007).

Tabel 2. Hasil analisis konsentrasi protein rekombinan menggunakan *Bradford Assay*

No.	Konsentrasi Imidazol (mM)	Konsentrasi NaCl (mM)	Konsentrasi Protein ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
1	140	300	0,56
2	140	600	0,54
3	140	900	0,48
4	140	1000	0,225

Hasil pengukuran konsentrasi protein menggunakan dua metode pengukuran, yaitu Software Image J dan *Bradford Assay* pada penelitian ini menunjukkan hasil yang berbeda. Hal ini terjadi karena fungsi dan cara pengukuran kedua metode analisis berbeda. Software Image J menganalisis *band* protein target secara spesifik, sedangkan *Bradford Assay* menganalisis kandungan utuh protein rekombinan hasil elusi. Kondisi ini membuat adanya perbedaan signifikan pada hasil analisis keduanya, hasil pengukuran Software Image J akan mempunyai nilai yang lebih kecil dibandingkan dengan hasil pengukuran *Bradford Assay*, sesuai dengan hasil penelitian ini. Perbedaan ini dapat diminimalkan bila

metode purifikasi yang dipilih sangat spesifik untuk dapat memisahkan semaksimal mungkin protein kontaminan dari protein target, sehingga saat diukur menggunakan metode *Bradford Assay* hanya akan mengukur protein target saja. Perbedaan ini juga membuat kedua metode analisis ini tidak dapat disejajarkan.

#### Hasil Uji Paired T-Test

Uji *Paired T-Test* antara konsentrasi protein dari metode software Image J dan *Bradford Assay* menunjukkan nilai  $p = 0,01$  ( $p < 0,05$ ), yang berarti terdapat perbedaan rerata dari nilai konsentrasi protein hasil pengukuran menggunakan software Image J dan metode *Bradford Assay* (Dahlan, 2014). Perbedaan ini disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya adalah perbedaan prinsip metode analisis dari keduanya. Software Image J menggunakan prinsip densitometri dengan menganalisis kerapatan gambaran 8-bit (*binary*) dari protein terget dalam *gel* hasil SDS PAGE. Hasil analisis konsentrasi protein sangat tergantung kondisi *gel* SDS PAGE, terutama gambaran *band* protein dan kualitas latar belakang *gel* yang mempengaruhi kualitas densitas optik. Kondisi ini membuat uji software Image J memiliki subjektivitas tinggi (María *et al.*, 2020). Uji *Bradford Assay* mempunyai prinsip absorbansi cahaya. Perubahan cahaya berwarna kebiruan mengindikasikan sampel protein telah berikatan dengan *dye Coomassie Blue G250* dalam kondisi asam. Prinsip ini memungkinkan sensitivitas metode ini cukup tinggi (Walker, 2002).

#### Implikasi Penelitian

Hasil penelitian ini dapat menjadi rujukan kondisi optimum konsentrasi NaCl dan imidazole untuk purifikasi protein rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1. Selanjutnya protein rekombinan terpurifikasi dapat digunakan untuk tahapan lanjut pengujian protein imunogenik kandidat vaksin malaria, misalnya uji imunogenitas, uji toksisitas maupun penentuan respon dosis terbaik pada hewan coba, sehingga mendukung tujuan pengembangan vaksin malaria.

#### KESIMPULAN

Protein rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1 berhasil dipurifikasi dengan ditunjukkan dari hasil SDS PAGE terbentuk pita tebal dengan berat molekul 27 kDa. Kondisi optimum untuk purifikasi protein rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1 adalah konsentrasi imidazol 140 mM dengan

konsentrasi NaCl sebesar 300 mM. Terdapat perbedaan yang signifikan antara rerata konsentrasi protein rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1 yang diukur dengan *software Image J* dan *Bradford Assay* dimana metode yang lebih direkomendasikan untuk mengukur konsentrasi hasil purifikasi protein rekombinan CIDR $\alpha$ -PfEMP1 adalah metode *Bradford Assay* karena aspek kemudahan dan sensitivitas.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Dahlan SM. 2014. *Statistik untuk Kedokteran dan kesehatan: Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat*. (W. Kurniawan (ed.). 6<sup>th</sup> ed., Issue 1). Salemba Medika.
- Dewi R, Ratnadewi AAI, Sawitri WD, Rachmania S & Sulistyaningsih E. 2018. Cloning, Sequence Analysis, and Expression of CIDR1 $\alpha$ -pfEMP1 from Indonesian *Plasmodium falciparum* isolate. *Current Topics in Peptide and Protein Research*. **19**:95-104.
- Ernst O & Zor T. 2010. Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments*. **38**:1-6.
- Ferreira T & Rasband W. 2012. Image J User Guide User Guide ImageJ. *Image J User Guide*, 1.46r.
- Flick K, Ahuja S, Chene A, Bejarano MT & Chen Q. 2004. Optimized Expression of *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 Domains in *Escherichia coli*. *Malaria Journal*. **3**(50):1-8.
- Gräslund S, Nordlund P & Weigelt J. 2008. Protein Production and Purification. *Nature Methods*. **5**(2):135-146.
- IBA Lifesciences. 2012. Expression and Purification of Proteins Using 6x Histidine - tag A Comprehensive Manual. In *IBA Solutions For Life Sciences* (Issue October). IBA Headquarters.
- Lubiana P, Bouws P, Roth LK, Dörpinghaus M, Rehn T, Brehmer J, Wichers JS, Bachmann A., Höhn K, Roeder T, Thye T, Gutschmann T, Burmester T, Bruchhaus I & Metwally NG. 2020. Adhesion Between *P. falciparum* Infected Erythrocytes and Human Endothelial Receptors Follows Alternative Binding Dynamics under Flow and Febrile Conditions. *Scientific Reports*. **10**(1):1-14.
- Oliveira C & Domingues L. 2018. Guidelines to Reach High-quality Purified Recombinant Proteins. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*. **102**(1): 81-92.
- Olson BJSC & Markwell J. 2007. Assays for Determination of Protein Concentration. in *Current Protocols in Protein Science* (pp. 1-29). John Wiley & Sons Inc.
- Puspitaningrum R, Adhiyanti C & Solihin. 2018. *Genetika Molekuler dan Aplikasinya* (S. Attas (ed.)). Deepublish.
- Putri M, Munadzirah E & Soebagio. 2015. Purifikasi Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Membran Amnion Rekombinan sebagai Kandidat Biomaterial Menggunakan Kromatografi Afinitas. *Jurnal PDGI*. **64**(1): 11-16.
- Qiagen. 2003. The QIA Expressionist - Fifth Edition. In *Qiagen GmbH, Düsseldorf, Germany* (Issue June).
- Reinking L. 2007. ImageJ Basics. *Word Journal of The International Linguistic Association*. 1-22.
- Riskesdas K. 2018. Hasil Utama Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS). *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*. **44**(8):1-200.
- Sawitri WD, Narita H, Ishizaka-Ikeda E, Sugiharto B, Hase T & Nakagawa A. 2016. Purification and Characterization of Recombinant Sugarcane Sucrose Phosphate Synthase Expressed in *E. Coli* and Insect Sf9 cells: An Importance of the N-Terminal Domain for An Allosteric Regulatory property. *Journal of Biochemistry*. **159**(6): 599-607.
- Simaremare APR, Bela B, Yasmon A & Ibrahim F. 2015. Optimizations of Expression and Purification of Recombinant HIV-1 CRF01\_AE p24 Protein in *Escherichia coli* for Development of Immunodiagnostic Assay. *Medical Journal of Indonesia*. **24**(1):14-18.
- Smith JD. 2014. The Role of PfEMP1 Adhesion Domain Classification in *Plasmodium falciparum* Pathogenesis Research. *Mol Biochem Parasitol*. **195**(2): 82-87.
- Sulistyaningsih E, Armiyanti Y & Dewi R. 2021. The Cidr1 $\alpha$ -Pfemp1 Sequence From Indonesian *Plasmodium falciparum* and Its Potential Association with The Cerebral Outcome. *MNJ (Malang Neurology Journal)*. **7**(1):34-39.
- Sulistyaningsih E, Fitri LE, Löscher T & Berens-Riha N. 2013. Diversity of The Var Gene Family of Indonesian *Plasmodium falciparum* Isolates. *Malaria Journal*. **12**(1): 1-13.
- Walker JM. 2002. *The Protein Protocols Handbook-Second Edition*. Humana Press Inc.
- World Health Organization. 2019. World malaria report 2019. In *WHO Regional Office for Africa*. World Health Organization.
- Zhang CL, Zhou HN, Liu Q & Yang YM. 2019. Genetic Polymorphism of Merozoite Surface Proteins 1 And 2 of *Plasmodium Falciparum* in The China-Myanmar Border Region. *Malaria Journal*. **18**(1):1-10.