
Pengaruh Jumlah Inokulum Sel Inang Bakteri *E.coli* BL21 (DE3) pLysS dan Waktu Overekspresi pada Produksi Protein Rekombinan Fim-C *Salmonella typhi*

The Effect of Number Inoculum of Host Cells *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Bacteria and Overexpression Time on Production of Fim-C *Salmonella typhi* Recombinant Protein

Muktiningsih Nurjayadi¹, Izzatul Ilma Chairinnisa¹, Geta Putri Mentari¹, Dudi Hardianto², Asri Sulfiandi², Kurnia Agustini²

¹Program Studi Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Jakarta
Gedung KH. Asj'arie Lantai 6, Jl. Rawamangun Muka, Jakarta Timur 13220, Jakarta, Indonesia
²Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong, Tangerang Selatan, Banten, Indonesia

Email: muktiningsih@unj.ac.id

Received: June 2018; Revised: August 2018; Accepted: September 2018; Available Online: November 2018

Abstrak

Protein rekombinan Fim-C *S.typhi* merupakan protein potensial yang dapat dijadikan vaksin demam typhus alternatif dan diproduksi dalam skala besar. Namun, sebelum masuk ke tahap skala besar diperlukan data optimum skala laboratorium mengenai faktor-faktor yang berpengaruh pada proses produksi protein Fim-C *Salmonella typhi*. Penelitian ini bertujuan mendapatkan informasi pengaruh faktor jumlah sel inang bakteri *E.coli* BL21 (DE3) pLysS dan waktu overekspresi pada produksi protein rekombinan Fim-C *Salmonella typhi* sebagai dasar pengembangan kandidat vaksin demam typhus. Proses optimasi overekspresi dilakukan dengan menambahkan inducer IPTG (*Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*) 0.5 mM ke dalam biakan bakteri sejumlah 2%, 4%, dan 6% dengan waktu overekspresi 4, 5, dan 6 jam. Pengukuran konsentrasi ekstrak protein rekombinan Fim-C dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan BCA Kit Assay Thermo Scientific™ pada panjang gelombang 590 nm. Karakterisasi ekstrak protein rekombinan Fim-C dilakukan dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian pengaruh jumlah sel inang bakteri *E.coli* BL21 (DE3) pLysS dan waktu overekspresi pada produksi protein rekombinan Fim-C *Salmonella typhi* memberikan kesimpulan bahwa jumlah sel bakteri *E.coli* 4% dan waktu overekspresi 4 jam merupakan kondisi optimum overekspresi protein Fim-C *Salmonella typhi* yang ditandai dengan adanya pita dengan intensitas tinggi pada ukuran ± 31 kDa.

Kata kunci: Protein rekombinan Fim-C *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi*, Overexpression.

Abstract

Recombinant protein Fim-C *S.typhi* is a potential protein that can be used as an alternative typhoid vaccine and produced on a large scale. However, before entering into a large-scale stage, laboratory optimum data on the factors that affect the production process of Fim-C *Salmonella typhi* proteins are required. This study aims to obtain information regarding the effect of host cell number *E.coli* BL21 (DE3) pLysS and overexpression time on production of recombinant protein Fim-C *Salmonella typhi* as the basis for developing candidate of typhoid vaccine. The optimization process of overexpression was done by adding 0.5 mM IPTG (*Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*) inducer into bacterial cultures of 2%, 4%, and 6% with 4, 5, and 6 hours over expression. The measurement of the concentration of Fim-C recombinant protein extracted samples were done by a spectrophotometric method used BCA Kit Assay Thermo Scientific™ with wavelength 590nm. The characterization of those protein extracts was performed using SDS-PAGE method. The results from the study

concluded that the number of 4% *E.coli* bacterial cells and four-hour overexpression time are the optimum condition of Fim- C *Salmonella typhi* characterized by the presence of high-intensity bands at ± 31 kDa.

Keywords: Recombinant protein Fim-C *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi*, Overexpression.

DOI:<http://10.15408/jkv.v4i2.8077>

1. PENDAHULUAN

Demam tifoid masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia khususnya di negara-negara berkembang dan tropis seperti Asia Tenggara, Afrika, dan Amerika Latin. Insiden penyakit ini masih tinggi yaitu menyebabkan lebih dari 21 juta kasus penyakit dan lebih dari 200.000 kasus berakhir dengan kematian (Damme *et al.*, 2011). Penyakit demam tifoid di Indonesia masih sangat endemis. Menurut data *World Health Organization*, penderita Demam Tifoid di Indonesia cenderung meningkat setiap tahun dengan rata-rata 800 per 100.000 penduduk (Depkes RI, 2013).

Salah satu upaya untuk mencegah penyakit demam tifoid adalah melalui pemberian vaksinasi. Vaksin rekombinan merupakan salah satu alternatif yang ditawarkan untuk mencegah demam tifoid. Vaksin rekombinan memiliki beberapa keunggulan, antara lain: perlindungan yang lebih tinggi untuk pasien, kemurniannya lebih tinggi, menghasilkan respon imun lebih spesifik, dan produksi protein dapat dilakukan dalam skala besar (Nascimento *et al.*, 2012; Muktiningsih *et al.*, 2016).

Salah satu gen yang dapat dijadikan kandidat vaksin rekombinan tifus adalah gen *fim-C*. Pada penelitian sebelumnya telah berhasil membuktikan bahwa gen *fim-C* *Salmonella typhi* berhasil di overekspresi dalam sel inang *E. Coli* BL21(DE3)pLysS menghasilkan protein rekombinan Fim-C *Salmonella typhi* (Endah, 2013). Selain itu, telah berhasil dilakukan pula uji immunogenisitas protein *Fim-C* hasil overekspresi kepada hewan mencit yang menunjukkan bahwa protein Fim-C *Salmonella typhi* mampu menaikkan titer antibodi hewan mencit tersebut (Umar, 2014; Muktiningsih *et al.*, 2014). Selanjutnya, telah pula dilakukan uji toksisitas protein rekombinan Fim-C *Inclusion Bodies* bakteri *Salmonella typhi* pada hewan mencit yang menunjukkan bahwa protein rekombinan Fim-C *Salmonella typhi* cukup aman bagi hewan uji mencit (Muktiningsih *et*

al., 2017 inpress; Gina, 2015). Berdasarkan hasil-hasil tersebut maka protein rekombinan Fim-C-*S. typhi* memiliki peluang untuk dijadikan vaksin alternatif dan diproduksi dalam skala besar yang diharapkan memiliki potensi yang lebih baik dari vaksin yang ada sebelumnya atau memiliki potensi yang mirip dengan vaksin yang sedang dikembangkan saat ini. Analisis literatur menunjukkan bahwa banyak hal yang harus diperhatikan dalam produksi rekombinan protein sebagai vaksin, atau sebagai tujuan terapeutik dan diagnosis. Salah satu sukses yang paling utama dalam aplikasi molekul biosimilar tersebut adalah bila berhasil mengembangkan produk tersebut dalam skala besar (Brown *et al.*, 2014 ; Bustos *et al.*, 2016 ; Chen *et al.*, 2016).

Namun, sebelum masuk ke tahap skala besar diperlukan data optimum skala laboratorium mengenai faktor yang akan berpengaruh pada proses produksi protein Fim-C *Salmonella typhi*. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menghasilkan informasi tentang jumlah inoculum sel inang bakteri *E.coli* BL21 (DE3) pLysS yang mengandung plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C-S.typhi* dan waktu overekspresi pada skala laboratorium yang dapat mempengaruhi produksi protein Fim-C *Salmonella typhi* skala besar.

2. METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : *Laminar Air Flow* (ESCO), *Hotplate* (Stuart), Autoklaf (All American), *UV Sterilizer* (Fortune), Kulkas (Sharp), *Freezer* (Sansio), Inkubator (Memmert), *Vortex* (Maxi Mix II), *Orbital Shaker* OS-10 (BOECO), *Microcentrifuge* (Hettich 70 R), satu set alat elektroforesis protein (Bio-Rad), Spektrofotometer UV-VIS (Genesys), Pipet Mikro (Rainin), Sentrifugasi (Thermo, Legend Micro17R Centrifuge Hettich Universal 320 R), alat-alat kaca bermerek Pyrex (tabung reaksi, cawan petri, corong, gelas kimia, gelas ukur, erlenmeyer), spatula, batang pengaduk, kawat ose, masker, sarung tangan, pipet tetes, tabung Eppendorf, Tip untuk mikropipet (Extragene),

syringe pengaduk magnetik, plastik selopan, pinset, microtiter plate well, *ELISA reader* (Biotech).

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri sel inang *E.coli* BL21 (DE3) pLysS yang sudah mengandung plasmid recombinant pET-30a-*fim-C-S.typhi* hasil penelitian sebelumnya (Endah, 2013; Muktiningsih et al, 2014; ThermoScientific, 2016).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: etanol 70% (Laboratorium Kimia UNJ), aquadest (Harum Kimia), *Luria-Broth* (Deben DiagnosticsLtd), Kanamicin, IPTG (Thermo Scientific), poliakrilamid 30% (Bio-Rad), 1,5 M *tris* pH 8,8 (Bio-Rad), SDS 10% (*Sodium Dodesil Sulfate*) (Bio Basic Canada Inc.), APS 10% (Thermo Scientific), TEMED (N,N,N',N'-tetra-etilendiamin) (Bio-Rad), 1.0 M *tris* pH 6.8 (Bio-Rad), SDS *Running Buffer* (*Tris base* (Thermo Fisher Scientific) *glycine* (Thermo Fisher Scientific), SDS 10% (Bio Basic Canada Inc.)), *Buffer sample* (*2-Mercaptoethanol* (Merck), *Laemmlli Sampel Buffer* (Bio-Rad)), *Page Blue Protein Staining Solution* (Thermo Scientific), *BCA Kit Assay* (Thermo Scientific), *Denaturing dan Native Equilibration Buffer*, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Biotech).

Pembuatan Inokulum

Sel inang bakteri *E. coli* BL21 (DE3) pLysS yang mengandung plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C-S.typhi* diinokulasi dalam media *Luria Bertani* cair 20 mL yang mengandung 60 µg/mL kanamisin (LBK). Campuran dari gliserol stock diinkubasi pada suhu 37 °C dengan aerasi menggunakan *shaker incubator* pada kecepatan 150 rpm selama *overnight* (±16 Jam) atau sampai nilai OD₆₀₀ 0.6-1.0 (Endah, 2013; Novagen, 2011)

Optimasi Jumlah Inokulum Sel Inang Bakteri *E.coli*, dan Waktu Overekspresi Protein *Fim-C S. typhi*

Variasi inokulum sebanyak 2%, 4%, dan 6% dengan OD₆₀₀ 0.6-1.0 hasil tahap sebelumnya dimasukkan ke dalam 3 erlenmeyer 100 mL yang telah diisi 50 mL media LBK (*Luria Bertani* + Kanamisin) steril. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C, dengan aerasi 150 rpm selama 3 jam sampai didapatkan OD₆₀₀ sebesar 0.6-1.0 menggunakan *incubator shaker*. Induksi terhadap overekspresi protein

rekombinan dilakukan dengan menambahkan IPTG 0.5 mM, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C, 150 rpm menggunakan *shaker incubator*. Penginduksian ini dilakukan dengan berbagai variasi waktu, dimana sebanyak 15 mL sampel diambil pada 4 jam setelah penginduksian. Selanjutnya dilakukan isolasi protein hasil overekspresi dengan variasi inokulum tersebut sesuai prosedur pET system. Protein hasil isolasi dikarakterisasi dengan SDS PAGE.

Berdasarkan cara yang sama dengan optimasi jumlah sel inang/inokulum, dilakukan juga variasi waktu overekspresi pada 4, 5, dan 6 jam. Proses isolasi protein dan karakterisasi protein hasil ekspresi sama dengan cara yang dilakukan sebelumnya.

Proses Overekspresi Protein *Fim-C S. typhi* pada kondisi optimum

Sebanyak 4 mL inokulum (4%) dengan OD₆₀₀ 0.6 dimasukkan dalam labu erlenmeyer 250 mL yang telah diisi 100 mL media LBK steril. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C, dengan pengocokan 150 rpm selama 3 jam sampai didapatkan OD₆₀₀ sebesar 0.6-1.0. Induksi terhadap ekspresi protein rekombinan dilakukan dengan menambahkan IPTG sebanyak 510 µL sehingga konsentrasi IPTG dalam medium 0.5 mM. Setelah itu diinkubasi pada waktu optimum overekspresi yaitu 4 jam pada suhu 37 °C, dengan aerasi 150 rpm. Semua langkah pada proses di atas dilakukan secara aseptik. Sel hasil overekspresi ini disiapkan lebih lanjut untuk tahap isolasi protein hasil overekspresi sesuai prosedur (Novagen, 2011)

Isolasi Protein *Fim-C S. typhi*

Protein *Fim-C S. typhi* diisolasi dari protein yang larut dalam sitoplasma (*Native*) dan protein yang membentuk agregat (*inclusion bodies*). Prosedur isolasi hasil overekspresi dilakukan sesuai prosedur ThermoScientific. Sel hasil induksi dipindahkan pada tabung sentrifugasi yang telah steril. Campuran sel disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 g, selama 30 menit pada suhu 4 °C. Supernatan didekantasi kemudian tabung sentrifugasi dibalik di atas kertas *tissue* agar semua media keluar. Pelet diresuspensi dengan 2 mL *Native Equilibration buffer*. Selanjutnya dilakukan sonikasi selama 15 menit dengan alat sonikator pada posisi frekuensi 4 Hz (Proses sonikasi 30 detik *on* dan 30 detik *off*) sampai campuran menjadi lebih bening. Selama proses sonikasi,

campuran sel diinkubasi dalam es. Campuran disentrifugasi pada kondisi 8000 g, selama 30 menit pada suhu 4 °C. Selanjutnya pelet dan supernatan dipisahkan. Protein yang terlarut dalam sitoplasma terdapat dalam supernatan dipisahkan ±2 mL untuk disimpan pada suhu -20 °C untuk analisis SDS-PAGE. Pellet dari hasil sentrifugasi akan disiapkan lebih lanjut untuk isolasi protein yang membentuk agregat atau *inclusion bodies* (Muktiningsih, 2005; ThermoScientific, 2016)

Pellet sel diresuspensi dengan 2 ml *denaturing equilibration buffer* dengan konsentrasi 1ml/berat basah. Campuran dihomogenkan dengan vorteks secara perlahan selama 1 menit dan dilakukan inkubasi selama 1 jam. Selanjutnya campuran disentrifugasi pada kondisi 8000 g, selama 30 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan adalah protein Fim-C *S. typhi* yang membentuk agregat atau *inclusion bodies*. Sebanyak ±2 mL supernatan diambil dan disimpan pada suhu -20°C untuk analisis SDS-PAGE (ThermoScientific, 2016)

Pengukuran Konsentrasi Protein Fim-C

Pengukuran konsentrasi protein Fim-C *S. typhi* dilakukan dengan metode BCA (Purwanto, 2014; Thermo Scientific, 2014). Tahap pengukuran konsentrasi protein dengan metode BCA meliputi pembuatan kurva standar dan penentuan konsentrasi protein sampel yang dialurkan pada kurva standar sesuai dengan prosedur pada *BCA Kit Assay Thermo Scientific™* (Thermo Scientific, 2014).

Karakterisasi Protein Fim-C *S. typhi*

Karakterisasi ekstrak protein dilakukan dengan SDS-PAGE 12%. Langkah proses SDS-PAGE meliputi penyiapan gel poliakrilamid, penyiapan sampel protein Fim-C *S. typhi*, proses elektroforesis, pewarnaan gel, dan pengeringan gel, prosedur mengikuti Bio-Rad (Bio-Rad, 2016).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Jumlah Inokulum Sel Inang Bakteri *E.Coli*, dan Waktu Overekspresi Protein Fim-C *S.typhi*

Proses optimasi jumlah sel inang bakteri *E.coli* dilakukan dengan memasukkan 1 mL (2%), 2 mL (4%), dan 3 mL (6%) inokulum dibiakkan kembali masing-masing ke dalam 50 mL media LBK pada masing-masing tabung erlenmeyer 100 mL selama 3 jam pada suhu 37

°C, pengocokkan 150 rpm. Pertumbuhan bakteri dapat diamati dengan cara mengukur OD₆₀₀ atau kekeruhan media pertumbuhan yang telah ditambahkan dengan bakteri. Indikasi adanya pertumbuhan yaitu kekeruhan yang semakin meningkat dan nilai OD₆₀₀ telah mencapai 0.6-1.0. Pengukuran *optical density* bakteri tersebut dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 600. Berikut ini merupakan hasil pengukuran OD₆₀₀ pada sel bakteri *E.coli*.

Tabel 1. Hasil Pengukuran OD₆₀₀ setelah 3 jam *dishaker*

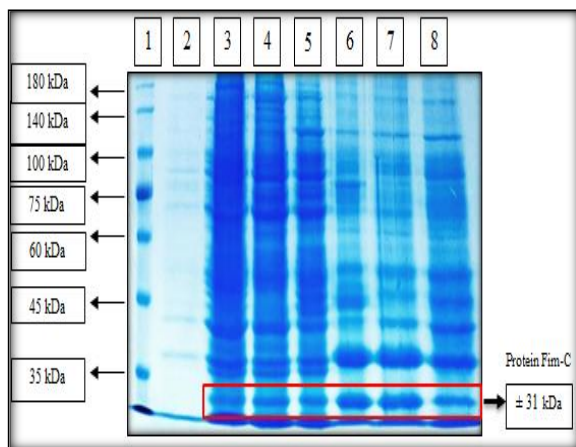
OD ₆₀₀ sel <i>E.coli</i> 2%	OD ₆₀₀ sel <i>E.coli</i> 4%	OD ₆₀₀ sel <i>E.coli</i> 6%
0.463	0.654	1.224

Setelah mengukur OD₆₀₀, dilakukan penginduksian. Sebelum dilakukan penginduksian, biakan pada masing-masing tabung erlenmeyer diambil 1 mL untuk disentrifuge dan disimpan sebagai kontrol negatif (I). Selanjutnya dilakukan penginduksian dengan menambahkan IPTG (*isopropil-β-D-thiogalaktopiranosida*) dengan konsentrasi 0.5 mM sebanyak 245 µL pada jumlah sel 2%, 250 µL jumlah sel 4%, dan 255 µL jumlah sel 6%.

Kultur sel bakteri rekombinan *E. coli* BL21 (DE3) *plysS* yang mengandung plasmid pET-30a-fim-C-*S.typhi* diinduksi dalam variasi waktu tertentu yaitu selama 4 jam, 5 jam, dan 6 jam. Biakan sebanyak 15 mL diambil pada waktu yang telah ditentukan pada masing-masing tabung erlenmeyer yang berisi kultur sel 2%, 4%, dan 6%, lalu proses penginduksian dihentikan. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi biakan pada suhu 4 °C selama 30 menit pada kecepatan 8.000 rpm. Tujuan dilakukannya sentrifugasi pada suhu rendah (4 °C) adalah untuk menjaga terjadinya denaturasi dan degradasi protein rekombinan yang telah diekspresikan (Novagen, 2011). Pellet yang dihasilkan disimpan pada suhu -20 °C. Pellet hasil optimasi jumlah sel dan waktu overekspresi diisolasi dan kemudian dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE.

Berdasarkan hasil SDS-PAGE diketahui bahwa jumlah sel optimum adalah 4% dan waktu overekspresi optimum yaitu 4 jam penginduksian. Hal ini dibuktikan dengan adanya intensitas pita yang lebih tinggi pada

lajur 4 (*Native*) dan lajur 7 (*Inclusion bodies*) pada Gambar 1 dan lajur 3 (*Native*) dan lajur 6 (*Inclusion bodies*) pada Gambar 2 dibandingkan dengan pita pada lajur lainnya.



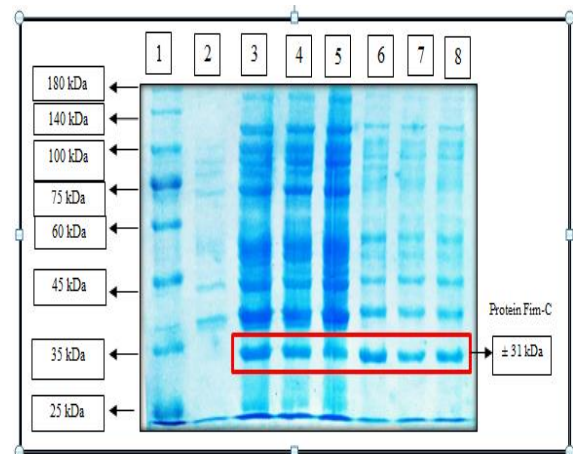
Gambar 1. Hasil optimasi jumlah sel inang bakteri *E.coli* BL21 (DE3) pLysS pada overekspresi protein rekombinan Fim-C *S.typhi*.

Keterangan:

Lajur 1: *Protein marker* 5 μ L (SMBiO); Lajur 2. 25 μ g protein rekombinan Fim-C sebelum diinduksi; Lajur 3. 25 μ g 2% ekstrak protein rekombinan Fim-C *native* hasil overekspresi; Lajur 4. 25 μ g 4% ekstrak protein rekombinan Fim-C *native* hasil overekspresi; Lajur 5. 25 μ g 6% ekstrak protein rekombinan Fim-C *native* hasil overekspresi; Lajur 6. 25 μ g 6% ekstrak protein rekombinan Fim-C *inclusion bodies* hasil overekspresi; Lajur 7. 25 μ g 6% ekstrak protein rekombinan Fim-C *inclusion bodies* hasil overekspresi; Lajur 8. 25 μ g 6% ekstrak protein rekombinan Fim-C *inclusion bodies* hasil overekspresi.

Berdasarkan data yang diperoleh, pita protein pada jumlah sel inang bakteri *E.coli* 4% pada ± 31 kDa intensitasnya lebih tebal dibandingkan dengan pita protein pada sel inang bakteri *E.coli* lainnya. Hal ini dikarenakan sel inang bakteri *E.coli* 4% sebelum diinduksi nilai OD₆₀₀ telah mencapai 0.6 yang berarti bahwa sel inang bakteri sedang memasuki fase eksponensial/ fase log. Fase log adalah fase dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat. Sehingga bila dilakukan penambahan *inducer* (IPTG) pada awal fase log akan meningkatkan produksi protein rekombinan yang diinginkan dan ditandai dengan tebalnya pita pada gel poliakrilamid tersebut (Novagen, 2011). IPTG merupakan senyawa yang memiliki struktur mirip laktosa dan berfungsi sebagai

penginduksi ekspresi gen di bawah kontrol promotor. Proses induksi IPTG dimulai dengan terjadinya ikatan antara IPTG dengan protein *lac repressor*. Ikatan tersebut mengakibatkan repressor terinaktivasi dan tidak dapat berikatan dengan operator. Setelah *lac repressor* tidak dapat mengikat operator, enzim RNA polimerase pada *E. coli* aktif untuk melakukan ekspresi (mentranskripsi dan translasi) gen RNA polimerasi-T7 menjadi protein polimerasi-T7. Setelah protein polimerasi-T7 terbentuk, protein tersebut akan mengikat promotor bakteriofag-T7 yang terdapat pada plasmid rekombinan sehingga ekspresi gen target dapat terjadi (Novagen, 2011). Sejalan dengan penelitian ini Gaurav Chhetri (2015) menyatakan bahwa penggunaan IPTG sebagai inducer pada produksi recombinant amyloid-beta peptide dapat diperoleh hasil 90% protein rekombinan yang terlarut dalam sitoplasma (Gaurav Chhetri *et al.*, 2015). Peneliti lain membuktikan bahwa ada hubungan langsung antara konsentrasi inducer awal dan laju transpor inducer dengan aktivitas spesifik. Mayoritas inducer tetap dalam medium untuk mencapai kesetimbangan dengan tingkat intraseluler (Fernández-Castané *et al.*, 2012)



Gambar 2. Hasil optimasi waktu overekspresi protein rekombinan fim-C *S.typhi*.

Keterangan:

Lajur 1. *Protein Marker* 5 μ L (SMBiO); Lajur 2. 25 μ g protein Fim-C sebelum diinduksi; Lajur 3. 25 μ g protein *native* Fim-C setelah diinduksi selama 4 jam; Lajur 4. 25 μ g protein *native* Fim-C setelah diinduksi selama 5 jam; Lajur 5. 25 μ g protein *native* Fim-C setelah diinduksi selama 6 jam; Lajur 6. 25 μ g protein *inclusion bodies* Fim-C setelah diinduksi selama 4 jam; Lajur 7. 25 μ g protein *inclusion bodies* Fim-C setelah diinduksi selama 5 jam; Lajur 8. 25 μ g protein *inclusion bodies* Fim-C setelah diinduksi selama 6 jam.

Sedangkan semakin lama waktu penginduksian, semakin berkurang pula intensitas pita protein yang dihasilkan dikarenakan protein rekombinan akan terdegradasi oleh *endogenous protease* yang dimiliki oleh inang, akibat sel inang yang mulai memasuki fase kematian, sehingga terjadi lisis sel. Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Semakin lama waktu inkubasi akan memperbesar peluang terjadinya pemecahan protein oleh enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* itu sendiri (Apriyansa, 2015).

Overekspresi Protein Fim-C *S.typhi* pada kondisi optimum

Kultur sel inang bakteri *E.coli* overnight (*starter culture*) sebanyak 20 mL dimasukkan ke dalam 100 mL media LBK steril. Kultur bakteri dilakukan di dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm, 37 °C selama 3 jam hingga OD₆₀₀ (0.6-1.0). Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C dikarenakan suhu tersebut merupakan suhu optimum untuk bakteri *E.coli* tumbuh dan melakukan aktivitas metabolismenya. Sedangkan inkubasi dalam *incubator shaker* bertujuan untuk memperbesar aerasi dan kontak yang terjadi antara medium dan bakteri sehingga bakteri dapat tumbuh secara maksimal. Setelah tercapai OD₆₀₀ (0.6-1.0), dilakukan penambahan inducer yaitu IPTG sebanyak 510 µL dari larutan stock 100 mM sehingga konsentrasi akhir IPTG dalam biakan sebesar 0.5 mM (Ida, 2016). Penginduksian dilakukan selama 4 jam, 150 rpm, 37 °C.

Berdasarkan pET-system, nilai OD₆₀₀ 0.6-1.0 menunjukkan bahwa bakteri *E.coli* sedang memasuki fase log (fase pertumbuhan) yaitu terjadi pembelahan bakteri terjadi dengan cepat, sehingga penambahan inducer (IPTG) pada awal fase log akan meningkatkan produksi protein rekombinan yang diinginkan. IPTG merupakan senyawa yang memiliki struktur mirip laktosa dan berfungsi sebagai penginduksi ekspresi gen di bawah kontrol promotor. Isolasi protein Fim-C yang telah dihasilkan dilakukan dengan tahap sebagai berikut: Hasil overekspresi adalah berupa pellet sel, pellet sel yang diperoleh dari 100 mL biakan LBK sebanyak 1,68 gram. Pellet yang dihasilkan dari sentifugasi, kemudian dilarutkan dalam *Native Equilibration Buffer* menghasilkan larutan warna putih gading dan

disonikasi dengan frekuensi 4 Hz hingga larutan menjadi bening dengan ketentuan 30 detik on off. Selama sonikasi, suspensi sel di letakkan dalam wadah berisi es untuk mencegah kelebihan panas yang dapat menyebabkan rusaknya protein yang terbentuk. Proses sonikasi ini bertujuan untuk memecahkan sel sehingga didapatkan protein yang diproduksi secara intra seluler dapat diisolasi (Thomas, 2011).

Pemisahan protein ekstrak yang larut dalam sitoplasma menggunakan *Native Equilibration Buffer* sebanyak 2 mL. *Native equilibration buffer* ini berguna untuk memisahkan protein Fim-C dalam bentuk nativenya (protein yang larut dalam sitoplasma) lalu dilakukan proses sentrifuge selama 15 menit pada kecepatan 8.000 rpm, 4 °C. Supernatan yang dihasilkan merupakan protein Fim-C yang larut dalam sitoplasma. Sedangkan pellet yang dihasilkan merupakan protein Fim-C yang tidak larut dalam sitoplasma atau membentuk agregat. Protein ini disebut dengan *inclusion bodies*.

Terbentuknya protein *inclusion bodies* telah diketahui karena adanya interaksi antar molekul pada daerah-daerah hidrofobik protein selama proses *foldng* dan hal tersebut sering dijumpai pada proses ekspresi protein yang menggunakan *E. coli* sebagai sel inang. Selain itu *inclusion bodies* juga dapat terbentuk karena jumlah protein *Fim-C* yang dihasilkan dari proses overekspresi sangat besar, akibatnya kelarutan protein *Fim-C* menjadi lebih kecil dan terbentuklah agregat. Pembentukan *inclusion bodies* juga dipengaruhi oleh jenis protein, jenis sel inang, tingkat ekspresi, kondisi pertumbuhan sel serta kondisi induksi (Novagen, 2011).

Pellet protein *inclusion bodies* dilarutkan dalam *Denaturing Equilibration Buffer* sebanyak 2 mL dan kemudian disentrifuge selama 15 menit, 4 °C, 8.000 rpm. Supernatan yang dihasilkan merupakan protein Fim-C *inclusion bodies*. Protein *inclusion bodies* inilah yang kemudian akan diukur konsentrasi, dan dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE.

Pengukuran Konsentrasi Ekstrak Protein Rekombinan Fim-C *S.typhi*

Ekstrak protein rekombinan Fim-C diukur konsentrasinya dengan metode BCA (*bicinchoninic acid*) menggunakan *BCA Kit Assay Thermo Scientific™*. Berdasarkan hukum

Lambert Beer, besar absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi. Kurva standar BSA (*bovine serum albumin*) dibuat untuk mengetahui persamaan garis yang diperoleh sehingga konsentrasi sampel dapat diketahui. Konsentrasi standar yang digunakan antara lain, 25 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, 1000 µg/mL, 1500 µg/mL dan 2000 µg/mL. Pengukuran konsentrasi

dilakukan pada panjang gelombang 590 nm menggunakan *ELISA reader*.

Persamaan garis yang diketahui berdasarkan kurva larutan standar BSA adalah $y=0.0006x$. Perhitungan menggunakan rumus *Lambert Beer* diketahui bahwa absorbansi dan konsentrasi ekstrak protein rekombinan Fim-C *S.typhi* dapat dilihat pada Tabel 2, Tabel 3, dan Tabel 4.

Tabel 2. Hasil data pengukuran absorbansi dan konsentrasi optimasi jumlah sel inang *E.coli* ekstrak protein fim-C *S.typhi* (Pengenceran 10x)

Waktu Overekspresi (Native)	Abs	Waktu Overekspresi (Inclusion Bodies)	Abs
4 Jam	0.461	4 Jam	0.151
5 Jam	0.414	5 Jam	0.142
6 Jam	0.395	6 Jam	0.127
Waktu Overekspresi (Native)	Konsentrasi (µg/mL)	Waktu Overekspresi (Inclusion Bodies)	Konsentrasi (µg/mL)
4 Jam	7683.33	4 Jam	2157.14
5 Jam	6900	5 Jam	2028.57
6 Jam	6583.33	6 Jam	1814.28

Tabel 3. Hasil data pengukuran absorbansi dan konsentrasi waktu overekspresi ekstrak protein fim-C *S.typhi* (pengenceran 10x)

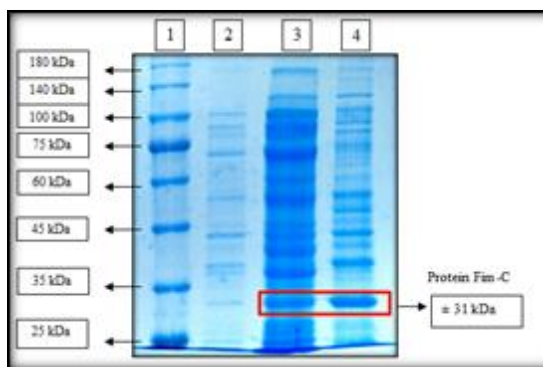
Jumlah Sel (Native)	Abs	Jumlah Sel (Inclusion Bodies)	Abs
2%	0.335	2%	0.124
4%	0.451	4%	0.142
6%	0.401	6%	0.110
Jumlah Sel (Native)	Konsentrasi (µg/mL)	Jumlah Sel (Inclusion Bodies)	Konsentrasi (µg/mL)
2%	5583.33	2%	1771.43
4%	7516.67	4%	2028.57
6%	6683.33	6%	1571.43

Tabel 4. Hasil data pengukuran absorbansi dan konsentrasi overekspresi ekstrak protein fim-C *S.typhi* (pengenceran 10x)

Overekspresi (Native)	Abs	Overekspresi (Inclusion Bodies)	Abs
4%, 4 jam	0.484	4%, 4 jam	0.089
Overekspresi (Native)	Konsentrasi (µg/mL)	Overekspresi (Inclusion Bodies)	Konsentrasi (µg/mL)
4%, 4 jam	6914.28	4%, 4 jam	1483.33

Karakterisasi Ekstrak Protein Fim-C *S.typhi* Pada Kondisi Optimum Menggunakan SDS-PAGE

Berdasarkan data hasil karakterisasi SDS-PAGE pada gambar 4 menunjukkan bahwa pada lajur 2 tidak terdapat pita protein pada berat molekul ± 31 kDa dikarenakan belum adanya IPTG sehingga *lac repressor* (*LacI*) dapat menempel pada bagian promoter DNA dan proses transkripsi terhambat sehingga protein rekombinan Fim-C *S. typhi* belum terbentuk. Sedangkan pada lajur 3 dan 4 terdapat pita protein pada berat molekul ± 31 kDa yang berarti bahwa proses overekspresi dengan menggunakan *inducer*, jumlah sel inang bakteri *E.coli* optimum 4% dan waktu overekspresi optimum 4 jam telah berhasil dilakukan.



Gambar 4. Hasil overekspresi protein rekombinan Fim-C-*S. typhi* pada kondisi jumlah inculum 4% dan waktu induksi 4 jam.

Keterangan:

Lajur 1. *Protein marker* 5 μ L (SMBiO); Lajur 2. 25 μ g protein rekombinan Fim-C sebelum diinduksi; Lajur 3. 25 μ g ekstrak protein rekombinan Fim-C *native* hasil overekspresi; Lajur 4. 25 μ g ekstrak protein rekombinan Fim-C *inclusion bodies* hasil overekspresi.

Berat molekul protein rekombinan *Fim-C S. Typhi* ± 31 kDa diperoleh berdasarkan perhitungan secara teoritis menggunakan program *DNAstar* khususnya *EditSeq* dimana massa molekul protein rekombinan *Fim-C S.typhi* yang mengandung enam asam amino histidin pada ujung 5' dan sepuluh asam amino yang mengandung urutan asam amino yang dikenali oleh faktor Xa (Endah, 2013; Muktiningsih 2013).

4. SIMPULAN

Berdasarkan data hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa (1) Jumlah

inoculum sel inang bakteri *E. coli BL21 (DE3) plysS* yang mengandung plasmid *pET-30a-fim-C-S.typhi* dapat menghasilkan produksi protein Fim-C-*S.typhi* dalam bentuk Native maupun Inclusion Bodies sejumlah 4%. (2) Waktu overekspresi optimum yang menghasilkan jumlah protein Fim-C rekombinan *Salmonella typhi* dengan berat molekul ± 31 kDa dengan hasil yang tinggi adalah 4 jam. Hal ini ditunjukkan dengan adanya instnsitas pita yang lebih tinggi pada konsentrasi yang sama dari pita tersebut dibanding dengan kondisi lainnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada Program Studi Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Jakarta, dan Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (Laptiab) BPPT, Serpong yang telah memfasilitasi penelitian ini dalam mewujudkan MOU UNJ-BPPT. Terima kasih juga untuk tim salmonella yang telah berkontribusi dan bekerja keras sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriyansa F. 2015. *Pengaruh Lama Kultur setelah Induksi IPTG terhadap Produksi Protein Rekombinan Glutation-S-Transferase (Gst)-Vp28 Pada Escherichia Coli*. Mataram: Universitas Mataram.
- Bio-Rad. 2016. *A Guide to Polyacrilamide Gel Electrophoresis and Detection*. USA: Bio-Rad Laboratories, Inc. pp 1-47.
- Brown J, Decarla P, Jones N, Smith T. 2014. Scale-up of microbial fermentation using recombinant *E. coli* to produce an 80 kDa protein in Thermo Scientific Hy Performa 30 L and 300 L Single-Use Fermentors. *Thermo Scientific*.
- Bustos J, Villar KD, Cortez TV, Ramirez JR, Renteria IB, Zarate X. 2016. Recombinant protein production data after expression in the bacterium *Escherichia coli*. *Molecular Biology*. 7: 502-508.
- Chen L, Cai F, Zhang D, Zhang L, Zhu P, Gao S. 2016. Large-scale purification and characterization of recombinant human stem cell factor in *Escherichia coli*. *Impress*. 4: 1-36.

- Chhetri G, Kalita P, Tripathi T. 2015. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX*. 2: 385–391. <http://doi.org/10.1016/j.mex.2015.09.005>.
- Damme, Van P, Kafeja F, Anemona A, Basile V, Hilbert AK, De I, Podda A. 2011. Safety, immunogenicity and dose ranging of a new Vi- CRM 197 conjugate vaccine against typhoid fever : randomized clinical testing in healthy adults. 6(9): 1–7.
- Departemen Kesehatan RI. 2013. *Laporan Tahunan Promkes Tahun 2006*. Jakarta(ID): Depkes RI.
- Endah PD. 2013. *Subkloning dan Ekspresi Gen fim-C Salmonella typhi* [Skripsi]. Jakarta : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.
- Fernández-Castané A, Caminal G, López-Santín J. 2012. Direct measurements of IPTG enable analysis of the induction behavior of *E. coli* in high cell density cultures. *Microbial Cell Factories*. 11(58). <http://doi.org/10.1186/1475-2859-11-58>
- Gina R. 2015. *Pengujian Toksisitas Protein Rekombinan Fim-C Inclusion Bodies Bakteri Salmonella Typhi pada Mencit ddY* [Skripsi]. Jakarta(ID): Prodi Kimia FMIPA UNJ.
- Ida S. 2016. Produksi, Karakterisasi, dan Uji Stabilitas Protein *Fim-C Inclusion Bodies Salmonella typhi* [Skripsi]. Jakarta(ID): Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.
- Nurjayadi M. 2005. *Produk Gen carA Salmonella typhi Berukuran 42 kDa yang Dideteksi dengan Antibodi Anti-Protein Fusi*. Disertasi Program Pascasarjana. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Nurjayadi M, Kurniadewi F, Kartika IR, Agustini K, Puspasari F, Natalia D. 2013. *Laporan Penelitian Strategis Nasional tahun ke-1 dan tahun ke-2. Kemenristek Dikti, 2013*. Jakarta-Indonesia
- Nurjayadi M, Hasan U, Apriyani D, Kurniadewi F, Kartika IR, Agustini K, Puspasari F, Natalia D. 2014. *Proceeding of International Conference On Research, Implementation And Education of Mathematics and Sciences*. UNY-Yogyakarta.
- Nurjayadi M, Apriyani D, Hasan U, Santoso I, Kurniadewi F, Kartika IR, Agustini K, Puspasari F, Natalia D, Mangunwardoyo W. 2016. Immunogenicity and Specificity of Anti recombinant Protein Fim-C-Salmonella typhimurium Antibody as a Model to Develop Typhoid Vaccine. *Procedia Chemistry*. 18: 237–245.
- Nurjayadi M, Santoso I, Kartika IR, Kurniadewi F, Saamia V, Sofihan W, Nurkhasanah D. 2017. *AIP Conference Proceedings*. 1862.
- Nascimento IP, Leite LC. 2012. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 45: 1102-1111.
- Novagen. 2011. pET-system : *Instructional Manual*. 11th ed. EMD Biosciences, Inc., Darmstadt: Jerman, 80 hlm.
- Purwanto, Maria GM. 2014. Perbandingan Analisa Kadar Protein Terlarut dengan berbagai Metode Spektroskopi UV-Visible. *Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi*. 7(2): 64-71. ISSN 0216-1540.
- Thermo Scientific. 2014. *Instruction BCA Kit Assay*. USA : Thermo Fisher Scientific Inc.
- Thermo Scientific. 2016. *Protein Research Handbook*. USA: Thermo Fisher Scientific Inc.
- Thomas, A. 2011. *Pierce GST and His Tag Protein Interaction Pull-Down Kits*. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=42e8e027-6231-4512-8dde-bb026740966b>. Diakses tanggal 16 Januari 2018, pukul 16.50 WIB.
- Umar, H. 2014. *Produksi dan Karakterisasi Antibodi Anti Fim C Salmonella typhi* [Skripsi]. Jakarta(ID): Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.