



**SINTESIS DAN PURIFIKASI PROTEIN REKOMBINAN KAPSID
*SUGARCANE MOSAIC VIRUS (SCMV)***

SKRIPSI

Oleh

**KIKY MEY PUTRANTY
NIM 121810401041**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**SINTESIS DAN PURIFIKASI PROTEIN REKOMBINAN KAPSID
*SUGARCANE MOSAIC VIRUS (SCMV)***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi Strata 1 (S1) Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pegetahuan Alam Universitas Jember

Oleh

**KIKY MEY PUTRANTY
NIM 121810401041**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, karya tulis ilmiah ini saya persembahkan untuk:

1. Ibu Wiwik Puji Purnami dan Bapak Sutiono tercinta, yang telah memberikan segala kasih sayang dan doa yang terus mengalir;
2. Saudariku Luluk Lady Laily, terimakasih untuk waktu yang telah kami lewati bersama;
3. Kakek dan nenek, Alm. Salikoen, Almh. Pi'arah, Midjan dan Saimah, yang telah memberikan kenangan indah dan nasehat yang berharga;
4. Seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, dukungan dan semangat untuk menuntut ilmu;
5. Semua guru-guru yang telah mendidik dan memberikan ilmunya;
6. Almamater Universitas Jember.

“Man Jadda Wa Jada” yang artinya, siapa yang bersungguh sungguh,
maka dia akan berhasil

“Laa tai’asuu mirrowhillah” yang artinya, jangan kamu
berputus asa dari rahmat Allah

(Qs. Yusuf (12): 87)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Kiky Mey Putranty

NIM : 121810401041

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul: **“Sintesis dan Purifikasi Protein Rekombinan Kapsid *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV)”** adalah benar-benar karya sendiri yang merupakan sub tema dari penelitian Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc yang berjudul **“Inovasi Benih Unggul Tebu Bebas dan Tahan *Sugarcane Mosaic Virus* Melalui Penerapan Teknologi *Pathogen Derived Resistance*”** yang dibiayai oleh Sistem Inovasi Nasional (SINas) Ristek tahun 2014-2016, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 13 Maret 2017

Yang menyatakan,

Kiky Mey Putranty
NIM 121810401041

SKRIPSI

**SINTESIS DAN PURIFIKASI PROTEIN REKOMBINAN KAPSID
SUGARCANE MOSAIC VIRUS (SCMV)**

Oleh:

**KIKY MEY PUTRANTY
NIM 121810401041**

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr. Sc

Dosen Pembimbing Anggota : Hardian Susilo Addy.,SP., MP., Ph.D

PENGESAHAN

Karya tulis ilmiah berjudul “**Sintesis dan Purifikasi Protein Rekombinan Kapsid *Sugarcane Mosaic Virus (SCMV)***” telah diuji dan disahkan oleh Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Senin, 13 Maret 2017

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Prof. Dr.Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc.
NIP. 19551022 198212 1 001

Dosen Penguji I,

Dr. Rike Oktarianti, M.Si.
NIP. 19631026 199002 2 001

Dosen Pembimbing Anggota,

Hardian Susilo Addy, SP., MP., Ph.D.
NIP. 19801109 200501 1 001

Dosen Penguji II,

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.
NIP. 19600816 198902 1 001

Mengesahkan,

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D.
19610204 198711 1 001

RINGKASAN

Sintesis dan Purifikasi Protein Rekombinan Kapsid *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) Kiky Mey Putranty, 121810401041; 2017: 43 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) merupakan virus penyebab penyakit mosaik pada tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.). Virus SCMV dapat menurunkan produktivitas tanaman tebu sebesar 0.5-45% tergantung dari ketahanan varietas tanaman, galur (strain) virus yang menyerang, iklim dan populasi serangga vektor. Oleh sebab itu, diperlukan penanganan yang serius dalam upaya pengendalian penyebaran SCMV. Metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi virus SCMV yaitu melalui uji serologi. Dalam uji serologi diperlukan antigen yang dapat digunakan untuk membentuk antibodi. Antigen diproduksi dengan menggunakan metode protein rekombinan.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan produksi dan purifikasi protein rekombinan kapsid SCMV yang digunakan sebagai antigen untuk memperoleh antibodi yang digunakan dalam uji serologi untuk mendeteksi virus SCMV. Gen yang digunakan dalam produksi protein rekombinan adalah cDNA protein kapsid SCMV. cDNA protein kapsid SCMV disubkloning dalam plasmid pET28a(+) yang kemudian dinamakan pET28a(+)-protein kapsid SCMV. Plasmid pET28a(+)-protein kapsid SCMV ditransformasikan dalam sel *Escherichia coli* strain BL21. Hasil SDS-PAGE pada protein yang diekstraksi dari *E. coli* strain BL21 yang memiliki cDNA protein kapsid SCMV menunjukkan protein kapsid SCMV dapat diekspresikan dalam bentuk inclusion body dengan ukuran ± 40 kDa. Ekspresi protein rekombinan tersebut tidak dipengaruhi adanya penambahan inducer IPTG.

Purifikasi protein rekombinan dilakukan dengan menggunakan kolom afinitas kromatografi resin Ni-NTA dan elektroelusi. Protein rekombinan yang kedua ujungnya telah berfusi dengan 6x histidin tag akan berikatan dengan nikel yang terdapat pada resin sehingga akan dapat dipisahkan protein kapsid SCMV

dengan protein lain yang diekstraksi dalam *E. coli*. Purifikasi yang kedua dilakukan dengan elektroelusi. Metode ini dilakukan dengan memotong gel SDS yang mengandung protein target kemudian mengeluarkan protein tersebut dari gel menggunakan arus listrik. Protein yang telah diperoleh, diukur konsentrasinya dengan metode Lowry. Konsentrasi protein yang diperoleh 15 mg/ml dengan volume total 6 ml.



PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah yang berjudul “Sintesis dan Purifikasi Protein Rekombinan Kapsid *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV)” dengan baik. Karya tulis ilmiah ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penyusunan karya tulis ilmiah ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Ibu Wiwik Puji Purnami dan Bapak Sutiono atas do’a, dukungan, motivasi, perhatian dan kasih sayang tiada henti sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S1;
2. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr. Sc selaku dosen pembimbing utama dan Hardian Susilo Addy Ph. D selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, dan saran dalam penulisan karya tulis ilmiah ini;
3. Dr. Rike Oktarianti M. Si. dan Drs. Rudju Winarsa M. Kes. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan karya tulis ilmiah ini;
4. Drs. Siswanto M. Si. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan S1;
5. Keluarga besar CDAST Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Tanaman : Purnama Okviandari, S.P, M.P., Arsetyo Rahardianto, S.Si., Ken Melati dan rekan-rekan kerja: Novita Niswatun Azizah, Suvia Wisyaningrum, Wilujeng Rahayu, Weni Nailul Hidayati, Safira Arikha, Suwinda Febriani, Arie Rahmawati, Tisa Rena Bertina, Wahyu Cipta Yuliasari, Febrian Eka Shandy, Reza Anugerah, Cahya Anugerah, Amir Muayyad, Diqita Naviri Fauzya, Guruh Surastomo, Ridwan Akbar. Serta kakak-kakak senior: Retna Hermawati, Retnosari Apriasti, Wulan

Nursyiam Ningtyas, Intan Ria Neliana, Firdha Narulita Alfian, Fragaria Vesca Paradisa, Nurul Mufithah, Wardatus Sholehah, Ratna Dwi, Mahbubatie Rohmah, Chusnul Khotimah, Ibu Inyana Agustien, Risky Maulana serta adik adik: Siti Nurul Afidah, Lutfiana Risky, M. Rosyadi Adnan, M. Sholehuddin, Angga, Gerda, Ifa, Erna, Muhammad Yusuf yang telah memberikan keceriaan dan semangat selama penulis menyelesaikan tugas akhir;

6. Teman-teman Shohibul Masjid (Lailatul Ikhrimah, Ika Wahyuni, Nenny Aulia Rochman, Lisa Hikmawati, Muslimatin, Suvia Widyaningrum dan Noer Imamah) serta teman-teman Biologi *Oryza sativa* (Biozva) 2012 yang selalu memberikan keceriaan kepada penulis selama menempuh pendidikan S1.
7. Galih Pradananta yang selalu menginspirasi dan memberikan motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan penyusunan karya tulis ilmiah ini.
8. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala saran dan kritik dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan karya tulis ilmiah ini. Akhir kata penulis berharap semoga karya tulis ilmiah ini dapat memberikan manfaat

Jember, 13 Maret 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 <i>Sugarcane Mosaic Virus</i> (SCMV).....	4
2.1.1 Struktur <i>Sugarcane Mosaic Virus</i> (SCMV).....	4
2.1.2 Struktur dan Fungsi Protein Kapsid (<i>Coat Protein</i>).....	5
2.1.3 Gejala dan Penularan SCMV	5
2.1.4 Deteksi SCMV	7
2.2 Produksi Protein Rekombinan.....	8
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> BL21.....	8
2.2.2 Plasmid pET28a	9
2.2.3 Mekanisme Induksi Menggunakan IPTG	11
2.3 Purifikasi Protein Rekombinan	12
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	14
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	14
3.2 Bahan Penelitian.....	14

3.3	Prosedur Penelitian Ekspresi Protein.....	14
3.3.1	Transformasi Plasmid pET28a(+)-Protein Kapsid SCMV ke <i>Escherichia coli</i> strain BL21	14
3.3.2	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) Koloni.....	14
3.3.3	Ekspresi Protein Rekombinan Kapsid SCMV pada Sel Bakteri <i>E. coli</i> strain BL21	15
3.3.4	Ekstraksi Protein Rekombinan Kapsid SCMV	15
3.3.5	Analisis SDS-PAGE (<i>Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>).....	16
3.4	Prosedur Penelitian Produksi dan Purifikasi Protein.....	16
3.4.1	Produksi dan Protein Kapsid Rekombinan SCMV pada Sel Bakteri <i>E. coli</i> strain BL21	16
3.4.2	Purifikasi Protein Menggunakan Kolom Afinitas Kromatografi Resin Ni-NTA.....	17
3.4.3	Elektroelusi protein	17
3.4.4	Dialisis	18
3.3.5	Penentuan Kandungan Protein Terlarut.	18
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19
4.1	Transformasi Plasmid pET28a(+)-Protein Kapsid SCMV ke dalam Sel <i>E. coli</i> Strain BL21	19
4.2	Ekspresi Protein Kapsid Rekombinan SCMV Menggunakan Sel Bakteri <i>E. coli</i> strain BL21	20
4.3	Purifikasi Protein Rekombinan Kapsid SCMV	22
BAB 5.	PENUTUP.....	25
5.1	Kesimpulan	25
5.2	Saran.....	25
DAFTAR PUSTAKA.....		34

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi partikel potyvirus	4
Gambar 2.2 Daun tanaman tebu yang menunjukkan gejala mosaik akibat infeksi virus SCMV	6
Gambar 2.3 Peta plasmid pET28a(+)	10
Gambar 2.4 Peta plasmid pET28a(+)-Protein Kapsid SCMV	11
Gambar 2.5 Skema mekanisme induksi protein rekombinan dengan IPTG	12
Gambar 2.6 Ilustrasi proses Pemurnian Protein dengan Kolom Kromatografi Resin Ni-NTA.....	13
Gambar 2.7 Struktur Kimia Imidazol dan Histidin.....	13
Gambar 4.1. Hasil elektroforesis DNA pengkode protein kapsid SCMV produk PCR koloni 19	19
Gambar 4.2 Profil Ekspresi Protein Kapsid Rekombinan SCMV	201
Gambar 4.3 Hasil ekspresi protein kapsid SCMV setelah diinduksi dengan konsentrasi IPTG yang berbeda.....	222
Gambar 4.4 Hasil visualisasi protein rekombinan kapsid yang telah dipurifikasi....	244

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) merupakan virus penyebab penyakit mosaik pada tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.). Virus ini dapat menghambat proses asimilasi karbon sehingga menurunkan produktivitas tanaman tebu. Apabila infeksi virus ini tidak ditangani dengan serius dapat menyebabkan menurunnya persentase perkecambahan, diameter batang dan jumlah internodus tanaman tebu (Viswanathan *et al.*, 2005). Menurut Singh *et al.* (2003) virus SCMV dapat menurunkan produktivitas tanaman tebu sebesar 0.5-45% tergantung dari ketahanan varietas tanaman, galur (strain) virus yang menyerang, iklim dan populasi serangga vektor. Oleh sebab itu, diperlukan penanganan yang serius dalam upaya pengendalian penyebaran SCMV.

Kendala utama dalam pengendalian penyakit mosaik yang disebabkan oleh SCMV yaitu gejala yang ditimbulkan oleh virus tersebut secara morfologi mirip dengan penyakit mosaik yang diakibatkan oleh kekurangan nutrisi ataupun penyakit mosaik yang diakibatkan oleh anggota kelompok potyvirus yang lain yaitu *sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) (Damayanti dan Putra, 2010), sehingga sulit dilakukan pengendalian yang spesifik untuk virus SCMV. Tanaman yang terinfeksi umumnya menunjukkan gejala timbulnya gambaran mosaik (belang) pada daun. Metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi virus SCMV yaitu melalui uji serologi. Metode ini lebih efektif dan spesifik untuk mendeteksi serangan SCMV dibandingkan dengan mengamati morfologi tanaman yang terjangkit virus tersebut.

Uji serologi merupakan metode untuk mendeteksi adanya antigen (protein, polisakarida, dll) yang terdapat dalam organisme dengan memanfaatkan interaksi spesifik dengan antibodi yang komplementer dengan antigen tersebut. Dalam uji serologi diperlukan antigen yang dapat digunakan untuk membentuk antibodi. Antigen yang digunakan dapat berasal dari virus SCMV secara utuh. Namun, dalam isolasi virus utuh diperlukan tahapan yang rumit. Oleh sebab itu digunakan metode protein rekombinan untuk menghasilkan antigen tersebut. Tahapan dalam

produksi protein rekombinan yaitu kloning gen, sintesis dan purifikasi protein (Adnyani, 2012). Gen yang digunakan pada produksi protein rekombinan ini yaitu gen cDNA protein kapsid SCMV yang diisolasi dari tanaman tebu yang terjangkit virus SCMV. Pengklonan cDNA protein kapsid dipilih karena kapsid merupakan molekul imunogenik yang akan memicu sistem imun hewan uji untuk menghasilkan antibodi. Selain itu, protein kapsid juga merupakan protein yang spesifik yang dapat dijadikan alat identifikasi spesies virus yang berbeda (Frenkel *et al.*, 1991). Fragmen cDNA protein kapsid SCMV telah dikonstruksi dalam plasmid ekspresi yang dapat digunakan untuk produksi protein rekombinan.

Tahap selanjutnya yaitu sintesis protein rekombinan kapsid SCMV. Sintesis protein rekombinan tersebut dilakukan dalam sel bakteri *Escherichia coli* karena bakteri tersebut dapat memproduksi protein dalam jumlah banyak dan dalam waktu yang relatif singkat (Rosano *et al.*, 2014). Produksi protein menjadi penting untuk dilakukan karena dalam uji serologi, protein yang dihasilkan mempengaruhi antibodi yang akan dibentuk.

Perlakuan yang dilakukan dalam sintesis protein rekombinan yaitu induksi sintesis protein menggunakan *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG). IPTG berperan sebagai *inducer* pada operator *lac* yang terdapat dalam plasmid dengan cDNA protein kapsid SCMV didalamnya (Collins *et al.*, 2013). Oleh sebab itu, konsentrasi IPTG yang digunakan tentu akan mempengaruhi jumlah protein yang dapat disintesis oleh bakteri *E. coli*. Selain itu, tahapan yang penting dalam uji serologi adalah pemurnian protein.

Pemurnian protein dapat dilakukan menggunakan kolom afinitas kromatografi resin Ni-NTA. Pada kedua ujung protein kapsid rekombinan terdapat 6x histidin yang akan berikatan dengan logam nikel pada resin. Ikatan antara histidin dan nikel dapat dilepas dengan menambahkan imidazol pada resin. Apabila protein tidak dimurnikan, hal tersebut akan menyebabkan antibodi yang terbentuk tidak spesifik dalam mengenali protein kapsid SCMV, sehingga hasil tersebut akan mempengaruhi identifikasi penyakit mosaik tanaman tebu.

1.2 Rumusan Masalah

Deteksi virus secara molekuler dalam upaya pengendalian penyebaran virus dapat dilakukan dengan uji serologi melalui produksi antibodi. Namun hingga saat ini antibodi untuk virus SCMV belum tersedia sehingga diperlukan metode untuk membentuk antibodi tersebut. Spesifisitas antibodi yang terbentuk sangat bergantung pada antigen yang digunakan. Oleh sebab itu rumusan masalah dari studi ini adalah bagaimana cara melakukan produksi dan purifikasi protein rekombinan kapsid SCMV yang akan digunakan sebagai antigen untuk membentuk antibodi ?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan produksi dan purifikasi protein rekombinan kapsid SCMV untuk memperoleh antibodi yang digunakan dalam uji serologi untuk mendeteksi virus SCMV.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah mendapatkan protein rekombinan kapsid SCMV murni yang dapat digunakan untuk membentuk antibodi spesifik untuk mendeteksi penyakit mosaik pada tanaman tebu.

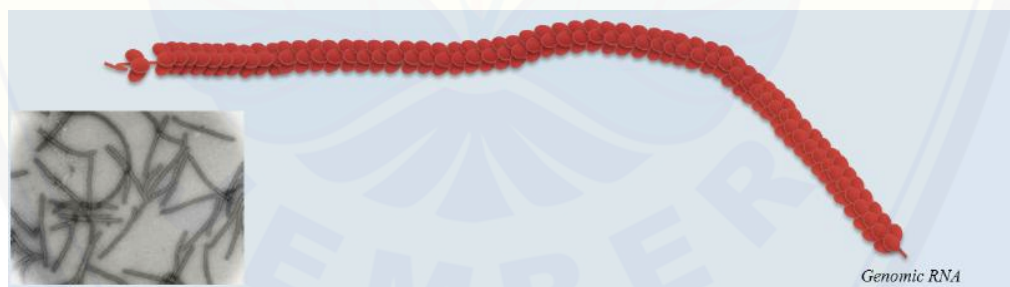
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV)

2.1.1 Struktur *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV)

Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) termasuk dalam golongan potyvirus yang menginfeksi tanaman jagung, sorgum, tebu dan berbagai jenis tanaman polong-polongan (Frenkel *et al.*, 1991). Virus SCMV mempunyai suhu inaktivasi 53-55 °C. Jika nira atau sap tanaman sakit disimpan dalam suhu kamar, virus akan inaktif dalam waktu kurang dari 1 hari, tetapi jika disimpan dalam suhu 6 °C virus akan bertahan sampai 27 hari (Semangun, 2001).

Potyvirus merupakan anggota dari famili potyviridae yang menyerang berbagai tanaman budidaya. Struktur potyvirus berupa serabut *flexuous* dengan panjang 680-900 nm dan berdiameter 11-15 nm (De Souza *et al.*, 2012). Menurut Jagadish *et al.* (1991) panjang potyvirus 700-900 nm dengan diameter 11 nm yang berikatan dengan poli A 10 kb, dilindungi oleh 2000 salinan protein kapsid tunggal dengan berat molekul 30-37 kDa. Morfologi partikel potyvirus dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Morfologi partikel potyvirus (inset: TEM pada partikel SCMV) (Sochor *et al.*, 2012)

Potyvirus memiliki rentangan distribusi yang luas, beberapa spesies memungkinkan untuk menginfeksi tanaman inang yang bervariasi dan menurunkan tingkat produktivitas tanaman tersebut. Penyebaran potyvirus dapat melalui migrasi aphid, yang mana setiap potyvirus dapat ditularkan oleh berbagai spesies aphid yang berbeda dan setiap spesies aphid dapat menularkan spesies

potyvirus yang berbeda beda. Oleh sebab itu, sulit untuk mengontrol dan mencegah infeksi potyvirus pada tanaman, terutama tanaman budidaya (Ivanov *et al.*, 2014).

2.1.2 Struktur dan Fungsi Protein Kapsid (*Coat Protein*)

Protein kapsid virus berperan penting dalam proses infeksi pada *host* atau inang. Selain itu, data susunan protein kapsid dapat digunakan untuk membedakan antara strain virus pada kelompok potyvirus. Protein kapsid dari berbagai strain virus yang berbeda dapat memiliki kesamaan 38-71%. Pada anggota strain virus yang sama, protein kapsid mempunyai kemiripan hingga 90% identik dengan ujung amino yang sama. (Frenkel *et al.*, 1991). Protein kapsid SCMV memiliki berat molekul antara 34 kDa dan 39.5 kDa (Zhang *et al.*, 2008). Berdasarkan hasil penelitian Gemechu *et al.* (2006), protein kapsid SCMV memiliki 942 nukleotida yang mengkode protein kapsid dengan berat molekul 33.65 kDa.

2.1.3 Gejala dan Penularan SCMV

SCMV merupakan virus yang menyebabkan penyakit mosaik tebu. Penyakit mosaik tebu, yang sering juga disebut sebagai “penyakit garis-garis kuning” adalah salah satu penyakit yang menyerang tanaman tebu di Indonesia. Penyakit mosaik pada tanaman tebu pertama kali dikenal oleh van Musschenbroek pada tahun 1892 di Jawa Tengah (Semangun, 2001). Penelitian yang dilakukan oleh Singh *et al.* (2003) melaporkan bahwa infeksi oleh virus SCMV akan menyebabkan penurunan produktivitas tanaman tebu sebesar 0.5-45% tergantung dari ketahanan varietas tanaman, strain virus yang menyerang, iklim dan populasi serangga vektor.

Gejala penyakit mosaik adalah timbulnya gambar mosaik (belang) atau terdapat bercak-bercak memanjang yang berwarna hijau muda, hijau tua dan kuning pada daun (Semangun, 2001; Muis, 2002). Gambaran pada daun ini agak bervariasi tergantung dari strain virus dan varietas tebu yang terinfeksi (Gambar 2.2). Pada ruas-ruas yang agak tua dari batang tanaman sakit terdapat garis-garis putih yang tidak teratur. Pada infeksi lebih lanjut terjadi lekah-lekah atau ruas

mengering dan keriput. Pada tanaman sakit umumnya ruas-ruas lebih pendek daripada biasanya, sehingga batang tanaman lebih pendek daripada tanaman yang sehat. Pada penyakit mosaik tebu tidak semua tunas dari batang yang sakit berkembang menjadi tanaman sakit. Sebagian dari tunas ini ternyata dapat mengatasi penyakit dan melanjutkan pertumbuhannya dengan normal (Semangun, 2001).



Gambar 2.2 Daun tanaman tebu yang menunjukkan gejala mosaik akibat infeksi virus SCMV (Goncalves *et al.*, 2012)

Menurut Muis (2002) tanaman yang masih muda memperlihatkan persentase serangan yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman yang lebih dewasa. Pada tanaman yang diinokulasikan dengan virus pada umur 1 minggu setelah tanam (mst) menunjukkan persentase serangan mencapai 100%, sedangkan yang diinokulasikan pada umur 6 mst persentase serangan hanya mencapai 9.09%. Hal ini disebabkan pada tanaman muda jaringan tanaman lebih rentan terhadap serangan penyakit, sehingga memudahkan penyakit lebih cepat berkembang.

Penyakit mosaik yang disebabkan oleh SCMV dapat ditularkan secara mekanik maupun melalui serangga vektor dengan cara nonpersisten (dapat ditransmisikan oleh vektor dalam waktu yang singkat) (Muis, 2002). Secara mekanik penyakit dapat ditularkan melalui tanaman yang terserang virus, pemakaian bibit yang terserang virus, dan alat-alat yang digunakan seperti parang pemotong. Infeksi dengan cara mekanik disebut juga infeksi primer.

Namun, persentase penularan dengan cara tersebut sangat rendah yaitu 0.25% (Semangun, 2001).

Penyebaran virus dapat dilakukan secara nonpersisten melalui migrasi serangga sebagai vektor (Ng *et al.*, 2006). Tebu yang tertular virus dari serangga dikatakan terkena infeksi sekunder (Semangun, 2001). Beberapa spesies serangga yang dapat menyebarkan SCMV yaitu kutu daun jagung (*Rhopalosiphum maidis*), *Aphis maidis*, *Myzus persicae*, *Schizaphis graminum*, *Aphis gossypii*, *Rhopalosiphum padi*, *Dactynotus ambrosiae*, *Hysteroneura setariae*, *Toxoptera graminum* (Brandes *et al.*, 1920; Teakle *et al.*, 1989; Mansoor-ul-Hasan *et al.*, 2003). Spesies serangga yang dapat menyebarkan SCMV dengan persentase paling tinggi yaitu *R. maidis* dan *R. padi* (92%) (Mansoor-ul-Hasan *et al.*, 2003).

2.1.4 Deteksi SCMV

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi tanaman yang terjangkit SCMV secara dini adalah melalui uji serologi. Uji serologi memanfaatkan interaksi antigen-antibodi yang spesifik untuk mendeteksi SCMV (Adnyani, 2012). Interaksi antigen dan antibodi terjadi pada reaksi pertahanan hewan apabila terpapar molekul asing (antigen). Reaksi antigen-antibodi yang spesifik dapat dimanfaatkan sebagai alat identifikasi patogen dan diagnosis penyakit virus pada tanaman (Akin, 2006).

Selain untuk mendeteksi dan mengidentifikasi virus penyebab penyakit, uji serologi dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi virus dalam suatu jaringan tanaman, mendeteksi virus tanaman dalam tubuh vektor dan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar virus. Salah satu metode yang telah berhasil dikembangkan untuk mendeteksi virus tanaman dalam uji serologi adalah: *dot blot immunobinding assay* (DIBA) (Somowiyarjo *et al.*, 1989) dan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (Abouzid *et al.*, 2002). *Dot Blot Immunobinding Assay* (DIBA) merupakan uji serologi menggunakan membran *nitropure nitrosellulose* (NPN) yang efektif untuk mendeteksi virus pada tanaman. Teknik ini menggunakan gerusan tanaman segar dan *diblot* pada kertas membran. Sampel yang akan *diblot* digerus dengan buffer kemudian *diblot* menggunakan

pipet mikrotiter pada kertas membran (Somowiyarjo, 1989). Prosedur yang digunakan sangat sederhana dan mempunyai tingkat sensitivitas yang tinggi.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) merupakan teknik yang digunakan untuk mendeteksi antigen atau antibodi tertentu pada sampel dengan cara memanfaatkan interaksi antigen dan antibodi yang spesifik (Madigan, 1996). Keunggulan teknik ini yaitu teknik pengerjaan yang relatif sederhana, ekonomis dan memiliki sensitivitas yang tinggi. Selain itu, ELISA dapat mendeteksi antigen atau antibodi dalam jumlah sangat sedikit dan hasil deteksi ELISA dapat diukur secara kuantitatif (Adnyani, 2012).

2.2 Produksi Protein Rekombinan

Protein rekombinan adalah protein yang diperoleh dari proses rekayasa dan transformasi gen untuk menghasilkan protein dalam jumlah besar di dalam sel suatu organisme. Pembentukan protein rekombinan dilakukan dengan menyisipkan DNA ke dalam plasmid vektor ekspresi dan mentransformasikannya ke dalam sel. Teknologi yang terlibat dalam produksi protein rekombinan dilakukan dengan mengisolasi gen target dan memindahkannya ke dalam plasmid vektor kloning untuk memperbanyak jumlah gen. Selanjutnya, gen target disubkloning pada plasmid vektor ekspresi sehingga protein target dapat diekspresikan (Schumann *et al.*, 2004). Komponen-komponen yang terlibat dalam produksi protein kapsid rekombinan sugarcane mosaic virus (SCMV) antara lain:

2.2.1 *Escherichia coli* BL21

Escherichia coli merupakan inang yang umum digunakan dalam ekspresi protein rekombinan (Robinchon *et al.*, 2011). *E. coli* digunakan karena waktu regenerasinya cepat (20 menit), sehingga dapat memproduksi protein rekombinan dalam jumlah banyak dan waktu yang singkat (Rosano *et al.*, 2014). *E. coli* strain BL21 umum digunakan untuk ekspresi protein rekombinan karena tidak menghasilkan Lon dan OmpT protease (Leone *et al.*, 2015). Lon protease dan ompT *outer membrane protease* dapat memdegradasi protein rekombinan (Studier

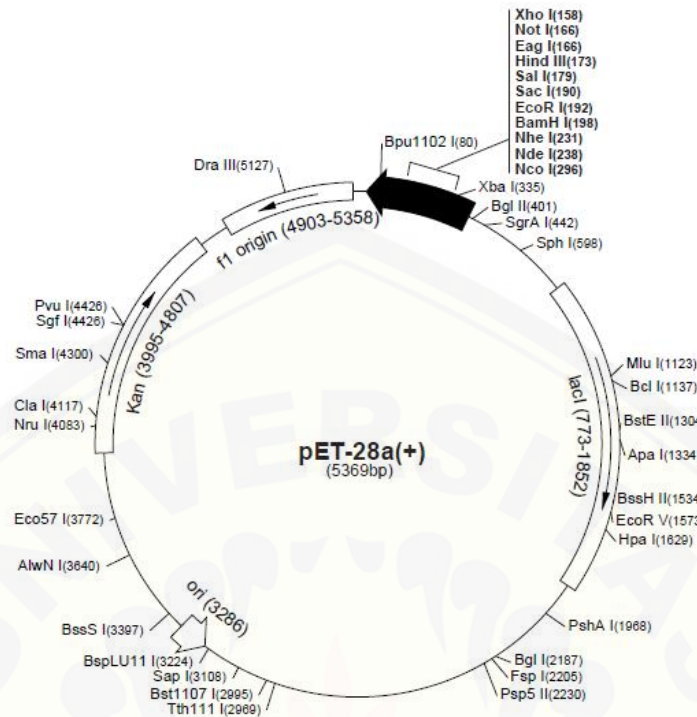
et al., 1990). Oleh sebab itu, semakin rendah Lon dan OmpT yang dihasilkan maka hal tersebut semakin baik untuk produksi protein rekombinan.

Ekspresi protein rekombinan dalam *E. coli* strain BL21 ditranskripsi oleh T7 RNA polimerase (T7 RNAP) yang berasal dari bakteriofage, yang mana gen pengkode untuk enzim tersebut terintegrasi pada genom *E. coli*. Transkripsi oleh T7 RNA polimerase dikontrol oleh T7 promoter atau lacUV5 promoter dan akan menranskripsi tujuh sampai delapan kali lebih cepat dibandingkan dengan *E. coli* yang menghasilkan RNAP (Studier *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2015).

Sistem ekspresi menggunakan bakteriofage T7 promoter memiliki beberapa kelebihan diantaranya. Bakteriofage T7 RNA polimerase tidak dihambat oleh rifamisin. Rifamisin dapat digunakan untuk merusak proses transkripsi pada gen sel inang. Bakteriofage mengkode enzim yang hanya mengenali bakteriofage T7 promoter yang tidak dimiliki oleh DNA kromosomal *E. coli*. Bakteriofage T7 RNA polimerase dapat menranskripsi beberapa kali lebih cepat sehingga lebih efisien digunakan dibandingkan dengan *E. coli* RNA polimerase. Apabila gen protein yang disisipkan bersifat toksik bagi sel *E. coli*, maka produksi T7 RNA polimerase harus dibatasi agar tidak menghambat proses pertumbuhannya.

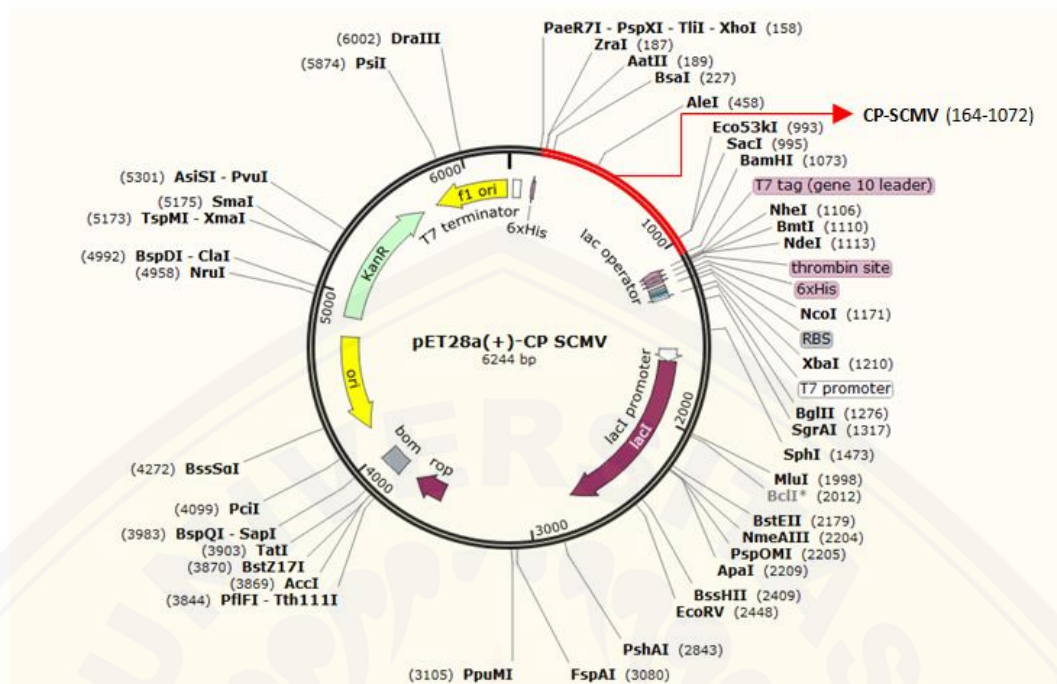
2.2.2 Plasmid pET28a(+)

Salah satu sistem yang dapat digunakan untuk produksi protein rekombinan dalam *E. coli* adalah serangkaian vektor pET dengan promoter *T7 phage RNA polymerase* (T7 promoter) dan menggunakan origin pBR322. Peta plasmid pET28a(+) ditunjukkan pada Gambar 2.3. Beberapa vektor pET memiliki untaian DNA pengkode histidine 6x yang berfungsi untuk pemurnian protein rekombinan pada kolom dengan logam bermuatan (Ramos *et al.*, 2004). Pada banyak penelitian yang telah dilakukan, 6x His-tag tidak memberikan dampak pada struktur dan fungsi protein rekombinan yang dihasilkan. Selain itu, 6xHis-tag dapat dijadikan sebagai epitop untuk mendeteksi protein menggunakan antibodi monoklonal atau konjugat enzim asam nitrilotriasetat-nikel (Ramos *et al.*, 2004).



Gambar 2.3 Peta plasmid pET28a(+)

Pada penelitian Hermawati (2016) telah berhasil dilakukan konstruksi cDNA protein kapsid SCMV dengan ukuran ± 900 bp ke dalam vektor ekspresi plasmid pET28a(+). Berdasarkan Gambar 2.4 cDNA protein kapsid disisipkan pada daerah MCS (*multiple cloning site*) diantara sisi pemotongan enzim restriksi BamHI (5'-C|TCGAG-3') dan XhoI (5'-G|GATCC-3'). Pada kedua ujung cDNA protein kapsid SCMV juga terdapat gen pengkode 6x His-tag yang berperan dalam pemurnian protein. Plasmid pET28a(+)-protein kapsid SCMV hasil konstruksi ini akan digunakan dalam produksi protein rekombinan kapsid SCMV.

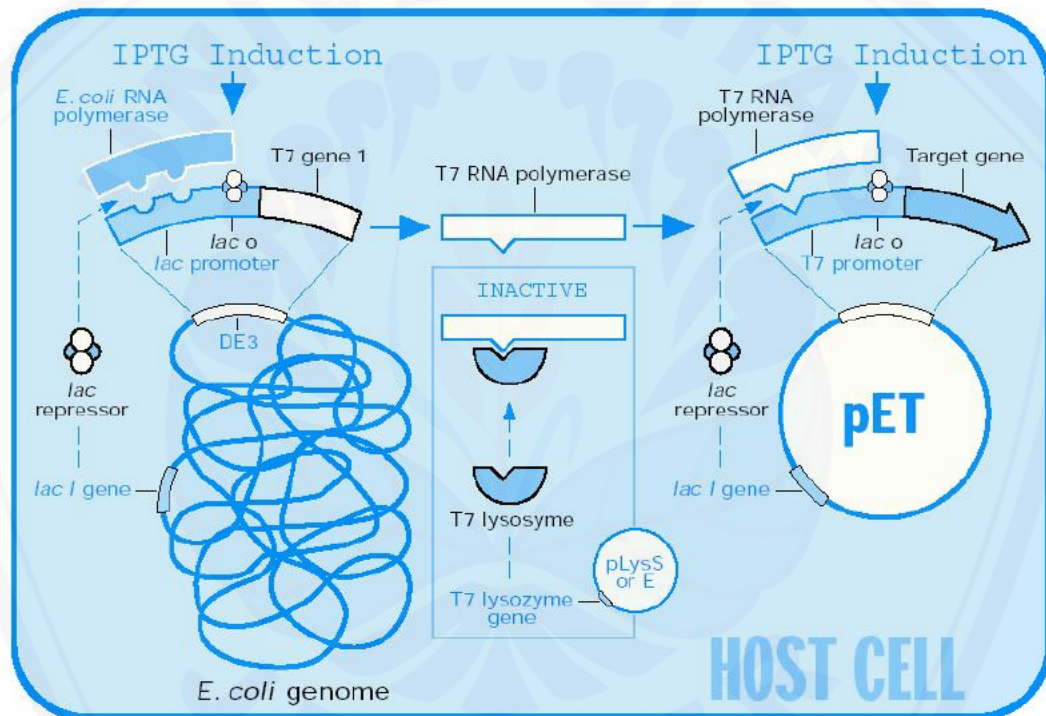


Gambar 2.4 Peta plasmid pET28a(+)-Protein Kapsid SCMV

2.2.3 Mekanisme Induksi Menggunakan IPTG

Eksresi protein kapsid rekombinan SCMV dilakukan dengan induksi menggunakan *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG). IPTG merupakan molekul induksi yang umum digunakan dalam produksi protein rekombinan (Collins *et al.*, 2013). Proses induksi IPTG melalui 2 tahap. Tahap pertama, IPTG akan berikatan dengan protein represor *lac* dan mengubah struktur protein represor *lac*. Perubahan struktur protein represor *lac* menyebabkan terlepasnya protein tersebut dari sekuen operator *lac* pada genom *E. coli*, sehingga RNA polimerase pada *E. coli* dapat berikatan dan mentranskripsi T7 RNA polimerase. Enzim T7 RNA polimerase digunakan untuk mentranskripsi sekuen insersi yang terdapat pada plasmid yang ditransformasikan ke *E. coli*. Tahap kedua, induksi dimulai saat IPTG berikatan dengan represor protein pada plasmid pET28a dan mengubah strukturnya sehingga represor terlepas dari daerah operator dan T7 RNA polimerase dapat berikatan dengan plasmid dan mentranskripsi gen protein kapsid SCMV (Bell *et al.*, 2000; Daber *et al.*, 2007).

Pada plasmid pET28a tepatnya sebelum daerah *mcs* (*multiple cloning site*) ditambahkan operator *lac* sebagai pengontrol. Selain itu, terdapat pula gen *lacI* yang merupakan protein repressor bagi operator *lac*. Pada saat sel bakteri berada pada fase awal pertumbuhan, *lacI* diekspresikan sehingga operator *lac* menjadi inaktif dan protein rekombinan tidak dapat ditranskripsikan. Kemudian, sel diinduksi dengan IPTG yang akan berikatan dengan *lacI* sehingga operator *lac* aktif dan gen rekombinan dapat ditranskripsi dan diekspresikan (Bell *et al.*, 2000; Daber *et al.*, 2007). Mekanisme induksi protein rekombinan dengan IPTG ditunjukkan pada Gambar 2.5.

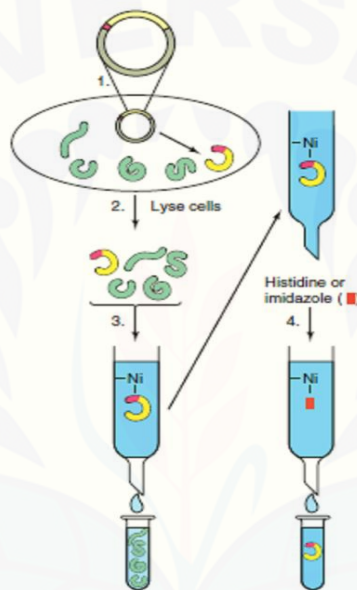


Gambar 2.5 Skema mekanisme induksi protein rekombinan dengan IPTG (Sambrook *et al.*, 2001)

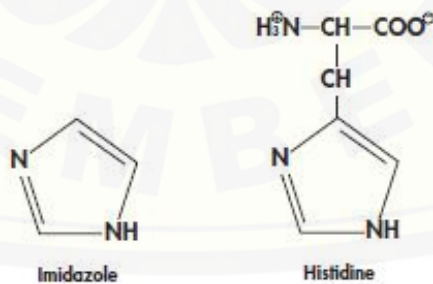
2.3 Purifikasi Protein Rekombinan

Purifikasi protein kapsid rekombinan SCMV dengan kolom afinitas kromatografi menggunakan resin Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid). Resin Ni-NTA merupakan resin dengan muatan ion nikel (Ni^{2+}), yang digunakan pada pemurnian protein rekombinan yang mengandung polihistidin. Histidin merupakan asam amino yang paling penting dalam memediasi pengikatan sebagian besar protein pada ion logam Ni^{2+} pada kolom diam (tidak bergerak)

(Janknecht *et al.*, 1991). Ikatan antara protein target yang memiliki rantai 6xHis tag dan resin dilepas menggunakan imidazol. Ilustrasi proses purifikasi menggunakan kolom afinitas kromatografi resin Ni-NTA dapat dilihat pada Gambar 2.6. Imidazol memiliki struktur yang identik dengan sisi pengikatan pada histidin (Gambar 2.7). Selain itu, imidazol memiliki afinitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan histidin, sehingga imidazol dalam konsentrasi tertentu akan lebih kuat berikatan dengan resin. Penggunaan imidazol tidak menyebabkan kerusakan protein akibat penurunan pH (Hainfeld *et al.*, 1999).



Gambar 2.6 Ilustrasi proses Pemurnian Protein dengan Kolom Kromatografi Resin Ni-NTA (Weaver, 2002)



Gambar 2.7 Struktur Kimia Imidazol dan Histidin

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Tanaman *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) mulai bulan Mei - Agustus 2016.

3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel bakteri *Escherichia coli* strain BL21, vektor pET28a(+) (Invitrogen) yang telah disisipi fragmen cDNA-protein kapsid SCMV, protein rekombinan kapsid SCMV.

3.3 Prosedur Penelitian Ekspresi Protein

3.3.1 Transformasi Plasmid pET28a(+)-Protein Kapsid SCMV ke *Escherichia coli* strain BL21

Plasmid pET28a(+)-Protein Kapsid SCMV ditransformasi sebanyak 1 µl ke 100 µl sel kompeten *E. coli* strain BL21. Kemudian dilakukan inkubasi dalam es selama 30 menit. Setelah itu, dilakukan *heat shock* pada suhu 42 °C selama 60 detik dan diinkubasi dalam es selama 2-3 menit. Pada campuran plasmid dan sel kompeten, ditambahkan 1 ml medium SOB (2% (w/v) tripton, 0.5% (w/v) ekstrak yeast, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) (Hanahan, 1983) dan digojog selama 1 jam pada suhu 37 °C dengan kecepatan 150 rpm. *E. coli* hasil transformasi ditumbuhkan sebanyak 150 µl pada media LB padat (10 g/L tripton, 5 g/L ekstrak yeast, 10 g/L NaCl dan 15g/L agar) dengan antibiotik kanamisin 50 ppm dan diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37 °C (Sambrook *et al.*, 1989). Koloni positif kemudian dikonfirmasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

3.3.2 *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Koloni

Komponen bahan yang digunakan dalam PCR koloni: 5 µl *master mix Kappa*, 0.5 µl primer T7 promoter (TAATACGACTCACTATAGGG), 0.5 µl primer T7 terminator (GCTAGTTATTGCTCAGCGG), dan 4 µl ddH₂O. Program

PCR yang digunakan: pre denaturasi 94 °C selama 3 menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik, *annealing* 55 °C selama 30 detik, *extention* 72 °C selama 1 menit dan *final extention* 72 °C selama 5 menit.

3.3.3 Ekspresi Protein Rekombinan Kapsid SCMV pada Sel Bakteri *E. coli* strain BL21

Koloni tunggal bakteri *E. coli* strain BL21 yang diperoleh dari hasil transformasi ditumbuhkan dalam 2 ml media LB cair (10 g/L tripton, 5 g/L ekstrak yeast, dan 10 g/L NaCl) yang mengandung antibiotik kanamisin 50 ppm dan digojog selama 16 jam pada suhu 37 °C. Bakteri yang tumbuh disubkultur ke dalam 50 ml media LB cair yang mengandung kanamisin 50 ppm (1:50) dan digojog selama 3 jam. Setelah mencapai OD 0.5 – 0.7 ditambahkan *inducer* yaitu IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) dengan konsentrasi 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM dan 1 mM. Kultur bakteri tersebut digojog selama 5 jam pada suhu 37 °C. Selanjutnya kultur sel bakteri diletakkan dalam es selama 15 menit dan sel bakteri dipanen dengan disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm dengan suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet sel bakteri yang diperoleh digunakan untuk ekstraksi protein (Holifah, 2012).

3.3.4 Ekstraksi Protein Rekombinan Kapsid SCMV

Ekstraksi protein rekombinan dilakukan dengan penambahan 2 ml buffer ekstraksi pH 8 (50 mM NaH₂PO₄ dan 300 mM NaCl) pada setiap 1 g pelet sel bakteri. Selanjutnya sel dipecah dengan sonikasi selama 3 menit dan disentrifugasi pada suhu 4 °C selama 15 menit dengan kecepatan 12.000 rpm.

Pada pelet (fraksi *insoluble*) yang diperoleh ditambahkan buffer DNPI (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl dan 8 M Urea pH 8) untuk proses solubelisasi, digojog dan disentrifugasi pada suhu ruang selama 20 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang diperoleh selanjutnya dipurifikasi dengan kolom afinitas kromatografi resin Ni-NTA (Holifah, 2012).

3.3.5 Analisis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Analisis protein rekombinan kapsid SCMV dilakukan dengan metode SDS-PAGE. Langkah-langkah yang dilakukan yaitu pembuatan *separating gel* dan *stacking gel*. *Separating gel* dibuat dengan konsentrasi akrilamida 15% dengan stok akrilamida 30% 5 ml, 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 ml SDS 10 %, 50 µl ammonium persulfat (APS) dan 5 µl N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), ddH₂O 2.35 ml dan *stacking gel* dibuat dengan stok akrilamida 30% 1.3 ml, 2.5 ml 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1 ml SDS 10 %, 50 µl APS, 5 µl (TEMED) dan ddH₂O 6.1 ml. Sampel protein rekombinan kapsid ditambah buffer *loading* dengan perbandingan 1:1, kemudian didenaturasi pada suhu 100 °C selama 3 menit. Sampel yang sudah didenaturasi dimasukkan ke dalam sumur gel sebanyak 10-20 µl dan elektroforesis dilakukan pada 70 volt selama 2,5 - 3 jam. Hasil pemisahan protein selanjutnya diberi pewarna *Commasie Brilliant Blue* (CBB) 1%.

3.4 Prosedur Penelitian Produksi dan Purifikasi Protein

3.4.1 Produksi Protein Rekombinan Kapsid SCMV pada Sel Bakteri *E. coli* strain BL21

Koloni tunggal bakteri *E. coli* strain BL21 yang diperoleh dari hasil transformasi ditumbuhkan dalam 100 ml media LB cair yang mengandung antibiotik kanamisin 50 ppm dan digojog selama 24 jam pada suhu 37 °C. Bakteri yang tumbuh disubkultur kedalam 3 liter media LB cair yang mengandung kanamisin 50 ppm (1:50) dan digojog selama 3 jam. Setelah mencapai OD 0,5 - 0,7 ditambahkan *inducer* yaitu IPTG dengan konsentrasi 0.05 M. Kultur bakteri tersebut digojog selama 5 jam pada suhu 37 °C. Selanjutnya kultur sel bakteri diletakkan dalam es selama 15 menit dan sel bakteri dipanen dengan disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm dengan suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet sel bakteri yang diperoleh digunakan untuk ekstraksi protein.

3.4.2 Purifikasi Protein Menggunakan Kolom Afinitas Kromatografi Resin Ni-NTA

Protein yang telah disolubelisasi dipurifikasi menggunakan kolom afinitas kromatografi resin Ni-NTA. Resin yang siap digunakan diekuilibrasikan dengan memasukkan buffer DNPI ke dalam kolom. Selanjutnya sampel protein dimasukkan ke dalam kolom dengan perbandingan resin dan protein (1:1) (tahap pengikatan). Larutan yang keluar dari kolom (*unbound protein*) ditampung dalam *microtube* untuk dianalisis. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menambahkan buffer DNPI-20 pH 8 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl dan 20 mM imidazol dan 8 M urea). Protein kemudian dielusi dengan buffer DNPI-250 pH 8 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl dan 250 mM imidazol dan 8 M urea). Protein hasil purifikasi digunakan untuk analisis SDS-PAGE seperti pada metode 3.3.4.

3.4.3 Elektroelusi protein

Sebelum dilakukan elektroelusi, protein yang telah dipurifikasi dengan kolom afinitas kromatografi resin Ni-NTA dipisahkan menggunakan SDS-PAGE dengan konsentrasi poliakrilamida 10%. Komposisi bahan untuk *separating gel* yaitu: 3.35 ml stok akrilamida 30%, 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 ml SDS 10%, 50 µl APS dan 5 µl TEMED, dan 4 ml ddH₂O. Sampel protein rekombinan dicampur dengan buffer *loading* dengan perbandingan 1:1 kemudian didenaturasi pada suhu 100 °C selama 15 menit. Sampel yang sudah didenaturasi dimasukkan ke dalam sumbu gel sebanyak 1 ml dan elektroforesis dilakukan pada 80 volt selama 5-6 jam. Hasil pemisahan protein selanjutnya diberi pewarna *Commasie Brilliant Blue* (CBB) 1%.

Elektroelusi protein dilakukan untuk mengeluarkan protein hasil pemisahan SDS-PAGE yang masih tercampur dengan protein lain. Protein target yang tampak setelah diberi pewarna CBB 1% dipotong lebih kecil dan dimasukkan ke dalam membran dengan buffer yang mengandung 25 mM Tris Base, 0.192 M glisin dan SDS 0.1%. Protein dalam gel dikeluarkan dengan aliran

listrik 80 Volt sampai gel menjadi bening (Harrington, 1990). Protein yang dihasilkan tampak berwarna biru karena masih berikatan dengan pewarna CBB.

3.4.4 Dialisis

Sampel protein hasil purifikasi dari kolom afinitas dan isolasi dari gel (elektroelusi protein) dimasukkan kedalam membran dialisis. Selanjutnya sampel dalam membran ditempatkan dan didialisis dalam beaker berisi 0.5 Lt buffer PBS pH 7.4 yang mengandung 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄ dalam 1 Lt buffer selama 12 Jam. Setelah 12 jam buffer diganti dengan buffer PBS baru. Protein yang telah didialisis kemudian disimpan pada suhu -20 °C.

3.3.5 Penentuan Kandungan Protein Terlarut.

Kandungan protein terlarut diukur dengan metode Lowry. Reagen yang digunakan yaitu reagen A (NaCO₃), reagen B (CuSO₄.5H₂O), reagen C (Natrium tartrat), reagen D (1 N folin). Tahap pertama yang dilakukan yaitu memasukkan 50 µl *Crude extract* kedalam *microtube* dan ditambahkan 0.5 ml dH₂O. Selanjutnya, ditambahkan 0.5 ml TCA 20% dan diinkubasi selama 6 jam. Tahap selanjutnya sampel disentrifugasi 12000 rpm 10 menit 4 °C. Pelet yang telah diperoleh ditambahkan acetone 0.5 ml dan disentrifugasi 12000 rpm 10 menit 4 °C. Pelet kemudian ditambah 0.25 ml NaOH 0.25 N dan 0.5 ml reagen kompleks (reagen A : B : C 100 : 1: 1). Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah diinkubasi, sampel ditambah 0.5 ml reagen D, divortex dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 10 menit suhu ruang. Selanjutnya nilai absorbansi sampel diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm (Lowry *et al.*, 1951).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa plasmid pET28a(+)-protein kapsid SCMV dapat diekspresikan dengan baik pada bakteri *E. coli* strain BL21. Namun, ekspresi protein rekombinan kapsid SCMV tersebut tidak dipengaruhi adanya penambahan inducer IPTG. Protein rekombinan berhasil dipurifikasi menggunakan kolom afinitas kromatografi resin Ni-NTA dan proses elektroelusi dengan konsentrasi protein rekombinan yang diperoleh 15 mg/ml.

5.2 Saran

Pada tahap purifikasi protein sebaiknya dipilih metode yang paling efektif untuk memurnikan protein. Setiap metode purifikasi yang digunakan, keefektifannya tergantung pada jenis protein yang diproduksi dan bagaimana karakteristik protein tersebut. Pemilihan metode purifikasi yang tepat dapat meminimalisir berkurangnya konsentrasi protein rekombinan akibat perlakuan yang dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abouzid, A. M., J. f. Astua, D. E. Purcifull, K. A. Beckam dan W.E. Crawford. 2002. Serological studies using polyclonal antisera prepared against the viral coat protein of four begomovirus expressed in *Escherichia coli*. *Plant Dis.* 86(10):1109-1114.
- Adnyani, N. N. P. 2012. Uji serologi tomat infectious chlorosis virus (ticv) pada tanaman tomat. *Karya tulis ilmiah*. Departemen Proteksi Tanaman Fakultas Petanian Institut Pertanian Bogor.
- Akin, M.H. 2006. *Virologi Tumbuhan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius (Anggota IKAPI)
- Bell, C. E. dan M. Lewis. 2000. A closer view of the conformation of lac repressor bound to operator. *Nature Structural Biology.*7(3): 209-214.
- Brandes, E. W..1920. Artificial and insect transmission of sugarcane mosaic. *Journal of Agricultural Research.*19(3): 131-138.
- Collins, T., J. A. Silva, A. da Costa, F. Branca, R. Machado dan M. Casal. 2013. Batch production of silk –elastin-like protein in e. coli bl21 (de3): key parameters for optimisation. *Microbial Cells Factories.* 12(21). 1-16.
- Daber, R., S. Stayrook, A. Rosenberg dan M. Lewis. 2007. Structural analysis of lac repressor bound to allosteric effectors. *J. Mol. Biol.* 370: 609-619.
- Damayanti dan Putra, 2010. Hot water treatment of cutting-cane infected with sugarcane streak mosaic virus (SCSMV). *J. ISSAAS.* 16(2):17-25.
- De Souza, I. R. P., F. Giolitti, N. P. Carneiro, S. L. Lenardon, E. De Oliveira, E. A. Gomes, R. W. Noda, dan F. A. De Souza. 2012. Sequence diversity in the coat protein of scmv infecting maize and sorghum in brazil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo.*11(2): 120-136.
- Frenkel, M. J., J. M. Jilka, N. M. McKern, P. M. Strike, J. M. Clark Jr, D. D. Shukla dan C. W. Ward. 1991. Unexpected Sequence Diversity in The Amino-Terminal Ends of The Coat Protein of Strains of Sugarcane Mosaic Virus. *Journal of General Virology.* 72: 237-242.
- Gemechu, A. L., P. Chlemsombat, S. Attathom, K. Reanwarakorn dan R. Lersrutaiyotin. 2006. Cloning and sequence analysis of coat protein gene for characterization of sugarcane mosaic virus isolated from sugarcane and maize in thailand. *Archives of Virology.*151: 167-172.

- Goncalves, M. C., L. R. Pinto, S. C. Souza dan M. G. A. Landell. 2012. Virus diseases of sugarcane. a constant challenge to sugarcane breeding in brazil. *Functional Plant Science and Biotechnology*. 6(special issue 2): 108-116.
- Hainfeld, J. F., W. Liu, C. M. R. Halsey, P. Freimuth dan R. D. Powell. 1999. Ni-NTA gold clusters target his-tagged proteins. *Journal of Structural Biology*. 127: 185-198.
- Hanahan, D.. 1983. Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *Journal Molecular Biology*. 166: 557-580.
- Harrington, M.G. 1990. Elution of protein from gel. *Methods in Enzymology*: 448-495.
- Hermawati, R.. 2016. Kloning dan konstruksi cdna penyandi protein kapsid sugarcane mosaic virus (scmv) ke dalam vektor ekspresi untuk produksi protein rekombinan. *Skripsi*. Jember: Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Holifah, N. 2012. Pembuatan antibodi poliklonal protein sucrose transporter menggunakan antigen protein rekombinan sut1 dari tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Ivanov, K. I., K. Eskelin, A. Lohmus dan K. Makinen. 2014. Molecular and cellular mechanism underlying infection. *Journal of General Virology*. 95: 1415-1429.
- Jagadish, M. N., C. W. Ward, K. H. Gough, P. A. Tulloch, L. A. Whittaker dan D. D. Shukia. 1991. Expression of coat protein in *Escherichia coli* and yeast and its assembly into virus-like particles. *Journal of General Virology*. 72: 1543-1550.
- Janknecht, R., G. de Martynoff, J. Lou, R. A. Hipskind, A. Nordheim dan H. G. Stunnenberg. 1991. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 8972-8976.
- Leone, S., F. Sannini, M. L. Tutino, E. Parrilli dan D. Picone. 2015. Acetate: friend or foe? efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source. *Microbial Cell Factories*. 14(106): 1-10.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr dan R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biol. Chem*. 193: 265-275.

- Madigan, Michael T., John M. Martinko dan Jack Parker. 1996. *Brock Biology of Microorganisms Eight Edition*. New York: Prentice Hall International, Inc.
- Mansoor-ul-Hasan, G. M. Sahi, W. Wakil dan Y. Imanat. 2003. Aphid transmission of sugarcane mosaic virus (SCMV). *Pak. J. Agri. Sci.*. 40(1-2): 74-76.
- Muis, Amran. 2002. Sugarcane mosaic virus (scmv) penyebab penyakit mosaik pada tanaman jagung di Sulawesi. *Jurnal Litbang Pertanian*, 21(2).
- Pohl, T. 1990. Concentration of protein and removal of solutes. *Methods in Enzymology*. 182: 68-83.
- Ramos, C. R. R., P. A. E. Abreu, A.L. T. O. Nascimento dan P. L. Ho. 2004. A High copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal n-terminal his tagged fusion peptide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 37: 1103-1109.
- Robichon, Carine, Jianying Luo, Thomas B. Causey, Jack S. Banner dan James C. Samuelson. 2011. Engineering *Escherichia coli* BL21 (DE3) derivative strains to minimize *e. coli* protein contamination after purification by immobilizes metal affinity chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(13): 4634-4646.
- Rosano, G. L. dan E. A. Ceccarelli. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 5(172): 1-17.
- Rostami, A., N. S. Bashir, D. Koolivand dan M. Hajizadeh. 2015. Serological methods to confirm expression of coat protein gene from an Iranian isolate of cucumber mosaic virus in *Escherichia coli*. *Biotech Health*. 2(2): 22-26.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch dan T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual Second Edition*. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition Volume 3*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schumann, W. C. dan L.S. Ferreira. 2004. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*. 27: 442-453.
- Semangun, Haryono. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.

- Singh, A., V. Upadhyay, A. K. Upadyay, S. M. Singh dan A. K. Panda. 2015. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories* 14:41.
- Singh, S. M. dan A. K. Panda. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99(4): 303-310.
- Singh, V., O.K. Sinha, dan R. Kumar. 2003. Progressive decline in yield and quality of sugarcane due to sugarcane mosaic virus. *Indian Phytopath.* 56 (4): 500-502.
- Sochor, J., P. Babuka, V. Adam, B. Krska dan R. Kizek. 2012. Sharka: the past, the present and the future. *Viruses*. 4: 2853-2901.
- Somowiyarjo, S., Sako N., Nonaka F. 1989. Dot-immunobinding assay for zucchini yellow mosaic virus using polyclonal and monoclonal antibodies. *Ann Phytopathol Soc.* 55(1): 56-63.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn dan J. W. Dubendoff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*. 185: 60-89.
- Studier, F. W.. 2014. Stable Expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. *Methods in Molecular Biology*: 17-32.
- Teakle, D. S., D. D. Shukla dan R. E. Ford. 1989. Sugarcane mosaic virus. *Description of Plant Viruses*. 5(88): 314-320.
- Trimpin, S. dan Brizzard, B. 2009. Analysis of insoluble protein. *BioTechniques*. 46: 209-419.
- Viswanathan, R., dan M. Balamuralikrishnan. 2005. Impact of mosaic infection on growth and yield of sugarcane. *Sugar Tech*. 7(1): 61-65.
- Weaver, Robert F. 2002. *Molecular Biology Second Edition*. New York: The McGraw-Hill Companies.
- Zhang, M. Q., G. P. Rao, R. K. Gaur, M. H. Ruan, Maneesha Singh, S. R. Sharma, Ashutosh Sigh, Pratibha Singh. 2008. Sugarcane mosaic virus. characterization, *Diagnosis and Management of Plant Viruses*. 1: 111-144.
- Zhang, Z., G. Kuipers, T. Niemiec, T. Baumgarten, D. J. Slotboorn, J.-W. de Gier dan A. Hjelm. 2015. High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21 (DE3) by omitting the inducer IPTG. *Microbial Cell Factories* 14(142): 1-11.