BAB 1

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kanker dan hepatitis merupakan penyakit yang memerlukan penanganan serius. *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2010 menyebutkan bahwa kanker adalah penyebab kematian nomor 2 (dua) setelah penyakit kadiovaskuler (Depkes, 2012). Hepatitis menempati urutan pertama sebagai penyakit yang paling sering terjadi dengan angka kematian sekitar 1-2 juta orang setiap tahunnya. Penyakit ini menjadi salah satu prioritas karena memiliki sifat yang mudah menular, morbiditas yang tinggi dan menyebabkan terhambatnya aktivitas sel (Sudoyono, 2006). Banyak pengobatan yang telah ditemukan untuk mengatasi penyakit kanker dan hepatitis, untuk penyakit kanker pengobatan yang dilakukan salah satunya dengan kemoterapi, reseksi, dan transplantasi. Sedangkan untuk pengobatan hepatitis sendiri hanya sebatas pengobatan dengan obat-obratan seperti ribavirin, boceprevir dan jika sudah dalam tahap kronis maka dilakukan transplantasi. Tetapi banyak resiko yang ditimbulkan dari pengobatan-pengobatan tersebut karena sensivitas virus hepatitis pada obat-obatan diatas semakin berkurang, selain itu mahalnya biaya pengobatan menjadi salah satu kendala. Salah satu obat alternatif untuk antikanker dan hepatitits adalah protein terapeutik.

Protein terapeutik merupakan protein yang memiliki aktivitas sebagai obat sehingga dapat digunakan untuk keperluan klinis. Perkembangan teknologi rekayasa genetika pada produksi protein terapeutik telah dilakukan pada mikroorganisme/organisme selain pada manusia. Salah satu produk dari protein terapaeutik adalah vaksin. Produksi protein terapeutik dan vaksin rekombinan manusia memerlukan inang. Inang yang digunakan biasanya merupakan sistem pada prokariot yaitu bakteri dan pada eukariot yaitu *Yeast*, sel mamalia, serangga dan tanaman. Umumnya pada ekspresi eukariot protein berukuran lebih dari 100 kDa sedangkan pada kelompok prokariot berukuran

lebih kecil yaitu 39 kDa.Kelompok *Yeast* juga telah digunakan sebagai organisme model dalam mempelajari biogenesis dan degradasi peroksisom (Maculey *et al*., 2005). Keberadaan peroksisom diinduksi oleh metanol yang berada pada media. Pada peroksisom terdapat 3 (tiga) jenis enzim yang berperan dalam metabolisme metanol dan merupakan karakteristik yang sangat penting pada *Yeast-Yeast* metropolik. Enzim-enzim tersebut adalah *alcohol oxidase* (AOX), *dihydroxyacetone sintase* (DHAS) dan *catalase* (CAT). Spesies *Yeast* yang sering digunakan dalam riset produksi protein rekombinan adalah *Pichia pastoris*.

Pichia pastoris merupakan kelompok mikroorgarnisme uniseluler yang memiliki sifat mudah dimanipulasi dan mudah dikultur. *Pichia pastoris* biasa digunakan sebagai inang (host) dalam produksi protein rekombinan. Ada banyak keuntungan dari sistem ekpresi pada *Pichia pastoris*, diantaranya tingginya tingkat ekspresi protein yang disekresikan disebabkan karena *Pichia pastoris* mengekresikan sedikit protein sehingga mudah mendapatkan protein yang diinginkan, biaya produksi yang terbilang murah dibandingkan pada mamalia, *scaling up* yang mudah pada fermentor, seleksi sel transforman dan teknik transformasi mudah, kerapatan sel yang tinggi walapun ditumbuhkan pada medium sederhana (Herawati, 2015). *Yeast Pichia pastoris* membutuhkan sumber karbon (C) dan nitrogen (N), sumber C yang paling umum digunakan adalah glukosa dan gliserol. Sumber N untuk pertumbuhannnya adalah pepton ekstrak *Yeast* dan nitrogen *Yeast* (Pingzuo *et al.*, 2006). *Pichia pastoris* mempunyai kemampuan untuk mensekresikan protein tertentu dengan tingkat sekresi sesuai dengan kemampuan *Yeast* untuk melakukan metabolisme terhadap alkohol. Salah satu protein terapeutik yang hasilkan oleh *Pichia pastoris* adalah interferon-α2a.

Interferon merupakan protein yang secara alami dibuat dan dikeluarkan oleh sel-sel sistem imun. Salah satu jenis interferon adalah interferon-α2a. Protein ini mempunyai berat molekul sebesar 21.550 kDa dan terdiri dari 188 asam amino. Interferon-α2a dikenal untuk pengobatan hepatitis C, sebagai anti-tumor dan agen antivirus (Ferenci, 1993; Bekisz *et al.*,2010). Interferon-α2a memiliki sifat antiviral, antiproriferatif dan memiliki aktifitas

immunomodulatory (Ferenci, 1993; Bekisz *et al.*, 2010) sehingga digunakan untuk protein terapi pada pengobatan kanker dan hepatitis.

Interferon-α2a telah mengalami banyak modifikasi, hal ini bertujuan untuk meningkatkan efisiensi Interferon-α2a dalam tubuh manusia. Salah satunya dengan penambahan tag berupa *Human Serum Albumin* (HSA). Selain dengan penambahan tag, eksperimen lainnya pun dilakukan, mulai dari rekayasa medium hingga rekayasa genetik. Penelitian ini merujuk pada penelitian sebelumnya yang menjelaskan bahwa bobot molekul pada Interferon-α2a yang sudah dipurifikasi sebesar 85 kDa (Ningrum, 2017). Penelitian sebelumnya hanya membahas karakterisasi dari Interferon-α2a yang sudah di purifikasi, sehingga dilakukan penelitian untuk memonitoring efisiensi dari proses purifikasi itu sendiri. Monitoring efisiensi pada proses purifikasi bertujuan untuk menganalisa konsentrasi protein yang terkandung pada saat sebelum proses purifikasi dan setelah proses purifikasi.

Overproduksi merupakan tahap untuk mengekspresikan protein Interferon-α2a yang terdapat dalam *Pichia pastoris*. Monitoring tahap awal untuk keberhasilan ekspresi dilakukan dengan metode *Dot Blot*. Tahap *Dot Blot* merupakan tahap yang sangat penting karena dengan dilakukanya *Dot Blot* kita dapat megetahui apakah protein pada tahapan overproduksi terekspresikan dengan baik atau tidak. *Western Blot* merupakan metode untuk menganalisis karakter protein berupa bobot molekul sehingga dapat dilihat ukuran molekul dari protein yang diinginkan, selain untuk mengukur bobot molekul *Western Blot* sendiri dapat digunakan untuk mengetahui spesifitas antibodi. Proses *Western Blot* memiliki tahapan yang melibatkan antibodi yang berfungsi sebagai agen pengenal protein. Antibodi yang digunakan pada proses *Western Blot* merupakan antibodi monoklonal yang memiliki keunggulan dibandingkan dengan antibodi poliklonal. Antibodi terdiri dari dua jenis yaitu antibodi primer dan antibodi sekunder. Antibodi primer berfungsi untuk mengikat protein target sedangkan antibodi sekunder berfungsi untuk mengikat antibodi primer yang terkonjugasi dengan marker. Berbeda dengan *Dot Blot*, *Western Blot* melewati tahap elektroforesis sedangkan *Dot Blot* tidak. Analisis efisiensi purifikasi dilakukan untuk

mengetahui kualitas protein suatu sampel berupa konsentrasi protein yang terkandung dalam sampel. Metode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) lebih aman digunakan daripada metode *Radio Immuno Assay* (RIA) karena pada metode RIA menggunakan bahan radio aktif yang berbahaya.

B. Rumusan Masalah

Interferon α2a merupakan agen terapeutik yang dibutukan dalam dunia klinis dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Produk Interferon-α2a yang beredar di Indonesia sebagain besar adalah produk impor, sehingga perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan sistem produksi Interferon-α2a dan membuat Indonesia tidak bergantung pada produk asing. Pada penelitian ini dilakukan overproduksi pada sel *Yeast Pichia pastoris* untuk mendapatkan protein fusi Interferon-α2a *Human Serum Albumin*, kemudian dilakukan purifikasi dan karakterisasi untuk mendapatkan hasil analisis efisiensi proses purifikasi. Rumusan masalah dapat dirumuskan menjadi bagaimanakah overproduksi, karakterisasi dan analisis efisiensi purifikasi protein fusi human Interferon-α2a

C. Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut diatas dapat dituliskan beberapa pertanyaan penelitian, yaitu:

1. Bagaimanakah hasil overproduksi dan Karakterisasi protein fusi Human Interferon-α2a *Human Serum Albumin* yang diproduksi dari *Pichia pastoris* menggunakan metode *Dot Blot* dan *Western Blot*?
2. Bagaimanakah hasil karakterisasi protein fusi Human Interferon-α2a *Human Serum Albumin* sebelum proses purifikasi TFF dan sesudah proses purifikasi ELUAT yang diproduksi dari *Pichia pastoris* menggunakan teknik *Western Blot*?
3. Bagaimanakah hasil efisiensi purifikasi protein fusi Human Interferon-α2a *Human Serum Albumin* yang diproduksi dari *Pichia pastoris* menggunakan teknik ELISA?

D. Batasan Masalah

Penelitian ini menggunakan protein Human Interferon-α2a yang diproduksi pada *Yeast Pichia pastoris* dan di fusi menggunakan *Human Serum Albumin* koleksi Laboratorium Vaksin dan Terapeutik LIPI dengan kode HSA SMD1168.

E. Tujuan Penelitian

Merujuk pada rumusan masalah, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil overproduksi, karakterisasi dan efisiensi purifikasi protein fusi Human Interferon-α2a *Human Serum Albumin* pada *Pichia pastoris* menggunakan metode *Western Blot* dan ELISA.

F. Manfaat Penelitian

Penelitian ini memiliki bebeberapa manfaat yang berhubungan dengan karakterisasi dan efisiensi purifikasi dari protein Interferon-α2a yang didapatkan dari *Yeast Pichia pastoris* rekombinan, yaitu manfaat praktis dan teoritis. Dalam manfaat praktis penelitian ini dapat menyediakan informasi efisiensi proses purifikasi dari protein fusi, sehingga dapat diambil langkah perbaikan untuk tahap produksi selanjutnya. Sedangkan untuk manfaat secara teoritis penelitian ini dapat menyediakan informasi baru untuk menambah khazanah keilmuan dalam bidang biologi molekuler, bioteknologi dan biomedik. Penelitian ini juga menjadi sebuah pembelajaran baru bagi penulis untuk mengetahui tahap dalam penelitian bioteknologi.

G. Struktur Organisasi Penelitian

Struktur organisasi penelitian menjelaskan gambaran umum mengenai isi dari skripsi secara singkat dan jelas.

1. BAB I Pendahuluan

   Pada BAB I dijelaskan mengenai latar belakang dilakukannya penelitian ini, serta dijelaskan mengenai rumusan masalah, batasan

masalah, tujuan penelitian, manfaat penelitian, asumsi penelitian dan hipotesis.

2. BAB II Kajian Pustaka

Pada BAB II dipapaparkan teori-teori yang berkaitan dengan penelitian, diantaranya menjelaskan mengenai Interferon-α2a yang meliputi sejarah, karakteristik, mekanisme kerja dan sifat-sifatnya. Selanjutnya mengenai *Pichia pastoris* meliputi karakteristik morfologi, keungulan dan sifat sifatnya. Terakhir yaitu membahas tentang metode yang akan digunakan untuk penelitian meliputi prinsip dasar dan tahap-tahap penggunaannya.

3. BAB III Metode Penelitian

Pada BAB III dijelaskan mengenai metode penelitian yang dilakukan pada penelitian secara jelas dan rinci. Bagian dari BAB III diantarannya jenis penelitian, populasi dan sampel, watktu dan lokasi penelitian dan prosedur penelitian.

4. BAB IV Temuan dan Pembahasan

Pada BAB IV berisi temuan penelitian dan pembahasan dari data-data yang didapatkan melalui prosedur penelitian. Data yang didapatkan berupa hasil overproduksi skala 3ml dan 50 ml, karakterisasi screening awal dan hasil purifikas dan efisiensi purifikasi. Data kemudian dianalisis dan menghasilkan sebuah permasalahan yang dianalisis sesuai dengan teori yang sudah didapatkan.

5. BAB V Simpulan dan Rekomendasi

Pada BAB V terdapat kesimpulan berupa inti dari hasil temuan yang telah dianalisis dan rekomendasi dari penulis yang diberikan kepada pihak-pihak yang terkait sebagai bentuk upaya untuk perbaikan bagi penelitian-penelitian selajutnya.