



TUGAS AKHIR - SB141510

**OVERPRODUKSI DAN KARAKTERISASI PROTEIN
REKOMBINAN hFN α -2a FUSI HSA DALAM YEAST
REKOMBINAN *Pichia pastoris***

Nadya Tarupuspita
151100068

Dosen Pembimbing
Dr. Nurul Jadid, M.Sc.
Dr. Ratih Asmana Ningrum

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2015



FINAL PROJECT - SB141510

OVERPRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF HSA- hIFN α 2a FUSHION PROTEIN IN *Pichia pastoris*

Nadya Tarupuspita
151100068

Advisor Lecturer
Dr. Nurul Jadid, M.Sc.
Dr. Ratih Asmana Ningrum

Biology Department
Mathematic and Natural Science Faculty
Sepuluh Nopember Institute of Technology
Surabaya 2015

LEMBAR PENGESAHAN

OVERPRODUKSI DAN KARAKTERISASI PROTEIN REKOMBINAN hIFN α -2a FUSI HSA DALAM YEAST REKOMBINAN *Pichia pastoris*

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
pada
Jurusan S-1 Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:
NADYA TARUPUSPITA
NRP. 1511 100 068

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir.

Dr. Nurul Jadid, M.Sc. (Pembimbing 1)

Dr. Ratih Asmana Ningrum. (Pembimbing 2)

Surabaya, 5 Agustus 2015

Mengetahui
Ketua Jurusan Biologi



Dr. rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si
NIP. 19690907 199803 2 001

OVERPRODUKSI DAN KARAKTERISASI PROTEIN
REKOMBINAN hIFN α -2a FUSI HSA DALAM YEAST
REKOMBINAN *Pichia pastoris*

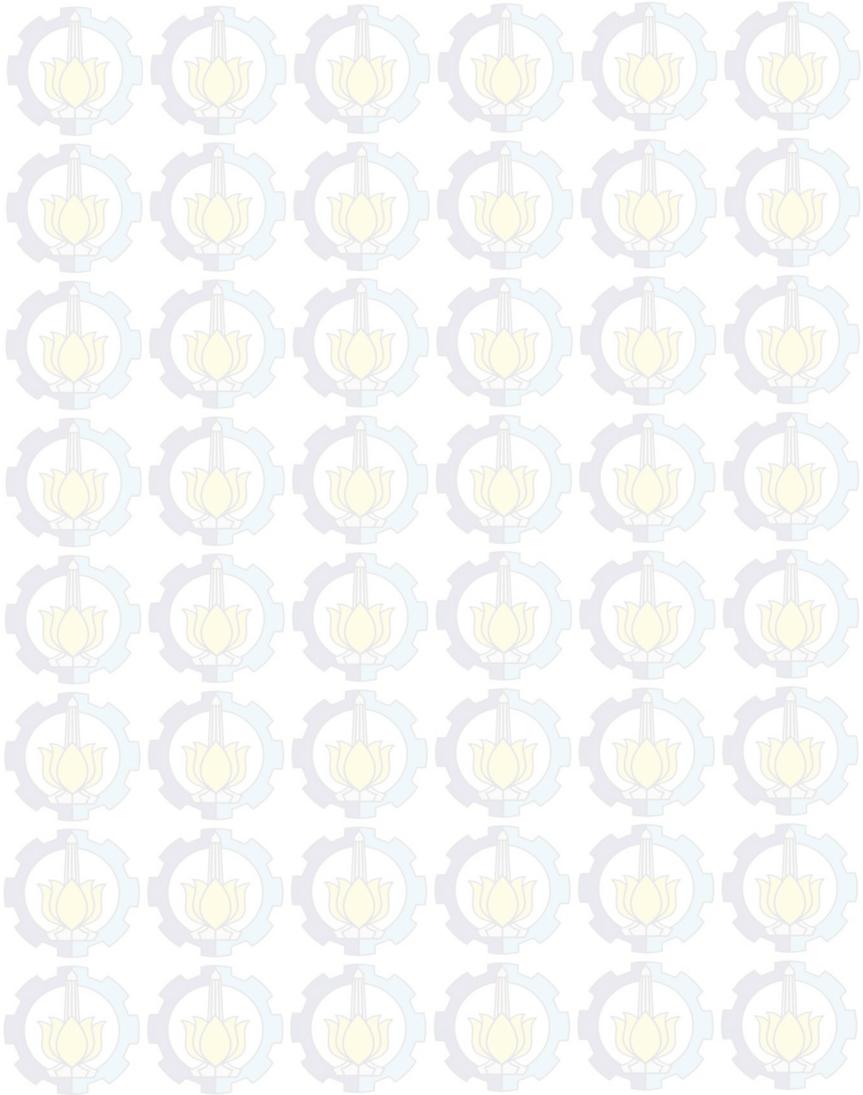
Nama : Nadya Tarupusita
NRP : 1511 100 068
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. Nurul Jadid, M. Sc.
Dr. Ratih Asmana Ningrum

Uraian Singkat

CHC (Chronic Hepatitis C) adalah salah satu penyakit yang paling umum ditemui pada penderita yang mengidap penyakit hati kronis. Terapi medis berbasis protein *IFN* (Interferon) dan modifikasinya merupakan salah satu metode pengobatan *CHC* yang saat ini terus dikembangkan. Pengembangan modifikasi protein *IFN α 2a* berguna untuk meningkatkan waktu paruh dari protein tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan overproduksi, purifikasi, dan karakterisasi protein rekombinan human *IFN- α 2a* (*rhIFN- α 2a*) yang difusikan dengan Human Serum Albumin (*HSA*) sebagai salah satu alternatif untuk meningkatkan waktu paruh protein. *Pichia pastoris* strain *SMD* dipilih karena berhasil mengekspresikan protein target *HSA-IFN α 2a*. Hasil analisis *SDS-PAGE* dan *Western Blot* dari kultur *SMD* menunjukkan bahwa protein target yang teridentifikasi sebagai *HSA-IFN α 2a* memiliki bobot molekul sebesar 85 kDa. Hasil *SDS-PAGE* dan *western blot* juga menunjukkan adanya degradasi protein. Penambahan inhibitor protease (*PMSF*) masih kurang efektif dalam mengurangi degradasi proteolitik protein *HSA-hIFN α 2a*. Hasil perhitungan konsentrasi protein dari kultur *SMD* berumur 48 jam yang telah melalui proses purifikasi adalah sebesar 25,1 $\mu\text{g/L}$.

Kata Kunci: *Chronic Hepatitis C, HSA, IFN- α 2a, Overproduksi, P. pastoris.*

“Halaman sengaja dikosongkan”



OVEPRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF HSA-hIFN α 2a FUSION PROTEIN IN *Pichia pastoris*

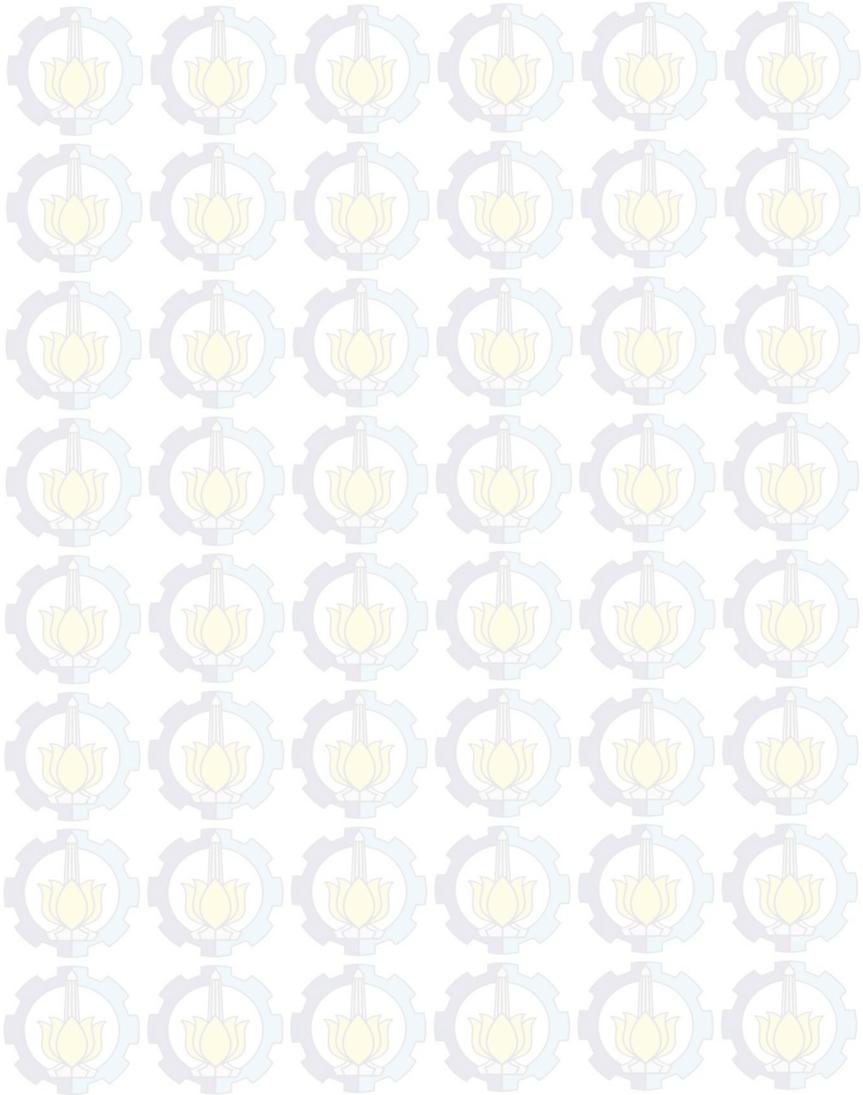
Name : Nadya Tarupusita
NRP : 1511 100 068
Department : Biology
Advisor Lecturer : Dr. Nurul Jadid, M. Sc.
Dr. Ratih Asmana Ningrum

Abstract

CHC (Chronic Hepatitis C) is one of the most common diseases found in patient with chronic liver disease. IFN (Interferon)-based medical therapy and its modification are one of the continuously developed treatment methods for CHC patients. The development modified IFN α 2a protein is useful to rise its half life. This study aims to overproduce, purify and characterize HSA-IFN α 2a fusion protein as an alternative method for increasing proteins half lives. Transformed SMD strain of *Pichia pastoris* was chosen as the main expression system to produce HSA-hIFN α 2a fusion protein. SDS-PAGE and western blot analyses from SMD strain culture confirmed that the protein was HSA-hIFN α 2a with 85 kDa in size. In addition the protein might undergo proteolytic degradation. In this present study, the inclusion of protease inhibitor (PMSF) to reduce proteolytic degradation of HSA-hIFN α 2a was inefficient. The quantification of purified proteins from 48 hours old SMD strain culture is 25,1 μ g/L.

Keywords: Chronic Hepatitis C, HSA, IFN- α 2a, Overproduction, *P. pastoris*.

“Halaman sengaja dikosongkan”



KATA PENGANTAR

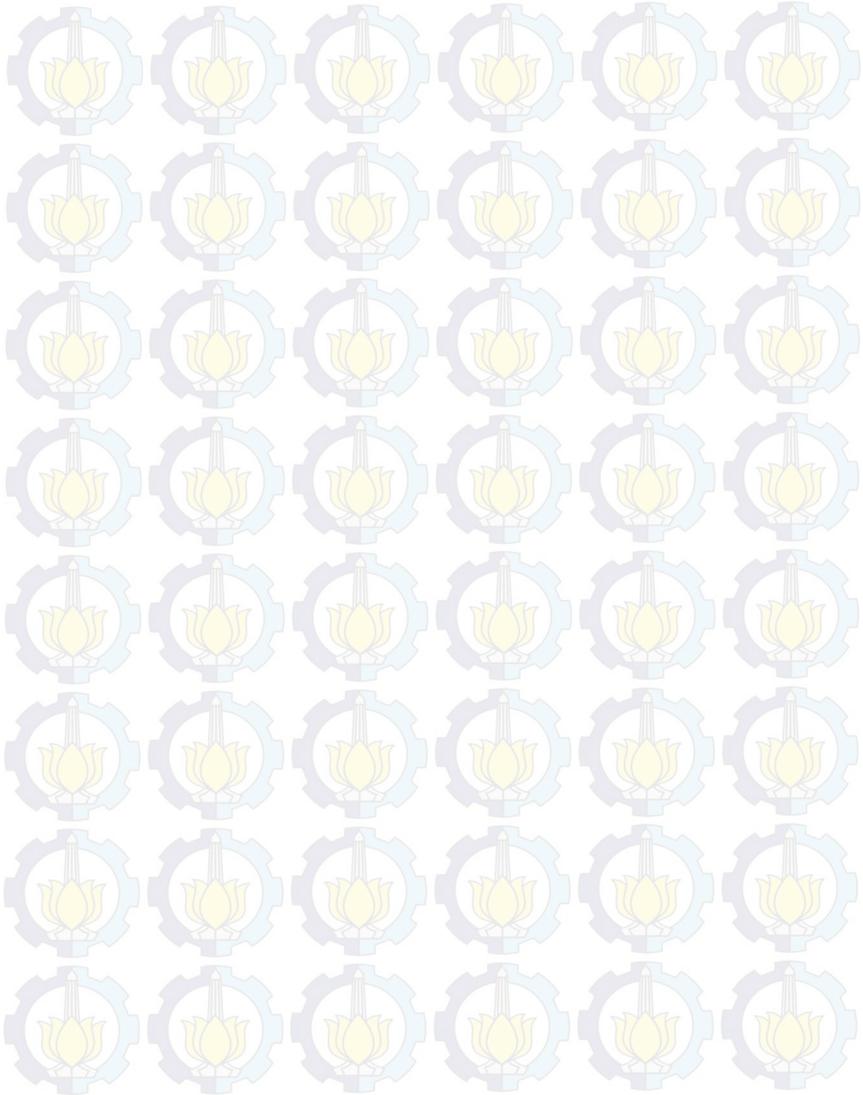
Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberi rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal Tugas Akhir dengan judul **Overproduksi dan Karakterisasi Protein Rekombinan hIFN α -2a Fusi HSA dalam Yeast Rekombinan *Pichia pastoris***, sebagai salah satu syarat untuk dapat melakukan Tugas Akhir di Jurusan Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Dalam penulisan Proposal Tugas Akhir ini penulis mendapatkan bimbingan dan arahan dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih kepada Bapak Dr. Nurul Jadid, M. Sc. selaku pembimbing Tugas Akhir dari Jurusan Biologi ITS, serta Ibu Dr. Ratih Asmana Ningrum selaku Pembimbing Lapangan Tugas Akhir di LIPI Bioteknologi yang telah memberikan dukungan, petunjuk, dan pengarahan. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Awik Puji Dyah N. dan Ibu Tutik Nurhidayati, S. Si., M. Si selaku dosen penguji I dan II yang telah memberikan kritik dan saran terhadap pengerjaan Tugas Akhir penulis.

Rasa hormat dan terima kasih penulis sampaikan kepada kedua orang tua, Alm. Bambang Tarubiyono dan Ibu Suryati Suryo atas segala cinta, perhatian, kasih sayang, serta doa yang terus terucap tiada henti. Selain itu penulis juga ingin berterima kasih kepada segenap karyawan Laboratorium Vaksin dan Terapeutik LIPI BioTek, Cibinong yang telah memberikan bimbingan dan bantuan, serta dukungan dari teman-teman BITS angkatan 2011. Penulis menyadari masih banyak kekurangan karena minimnya pengalaman dan pengetahuan, namun besar harapan bagi penulis bahwa penelitian ini dapat bermanfaat bagi para pembaca untuk menambah wawasan dan pengetahuan.

Surabaya, 18 Februari 2015
Nadya Taruspita

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



DAFTAR ISI

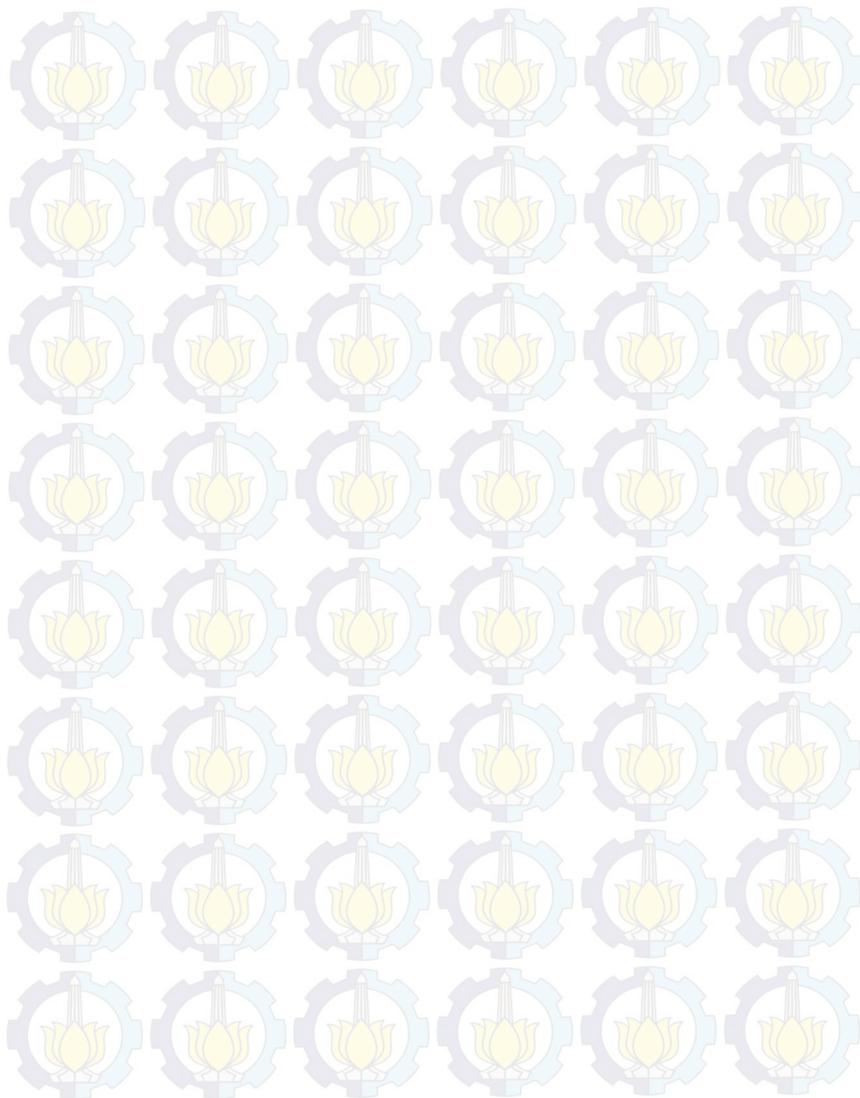
	Halaman
HALAMAN COVER (INDONESIA).....	i
HALAMAN COVER (INGGRIS).....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
URAIAN SINGKAT.....	vii
ABSTRACT.....	ix
KATA PENGANTAR.....	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Permasalahan.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan.....	3
1.5 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Interferon Alfa 2a (IFN α -2a).....	5
2.1.2 Mekanisme Kerja IFN- α	7
2.1.2.1 Penghambatan Siklus Sel dan Antiproliferasi.....	7
2.1.2.2 Apoptosis dan Sitotoksitas.....	8
2.1.2.3 Anti-tumor.....	8
2.1.2.4 Efek Imunomodulatori dari IFN pada Pertumbuhan dan Ketahanan Sel.....	8
2.1.3 Modifikasi dari IFN- α 2a.....	9
2.2 Yeast <i>Pichia pastoris</i> Rekombinan.....	10
2.3 Purifikasi Protein.....	11
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	13

3.2 Metode Penelitian.....	13
3.2.1 Screening <i>Pichia pastoris</i> rekombinan (HSA- hIFN α 2a).....	13
3.2.2 Overproduksi Protein HSA- hIFN α 2a.....	14
3.2.2.1 Overproduksi Skala Kecil Protein HSA- hIFN α 2a	14
3.2.2.2 Overproduksi Skala Besar Protein HSA- hIFN α 2a	15
3.2.3 Ekstraksi Protein HSA- hIFN α 2a.....	15
3.2.4 Purifikasi Protein HSA- hIFN α 2a	16
3.2.5 Karakterisasi Protein HSA- hIFN α 2a.....	16
3.2.5.1 Karakterisasi Menggunakan SDS-PAGE.....	16
3.2.5.2 Karakterisasi Menggunakan Western-Blot.....	17
3.2.5.3 Karakterisasi Jumlah Protein menggunakan BCA Protein Assay.....	18
3.2.6 Analisis Data.....	19
	21
BAB IV HASIL dan PEMBAHASAN	27
4.1 Screening <i>Pichia pastoris</i> Rekombinan (HSA- hIFN α 2a).....	21
4.2 Overproduksi dan Identifikasi Protein HSA-hIFN α 2a	24
4.3 Purifikasi dan Kuantifikasi Protein HSA-hIFN α 2a.....	31
BAB V KESIMPULAN	
5.1 Kesimpulan.....	35
5.2 Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN.....	45
BIODATA PENULIS.....	49

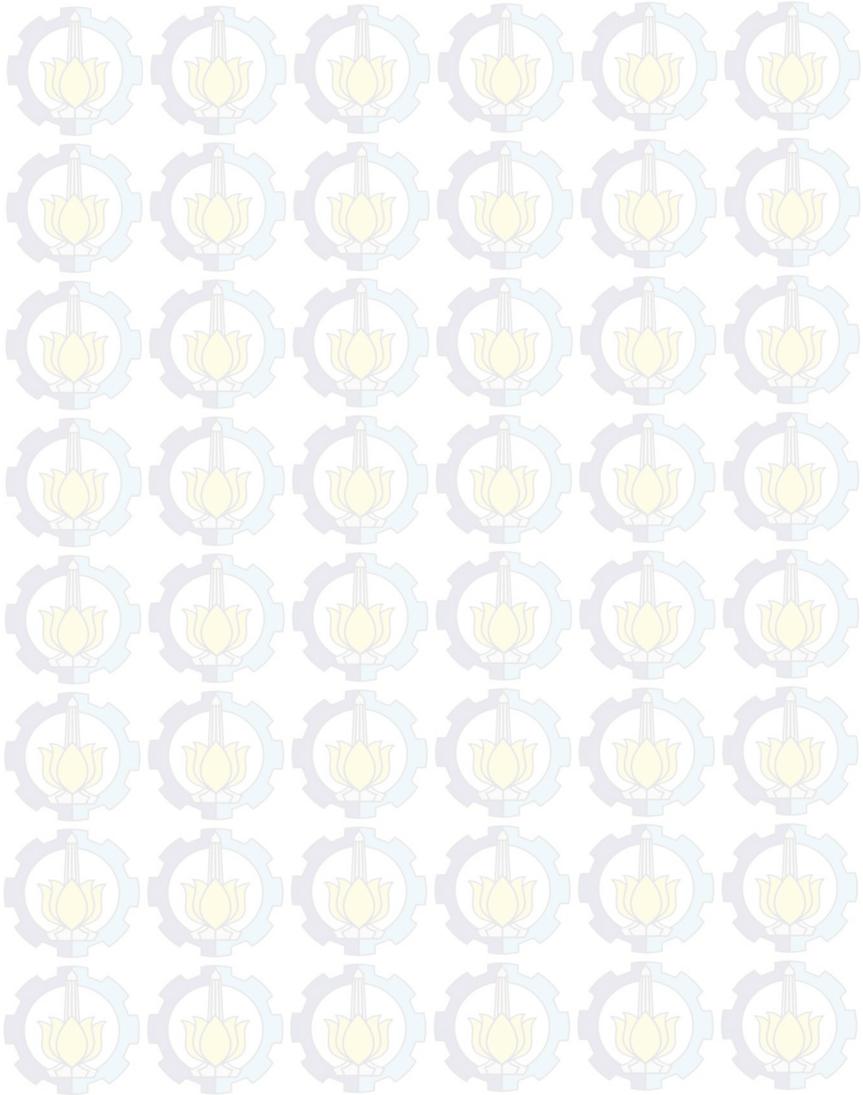
DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 4.1	Hasil Dot Blot Overekspresi Koloni Yeast.	23
Gambar 4.2	Hasil SDS-PAGE (a) dan <i>Western Blot</i> (b) Koloni Strain SMD Berumur 24 Jam.	25
Gambar 4.3	Hasil SDS-PAGE (a) dan <i>Western Blot</i> (b) Koloni SMD berumur 48 jam.	26
Gambar 4.4	Hasil SDS-PAGE dan <i>Western Blot</i> Koloni GS115 dengan Antibodi IFN α .	27
Gambar 4.5	Hasil Analisis <i>Western Blot</i> Strain GS115 dan SMD Pada Jam ke 24 (a) dan 48 (b) Menggunakan Antibodi HSA.	29
Gambar 4.6	Hasil SDS-PAGE (a) dan <i>Western Blot</i> (b) dari Hasil Purifikasi Protein dengan Antibodi HSA.	32
Gambar 4.7	Kurva Standar <i>BCA Protein Assay</i> .	34

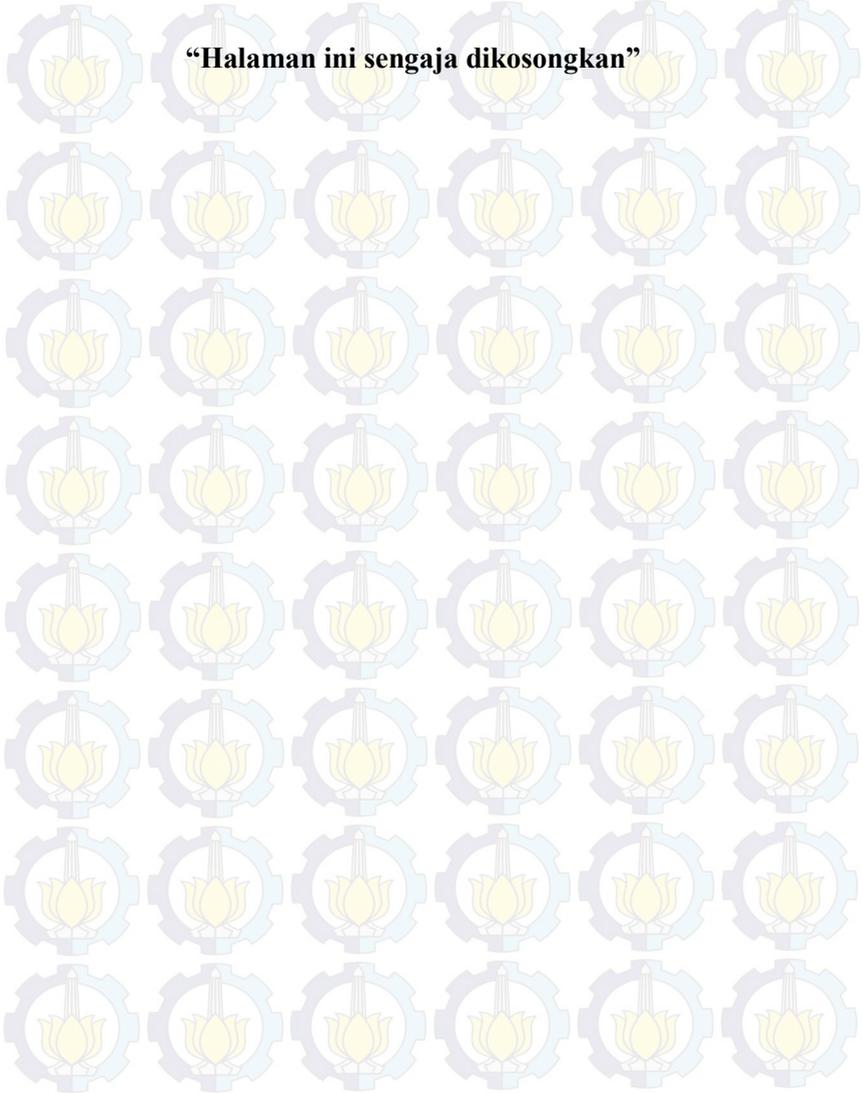
“Halaman ini sengaja dikosongkan”



“Halaman ini sengaja dikosongkan”



“Halaman ini sengaja dikosongkan”



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

CHC (*Chronic Hepatitis C*) merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh infeksi HCV (*Hepatitis C Virus*) yang diderita sekitar 3% penduduk dunia (Shepard *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2003). Sekitar 60% hingga 80% individu yang terinfeksi HCV akut, mengidap CHC (*Chronic Hepatitis C*) dan 20% lainnya akan mengidap *cirrhosis* (Subramanian *et al.*, 2007). Salah satu metode pengobatan terhadap CHC yang saat ini sedang terus dikembangkan adalah dengan menggunakan protein Interferon (IFN) dan modifikasinya (Subramanian *et al.*, 2007).

IFN adalah protein yang dihasilkan oleh sel sebagai respon terhadap suatu infeksi virus (Colby & Morgan, 1971). Salah satu tipe protein interferon yang digunakan dalam pengobatan CHC adalah Interferon α (IFN- α) (Biron, 2001 ; Bach, 1997 ; Young, 1996). Interferon α (IFN- α) adalah sitokin pertama yang diproduksi menggunakan teknologi rekombinan DNA untuk pengobatan klinis skala luas dalam perawatan terhadap infeksi penyakit ganas (Tagliaferri *et al.*, 2005).

Interferon α terbagi menjadi dua sub tipe yaitu IFN α 2a (Interferon Alfa 2a) dan IFN α 2b (Interferon Alfa 2b) (Jonasch & Haluska, 2001). Penelitian ini berfokus pada IFN α 2a. Rekombinan hIFN α 2a (rhIFN α 2a) sudah banyak digunakan dalam pengobatan, namun rhIFN α 2a masih memiliki kekurangan. Industri klinis mengenal rhIFN α 2a dengan nama Roferon-A[®] Roche yang terdiri dari 165 asam amino dan memiliki bobot molekul 19 kDa. Terapi klinis menggunakan rhIFN α 2a memiliki kelemahan. Roferon-A[®] Roche memiliki waktu paro eliminasi yang relatif singkat, yaitu 3,7-8,5 jam (rata-rata 5.1 jam). Hal ini menyebabkan penderita membutuhkan dosis yang lebih tinggi untuk menghindari pembersihan sitokin dalam darah yang cepat (Chatelut *et al.*, 1999; Roche, 2014). Penggunaan dosis obat yang tinggi dapat berdampak negatif seperti munculnya efek samping

pada kulit, sistem syaraf, endokrin, dan toksisitas pada imun (Gutterman, 1999). Oleh karena itu dibutuhkan teknik modifikasi yang tepat untuk meningkatkan waktu paro eliminasi dari protein tersebut.

Salah satu contoh modifikasi yang sudah dilakukan adalah dengan menambah bobot molekul dari protein tersebut. Hal ini dilakukan dengan cara menggabungkan protein IFN α -2a melalui konjugasi dengan PEG (*Polyethylene Glycol Chain*) yang memiliki berat molekul 40 kDa sehingga total berat molekul menjadi 60 kDa. Modifikasi ini akan meningkatkan waktu paro eliminasi protein tersebut, dari 3,7-8,5 jam menjadi 60 jam (Roche, 2014; Rosendahl *et al.*, 2005).

Berdasarkan data-data tersebut penelitian ini bertujuan untuk memodifikasi protein hIFN α -2a dengan cara memfusikan HSA (*Human Serum Albumin*). Protein tersebut kemudian dioverproduksi dalam yeast rekombinan *Pichia pastoris*. Hasil overproduksi akan dipurifikasi dan dikarakterisasi untuk mendapatkan karakteristik berupa bobot molekul dan identitas protein. Konsentrasi protein yang dihasilkan juga akan diketahui melalui hasil analisis *BCA protein Assay*.

1.2 Permasalahan

Permasalahan yang akan dikaji dalam penelitian ini adalah bagaimanakah karakter bobot molekul, identitas, dan konsentrasi protein HSA-hIFN α 2a yang dioverproduksi dalam yeast *P. pastoris*.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Karakterisasi protein dilakukan dengan cara mengidentifikasi bobot molekul protein menggunakan metode SDS-PAGE.
2. Identitas protein dianalisis dengan menggunakan metode *Western Blot*.
3. Konsentrasi protein yang dihasilkan dianalisis menggunakan metode *BCA Protein Assay*.

1.4 Tujuan

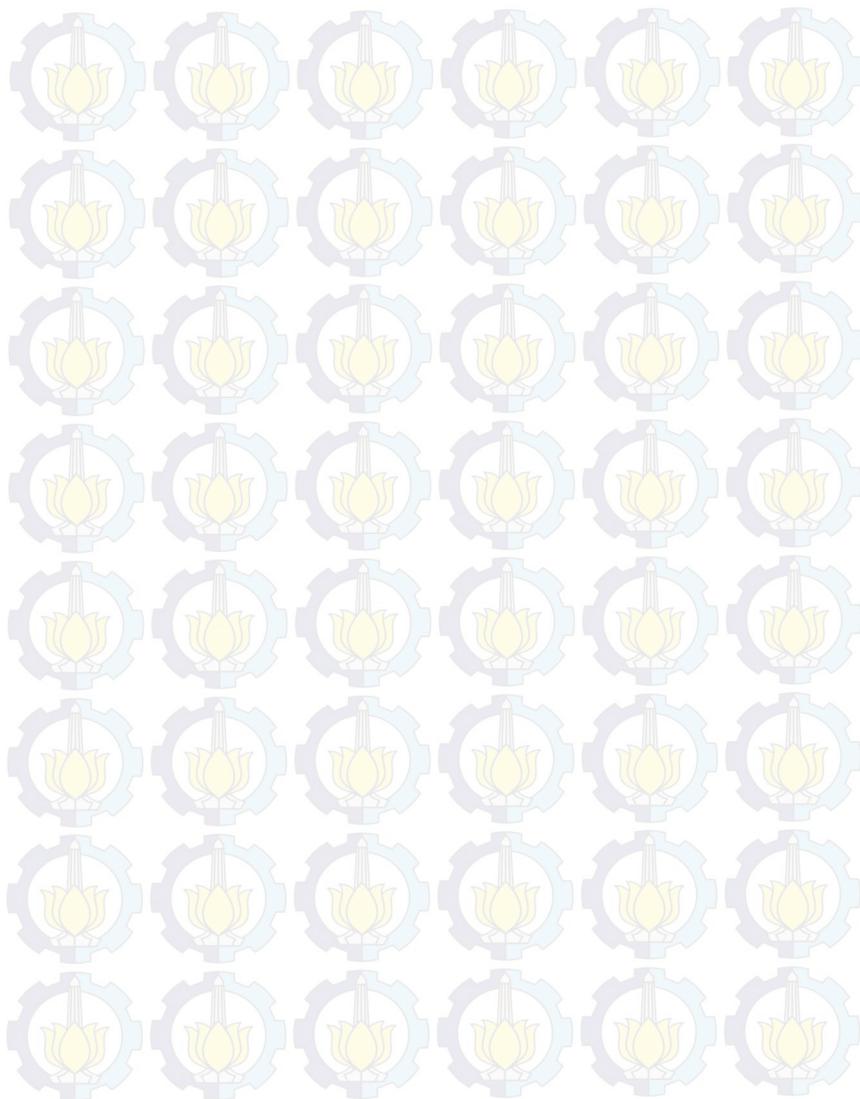
Penelitian ini bertujuan untuk:

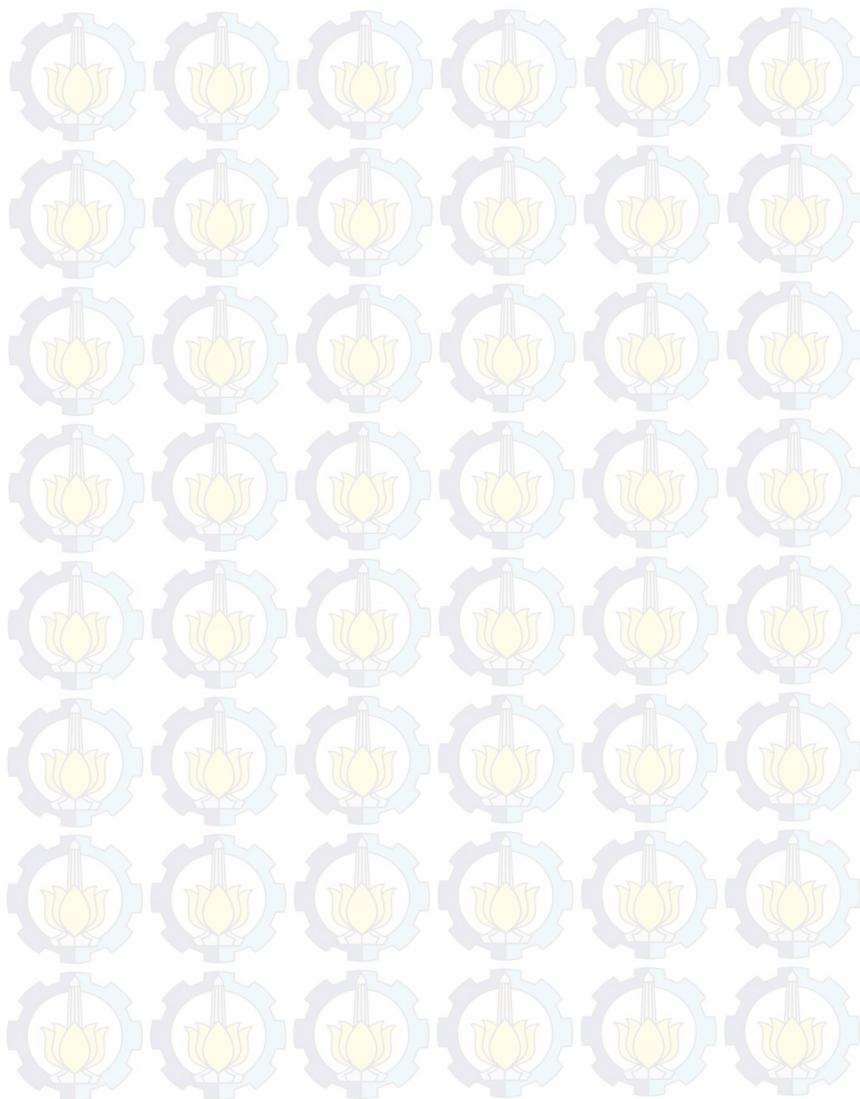
1. Mengetahui karakter dan identitas protein HSA-hIFN α 2a yang dianalisa menggunakan SDS-PAGE dan Western Blot.
2. Mengetahui konsentrasi dari protein HSA-hIFN α 2a yang dioverproduksi dalam yeast *P. pastoris*.

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan, menjadi salah satu referensi literatur untuk penelitian lanjutan, terutama yang berhubungan dengan proses overproduksi, purifikasi, dan karakterisasi dari protein Interferon Alpha-2a yang didapatkan dari yeast *P. pastoris* rekombinan. Manfaat lain yang dapat diambil dari penelitian ini adalah untuk dapat menghasilkan modifikasi hIFN α 2a yang memiliki waktu paro eliminasi yang lebih lama dari modifikasi hIFN α 2a yang telah ada sebelumnya.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”





BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Interferon Alfa 2a (IFN α -2a)

Interferon (IFN) adalah protein yang disekresikan dan diproduksi oleh berbagai jenis sel sebagai respon terhadap virus, bakteri, parasit, sel tumor atau antigen yang lain (Kusumawati *et al.*, 2013). Grup Interferon dari sitokin pertama kali ditemukan pada tahun 1950, ketika faktor antivirus memberikan perlindungan terhadap serangan virus influenza (Bis *et al.*, 2014). Interferon memiliki aktivitas antiviral, antitumor, efek dalam metabolisme dan diferensiasi sel, dan memodulasi sistem imun (Kusumawati *et al.*, 2013). Aktivitas biologis dari IFN sering kali diuji dengan cara mengetahui aktivitas antiviral pada kultur sel (Pestka, 1987).

Interferon diklasifikasikan menjadi dua tipe (Biron, 2001). IFN Tipe I disebut juga sebagai IFN viral dan di dalamnya adalah IFN- α (leukosit), IFN- β (fibroblas) dan IFN- ω . IFN Tipe II disebut juga sebagai IFN imun, terdiri atas IFN- γ . IFN viral (tipe I) diinduksi oleh infeksi virus, sedangkan IFN tipe II diinduksi oleh mitogenik atau stimulus antigenik. Kebanyakan tipe dari sel yang terinfeksi virus mampu mensintesis IFN- α/β pada kultur sel. Sedangkan pada IFN- γ disintesis hanya oleh sistem imun beberapa jenis sel, termasuk sel *natural killer* (sel NK), sel CD4 Th1, dan sel supresor sitotoksik CD8 (Bach, 1997 ; Young, 1996).

IFN- α diproduksi oleh semua tipe sel ketika distimulasi oleh virus, bakteri, *mycoplasma*, dan protozoa. IFN- α 2a terdiri dari 165 asam amino dengan 2 ikatan disulfida; satu diantara Cys1 dan Cys29 dan yang lain diantara Cys90 hingga Cys138, dari kedua jembatan disulfide ini, ikatan Cys29-Cys138 diketahui sangat kritikal untuk aktivitas biologis interferon (Bae *et al.*, 1995).

Produksi dari IFN- α oleh teknologi rekombinan untuk menggunakan terapeutik telah berfokus pada IFN- α 2a dan IFN-

$\alpha 2b$ (Bae *et al.*, 1995). IFN- $\alpha 2a$ dan IFN- $\alpha 2b$ memiliki perbedaan. IFN- $\alpha 2a$ memiliki lysin pada residu 23, sedangkan IFN- $\alpha 2b$ memiliki arginine pada posisi yang sama (Kusumawati *et al.*, 2013). IFN ini memiliki efek biologis yang luas termasuk antiviral, antiproliferatif, dan aktivitas imunomodulatori (Foser *et al.*, 2003). hIFN- $\alpha 2a$ (*human IFN- $\alpha 2a$*) I telah di setujui oleh FDA (*Food and Drug Administration*) untuk mengobati beberapa penyakit seperti NHL (*Non-Hodgkin's Lymphoma*), Hairy cell leukimia, CML (*Chronic Mylogenous Leukimia*), AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*), dan Hepatitis C yang kronis (Jonasch & Haluska, 2001).

Rekombinan hIFN $\alpha 2a$ dalam industri klinis dikenal dengan nama Roferon-A[®] Roche, terdiri dari 165 asam amino dan bobot molekul 19 kDa, Roferon-A[®] Roche memiliki waktu paro eliminasi yaitu 3,7-8,5 jam (rata-rata 5.1 jam). Hal ini menyebabkan penderita membutuhkan dosis yang lebih tinggi untuk menghindari pembersihan sitokin dalam darah yang cepat (Chatelut *et al.*, 1999; Roche, 2014). Pengobatan menggunakan rhIFN $\alpha 2a$ memiliki rentang waktu yang panjang, baik dalam bulanan ataupun tahunan. Kondisi pemberian dosis obat yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya efek samping pada kulit, sistem syaraf, endokrin, dan toksisitas pada imun (Gutterman, 1999). Banyak strategi dikembangkan untuk memperpanjang waktu paro eliminasi dari sitokin, dengan harapan dapat memperbesar efisiensi *in vivo* dari sitokin itu sendiri, sehingga dapat mengurangi frekuensi injeksi dan meningkatkan kualitas hidup pasien (Ceaglio, 2008).

Protein yang berukuran kecil akan dieliminasi oleh ginjal melalui proses pembersihan renal (Sola & Griebenow, 2010). Terdapat tiga tahapan utama dalam pembersihan renal. Jalur pertama melalui filtrasi glomerular yang secara primer dikontrol oleh ukuran permeabilitas selektif dari ginjal. Kemampuannya untuk memfilter urin atau darah yang sangat baik, berguna untuk mengeliminasi protein dengan bobot molekul dan radius hidrodinamik lebih dari 50 kDa dan 60 Å (Caliceti *et al.*, 2003;

Weinstein *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2007). Protein yang melebihi ukuran bobot molekul tersebut akan dieliminasi oleh jalur yang lain, kebanyakan melalui degradasi proteolitik, *up take* hepatic, dan *clarence* imun (Sola & Griebenow, 2010). Jalur kedua dari proses eliminasi renal kebanyakan berlaku pada petida linier yang kecil, proses tersebut terjadi melalui hidrolisis oleh enzim yang terletak pada membran luminal diikuti oleh reabsorpsi. Jalur ketiga adalah jalur yang paling jarang digunakan, melibatkan ekstraksi peritubular dari kapilaritas postglomerular diikuti oleh degradasi intraselular (Sola & Griebenow, 2010).

2.1.2 Mekanisme kerja IFN- α

IFN Tipe I termasuk di dalamnya IFN- α 2a diinduksi oleh kebanyakan tipe sel akibat adanya virus dan dsRNA (Sharkar *et al.*, 2003). IFN- α memiliki mekanisme aktivitas biologis melalui jalur JAK/STAT (*Janus Kinase/Sinyal Transduksi dan Aktifator Transkripsi*) (Bazhanova, 2005). Mekanisme antitumor dapat melalui 2 cara, yaitu secara langsung (menghambat siklus sel dan apoptosis) dan secara tidak langsung melalui sel imun (Bekisz *et al.*, 2010).

2.1.2.1 Penghambatan Siklus Sel dan Antiproliferasi

IFN diketahui dapat mempengaruhi fase yang berbeda dari siklus mitotik dalam sistem sel yang berbeda, kebanyakan memiliki pengaruh yang paling umum dalam penahanan fase G1 (Ross *et al.*, 1984). IFN- α diketahui dapat menginduksi inhibitor Cdk (*cyclin-dependent kinase*) p19 dan p21, ikatan kedua inhibitor ini pada kompleks Cdk/G1 cyclin akan menyebabkan terjadinya reduksi aktivitas kinase dan akan menyebabkan fase G1 tertahan (Bekisz *et al.*, 2010).

Jalur lain diketahui telah diaktifkan oleh pengobatan IFN, dimana ikatan antara IFN Tipe-I dan kompleks IFNAR akan menginduksi fosforilasi dari *vav proto oncogene*, yang akan

mengaktifkan GTPase Rac1 dan menyebabkan fosforilasi dari p38 MAPK (Uddin *et al.*, 1997; Uddin *et al.*, 2000).

2.1.2.2 Apoptosis dan Sitotoksitas

Salah satu hal yang penting untuk diketahui adalah bahwa tipe sel yang berbeda dapat memiliki reaksi pro- atau anti-apoptosis terhadap IFN. Pengobatan menggunakan IFN- α akan menyebabkan regulasi dari protein pro-apoptosis seperti Fas, Fas-ligand (FasL) dan TRAIL. Protein-protein ini dapat berinteraksi dengan FADD (*Fas Associated Death Domain*) atau protein reseptor TRAIL, menyebabkan inisiasi dari apoptosis melalui aktivasi capcase-8. IFN juga dapat meregulasi capcase-4 dan capcase-8 dalam beberapa jenis sel, yang dapat menyebabkan inisiasi capcase-8 dan 9 serta efektor capcase-3, protein-protein ini yang meningkatkan sensitivitas sel terhadap stimulus pro-apoptosis seperti TNF- α (Bekisz *et al.*, 2010)

2.1.2.3 Anti-tumor

Sebagai tambahan untuk efek antiproliferasi dan efek apoptosis, pengobatan IFN diketahui juga dapat menyebabkan sitotoksitas langsung pada beberapa sel tumor. Beberapa jenis IFN yang telah disetujui oleh FDA seperti IFN- α 2a (Hoffman-La Roche©) dan - α 2b (Schering-Plough©) telah menjadi pengobatan untuk mengobati *Hairy Cell Leukimia* dan *Leukimia Myelogenous* yang kronis (CML) dimana selanjutnya obat yang disetujui untuk CML adalah IFN- α 2a (Bekisz *et al.*, 2010).

2.1.2.4 Efek Imunomodulatori dari IFN pada Pertumbuhan dan Ketahanan Sel

Adanya IFN menyebabkan aktivasi dari monosit dan makrofage. Macrophag yang aktif akan memproduksi *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen intermediates* (RNI) yang memiliki efek sitotoksik pada sel target, sebagai tambahan monosit yang teraktivasi akan memproduksi sitokin yang menginisiasi respon Th1 (Bekisz *et al.*, 2010).

2.1.3 Modifikasi dari IFN- α 2a.

Salah satu bentuk modifikasi dari rhIFN α 2a yang paling berhasil adalah dengan modifikasi pada peningkatan bobot molekul protein rhIFN α 2a melalui konjugasi dengan polietilen glikol (PEG), sehingga memiliki penambahan waktu paro dari protein rhIFN α 2a pada umumnya (Rosendahl *et al.*, 2005). rhIFN α 2a yang memiliki modifikasi PEG memiliki nama dagang PEGASYS[®] Roche, terbentuk dari konjugasi satu cabang PEG (*Polyethylene Glycol Chain*) yang memiliki berat molekul sekitar 40 kDa kemudian digabungkan kepada Interferon Alfa-2a (20 kDa) oleh suatu ikatan amida yang stabil, dengan berat molekul total yaitu 60 kDa. PEGASYS memiliki waktu paro terminal pada subjek yang sehat sekitar 60 jam (Roche, 2014).

Modifikasi menggunakan PEG memiliki kelemahan, dimana rhIFN α 2a yang memiliki PEG akan secara signifikan memiliki tingkat bioaktivitas *in vitro* yang menurun daripada pada rhIFN α 2a yang tidak memiliki PEG, sehingga pasien akan membutuhkan dosis yang lebih besar (Rosendahl *et al.*, 2005). Kehilangan tingkat bioaktivitas terbesar terjadi saat rhIFN α 2a dimodifikasi dengan PEG yang besar (PEG dengan bobot molekul 20- dan 40-kDa) serta jika protein mengikat lebih dari satu PEG, padahal PEG sangat berguna untuk memperpanjang waktu paro dari protein itu sendiri (Monkarsh *et al.*, 1997; Bailon *et al.*, 2001).

Bentuk modifikasi lain adalah glikosilasi protein, dimana proses modifikasi ini mengacu pada penempelan secara kovalen sebuah molekul karbohidrat (*glycan*) ke permukaan sebuah protein. Glikosilasi adalah kompleks dari modifikasi kimia yang paling prevalen dan secara bentuk struktur terdapat pada natural pada protein, namun modifikasi jenis ini memiliki tantangan yaitu, sifat intrinsik yang kompleks dari struktur *glycan* dan kesulitan yang berkaitan dengan *host* yang akan mengekspresikan glikoprotein (Sola & Griebenow, 2010).

Modifikasi lain yang menjadi alternatif adalah menggunakan HSA (*Human Serum Albumin*) dimana peningkatan bobot molekul akan melalui teknologi fusi dengan HSA (Zhao, 2012). HSA sendiri merupakan protein yang paling lazim ditemukan dalam sistem sirkulasi. HSA dipilih karena memiliki beberapa kelebihan, yaitu meningkatkan waktu paro *in vivo*, tidak perlu dimodifikasi, fleksibilitas desain, mengurangi pembersihan renal serta dapat meningkatkan kelarutan dan stabilitas protein (Subramanian *et al.*, 2007). Salah satu bentuk dagang yang ada di pasaran adalah Albuferon, yaitu fusi protein HSA dan Interferon- α 2b (IFN- α 2b) yang mengkombinasikan aktivitas antiviral dari IFN- α 2b dan HSA yang memiliki paro waktu yang panjang (Zhao, 2008).

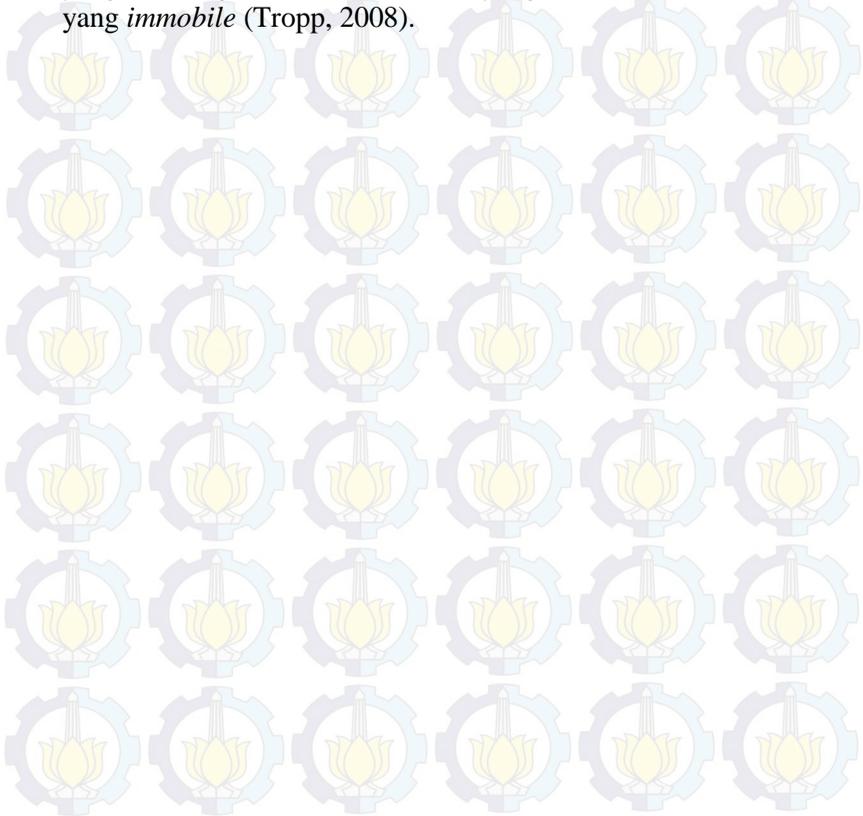
2.2 Yeast *P. pastoris* Rekombinan

P. pastoris adalah salah satu yeast metilotropik yang banyak digunakan dalam memproduksi protein rekombinan, bahkan dalam level yang lebih besar dari gram per liter sebuah kultur, baik dalam penelitian dasar maupun dalam aplikasi bioteknologi di industri (Bollok *et al.*, 2009). Yeast ini dapat tumbuh pada keadaan densitas sel yang tinggi, memiliki sistem sekresi yang efisien dan dapat digunakan dalam banyak hal di bidang manipulasi molekular. Hal ini menyebabkan *P. pastoris* menjadi salah satu alternatif sistem ekspresi bakteri seperti *E. Coli*, terutama saat berhubungan dengan produksi protein kompleks yang membutuhkan tipikal modifikasi post-translasi eukariot atau yang mengandung ikatan disulfida (Kraimer *et al.*, 2012).

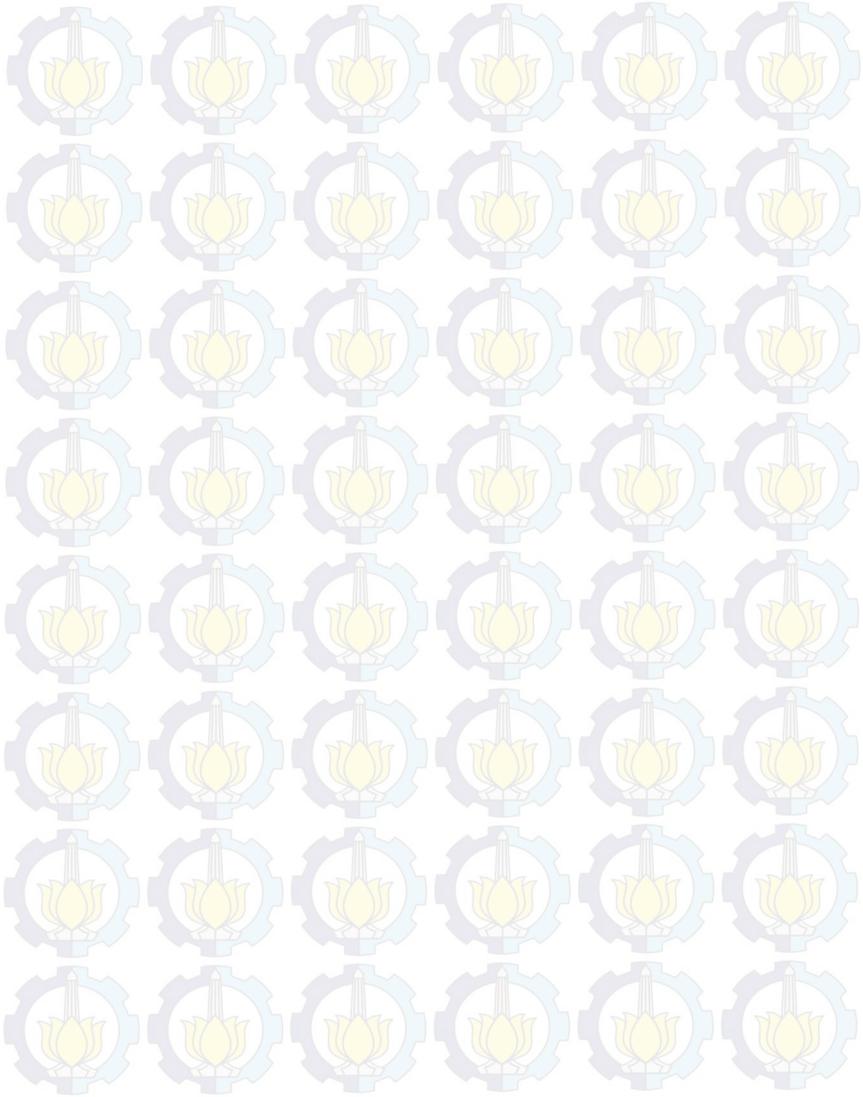
2.3 Purifikasi Protein

Proses purifikasi protein memiliki banyak metode, perbedaan ini berdasarkan jenis protein yang akan diisolasi serta tingkat kemurnian protein yang diinginkan (Scopes, 1993). Purifikasi protein selalu diawali dengan tahapan pemisahan protein dari sel (isolasi protein) hingga dihasilkan ekstrak protein kasar (Koolman, 2005). Setelah mendapatkan ekstrak protein yang

belum murni dari zat-zat pengotor lain, dilakukan proses pemurnian menggunakan beberapa metode. Isolasi protein dapat dilakukan menggunakan cara sentrifugasi dengan kecepatan tinggi (5000-10000 rpm) atau menggunakan garam, salah satu contohnya adalah ammonium sulfat (Scopes, 1993). Metode lain yang juga umum digunakan adalah filtrasi gel dan metode kromatografi penukar ion (Jumiarti, 2012). Salah satu metode yang umum dalam purifikasi protein disebut kromatografi kolom, memisahkan protein dalam suatu campuran dengan pemisahan yang berulang antara larutan encer yang *mobile* dan matriks solid yang *immobile* (Tropp, 2008).



“Halaman ini Sengaja Dikosongkan”



BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama 2 bulan (April – Juni 2015) di Laboratorium Terapeutik Protein dan Vaksin, Pusat Penelitian LIPI Bioteknologi Cibinong.

3.2 Metode yang Digunakan

3.2.1 Screening *P. pastoris* rekombinan (HSA- hIFN α 2a).

Proses seleksi atau *screening* dilakukan untuk mengkonfirmasi keberadaan multikopi plasmid rekombinan pPICZ α B yang sebelumnya telah di transformasikan ke dalam yeast *P. pastoris* strain SMD dan GS115. Proses seleksi yeast *P. pastoris* rekombinan dilakukan pada 9 koloni strain SMD dan 44 koloni strain GS115 menggunakan medium YPDS (*Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol*) yang mengandung antibiotik zeocin pada *range* konsentrasi 500, 1000 hingga 2000 $\mu\text{g/mL}$. Kultur *P. pastoris* diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30°C.

Screening dilanjutkan dengan proses overproduksi skala kecil. Koloni *P. Pastoris* dikultivasi dalam 3 ml medium BMGY (*Buffered Glycerol complex Medium*), kemudian diinkubasi dalam inkubator *shaker* selama 24 jam pada suhu 29°C dengan kecepatan *shaker* 250 rpm. Kultur yang berumur 24 jam diambil sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam tabung *sentrifuge*, setelah itu di *sentrifuge* dengan kecepatan 6000 g selama 5 menit. Pelet hasil *sentifuge* kemudian diresuspensi dengan 2 ml medium BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*) dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kultur kemudian diinkubasi pada *inkubator shaker* selama 24 jam dengan suhu 29°C dan kecepatan *shaker* 250 rpm. Setelah kultur berumur 24 jam, kemudian diinduksi dengan menggunakan 0,5% methanol absolut dan diinkubasi kembali selama 24 dengan suhu dan kecepatan *shaker* yang sama.

Hasil dari overproduksi skala kecil dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 g selama 5 menit untuk memisahkan sel dan supernatan yang mengandung protein HSA-hIFN α 2a. Supernatan selanjutnya dianalisis menggunakan *dot blot* untuk melihat koloni mana yang menghasilkan protein dalam supernatan hasil overproduksi. Antibodi yang digunakan dalam proses ini adalah *mouse anti human interferon α* dan *mouse anti human serum albumin* sedangkan untuk antibodi sekunder yang digunakan adalah *anti mouse AP conjugate*.

3.2.2 Overproduksi Protein HSA-hIFN α 2a.

3.2.2.1 Overproduksi Skala kecil Protein HSA-hIFN α 2a.

Koloni SMD dan GS115 yang berhasil lulus *screening* dioverproduksi skala kecil dalam 3 ml medium BMGY pada tabung reaksi. Kultur diinkubasi dalam inkubator *shaker* selama 24 jam pada 29°C dengan kecepatan kocokan 250 rpm (Ningrum *et al.*, 2013). Kultur yeast kemudian dipisahkan antara sel dan supernatannya menggunakan sentrifugasi (6000 g selama 5 menit). Hasil proses sentrifugasi akan menyebabkan dua fase yaitu pelet dan supernatan. Supernatan tidak akan digunakan sehingga dibuang sedangkan pelet diambil dan diresuspendi menggunakan 2 ml medium. Kultur diinkubasi dalam inkubator *shaker* dalam kondisi suhu 29°C dengan kecepatan kocokan 250 rpm. Pada jam ke 24 dilakukan *sampling* 500 μ l untuk dianalisis menggunakan SDS-PAGE dan *western blot*. Kultur kemudian diinduksi dengan 0,5% Methanol absolut dan diinkubasi kembali selama 24 jam dalam suhu 29°C dengan kecepatan kocokan 250 rpm. Panen hasil overproduksi skala kecil dilakukan ketika kultur telah berumur 24 jam dari induksi methanol terakhir, proses panen dilakukan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 g selama 5 menit. Hasil panen kemudian dianalisis menggunakan SDS-PAGE dan *western blot*. Antibodi primer yang digunakan pada proses *western blot* adalah *mouse anti*

human serum albumin sedangkan antibodi sekunder yang digunakan adalah anti *mouse AP conjugate*.

3.2.2.2 Overproduksi skala besar Protein HSA-hIFN α 2a.

Kedua strain *P. pastoris* dikultivasi dalam 100 ml medium BMGY dalam labu erlenmeyer 1 L. Kultur diinkubasi dalam inkubator *shaker* selama 24 jam pada 29°C dengan kecepatan kocokan 250 rpm (Ningrum *et al.*, 2013). Kultur yeast kemudian dipisahkan antara sel dan supernatannya menggunakan sentrifugasi (6000 g selama 5 menit). Hasil proses sentrifugasi akan menyebabkan dua fase yaitu pelet dan supernatan. Supernatan tidak akan digunakan sehingga dibuang sedangkan pelet diambil dan diresuspensi menggunakan 100 ml medium BMMY dalam labu erlenmeyer 1 L. Kultur *P. pichia* dalam BMMY ditambahkan 0,1 M PMSF (*protease inhibitor phenylmethtylsulfonil fluoride*). Kultur diinkubasi dalam inkubator *shaker* dalam kondisi suhu 29°C dengan kecepatan kocokan 250 rpm. OD (*Optical Density*) = 1, mengandung 0,5% methanol (Ningrum *et al.*, 2013; Santoso *et al.*, 2013). Pada jam ke 24 sebelum kultur diinduksi, dilakukan sampling 500 μ l untuk dianalisis menggunakan *western blot*. Kultur kemudian diinduksi menggunakan 0,5% metanol absolut pada 24 jam berikutnya (Santoso *et al.*, 2014).

3.2.3 Ekstraksi Protein HSA- hIFN α 2a.

Proses overproduksi dilanjutkan dengan pemisahan antara sel dan media menggunakan sentrifugasi (7000 g selama 5 menit). Supernatan dari hasil overproduksi skala besar kemudian diambil sebanyak 500 μ l untuk dianalisis menggunakan *western blot*. Sisa dari supernatan kemudian difiltrasi menggunakan *syring filter* 0,45 μ m dan diultrafiltrasi menggunakan Minimate™ TFF Capsule 30K dari 100 ml menjadi 10 ml. Hasil ultrafiltrasi akan mengandung protein yang berukuran lebih besar dari 30 kDa. Hasil overproduksi dan hasil ultrafiltrasi kemudian di analisis dengan *western blot*.

3.2.4 Purifikasi Protein HSA-hIFN α 2a.

Purifikasi protein dimulai dengan mencampurkan *buffer* PBS 1x dengan supernatan hasil ultrafiltrasi dengan perbandingan 4:1. Supernatan kemudian diultrafiltrasi menggunakan Minimate™ TFF Capsule 30K hingga menjadi 10 ml, selanjutnya supernatan siap dipurifikasi.

Purifikasi dilakukan menggunakan kromatografi afinitas dengan menggunakan resin Blue Sepharose™ 6 Fast Flow yang sebelumnya telah diekuilibrasi dengan menggunakan 2 ml *buffer* PBS 1x. Elusi protein dilakukan menggunakan 2 ml PBS 1x 1,5 M NaCl. Protein selanjutnya dimurnikan kembali dengan kromatografi filtrasi gel menggunakan resin Sephadex-G25 yang diekuilibrasi dengan menggunakan 6 ml PBS 1x. Sampel dimasukkan dan segera ditampung dengan membaginya menjadi 6 fraksi masing-masing fraksi 500 μ l.

3.2.5 Karakterisasi Protein HSA- hIFN α 2a.

Karakterisasi bobot molekul protein dilakukan menggunakan metode SDS-PAGE. Karakter identitas protein diketahui menggunakan metode *Western Blot*, sedangkan untuk mengetahui jumlah protein yang dihasilkan diukur menggunakan metode *BCA (Bicinchoninic acid) Protein Assay*.

3.3.5.1 Karakterisasi Bobot Protein menggunakan SDS-PAGE.

Metode karakterisasi menggunakan metode SDS PAGE dimulai dengan membentuk *stacking* gel dan *separating* gel dengan konsentrasi *stacking* gel 5% dan *separating* gel 10%. Sampel protein diambil 20 μ l dan ditambahkan 5 μ l *Loading dye*. Marker yang digunakan adalah Spektra Br Protein Ladder sebanyak 5 μ l. Sebanyak 20 μ l sample yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam *well*, dengan posisi marker berada paling kanan.

Protein dimigrasikan dalam sistem SDS-PAGE, selama 80 menit. Gel SDS-PAGE kemudian diwarnai menggunakan larutan staining *commasie blue* selama *overnight* dan diletakkan pada *rotary shaker* dengan kecepatan pelan. Residu *commasie blue* pada gel kemudian dieliminasi menggunakan larutan *destaining* selama 30 menit. Gel SDS-PAGE diamati dan dilakukan dokumentasi.

3.3.5.2 Karakterisasi Identitas Protein menggunakan Western Blot

Tris-glycine transfer buffer dalam kondisi suhu rendah (dingin) diisikan ke dalam *tank transfer*, 200 ml *transfer buffer* digunakan untuk menyeimbangkan gel, membran, dan kertas filter. Gel hasil proses SDS-PAGE diambil dengan cara memotong salah satu sisi gel menggunakan pemotong yang bersih dan tajam. Membran *nitrocellulose* Hybond ECL yang digunakan kemudian dipotong sesuai ukuran dari gel dan dibasahi menggunakan *transfer buffer*

Kertas filter dan potongan busa kemudian direndam dalam *transfer buffer*. Kaset elektrotransfer kemudian diletakkan dalam rak yang terisi *transfer buffer* dingin sedalam 3 cm dengan posisi anoda (+) dihadapkan ke bawah. Posisi dalam kaset berurutan dimulai dengan sisi anoda (+), spon busa, kertas filter, membran yang telah disiapkan, gel elektroforesis, kertas filter, dan terakhir spon busa lain.

Gelembung air dipastikan tidak ada sama sekali di antara kertas filter, gel, dan membran. Kaset ditutup dan sisi anoda (+) diletakkan pada orientasi yang sama dengan sisi anoda (+) pertama yang ada dalam *tank elektrotransfer*, *tank* kemudian dipenuhi dengan *transfer buffer* yang dijaga untuk tetap dingin. Suhu rendah biasanya dijaga dengan menambahkan es disekitar *tank transfer*.

Ujung positif dari kabel di tutup *tank elektrotransfer* dipastikan untuk disambungkan dengan soket positif dari *power supply*. *Transfer* kemudian di *running*, selama 90 Menit. Setelah

proses *running selesai* kemudian membran dimasukkan kedalam larutan blocking selama 1 jam.

Antibodi yang digunakan adalah antibodi primer *mouse anti human interferon alfa* (Calbiochem) *mouse anti human serum albumin* (Sigma) dan antibodi sekunder anti *mouse AP conjugate* (Promega). Proses pemberian antibodi dilakukan setelah membran direndam dalam larutan *blocking* selama 1 jam kemudian di cuci menggunakan TBS-T 1x selama 15 menit, 5 menit dan 5 menit. Membran hasil transfer direndam dalam campuran susu dan antibodi primer selama 1 jam dalam wadah tertutup, proses perendaman ini dilakukan dalam suhu ruang dengan keadaan digoyang dalam kecepatan rendah. Pencucian dengan TBS-T 1x dilakukan setelah proses perendaman antibodi primer selesai. Membran yang telah di cuci direndam kembali dalam campuran antibodi sekunder dan susu. Proses perendaman berada dalam lama dan kondisi yang sama dengan proses perendaman yang pertama.

Langkah terakhir dari proses *western blot* adalah perendaman membran dalam larutan NBT/BCIP (*5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate / nitro-blue tetrazolium*) selama beberapa detik hingga terlihat perubahan warna pada membran. Membran yang telah terwarnai diamati dan didokumentasikan.

3.3.5.2 Karakterisasi Jumlah Protein menggunakan BCA Protein Assay.

Karakterisasi jumlah protein dilakukan menggunakan *BCA protein assay kit* (Pierce). Proses karakterisasi dimulai dengan membuat kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) sesuai dengan petunjuk pada kit.

Penentuan jumlah protein pada sampel dilakukan dengan cara mencampurkan 25 μl sampel dengan 200 μl *working reagent*. *Working reagent* terdiri dari 50 bagian reagen A dan 1 bagian reagen B. Campuran dari sampel dan *working reagent* akan diinkubasi selama 30 menit dalam suhu 37°C, setelah itu campuran didinginkan. Campuran yang telah dimasukkan dalam

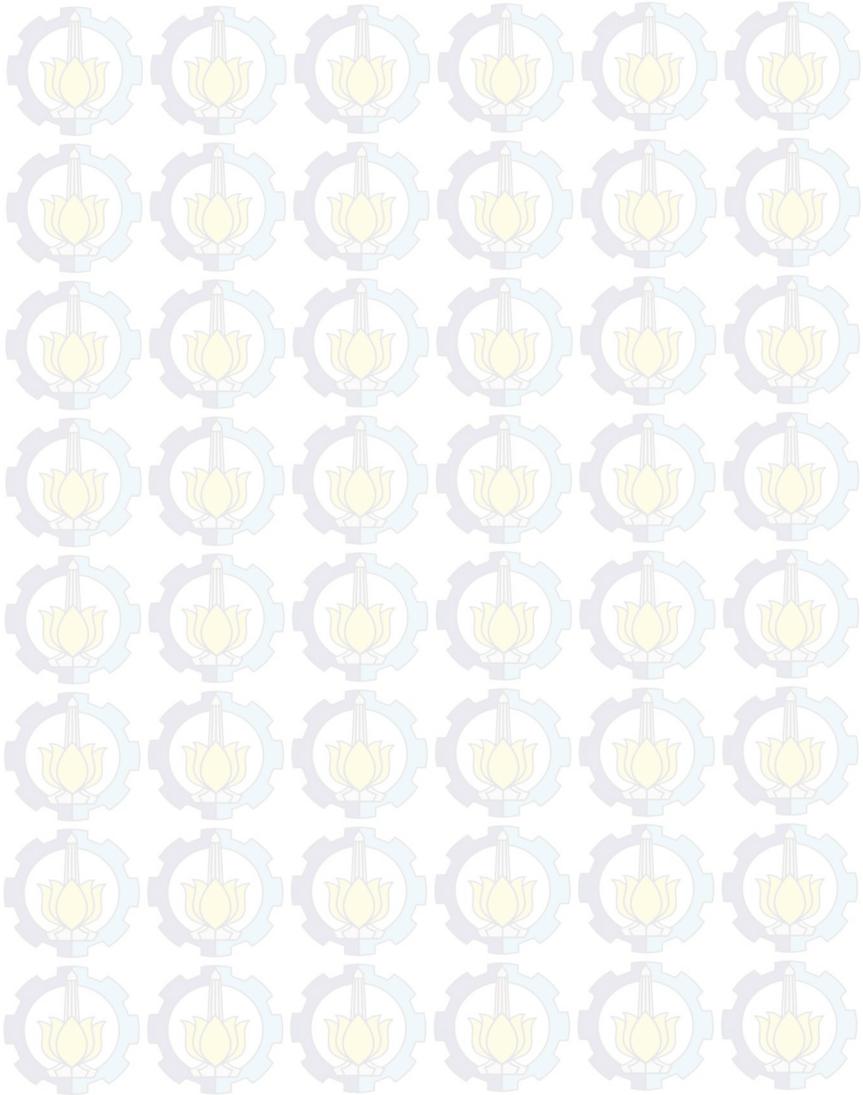
microplate kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer. Pembacaan nilai absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 570 nm. Nilai absorbansi kurva standar dimasukkan kedalam kurva dengan nilai regresi yang harus mendekati 0,999.

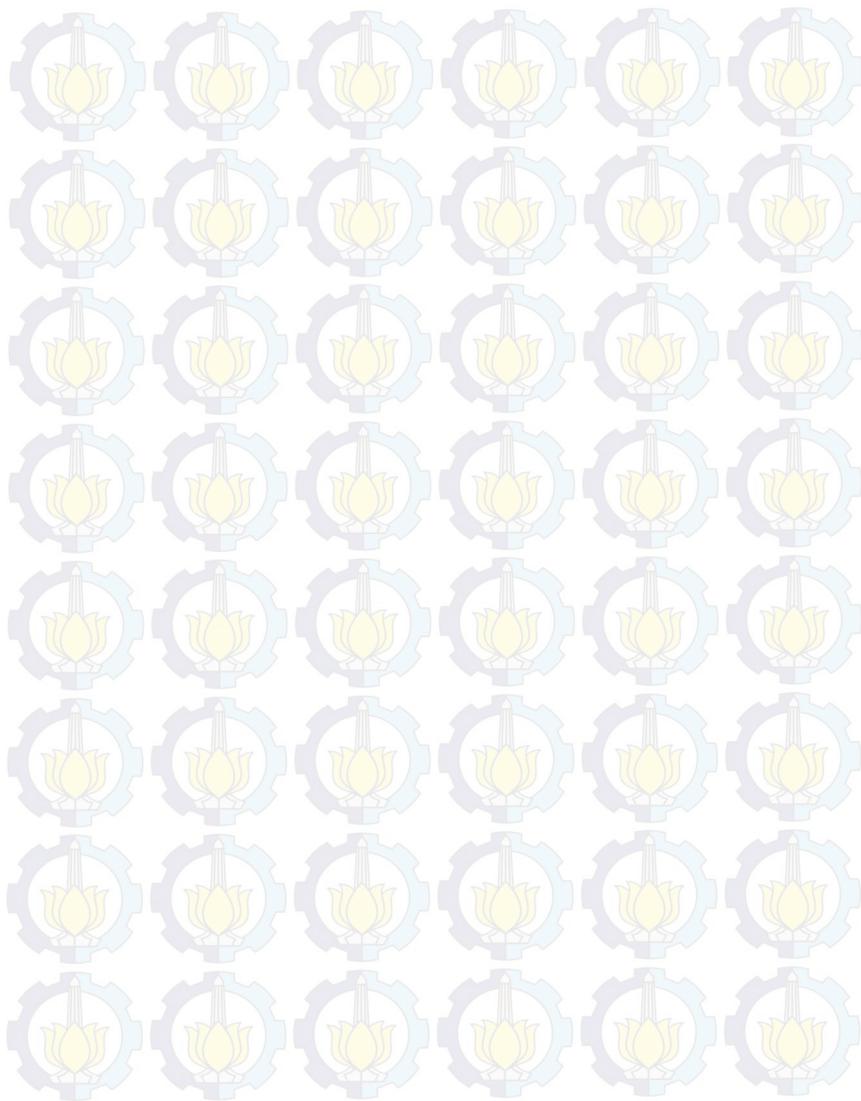
Hasil dari pembacaan nilai absorbansi sampel akan dimasukkan kedalam persamaan yang telah didapatkan dengan hasil kurva standar BSA yang telah diketahui sebelumnya.

3.2.6 Analisis Data

Hasil penelitian dianalisis secara deskriptif kualitatif. Analisis data yang didapatkan berupa karakteristik bobot molekul hasil dari karakterisasi SDS-PAGE, karakterisasi identitas protein hasil dari metode *western blot*, dan karakterisasi jumlah protein yang dihasilkan menggunakan *BCA protein assay*.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”





BAB IV HASIL PENELITIAN dan PEMBAHASAN

4.1 Screening *P. pastoris* rekombinan (HSA- hIFN α 2a).

Pada penelitian ini digunakan dua jenis strain *P. pastoris*, yaitu strain SMD dan strain GS115. Kedua strain tersebut memiliki karakteristik dapat memetabolisme methanol karena memiliki gen *AOX1*, akan tetapi dalam beberapa jurnal disebutkan bahwa strain SMD dikenal sebagai strain yang memiliki defisiensi protease sehingga dapat mengurangi tingkat degradasi protein rekombinan yang dihasilkan oleh yeast (Zhang *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2004). Proses *screening* dilakukan pada 9 koloni yeast *P. pastoris* strain SMD dan 44 koloni yeast *P. pastoris* strain GS115 yang telah menjadi koleksi laboratorium terapeutik protein dan vaksin, LIPI Bioteknologi, Cibinong. Koloni tersebut merupakan hasil tahapan transformasi plasmid rekombinan pPICZ α B-IFN α 2a-HSA ke dalam yeast *P. pastoris*. Proses *screening* dilakukan untuk mendapatkan koloni rekombinan *multi-copy*, koloni tersebut akan memiliki tingkat produksi protein *heterologous* yang tinggi (Menéndez *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2014). Salah satu cara untuk melakukan *screening* rekombinan *multi-copy* adalah dengan menggunakan konsentrasi antibiotik zeocin bertingkat (500, 1000, dan 2000 μ g/mL). Antibiotik zeocin digunakan sebagai penyeleksi koloni yeast rekombinan *P. pastoris* yang memiliki plasmid pPICZ α B, karena plasmid ini mengandung gen resisten terhadap antibiotik zeocin (Ningrum *et al.*, 2013).

Pada konsentrasi antibiotik zeocin 500 μ g/mL, 9 koloni SMD dan 44 koloni GS115 berhasil tumbuh (Tabel 4.1). Semua koloni tersebut kemudian dipindahkan kedalam medium YPDS dengan konsentrasi antibiotik 1000 μ g/mL. Pada konsentrasi ini semua koloni juga berhasil tumbuh. Selanjutnya koloni tersebut disubkulturkan pada medium YPDS baru dengan konsentrasi 2000 μ g/mL. Hasil *screening* terakhir pada konsentrasi tersebut

menunjukkan bahwa 9 koloni SMD berhasil hidup (100%), akan tetapi pada strain GS115 hanya 2 koloni dari 44 koloni yang berhasil tumbuh (4,5%). Koloni yang berhasil tumbuh pada konsentrasi 2000 $\mu\text{g/mL}$ mengindikasikan bahwa koloni tersebut memiliki *multi-copy* plasmid yang mengekspresikan gen resisten antibiotik zeocin.

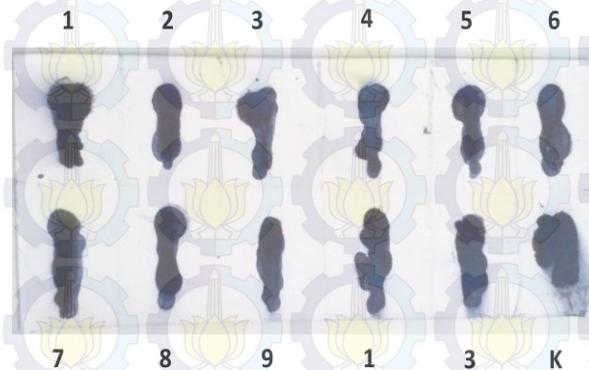
Tabel 4.1. Tingkat Survival Koloni Yeast Rekombinan *P. pastoris*.

Konsentrasi antibiotik ($\mu\text{g/mL}$)	Strain SMD (%)	Strain GS115 (%)
500	100	100
1000	100	100
2000	100	4,5

Semua koloni *P. pastoris* tersebut selanjutnya disubkulturkan kedalam 3 ml medium BMGY selama 24 jam. Medium BMGY merupakan medium yang digunakan khusus untuk meningkatkan biomassa sel yeast hal ini dikarenakan medium ini mengandung 1% gliserol yang dapat digunakan sebagai sumber karbon (Mengwasser *et al.*, 2011). Setelah kultur berumur 24 jam (telah terjadi peningkatan biomassa sel yeast), proses overekspresi protein dilanjutkan dengan mensubkulturkan yeast tersebut dalam 3 ml medium BMMY. Medium BMMY memiliki kandungan 0,5% methanol absolut yang digunakan untuk menginduksi *P. pastoris* dalam meningkatkan produksi protein *heterologous* yang diinginkan (Mengwasser *et al.*, 2011). Methanol digunakan sebagai *inducer* karena dapat meregulasi aktivitas gen *AOX1* (Herawati *et al.*, 2014). Gen *AOX1* adalah gen dalam *P. pastoris* yang berguna untuk menghasilkan alkohol oksidase dalam proses oksidasi methanol, untuk menghasilkan energi dan sumber karbon bagi yeast (Vanz *et al.*, 2012; Herawati *et al.*, 2014). Kultur kemudian diinduksi pada jam ke 24 dengan menggunakan 0,5% methanol absolut, setelah itu kultur

diinkubasi kembali selama 24 jam (Santoso *et al.*, 2012). Setelah kultur berumur 48 jam, dilakukan ekstraksi protein dengan menggunakan sentrifugasi berkecepatan 6000 g selama 5 menit pada suhu 4°C. Hal ini dilakukan untuk mengekstrak protein ekstraseluler dari yeast *P. pastoris* rekombinan. Keberadaan protein rekombinan selanjutnya diidentifikasi menggunakan metode *dot blot*.

Hasil *dot blot* (Gambar 4.1) menunjukkan bahwa semua supernatan yang didapatkan dari proses overekspresi koloni SMD dan GS115 mengandung protein target yaitu protein fusi HSA-IFN α 2a. Hal itu ditunjukkan dengan adanya *blot* sebagai gambaran adanya interaksi antara protein fusi HSA-IFN α 2a dengan antibodi IFN α yang diberikan.



Gambar 4.1. Hasil Dot Blot Overekspresi Koloni Yeast.

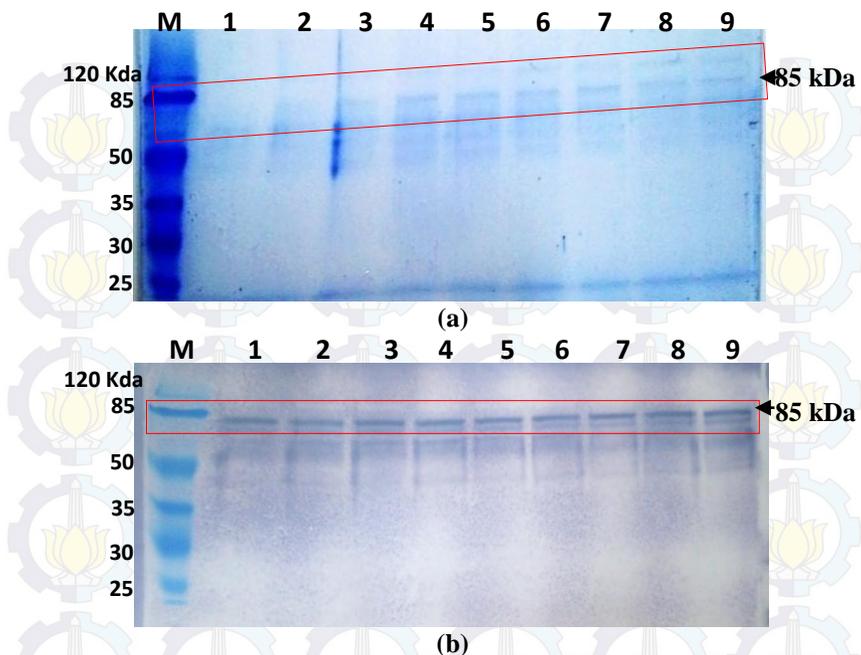
Keterangan : (1-9: strain SMD; 1 dan 3: strain GS115; K: kontrol berupa IFN α 2a).

4.2 Overproduksi dan Identifikasi Protein HSA- hIFN α 2a

Proses overproduksi skala kecil protein rekombinan HSA-hIFN α 2a dilakukan kembali dengan mengkulturkan kedua strain *P. pastoris* hasil *screening* kedalam 3 ml medium BMMY. Proses identifikasi protein HSA-IFN α 2a dilakukan dengan cara

mengambil *sampling* yeast yang berumur 24 jam setelah kultur (JSK) dan 48 JSK (setelah melalui proses induksi dengan 0,5% methanol absolut pada 24 JSK). Sampel yeast yang telah didapatkan kemudian diekstrak protein ekstraselulernya dengan melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 g selama 5 menit pada suhu 4°C. Hasil ekstraksi selanjutnya dianalisis menggunakan SDS-PAGE dan *Western Blot*. Proses ini dilakukan untuk membandingkan ekspresi protein yang dihasilkan pada saat yeast berumur 24 JSK dan setelah kultur mendapatkan induksi methanol absolut (48 JSK).

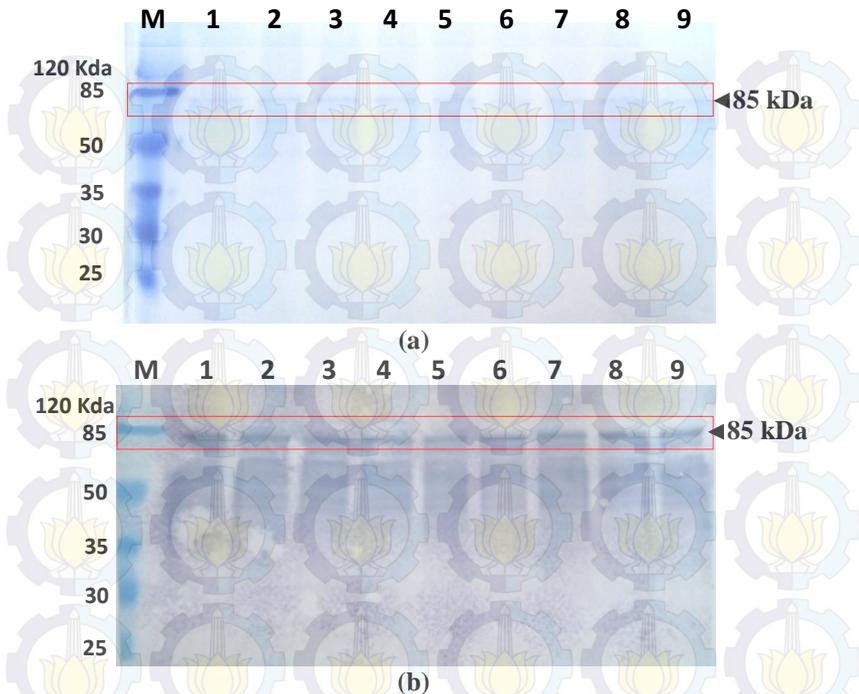
Hasil SDS-PAGE dan *Western blot* dari 9 koloni SMD menunjukkan bahwa protein fusi HSA-IFN α 2a sudah diekspresikan oleh yeast rekombinan pada 24 JSK. Meskipun demikian konsentrasi protein target yang diperoleh cukup rendah. Protein fusi HSA-IFN α 2a tersebut memiliki ukuran sebesar 85 kDa (Gambar 4.2a dan 4.2b). Hasil analisis *Western blot* yang menggunakan antibodi HSA, menunjukkan bahwa *band* protein yang terlihat pada hasil SDS-PAGE merupakan protein HSA-IFN α 2a.



Gambar 4.2. Hasil SDS-PAGE (a) dan *Western Blot* (b) Koloni Strain SMD Berumur 24 Jam.

Keterangan: (M: Marker; 1-9: Koloni SMD).

Pada hasil ekstrak protein ekstraseluler yang diperoleh dari kultur yeast rekombinan berumur 48 JSK (telah diinduksi dengan 0,5% methanol absolut) terlihat bahwa protein target juga berhasil diekspresikan dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan protein target yang diperoleh dari yeast rekombinan berumur 24 JSK (Gambar 4.3a dan 4.3b). Hasil tersebut menunjukkan bahwa proses induksi dengan 0,5% methanol absolut merupakan proses yang penting dalam overekspresi protein HSA-IFN α 2a pada koloni SMD.

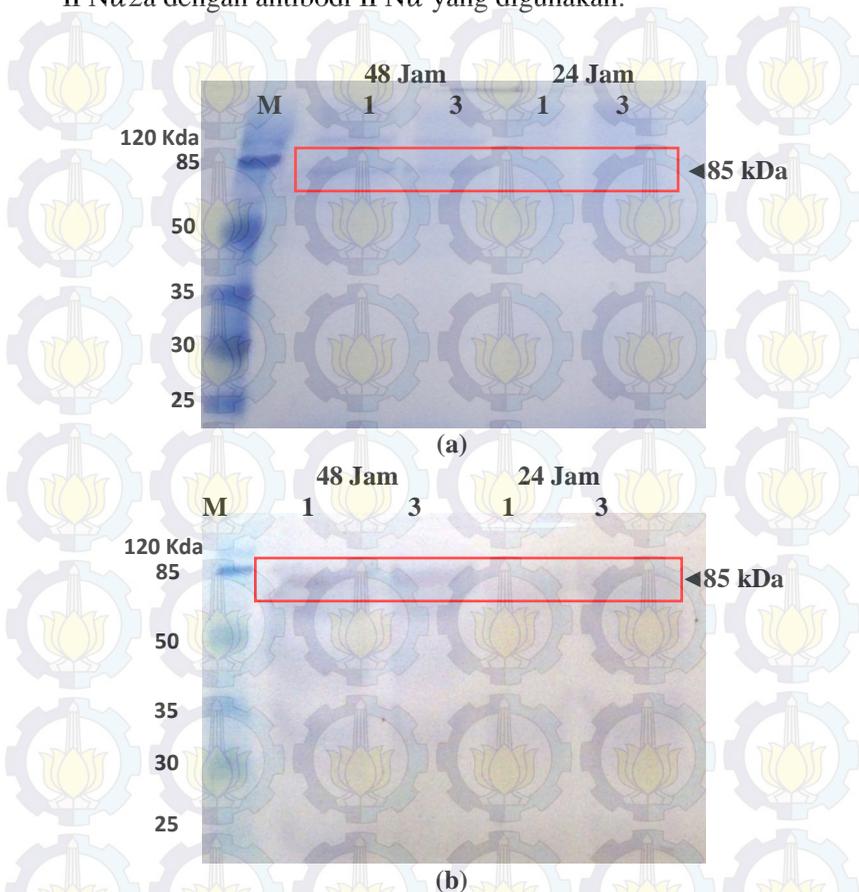


Gambar 4.3. Hasil SDS-PAGE (a) dan *Western Blot* (b) Koloni SMD berumur 48 jam.

Keterangan: (M: Marker, 1-9: Koloni SMD).

Hasil analisis SDS-PAGE dan *Western Blot* dari strain GS115 yang berumur 24 JSK tidak menunjukkan adanya *band* protein target (Gambar 4.4a dan 4.4b). Hal tersebut menunjukkan bahwa inkubasi selama 24 jam masih belum cukup bagi strain GS115 untuk memproduksi protein HSA-IFN α 2a. Pada jam ke 48 hasil SDS-PAGE menunjukkan adanya *band* protein target telah terbentuk dan memiliki bobot molekul 85 kDa. Identitas protein tersebut dikonfirmasi sebagai protein target HSA-IFN α 2a dengan menggunakan metode *Western Blot*. *Band* protein tersebut

terbentuk sebagai akibat adanya interaksi antara protein HSA-IFN α 2a dengan antibodi IFN α yang digunakan.



Gambar 4.4. Hasil SDS-PAGE dan *Western Blot* Koloni GS115 dengan Antibodi IFN α .

Keterangan: (M: Marker; 1,3: Koloni GS115).

Hasil dari analisis SDS-PAGE dan *Western Blot*, kedua strain memiliki kemampuan untuk mengekspresikan protein

target yang memiliki bobot molekul sekitar 85 kDa. Akan tetapi strain GS115 membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama (48 JSK dengan proses induksi 0,5% methanol absolut pada 24 JSK)(Herawati *et al.*, 2014; Santoso *et al.*, 2012). Strain SMD memiliki kemampuan yang lebih baik dalam mengekspresikan protein *heterologous* HSA-IFN α 2a dibandingkan dengan strain GS115. Hal ini ditunjukkan dengan kemampuan produksi protein target oleh strain SMD pada 24 JSK, meskipun dalam konsentrasi yang sedikit.

Hasil analisis *western blot* juga menunjukkan terbentuknya *band* lain dengan bobot molekul yang lebih kecil. Hal tersebut diperkirakan merupakan fragmen hasil degradasi dari protein target yang meningkat seiring dengan bertambahnya lama inkubasi. Hal tersebut mengindikasikan adanya aktivitas protease yang cukup tinggi dalam supernatan. Hal ini sejalan dengan Zhang *et al.* (2007) yang mengungkapkan bahwa degradasi proteolitik merupakan hal yang rentan terjadi pada sistem ekspresi protein *heterologous* pada yeast *P. pastoris*. Selain itu Millan *et al.* (2003) juga mengungkapkan bahwa protein HSA sangat rentan mengalami degradasi proteolitik dalam sistem rekombinan. Berdasarkan hasil tersebut, penambahan *inhibitor protease* pada proses overproduksi protein target sangat penting.

Analisa efektifitas penambahan inhibitor protease dalam proses overproduksi protein target dilakukan dengan cara menambahkan PMSF pada kultur skala besar dan skala kecil. PMSF ditambahkan sejak pemindahan sel *P. pastoris* ke dalam medium BMMY. Protein ekstraseluler diekstrak pada yeast yang berumur 24 JSK dan 48 JSK (setelah induksi 0,5% methanol absolut) dengan melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 g selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh dari yeast yang berumur 48 JSK dalam kultur skala besar dipisahkan menggunakan Minimate™ TFF Capsule 30K. Hal ini dimaksudkan untuk mengeliminasi protein yang berukuran kurang dari 30 kDa. Setelah supernatan dipanen kemudian

dilakukan migrasi protein dengan menggunakan SDS-PAGE (data tidak ditunjukkan) dan *western blot* untuk mengetahui hasil band protein target dan tingkat degradasinya.

Hasil *Western Blot* menunjukkan intensitas band protein pada kultur yeast skala besar (100 ml) dan skala kecil (3 ml) baik pada yeast yang berumur 24 dan ke 48 JSK tidak menunjukkan adanya perbedaan (Gambar 4.5a dan 4.5b).



Gambar 4.5 Hasil Analisis *Western Blot* Strain GS115 dan SMD Pada Jam ke 24 (a) dan 48 (b) Menggunakan Antibodi HSA.

Keterangan: (SK: skala kecil; SB: skala Besar, TFF: hasil pemekatan menggunakan Minimate™ TFF Capsule 30K).

Hasil dari *Western Blot* menunjukkan bahwa masih terjadi degradasi protein target walaupun kultur tersebut telah diberi penambahan *inhibitor protease* (PMSF). Hal ini menunjukkan bahwa PMSF tidak dapat mengatasi secara penuh aktivitas proteolitik yang terjadi dalam medium kultur. *P. pastoris* diketahui menghasilkan protease vaskuler berupa protease A dan protease B yang menjadi penyebab utama terjadinya degradasi protein (Santoso *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2007). PMSF sendiri diketahui menjadi inhibitor bagi jenis protease B, akan tetapi protease jenis lain dapat terbentuk dari medium kultur sehingga meningkatkan tingkat degradasi protein (Sinha *et al.*, 2004).

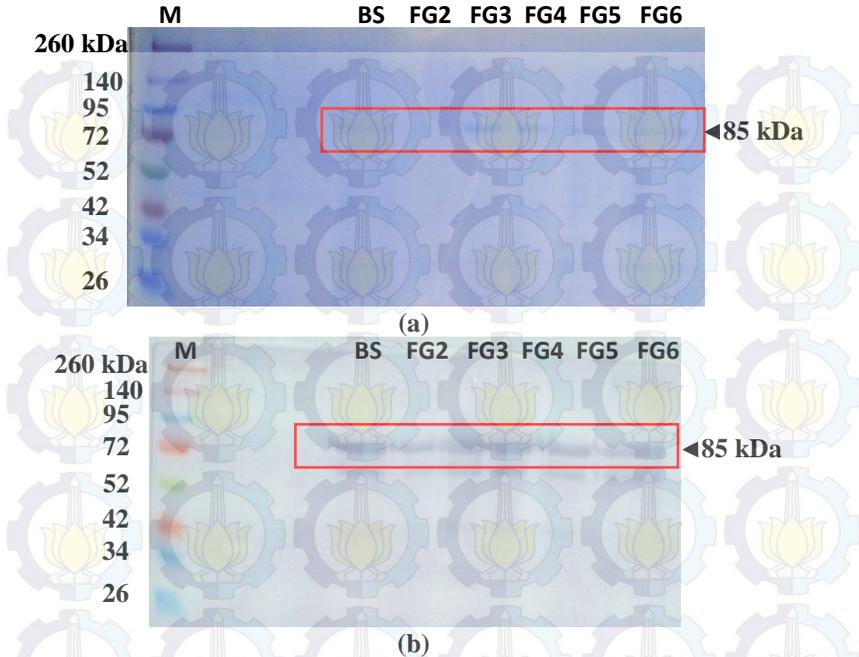
Produksi protein HSA-IFN α 2a yang dihasilkan oleh strain SMD dan GS115 tidak menunjukkan adanya perbedaan, akan tetapi strain SMD dipilih karena memiliki tingkat pertumbuhan sel yang lebih cepat ketimbang strain GS115 saat penelitian ini dilakukan. SMD juga dikenal sebagai strain yang memiliki defisiensi protease sehingga dapat mengurangi tingkat degradasi protein rekombinan (Zhang *et al.*, 2000).

4.3 Purifikasi dan Kuantifikasi Protein HSA- hIFN α 2a

Purifikasi protein dilakukan untuk mendapatkan hasil akhir berupa protein HSA-IFN α 2a yang memiliki tingkat kemurnian tinggi. Standar kemurnian protein IFN α 2a yang ditetapkan oleh British Pharmacope maupun EMEA adalah diatas 95%, hal inilah yang menyebabkan proses purifikasi memegang peranan penting dalam produksi protein HSA-IFN α 2a rekombinan. Proses purifikasi dilakukan hanya pada strain SMD dengan umur 48 JSK dalam dua tahap yaitu menggunakan kromatografi afinitas (Blue Sepharose) dan Filtrasi gel. Sebelum proses purifikasi, supernatan terlebih dahulu dipisahkan menggunakan TFF dengan ukuran 30K, dimana semua protein kontaminan yang berukuran dibawah 30K akan dibuang dan akan menyisakan protein yang berukuran diatas 30K. Pada supernatan hasil overproduksi kemudian ditambahkan *buffer* untuk kalibrasi

keadaan sampel dengan keadaan kolom purifikasi. Hal ini penting dilakukan untuk memfasilitasi ikatan protein target dengan resin Blue Sepharose pada kromatografi afinitas. 2 ml hasil purifikasi sebelumnya, kemudian dimurnikan kembali menggunakan filtrasi gel dengan mengambil 6 fraksi masing-masing 500 μ l. Seluruh hasil purifikasi kemudian dipekatkan kembali dengan menggunakan *Amicon ultra centrifugal filters* dengan ukuran *cut off* 10K, sehingga protein akan menjadi lebih pekat (dari 500 μ l menjadi 60 μ l).

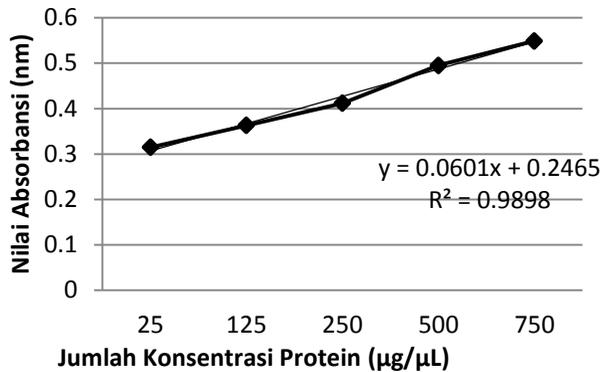
Protein yang telah dipekatkan kemudian dianalisis menggunakan SDS-PAGE dan *western blot*. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa protein hasil purifikasi menggunakan filtrasi gel memiliki intensitas band yang lebih tebal dibandingkan purifikasi menggunakan Blue Sepharose (Gambar 4.6a dan 4.6b). Pada eluat filtrasi Gel memiliki band dengan paling tebal dan semua eluat proses purifikasi yang lain juga menunjukkan adanya band protein target yang dihasilkan. Pada hasil analisis *western blot*, terlihat bahwa semua hasil purifikasi memiliki identitas sebagai protein HSA-IFN α 2a, akan tetapi masih terlihat adanya degradasi protein target. Oleh karena itu diperlukan inhibitor protease lain yang lebih universal untuk meminimalisir terjadinya degradasi protein, sebagai contoh *protease inhibitor cocktail*.



Gambar 4.6 Hasil SDS-PAGE (a) dan *Western Blot* (b) dari Hasil Purifikasi Protein dengan Antibodi HSA.

Keterangan: (M:marker; BS: blue sepharose; FG2: filtrasi gel fraksi 2; FG3: filtrasi gel fraksi 3; FG4: filtrasi gel fraksi 4; FG5: filtrasi gel fraksi 5; FG6: filtrasi gel fraksi 6).

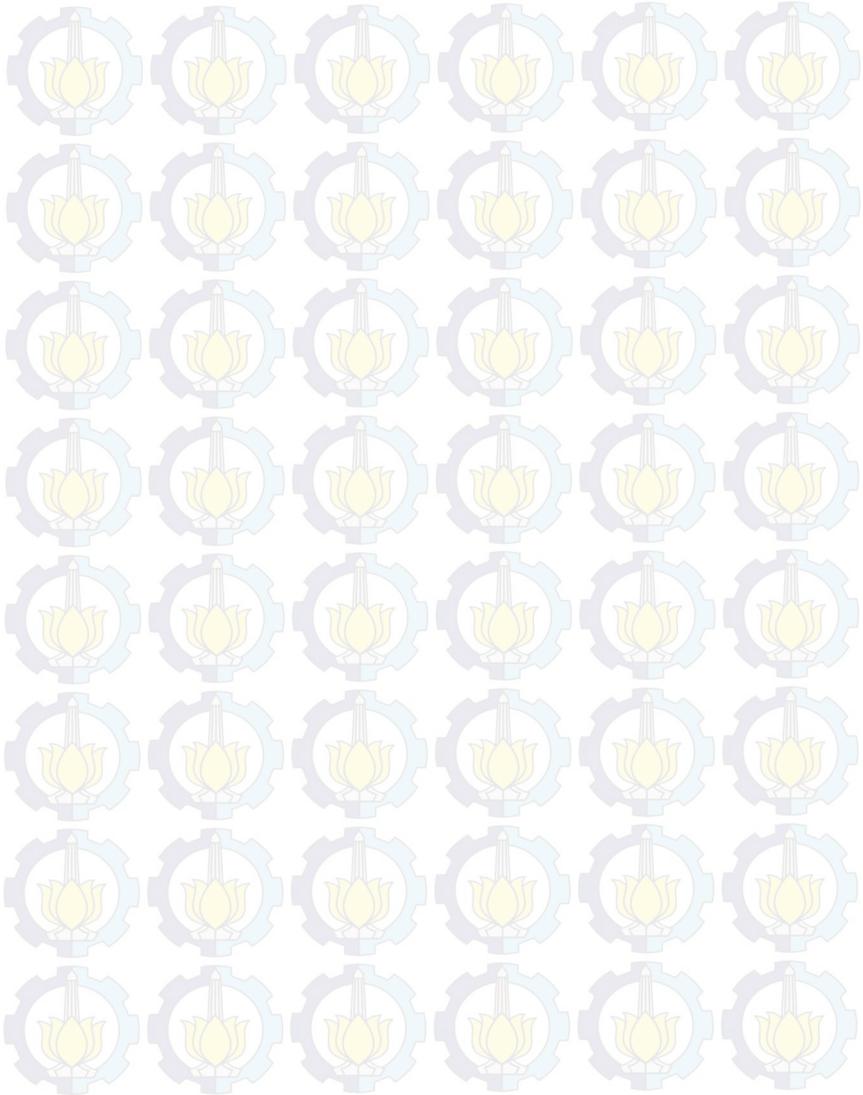
Setelah melalui proses purifikasi, dilakukan penentuan konsentrasi protein menggunakan metode *BCA assay*. Kurva standar yang digunakan menggunakan *range* konsentrasi 25, 125, 250, 500, dan 750 μl . Pengukuran nilai absorbansi kurva standar dilakukan pada panjang gelombang 570 nm. Nilai absorbansi yang didapatkan kemudian digunakan untuk membentuk kurva standar, dengan persamaan $y = 0,060x + 0,246$ (Gambar 4.7). Persamaan tersebut digunakan untuk mendapatkan konsentrasi protein.



Gambar 4.7 Kurva Standar BCA Protein Assay.

Hasil perhitungan jumlah konsentrasi protein menunjukkan bahwa total protein target yang didapatkan dari proses akhir purifikasi adalah $25,1\mu\text{g}/\text{L}$. Hasil *yield* protein yang didapatkan tergolong kecil karena belum melalui proses optimasi produksi protein.

“Halaman sengaja dikosongkan”



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah:

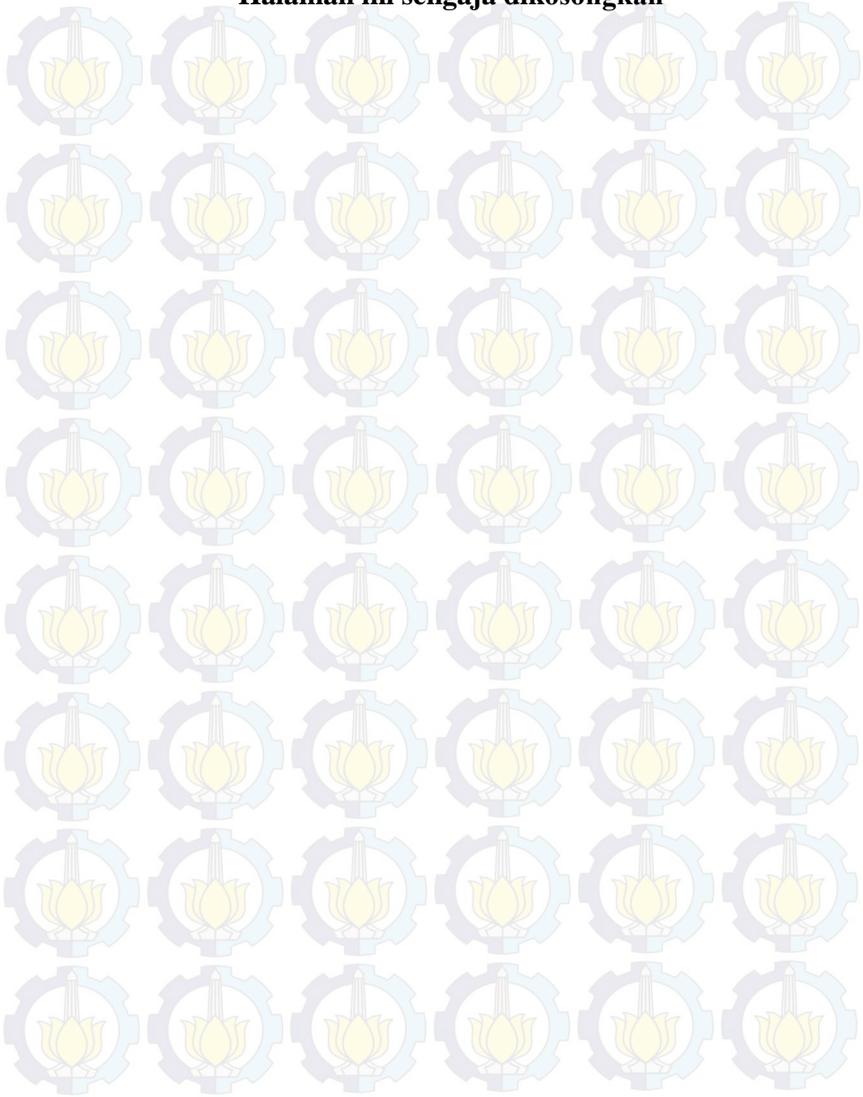
1. Strain SMD memiliki kemampuan yang lebih baik dibandingkan GS115 dalam sistem overproduksi protein HSA-hIFN α 2a. Hasil SDS-PAGE dan *Western Blot* menunjukkan bahwa protein HSA-hIFN α 2a memiliki bobot molekul 85 kDa.
2. Hasil SDS-PAGE dan western blot juga menunjukkan adanya degradasi protein. Penambahan inhibitor protease (PMSF) masih kurang efektif dalam mengurangi degradasi proteolitik protein HSA- hIFN α 2a.
3. Konsentrasi protein HSA-hIFN α 2a hasil overproduksi dalam kultur yeast SMD pada umur 48 jam setelah kultur adalah 25,1 μ g/L.

5.2 Saran

Saran yang diberikan dari hasil penelitian ini adalah:

1. Aktivitas proteolitik yang menyebabkan degradasi dari protein target terbilang cukup tinggi sehingga penggunaan protease inhibitor lain yang bersifat universal (*cocktail*) dapat digunakan sebagai alternatif untuk menekan laju degradasi protein.
2. Proses purifikasi protein dapat menggunakan metode alternatif lain yaitu, Captoblue untuk meningkatkan *yield* protein.
3. Optimasi proses kultur dalam sistem overproduksi juga perlu dilakukan untuk meningkatkan *yield* protein.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”



DAFTAR PUSTAKA

Bach, E. A., Aguet, M. dan Schreiber, R. D. 1997. The IFN Gamma Receptor: a Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. **Annu. Rev. Immunol** 15: 563–591.

Bae, T. K., Chang, H.J., Kim, J.H. dan Park, S.J. 1995. Purification and characterization of recombinant human interferon alpha 2a produced from *Saccharomyces cerevisiae*, **J. Biochem. Mol. Biol.** 28 (6), 477-483.

Bailon, P., Palleroni, A., Schaffer, C. A., Spence, C. L., Fung, W.-J., Porter, J. E., Ehrlich, G. K., Pan, W., Xu, Z.-X., Modi, M. W., Farid, A. and Berthold, W. 2001. Rational Design of a Potent, Long-Acting Form of Interferon: a 40 kDa Branched Polyethylene Glycol-Conjugated Interferon R2a for the Treatment of Hepatitis C. **Bioconjugate Chem** 12: 195-202.

Bazhanova, E.D. 2005. Participation of Interferon-Alpha in Regulation of Apoptosis, **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology** 41: 127-133.

Bekisz, J., Baron, S., Balinsky, C., Morrow, A. dan Zoon, K.C. 2010. Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. **Pharmaceuticals** 3: 994-1015.

Biron, C. A. dan Sen, G. C. 2001. **Interferons and Other Cytokines**. p.321–351.

Bis, R. L., Stauffer, T.M., Singh, S.M., Lavoie, T.B. dan Mallela, K.M.G. 2014. High Yield Soluble Bacterial Expression and Streamlined Purification of Recombinant Human Interferon α -2a. **Protein Expression and Purification** 99: 138-146.

Bollok, M., Resina, D., Valero, F. dan Ferrer, P. 2009. Recent patents on the *Pichia Pastoris* expression system: expanding the toolbox for recombinant protein production. **Recent Patents on Biotechnology** 3: 192-201.

Caliceti, P. dan Veronese, F.M. 2003. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. **Adv Drug Deliv Rev** 55(10): 1261-77.

Ceaglio, N., Etcheverrigaray, M., Kratje, R. dan Oggero, M. 2008. Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. **Biochimie** 90: 437-449.

Chatelut, E., Rostaing, L., Grégoire, N., Payen, J., Pujol, A., Izopet J., Houin G. dan Canal, P. 1999. A pharmacokinetic model for alpha interferon administered subcutaneously. **J. Clin. Pharmacol** 47: 365-371

Choi, H.S., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J.P., Ipe, B., Bawendi, M.G. dan Frangioni, J.V. 2007. Renal clearance of quantum dots. **Nat Biotechnol** 25(10):1165-70.

Colby, C. dan Morgan, M.J. 1971. Interferon induction and action. **Annual Review of Microbiology** vol. 25: 333-360.

Davis, G.L., Albright, J.E., Cook, S.F. dan Rosenberg, D.M. 2003. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. **Liver Transpl** 9: 331-8.

Foser, S., Schacher, A., Weyer, Karl A., Brugger, D., Dietel, E., Marti, S. dan Schreitmuller, T. 2003. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon α -2a (PEGASYS). **Protein Expression and Purification** 30: 78-87.

Gutterman, J.U. 1994. Cytokine therapeutics: lessons from interferon a. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 94: 1198-1205.

Herawati, N., Santoso, A. dan Ningrum, R.A. 2014. The Effect of Non-Nutritional Factors of Culture Condition on Human Interferon Alpha-2b Production in Methilotropic Yeast *Pichia pastoris*. **J. Pharm. Bioanal. Sci** 3(1): 1-5.

Jonasch, E. dan Haluska F.G. 2000. IFN in oncological practice : review of IFN biology clinical applications, and toxicities. **The Oncologist** 6: 34-55.

Koolman, J. dan Roehm, K.H. 2005. **Atlas of Biochemistry**. Ed ke-2. New York : Thieme.

Krainer, W.F., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O. dan Glieder, A. 2012. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. **Microbial Cell Factories** 11: 22.

Kusumawati, A., Santoso, A. dan Radji, M. 2013. Soluble expression of recombinant human interferon alpha 2a fusion protein in *Escherichia coli*. **International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care Issue 3**. Vol 2: 42-49.

Menendez, J., Garcia, B. dan Hidalgo, Y. 2000. New Method for The Selection of Multicopy Transformants of *Pichia pastoris*, Using 3-Amino-1,2,4 Triazol. **BioTechniques** 29: 1094-1099.

Mengwasser, K.E., Bryant, C.E., Gay, N.J. dan Gangloff, M. 2011. **Protein Expr Purif.** 76(2): 173-183.

Millán, A.F.S., Castel, A.M., Miller, M. dan Daniell, H. 2003. A Chloroplast Transgenic Approach to Hyper-Express and Purify Human Serum Albumin, a Protein Highly Susceptible to Proteolytic Degradation. **Plant Biotechnol J** 1(2): 71-79.

Monkarsh, S. P., Ma, Y., Aglione, A., Bailon, P., Ciolek, D., DeBarbieri, B., Graves, M. C., Hollfelder, K., Michel, H., Palleroni, A., Porter, J. E., Russoman, E., Roy, S., Pan, Y.C. 1997. Positional isomers of monopegylated interferon R-2a: isolation, characterization and biological activity. **Anal. Biochem.** 247: 434-440.

Ningrum, R. A., Santoso, A. dan Herawati, N. 2013. Secretory expression of recombinant human interferon-alpha2b in-methylotropic yeast *Pichia pastoris*. **J. Res. Pharm. Sci.** 4(2): 207-210.

Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K. C. dan Samuel, C. E. 1987. Interferons and their actions. **Annu. Rev. Biochem.** 56: 317-332.

Roche. 2014. Roferon-A[®] : Interferon Alfa-2a. **Roche Roferon-A[®] 140903**: 1-25.

Roche. 2014. PEGASYS[®] : Peginterferon Alfa-2a. **Roche Pegasys 140512**. 1-34.

Rosendahl, M.S., Doherty, D.H., Smith, D.J., Carlson, S.J., Chlipala, E.A. dan Cox, G.N. 2005. A long-acting, highly potent interferon α -2 conjugate created using site-specific PEGylation. **Bioconjugate Chemistry** 16: 200-207.

Roos, G., Leanderson, T. dan Lundgren, E. 1984. Interferon-induced cell cycle changes in human hematopoietic cell lines and fresh leukemic cells. **Cancer Res** 44: 2358-2362.

Santoso, A., Herawati, N. dan Rubiana, Y. 2012. The effect of methanol induction and incubation time on expression of human erythropoietin in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Makara, Teknologi** Vol 16 (1): 29-34.

Santoso, A., Ningrum, R.A. dan Herawati, N. 2013. Purification and characterization of recombinant human interferon alpha-2b in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care** Issue 3, Vol 3: 13-19.

Santoso, A., Herawati, N. dan Rubiana, Y. 2014. The effect of methanol induction and incubation time on expression of human erythropoietin in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **J. Pharm. Bioanal. Sci.**, Volume 3, Issue 1, Jan-Mar 12: 1-5.

Sarkar, M.C., Lindner, D. J., Liu Y.F., Williams, B.R., Sen, G. C., Silverman, R. H. dan Borden, E. C. 2003. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. **Apoptosis** 8: 237–249.

Scopes, R. K. 1993. **Protein Purification: Principles and Practice**. Ed ke-3. New York: Springer Press.

Shepard, C.W., Finelli, L. dan Alter, M.J. 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect. Dis** 5: 558–567.

Sinha, J., Plantz, B.A., Inan, M. dan Meagher, M. 2004. Cause of Proteolytic Degradation of Secreted Rekombinan Proteins Produced in Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*: Case Study With Recombinant Ovine Interferon- τ . **Biotechnology and Bioengineering** 89: 102-112.

Sola, R.J. dan Griebenow, K. 2010. Glycosylation of therapeutic proteins: An effective strategy to optimize efficacy. **BioDrugs** 24: 9–21.

Soriano, V., Puoti, M., Sulkowski, M., Cargnel, A., Benhamou, Y., Peters, M., Mauss, S., Bräu, N., Hatzakis, A., Pol, S. dan Rockstroh, J. 2007. Care of patients coinfectd with HIV and hepatitis C virus: 2007 updated recommendations from the HCV-HIV international panel. **AIDS** 21: 1073–1089.

Subramanian, M.G., Fiscella, M. dan Smith, A.L. 2007. Albinterferon α -2b: a genetic fusion protein for the treatment of chronic hepatitis C. **Nature Biotechnology** 25: 1411-1419.

Tagliaferri, P., Caraglia, M., Budillon, A., Marra M., Vitale, G., Viscomi, C., Masciari, S., Tassone, P., Abbruzesse A. dan Venuta S. 2005. New pharmacokinetic and pharmacodynamic tools for interferon-alpha (IFN- α) treatment of human cancer. **Cancer Immunology Immunotherapy** 54: 1–10.

Tropp, B.E. 2008. **Molecular Biology: Genes to Proteins** 3rd Ed. USA: Jones and Bartlett Publisher, Inc.

Uddin, S., Sweet, M., Colamonici, O. R., Krolewski, J. J. dan Plataniias, L. C. 1997. The vav protooncogene product (p95vav) interacts with the Tyk-2 protein tyrosine kinase. **FEBS. Lett.** 403: 31-34.

Uddin, S., Lekmine, F., Sharma, N., Majchrzak, B., Mayer, I., Young, P. R., Bokoch, G. M., Fish, E. N. dan Plataniias, L. C. 2000. The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. **J. Biol. Chem.** 275: 27634-27640.

Vanz, A.L., Lünsdorf, H., Adnan, A., Nimtz, M., Gurramkonda, C., Khanna, N. dan Rinas, U. 2012. Physiological Response of *Pichia pastoris* GS115 to Methanol-Induced High Level Production of The Hepatitis B Surface Antigen: Catabolic Adaptation, Stress Responses, and Autophagic Processes. **Microbial Cell Factories** 11: 103

Weinstein, T., Gafter, U., Chagnac, A. dan Skutelsky E. 1997. Distribution of glycosaminoglycans in rat renal tubular epithelium. **J Am Soc Nephrol** 8(4): 586–95.

Young, H. A. 1996. Regulation of Interferon - Gene Expression. **J. Interferon Cytokine Res** 16: 563–568.

Zhang, W., Inan, M. dan Meagher, M. 2000. Fermentation Strategies for Recombinant Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnol. Bioprocess Eng** 5: 275-287.

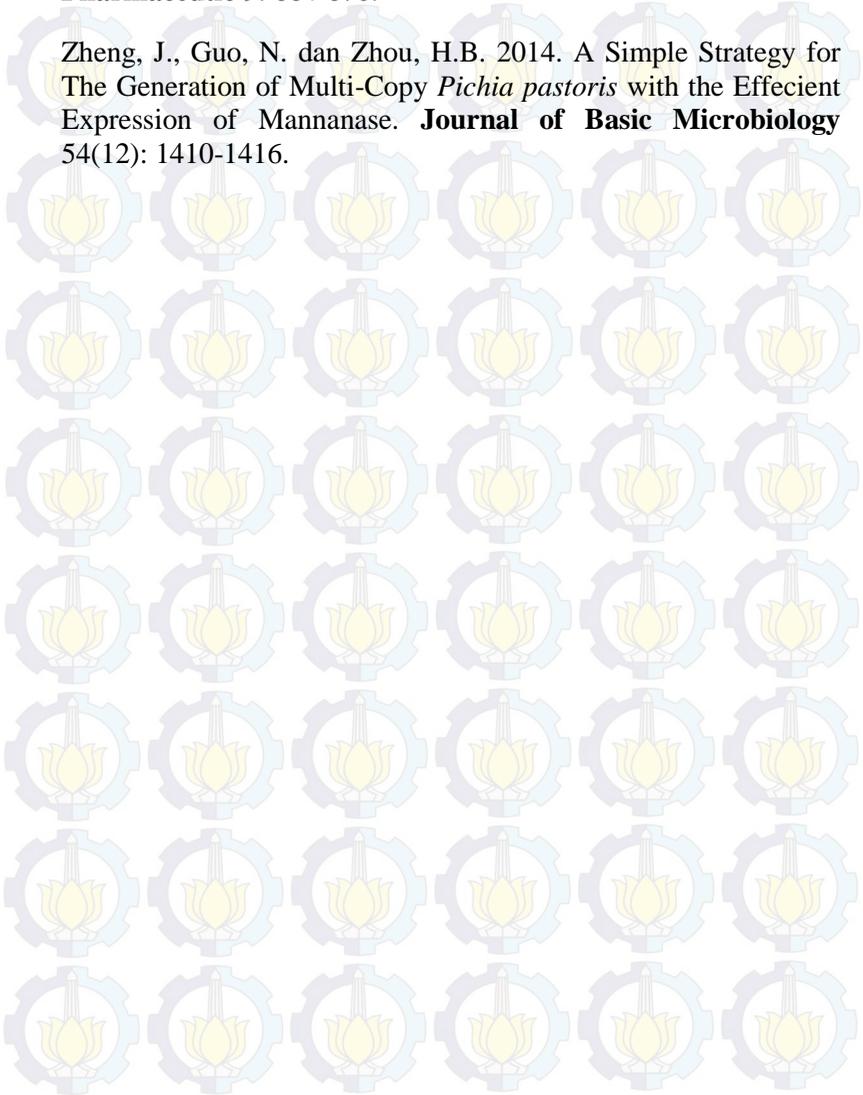
Zhang, Y., Liu, R. dan Wu, X. 2007. The Proteolytic System and Heterologous Protein Degradation in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **Annals of Microbiology** 57(4): 553-560.

Zhao, H.L., Yai X.Q., Xue C., Wang Y., Xiong X.H. dan Liu Z.M. 2008. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon- α 2b fusion protein by linker engineering. **Protein Expression and Purification** 61: 73–77.

Zhao, H.L., Yai, X.Q., Xue, C., Wang, Y., Xiong, X.H. dan Liu, Z.M. 2012. Balancing the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Interferon- α 2b and Human Serum Albumin Fusion Protein by Proteolytic or Reductive Cleavage

Increases Its in Vivo Therapeutic Efficacy. **Molecular Pharmaceutic** 9: 664-670.

Zheng, J., Guo, N. dan Zhou, H.B. 2014. A Simple Strategy for The Generation of Multi-Copy *Pichia pastoris* with the Effecient Expression of Mannanase. **Journal of Basic Microbiology** 54(12): 1410-1416.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Bahan Medium

YPD (*Yeast Peptone Dextrose*):

- 1% Yeast Extract
- 2% Peptone
- 2% Dextrose

YPDS (*Yeast Peptone Dextrose Sorbitol*):

- 1% Yeast Extract
- 2% Peptone
- 2% Dextrose
- 1M Sorbitol

BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium*):

- 1% Yeast Extract
- 2% Pepton
- 100mM Potassium Fosfat pH 6
- 1.34% Yeast Nitrogen Base
- 1% Glycerol
- 0.2% Biotin

BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*):

- 1% Yeast Extract
- 2% Pepton
- 1.34% Yeast Nitrogen Base
- 0.2% Biotin
- 0.5% methanol.

Lampiran 2. Komposisi Bahan SDS-PAGE.

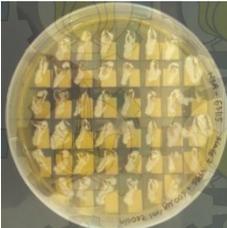
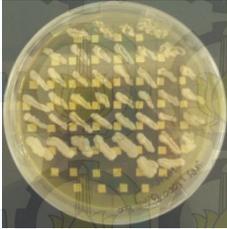
Stacking Gel 3%:

1,75ml DDW,
313 μ l 40% Akrilamid
225 μ l 1,0 M Tris HCl pH 6,8
25 μ l 10% SDS
25 μ l 10% APS
3 μ l TEMED

Separating Gel 12%:

2,2 ml DDW
1,25 ml 40% Akrilamid
1,5 ml 1,5 M Tris HCl pH 8,8
50 μ l 10% SDS
50 μ l 10% APS
3 μ l TEMED

Lampiran 4. Tingkat Survival Koloni Yeast Rekombinan *P. pastoris* (Foto).

Konsentrasi antibiotik	Strain SMD	Strain GS115
500 $\mu\text{g/mL}$	100% 	100% 
1000 $\mu\text{g/mL}$	100% 	100% 
2000 $\mu\text{g/mL}$	100% 	4,5% 

Lampiran 3. Profil Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong.



Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (Puslit Bioteknologi-LIPI) adalah pusat penelitian yang bernaung di bawah lingkungan kerja dan bertanggungjawab kepada Kedeputan Bidang Ilmu Pengetahuan Hayati Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (Kedeputan IPH-LIPI). Berdiri pada tanggal 13 Januari 1986, Puslit

Bioteknologi-LIPI dibentuk dalam rangka pengembangan dan pemanfaatan Bioteknologi di Indonesia. Hal ini berdasarkan Keputusan Presiden Republik Indonesia No.1 Tahun 1986.

Pusat Penelitian (Puslit) Bioteknologi-LIPI, pada mulanya bernama Pusat Penelitian dan Pengembangan (Puslitbang) Bioteknologi-LIPI. Pada bulan April 1993, Puslitbang Bioteknologi-LIPI bersama Puslitbang Biologi-LIPI menempati Gedung Kusnoto yang terletak pada di Jalan Ir.H. Djuanda No. 18 Bogor. Kemudian sejak tanggal 1 Oktober 1993, semua kegiatan dipindahkan ke Cibinong Science Center (CSC-LIPI) yang terletak di Jalan Raya Bogor Km 46 Cibinong, Kabupaten Bogor-Jawa Barat. Pada tahun 2001, sesuai SK Kepala LIPI No. 1151/Kep/2001 Puslitbang Bioteknologi-LIPI berubah nama menjadi Puslit Bioteknologi-LIPI.

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Surabaya pada tanggal 1 Mei 1995 sebagai anak tunggal dari bapak Alm. Bambang Tarubiyono dan ibu Suryati. Menempuh pendidikan sekolah dasar di kota Banjarmasin, Kalimantan Selatan dan menamatkan pendidikan sekolah menengah pertama di kota Pekanbaru, Riau Daratan. Saat menempuh tingkat menengah atas, penulis menjadi bagian dari Tim Olimpiade Biologi

SMAN 1 Pekanbaru dan banyak mengikuti kegiatan olimpiade baik tingkat Kota, Provinsi, maupun Nasional. Pada tahun 2011 penulis berhasil menamatkan pendidikan di bangku sekolah menengah atas dari SMAN 1 Pekanbaru. Pada bulan juni di tahun yang sama, penulis berhasil lulus seleksi masuk ITS melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri dengan memilih jurusan Biologi FMIPA ITS.

Selama menjadi mahasiswa di Jurusan Biologi ITS, penulis beberapa kali ditunjuk untuk menjadi asisten praktikum dan menjadi salah satu panitia dalam *International Biological Olimpiade Conference (IBOC)*.