

**ANALISIS PROTEIN ISOLAT BAKTERI *Escherichia coli* BL 21 MENGGUNAKAN
*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Elektrophoresis (SDS-PAGE)***

**PROTEIN ANALYSIS OF BACTERIAL ISOLATE *Escherichia coli* BL 21 USING
*Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)***

Eka Oktaviani¹, Maya Ekaningtias²

1 Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Boyolali

2 Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP, Universitas Nahdlatul Wathan Mataram

E-mail: mentias4life@gmail.com

ABSTRAK

Protein merupakan komponen struktural dan fungsional yang terdapat dalam organisme hidup. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kuantitas protein yang diperoleh dan jenis protein yang berhasil diekstrak dari kultur bakteri *Escherichia coli* BL 21 (DE3). Metode penelitian menggunakan deskriptif eksploratif, pengukuran konsentrasi protein dengan spektrofotometer dan analisa berat molekul protein dengan elektroforesis SDS-PAGE. Hasil penelitian didapatkan bahwa protein total yang diisolasi dari kultur bakteri *E. coli* BL21 (DE3) memiliki konsentrasi sebesar 7,67 µg/µl, konsentrasi kontrol lebih tinggi dari sampel yaitu 9,33µg/µl. Kesimpulan dari penelitian ini adalah konsentrasi protein total yang diisolasi dari kultur bakteri *E.coli* BL21 (DE3) sebesar 7,67 µg/µl, namun dengan berat molekul dan jenis protein dalam protein total masih belum diketahui.

Kata Kunci: Bakteri *Escherichia coli* BL 21, Isolasi Protein, SDS-PAGE

ABSTRACT

Protein is a structural and functional component found in living organisms. This study aims to determine the quantity of protein obtained and the type of protein that was successfully extracted from the culture of *Escherichia coli* BL 21 (DE3). The research method uses exploratory descriptive, measurement of protein concentration by spectrophotometer and analysis of protein molecular weight by SDS-PAGE electrophoresis. The results of the study it was found that the total protein isolated from *E. coli* BL21 (DE3) bacterial culture had a concentration of 7.67 µg / µl, the control concentration was higher than the sample which was 9.33 µg / µl. The conclusions of the study it was found that the concentration of total protein isolated from *E. coli* BL21 (DE3) bacterial culture had a of 7.67 µg/µl, but the molecular weight and type of protein in total protein were still unknown.

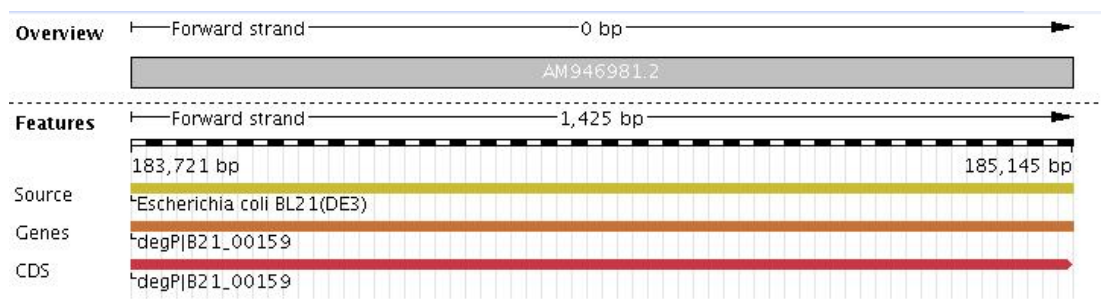
Keywords: *Escherichia coli* BL 21, Protein Isolation, SDS-PAGE

A. PENDAHULUAN

Dogma sentral biologi menempatkan protein sebagai hasil ekspresi gen dalam organisme seluler maupun non seluler melalui proses replikasi, transkripsi dan translasi. Protein merupakan komponen struktural dan fungsional yang terdapat dalam organisme hidup. Peran protein sebagai komponen struktural yang menyusun berbagai sel dan jaringan, serta dalam tingkat organisasi kehidupan yang lebih tinggi dalam organisme. Peran protein sebagai komponen fungsional dapat dilihat sebagai biokatalisator reaksi biokimia yang terjadi dalam proses metabolisme organisme sehingga dapat membantu meningkatkan efektivitas dan

efisiensi reaksi kimia dalam tubuh. Protein juga berperan dalam komunikasi antar sel yang menjadi kunci mekanisme pertumbuhan, perkembangan dan ketahanan organisme yang diperantarai oleh jalur sinyal transduksi (interaksi antara *ligand* dan reseptor) (Nelson & Cox, tanpa tahun). Yuwono (2005) menambahkan bahwa protein juga berperan sebagai pengatur dalam ekspresi genetik dan dalam berbagai sistem pendukung kerja organisme hayati. Protein adalah polimer dari asam amino - asam amino yang berikatan membentuk struktur polinukleotida. Asam amino dicirikan dengan adanya gugus amina, gugus karboksil, gugus hidroksil, dan rantai samping asam amino. Sampai sekarang sudah ditemukan asam amino sebanyak 22 dengan karakter rantai samping yang beraneka ragam. Uji kuantitas protein dalam sampel dapat diketahui menggunakan teknik elektroforesis gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Elektrophoresis*). Metode elektroforesis gel SDS-PAGE digunakan untuk mengetahui jenis dan berat molekul suatu protein.

Salah satu strain *E. coli* BL21 (DE3) merupakan strain bakteri dengan kepemilikan sekuens pengkodean gen *degP* sepanjang 1.425 *base pair* (bp) dari urutan basa ke 183.721 bp hingga 185.145 bp. Gen ini mengkode *serine endoprotease* (protease Do), atas fungsi yang berhubungan dengan membran. Dari database ENA (2014) dengan nomor akses ACT42061 diperoleh struktur gen sebagai berikut ini (Gambar 1.1).



Gambar 1.1 Sekuens Gen *degP* Sepanjang 1425 Pasang Basa

Strain *E. coli* BL21 (DE3) membutuhkan metode induksi menggunakan *Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside* (IPTG) yang dapat menginduksi ekspresi protein yang tinggi dalam organisme tersebut. Akan tetapi, terkadang gen tidak terinduksi untuk menghasilkan protein dalam kondisi tertentu (Sambrook & Russel, 2001). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kuantitas protein yang diperoleh dan jenis protein yang berhasil diekstrak dari kultur bakteri *Escherichia coli* BL 21 (DE3).

B. METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah labu erlenmeyer, mikropipet, pipet tip, tabung 15ml, tabung reaksi, sentrifuge, shaker, inkubator, vorteks, spektrofotometer, tabung kuvet, dan seperangkat elektroforesis SDS-PAGE. Bahan – bahan yang digunakan pada praktikum adalah kultur bakteri *E. coli* kode BL 21 (DEGP) dengan Amphotericin + Chloramphenicol, medium LB, senyawa IPTG, buffer PBS, komponen reagen untuk

pembuatan *separating gel* 10%, komponen reagen untuk pembuatan *stacking gel* 5%, protein standar BSA (*Bovine Serum Albumin*), *polyacrylamide* 30%, *electrode buffer*, larutan *staining*, larutan *destaining*, dan buffer SDS 5x. Isolasi protein dilakukan dengan menyiapkan 15 ml kultur cair bakteri kemudian dipisahkan dengan sentrifuge 3000 rpm suhu 4°C selama 20 menit sehingga diperoleh bagian pelet yang akan diproses lebih lanjut untuk menghasilkan supernatan yang berisi protein. .

Pengukuran konsentrasi protein diawali dengan pembuatan kurva standar menggunakan protein standar BSA (*Bovine Serum Albumin*). Protein standar tersebut diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Dari pengukuran tersebut akan diperoleh persamaan regresi dari kurva standar. Berat molekul protein sampel diukur dengan elektroforesis SDS PAGE (Ausubel *et al*, 2003). Bahan-bahan yang digunakan untuk *stacking* dan *separating gel* adalah pada Tabel 2.1.

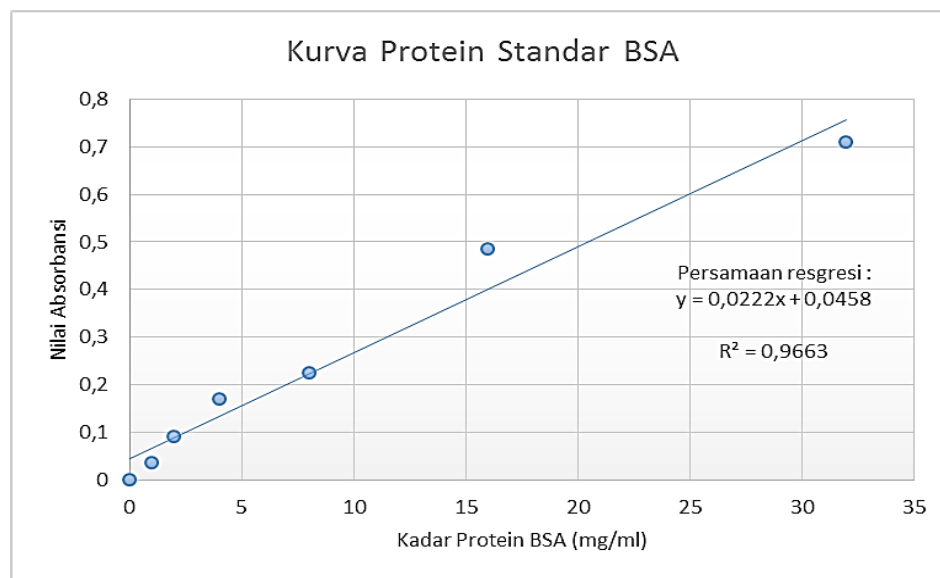
Tabel 2. 1 Komposisi Pembuatan Gel Poliakrilamid

Komposisi	<i>Separating gel</i> (10%)	<i>Stacking gel</i> (5%)
dH ₂ O	4,0 ml	2,7 ml
PA	3,3 ml	0,83 ml
1,5 M Tris pH 8.8	2,5 ml	-
1,5 M Tris pH 6.8	-	1,25 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
TEMED	10µl	10 µl
10% APS	90 µl	90 µl

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Fungsi isolasi protein adalah untuk mendapatkan protein murni (100 % protein) agar memudahkan pada uji lanjutan yang dilakukan, contoh adalah uji immunoblotting atau dikenal western blotting dan SDS PAGE. SDS-PAGE merupakan metode elektroforesis yang menggunakan kombinasi poliakrilamida dan SDS. SDS-PAGE adalah teknik untuk memisahkan rantai polipeptida pada protein berdasarkan kemampuannya untuk bergerak dalam arus listrik, yang merupakan fungsi dari panjang rantai polipeptida atau berat molekulnya. Hal ini dicapai dengan menambahkan deterjen SDS dan pemanasan untuk merusak struktur tiga dimensi pada protein dengan terpecahnya ikatan disulfide yang selanjutnya direduksi menjadi gugus sulfidhidril. SDS akan membentuk kompleks dengan protein dan kompleks ini bermuatan negative karena gugus-gugus anionic dari SDS (Hemes, 1998). Secara sederhana, konsep proses isolasi protein ini sama dengan isolasi DNA. Buffer lisis berfungsi untuk melisiskan sel sehingga semua senyawa yang terdapat didalamnya akan bisa tercampur sampai homogen. Sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan perbedaan protein berdasarkan berat molekul. Sentrifugasi dapat digunakan untuk mengisolasi dan memisahkan biomolekul, organela-organela sel atau sel secara keseluruhan (Rickwood, 1984).

Sentrifugasi dilakukan berkali-kali untuk mendapatkan isolat protein yang paling murni. Semakin murni suatu isolat protein, maka uji selanjutnya akan semakin baik akan tetapi membutuhkan waktu yang makin lama. Isolasi protein ini menggunakan IPTG yang digunakan untuk menginduksi ekspresi protein dalam sel bakteri *E.coli* (Hansen *et al*, 1997). IPTG merupakan senyawa yang dapat meningkatkan produksi protein (Maknun, 2015) sehingga dengan perlakuan tersebut konsentrasi protein seharusnya lebih tinggi jika dibandingkan dengan kontrol tanpa induksi IPTG. Hubungan antara konsentrasi protein standar dengan nilai absorbansi dapat dilihat pada Gambar 3.1. Berdasarkan kurva standar tersebut, maka setelah diplotkan ke persamaan regresi linear yang diperoleh, didapat konsentrasi protein hasil isolasi sebagai berikut (Tabel 3.1).



Gambar 3.1. Kurva Standar Protein BSA

Tabel 3. 1 Kadar Protein Sampel Yang Diisolasi Dari Kultur *E.coli*

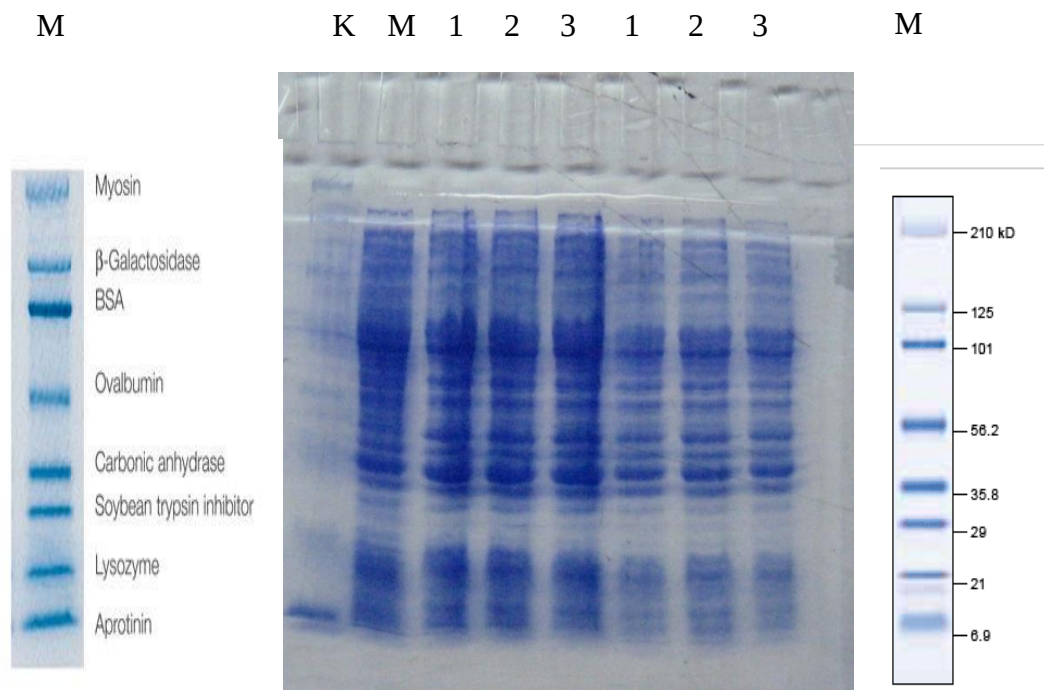
Ulangan	Nilai Absorbansi	Kadar Protein Sampel (µg/µl)
Kontrol	0,46	9,33
I	0,409	8,16
II	0,359	7,055
III	0,392	7,795
Rata – rata	0,3867	7, 67

Konsentrasi protein total dalam sampel bakteri *E. coli* yang ditentukan dengan metode

spektrofotometri sebanyak 7,67 µg/µl, artinya di dalam sampel tersebut terkandung 0,77 % total protein. Hasil percobaan menunjukkan konsentrasi kontrol lebih tinggi dari sampel yaitu 9,33µg/µl. Konsentrasi kontrol seharusnya lebih rendah dibandingkan sampel karena sampel diberi perlakuan induksi IPTG. Konsentrasi kontrol yang justru lebih tinggi disebabkan karena kepadatan populasi mikrobial dalam kultur yang tidak sama dengan kultur yang dijadikan kontrol. Selanjutnya dilakukan analisis penentuan berat molekul dan jenis protein menggunakan elektroforesis SDS-PAGE. Elektroforesis ini menggunakan dua jenis gel, yaitu *separating gel* dan *stacking gel*. *Separating gel* berfungsi untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul. Di dalam *separating gel* terdapat TEMED dan APS yang berfungsi untuk polimerisasi agar larutan dapat memadat sehingga dapat membentuk gel. *Stacking gel* berfungsi untuk menyamakan *starting point* protein sebelum dijalankan. Gel yang dipakai adalah *polyacrylamide*. Penggunaan poliakrilamida mempunyai keunggulan dibandingkan dengan gel lainnya, karena tidak bereaksi dengan sampel dan tidak membentuk matriks dengan sampel, sehingga tidak menghambat pergerakan sampel yang memungkinkan pemisahan protein secara sempurna. Selain itu, gel poliakrilamida ini mempunyai daya pemisahan yang cukup tinggi (Anonim, 2012).

Penggunaan SDS berfungsi untuk mendenaturasi protein karena SDS bersifat sebagai deterjen yang mengakibatkan ikatan dalam protein terputus membentuk protein yang dapat terelusi dalam gel begitu juga *mercaptoethanol*. *Loading dye* untuk protein berbeda dengan *loading dye* untuk DNA. Pada protein, *loading dye* berupa *buffer* yang terdiri dari TRIS sebagai asam. SDS untuk membuat protein bermuatan negatif, *mercaptoethanol* berfungsi sebagai basa untuk memotong ikatan *disulfide* pada protein agar struktur protein menjadi linear. *Bromfenol* sebagai pewarna dan gliserol sebagai pemberat. *Running buffer* pada protein berbeda dengan pada DNA. Elektroforesis pada DNA menggunakan TBE, tetapi pada protein menggunakan *electrode buffer* yang terdiri dari TRIS, glisin, dan SDS. Analisis penentuan berat molekul dan jenis protein yang terdapat dalam kultur *E.coli* dapat dilihat pada Gambar 3.2.

Migrasi protein dengan elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt dan lama pemisahan kurang lebih 1 jam agar didapatkan molekul protein yang berbeda dapat terpisah dengan baik. Penanda migrasi ditentukan dengan pewarna *coomassie brilliant blue*. Hasil SDS PAGE menunjukkan pita-pita protein yang dapat dipisahkan berdasarkan berat molekul (Gambar 3.3). Perbedaan posisi pita protein menunjukkan perbedaan panjang protein yang diperoleh. Hal ini terjadi karena perbedaan berat molekul masing-masing protein yang berhasil diisolasi dari kultur *E.coli*. Jenis protein yang mungkin dapat diisolasi dari sampel kultur bakteri *E.coli* tidak dapat dibedakan dengan jelas karena pemisahan protein dengan SDS PAGE masih menghasilkan pita-pita yang saling tumpang tindih. Hal ini dapat disebabkan karena protein yang dianalisis memiliki konsentrasi yang tinggi sehingga menghasilkan pita-pita yang kurang spesifik. Marker hasil elektroforesis terlihat memiliki pola pita yang berbeda dengan referensi. Hal ini bisa disebabkan karena perbedaan sistem gel yang digunakan. Salah satu jenis protein yang diperkirakan tidak ada dalam ekstrak isolasi



Gambar 3.2 Perbandingan Hasil Elektroforesis Dengan Marker (M : Marker Protein, 1-6 : Elektroforesis Hasil Isolasi Protein Bakteri *E. coli* dari 3 Kultur Tabung yang Berbeda Dengan Masing-Masing 2x Ulangan)

protein adalah penghambat tripsin yang terdapat dalam tanaman kedelai, karena sumber untuk isolasi protein berasal dari bakteri Prokariotik. Hal ini diperkuat dengan posisi pita pada perkiraan panjang pita milik penghambat tripsin kedelai yang tidak tervisualisasi setelah dilakukan elektroforesis gel SDS-PAGE.

D. KESIMPULAN

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah protein total yang diisolasi dari kultur bakteri *E.coli* BL21 (DE3) memiliki konsentrasi sebesar 7,67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, namun dengan berat molekul dan jenis protein dalam protein total yang masih belum diketahui.

E. DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2012. *Gel Elektroforesis Agaroes VsPoliakrilamid*. Online, (<http://ibcraja4.org/assets/File/Buletin5Oktober2012.pdf>). Diakses 12 Mei 2014.
- Ausubel, F.M, Brent, R., Robert, E.K., David, D.M., Seidmen, J.G., Smith, J.A., and Sthrlul, K. 2003. *Current Protocol in Moleculer Biology*. John Wiley and Sons, Inc.

- Bio-Rad. 2014. *Prestained SDS-PAGE Standards #1610318EDU*. Online (<http://www.bio-rad.com/en-id/sku/161-0318edu-prestained-sds-page-standards>). Diakses tanggal 12 Juli 2014
- ENA. 2014. *European Nucleotide Archive - Coding: ACT42061.1*. Online, (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/ACT42061>). Diakses tanggal 12 Juli 2014.
- Hansen, LH, Sorensen SJ, Jensen LB. 1997. Chromosomal Insertion of The entire Eschericia coli Lactose Operon, into Two Strains of Pseudomonas, Using A Modified mini-Tn5 Delivery System. *Gene* 186:167-173.
- Hemes B.D. 1998. *Gel Electrophoresis of Protein*. Oxford University press. New York.
- Maknun, L. 2015. Penggunaan Iso Propyl Thio D-Galactosidase (IPTG) pada Berbagai Tingkat Kepadatan (Optical Density) Bakteri Terhadap Produksi Protein Rekombinan GST-VP28 pada *Escherichia Coli*. *Skripsi*. Fakultas Peternakan. Universitas Mataram.
- Nelson, DL, Cox MM. tanpa tahun. *Lehninger Principles of Biochemistry fourth Edition*. University of Wisconsin. Madison. Online, (www.whfreeman.com/lehninger4e).
- Rickwood, D. 1984. *Centrifugation : A Practical Approach*. Washington DC : IRL Press.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekular*. Erlangga. Jakarta.