



**PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL PROTEIN *SUCROSE*
TRANSPORTER MENGGUNAKAN ANTIGEN PROTEIN
REKOMBINAN SUT1 DARI TANAMAN
TEBU (*Saccharum officinarum* L.)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat-syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**NURUL HOLIFAH
NIM 071810401096**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2012**

PERSEMBAHAN

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

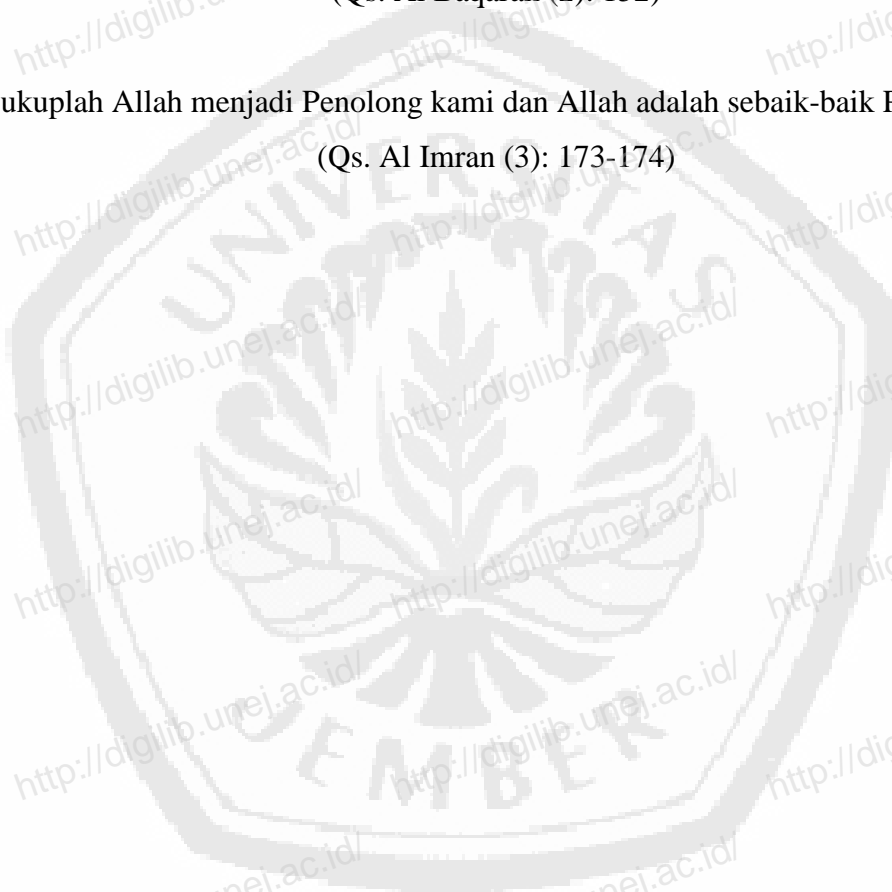
1. Almarhum Ayahanda H. Ashari dan Ibunda Sumi tercinta, terimakasih yang tak terhingga atas segala pengorbanan, kasih sayang dan doa yang terus mengalir;
2. Abah Taksin dan Umi Sofia yang telah merawat dan mendidik penulis sampai saat ini;
3. seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, dukungan dan semangat untuk menuntut ilmu;
4. semua guru-guru yang telah mendidik dan memberikan ilmunya, terima kasih yang tak terhingga atas ilmu yang telah diberikan;
5. almamater universitas Jember.

“Karena itu, ingatlah kamu kepada-Ku niscaya Aku ingat (pula) kepadamu”

(Qs. Al Baqarah (2): 152)

“Cukuplah Allah menjadi Penolong kami dan Allah adalah sebaik-baik Pelindung”

(Qs. Al Imran (3): 173-174)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nurul Holifah

NIM : 071810401096

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: “*Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Sucrose Transporter Menggunakan Antigen Protein Rekombinan SUT1 dari Tanaman Tebu (Saccharum officinarum L.)*” adalah benar-benar karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi 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, 05 November 012

Yang menyatakan

Nurul Holifah
NIM 071810401096

SKRIPSI

**PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL PROTEIN *SUCROSE*
TRANSPORTER MENGGUNAKAN ANTIGEN PROTEIN
REKOMBINAN SUT1 DARI TANAMAN
TEBU (*Saccharum officinarum* L.)**

Oleh:

**NURUL HOLIFAH
NIM 071810401096**

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Hidayat Teguh Wiyono., M.Pd

PENGESAHAN

Skripsi berjudul *Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Sucrose Transporter Menggunakan Antigen Protein Rekombinan SUT1 dari Tanaman Tebu (Saccharum officinarum L.)* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Jember pada:

Hari :
Tanggal :
Tempat : Fakultas MIPA Universitas Jember

Tim Penguji,

Ketua,

Sekretaris,

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

Dr. Hidayat Teguh Wiyono., M.Pd
NIP. 195805281988021002

Anggota,

Penguji I,

Penguji II,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si, M.Si
NIP. 197509132000032001

Sri Mumpuni W.W., S.Pd, M.Si
NIP. 197105101999032002

Mengesahkan,

Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA. Ph.D
NIP. 196101081986021001

RINGKASAN

Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein *Sucrose Transporter* Menggunakan Antigen Protein Rekombinan SUT1 dari Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) : Nurul Holifah, 071810401096; 2012, 31 Halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Sucrose transporter (SUT) merupakan protein translokator pada proses translokasi hasil fotosimilasi dalam bentuk sukrosa dari organ *source* menuju organ penyimpanan (*sink*). Protein ini diketahui terdapat pada membran plasma. Berdasarkan analisis filogenetik gen *SUT* dibagi menjadi tiga subfamili antara lain; *SUT1*, *SUT2* dan *SUT4*. *SUT1* memiliki afinitas yang tinggi terhadap sukrosa dan daya muat yang rendah terhadap sukrosa. *SUT2* mempunyai sifat afinitas rendah dan daya muat pengangkutannya tinggi. Sedangkan protein *SUT4* mempunyai afinitas rendah dan daya muat pengangkutan yang rendah

Pentingnya *SUT1* dalam tanaman mendorong banyak penelitian mengarah pada deteksi keberadaan *SUT1* dalam tanaman karena sifat *SUT1* yang paling diantara famili *SUT*. Deteksi protein tanaman dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain: *western blotting*, *double diffusion*, dan imunohistokimia menggunakan antibodi spesifik sebagai *probe*. Antibodi merupakan immunoglobulin yang disintesis oleh hewan sebagai respon terhadap substansi asing yang masuk ke dalam tubuh. Setiap antibodi memiliki afinitas spesifik terhadap materi asing yang memicu sintesis antibodi tersebut. Berdasarkan latar belakang tersebut, pentingnya *SUT1* pada tanaman dan belum tersedianya antibodi *SUT1* maka perlu dilakukan pembuatan antibodi *SUT1* untuk mendeteksi keberadaan *SUT1* dalam tanaman sehingga dapat dipelajari proses translokasi sukrosa. Lebih lanjut penelitian bermanfaat sebagai acuan dalam upaya untuk meningkatkan transport dan kandungan sukrosa pada tanaman.

Pembuatan antibodi dilakukan pada *New Zealand White Rabbit* menggunakan antigen protein rekombinan *SUT1* hasil overekspresi *E. coli* strain BI-21 yang telah

disisipi vektor mengandung cDNA-*SoSUT1*. Antigen dicampur dengan *Freund's* adjuvant dan diimmunisasi secara subkutan. Antibodi yang terbentuk digunakan untuk analisis molekuler tanaman seperti deteksi keberadaan protein SUT1.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa antibodi terdeteksi pada minggu ke-5 setelah imunisasi pertama dan minggu kedua setelah *booster* pertama, namun titer antibodi masih rendah. Titer antibodi meningkat sampai pada minggu ke-8 setelah injeksi pertama dan mengalami penurunan pada minggu ke-9. Deteksi titer antibodi menunjukkan bahwa antibodi yang didapat memiliki titer yang tinggi karena mampu mendeteksi antigen protein rekombinan pada konsentrasi 1 nanogram dengan pengenceran antibodi 1 : 2000. Sedangkan deteksi SUT1 pada tanaman mampu mendeteksi keberadaan SUT1 pada fraksi *insoluble* dengan ukuran ± 75 kDa dan ± 25 kDa.

PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul *Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Sucrose Transporter Menggunakan Antigen Protein Rekombinan SUT1 dari Tanaman Tebu (Saccharum officinarum L.)*. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penelitian ini dibiayai oleh Hibah Fundamental Dirjen Dikti Tahun 2011-2012 dengan judul “Produksi Protein Rekombinan *Sucrose Transporter* melalui Overekspresi cDNA-*SoSUT1* pada Sel Bakteri *Escherichia coli* untuk Pembuatan Antibodi”

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc selaku dosen pembimbing utama dan Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, dan saran dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr.rer.nat Kartika Senjarini dan Sri Mumpuni S.Pd., M.Si. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Dra. Retno Wimbaningrum M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama menjadi Mahasiswa Universitas Jember;
4. Ir. Popy Hartati Hardjo, M.Si, Purnama Okviandari M.P, Dr. Tri Handoyo, Dr. Netty Ermawati dan keluarga besar peneliti Biologi Molekuler yang telah memberikan bantuan, dukungan dan masukan atas jalannya penelitian;
5. rekan kerja dan teman-teman seperjuangan; Triliani Farlisa S.Si, Nina Oktaria S.Si, Ahmad Fudhaili S.Si, Yunianzi Tiara P. Mutik Mahtuhfatul, Yahya

Agung, Aji Baskoro S.P., Anandang Gani S.P., Septyan Cristanto S.P., Aditya Nurmalita, Saniya Rohma, Siti Komariah, adik-adik (Frengky Hermawan, Edia Fitri, Rinda Media dan Hidayah M.N) serta seluruh teman-teman angkatan 2007 terimakasih atas kebersamaan, dukungan dan bantuannya;

6. Zainollah dan Keluarga terimakasih atas dukungan dan semangat yang diberikan;
7. teman-teman Wisma Bunda 57; Dipsy, Sulis, Aminatus zuhra, Inayatul Maula, Triya, Yessi, Lutfi, Elia dan Hydrilla terimakasih atas kebersamaan dan keceriaan yang selama selalu ada di Wisma Bunda 57;
8. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima saran dan kritik dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

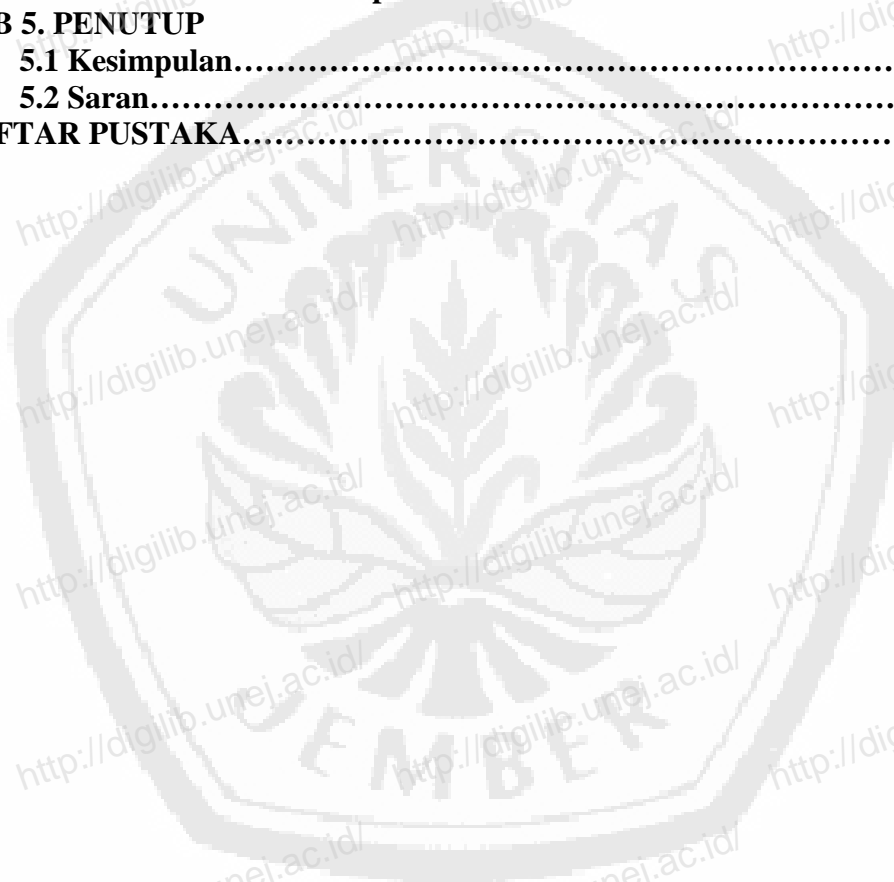
Penulis

Jember, 05 November 2012

DAFTAR ISI

	Halaman
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
DAFTAR TABEL	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan dan Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Sucrose transporter (SUT)</i>	4
2.2 Protein Rekombinan	5
2.3 Struktur Antibodi	6
2.4 Interaksi Antigen-Antibodi	8
2.5 Pembuatan Antibodi Poliklonal	9
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.2 Bahan Penelitian	11
3.3 Prosedur Penelitian	12
3.3.1 Preparasi antigen	12
3.3.1.1 Produksi Protein Rekombinan SUT1 pada Sel Bakteri <i>Escherichia coli</i> strain BL21.....	12
3.3.1.2 Ekstraksi dan Solubelisasi Protein Rekombinan SUT1....	12
3.3.1.3 Purifikasi Protein menggunakan Kolom Afinitas Kromatografi Ni-NTA Resin.....	13
3.3.1.4 Analisa SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis).....	13
3.3.1.5 <i>Electroelution</i> protein.....	14
3.3.1.6 Dialisis.....	14
3.3.1.7 Penentuan Kandungan Protein Terlarut.....	14
3.3.2 Pembuatan Antibodi Poliklonal SUT1 Pada Kelinci	14
3.3.3 Analisis <i>Ouchterlony</i>	15
3.3.4 Ekstraksi Protein SUT pada Tanaman Tebu	16

3.3.5 Analisis <i>Western blotting</i>	16
3.3.5.1 Penentuan Titer Antibodi Poliklonal SUT1.....	16
3.3.5.2 Deteksi Protein SUT1 pada Tanaman Tebu.....	17
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Antigen Protein Rekombinan SUT1.....	18
4.2 Pembuatan Antibodi Poliklonal SUT1 Pada Kelinci dan Analisa <i>Ouchterlony</i>	20
4.3 Penentuan Titer Antibodi Dengan Analisa <i>Western Blotting</i> ...	23
4.4 Deteksi Protein SUT1 pada Tanaman.....	24
BAB 5. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	26
5.2 Saran.....	26
DAFTAR PUSTAKA	27

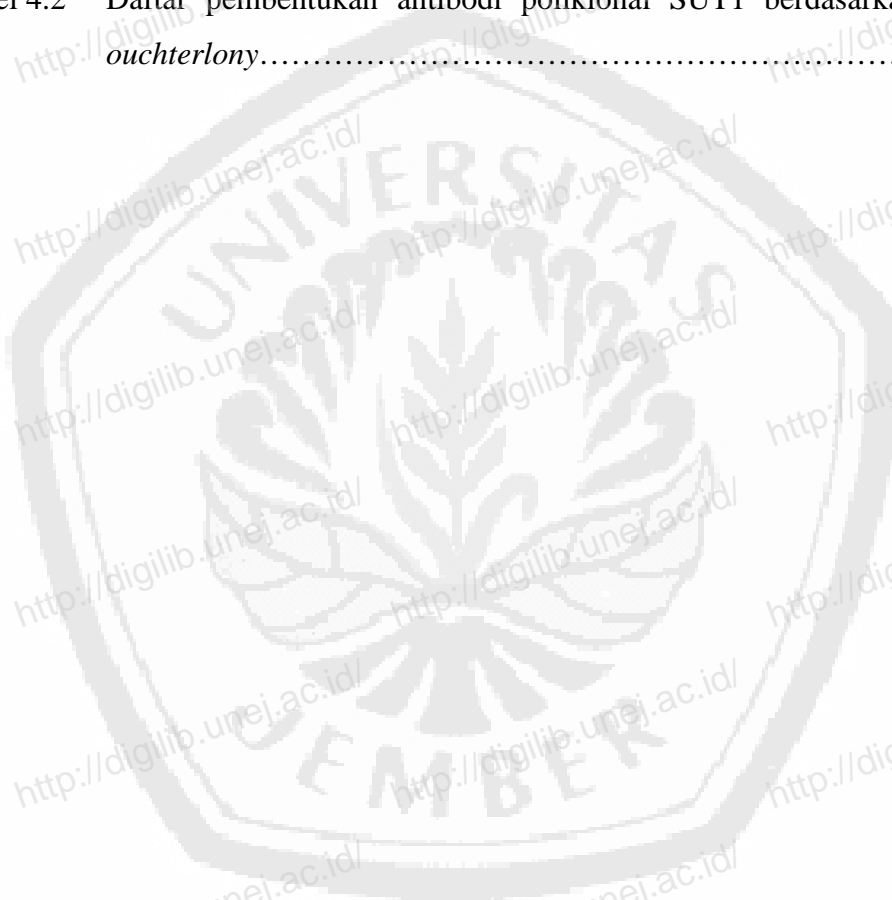


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Lokasi <i>sucrose transporter</i> dalam sel.....	5
Gambar 2.2	Model struktur immunoglobulin G (IgG).....	7
Gambar 3.1	Peta konstruk plasmid pET28a yang telah disisipi oleh fragmen cDNA- <i>SoSUT1</i>	11
Gambar 4.1	Purifikasi protein SUT1 menggunakan resin Ni-NTA.....	18
Gambar 4.2	Analisa SDS-PAGE protein hasil elektroelusi.....	19
Gambar 4.3	Uji <i>Ouchterlony</i> dengan antigen protein rekombinan SUT1.....	21
Gambar 4.4	Analisa <i>western blotting</i> antigen protein rekombinan SUT1.....	23
Gambar 4.5	Analisa <i>ouchterlony</i> protein SUT1 dari tanaman tebu.....	24
Gambar 4.6	Analisa <i>western blotting</i> protein SUT1 dari daun tanaman tebu....	25

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Frekuensi injeksi antigen dengan adjuvant dan pengambilan serum	15
Tabel 4.1	Hasil Penentuan Kandungan Protein Rekombinan SUT1 Hasil Purifikasi yang digunakan Sebagai Antigen.....	20
Tabel 4.2	Daftar pembentukan antibodi poliklonal SUT1 berdasarkan uji <i>ouchterlony</i>	22



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sucrose transporter (SUT) merupakan protein translokator pada proses translokasi hasil fotoasimilasi dalam bentuk sukrosa dari organ *source* (pembuat) menuju organ *sink* (penyimpanan). Protein SUT disandikan oleh gen *SUT* (Aoki *et al.*, 2003). Berdasarkan analisis filogenetik Shiratake (2007) gen *SUT* dibagi menjadi tiga subfamili antara lain; *SUT1*, *SUT2* dan *SUT4*. Berdasarkan homologinya juga ditemukan *SUT3* yang hanya ditemukan pada tembakau dan termasuk dalam subfamili *SUT1*. Protein SUT1 memiliki karakteristik afinitas tinggi terhadap sukrosa tetapi daya muat pengangkutannya terhadap sukrosa rendah. Sebaliknya protein SUT2 mempunyai sifat afinitas rendah dan daya muat pengangkutannya tinggi. Sedangkan protein SUT4 mempunyai afinitas rendah dan daya muat pengangkutan yang rendah (Weise *et al.*, 2000). Berdasarkan karakteristik tersebut, protein SUT1 memiliki sifat paling baik diantara tiga subfamili protein SUT sehingga keberadaannya didalam tanaman sangat penting untuk meningkatkan akumulasi sukrosa di dalam tanaman.

Untuk mempelajari proses transportasi sukrosa pada tanaman perlu dilakukan analisa mengenai protein SUT, terutama untuk melihat ekspresi tingkat protein dan aktifitas fisiologisnya. Pengetahuan tentang transportasi sukrosa ini merupakan hal penting untuk dapat meningkatkan transport dan kandungan sukrosa pada tanaman. Deteksi protein tanaman dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain: *western blotting* (Lauterbach, *et al.*, 2006), *double diffusion* (Cheung, *et al.*, 2002), dan immunohistokimia (Hackel, *et al.*, 2006) menggunakan antibodi spesifik (Rantam, 2003).

Antibodi merupakan immunoglobulin yang disintesis oleh hewan sebagai respon terhadap substansi asing yang masuk ke dalam tubuh. Setiap antibodi memiliki afinitas spesifik terhadap materi asing yang memicu sintesis antibodi tersebut. Suatu molekul asing yang mampu memicu pembentukan antibodi disebut antigen (Stryer, 1995). Protein, polisakarida dan asam nukleat pada umumnya merupakan antigen yang kuat (Nevinsky, 2003). Total antibodi yang terdapat dalam serum disebut antibodi poliklonal (Dunbar dan Schwobel 1990).

Pada perkembangannya ikatan antibodi dan antigen dapat dimanfaatkan untuk mengungkapkan keberadaan dari suatu protein ataupun enzim dalam kompleks reaksi biokimia. Seperti pada penelitian sebelumnya tentang pembuatan antibodi poliklonal *sucrose phosphate synthase* (SPS) yang digunakan untuk menentukan keberadaan SPS yang memiliki karakter berbeda pada tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) (Sugiharto, *et al.*, 2003). Keberhasilan penelitian tersebut mendorong untuk pembuatan antibodi SUT1 sehingga dapat dipelajari karakter protein SUT1 pada tanaman.

Gen (cDNA)-*SoSUT1* yang mengkode untuk protein SUT telah diisolasi dari tanaman tebu (Sugiharto, 2010) dan dapat digunakan sebagai materi genetik untuk produksi protein rekombinan SUT1. Saat ini fragmen cDNA-*SoSUT1* telah dikonstruksi kedalam vektor plasmid ekspresi pET28a dan dapat digunakan untuk produksi protein rekombinan pada bakteri *Escherichia coli* strain B121 (Farlisa *et al.*, 2012). Protein rekombinan SUT1 dalam jumlah yang cukup selanjutnya dapat digunakan sebagai antigen dalam pembuatan antibodi poliklonal SUT1.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan antibodi yang dapat digunakan untuk deteksi keberadaan protein SUT1 sehingga dapat dipelajari proses translokasi sukrosa pada tanaman. Lebih lanjut diharapkan dapat digunakan sebagai acuan untuk melakukan peningkatan translokasi pada tanaman.

1.2 Rumusan Masalah

Antibodi dapat digunakan untuk deteksi atau analisis protein pada tanaman seperti untuk deteksi dan penentuan kandungan protein SUT1. Namun, saat ini belum tersedia antibodi SUT1, sehingga pembuatan antibodi SUT1 perlu dilakukan untuk deteksi protein SUT1 pada tanaman. Pembuatan antibodi dapat dilakukan menggunakan antigen protein rekombinan yang diproduksi dan dipurifikasi dari sel *Escherichia coli*.

1.3 Tujuan dan Manfaat

1.3.1 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan antibodi poliklonal SUT1 menggunakan protein rekombinan SUT1 yang diproduksi dalam sel *Escherichia coli*. Antibodi poliklonal yang terbentuk digunakan untuk deteksi protein SUT1 pada tanaman.

1.3.1 Manfaat

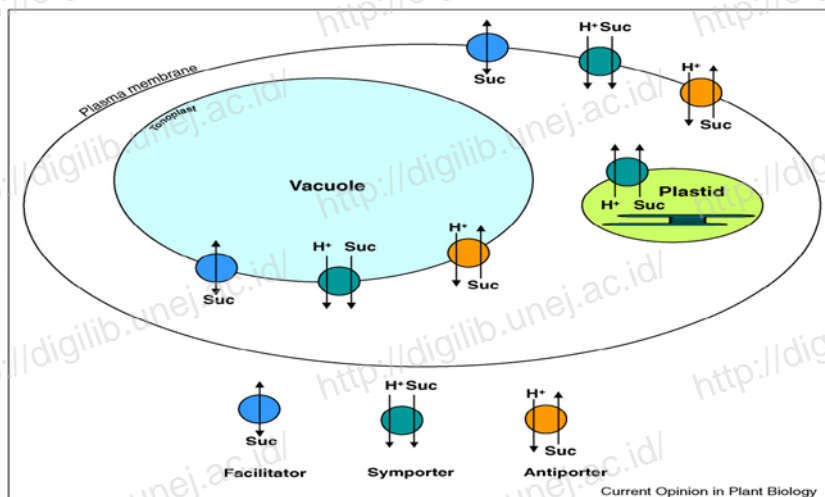
Penelitian ini diharapkan dapat memperoleh antibodi poliklonal SUT1 yang digunakan untuk keperluan deteksi dan penentuan kandungan protein SUT1 sehingga dapat dipelajari proses translokasi sukrosa pada tanaman. Pengetahuan tentang translokasi sukrosa ini penting dalam upaya untuk meningkatkan transport dan kandungan sukrosa pada tanaman.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Sucrose transporter* (SUT)

Sukrosa merupakan senyawa karbon hasil fotosintesis yang berperan penting terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Huber and Huber, 1996). Sukrosa ditranslokasikan dari organ *source* melalui phloem (*loading*) menuju organ *sink* (*unloading*) (Hackel *et al.*, 2006). Translokasi sukrosa dari organ *source* ke organ penyimpanan (*sink*) mengikuti jalur *symplast* dan *apoplast*. Secara *symplast* translokasi sukrosa terjadi dari sel melalui plasmodesmata, yang terjadi pada jaringan meristem dan organ tanaman yang masih muda. Secara *apoplast* sukrosa ditranslokasikan melewati dinding sel dan ruang inter seluler jaringan (Patrick 1997; Lalonde *et al.*, 2003).

Translokasi sukrosa merupakan bentuk pengangkutan aktif, disebut sebagai *sucrose proton symport* (Riesmeier *et al.*, 1993). Proses translokasi ini diperantarai oleh protein transporter yang terdapat pada membran plasma dan membutuhkan energi (Riesmeier *et al.*, 1992). Pada tanaman monokotil dan dikotil, protein transporter tersebut diidentifikasi sebagai *sucrose transporter* (SUT) (Lemoine, 2000). Khun dan Crishtopher (2010) melaporkan bahwa lokasi *sucrose transporter* dalam sel terdapat pada membran plastid (SUT4), membran tonoplast (SUT4), dan membran plasma (SUT1, SUT2 dan SUT3), seperti terlihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Lokasi *sucrose transporter* dalam sel tanaman. SUT terdapat pada membran tonoplast, membran plastid dan membran plasma (Khun dan Crishtoper, 2010)

Transportasi sukrosa pada tanaman tingkat tinggi dilaporkan oleh Giaquinta (1976) bahwa sukrosa di translokasikan secara aktif kedalam phloem secara *apoplasmik* yang melibatkan protein yang mengandung ikatan sulfhydryl. Sejak itu, banyak penelitian tentang kloning gen *sucrose transporter* dari spesies yang berbeda-beda (Sauer, 2007). Pada beberapa tanaman, gen *sucrose transporter* telah ditemukan seperti *OsSUT1*, *OsSUT3* pada padi (*Oryza sativa* L.) (Yu *et al.*, 2000), *AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSUC5* pada Arabidopsis (Sauer *et al.*, 2004), *LeSUT1*, *LeSUT2* pada tomat (Hackel *et al.*, 2006) dan *SoSUT1*, *SoSUT2* pada tebu (Sugiharto *et al.*, 2010).

2.2 Protein Rekombinan

Protein rekombinan adalah suatu protein yang dihasilkan dari proses manipulasi dan transformasi gen untuk menghasilkan protein dalam jumlah yang besar dalam sel organisme. Aplikasi penting dari protein rekombinan antara lain untuk melakukan vaksinasi, uji biokimia, analisis protein tiga dimensi, bioteknologi dan pengobatan. Pembentukan protein rekombinan dapat dilakukan dengan insersi

(menyisipkan) DNA kedalam plasmid vektor ekspresi dan mengekspresikannya kedalam sel (Schumann dan Ferreira, 2004).

Teknologi rekombinan adalah proses yang terlibat dalam pembentukan protein rekombinan. Teknologi tersebut dilakukan dengan mengisolasi urutan gen target dan kemudian memindahkannya ke vektor kloning yang memiliki kemampuan untuk mereproduksi diri. Gen target tersebut kemudian di sub-kloning kedalam plasmid vektor ekspresi sehingga dapat diekspresikan. DNA rekombinan dapat ditranskripsikan menjadi RNA, yang selanjutnya ditranslasikan sehingga dapat menghasilkan protein rekombinan (Clark dan Pazdermik, 2009).

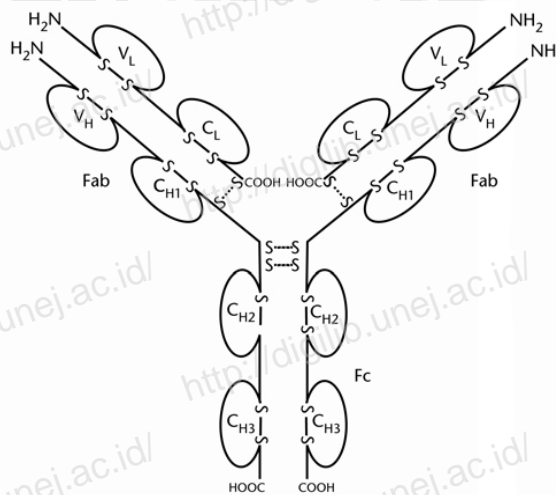
Pada beberapa metode yang tersedia untuk produksi protein rekombinan, penggunaan bakteri gram negative *Escherichia coli* adalah yang paling banyak digunakan karena memiliki kemampuan pertumbuhan secara cepat dalam substrat yang sederhana, ekonomis, dan dapat memproduksi protein rekombinan dalam skala besar (Baneyx, 1999). *Escherichia coli* strain BL21 umum digunakan dalam produksi protein rekombinan karena memiliki kandungan protease yang rendah sehingga sel mampu mengakumulasi protein rekombinan dengan kandungan yang tinggi (Donahue dan Bebee, 1999).

2.3 Struktur Antibodi

Struktur dasar dari sebuah molekul antibodi terdiri dari dua rantai ringan identik dan dua rantai berat identik dihubungkan oleh ikatan disulfida. Terdapat lima kelas imunoglobulin yang berbeda dalam urutan asam amino dan jumlah domain di daerah konstan rantai berat yaitu IgM, IgG, IgA, IgE dan IgD. Diantara lima golongan imunoglobulin tersebut, IgG merupakan imunoglobulin yang umum digunakan dalam produksi bahan biologis untuk immunodiagnostik. Hal tersebut dikarenakan IgG memiliki prosentase jumlah paling banyak yaitu 70-75% di dalam serum normal dibandingkan IgM (antibodi pertama yang muncul dalam respon primer) (Papermaster, 1975).

Secara struktural, IgG memiliki empat rantai polipeptida yang terbagi atas dua rantai berat (*heavy chain*) yang memiliki berat molekul 55 kDa serta dua rantai

ringan (*light chain*) dengan berat molekul 25 kDa. Polipeptida rantai berat dan rantai ringan dihubungkan oleh ikatan disulfida dan ikatan nonkoyalen yang terdapat pada bagian engsel (*hinge region*) yang dilambangkan dengan bentuk molekul Y dengan total berat molekul 150 kD (Lipman *et al.*, 2005). Masing-masing rantai berat dan rantai ringan dari IgG memiliki bagian konstan (Fc) atau tetap dan bagian yang dapat berubah atau variabel (Gambar 2.2). Variabel (v) atau bagian yang dapat berubah pada struktur IgG memiliki fungsi khusus untuk berikatan dengan antigen melalui *antigen binding site* (Papermaster, 1975). Bagian konstan memiliki fungsi efektor seperti aktivasi sel NK (*natural killer cell*), aktivasi komplemen dan fagositosis (Lipman *et al.*, 2005). Dua lengan Fab molekul antibodi mengandung bagian *antigen binding site* dan bagian Fc yang dihubungkan oleh bagian yang kaya proline, threonine dan serin yang disebut *hinge* (engsel) (Lipman *et al.*, 2005).



Gambar 2.2 Model struktur immunoglobulin G (IgG). **Fb**; fragmen *antigen binding site*, **Fc**; Fragmen konstan, C_L ; *constant light chain*, C_H ; *constant heavy chain*, V_L ; *variable light chain*, V_H ; *variable heavy chain* (Kumagai dan Tsumoto, 2001).

2.4 Interaksi Antigen-Antibodi

Suatu antibodi dapat berikatan secara spesifik dengan antigen yang sesuai. Semua bentuk antibodi seragam satu sama lain, namun terdapat daerah spesifik yang dapat mengikat satu antigen saja yaitu *antigen binding site*. Antigen adalah bahan asing yang masuk ke dalam tubuh dan dapat berinteraksi dengan molekul sistem imun. Bagian dari antigen secara langsung berikatan dengan molekul reseptor disebut *epitop* (Rantam, 2003).

Antibodi dapat mengenali epitop dengan ukuran yang berbeda dan dapat mengikat epitop menggunakan beberapa atau semua *complementarity determining regions* (CDRs). Pengikatan antara antibodi dan epitop terjadi secara *reversible* dan tergantung pada susunan antigen-antibodi. Antigen dengan struktur yang relatif kecil dapat mempengaruhi kekuatan interaksi antibodi-antigen. Karena antibodi yang mengenali komponen antigen relatif kecil menyebabkan terjadinya reaksi silang dengan epitop yang mirip pada antigen lain tetapi dengan afinitas yang rendah. Reaksi silang antibodi berguna dalam alat penelitian sebagai dasar identifikasi antigen yang sesuai. Spesifitas antibodi mengacu pada kemampuan untuk mengenali epitop spesifik diantara epitop yang lain. Sebuah antibodi dengan spesifitas yang tinggi mengurangi terjadinya reaksi silang. Afinitas pengikatan antibodi dipengaruhi oleh konformasi determinan dan antibodi yang telah mengikat protein sebelumnya tidak akan mengikat protein yang sama pada kondisi terdenaturasi (Nelson, *et al.* 1997 dalam Lipman, *et al.*, 2005).

Afinitas antibodi merefleksikan kekuatan pengikatan terhadap satu epitop. Ikatan antigen-antibodi merupakan suatu reaksi yang seimbang. Afinitas antibodi yang tinggi cenderung mengikat antigen secara cepat dan memisah secara lambat dibandingkan afinitas antibodi yang rendah. Afinitas antibodi yang tinggi juga cenderung mengikat antigen dengan ukuran yang lebih besar. Secara fungsional, kekuatan antibodi pada aplikasi khusus menentukan aviditas kompleks antigen-antibodi.

Aviditas menunjukkan keseluruhan pengikatan antara antibodi dengan berbagai macam epitop yang terdapat pada antigen. Aviditas ditentukan oleh afinitas antibodi terhadap epitop, jumlah *antibodi binding site* dan kompleks antibodi-antigen. Antigen dapat menyajikan epitop yang identik (*homopolymeric*) atau hadir dengan epitop yang berbeda. Fungsi antibodi monoklonal sangat baik dengan antigen *homopolymeric* ketika epitop disajikan dengan tidak menghambat pengikatan. Begitu juga dengan antibodi poliklonal yang baik digunakan untuk imunopresipitasi untuk kompleks antigen karena antibodi dapat mengikat molekul antigen dan menghasilkan kompleks antibodi-antigen membentuk garis presipitasi. Aviditas antibodi yang tinggi menunjukkan tempat yang bervariasi untuk pengikatan reagen sekunder terhadap setiap komponen esensial pada teknik imunokimia (Lipman, *et al.*, 2005).

Ikatan antigen dan antibodi pada perkembangannya dapat dijadikan alat untuk identifikasi dan karakterisasi antigen spesifik menggunakan antibodi spesifik sebagai *probe* yang divisualisasikan dengan radiolabel atau *enzyme-conjugated second antibody*. Beberapa metode yang menggunakan prinsip ikatan antigen-antibodi diantaranya; imunohistokimia (Hackel, *et al.*, 2006), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (McElroy *et al.*, 2009), imunodifusi (Cheung, *et al.*, 2002) dan *western blotting* (Dunbar dan Timmons, 1990).

2.5 Pembuatan Antibodi Poliklonal

Antibodi poliklonal merupakan kelompok antibodi yang diproduksi oleh limfosit-B pada respon antigen yang sama. Produksi antibodi poliklonal melalui imunisasi hewan melibatkan injeksi antigen, pemilihan adjuvant, pemilihan hewan dan pengumpulan antibodi (Leenaars dan Hendriksen, 2005).

Sistem imun pada hewan sangat sensitif karena dapat mendeteksi unsur terkecil dari suatu antigen. Spesifitas antibodi dapat ditingkatkan dengan pemisahan protein terlebih dahulu kedalam subunit dan menginjeksi hewan uji hanya dengan satu tipe polipeptida. Kemampuan antigen untuk menginisiasi respon imun sangat

beragam, antigen biasanya dicampur dengan adjuvant dalam sampel sebelum diinjeksikan (Cooper, 1977).

Adjuvant adalah zat yang digunakan untuk meningkatkan respon imun terhadap antigen dan mencegah agar antigen tidak cepat hilang dari jaringan. *Adjuvant Freund's* merupakan adjuvant yang sangat kuat. Aktivasinya diperkuat oleh bagian aktif mikobakteri yaitu muramil dipeptida. Muramil dipeptida merangsang fungsi makrofag dan merangsang respon antibodi yang kuat dalam waktu lama. Adjuvant bertindak khusus untuk merangsang fungsi sel T dan hanya meningkatkan reaksi antigen tergantung timus. *Freund's complete adjuvant* digunakan pada injeksi antigen pertama, sedangkan *Freund's incomplete adjuvant* digunakan untuk injeksi antigen kedua dan selanjutnya (Cooper, 1977).

Selain pemberian adjuvant, pemilihan spesies hewan yang akan digunakan yang sesuai sangat penting khususnya ketika memproduksi antibodi poliklonal. Hewan yang akan digunakan seharusnya berbeda dari hewan sebagai sumber antigen. Hewan yang sering digunakan untuk produksi antibodi adalah kelinci karena lebih mudah, lebih murah memiliki respon imun yang kuat dan dapat diambil serum darah berulang-ulang tanpa mengganggu kelinci tersebut. (Lipman, 2005). Usia kelinci yang umum digunakan adalah umur 10-16 minggu. Kelinci yang lebih tua tidak digunakan untuk produksi antibodi karena pada usia ini sistem kekebalan tubuh berada pada puncaknya dan kemampuan untuk merespon antigen baru mengalami penurunan karena usia. Kelinci betina lebih sering digunakan karena lebih jinak. Telah dilaporkan bahwa kelinci betina sensitif terhadap dosis antigen yang lebih rendah dan mungkin secara signifikan lebih tinggi dan lebih lama merespon imunisasi dibandingkan kelinci jantan (Leenaars dan Hendriksen, 2005).

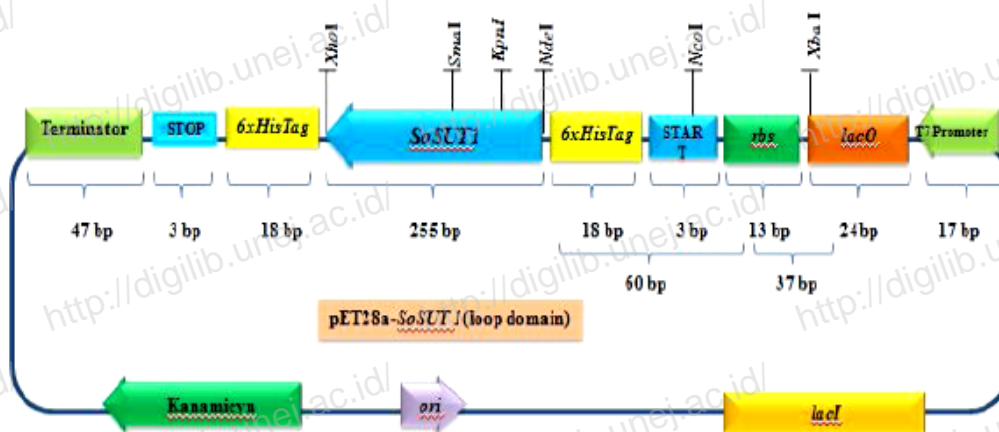
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember dan Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya mulai bulan Maret 2012 – September 2012.

3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel bakteri *Escherichia coli* strain BL21 mengandung vektor pET28a yang telah disisipi fragmen cDNA-*SoSUT1*, protein rekombinan SUT1, *New Zealand White Rabbit*, *Freund's* adjuvant dan tanaman tebu yang ditumbuhkan pada pot berisi tanah.



Gambar 3.1 Peta konstruk plasmid pET28a yang telah disisipi oleh fragmen cDNA-*SoSUT1*

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Preparasi Antigen Protein Rekombinan SUT1

3.3.1.1 Produksi Protein Rekombinan SUT1 pada Sel Bakteri *Escherichia coli* strain BL21

Koloni tunggal bakteri *Escherichia coli* strain BL21 yang telah membawa konstruk plasmid pET28a-*SoSUT1* ditumbuhkan ke dalam 2 ml media LB cair yang mengandung cloramphenicol 35 ppm dan kanamisin 50 ppm dan digojog selama semalam pada suhu pertumbuhan 37°C. Bakteri yang tumbuh di subkultur ke dalam 1 liter media LB cair yang mengandung cloramphenicol 35 ppm dan kanamisin 50 ppm dan digojog selama 3 jam dengan perbandingan koloni dan media (1 : 50). Setelah mencapai OD 0,5-0,7 ditambahkan *inducer* yaitu 0.5 mM IPTG (*Isopropyl-thiogalactosidase*). Pertumbuhan dilanjutkan dengan menggojog kultur bakteri selama 5 jam dengan suhu 37°C. Selanjutnya kultur sel bakteri di letakkan dalam es selama 15 menit dan sel bakteri dipanen dengan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm dengan suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pellet sel bakteri yang diperoleh digunakan untuk ekstraksi protein.

3.3.1.2 Ekstraksi dan Solubelisasi Protein Rekombinan SUT1

Ekstraksi protein rekombinan dilakukan dengan penambahan buffer NPI-10 pH 8 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl dan 10 mM imidazole) dan ditambahkan lysozyme 100 µg/ml pada pellet sel bakteri. Selanjutnya sel dipecah dengan sonikasi selama 3 menit dan disentrifuse pada suhu 4 °C selama 20 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Pada penelitian sebelumnya protein rekombinan SUT diekspresikan pada bagian *insoluble* sehingga protein SUT diekstrak dari pellet (Farlisa, 2012).

Pellet (fraksi *insoluble*) yang diperoleh ditambahkan buffer NPI-10 dan disentrifuse pada suhu 4 °C selama 20 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Supernatan dibuang dan pellet ditambahkan buffer DNPI-10 pH 8 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl dan 10 mM imidazole dan 8 M urea) dan disonikasi selama 3 menit

untuk solubelisasi (pelarutan) protein membran. Suspensi sel disentrifugasi pada suhu 20 °C selama 20 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Supernatan yang diperoleh selanjutnya dipurifikasi dengan kolom afinitas kromatografi Ni-NTA resin.

3.3.1.3 Purifikasi Protein menggunakan Kolom Afinitas Kromatografi Ni-NTA Resin

Protein yang telah disolubelisasi digunakan purifikasi menggunakan kolom afinitas kromatografi Ni-NTA resin. Resin yang siap digunakan diekuilibrasi dengan memasukkan buffer DNPI-10 kedalam kolom. Selanjutnya sampel protein dimasukkan kedalam kolom dengan perbandingan resin : protein (1:1) dan mengalami tahap pengikatan (*binding*). Larutan yang keluar dari kolom (*protein unbinding*) ditampung dalam ependorf untuk analisis. Kemudian dilakukan pencucian dengan menambahkan buffer DNPI-20 pH 8 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl dan 20 mM imidazole dan 8 M urea). Protein SUT1 kemudian dielusi dengan buffer DNPI-250 pH 8 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl dan 250 mM imidazole dan 8 M urea). Protein hasil purifikasi selanjutnya disimpan dalam freezer untuk analisis SDS-PAGE.

3.3.1.4 Analisa SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis*)

Analisis SDS-PAGE dilakukan dengan konsentrasi akrilamid 15 % untuk separating gel yang mengandung akrilamid 30%, Tris-HCl pH 8.8, SDS 10 %, 50 µl ammonium persulfate (APS) dan 5 µl N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) dan konsentrasi akrilamid 4,5 % untuk gel stacking mengandung akrilamid 30%, Tris-HCl pH 6.8, SDS 10 %, 10 µl APS dan 4.5 µl (TEMED) (Garfin, 1990). Sampel protein rekombinan SUT1 ditambah buffer loading dengan perbandingan 1 : 1, kemudian didenaturasi pada air mendidih selama 3 menit. Sampel yang sudah didenaturasi dimasukkan ke dalam sumur gel dan elektroforesis dilakukan pada 70

volt selama 2,5 - 3 jam. Hasil pemisahan protein selanjutnya di beri pewarna *Commasie Brilliant Blue* (CBB) 1%.

3.3.1.5 *Electroelution protein*

Protein rekombinan hasil SDS-PAGE yang masih tercampur dengan protein lain dipotong dari gel dan dikeluarkan dari gel poliakrilamid dengan elektroelusi protein. Protein target yang tampak setelah diberi pewarna CBB 1% di potong lebih kecil dan dimasukkan kedalam membran dengan buffer mengandung 25 mM Tris Base, 0.192 M glycine dan SDS 0.1%. Protein dalam gel dikeluarkan dengan aliran listrik 60 Volt sampai gel menjadi bening (Harrington, 1990). Protein yang dihasilkan tampak berwarna biru karena masih berikatan dengan pewarna CBB.

3.3.1.6 *Dialisis*

Sampel protein hasil purifikasi dari kolom afinitas dan isolasi dari gel (*electroelution protein*) dimasukan kedalam membran dialysis. Selanjutnya sampel dalam membran ditempatkan dan didialysis 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. Tahap berikutnya, setelah 12 jam buffer diganti dengan buffer baru yang sama. Protein yang telah didialisis ditempatkan pada ependorf dan dikonsentrasikan (dipekatkan) dengan *freeze drying* (Phol, 1990).

3.3.1.7 *Penentuan Kandungan Protein Terlarut*

Penentuan kandungan protein terlarut menggunakan metode Bradford (1976). Kandungan protein terlarut diukur dengan memasukkan 5 µl sampel ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan Bradford 995 µl. Kemudian diukur dengan panjang gelombang 595 nm. Standart yang digunakan adalah protein BSA konsentrasi 1 µg/µl dengan masing-masing konsentrasi 0.5, 10, 15, 20, 25 dan 50 µg.

3.3.2 Pembuatan Antibodi Poliklonal SUT1 Pada Tubuh Kelinci

Pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan menginjektikan protein rekombinan SUT1 (antigen) pada tubuh kelinci. Satu minggu sebelum injeksi diadakan pengambilan serum darah pre-imunisasi dari pembuluh vena telinga kelinci. Injeksi dilakukan dengan mencampur antigen protein rekombinan SUT1 (0.5 mg) dengan *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) (1:1) sampai homogeny yang kemudian menginjektikanya pada bagian bawah kulit (subkutan) punggung kelinci. Selang dua minggu dilakukan *booster* injeksi dengan mencampur antigen protein rekombinan SUT1 (0.1 mg) dengan *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA) (1:1) sampai homogeny dan seterusnya setiap satu minggu sekali (Dunbar and Schwoebel, 1990). Frekuensi injeksi antigen dengan adjuvant dapat dilihat pada Tabel 3.1. Satu bulan setelah injeksi pertama diambil serum darah kelinci untuk dianalisis terbentuknya antibodi. Terbentuknya antibodi dianalisis menggunakan metoda uji *ouchterlony* (Timmons and Dunbar, 1990).

Tabel 3.1 Frekuensi injeksi antigen dengan adjuvant dan pengambilan serum pada kelinci

No.	Minggu ke-	Adjuvant (ml)	Dosis antigen (mg)	Pengambilan serum
1	I	FCA 1 ml	0.5 mg	Per-imunisasi
2	II	-	-	-
3	III	FIA 1 ml	0.1 mg	-
4	IV	FIA 1 ml	0.1 mg	Serum I
5	V	FIA 1 ml	0.1 mg	Serum II
6	VI	FIA 1 ml	0.1 mg	Serum III
7	VII	FIA 1 ml	0.1 mg	Serum IV
8	VIII	FIA 1 ml	0.1 mg	Serum V
9	IX	-	-	Serum VI

3.3.3 Analisis *Ouchterlony*

Analisis *Ouchterlony* dilakukan dengan melarutkan agarose 1 % dengan agarose buffer solution yang terdiri dari 0.5 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA, NaCl, dan 0.1 M NaN₃. Larutan dipanaskan dengan microwave sampai homogen, kemudian dituang ke dalam *glass plate* secara merata ke seluruh permukaan. 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 kedalam sumuran secara berdampingan dan di inkubasi selama 2 hari kemudian diamati. Garis presipitasi yang telah terbentuk diantara sumuran antibodi dan antigen diwarnai dengan menggunakan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) 0.1%.

3.3.4 Ekstraksi Protein SUT1 Pada Tanaman Tebu

Ekstraksi protein dilakukan dengan cara menggerus 1 gram sampel daun (tanaman tebu) menggunakan mortal-stamper dengan menambahkan nitrogen cair. Daun digerus sampai halus dan diberi buffer ekstraksi yang terdiri dari 30% *sucrose*, Tris-HCl pH 7.5, EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM DTT dan 5% PVP (1 gram sampel dalam 3 ml buffer ekstraksi) kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit suhu 4°C. Supernatant (*soluble fraction*) disimpan, sedangkan pellet (*insoluble fraction*) yang diperoleh disolubelisasi dengan buffer Tris-HCl pH 7.5, EDTA, 5 mM DTT dan SDS 2% dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan supernatant (*insoluble fraction*). Supernatant yang diperoleh disimpan dalam *freezer* -80 untuk digunakan untuk analisis *western blotting* dan imunodifusi (*Ouchterlony*).

3.3.5 Analisis Western Blotting

3.3.5.1 Penentuan Titer Antibodi Poliklonal SUT1

a. SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

Sampel protein rekombinan SUT1 yang digunakan yaitu sebanyak 0.001 µg, 0.01 µg, 0.1 µg dan 1 µg ditambah buffer loading dengan perbandingan 1 : 1 untuk analisa titer antibodi, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 3 menit. Sampel yang sudah dipanaskan dimasukkan ke dalam sumur gel dan elektroforesis dilakukan pada 70 volt selama 2,5 - 3 jam.

b. Transfer ke Membran *Nitrocellulose*

Protein yang telah dipisahkan dengan SDS-PAGE ditransfer ke *membrane nitrocellulose* melalui aliran listrik sebesar 250 mA selama 2 jam dengan suhu 4°C. Membran dicuci dengan TBS (*Tris Buffered Saline*) sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit. Setelah dicuci, protein pada membran *blocking* dengan cara direndam 0,5% skim milk dalam TBS selama 30 menit.

c. Deteksi antigen protein rekombinan SUT1

Deteksi antigen protein SUT1 dilakukan dengan inkubasi membran yang diberi antibodi I (antibodi poliklonal SUT1) pada *shaker* overnight. Membran dicuci kembali dengan TBS sebanyak 3 kali 5 menit, lalu diberi antibodi sekunder (*Alkaline phosphatase Goat-Anti IgG Rabbit conjugated*) dalam TBS skim milk dan diinkubasi selama 1 jam. Sebelum pewarnaan, membran dicuci lagi dengan TBS dan buffer alkali pospat pH 9,5. Pewarnaan dilakukan dengan pemberian 25 µl BCIP dan 50 µl NBT yang dilarutkan dalam 10 ml buffer alkali pospat. Band protein yang terbentuk merupakan band protein SUT1.

3.3.5.2 Deteksi Protein SUT pada Tanaman Tebu

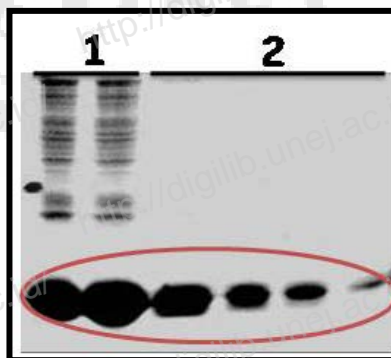
Deteksi protein SUT1 pada tanaman tebu dilakukan pada fraksi *soluble* dan *insoluble* protein masing-masing sebanyak 20 µg. Protein yang telah ditrasfer ke membran PVDF diinkubasi dengan antibodi poliklonal SUT1 pada pengenceran antibodi 1:2000 selama *overnight*. Selanjutnya diberi antibodi sekunder (*Alkaline phosphatase Goat-Anti IgG Rabbit conjugated*) pada pengenceran 1: 3000 dan diwarnai dengan BCIP dan NBT seperti metode yang disebutkan diatas.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Antigen Protein Rekombinan SUT1

Protein umumnya merupakan antigen yang kuat karena struktur yang kompleks dan memiliki berat molekul yang besar. Antigen yang digunakan dalam penelitian ini adalah protein SUT1 yang terdapat pada membran plasma sel tanaman (Khun dan Crishtoper, 2010). Isolasi dan purifikasi protein SUT1 dari tanaman sulit dilakukan karena letaknya pada membran plasma. Hal ini dapat diatasi dengan melakukan overekspresi protein SUT1 menggunakan sel bakteri *Escherichia coli*.

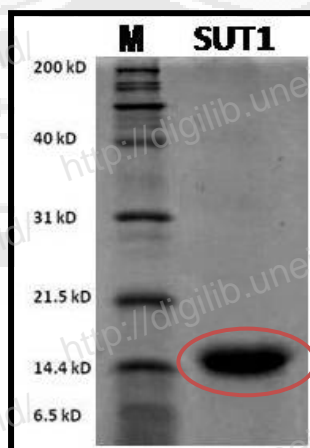
Antigen yang baik adalah antigen dengan tingkat kemurniaan yang tinggi, yaitu protein yang digunakan sebagai antigen mengandung tidak lebih 1% kontaminan (Schwebel, *et al.*, 1990). Oleh karena itu protein rekombinan dari sel bakteri *Escherichia coli* yang akan digunakan sebagai antigen dipurifikasi untuk mendapatkan protein murni. Purifikasi menggunakan kolom afinitas resin Ni-NTA menghasilkan pemisahan protein dan dapat dipisahkan menjadi dua fraksi protein yaitu protein yang masih tercampur dengan protein lain (Gambar 4.1; fraksi 1) dan protein murni SUT1 yang sudah tidak tercampur dengan protein lain (Gambar 4.1; fraksi 2).



Gambar 4.1. Purifikasi protein SUT1 menggunakan resin Ni-NTA. **1** protein SUT1 yang masih tercampur dengan protein lain; **2** protein murni SUT1. Lingkaran merah menunjukkan protein target SUT1

Hasil purifikasi menunjukkan bahwa protein rekombinan SUT1 yang telah difusikan dengan 6x-Histag berhasil dipurifikasi menggunakan *single step* resin afinitas Ni-NTA. Pada prinsipnya resin Ni-NTA yang mengandung ion Nikel (Ni^{2+}) akan berikatan dengan protein yang memiliki protein fusi 6x-Histag. Ikatan tersebut dapat dielusi menggunakan imidazole dengan konsentrasi yang tinggi yaitu 100-250 mM. Hal ini bertujuan untuk melepaskan protein mengandung 6x-Histag yang terikat pada ion Ni^{2+} (Sambrook dan Russell, 2001). Adanya kontaminasi protein lain kemungkinan disebabkan oleh pencucian sebelum elusi kurang maksimal sehingga masih terdapat protein non target yang terikat dengan elusi.

Protein yang masih tercampur dengan protein lain selanjutnya dilakukan purifikasi dengan elektroelusi untuk mendapatkan protein rekombinan murni SUT1. Elektroelusi protein merupakan metode yang cukup mudah untuk mengisolasi protein dari gel poliakrilamid dengan medan listrik (Harrington, 1990). Hasil purifikasi dengan metode ini cukup spesifik yaitu hanya terdapat satu pita protein target SUT1 dengan ukuran ± 15 kD (Gambar 4.2). Spesifitas hasil purifikasi secara elektroelusi dikarenakan hanya pita protein target yang dipotong yang kemudian dikeluarkan menggunakan medan listrik.



Gambar 4.2. Analisa SDS-PAGE sebanyak 5 μg protein rekombinan SUT1 hasil elektroelusi; **M**: marker, **SUT1**: protein rekombinan murni SUT1

Protein rekombinan murni SUT1 didialisis terlebih dahulu untuk menghilangkan senyawa-senyawa selain protein seperti urea, SDS, dan sebagainya yang terkandung dalam cairan protein. Dialisis merupakan metode memisahkan molekul kecil dari molekul besar dengan memungkinkan difusi hanya molekul kecil melalui membran dialisis. Konsentrasi urea dan SDS yang tinggi akan menyebabkan terganggunya metabolisme pada hewan uji dan akan berakhir dengan kematian (Phol, 1990).

Kandungan protein penting diketahui sebelum dilakukan injeksi untuk menentukan dosis protein yang akan diinjeksikan terhadap hewan percobaan. Produksi protein dilakukan dari 4 *l* media *luria bertani* (LB) cair menghasilkan protein sebanyak 4.565 mg dengan rincian pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil Penentuan Kandungan Protein Rekombinan SUT1 Hasil Purifikasi yang digunakan Sebagai Antigen

No	Produksi ke-	Kuantitas protein (mg)
1	P1 ¹	1.04 mg
2	I	1.9 mg
3	II	1.625 mg
4	Total	4.565 mg

¹Farlisa, 2012

4.2 Pembuatan Antibodi Poliklonal SUT1 Pada Kelinci dan Analisa *Ouchterlony*

Pembuatan antibodi poliklonal SUT1 dilakukan pada kelinci betina jenis *New Zealand White Rabbit* usia 3 bulan. Dipilihnya kelinci betina karena lebih penurut, dan lebih sensitif terhadap dosis antigen yang rendah (Hendriksen and Hau 2003).

Injeksi antigen menggunakan protein murni SUT1 dengan dosis 0.5 mg dan dicampur dengan *freund's complete adjuvant* (FCA) yang mengandung mikobakteria. Kandungan mikobakteria dalam FCA akan meningkatkan imunogenitas dengan cara menyusup kedalam sel limfosit. *Booster* imunisasi menggunakan dosis 0.1 mg dengan *freund's incomplete adjuvant* (FIA) yang tidak mengandung mikobakteria hanya terdiri dari campuran minyak dan air (Dunbar dan Schwoebel, 1990),

Penurunan dosis antigen dapat meningkatkan pematangan afinitas antibodi terhadap antigen. Injeksi dilakukan secara subkutan yaitu penyuntikan dibawah kulit agar antigen yang diinjeksikan tidak langsung lepas kedalam peredaran darah. Adanya adjuvant juga menyebabkan antigen dilepas secara pelan-pelan ke peredaran darah karena antigen terperangkap dalam emulsi adjuvant sehingga respon imun terjadi lebih lama (Hendriksen and Hau 2003).

Berdasarkan uji *ouchterlony* (Gambar 4.3), serum yang diambil pertama kali (Ab1) pada minggu ke-4 setelah injeksi pertama atau minggu ke-1 setelah *booster*, belum terdeteksi adanya antibodi SUT1 yang ditandai dengan tidak terbentuknya garis presipitasi. Antibodi SUT1 dalam tubuh kelinci sebenarnya telah terbentuk karena injeksi antigen pertama kali akan merangsang sel-B membentuk antibodi dan sel memori yang disebut respon primer. Antibodi yang dibentuk pada respon primer jumlahnya masih sedikit dan akan meningkat pada injeksi antigen berikutnya yang disebut respon sekunder (Abbas dan Lichtman, 1991). Antibodi SUT1 terdeteksi dalam serum pengambilan kedua (Ab2) minggu ke-5 setelah injeksi pertama dan minggu ke-2 setelah *booster*. Namun serum yang terbentuk masih memiliki titer yang rendah yang ditunjukkan dengan garis presipitasi yang tipis. Pada minggu ke-6 sampai minggu ke-7 titer antibodi meningkat, sedangkan minggu ke-8 sampai minggu ke-9 cenderung mengalami penurunan titer antibodi.



Gambar 4.3. Uji *Ouchterlony* dengan 10 μ g antigen protein rekombinan SUT1 **Pre**: serum pre-imunisasi; **Ab.1-Ab.6**: pengambilan serum setiap minggu (Minggu ke -4 sampai Minggu ke-9 setelah injeksi pertama).

Garis presipitasi yang terbentuk pada uji *ouchterlony* menunjukkan ikatan antigen dan antibodi yang cocok dan bermigrasi ke arah satu sama lain dalam gel. Reaksi presipitasi ini sangat spesifik karena hanya antibodi dan antigen yang cocok yang dapat berikatan. Metode ini sering digunakan untuk memeriksa spesifitas dari antibodi poliklonal (Kunkel, 1988).

Antibodi yang berperan dalam reaksi dengan antigen merupakan imunoglobulin G (IgG). IgG merupakan imunoglobulin yang memiliki fungsi untuk netralisasi toksin, antigen virus, serta presipitasi antigen terlarut. Mekanisme produksi IgG diinisiasi dengan fagositosis antigen oleh makrofag dan memecah antigen menjadi molekul yang lebih kecil. Molekul yang telah dipecah kemudian dipresentasikan oleh MHCII yang menghasilkan IL-1 untuk merangsang sel T helper. Sel T helper menghasilkan IL-2 yang merangsang sel-B berproliferasi menjadi sel plasma untuk memproduksi IgG dan sel memori. Ketika terdapat paparan antigen untuk pertama kalinya (respon primer), sel plasma akan membentuk imunoglobulin M (IgM) sebelum membentuk IgG. IgM merupakan antibodi yang pertama kali dibentuk oleh sel plasma pada respon primer setelah paparan antigen pertama. Produksi IgM akan menurun dan produksi IgG meningkat (Abbas dan Lichtman, 1991).

Paparan antigen baru berikutnya (*booster*), akan mengaktivasi sel memori dan merangsang respon antibodi kedua kali yang jauh lebih cepat dan kuat. Hal ini disebabkan sel memori berproliferasi dengan cepat membentuk sel plasma yang menghasilkan antibodi dalam jumlah besar. Pada respon sekunder, IgM diproduksi dalam jumlah kecil dan dengan waktu yang singkat untuk kemudian IgG diproduksi dalam jumlah besar. IgG merupakan antibodi dominan yang jumlahnya mencapai 75% dari total serum darah normal (Clark dan Pazdernik, 2009)

Dari hasil produksi antibodi poliklonal dan uji *Ouchterlony* didapatkan antibodi poliklonal SUT1 sebanyak 14150 μ L dari total serum II sampai serum VI yang mengandung antibodi SUT1 (tabel 4.2). Hasil antibodi poliklonal yang didapat

tergantung keberhasilan pada saat pengambilan serum darah. Total volume serum yang didapatkan masih dapat ditingkatkan.

Tabel 4.2 Daftar perolehan pengambilan serum darah kelinci yang mengandung antibodi poliklonal SUT1 berdasarkan uji *ouchterlony*

No.	Minggu ke-	Serum	Volume serum	Titer
1.	I	Pre-imun	700 μ L	-
2.	II	-	-	-
3.	III	-	-	-
4.	IV	I	500 μ L	Tidak terdeteksi
5.	V	II	500 μ L	Rendah
6.	VI	III	1200 μ L	Tinggi*
7.	VII	IV	3950 μ L	Tinggi***
8.	VIII	V	7850 μ L	Tinggi**
9.	IX	VI	650 μ L	Tinggi*

*Peningkatan titer antibodi

4.3 Penentuan Titer Antibodi Dengan Analisa *Western Blotting*

Penentuan titer antibodi dilakukan dengan analisa *western blotting*. Antigen yang digunakan adalah protein rekombinan SUT1 dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 1 μ g, 0,1 μ g, 0,01 μ g (10 ng), dan 0,001 μ g (1 ng). Berdasarkan hasil *western blotting* antibodi poliklonal SUT1 pada serum IV mampu mendeteksi keberadaan antigen SUT1 sampai pada konsentrasi 0.001 μ g (1 ng) dengan pengenceran antibodi 1 : 2000. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa antibodi poliklonal SUT1 memiliki titer yang tinggi karena dapat mendeteksi keberadaan antigen dengan konsentrasi yang sangat rendah yaitu 0.001 μ g (1 ng).

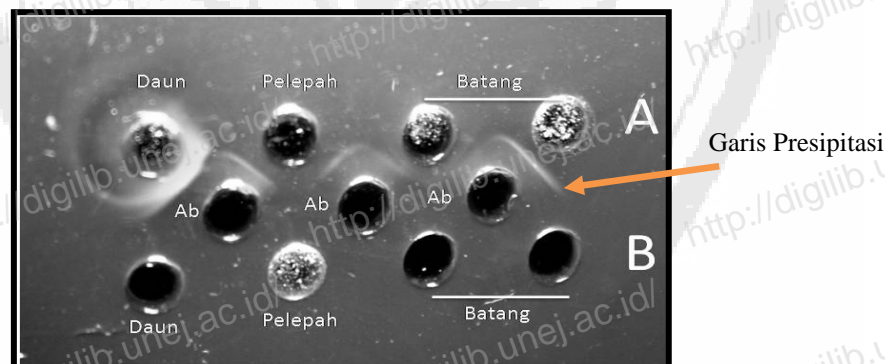


Gambar 4.4 Analisa *western blotting* antigen protein rekombinan SUT1; **A)** 1 μ g, **B)** 0,1 μ g, **C)** 0,01 μ g, **D)** 0,001 μ g dengan pengenceran antibodi 1: 2000. Antibodi poliklonal SUT1 dapat mendeteksi keberadaan antigen rekombinan sampai pada konsentrasi 1 nanogram.

Pengenceran antibodi 1 : 2000 dilakukan berdasarkan ketentuan bahwa pengenceran untuk antibodi poliklonal dapat dilakukan dengan seri pengenceran 1 : 100 sampai 1 : 2000. Antibodi yang dapat mendeteksi antigen pada seri pengenceran tertinggi merupakan antibodi yang memiliki titer tinggi (Boenisch, 2009).

4.4 Deteksi Protein SUT1 pada Tanaman

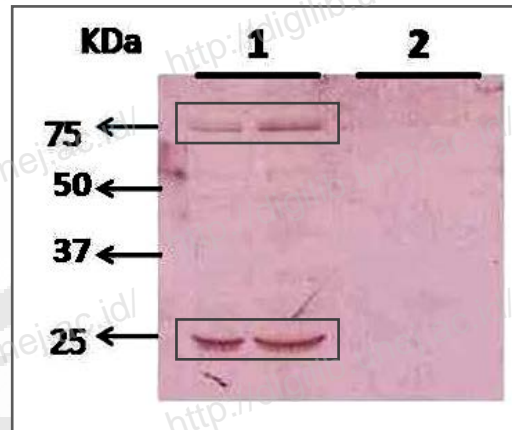
Deteksi protein SUT1 pada tanaman dilakukan dengan analisa *Ouchterlony* dan *Western Blotting* menggunakan protein dari tanaman tebu sebagai antigen. Hasil analisis *Ouchterlony* terbentuk garis presipitasi diantara antibodi dan *fraksi insoluble*. Hal tersebut menunjukkan bahwa antibodi poliklonal SUT1 dapat mengikat protein SUT1 pada fraksi *insoluble* (Gambar 4.5) yang mengindikasikan bahwa protein tersebut terdapat pada membran plasma. Sedangkan pada fraksi *soluble* tidak terjadi reaksi ikatan antibodi-antigen sehingga tidak ada presipitasi yang terbentuk. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Lemoine (2000) bahwa *sucrose transporter* yang diisolasi dari daun *sugar beet* terdapat pada membran plasma.



Gambar 4.5. Analisa *ouchterlony* dengan 1% gel agarose dan 40 µl protein SUT1 dari tanaman tebu menggunakan serum 20 µl antibodi poliklonal SUT1 ke-IV. A) fraksi *insoluble* B) fraksi *soluble*. Garis presipitasi terbentuk pada bagian pellet atau fraksi *insoluble*.

Analisis *western blotting* menunjukkan hasil yang sama bahwa antibodi poliklonal SUT1 dapat mengenali dan mengikat protein SUT1 yang berada pada

fraksi *insoluble*. Protein SUT1 dari tanaman tebu terdeteksi adanya dua pita protein pada ukuran berat molekul ± 75 kDa dan ± 25 kDa (Gambar 4.6).



Gambar 4.6 Analisa *western blotting* dengan 12.5 % akrilamid dan 20 μ g protein SUT1 dari daun tanaman tebu menggunakan serum antibodi poliklonal SUT1 ke-IV. 1) fraksi *insoluble* protein, 2) fraksi *soluble* protein. Protein terdeteksi pada fraksi *insoluble*.

Terbentuknya dua pita protein menunjukkan adanya disosiasi atau degradasi protein SUT1, seperti yang telah dilaporkan oleh Krugel *et al.*, (2008) bahwa adanya DTT (*Dithiothreitol*) pada saat ekstraksi dan purifikasi dapat memutus ikatan disulfida sehingga SUT1 dalam bentuk oligomer menjadi bentuk monomer. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protein SUT1 dengan ukuran ± 75 kDa diduga merupakan bentuk oligomer, sedangkan protein SUT1 dengan ukuran ± 25 kDa diduga merupakan bentuk monomernya. Protein SUT1 oligomer dengan ukuran ± 75 kDa akan menjadi monomer dengan ukuran ± 25 kDa. Kemampuan *sucrose transporter* menjadi oligomer terkait dimana sel tersebut diekspresikan. Bentuk monomer dominan pada sel-sel selain jaringan phloem, sedangkan bentuk oligomer dominan pada jaringan phloem (Krugel *et al.*, 2008).

BAB 5. PENUTUP

4.1 Kesimpulan

Protein rekombinan SUT1 hasil overekspresi fragmen cDNA-*SoSUT1* pada sel *Escherichia coli* strain BL21 dapat digunakan untuk pembentukan antibodi poliklonal SUT1. Injeksi protein rekombinan SUT1 secara subkutan pada kelinci *New Zealand White* dapat menghasilkan antibodi poliklonal SUT1. Hasil analisis *ouchterlony* menunjukkan bahwa pembentukan antibody terdeteksi pada minggu ke-5 setelah injeksi pertama dan minggu kedua setelah *booster* pertama. Antibodi memiliki titer paling tinggi pada minggu ke-7 setelah injeksi pertama. Hasil analisis *western blotting* menggunakan antibodi poliklonal SUT1 dapat mendeteksi keberadaan protein SUT1 pada tanaman tebu dalam fraksi *insoluble* pada ukuran ± 75 kDa dan ± 25 kDa.

4.2 Saran

Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk deteksi protein SUT1 pada tanaman tebu dan tanaman lainnya. Untuk mendapatkan hasil lebih baik perlu dilakukan penelitian lanjutan terutama metode ekstraksi protein SUT1 pada tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A. K. dan Lichtman, A. H. 1991. *Cellular and Molecular Immunology; Updated Edition*. Cina. Elsevier Inc

Aoki, N., Hirose, T., Scofield, G. N., Whitfeld, P. R., Furbank, R. T. 2003. The Sucrose Transporter Gene Family in Rice. *Plant Cell Physiol.* 44: 223–232

Baneyx, F. 1999. Recombinant Protein Expression in Escherchia coli. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 411-421

Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254

Boenisch, T. 2009. *Immunohistochemical Staining Methods: Fifth Edition*. California: Dako North America, Carpinteria

Cheung H, Chan K, Cheng C (2002). Production of polyclonal antibody against recombinant goldfish prolactin and demonstration of its usefulness in a non-competitive antigen-capture ELISA. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 131: 37-46.

Clark, D.P dan Pazdernik, N. J. 2009. *Biotechnology: Applying the Genetic Revolution*. USA. Elsevier Inc.

Cooper, T. G. 1997. *The Tools of Biochemistry*. Pittsburgh: United States of America

Dunbar, B. S. dan Schwobel, E. D. 1990. Preparation of Polyclonal Antibodies. In M.P. Deutscher (Ed.) *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology.* 182: 663-679

Donahue Jr, R.A., R.L Bebee. 1999. BL21-SITM Competent cells for protein Expression in *E.coli*. *Life Technologies* 21: 2

Farlisa, T. 2012. Produksi Protein Rekombinan Sucrose Transporter Melalui Overekspresi cDNA-SoSUT1 Pada Sel Bakteri *Escherichia coli* Stran BL-21.(Skripsi)

- Garfin, D. E. 1990. One-Dimensional Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology*. 425:441
- Giaquinta, R. 1976. Evidence for Phloem Loading from the Apoplast : Chemical Modification Of Membrane Sulphydryl Groups. *Plant Physiol* 57: 872-875
- Harrington, M.G. 1990. Elution of Protein From Gel. *Methods in Enzymology*. 448-495.
- Hackell, N., Schauer, N., Carrari, F., Fernie, AR., Grimm, B., Kuhn, C. 2006. Sucrose Transporter LeSUT1 and LeSUT2 Inhibition Affects Tomato Fruit Development In Different Ways. *The Plant Journal* 45: 180–192
- Hendriksen C, Hau J. 2003. Production of polyclonal and monoclonal antibodies. In: *Handbook of Laboratory Animal Science*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press LLC. p 391-411
- Huber, S. C. dan Huber, J. L. 1996. Role and Regulation of Sucrose Phosphate Synthase in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 431-444
- Krugel, U., Veenhoff, L. M., Langbein, J., Wiederhoki, E., Liesche, J., Friedrich, T., Grimm, B., Martinoia, E., Poolman, B., Kuhn, C., 2008. Transport and Sorting of the Solanum tuberosum Sucrose Transporter SUT1 Is Affected by Posttranslational Modification. *The Plant Cell*, Vol. 20: 2497–2513
- Kuhn, C and Christopher. 2010. Sucrose Transporters Of Higher Plants. *Plant Biology* 13:1–11
- Kumagai dan Tsumoto, 2001. Antigen–Antibody Binding. *Encyclopedia Of Life Sciences*
- Kunckel, J.G. 1988. Immunikological Techniques in Insect Biology. Gilbert & Miller Eds.
- Lalonde, S., Tegeder, M., Frommer, W. B., Patrick, J.W. 2003. Phloem Loading and Unloading of Sugars and Amino Acids. *Plant Cell and Environment* 26: 37–56
- Leenaars, M. dan Hendriksen, C. F. M. 2005. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR Journal* 46: 3

- Lemoine, R. 2000. Sucrose Transporters In Plants: Update On Function And Structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 246-262
- Lipman, N. S., Jackson, L. R. Trudel, L. J. Garcia, F. W. 2005. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resource. *ILAR Journal* 46: 3
- Lauterbach et al., 2006. Immunolocalization of the PmSUC1 Sucrose Transporter in *Plantago major* Flowers and Reporter-Gene Analyses of the PmSUC1 Promoter Suggest a Role in Sucrose Release from the Inner Integument. *Plant Biol.* 9 (2007): 357 – 365
- McElroy, A. K., Albarino, C. G., Nichol, S. T. 2009. Development of a RVFV ELISA that can distinguish infected from vaccinated animals. *Virology journal.* 6: 25
- Nevinsky, N. A., Favorova, O. O., Buneva, V. N. 2002. Catalytic Antibodies: New Characters in the Protein Repertoire. *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual* Laboratory Press
- Ouchterlony, O., (1967) in Handbook of Experimental Immunology eds. D. M. Weir (Blackwell, Oxford) p. 655.
- Ouchterlony, O. and Nilsson, L. A. (1973) in Handbook of Experimental Immunology ed. D. M. Weir (Blackwell, Oxford), Chapter 19.
- Papermaster, D. M. D. 1975. *Immunology: A Scope Monograph*. Michigan: The Upjohn Company
- Patrick, J.W. 1997. Phloem Unloading: Sieve Element Transport. *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol.* 48: 1567-1577
- Pohl, T. 1990. Concentration of Protein and Removal of Solutes. *Methods in Enzymology.* 182: 68-83
- Rantam. FA. 2003. *Metode Immunologi*. Surabaya: Airlangga University Press
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., Frommer, W. B. 1992. Isolation and Characterization of a Sucrose Carrier cDNA from Spinach by Functional Expression in Yeast. *The EMBO Journal* 11: 4705-4713

- Riesmeier, J.W., Hirner B., Frommer, W.B. 1993. Potato Sucrose Transporter Expression in Minor Veins Indicates a Role in Phloem Loading. *The Plant Cell* 5: 1591-1598
- Sauer, N., Ludwig, A., Knoblauch, A., Rothe, R., Gahrtz, M. and Franz Klebl, F. 2004. AtSUC8 and AtSUC9 Encode Functional Sucrose Transporters, But The Closely Related AtSUC6 and AtSUC7 Genes Aberrant Proteins In Different Arabidopsis Ecotypes. *Plant J.* 40: 120–130.
- Sauer, N. 2007. Molecular Physiology Of Higher Plant Sucrose Transporters. *FEBS Letters* 581: 2309–2317
- Schumann, W. Carlos L.S. Ferreira. 2004. Production of recombinant proteins in Escherichia coli. *Genetics and Molecular Biology* 27: 442-453
- Shiratake, K. 2007. Genetics of Sucrose Transporters in Plants. *Genes, Genomes, and Genomics Global Science Books.*
- Sorensen, H. P and Mortensen, K.K. 2004. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. *Journal of Biotechnology* 115: 113–128
- Stryer, Lubert. 1995. *Biokimia*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Stills HF Jr. 2005. Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J* 46:280-293.
- Sugiharto, B., Ermawati, N., Sakakibara, H. 2003. Pembuatan Antibodi Poliklonal Secara tepat untuk Deteksi Protein Drought-Inducible pada Tanaman Tebu. *Jurnal Ilmu Dasar.* 4(2): 112-119.
- Sugiharto, B., Slameto dan P. Dewanti. 2008. Peningkatan Produksi Gula melalui Overekspresi Gen untuk SPS dan SUT pada Tanaman Tebu. Laporan penelitian Hibah kompetensi. (Tidak dipublikasikan).
- Sugiharto, B., 2010. Overekspresi Gen Sucrose-Phosphate Synthase, Konstruksi Double Ekspresi Gen SPS-SUT: Laporan Akhir Kerjasama Riset Bioteknologi Tebu Rendemen Tinggi. Jember: Pusat Penelitian Biologi Molekul UNEJ
- Timmons, T.M. and Dunbar, B.S. 1990. Protein Blotting and Immunodetection. In M.P. Deutscher (Ed.) Guide to Protein Purification. *Methods in Enzymology.* 182: 679-687.

Yu, J., Hu, S., Wang, J., et al. (2002) A Draft Sequence Of The Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296: 79–92.

Weise, A., Barker, L., Kühn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, B.W., Ward2, J.M. 2000. Plant Physiology: A New Subfamily of Sucrose Transporters, SUT4, with Low Affinity/High Capacity Localized in Eucleate Sieve Elements of Plants. *The Plant Cell*. **12**: 1345–1355.

