

LAPORAN TAHUN II
PROGRAM PENELITIAN HIBAH FUNDAMENTAL
SUMBER DANA DIPA PTN
TAHUN 2012



Judul Penelitian : Produksi Protein Rekombinan Sucrose Transporter Melalui Overekspresi cDNA-*SoSUT1* pada Sel Bakteri *E. coli* Untuk Pembuatan Antibodi

Ketua : Dr. Tri Handoyo, S.P.

Anggota : 1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Sc.
2. Purnama Okviandari, S.P., M.P.

Dibiayai oleh
DIPA UNIVERSITAS JEMBER
No. 181/UN.3.1/Lt.6/2012
Tanggal: 01 Maret 2012

HALAMAN PENGESAHAN

1. Topik Kegiatan : Produksi Protein Rekombinan *Sucrose Transporter* Melalui Overekspresi cDNA-*SoSUT1* pada Sel Bakteri *E. coli* Untuk Pembuatan Antibodi
2. Fokus : Pertanian (Makanan Minuman) – Koridor Jawa
3. Ketua Peneliti
 - a. Nama Lengkap : Dr. Tri Handoyo, SP.
 - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 - c. NIP : 197112021998021001
 - d. Jabatan Struktural : -
 - e. Jabatan Fungsional : Lektor
 - f. Perguruan Tinggi : Universitas Jember
 - g. Fakultas/Jurusan : PERTANIAN / Jurusan Agronomi
 - h. Pusat Penelitian : Lembaga Penelitian Universitas Jember
 - i. Alamat : Jl. Kalimantan 37 Kampus Tegalboto Jember
 - j. Telpon/Faks : 0331-338696/0331-338696
 - k. Alamat Rumah : Jl. Langsep E7, Patrang-Jember
 - l. Telpon : 087757746121
4. Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun (keseluruhan)

Mengetahui,
Dekan Fakultas Pertanian

Jember, 8 Desember 2012

Ketua Peneliti,

Dr. Ir. Jani Januar, M.T.
NIP. 195901021988031002

Dr. Tri Handoyo, SP.
NIP. 197112021998021001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian

Prof. Ir. Achmad Subagio, MAgr., PhD.
NIP. 196905171992011001

LAPORAN TAHUN II
PROGRAM PENELITIAN HIBAH FUNDAMENTAL
SUMBER DANA DIPA UNIVERSITAS JEMBER
TAHUN 2012

Kategori : Fundamental Tahun : 2012
Universitas : Universitas Jember Fakultas : Pertanian
Nama Peneliti : Dr. Tri Handoyo, SP.

Keterangan Umum

1. Judul : **Produksi Protein Rekombinan Sucrose Transporter Melalui Overekspresi cDNA-SoSUT1 pada Sel Bakteri *E. coli* Untuk Pembuatan Antibodi**

2. Dibiayai oleh

2.1 Nomor : 181/UN25.3.1/LT.6/2012

2.2 Tanggal : 1 Maret 2012

3. Jangka waktu penelitian : 1 tahun

4. Personalia penelitian

No.	Nama Peneliti dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi
1.	Dr. Tri Handoyo, S.P.	Biokimia	Fakultas Pertanian
2.	Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Sc.	Biokimia dan Fisiologi Tumbuhan	F. MIPA
3.	Purnama Okviandari, S.P., M.P.	Mikrobiologi	F. MIPA

5. Lokasi Penelitian:

Laboratorium	Alamat	Pemilik/Pengelola
Laboratorium Biologi Dasar	Fakultas MIPA Universitas Jember, Jl. Kalimantan No. 37 Jember, 68121	Dra. Mahriani, MS

6. Persiapan yang dilakukan

- a. Dalam penelitian lanjutan ini, persiapan yang dilakukan yaitu penyediaan protein murni hasil ekspresi cDNA-SoSUT1 kedalam bakteri *E. coli*.
- b. Penyediaan kelinci untuk memproduksi antibodi SUT1 sebanyak 5 ekor kelinci dengan berat lebih dari 2 kg.
- c. Persiapan tanaman untuk melakukan pengujian terhadap antibodi yang telah diproduksi didalam tubuh kelinci.

7. Keterangan khusus

7.1 Tahapan proses pelaksanaan penelitian yang telah diajukan hingga pelaporan kemajuan.

- a. Produksi protein menggunakan teknik protein rekombinan dengan memasukan cDNA-SoSUT1 kedalam vektor ekspresi.
- b. Pemurnian protein hasil produksi menggunakan teknik protein rekombinan.
- c. Pengujian protein menggunakan elektroforesis untuk mengetahui kemurniannya.
- d. Produksi antibodi dalam tubuh kelinci untuk mendapatkan serum darah atau poliklonal antibodi SUT1
- e. Pengujian protein dengan cara mereaksikan antibodi dengan antigen yang diekstraksi dari daun tanaman tebu.

7.2 Pemantauan yang telah dilakukan: **Logbook**

7.3 Hambatan yang ditemukan dan cara penanggulangannya: **tidak ditemukan hambatan dalam pelaksanaan penelitian.**

7.4 Hasil Penelitian Yang Telah Dilakukan:

- a. Produksi protein murni yang telah dihasilkan menggunakan teknik protein rekombinan. Protein dalam bakteri E. coli diekstraksi menggunakan buffer kemudian dipurifikasi menggunakan NiTA resin yang mengandung 6xHistidin. Protein dielusikan kedalam resin sehingga protein terikat dalam matrik, untuk melepaskan protein dari ikatan, matrik dielusi menggunakan larutan NaCl.
- b. Protein yang sudah diperoleh diuji menggunakan elektroforesis untuk mengetahui tingkat kemurniannya dan selanjutnya dikonsentrasikan agar diperoleh protein yang pekat.
- c. Antigen SUT murni yang dilarutkan dengan adjuvant dan disuntikan ke tubuh kelinci di bawah permukaan kulit (subcutan). Proses injeksi dilakukan selama 1 bulan dengan tempo waktu injeksi berikutnya (boost) selama 1 minggu, selain itu juga dilakukan pengujian darah/serum kelinci setiap minggu menggunakan metode Ouckterloni.
- d. Tahapan terakhir dalam penelitian ini adalah pengujian antibodi yang sudah diproduksi didalam tubuh kelinci menggunakan western blot, yaitu mereaksikan antibodi dengan antigen yang diekstraksi dari daun tanaman tebu.

RINGKASAN

Sucrose transporter (SUT) merupakan salah satu protein kunci dalam proses transportasi sukrosa dari daun ke organ lainnya, sehingga keberadaan protein SUT ini sangat menarik untuk dipelajari. Berbagai metode untuk mempelajari mekanisme transportasi sukrosa, yang salah satunya menggunakan metode imunologi (*western blot*). Metode imunologi membutuhkan antibodi protein SUT yang diperoleh dengan memasukan/menginjeksikan protein SUT kedalam tubuh kelinci di bawah permukaan kulit (subkutan).

Produksi protein SUT menggunakan fragmen cDNA-*SoSUT1* telah dikonstruksi dalam vektor plasmid ekspresi pET28a untuk memproduksi protein rekombinan dalam bakteri *Escherichia coli* strain Bl 21. Protein rekombinan SUT1 diisolasi dan dipurifikasi menggunakan NiTA resin yang mengandung 6 Histidin, protein murni digunakan sebagai antigen dalam pembuatan antibodi poliklonal SUT1. Protein SUT hasil purifikasi kemudian diinjeksikan kedalam tubuh kelinci agar antibodi SUT1 dapat terbentuk. Analisis terbentuknya antibodi dilakukan dengan menguji darah kelinci setiap minggu, dengan metode Oukterloni. Antibodi yang telah terbentuk, selanjutnya diujikan secara langsung ke tanaman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa cDNA-*SoSUT1* satu dapat diekspresikan dalam bakteri *E. coli* dan hasil ekspresi berupa protein dapat membentuk antibodi dalam tubuh kelinci, serta antibodi yang terbentuk mampu bereaksi dengan antigen SUT yang ada didalam tanaman.

PENDAHULUAN

Sucrose transporter (SUT) merupakan protein translokator pada proses translokasi hasil fotoasimilasi dalam bentuk sukrosa dari organ *source* menuju organ penyimpanan (*sink*). Protein tersebut disandikan oleh gen yang disebut sebagai gen *SUT* (Aoki *et al.*, 2003). Berdasarkan analisis filogenetik Shiratake (2007) *sucrose transporter* 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 tetapi daya muat pengangkutannya 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 menduga ekspresi tingkat protein. Pengetahuan tentang transportasi sukrosa ini merupakan temuan 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 serum 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 makromolekul asing yang mampu memicu pembentukan antibodi disebut antigen (Stryer, 1995). Protein, polisakarida dan asam nukleat pada umumnya merupakan antigen yang efektif (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 digunakan untuk mempelajari karakter protein SUT1 pada tanaman.

Gen (cDNA)-*SoSUT1* yang telah diisolasi dari tanaman tebu (Sugiharto dkk, 2009 Hikom) 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 BI 21 (Farlisa *et al.*, 2012). Protein rekombinan SUT1 dalam jumlah yang cukup selanjutnya dapat digunakan sebagai antigen dalam pembuatan antibodi poliklonal SUT1. Proses pembuatan antibodi dilakukan dengan memurnikan protein SUT1 yang diperbanyak menggunakan bakteri *E. coli* dan selanjutnya diinjeksikan kedalam tubuh kelinci agar antibodi SUT1 dapat terbentuk.

METODE PENELITIAN

Persiapan Antigen

a. Isolasi Protein dari Gel Poliakrilamid

Isolasi protein dari gel dilakukan dengan memotong gel pada bagian pita target. Potongan gel di potong lebih kecil dan dimasukkan kedalam membran dengan buffer mengandung 25mM Tris Base, 0.192 M glycine dan SDS 0.1%. protein dalam gel dikeluarkan dengan muatan listrik 60 Volt sampai gel menjadi bening (Harrington, 1990).

b. Dialisis

Sampel protein hasil purifikasi dari *colum affinity* dan isolasi dari gel dimasukan kedalam membran dialysis yang terpisah. Selanjutnya sampel dalam membran ditempatkan pada 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 dilakukan *freeze drying* (Phol, 1990).

Pembuatan antibodi poliklonal SUT1 pada tubuh kelinci

Pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan menginjeksikan protein rekombinan SoSUT1 (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) yang kemudian menginjeksikanya pada bagian bawah kulit (subkutan) punggung kelinci. Selang dua minggu dilakukan *booster* injeksi dengan mencampur antigen protein rekombinan SoSUT1 (0.1 mg) dengan *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA) (1:1) 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 *ujiouchterlony* dan *western blotting* (Timmons and Dunbar, 1990).

Tabel 1 Frekuensi injeksi antigen dengan adjuvant

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

Analisis *Ouchterlony*

Analisis *Ouchterlony* dilakukan dengan melarutkan gel agarose 0.8 % dengan agarose buffer solution yang terdiri dari 0.5 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA, NaCl, dan 0.1 M NaN_3 . Larutan dipanaskan dengan microwave sampai homogen dan jernih, 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. Selanjutnya larutan antigen dan antibodi dimasukkan kedalam sumuran sebanyak 20 mikroliter. Inkubasi selama 2-3 hari kemudian diamati. Garis presipitasi yang telah terbentuk diwarnai dengan menggunakan pewarna Coomassie Blue (CBB) 0.1%.

Deteksi Titer Antibodi Dengan Analisis Western Blotting

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

Analisis SDS-PAGE (Garfin, 1990) dilakukan dengan konsentrasi akrilamid 15 % untuk separating gel yang mengandung akrilamid, Tris-HCl pH 8.8, H_2O , SDS 10 %, ammonium persulfate (APS) dan N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) dan 4,5 % untuk gel stacking yang mengandung akrilamid, Tris-HCl pH 6.8, H_2O , SDS 10 %, ammonium persulfate (APS) dan N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED). Sampel protein rekombinan SUT1 yang digunakan 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-protein yang tidak diinginkan, ditutup (*blocking*) dengan cara direndam 0,5% skim milk dalam TBS selama 30 menit.

c. Deteksi antigen protein SUT1

Deteksi protein antigen SUT1 dilakukan dengan inkubasi membran yang diberi antibodi I (antibody 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 alkali pospat. Pewarnaan dilakukan dengan pemberian 25 µl BCIP dan 50 µl NBT yang dilarutkan dalam 10 ml alkali pospat. Band protein yang terbentuk merupakan band protein SUT1. Protein yang mampu terdeteksi pada konsentrasi tertentu menunjukkan tinggi rendahnya titer antibodi.

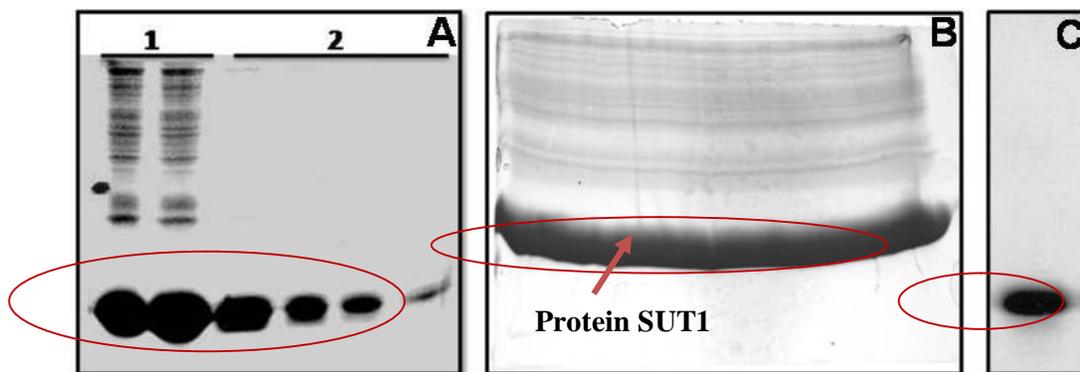
Deteksi protein SUT1 pada tanaman

Deteksi protein SUT1 pada tanaman dilakukan dengan mengekstraksi protein tebu pada bagian daun, pelepah dan batang. Ekstraksi dilakukan dengan cara menggerus 1 gram sampel daun (tanaman tebu) menggunakan mortal-stamper dengan menambahkan nitrogen cair. Daun digerus sampai halus dan diberi bufer ekstraksi yang terdiri dari 30% *sucrose*, Tris-HCl, EDTA, PMSF, DTT dan 5% PVP (1 gram sampel dalam 3 ml buffer ekstraksi) kemudian disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit suhu 4°C. Pellet yang diperoleh disolubelisasi dengan buffer Tris-HCl, EDTA, DTT dan SDS 20% dan disentrifus kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan supernatant (*soluble*) dan pellet (fraksi 2). Supernatan yang diperoleh disimpan dalam *freezer* -80 untuk dilakukan analisis SDS-PAGE dan western blot.

HASIL PENELITIAN

Preparasi Antigen

Antigen yang digunakan dalam penelitian ini adalah protein SUT1 yang terdapat pada membrane plasma. Pada penelitian sebelumnya dilakukan produksi protein SUT1 pada *E. coli* menggunakan fragmen *cDNA SoSUT1* yang diisolasi dari tanaman tebu (**Farlisa dan Sugiharto, 2012**). Untuk mendapatkan protein murni dilakukan purifikasi dalam kondisi denaturing menggunakan *coloum affinity*. Namun dalam pemurnian tersebut selain didapatkan protein murni (Gambar A, line 3, 4, 5 dan 6) juga didapatkan protein yang terkontaminasi oleh protein lain (Gambar A, line 1 dan 2). Protein yang terkontaminasi dilakukan purifikasi dengan elektroelusi (Gambar B) sehingga didapatkan protein murni (gambar C). Metode tersebut cukup mudah untuk mengisolasi protein denaturasi yang murni untuk antibodi poliklonal spesifik.



Gambar 1. (A) Protein hasil purifikasi dengan *coloum affinity*, (B) protein yang akan dipotong pada bagian protein target (C) protein hasil purifikasi dari ge poliakrilamidl

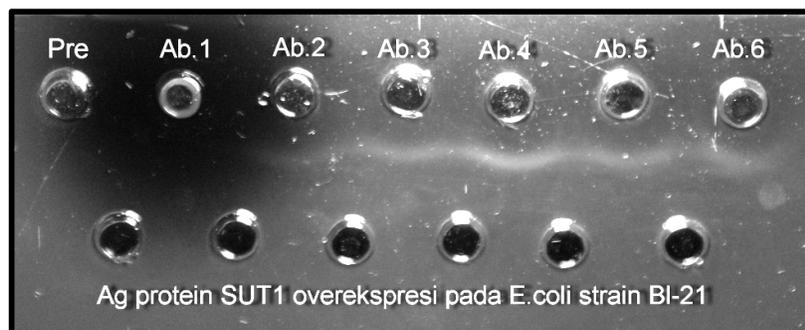
Pembuatan Antibodi Poliklonal SUT1 Pada Kelinci dan Analisa *Ouchterlony*

Pembuatan antibodi SUT1 dilakukan pada kelinci betina jenis *New Zaeland White Rabbit* usia 3 bulan. Untuk pembuatan antibodi poliklonal, kelinci sering digunakan karena ukurannya sesuai, mudah dalam penanganan, umur relatif panjang, cukup untuk produksi titer yang tinggi dan afinitas tinggi. Dipilihnya kelinci betina karena lebih penurut, tidak agresif pada interaksi sosial dan lebih sensitif terhadap dosis yang rendah.

Imunisasi antigen menggunakan protein murni SUT1 dengan dosis 0.5 mg dan dicampur dengan *freund's complete adjuvant* yang mengandung mikobakteria. Kandungan mikobakteria dalam FCA akan meningkatkan imunogenitas dengan cara menyusup kedalam sel limfosit. Booster imunisasi menggunakan dosis 0.1 – 0.2 mg dengan *freund's incomplete adjuvant* yang tidak mengandung mikobakteria, hanya terdiri dari campuran minyak dan air.

Imunisasi 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.

Berdasarkan uji *ouchterlony*, serum I yang diambil pada minggu ke-4 setelah imunisasi belum menunjukkan adanya antibodi SUT1 dalam serum. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya garis presipitasi yang terbentuk seperti pada serum pre-imunisasi. Kelinci yang diimunisasi menunjukkan adanya pembentukan antibodi SUT1 pada minggu ke-5 (serum II). 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 2).



Gambar 2. Hasil uji Ouchterlony dengan antigen dari overekspresi protein SUT1 pada *E.coli*. Pre: serum pre-imunisasi; Ab.1-Ab.6: pengambilan serum setiap minggu (Minggu ke -5 sampai Minggu ke-6)

Paparan antigen baru yang sama untuk kedua kalinya (*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, Ig M diproduksi dalam jumlah kecil dan dengan waktu yang singkat untuk kemudian Ig G diproduksi dalam jumlah besar. Ig G merupakan antibodi dominan yang jumlahnya mencapai 75% dari total serum darah normal.

Dari hasil produksi antibodi poliklonal didapatkan antibodi poliklonal SUT1 sebanyak 14,15 mL dari total serum II sampai serum VI yang mengandung antibodi SUT1 (Tabel 1).

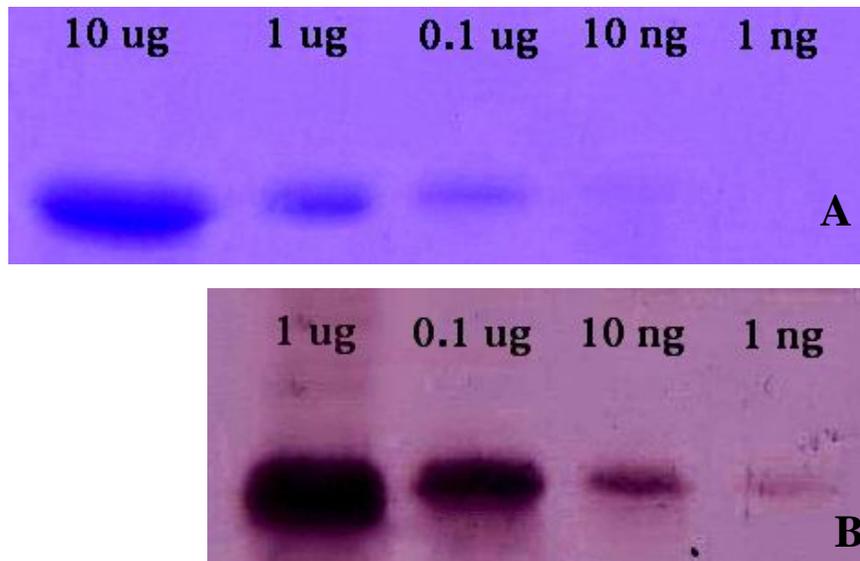
Tabel 1. Kuantitas (mL) dan titer antibodi poliklonal SUT1 berdasarkan uji *ouchterlony*

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

Deteksi Titer Antibodi Dengan Analisa *Western Blotting*

Deteksi titer antibodi dilakukan dengan analisa *western blotting*. Antigen yang digunakan adalah protein SUT overekspresi *E.coli* dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 10 μg , 1 μg , 0.1 μg , 0.01 μg (10 ng), dan 0.001 μg (1 ng). Berdasarkan hasil *western blotting* antibodi poliklonal SUT1 pada serum IV mampu mendeteksi antigen SUT1 sampai pada konsentrasi 1 ng dengan pengenceran antibodi 1 : 2000. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa antibodi poliklonal SUT1 memiliki titer yang tinggi.

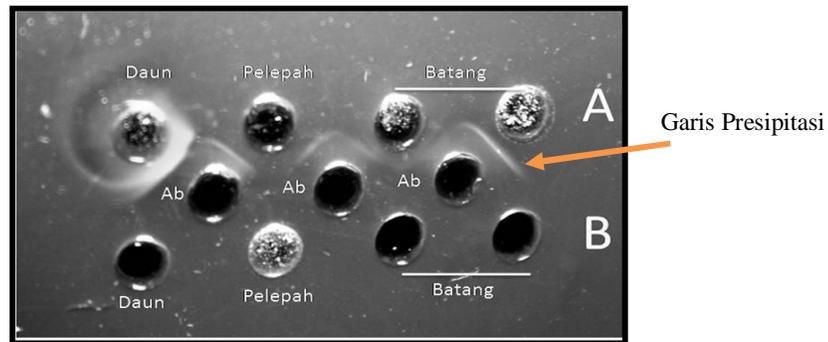
Hasil pemisahan protein dengan analisa SDS-PAGE hanya mampu mendeteksi protein sampai 0.1 μg (100 ng), berbeda dengan hasil analisa *western blotting* yang mampu mendeteksi keberadaan protein pada konsentrasi 0.001 μg (1ng). Hal ini menunjukkan bahwa analisa *western blotting* lebih akurat dan memiliki sensitifitas yang tinggi di bandingkan analisa SDS-PAGE.



Gambar 3. (A) Visualisasi protein SUT1 dari sel *E.coli* dengan analisa SDS-PAGE; (B) Deteksi protein SUT1 dari sel *E. coli* dengan analisa *western blotting*.

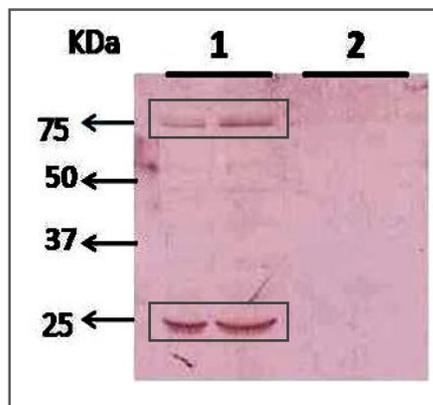
Deteksi Protein SUT1 pada Tanaman

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) 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.



Gambar 4. Analisa *ouchterlony* dengan 1% gel agarose dan 40 μ l protein SUT1 dari tanaman tebu menggunakan serum 20 μ l 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 \pm 75 kDa dan \pm 25 kDa (Gambar 5). Hal ini sesuai dengan yang lokasi *sucrose transporter* yang terdapat pada membran plasma.



Gambar 5. 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*

DAFTAR PUSTAKA

- 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
- 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.
- 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.
- Farlisa, T. 2012. Produksi Protein Rekombinan Sucrose Transporter Melalui Overekspresi cDNA-SoSUT1 Pada Sel Bakteri *Escherichia coli* Strain BL-21.(Skripsi)
- Garfin, D. E. 1990. One-Dimensional Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology.* 425:441.
- 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.
- Harrington, M.G. 1990. Elution of Protein From Gel. *Methods in Enzymology.* 448-495.
- 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.
- 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.
- Shiratake, K. 2007. Genetics of Sucrose Transporters in Plants. *Genes, Genomes, and Genomics Global Science Books.*
- Stryer, Lubert. 1995. *Biokimia.* Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- 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. 2009. Peningkatan Produksi Gula melalui Overekspresi Gen untuk SPS dan SUT pada Tanaman Tebu. Laporan penelitian Hibah kompetensi. (Tidak dipublikasikan).
- 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.
- Weise, A., Barker, L., Kühn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, B.W., Ward, 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.

Lampiran Foto Kegiatan



New Zealand White Rabbit untuk Pembuatan Antibodi Poliklonal SUT1



Injeksi Antigen Protein Rekombinan SUT1 Pada Kelinci Secara Subkutan



Pengambilan Serum (Antibodi) SUT1 Melalui Vena Telinga Kelinci



Analisa Antibodi Poliklonal SUT1