



**PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL UNTUK DETEKSI PROTEIN
Wee1 PADA SEL TANAMAN PADI (*Oryza sativa* L.)**

SKRIPSI

Oleh:

**Ardela Alief Maulani
NIM 171510501052**

PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI

FAKULTAS PERTANIAN

UNIVERSITAS JEMBER

2022



**PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL UNTUK DETEKSI PROTEIN
Wee1 PADA SEL TANAMAN PADI (*Oryza sativa* L.)**

SKRIPSI

diajukan guna memenuhi persyaratan untuk menyelesaikan Program Sarjana
pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh :

**Ardela Alief Maulani
NIM 171510501052**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2022

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tua saya yang saya sayangi dan cintai Bapak Imam Hanafi dan Ibu Sri Utami serta adik saya Ibrahim Sigit Wardana yang selama ini memberikan dukungan serta doa untuk saya dalam menuntut ilmu dan menyelesaikan tugas akhir.
2. Prof. Ir. Bambang Sugiharto M.Agr.Sc., D.Agr.Sc, selaku Dosen Pembimbing Skripsi saya yang selalu dengan sabar membimbing dan memberikan ilmu serta arahan selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Semua guru, dosen, pegawai, karyawan juga pihak-pihak yang berjasa dalam memberikan ilmu dan pengalaman yang berharga khususnya di Program Studi Agroteknologi Universitas Jember.
4. Teman-teman dan sahabat yang telah memotivasi dan memberi semangat untuk saya.
5. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

“Pelan-pelan”

“Setiap orang ada massanya. Setiap massa ada orangnya”

“Terima diri sendiri sebelum mencintai diri sendiri”

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ardela Alief Maulani

NIM : 171510501052

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi berjudul “**Pembuatan Antibodi Poliklonal untuk Deteksi Protein Wee1 pada Sel Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.)**” adalah benar-benar hasil karya tulis sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun serta bukan karya tulis plagiasi. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, Maret 2022

Yang menyatakan

Ardela Alief Maulani

NIM. 171510501052

SKRIPSI

**PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL UNTUK DETEKSI PROTEIN
Wee1 PADA SEL TANAMAN PADI (*Oryza sativa* L.)**

Oleh:

Ardela Alief Maulani
NIM 171510501052

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Skripsi: Prof. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc., D.Agr.Sc
NIP 195510221982121001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pembuatan Antibodi Poliklonal untuk Deteksi Protein Wee1 pada Sel Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.)” telah diuji dan disahkan pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 17 Maret 2022

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Skripsi,

Prof. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc., D.Agr.Sc.,
NIP. 19551022198212001

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota,

Wahyu Indra Duwi Fanata SP., M.Sc., Ph.D.
198102042015041001

Tri Handoyo, SP., Ph.D
197112021998021001

Mengesahkan,

Dekan

Prof. Dr. Ir. Soetriono, MP.
NIP. 196403041989021001

RINGKASAN

Pembuatan Antibodi Poliklonal untuk Deteksi Protein Wee1 pada Sel Tanaman Padi (*Oryza Sativa* L.) Ardela Alief Maulani. 171510501052: 2022: Program Studi Agroteknologi. Fakultas Pertanian. Universitas Jember

Wee1 menjadi salah satu protein kinase yang berperan penting pada proses pembelahan sel juga berperan sebagai inhibitor dari *checkpoint* siklus sel. . Wee1 berperan memfosforilasi *cyclin dependent kinase 1* (CDK1) dan menginaktivasiya sehingga sel tidak dapat membelah. Regulasi Wee1 telah dimanfaatkan untuk meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman. Overekspresi Wee1 penelitian sebelumnya belum sampai pada analisa ekspresi protein sehingga perlu pembuatan antibodi untuk mendeteksi protein Wee1. Konstruksi gen Wee1 pada plasmid pET-28(a) dan telah dilakukan transformasi pada bakteri *Escherichia coli* strain BL 21. Penelitian sebelumnya mengkonfirmasi ekspresi gen Wee1 dan telah didapatkan protein Wee1 murni hasil purifikasi. Protein Wee1 murni hasil purifikasi digunakan sebagai antigen pada hewan uji coba untuk menghasilkan antibodi poliklonal.

Teknik analisa protein berbasis antibodi salah satunya yaitu *western blot*. Metode penelitian yang akan dilakukan yaitu pembuatan antibodi poliklonal protein Wee1 pada hewan coba kelinci dengan cara injeksi antigen protein Wee1. Injeksi dilakukan dengan mencampur antigen protein rekombinan Wee1 sebanyak 1 mg dengan *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) sebanyak 1 ml perbandingan 1:1. Dua minggu setelahnya dilakukan booster injeksi dengan mencampur antigen protein rekombinan protein Wee1 sebanyak 0.25 mg dengan *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA) perbandingan 1:1 sebanyak 1 ml sampai homogen. Injeksi antigen pada hewan coba dilakukan secara subkutan dari minggu kedua sampai kesembilan. Pengambilan serum darah dilakukan pada minggu pertama sebagai pre-imunisasi dan minggu keempat hingga minggu kesepuluh. Serum diuji *ouchterlony* untuk menganalisa reaksi antigen-antibodi dengan terbentuknya garis presipitasi . Uji sensitifitas dilakukan pada serum pre imunisasi dan serum ke III. Karakterisasi bakteri *Escherichia coli* dilakukan dengan membandingkan

konsentrasi IPTG 0 dan 0.5 mM yang akan diamati setiap dua jam sekali dengan mengukur *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer ($\lambda = 600$ nm). Deteksi protein Wee1 dilakukan dengan mengekstraksi bakteri *Escherichia coli* dan tanaman padi kemudian dilakukan analisa *western blot* untuk mengetahui adanya pita protein Wee1 menggunakan serum antibodi poliklonal.

Hasil penelitian pembuatan antibodi berhasil dilakukan yang menghasilkan total serum 24.700 uL baik serum pre imun hingga serum minggu kesepuluh. Serum selanjutnya dilakukan *uji ouchterlony* yang menunjukkan adanya garis presipitasi sangat tipis pada serum pre imun dan serum pertama kemudian mulai menebal pada serum kedua hingga kelima. Garis presipitasi mulai tipis pada serum keenam hingga serum terakhir. Serum pre imun dilakukan analisa *western blot* tetapi tidak ada pita protein yang terlihat. Serum ketiga menunjukkan bahwa sensitifitas antibodi poliklonal Wee1 terlihat hingga konsentrasi protein Wee1 0.1 ug. Kurva pertumbuhan bakteri menunjukkan peningkatan pertumbuhan bakteri *E.coli* BL21 Wee seiring pertambahan waktu. Bakteri *E.coli* BL21 Wee tanpa induksi IPTG menunjukkan pertumbuhan lebih tinggi dibandingkan dengan penambahan IPTG 0.5 mM. Hasil *western blot* menunjukkan *crude extract* protein insoluble pada jam ke-6 dan ke-18 menunjukkan adanya pita protein Wee1. Ekspresi protein Wee1 lebih tebal dengan penambahan IPTG 0.5 mM pada perlakuan setelah 6 jam setelah ditumbuhkan. Deteksi protein Wee1 pada tanaman padi (*Oryza sativa* L.) dengan konsentrasi 30 ug menunjukkan pita protein terdeteksi pada fraksi soluble dan insoluble diseluruh bagian daun, batang, bunga, dan biji.

SUMMARY

Making Polyclonal Antibodies for Detection of Wee1 Protein in Rice Plant Cells (*Oryza sativa* L.). Ardela Alief Maulani. 171510501052: 2022: Agrotechnology Study Program. Faculty of Agriculture. Universitas of Jember.

Wee1 is a protein kinase that plays an important role in the process of cell division and also acts as an inhibitor of cell cycle checkpoints. Wee1 plays a role in phosphorylating cyclin dependent kinase 1 (CDK1) and inactivating it so that cells cannot divide. Wee1 regulation has been exploited to increase plant growth and production. Wee1 overexpression previous studies have not yet reached the analysis of protein expression, so it is necessary to manufacture antibodies to detect Wee1 protein. The construction of the Wee1 gene on the pET-28(a) plasmid and transformation was carried out on *Escherichia coli* strain BL 21. Previous studies confirmed the expression of the Wee1 gene and purified pure Wee1 protein was obtained. The purified pure Wee1 protein was used as an antigen in experimental animals to produce polyclonal antibodies.

One of the antibody-based protein analysis techniques is western blot. The research method to be carried out is the manufacture of Wee1 protein polyclonal antibodies in rabbit experimental animals by injection of Wee1 protein antigen. The injection was performed by mixing 1 mg of Wee1 recombinant protein antigen with 1 ml of Freund's Complete Adjuvant (FCA) in a ratio of 1:1. Two weeks later, a booster injection was performed by mixing 0.25 mg of Wee1 protein recombinant protein antigen with Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) 1:1 ratio of 1 ml until homogeneous. Injection of antigen in experimental animals was carried out subcutaneously from the second to the ninth week. Blood serum was taken in the first week as pre-immunization and the fourth week to the tenth week. Serum was Ouchterlony tested to analyze the antigen-antibody reaction with the formation of a precipitation line. Sensitivity test was performed on pre-immunized serum and third serum. *Escherichia coli* bacteria characterization was carried out by comparing 0 and 0.5 mM IPTG concentrations which would be observed every two hours by measuring Optical Density (OD) using a spectrophotometer ($\lambda = 600$

nm). Wee1 protein detection was carried out by extracting *Escherichia coli* bacteria and rice plants and then western blot analysis was performed to determine the presence of Wee1 protein bands using polyclonal antibody serum.

The results of the research on making antibodies were successfully carried out which resulted in a total serum of 24,700 L both pre-immune serum to serum at the tenth week. The serum was then subjected to an ouchterlony test which showed a very thin line of precipitation in the pre-immune serum and the first serum then began to thicken in the second to fifth serum. The line of precipitation starts thin in the sixth serum to the last serum. Pre-immune serum was analyzed by western blot but no protein band was seen. The third serum showed that the sensitivity of the Wee1 polyclonal antibody was visible up to the Wee1 protein concentration of 0.1 g. The bacterial growth curve showed an increase in the growth of *E.coli* BL21 Wee bacteria over time. Bacteria *E.coli* BL21 Wee without IPTG induction showed higher growth than the addition of 0.5 mM IPTG. The results of western blot showed crude extract insoluble protein at the 6th and 18th hours indicating the presence of Wee1 protein bands. Wee1 protein expression was thicker with the addition of 0.5 mM IPTG in the treatment after 6 hours after being grown. Detection of Wee1 protein in rice (*Oryza sativa* L.) with a concentration of 30 g showed protein bands were detected in soluble and insoluble fractions in all parts of leaves, stems, flowers, and seeds.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Tuhan yang Maha Esa atas rahmat, hidayah dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pembuatan Antibodi Poliklonal Untuk Deteksi Protein Wee1 pada Sel Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.)”** dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan Pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Penyelesaian penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Soetriono, M.P selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
2. Drs. Yagus Wijayanto, M.A., Ph.D., selaku Koordinator Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.
3. Prof. Ir.Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc., D.Agr.Sc, selaku Dosen Pembimbing Skripsi yang telah membimbing, mendampingi dan memberikan dukungan serta semangat dalam menyelesaikan skripsi.
4. Wahyu Indra Duwi Fanata SP., M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Penguji I yang telah memberikan saran, ilmu serta bimbingannya selama menyelesaikan skripsi ini.
5. Tri Handoyo SP., Ph.D. selaku Dosen Penguji II dan Dosen Pembimbing Akademik (DPA) yang telah memberikan arahan, saran, dan motivasi selama masa perkuliahan dan penyelesaian skripsi ini.
6. Kedua orang tua saya yang saya sayangi dan cintai Bapak Imam Hanafi dan Ibu Sri Utami serta adik saya Ibrahim Sigit Wardana yang selama ini memberikan dukungan serta doa untuk saya dalam menuntut ilmu dan menyelesaikan tugas akhir.
7. Intan Ria Nelliana S.Pd., M. Biotek., dan Ladefa Primana Oktapan SP. yang telah membantu dalam penelitian dan skripsi serta memberi arahan

dan dengan sabar mengajari metode saat penelitian sehingga penelitian berhasil.

8. Teman-teman dan keluarga besar SUGAR GROUP yang telah memberikan motivasi, bantuan dan doa dalam pengerjaan tugas akhir.
9. Teman-teman dan sahabat Risyadilla, Destya, Anggi, Uum, Nada, Rizqi Aprilia, Ainaya, Rizqi Balqis, Sintia Vira, Sukma Melati yang telah memberi semangat serta motivasi dan doa hingga terselesaikannya skripsi ini.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu oleh penulis.

Penulis telah berusaha menyelesaikan tanggung jawabnya dalam penulisan skripsi ini dengan sebaik-baiknya. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karenanya penulis berharap adanya saran dan kritik yang bersifat membangun sehingga menjadikan penulisan skripsi ini lebih baik. Semoga segala sesuatu yang tertulis di dalam skripsi ini dapat memberikan informasi bagi para pembaca.

Jember, Maret 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
HALAMAN PRAKATA	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Protein Wee1	3
2.2 Pembuatan Antibodi Poliklonal	3
2.3 Interaksi Antigen-Antibodi	5
2.4 Deteksi Protein Berbasis Antibodi	6
2.5 Hipotesis	7
BAB 3. METODE PENELITIAN	8
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	8
3.2 Alat dan Bahan	8
3.3 Prosedur Penelitian	8
3.3.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Wee1 pada Tubuh Kelinci	8
3.3.2 Uji Ouchterlony	9
3.3.3 Karakterisasi Wee1 terhadap Pertumbuhan Bakteri	10
3.3.4 Deteksi Protein Wee1	10

3.4 Variabel Pengamatan.....	12
3.5 Analisis data.....	12
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	13
4.1 HASIL PENELITIAN.....	13
4.1.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Wee1 pada Tubuh Kelinci ..	13
4.1.3 Uji Sensifitas Protein Wee1 dengan Analisa <i>Western Blotting</i>	14
4.1.4 Karakterisasi Wee1 terhadap Pertumbuhan Bakteri	15
4.1.5 Deteksi Protein Wee1 pada Bakteri Transformasi WEE dan Tanaman Padi (<i>Oryza sativa</i> L.) dengan Analisa <i>Western Blotting</i>	16
4.2 PEMBAHASAN.....	17
4.2.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Wee1 pada Tubuh Kelinci ..	17
4.2.2 Uji Ouchterlony	18
4.2.3 Uji Sensifitas Protein Wee1 dengan Analisa <i>Western Blotting</i>	18
4.2.4 Karakterisasi Wee1 terhadap Pertumbuhan Bakteri	19
4.2.5 Deteksi Protein Wee1 pada Bakteri Transformasi WEE dan Tanaman Padi.....	19
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	22
5.1 Kesimpulan	22
5.2 Saran Penelitian.....	22
DAFTAR PUSTAKA	23

DAFTAR TABEL

DAFTAR GAMBAR

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Wee1 menjadi salah satu protein kinase yang krusial selama proses pembelahan sel. Wee1 berperan sebagai inhibitor dari *checkpoint* kinase pada siklus sel, dimana terdapat tiga *checkpoint* selama proses pembelahan sel yaitu *checkpoint* G1 (gap pertama), G2 (gap kedua), dan M (mitosis) (Schmidt *et al.*, 2017). Pada proses pembelahan sel (G2 menuju M) Wee1 berperan memfosforilasi *cyclin dependent kinase 1* (CDK1) sehingga mengakibatkan sel tidak membelah dan ukuran sel semakin besar (Cook *et al.*, 2013).

Beberapa penelitian memanfaatkan regulasi Wee1 pada proses pembelahan sel dengan tujuan untuk meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman. Overekspresi Wee1 pada *Arabidopsis* diketahui menyebabkan peningkatan ukuran sel meristem apikal pada akar (Siciliano *et al.*, 2019), sedangkan overekspresi Wee1 pada tanaman padi menunjukkan peningkatan kuantitas biji padi. Karakterisasi ekspresi gen Wee1 pada tanaman padi overekspresi gen Wee1 yang dilakukan oleh Prasetyo *et al* (2018), belum sampai pada analisa ekspresi protein sehingga perlu pembuatan antibodi untuk mendeteksi protein Wee1.

Saat ini, telah dilakukan konstruksi gen Wee1 pada plasmid pET-28(a) dan telah dilakukan transformasi pada bakteri *Escherichia coli* strain BL 21. Penelitian sebelumnya mengkonfirmasi ekspresi gen Wee1 dan telah didapatkan protein Wee1 murni hasil purifikasi. Protein Wee1 murni kemudian akan digunakan sebagai antigen pada hewan coba untuk menghasilkan antibodi (Koolivand *et al.*, 2016).

Antibodi yaitu suatu immunoglobulin yang disintesis oleh tubuh atau hewan sebagai respon terhadap substansi asing yang masuk ke dalam tubuh. Molekul asing yang dapat memicu pembentukan suatu antibodi disebut antigen. Antibodi terbagi menjadi dua yaitu monoklonal yang spesifik mengikat satu epitop dan poliklonal mengikat banyak epitop (Pohanka, 2009). Antibodi dimanfaatkan untuk deteksi protein dengan memanfaatkan reaksi spesifik antigen dan antibodi. Beberapa teknik analisa protein berbasis antibodi yaitu *western blotting* (Susianti,

2019), ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) (Soliman *et al.*, 2019, Kohl and Ascoli, 2017), dan Immunoblotting dot blot (Agustina, 2017).

Berdasarkan uraian di atas dan diketahui bahwa protein Wee1 berperan penting pada proses pembelahan sel baik pada sel prokariot (bakteri) dan sel eukariot (tanaman), maka perlu dilakukan penelitian mengenai pembuatan antibodi poliklonal untuk mendeteksi protein Wee1. Pada penelitian ini akan dilakukan pembuatan antibodi Wee1 dan akan dilanjutkan dengan deteksi protein Wee1 pada sel bakteri *Escherichia coli* dan tanaman padi (*Oryza sativa*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, diketahui protein Wee1 berpengaruh terhadap proses pembelahan sel. Belum tersedianya antibodi Wee1 menjadi kendala untuk mempelajari regulasi siklus sel terutama pada organisme overekspresi Wee1 sehingga perlu dilakukan pembuatan antibodi poliklonal untuk mendeteksi protein Wee1.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan antibodi protein Wee1 yang dapat digunakan untuk mendeteksi protein Wee1 pada sel bakteri *Escherichia coli* dan tanaman padi (*Oryza sativa*).

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memperoleh antibodi poliklonal Wee1 dan digunakan untuk mendeteksi protein Wee1. Selain itu, metode pembuatan antibodi yang digunakan dapat dijadikan acuan untuk penelitian sejenis yang akan datang.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Protein Wee1

Protein Wee1 menjadi protein kinase yang keberadaannya penting selama siklus sel berlangsung. Wee1 diketahui dapat mengontrol ukuran sel (pembesaran ukuran sel) dan mengatur proses pembelahan sel (Gonzales *et al.*, 2007). Rendahnya ekspresi Wee1 pada sel mengakibatkan sel berukuran kecil karena pembelahan sel meningkat, sedangkan ekspresi Wee1 yang berlebih akan mengakibatkan sel mengalami pembesaran karena terhambatnya pembelahan sel (Prasetyo *et al.*, 2018). Penghambatan Wee1 dapat berpengaruh terhadap proses siklus sel, hal ini juga berpengaruh terhadap aktivitas ATR (ATM- dan Rad3-related) dan CHK1 ketika adanya kerusakan DNA atau RNA. Adanya penghambatan Wee1 membutuhkan kinase 1 dan 2 yang keberadaannya tergantung pada *cyclin* (CDK1/2) dan kinase (Plk1) sehingga aktivitas siklus sel akan tetap berjalan hingga fase mitosis (Saini *et al.*, 2015).

Protein Wee1 menjadi protein kinase yang menghambat dan menginaktivasi CDK1 atau CYCB dengan cara fosforilasi pada *checkpoint* G2/M selama siklus sel. Wee1 juga memiliki keterlibatan dalam kerusakan DNA pada sel dimana adanya sensor ATM (ataxia-telangiectasia) atau ATR (ATM- dan Rad3-related) yang memberikan sinyal keberadaan DNA yang rusak. ATR atau ATM kemudian akan memfosforilasi CHK1 dan CHK1 memfosforilasi Wee1 sehingga CDK1 atau CYCB menjadi inaktiv dan sel tidak akan membelah (Cabral *et al.*, 2020). Adanya protein lain yang berperan dalam siklus sel yaitu CDC25 akan membalikkan penghambatan fosforilasi CDK1 oleh kinase Wee1 sehingga sel akan memasuki fase mitosis dan menghasilkan sel anakan (Kellogg, 2003).

2.2 Pembuatan Antibodi Poliklonal

Pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan menginjeksikan protein yang akan digunakan sebagai antigen ke dalam tubuh hewan percobaan. Pemilihan hewan percobaan perlu diperhatikan karena berpengaruh terhadap produksi antibodi yang dihasilkan. Hewan percobaan yang biasa digunakan dalam

pembuatan antibodi poliklonal adalah kelinci (Darsono *et al.*, 2018). Kelinci betina lebih banyak dimanfaatkan karena lebih jinak sedangkan kelinci jantan lebih sulit dikendalikan. Kelinci betina juga sensitif terhadap antigen dengan dosis rendah serta respon imunisasi lebih lama. Penggunaan kelinci muda memiliki keuntungan tersendiri dalam memproduksi antibodi poliklonal karena sistem kekebalan tubuh masih baik dibandingkan dengan kelinci tua (Hutu *et al.*, 2019).

Proses injeksi protein ke dalam tubuh hewan perlu adanya pemberian adjuvant untuk meningkatkan, mempercepat, dan memperpanjang respon imun spesifik terhadap antigen. Pemberian adjuvant sangat penting dalam pembuatan antibodi poliklonal yang dapat menyebabkan antigen dilepas sedikit demi sedikit (Fatimah *et al.*, 2018). Adjuvant yang digunakan untuk pembuatan antibodi seperti *incomplete adjuvant* (Sigma), aluminium hidroksida (AH) (Sigma), dan *immunostimulating complex* (Iscoms) dan *Adjuvant Freund's*. *Adjuvant Freund's* salah satu adjuvant yang banyak digunakan dalam pembuatan antibodi poliklonal karena yang sangat kuat dalam merangsang respon antibodi dalam waktu lama (Suartha *et al.*, 2011). Penggunaan *Freund's complete adjuvant* dan *Freund's incomplete adjuvant* digunakan pada tahap injeksi pertama dan kedua dalam pembuatan antibodi poliklonal (Bunyamin *et al.*, 2017).

Freund's complete adjuvant (FCA) mengandung Mycobacteria yang dapat menarik makrofag dan memulai respon imun yang tahan lama dengan diperantara sel. FCA ini biasa digunakan dalam meningkatkan respon imunisasi primer dalam membantu retensi antigen untuk waktu yang lama (Barinova *et al.*, 2017). *Freund's incomplete adjuvant* (FIA) digunakan untuk injeksi sekunder dan *booster* yang bertujuan dalam menghindari inflamasi dan lesi akibat pembentukan granuloma. Kedua *adjuvant* ini mengandung minyak mineral dalam mengangkut antigen pada sistem limfatik (Delahaut, 2017).

Freund's Adjuvant dihomogenkan dengan protein rekombinan dan diinjeksikan secara subkutan atau dibawah kulit pada punggung kelinci. Hal ini bertujuan agar antigen yang diinjeksikan akan dilepas secara perlahan ke dalam peredaran darah hewan coba (kelinci) (Darsono *et al.*, 2018). Menurut Swacita (2015). Injeksi pertama kali telah membentuk antibodi dengan merangsang sel B

dan sel memori yang biasa disebut sebagai respon primer tetapi jumlah antibodi tidak banyak. Respon primer akan membentuk immunoglobulin M (IgM) pada sel plasma. Injeksi selanjutnya (booster) dapat meningkatkan antibodi yang terbentuk hal ini karena antigen telah dikenali sel B secara spesifik, proses ini merupakan respon sekunder dari terbentuknya antibodi. Respon sekunder akan membentuk immunoglobulin G (IgG) dan meningkatkannya dimana sebelumnya produksi IgM telah menurun (Hardjo *et al.*, 2015).

2.3 Interaksi Antigen-Antibodi

Antigen yaitu zat atau senyawa asing yang memicu pembentukan antibodi serta dapat bereaksi secara spesifik terhadap antibodi yang telah dipicu pembentukannya oleh antigen yang sesuai. Bagian dari antigen dapat mengikat maupun berikatan dengan antibodi atau reseptor biasa disebut epitop. Sebagian dari protein dan polisakarida tidak semua dapat dikenal sebagai antigen terhadap antibodi atau reseptor tertentu (Nguyen, 2018). Kadar optimal protein dalam antigen sangat diperlukan sehingga pita protein yang baik dapat dihasilkan. Zat atau molekul asing ini dapat bereaksi spesifik terhadap antibodi yang telah dipicu pembentukannya. Antibodi diartikan sebagai protein dari hasil respon dari adanya infeksi atau imunisasi dan akan beraksi dengan epitop dari antigen yang spesifik. Antibodi terbagi menjadi dua yaitu antibodi monoklonal dan antibodi poliklonal dimana perbedaannya yaitu banyaknya epitop yang diikat (Fanani *et al.*, 2020).

Tingginya afinitas suatu antibodi dapat membentuk sistem imun yang lebih kompleks sedangkan rendahnya afinitas antibodi dapat menyebabkan reaksi silang antara epitop antigen lain pada antigen yang relatif kecil. Interaksi antigen-antibodi biasa digunakan untuk diagnostik dan akan dilakukan penentuan interaksi secara *in vitro* (Fiddiyamti *et al.*, 2018). Antibodi dapat diukur tingkat spesifitas dan sensitifitasnya dengan analisa Western blotting. Penentuan spesifitas antibodi berdasarkan dari kemampuan antibodi tersebut dalam menganali epitop spesifiknya. Tingginya spesifitas yang dimiliki oleh antibodi juga dapat mengurangi adanya reaksi silang. Tingkatan spesifitas antibodi diketahui dari ada atau tidaknya interaksi antibodi dan antigen dalam lingkungan yang jumlahnya

beragam (Fanani *et al.*, 2020). Sensitifitas antibodi dapat ditentukan dari adanya interaksi antara antibodi dengan variasi jumlah antigennya. Sensitifitas antibodi memiliki parameter penentuan berdasarkan dari level deteksi antibodi terhadap antigen. Tingkatan sensitifitas antibodi juga berbeda hal ini tergantung dari jumlah antibodi primer dan jenis protein yang digunakan sebagai antigen (Hermanto, 2007).

Keberadaan antibodi dan antigen akan diuji lanjut untuk mengetahui adanya interaksi antigen dan antibodi yang terbentuk salah satunya menggunakan uji ouchterlony (Maboudi *et al.*, 2017). Interaksi antigen-antibodi dapat terjadi ketika reaksi imun, dimana antigen akan memicu pembentukan antibodi. Antibodi akan berikatan secara spesifik dengan antigen yang sesuai sehingga interaksi antigen-antibodi dapat terjadi. Terjadinya interaksi antigen-antibodi yang diuji ouchterlony akan menunjukkan adanya garis presipitasi yang artinya ikatan antigen-antibodi sesuai dan spesifik sehingga akan bermigrasi kearah satu sama lain pada gel (Hardjo *et al.*, 2015).

2.4 Deteksi Protein Berbasis Antibodi

Analisa deteksi protein yang menggunakan antibodi terdiri dari berbagai macam seperti DBIA (*dot blot immunoassay*), ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), dan *Western Blotting*. Deteksi protein dengan ketiga metode tersebut tentu memiliki kegunaan dalam pengujian keberadaan antibodi yang telah dibuat. Deteksi DBIA menjadi salah satu metode deteksi yang hasilnya berupa noktah berwarna coklat, warna coklat tersebut muncul ketika substrat DAB (dimetilaminobenzidin) telah bereaksi (Fusvita dkk., 2016). Metode deteksi DBIA menjadi salah satu metode yang ekonomis khususnya dalam biaya reagen dengan antibodi primer spesifik sebagai komponen utama. Metode ini memberi data yang akurat untuk tujuan titering virus (Cheng *et al.*, 2019).

Metode deteksi lain yaitu ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) menjadi metode yang paling banyak digunakan dimana memiliki tingkat sensitivitas dan spesifitas (Cheng *et al.*, 2019). ELISA *competitive assay* salah satu jenis ELISA yang menggunakan konjugat antigen-enzim atau antibodi-enzim

sedangkan ELISA *non-competitive assay* menggunakan dua antibodi atau biasa disebut ELISA *sandwich*. ELISA dapat dimanfaatkan dalam pemeriksaan sampel jumlah besar dan waktu yang singkat. Penggunaan protein rekombinan pada metode ELISA sebagai antigen menunjukkan sensitivitas dan spesifitas dibandingkan dengan ELISA kit yang tersedia dipasaran (Muflikhah dan Artama, 2017). Reaksi ELISA dapat memperoleh reaksi yang lebih spesifik dengan adanya konsentrasi antibodi rendah dari cara pengenceran antibodi 100-200 kali (Dalimunthe *et al.*, 2017). Reaksi positif pada ELISA dapat dilihat dari warna pada sumuran karena adanya reaksi antar enzim label pada antibodi substrat dan substrat (Nugroho dkk, 2015).

Western blotting menjadi metode deteksi antibodi spesifik pada protein berupa antigen dengan berat molekul tertentu yang dapat dilihat dari adanya band. Tahapan dalam *Western blotting* terdiri dari persiapan sampel, elektroforesis gel, transfer, *blocking and binding*, deteksi dan analisis protein. *Western blotting* memiliki prinsip kerja yaitu pemindahan makromolekul dari gel *polyakrilamida* ke atas membran nitroselulosa setelah adanya proses elektroforesis dengan tegangan listrik tertentu (Bass *et al.*, 2017). Keuntungan *Western blotting* salah satunya sangat efektif dalam mendeteksi antigen ukuran kecil yang mengandung banyak protein pada suatu larutan (Fanani dkk, 2020). Deteksi menggunakan metode *Western blotting* terdapat tahapan yang sangat penting yaitu pencucian yang berfungsi dalam meminimalkan *background* pada membran nitroselulosa dan menghilangkan antibodi yang tidak terikat (Mahmood and Yang, 2012). Tahapan *blocking* pada *Western blotting* biasanya menggunakan *skim milk* karena mudah didapat dan ekonomis. Penggunaan *skim milk* berfungsi untuk mengikat bagian non spesifik juga dapat menghilangkan semua *background* tanpa mengubah adanya interaksi protein target yang akan terikat dengan antibodi (Susianti dkk, 2019).

2.5 Hipotesis

Terbentuknya antibodi protein Wee1 pada hewan coba setelah diinjeksi dengan antigen berupa protein Wee1 yang telah dimurnikan.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, Center for Development of Advanced Science and Technology (CDAST) Universitas Jember mulai bulan April hingga Juni 2021.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan mikropipet, tip, erlenmeyer, microwave, incubator, sonicator, sentrifugator, spin, vortex, perangkat elektroforesis, timer, autoklaf, timbangan elektrik, tabung ukur, gelas ukur, mortar-stamper, lemari pendingin. Bahan yang digunakan protein Wee1, *Freund's complete adjuvant* (FCA) dan *Freund's incomplete adjuvant* (FIA), agarose 1%, *buffer solution*, pewarna *Commassie Brilliant Blue* (CBB) 1%, *buffer loading*, TBS (*Tris Buffered Saline*), skim milk, membran *nitrocellulose*, antibodi sekunder (*Alkaline phosphate Goat-Anti IgG Rabbit conjugate*), buffer alkali phospat pH 9,5, BCIP (*5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*), NBT (*nitro-bluetetrazolium chloride*).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Wee1 pada Tubuh Kelinci

Pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan menginjeksi antigen yang berupa protein rekombinan protein Wee1 ke dalam tubuh kelinci. Satu minggu sebelum injeksi dilakukan pengambilan serum darah pre-imunisasi dari pembuluh vena telinga kelinci. Injeksi dilakukan dengan mencampur antigen protein rekombinan Wee1 sebanyak 1 mg dengan *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) sebanyak 1 ml perbandingan 1:1 sampai homogen, kemudian diinjeksikan pada bagian bawah kulit (subkutan) punggung kelinci. Dua minggu setelahnya dilakukan booster injeksi dengan mencampur antigen protein rekombinan protein Wee1 sebanyak 0.25 mg dengan *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA) perbandingan 1:1 sebanyak 1 ml sampai homogen hingga seterusnya setiap satu

minggu sekali sesuai dengan frekuensi injeksi antigen pada tabel 3.1 (Darsono *et al.*, 2018).

Tabel 3.1 Frekuensi Injeksi antigen dengan *adjuvant* dan pengambilan serum pada kelinci

No.	Minggu ke-	Jenis Adjuvant (ml)	Dosis Antigen (mg)	Pengambilan serum
1	I	-	-	Pre-imunisasi
2	II	FCA 1 ml	1	-
3	III	FIA 1 ml	0.25	-
4	IV	FIA 1 ml	0.25	Serum I
5	V	FIA 1 ml	0.25	Serum II
6	VI	FIA 1 ml	0.25	Serum III
7	VII	FIA 1 ml	0.25	Serum IV
8	VIII	FIA 1 ml	0.25	Serum V
9	IX	FIA 1 ml	0.25	Serum VI
10	X	-	-	Serum VII & VIII

3.3.2 Uji Ouchterlony

Analisis *ouchterlony* dilakukan untuk menganalisa adanya reaksi antigen-antibodi dengan melarutkan agarose 1% dengan *buffer* PBS (*phosphate-buffered saline*) yang terdiri dari 0.137 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 0.01 M Na₂HPO₄ yang mengandung 0.05% NaN₃. Larutan dipanaskan dengan *microwave* sampai homogen kemudian dituang ke dalam gelas kaca sampai merata keseluruhan permukaan dan larutan dibiarkan hingga dingin dan membeku. Kemudian dibuat sumuran dengan diameter 2-3 mm dan jarak antar sumuran 0,5 cm. Larutan antigen dan antibodi dimasukkan ke dalam sumuran secara berdampingan dan diinkubasi selama 2 hari kemudian diamati. Garis presipitasi yang terbentuk diantara sumuran antibodi dan antigen diwarnai dengan menggunakan pewarna *Commassie Brilliant Blue* (CBB) 1% (Hornbeck, 2017).

3.3.3 Karakterisasi Wee1 terhadap Pertumbuhan Bakteri

Koloni tunggal bakteri *Escherichia coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a) ditumbuhkan dalam 3 ml media LB cair yang mengandung antibiotik kanamisin 50 ppm sebagai starter dan digojok selama 18 jam pada suhu 37 °C. Bakteri diambil sebanyak 1 ml starter ke dalam erlenmeyer berisi 50 ml medium LB cair yang mengandung kanamisin 50 ppm dan digojok dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 4 jam. Kemudian diinduksi dengan IPTG konsentrasi 0 mM dan 0.5 mM dan dipindah pada suhu 37 °C, sampling dilakukan setiap 2 jam sekali pada jam ke-0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, dan 18 untuk dilakukan pengukuran pertumbuhannya dengan mengukur *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer ($\lambda = 600$ nm) serta dibuat kurva pertumbuhan bakteri *E.coli* (Wulansari *et al.*, 2019).

3.3.4 Deteksi Protein Wee1

a. Ekstraksi protein pada Bakteri *Escherichia coli*

Ekstraksi protein pada Bakteri *Escherichia coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a) dilakukan dengan menggunakan pelet sel bakteri hasil karakterisasi pada jam ke-6 dan jam ke-18. Pelet ditambahkan buffer sonikasi (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl) 3x volume lalu dicampur dengan cara pipeting. Kemudian dilakukan sonikasi selama 30 detik 6 kali dengan jeda selama 30 detik. Sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C, maka akan menghasilkan pelet dan supernatan. Supernatan dibuang dan pelet ditambahkan buffer NDPI (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 8 M Urea) 2x volume lalu campur dengan cara pipeting. Disonikasi selama 30 detik 2 kali dengan jeda selama 30 detik. Kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit pada suhu ruang. Supernatan dan pelet disimpan untuk selanjutnya di analisa *Western blot* (Boynak *et al.*, 2013).

b. Ekstraksi protein pada tanaman padi

Ekstraksi protein dilakukan dengan menghaluskan 1 gram daun, batang, bunga dan biji tanaman padi dengan mortar-stumpler serta penambahan sedikit demi sedikit nitrogen cair. Kemudian menambahkan 3 mL buffer ekstraksi yaitu

50 mM MOPS, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 1 mM PMSF, PVP. Sampel tersebut disentrifus pada kecepatan 16.000 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan disimpan untuk analisa atau deteksi western blot. Pelet yang diperoleh disolubelisasi dengan buffer 50 mM Tris, 1mM EDTA, 30% Sucrose, DTT dan SDS 2 % dan disentrifugasi selama 10 menit, 14.000 rpm suhu ruang untuk mendapatkan supernatan (soluble) dan pelet. Supernatan tersebut disimpan dalam freezer -80 untuk kemudian dianalisis SDS-PAGE dan western blot (Hardjo *et al.*, 2015).

c. Western blot

Deteksi antibodi poliklonal protein Wee1 pada bakteri dilakukan dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) pada variasi konsentrasi sampel protein Wee1 murni yaitu 0,001, 0,01, 0,1, dan 1 µg. Deteksi protein Wee1 pada bakteri *Escherichia coli* BL21 Wee1 full- PET-28(a) yang diukur *Optical Density* (OD) selama 2 jam sekali dan pada tanaman padi dilakukan dengan memasukkan 30 µg sampel crude ekstrak tanaman yang diekstraksi dari daun, batang, bunga, dan biji. Kemudian ditambahkan *buffer loading* dengan perbandingan 1:1, kemudian didenaturasi selama tiga menit. Sampel yang sudah dipanaskan dimasukkan ke dalam sumuran gel dan di *running* pada 80 volt selama 2,5 – 3 jam. Protein yang telah dipisahkan dengan SDS-PAGE kemudian ditransfer ke membran *nitrocellulose* pada aliran listrik sebesar 0.1 A, 4W, dan 25 Volt selama 1.5 jam. Membran dicuci dengan TBS (*Tris Buffered Saline*) sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit. Setelah dicuci, protein pada membran di *blocking* dengan cara direndam pada 1% skim milk dalam TBS selama 30 menit. Deteksi antigen protein Wee1 dilakukan dengan inkubasi membran yang diberi antibodi poliklonal protein Wee1 pada *shaker overnight*. Membran dicuci kembali dengan TBS sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian diberi antibodi sekunder (*Alkaline phosphatase Goat-Anti IgG Rabbit conjugate*) dalam TBS skim milk dan diinkubasi selama 1.5 jam. Sebelum pewarnaan, membrane dicuci lagi dengan TBS dan buffer alkali phospat pH 9,5. Pewarnaan dilakukan dengan 25 µl BCIP (*5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*) dan 50 µl NBT (*nitro-bluetetrazolium chloride*) yang dilarutkan dalam 10 ml

buffer alkali phospat. Pita protein yang terbentuk merupakan pita protein Wee1 (Darsono *et al.*, 2018).

3.4 Variabel Pengamatan

Variabel pengamatan pada penelitian ini diantaranya:

1. Hasil uji *ouchterlony*
Hasil uji dilihat dari adanya garis presipitasi pada sampel serum darah yang telah diinduksi protein rekombinan Wee1
2. Karakterisasi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*
Hasil karakterisasi dilihat dari adanya perbedaan kurva pertumbuhan pada konsentrasi IPTG 0 mM dan 0.5 mM
3. Analisis *Western blot*
Hasil analisis *Western blot* pada sel tanaman padi dan sel bakteri *Escherichia coli* menunjukkan adanya band protein Wee1 menggunakan serum antibodi poliklonal

3.5 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian akan dianalisis dengan menggunakan analisis deskriptif yaitu dengan penyajian setiap variabel pengamatan secara visual

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 HASIL

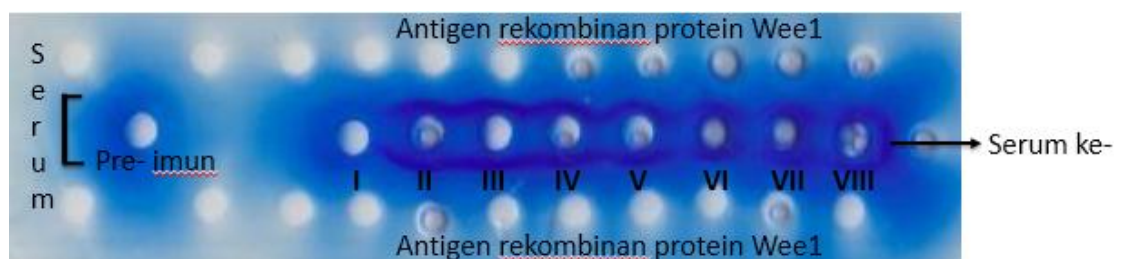
4.1.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Wee1 pada Tubuh Kelinci

Pembuatan antibodi poliklonal protein Wee1 didapatkan dari hewan uji coba kelinci yang telah diinjeksi dengan antigen protein Wee1. Pengambilan serum darah dilakukan pada minggu pertama sebagai serum pre-imunisasi dan pengambilan serum darah dilakukan kembali pada minggu ke empat hingga minggu ke sepuluh. Hasil serum yang didapatkan berbeda-beda tergantung dari kondisi hewan uji coba saat proses pengambilan. Total hasil serum yang didapatkan dari produksi antibodi poliklonal protein Wee1 pada hewan uji coba kelinci sebanyak 24.700 µl dengan rincian pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Daftar perolehan pengambilan serum darah kelinci

No	Minggu ke-	Serum	Volume serum
1.	I	Pre-imun	600 µl
2.	II	-	-
3.	III	-	-
4.	IV	I	750 µl
5.	V	II	1200 µl
6.	VI	III	1400 µl
7.	VII	IV	2250 µl
8.	VIII	V	3000 µl
9.	IX	VI	4000 µl
10.	X	VII	5500 µl
		VIII	6000 µl

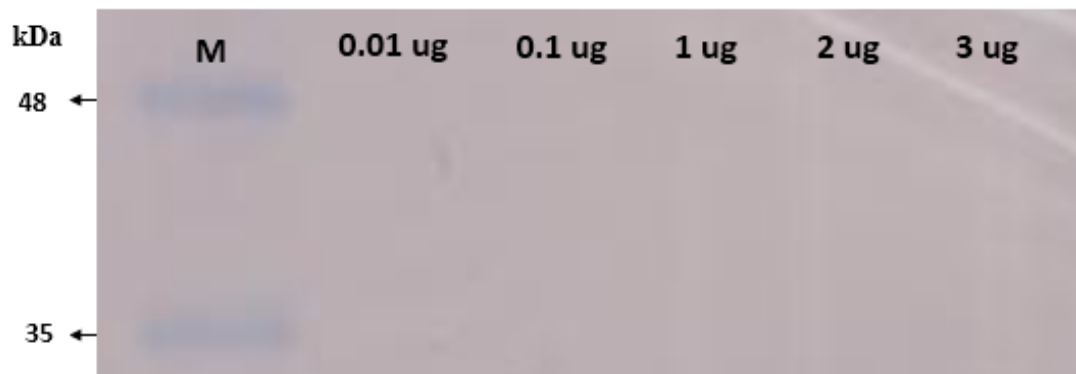
4.1.2 Uji Ouchterlony



Gambar 4.1 Uji Ouchterlony dengan 10 μ l antigen rekombinan protein Wee1 pengambilan serum setiap minggu (Minggu ke-1 sebagai pre imunisasi dan minggu ke-4 sampai minggu ke-10 setelah injeksi pertama).

Uji ouchterlony pada gambar 4.1 menunjukkan adanya garis presipitasi pada semua serum. Serum pertama menunjukkan bahwa garis presipitasi masih sangat tipis dan pada serum kedua hingga kelima semakin tebal. Garis presipitasi mulai tipis pada serum keenam hingga serum terakhir. Adanya garis presipitasi yang sangat tipis pada serum pre imunisasi akan di analisa dengan *Western blot* untuk memastikan belum terbentuknya antibodi Wee1 pada hewan coba. Serum ketiga sebagai serum dengan presipitasi paling tebal digunakan untuk analisa *Western blot* pada bakteri *Eschericia coli* dan tanaman padi (*Oryza sativa* L.).

4.1.3 Uji Sensifitas Protein Wee1 dengan Analisa *Western Blotting*



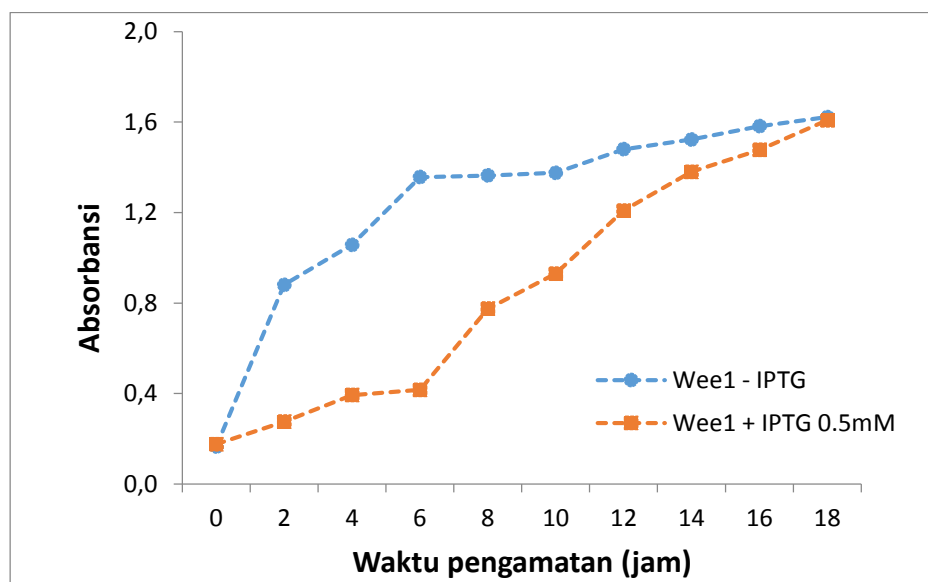
Gambar 4.2 Analisa Western blot antigen protein Wee1 pada serum pre-imunisasi



Gambar 4.3 Analisa Western blot antigen protein Wee1 pada serum ke-III

Deteksi antibodi poliklonal protein Wee1 yang dilakukan pada protein rekombinan Wee1 murni hasil purifikasi dengan menggunakan serum pre-*imunisasi* (Gambar 4.2) tidak menunjukkan adanya pita protein Wee1. Konfirmasi deteksi antibodi poliklonal protein Wee1 juga dilakukan dengan menggunakan serum ke-III (Gambar 4.3) pada antigen yang sama menunjukkan pita protein pada konsentrasi 0.1 ug, 1 ug, 2 ug, dan 3 ug. Hasil tersebut menunjukkan bahwa antibodi poliklonal WEE dapat mendeteksi protein WEE dengan konsentrasi minimal 0.1 ug.

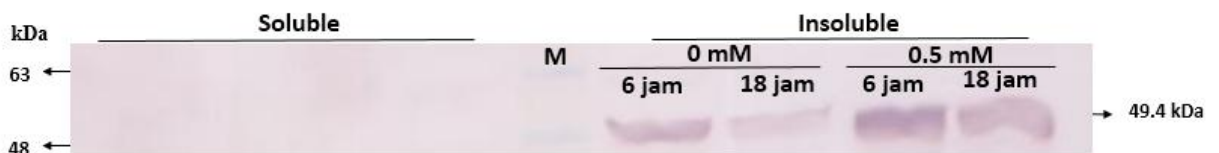
4.1.4 Karakterisasi Wee1 terhadap Pertumbuhan Bakteri



Gambar 4.4 Grafik pertumbuhan *Bakteri Escherichia coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a)

Karakterisasi protein Wee1 pada bakteri *Escherichia coli* BL21 Wee1 full (gambar 4.4) diamati pertumbuhan bakteri dengan spektrofotometer ($\lambda = 600$ nm) selama dua jam sekali hingga 18 jam. Pengamatan dilakukan dengan penambahan IPTG konsentrasi 0.5 mM sebagai induser ekspresi Wee dan tanpa IPTG. Kurva pertumbuhan bakteri menunjukkan peningkatan pertumbuhan bakteri *E. coli* BL21 Wee seiring pertambahan waktu. Bakteri *E. coli* BL21 Wee tanpa induksi IPTG menunjukkan pertumbuhan lebih tinggi dibandingkan dengan penambahan IPTG 0.5 mM.

4.1.5 Deteksi Protein Wee1 pada Bakteri Transformasi WEE dan Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.) dengan Analisa *Western Blotting*



Gambar 4.5 Deteksi protein WEE pada Bakteri *Escherichia coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a) menggunakan analisa *Western blot*

Deteksi protein Wee1 pada bakteri *Escherichia coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a) menggunakan antibodi poliklonal. Hasil *western blot* menunjukkan *crude extract* protein insoluble pada jam ke-6 dan ke-18 menunjukkan adanya pita protein Wee1. Ekspresi protein Wee1 lebih tebal dengan penambahan IPTG 0.5 mM pada perlakuan setelah 6 jam setelah ditumbuhkan.



Gambar 4.6 Deteksi protein WEE pada tanaman padi (*Oryza sativa* L.) menggunakan antibodi poliklonal serum ke-III

Deteksi protein Wee1 pada tanaman padi (*Oryza sativa* L.) dengan konsentrasi 30 ug menunjukkan pita protein terdeteksi pada fraksi soluble dan insoluble diseluruh bagian daun, batang, bunga, dan biji.

4.2 PEMBAHASAN

4.2.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Wee1 pada Tubuh Kelinci

Pembuatan antibodi poliklonal Wee1 pada hewan uji coba kelinci galur New Zealand White yang berusia kurang lebih 3 bulan dilakukan dengan menginjeksi protein murni hasil purifikasi menggunakan resin Ni-NTA. Penelitian pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan mencampurkan antigen protein Wee1 dengan adjuvant. Adjuvant yang digunakan yaitu *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) dan *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA) (Park and Choi, 2018). Injeksi pertama menggunakan *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) sebanyak 1 mg dan injeksi kedua atau booster menggunakan *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA) sebanyak 0.25 mg. FCA digunakan sebagai adjuvant untuk injeksi primer karena mengandung adanya mikobakteria sehingga imunogenitas akan meningkat. FIA digunakan untuk injeksi sekunder karena hanya mengandung campuran minyak dan air (Trott *et al.*, 2008).

Adanya *adjuvant* yang dihomogenkan dengan antigen berupa protein murni Wee1 dapat membantu meningkatkan respon imun terhadap antigen protein Wee1. Campuran antigen dan *adjuvant* kemudian akan diinjeksikan pada hewan coba kelinci secara subkutan atau di bawah kulit (Greenfield, 2020). Cara penginjeksian secara subkutan pada punggung hewan coba dengan sedikit dicubit dan disuntikkan antigen yang telah dihomogenkan dengan *Freund's adjuvant* (Nugroho, 2018). Injeksi secara subkutan memiliki fungsi agar antigen yang telah diinjeksikan tidak langsung lepas ke dalam peredaran darah (Askar *et al.*, 2020). Injeksi dilakukan sebanyak delapan kali dimulai pada minggu kedua hingga minggu kesembilan. Minggu kedua injeksi FCA dan minggu ketiga sampai kesembilan dilakukan booster berupa injeksi FIA (Kusumaningsih, 2020). Serum darah akan diambil melalui vena telinga kelinci yang menghasilkan serum pre imunisasi dan serum pertama hingga kedelapan.

4.2.2 Uji Ouchterlony

Keseluruhan serum dilakukan uji ouchterlony (Gambar 4.1) hasil menunjukkan adanya garis presipitasi pada serum ke- 1 hingga ke- 8. Garis presipitasi tersebut menunjukkan adanya ikatan antara antigen Wee1 yang diinjeksikan dengan antibodi spesifik Wee1 yang dihasilkan pada serum darah hewan coba (Duong *et al.*, 2021). Serum ke-1 diambil pada minggu keempat setelah dilakukan booster kedua dan terlihat adanya garis presipitasi yang sangat tipis, hal ini menunjukkan bahwa serum ke-1 memiliki titer antibodi yang masih rendah. Serum ke-2 hingga ke-5 menunjukkan adanya garis presipitasi yang tebal dan artinya titer antibodi semakin meningkat. Serum ke-6 hingga serum ke-8 menunjukkan semakin menipisnya garis presipitasi dan cenderung mengalami penurunan antibodi yang dihasilkan (Hardjo *et al.*, 2015). Semakin tipisnya garis presipitasi mempengaruhi rendahnya titer antibodi dan sensitifitas yang dihasilkan. Rendahnya titer antibodi terjadi karena kandungan *adjuvant* semakin inaktif sehingga proses pelepasan antigen semakin lambat (Kencana *et al.*, 2017).

4.2.3 Uji Sensifitas Protein Wee1 dengan Analisa *Western Blotting*

Gambar 4.2 menunjukkan tidak adanya pita protein yang terbentuk sehingga dapat diindikasikan bahwa pada serum pre imun tidak ada antibodi poliklonal. Tidak adanya antibodi poliklonal Wee1 mengakibatkan antigen protein Wee1 tidak mampu diikat sehingga pita protein tidak terbentuk pada membran *nitrocellulose* (Kencana *et al.*, 2015). Analisa *Western blot* pada antigen protein rekombinan pada serum ke-III (Gambar 4.3) dengan variasi konsentrasi protein antigen 0.01 ug, 0.1 ug, 1 ug, 2 ug, dan 3 ug dengan diencerkan 3000 kali. Sensitifitas antibodi poliklonal Wee1 terdeteksi hingga konsentrasi 0.1 ug pada berat molekul 38.39 kDa. Antibodi poliklonal Wee1 tidak terdeteksi pada konsentrasi 0.01 ug karena antibodi tersebut memiliki tingkat sensitifitas minimal 0.1 ug.

4.2.4 Karakterisasi Wee1 terhadap Pertumbuhan Bakteri

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa pertumbuhan Wee1 pada bakteri *E.coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a) dengan induksi IPTG konsentrasi 0 mM lebih tinggi dari 0.5 mM. Hal ini karena adanya IPTG pada konsentrasi 0.5 mM yang diberikan menghasilkan ekspresi protein Wee1 lebih banyak, sehingga bakteri *E.coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a) memiliki kepadatan sel lebih rendah dibandingkan non IPTG atau konsentrasi 0 mM. Induksi IPTG sebagai inducer bertujuan untuk meningkatkan ekspresi protein pada protein rekombinan. Ketika bakteri *E.coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a) diinduksi dengan IPTG maka ekspresi protein semakin tinggi namun kepadatan sel rendah (Hermana *et al.*, 2015). Kurva pertumbuhan bakteri *E.coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a) merepresentasikan siklus pertumbuhan bakteri dari fase lag, eksponensial hingga stasioner.

4.2.5 Deteksi Protein Wee1 pada Bakteri Transformasi WEE dan Tanaman Padi

Analisa *Western blot* dilakukan pada protein rekombinan Wee1. Bakteri *E.coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a) dan pada tanaman padi (*Oryza sativa* L.). Analisa *Western blot* dilakukan untuk menguji antibodi poliklonal yang dihasilkan terhadap antigen (Seenichamy *et al.*, 2014). Serum pre imun dan serum ke- III digunakan pada analisa *Western blot*. Serum pre imun diuji untuk memastikan belum terbentuknya antibodi poliklonal Wee1 pada hewan uji coba sebelum injeksi. Serum ke- III dipilih karena pada hasil uji outherlony (Gambar 4.1) garis presipitasi yang paling tebal terdapat pada serum ke- III. Antibodi poliklonal Wee1 juga digunakan untuk analisa pada bakteri *E.coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a) yang diukur pertumbuhannya selama 2 jam sekali. Gambar 4.5 menunjukkan bahwa antibodi poliklonal Wee1 terdeteksi pada fraksi insoluble dengan berat molekul 49.4 kDa. Penambahan IPTG pada konsentrasi 0.5 mM menunjukkan pita protein yang lebih tebal dibandingkan tanpa penambahan IPTG. Protein Wee1 lebih banyak terekspresi karena adanya penambahan IPTG dan ekspresi protein Wee1 lebih sedikit terekspresi pada bakteri tanpa IPTG (Choi *and*

Geletu, 2018). Variasi ekstraksi bakteri pada 6 jam dan 18 jam waktu pertumbuhan juga berpengaruh pada pita protein hasil analisa *Western blot*. Pita protein 6 jam pertumbuhan lebih tebal dibandingkan 18 jam pertumbuhan. Hal ini berkaitan dengan waktu inkubasi yang berbanding lurus dengan kepadatan sel yang dihasilkan (Hermana *et al.*, 2015). Waktu inkubasi 6 jam menunjukkan bakteri berada pada fase log atau eksponensial dimana bakteri sudah beradaptasi dengan baik sehingga pertumbuhannya mulai lebih cepat. Sama halnya dengan bakteri yang diinduksi IPTG pada 6 jam setelah induksi terekspresi lebih tebal dari pada non IPTG dilihat dari protein hasil *Western blot* (Gambar 4.5), sedangkan pada 18 jam IPTG dan non IPTG setelah induksi terekspresi lebih rendah atau pita protein terlihat lebih tipis hal ini memungkinkan bakteri telah berada pada fase stasioner dimana aktivitas metabolismenya melambat (Tyas *et al.*, 2021). Menipisnya pita protein tersebut didukung oleh penelitian Choi dan Geletu (2018), bahwa pertumbuhan sel mulai melambat pada 16 jam pasca induksi yaitu 20 dan 24 jam yang ditunjukkan pada hasil SDS-PAGE. Hal ini juga sesuai dengan penelitian Fazaell *et al* (2019), yang menunjukkan hasil protein yang terdeteksi lebih rendah setelah diinduksi selama lebih dari 16 jam.

Antibodi poliklonal Wee1 digunakan untuk deteksi WEE pada bagian bagian daun, batang, bunga dan biji tanaman padi (*Oryza sativa* L.). Protein Wee1 dirunning sebanyak 30 ug pada gel akrilamide dan ditransfer pada membran *nitrocellulose* pada analisa *Western blot*. Hasil menunjukkan bahwa antibodi poliklonal yang dihasilkan dapat mengenali dan mengikat protein Wee1 pada tanaman padi (*Oryza sativa* L.) pita protein Wee1 terlihat pada fraksi *soluble* dan *insoluble* dengan berat molekul 49.4 kDa. Adanya protein Wee1 pada tanaman padi (*Oryza sativa* L.) menunjukkan bahwa antibodi poliklonal WEE dapat mendeteksi WEE pada tanaman. Peran Wee1 sebagai protein kinase yang berpengaruh terhadap siklus sel tepatnya pada kontrol checkpoint (Cabral *et al.*, 2020). Gambar 4.6 menunjukkan bahwa ekspresi Wee1 pada daun lebih tipis dibandingkan bagian lainnya. Penggunaan bagian daun, batang dan bunga untuk konfirmasi sensitifitas antibodi poliklonal Wee1 sesuai dengan penelitian yang dilakukan Sorrel *et al* (2002) dan Ermawati dan Wibisono (2017) analisa RT-PCR

terekspresi jelas pada bunga tetapi tipis pada bagian batang dan tidak terekspresi pada bagian daun. Analisa selanjutnya dapat dikonfirmasi dengan analisa Western blot untuk melihat adanya protein Wee1 dan mampu mendeteksi protein secara akurat dan memiliki sensitifitas tinggi. Bagian biji digunakan untuk konfirmasi sensitifitas antibodi poliklonal Wee1 karena pada penelitian Sun *et al* (1999) *ZmWee1* tanaman jagung dan penelitian *LeWee1* tanaman tomat Gonzales *et al* (2007) terekspresi pada bagian biji atau buah. Beberapa penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa terekspresinya Wee1 pada bagian tanaman tersebut erat kaitannya dengan pembelahan sel dan endoreduplikasi, sehingga keberadaan Wee1 dapat bermanfaat dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan antibodi poliklonal Wee1 telah terbentuk dengan adanya garis presipitasi pada uji *ouchterlony*. Sensitifitas antibodi poliklonal Wee1 dapat mendeteksi antigen protein rekombinan Wee1 hingga konsentrasi minimal 0.1 ug. Hasil karakterisasi Bakteri *Escherichia coli* BL21 Wee1 full- pET-28(a) yang diukur selama 2 jam sekali menunjukkan bahwa antibodi dapat mendeteksi pada bakteri tanpa IPTG maupun dengan IPTG juga dibagian daun, batang, bunga, dan biji fraksi solubel dan insolubel tanaman padi dengan berat molekul 49.4 kDa.

5.2 Saran

Hasil penelitian dapat dilakukan untuk deteksi protein Wee1 pada tanaman padi dan lainnya. Proses ekstraksi pada tanaman padi memiliki kendala sehingga perlu dilakukan pemilihan metode ekstraksi yang tepat dan efektif.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, D., 2017. Deteksi Immunoglobulin G dengan Immunoblotting Pasca Imunisasi Subkutan Protein Hemagglutinin Pili *Klebsiella pneumoniae* 12, 8 kDa pada Mencit BALB/C. *Agromedicine and Medical Sciences*, 3(2): 40-46.
- Alikhani, M., Behzadian, F., Mehrbod, P., Khosravi Node, F., Shokouhi Targhi, H. and Farahmand, B., 2017. Polyclonal Antibody Against Recombinant Nucleoprotein Of The Influenza A Virus (H1N1); Production and Purification. *Iranian Journal of Virology*, 11(2), pp.36-42.
- Askar, R., Fredriksson, E., Manell, E., Hedeland, M., Bondesson, U., Bate, S., Olsén, L. and Hedenqvist, P. 2020. Bioavailability Of Subcutaneous And Intramuscular Administrated Buprenorphine In New Zealand White Rabbits. *BMC veterinary research*, 16(1): 1-10.
- Barinova, K.V.; Khomyakova, E.V.; Kuravsky, M.L.; Schmalhausen, E.V.; Muronetz, V.I. Denaturing Action Of Adjuvant Affects Specificity Of Polyclonal Antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, 482, 1265–1270.
- Bass, J.J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., and Atherton, P. J. 2017. An Overview of Technical Considerations for Western Blotting Applications to Physiological Research. *Scand J Med Sci Sports* 27: 4-25
- Boynak, N. Y., F.Rojas¹, C. D'Alessio., S. C. V. Larrea¹, V. Rodriguez., P. D. Ghiringhelli and M. T. Téllez-Iñón. 2013. Identification of a Wee1-Like Kinase Gene Essential for Procyclic *Trypanosoma brucei* Survival. *Plos One*. 8 (11) : 1-14.
- Bunyamin, M., Mulyana., dan A. M. Lusiastuti. 2017. Produksi Serum Rabbit Anti-Catfish Terhadap Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) Pada Ikan Patin Siam (*Pangasius hypophthalmus*). *JURNAL MINA SAINS*, 1(1), pp.24-33.
- Cabral, D., Banora, M.Y., Antonino, J.D., Rodiuc, N., Vieira, P., Coelho, R.R., Chevalier, C., Eekhout, T., Engler, G., De Veylder, L. and Grossi-de-Sa, M.F., 2020. The Plant WEE1 Kinase Is Involved In Checkpoint Control Activation In Nematode-Induced Galls. *New Phytologist*, 225(1), pp.430-447.
- Cook, G.S., Grønlund, A.L., Siciliano, I., Spadafora, N., Amini, M., Herbert, R.J., Bitonti, M.B., Graumann, K., Francis, D. and Rogers, H.J., 2013. Plant WEE1 Kinase Is Cell Cycle Regulated And Removed At Mitosis Via The 26S Proteasome Machinery. *Journal of experimental botany*, 64(7), pp.2093-2106.

- Cheng, L.T., Zeng, Y.J., Chu, C.Y. and Wang, H.Y., 2019. Development Of A Quick Dot Blot Assay For The Titering Of Bovine Ephemeral Fever Virus. *BMC veterinary research*, 15(1), pp.1-7.
- Choi, T.J. and Geletu, T.T. 2018. High Level Expression And Purification Of Recombinant Flounder Growth Hormone In *E. Coli*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2): 347-355.
- Dalimunthe, C.I., Tistama, R., Wahyuni, S. and Darwis, H.S., 2017. Pengembangan Teknik Serologi untuk Deteksi Dini Penyakit Jamur Akar Putih (*Rigidoporus Microporus*) pada Tanaman Karet. *Indonesian Journal of Natural Rubber Research*, 35(2), pp.129-138.
- Darsono, N., N. N. Azizah., K. M. Putranty., N. T. Astuti., H. S. Addy., W. Darmanto., and B. Sugiharto. 2018. Production of a Polyclonal Antibody against the Recombinant Coat Protein of the Sugarcane Mosaic Virus and Its Application in the Immunodiagnostic of Sugarcane. *Agronomy*, 8(6), p.93
- Delahaut, P. Immunisation—Choice Of Host, Adjuvants And Boosting Schedules With Emphasis On Polyclonal Antibody Production. *Methods* 2017, 116, 4–11.
- Duong, N.D., Nguyen-Phuoc, K.H., Do, K.Y.T., Nguyen, N.T.T., Tran, T.L. and Tran-Van, H., 2021. Production Of Polyclonal Antibody Against The Recombinant Pirbvp Protein Of *Vibrio Parahaemolyticus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1): 1-8.
- Ermawati, N and Y. Wibisono. 2017. Early Isolation of Cell Cycle-Associated Protein Kinase (*Oswee*) Gene in Rice (*Oryza ativa* L.). *Pak. J. Biotechnol. Vol*, 14(1), pp.71-76
- Fanani, F. H., Kusnoto., P. Hastutiek., M. Yunus., S. Koesdarto., dan E. Suprihati. 2020. Reaksi Silang Antigen *Haemonchus contortus* dengan Serum Anti-*Fasciola gigantica* Menggunakan Teknik Western Blot. *Parasite Science*, 4(1): 1-6.
- Fatimah, I.N., Hasan, K., Sundari, R. and Biomolekular, B.P., 2018. Profil Protein Serum Tikus Yang Diimmunisasi Menggunakan Antibodi Anti-Idiotipe Dengan Penambahan Adjuvan Kitosan.
- Fazaeli, A., Golestani, A., Lakzaei, M., Rasi Varaei, S.S. and Aminian, M. 2019. Expression Optimization, Purification, And Functional Characterization Of Cholesterol Oxidase From *Chromobacterium* Sp. DS1. *PloS one*, 14(2), p.e0212217.
- Fiddiyanti, I., M. Ramli., R. D. Soetikno., dan A. Mutalib. 2018. Afinitas Pengikatan Antibodi Monoklonaltrastuzumab terhadap *Human Epidermal Receptor-2* yang Diekspresikan Tumor Ganas Ovarium. *Sains Materi Indonesia*, 13(4): 46-51.

- Fusvita, A., R. Maryam., dan E. S. Pribadi. 2016. Karakterisasi Antibodi Poliklonal terhadap Aflatoksin M₁. *Sain Veteriner*. 34(1): 9-15.
- Gonzales, N., Gevaudant, F., Hernould, M., Chevalier, C. and Mouras, A. 2007. The Cell Cycle-Associated Protein Kinase WEE1 Regulates Cell Size In Relation To Endoreduplication In Developing Tomato Fruit. *The Plant*, 51: 642-655.
- Greenfield, E.A., 2020. Standard immunization of rabbits. Cold Spring Harbor Protocols, 2020(9), pp.pdb-prot100305.
- Hardjo, P. H., N. Holifah., T. Handoyo., W. Darmanto., and B. Sugiharto. 2015. Production of Polyclonal Antibodies against Sucrose Transporter (SUT1) Protein Expressed in *Escherichia coli* BL21 and Application for Immunodiagnosis. *Basic and Applied Scientific Research*, 5(2): 24-30.
- Hermana, N.S.P., Kusdiyantini, E., Suprihadi, A. and Nuraini, N., 2015. Ekstraksi Protein dari *Escherichia coli* BL21 Rekombinan Gen *Mycobacterium tuberculosis* dengan Variasi Waktu Inkubasi Induksi Isoprophyl- β -D-Thiogalactosidase (IPTG) dan Metode Lisis Sel. *Jurnal Akademika Biologi*, 4(2): 60-68.
- Hermanto, S., 2007. Spesifitas Dan Sensitifitas Antibodi Anti Erf3 Ragi *Saccharomyces Cerevisia*. *Jurnal Kimia Valensi*, 1(1).
- Hornbeck, P. 2017. Double-Immunodiffusion Assay For Detecting Specific Antibodies (*Ouchterlony*). *Curr. Protoc. Immunol.* 116:2.3.1-2.3.4.
- Hutu, I., Mircu, C., Lungu, B.C., Panaitescu, C. and Chen, K.W. 2019. Polyclonal Antibody Production in Several Rabbit Models. Volume: Proceedings of The International Scientific Congress "Life sciences, a challenge for the future" (17th-18th October 2019, Iasi Romania), 422-425.
- Kellogg, D.R., 2003. Wee1-Dependent Mechanisms Required For Coordination Of Cell Growth And Cell Division. *Journal of cell science*, 116(24), pp.4883-4890.
- Kencana, G.A.Y., Suartha, N., Simbolon, M.P., Handayani, A.N., Ong, S. and Syamsidar, A.K., 2015. Respons Antibodi terhadap Penyakit Tetelo pada Ayam yang Divaksin Tetelo dan Tetelo-Flu Burung. *Jurnal Veteriner Juni*, 16(2): 283-290.
- Kencana, G.A., Suartha, I.N., Nainggolan, D.R.B. and Tobing, A.S.L. 2017. Respons Imun Ayam Petelur Pascavaksinasi Newcastle Disease Dan Egg Drop syndrome. *Jurnal Sain Veteriner*, 35(1): 81-90.
- Kohl, T.O. and Ascoli, C.A., 2017. Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(5), pp.pdb-prot093708.
- Koolivand, D., Bashir, N.S., Behjatnia, S.A. and Joozani, R.J., 2016. Production Of Polyclonal Antibody Against Grapevine Fanleaf Virus Movement

- Protein Expressed In *Escherichia coli*. *The plant pathology journal*, 32(5), p.452.
- Kusumaningsih, P. 2020. Pengembangan Antibodi Polikonal dari Stadium Takizoit *Toxoplasma Gondii* Isolat WTA. *Jurnal Kesehatan Terpadu*, 2(1): 31-36.
- Mahmood, T. and Yang, P. C. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North Am J Med Sci* 4:429-434.
- Maboudi, K., Hosseini, S.M., Sepahi, M., Yaghoubi, H. and Hadadian, S., 2017. Production Of Erythropoietin-Specific Polyclonal Antibodies. *Iranian journal of biotechnology*, 15(1), p.50.
- Muflikhah, N.D. and Artama, W.T., 2017. An Evaluation Study Of *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Elisa) Using Recombinant Protein Gra1 For Detection Of Igg Antibodies Againts *Toxoplasma Gondii* Infections. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, 6(5), pp.105-108.
- Nguyen, N. H. 2018. *Penting 18000 Kata Medical Dictionary di Indonesia*.
- Nugroho, C.A., Basuki, N. and Sugiharto, A.N., 2015. Produksi Antibodi Poliklonal Sugarcane Streak Mosaic Virus. *Buana Sains*, 15(2), pp.101-110.
- Prasetyo, F. H. H., B. Sugiharto, and N. Ermawati. 2018. Cloning, Transformation And Expression Of Cell Cycle-Associated Protein Kinase Oswee1 In Indica Rice (*Oryza sativa L.*). *Genetic Engineering and Biotechnology*. 16 (2018) : 573–579.
- Pohanka, M., 2009. Monoclonal And Polyclonal Antibodies Production-Preparation Of Potent Biorecognition Element. *J Appl Biomed*, 7, pp.115-121.
- Saini, P., Li, Y. and Dobbelstein, M., 2015. Wee1 is required to sustain ATR/Chk1 signaling upon replicative stress. *Oncotarget*, 6(15), p.13072.
- Seenichamy, A., Bahaman, A.R., Mutalib, A.R. and Khairani-Bejo, S., 2014. Production And Characterization Of A Polyclonal Antibody Of Anti-Rlipl21-Igg Against *Leptospira* For Early Detection Of Acute Leptospirosis. *BioMed research international*.
- Schmidt, M., Rohe, A., Platzner, C., Najjar, A., Erdmann, F. and Sippl, W., 2017. Regulation of G2/M transition by inhibition of WEE1 and PKMYT1 kinases. *Molecules*, 22(12), p.2045.
- Siciliano, I., Grønlund, A.L., Ševčíková, H., Spadafora, N.D., Rafiei, G., Francis, D., Herbert, R.J., Bitonti, M.B., Rogers, H.J. and Lipavská, H., 2019. Expression Of Arabidopsis WEE1 In Tobacco Induces Unexpected Morphological And Developmental Changes. *Scientific reports*, 9(1):1-13.

- Soliman, A.M., Alhudaib, K.A., Rezk, A.A., El-Beltagi, H.S. and El-Ganainy, S.M., 2019. Production Of Polyclonal Antibodies To Some Potato Viruses Using Synthetic Peptides. *Feb-Fresenius Environmental Bulletin*, p.4870.
- Sorrell, D.A., Marchbank, A., McMahon, K., Dickinson, R.J., Rogers, H.J. and Francis, D., 2002. A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 215(3), pp.518-522.
- Suartha, I.N., Wibawan, I.W.T., Putra, I.G.N.N., Dewi, N.M.R.K. and Mahardika, I.G.N.K., 2011. Pemilihan Adjuvant pada Vaksin Avian Influenza. *Jurnal Kedokteran Hewan-Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 5(2).
- Sun, Y., Dilkes, B.P., Zhang, C., Dante, R.A., Carneiro, N.P., Lowe, K.S., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J. and Larkins, B.A., 1999. Characterization Of Maize (*Zea Mays L.*) Wee1 And Its Activity In Developing Endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), pp.4180-4185.
- Susianti., Sukmana, E., Lesmana, R. and Supratman, U., 2019. Optimasi Teknik Western Blot Untuk Deteksi Ekspresi Protein Tanaman Padi (*Oryza sativa L.*). *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*, 6(2): 174-183.
- Swacita, I.B.N., Damriyasa, I.M., Dharmawan, N.S., Astawa, N.M., Apsari, I.A.P., Oka, I.B.M. and Tenaya, I.W.M., 2015. Produksi dan Karakterisasi Antibodi Monoklonal Anti-*Cysticercus cellulosae*. *Jurnal Veteriner*, 16(3), pp.325-333.
- Trott, D.L., Hellestad, E.M., Yang, M. and Cook, M.E. 2008. Additions Of Killed Whole Cell Bacteria Preparations To Freund Complete Adjuvant Alter Laying Hen Antibody Response To Soluble Protein Antigen. *Poultry science*. 87(5): 912-917.
- Tyas, S., P. A., A. Syarifuddin., dan N. M. A. A. Septianingrum. 2021. Optimasi Waktu Produksi Antibakteri Isolat Actinomycetes (Isolat Te 235) terhadap Aktivitas Antibakteri pada *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Farmasi Sains dan Praktis*. 7(1): 15-24.
- Wulansari, A., Aqlinia, M., Wijanarka, W and Raharja, B., 2019. Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) dan Uji Aktivitas Antibakterinya terhadap Bakteri Penyebab Penyakit Kulit *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Berkala Bioteknologi*. 2(2): 25-36.