

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental dengan beberapa perlakuan yang berbeda pada setiap sampelnya.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dimulai pada Bulan Oktober 2017 hingga bulan Januari 2018, dan dilakukan di Laboratorium Protein Terapeutik dan Vaksin, Pusat Penelitian LIPI Bioteknologi Cibinong, Bogor.

#### **3.3 Populasi dan Sampel**

Populasi dari penelitian ini adalah koloni dari *Pichia pastoris* rekombinan yang dapat menghasilkan protein fusi, sedangkan sampel dari penelitian ini adalah protein interferon yang difusi dengan *Human Serum Albumin* (HSA) yang menjadi fokus penelitian.

#### **3.4 Alat dan Bahan**

##### **3.4.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1 yang terdapat pada bagian lampiran

##### **3.4.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.2 yang terdapat pada bagian lampiran 1.

#### **3.5 Prosedur Penelitian**

##### **3.5.1 Aktivasi Skala Kecil (3 ml) Protein Fusi dalam Sel *Pichia pastoris***

Koloni tunggal dari *P. pastoris* padat dikultivasi kedalam media 3 ml BMGY (1% *yeast extract*, 2% Pepton, 1,34% *yeast nitrogen base*, 1% Gliserol, 1% Natrium fosfat, 0.2% biotin, dan H<sub>2</sub>O) dengan suhu 30°C dengan kecepatan 250 rpm. Setelah 24 jam, diambil 1.5 ml dari BMGY, kemudian dipindahkan kedalam mikrotube 1.5 ml untuk dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan

dipisahkan, pelet diresuspensi kedalam media BMMY 3 ml (1% *yeast extract*, 2% Pepton, 1,34% *yeast nitrogen base*, 0.5% MeOH, 1% Natrium fosfat, 0.2% biotin, dan H<sub>2</sub>O dan diinkubasi dalam *shaker* bersuhu 30°C dengan kecepatan 250 rpm. Proses induksi dilakukan 24 jam kemudian dengan menambahkan 60µl MeOH kedalam media BMMY yang kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 250 rpm.

### 3.5.2 Karakterisasi Protein Fusi dengan Metode *Dot Blot*

Kultur *P. pastoris* dari media BMMY diambil sebanyak 1.5 ml kedalam mikrotube untuk dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipisahkan dengan peletnya, supernatan diteteskan ke membran nitroselulose (GE Healthcare™, Swedia) sebanyak 20 µl secara bertahap hingga kering. Membran kemudian direndam dalam susu skim (10% susu skim dalam 10 ml TBS 1x) selama 1 jam, kemudian membran dicuci dalam larutan TBS-Tween (TBS 1x, Tween 20 0.1%) secara bertahap dengan waktu 15 menit pertama, 5 menit kedua, dan 5 menit ketiga. Membran di rendam dengan Antibodi primer (10 µl standar primer *Mouse Anti-Human Interferon α2* (Calbiochem, Jerman) dalam 10 ml susu skim) selama 1 jam, kemudian dilakukan pencucian kembali dengan TBS-Tween secara bertahap kembali. Membran kemudian direndam dengan Antibodi sekunder (10 µl standar sekunder *Mouse Anti-Mouse iGG AP Conjugate* (Promega, USA) dalam 10 ml susu skim) selama 1 jam dan kemudian dilakukan pencucian kembali dengan TBS-Tween secara bertahap. Membran kemudian ditambahkan akuades steril sebanyak 4 ml dan ditambahkan BCIP *buffer* 500 µl dan NBT *solution* 500 µl (Invitrogen, USA).

### 3.5.3 Aktivasi Skala Lab (50 ml) Protein Fusi dalam Sel *Pichia pastoris*

Hasil *Dot Blot* yang positif, kemudian dilanjutkan aktivasi skala lab. Koloni *P. pastoris* dari media YPD dikultivasi kedalam media BMGY 50 ml dan diinduksi dengan suhu 30°C dengan kecepatan 250 rpm selama 24 jam. Kemudian, kultur dikultivasi kedalam media BMMY 50 ml dan diinkubasi dengan suhu 30°C dengan kecepatan 250 rpm selama 24 jam. Penambahan *Protease Inhibitor Cocktail* (PIC) (Roche, Swiss)

**Naufan Aldi Sujatmoko, 2018**

*UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168 YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST Pichia pastoris*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu

sebanyak 0.2 gr dilakukan pada satu jam pertama setelah inkubasi, dan proses induksi dilakukan 24 jam setelah inkubasi dengan menambahkan 250  $\mu$ l MeOH.

### **3.5.4 Filtrasi, Purifikasi dan Karakterisasi Protein Fusi dengan Metode *Dot Blot***

Media BMMY dipindahkan kedalam tabung falcon (Iwaki, Jepang) 50 ml kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipisahkan dari peletnya, kemudian supernatan dimasukkan kedalam tabung *Minimate™ Tangential Flow Filtration* (Pall, USA) dengan *Molecular Weight Cut Off* (MWCO) 10 kDa. Supernatan dipisahkan dari volume awal 50 ml menjadi 10 ml. Sampel hasil filtrasi, dilakukan purifikasi pada kolom yang berisi *Blue Sepharose™* (GE Healthcare, Swedia), yang sebelumnya sudah dicuci dengan akuades dan PBS 1x. Penambahan PBS 1x dilakukan setelah sampel habis dalam kolom, yang dimasukkan kedalam 2 *microtube* sebanyak 1.5 ml masing-masing *microtube*. Penambahan *Elution buffer* (2 M NaCl dalam PBS 1x) dilakukan, dan dimasukkan kedalam 10 *microtube* 1.5 ml sebanyak 1 ml. Karakterisasi dilakukan dengan uji *Dot Blot* tiap eluat diatas membran nitroselulose, dipilih eluat yang memiliki ketebalan yang jelas.

### **3.5.5 Kuantifikasi Protein Fusi HSA-SMD dengan Metode *Bicinchoninic Acid Assays* (BCA)**

Eluat yang jelas dipisahkan kedalam satu *microtube* 1.5 ml. Protein eluat hasil purifikasi dihitung konsentrasinya menggunakan *Bicinchoninic Acid Assay* (*BCA Protein Assay Kit*) (Pierce, USA) dengan berbagai konsentrasi *Bovin Serum Albumin* (0  $\mu$ g/ml – 1000  $\mu$ g/ml) sebagai standar kontrol. Absorbansi sampel protein diukur pada panjang gelombang 562 nm

### **3.5.6 Karakterisasi Protein Fusi dengan Metode *Western Blot***

Eluat gabungan diambil 15  $\mu$ l, kemudian ditambahkan *Reducing Sample Buffer* (RSB) (1 M Tris HCl pH 6,8, Gliserol 50%, SDS 10%, 2-merkaptotanol, Bromophenol blue, DDW) sebanyak 5  $\mu$ l kedalam gel poliakrilamid (Bio-Rad, USA) yang tersusun atas *Separating Gel* (12%)

**Naufan Aldi Sujatmoko, 2018**

*UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168 YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST Pichia pastoris*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu

dan *Stacking Gel* (4%) digunakan dalam analisis *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dalam larutan *running buffer* (*Trisma base*, Glisin, SDS, ddH<sub>2</sub>O) selama 90 menit dengan kekuatan arus 100 V. Proses *Western Blot* dilakukan setelah analisis SDS PAGE selesai. Gel dipindahkan dan ditambahkan membran nitroselulose pada blok untuk dilakukan proses *Western Blot* pada larutan *Transfer Buffer* (*Trisma base*, Glisin, SDS, Metanol, ddH<sub>2</sub>O) selama 90 menit dan kuat arus sebesar 100 V dalam keadaan dingin. Membran nitroselulose dilakukan pewarnaan dengan direndam pada susu skim, antibodi primer, antibodi sekunder, BCIP *buffer* dan NBT *solution* selama masing-masing satu jam diselingi dengan pencucian menggunakan TBS-Tween 0.1% pada tiap tahap secara bertahap.

### **3.5.7 Uji Stabilitas Protein Fusi HSA-SMD Terhadap Perbedaan Suhu dan Lama Penyimpanan**

Uji stabilitas HSA-SMD dilakukan pada dua parameter, yaitu waktu dan suhu. Stok HSA-SMD tanpa perlakuan digunakan sebagai kontrol positif. Pengujian kondisi suhu, berada pada kondisi 4°C, 25°C, dan 37°C. Kontrol tanpa perlakuan disimpan pada suhu -20°C. Pengujian lamanya waktu inkubasi selama seminggu, yaitu pada hari pertama, ketiga, dan keenam. HSA-SMD dari gabungan eluat diambil sebanyak 25 µl kedalam setiap mikrotube. Pada setiap hari pengujian, sampel dilakukan uji *Dot Blot* untuk mengetahui ada tidaknya protein. Jika pada uji *Dot Blot* sudah diketahui adanya protein pada membran nitroselulosa, maka dilakukan penghitungan densitas menggunakan program aplikasi *software ImageJ*.

### **3.6 Alur Penelitian**

Alur penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 3.1 dibawah ini:

**Naufan Aldi Sujatmoko, 2018**

*UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168 YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST Pichia pastoris*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu



**Gambar 3.1** Alur penelitian yang Dilakukan

### 3.7 Tabel Instrumen Penilaian

Tabel Instrumen Penilaian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

**Tabel 3.3 Hasil Instrumen Penilaian**

No.	Hari ke-	Suhu (°C)	Ketebalan Pita (Densitas)	Hasil ImageJ
1.	1	4		
		25		
		37		
2.		4		

**Naufan Aldi Sujatmoko, 2018**

*UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168 YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST *Pichia pastoris**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu

	3	25		
		37		
3.	6	4		
		25		

**Naufan Aldi Sujatmoko, 2018**

*UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168  
YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST *Pichia pastoris**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |  
perpustakaan.upi.edu