

**EKSPRESI DAN PURIFIKASI PARSIAL INTERFERON- $\alpha 2b$
REKOMBINAN TERLARUT DI *Escherichia coli*
DENGAN SISTEM *CHAPERONE-SUBSTRATE*
CO-LOCALIZED EXPRESSION (CLEX)**

SKRIPSI



MIKHAIL NAUFAL

**PROGRAM STUDI S1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2022**

**EKSPRESI DAN PURIFIKASI PARSIAL INTERFERON- α 2b
REKOMBINAN TERLARUT DI *Escherichia coli*
DENGAN SISTEM *CHAPERONE-SUBSTRATE*
CO-LOCALIZED EXPRESSION (CLEX)**

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Bidang Kimia
Pada Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

Oleh:

Mikhail Naufal

NIM 081811533036

Disetujui oleh:

Pembimbing I,



Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
NIP. 196306151987012001

Pembimbing II,



Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si.
NIP. 199008012019032012

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Ekspresi dan Purifikasi Parsial Interferon- α 2b
Rekombinan Terlarut di *Escherichia coli* dengan Sistem
Chaperone-Substrate Co-localized Expression (CLEX)
Penyusun : Mikhail Naufal
NIM : 081811533036
Pembimbing I : Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
Pembimbing II : Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si.
Tanggal Seminar : 22 Juli 2022

Disetujui oleh:

Pembimbing I,



Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
NIP. 196306151987012001

Pembimbing II,



Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si.
NIP. 199008012019032012

Mengetahui,

Ketua Departemen Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga



Mochamad Zakki Fahmi, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP. 198307022009121005

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seijin penyusun dan harus menyebutkan sumber sesuai kebiasaan ilmiah. Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi dengan judul **“Ekspresi dan Purifikasi Parsial Interferon- α 2b Rekombinan Terlarut di *Escherichia coli* dengan Sistem *Chaperone-Substrate Co-localized Expression* (CLEX)”**. Penulis menyadari dalam penyusunan naskah skripsi ini tidak dapat dilakukan oleh seorang diri. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si., selaku dosen pembimbing I atas waktu, bimbingan, saran, masukan, nasihat, dan motivasi yang telah diberikan selama penyusunan naskah skripsi ini.
2. Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si., selaku dosen pembimbing II atas waktu, bimbingan, saran, dan masukan yang selalu diberikan selama proses penyusunan naskah skripsi ini.
3. Harsasi Setyawati, S.Si., M.Si., selaku dosen wali atas nasihat, motivasi, dan dukungan yang selalu diberikan selama proses perkuliahan
4. Kedua orang tua tercinta, kakak, adik, dan mas yang telah memberikan dukungan dan kasih sayang tak terhingga sehingga naskah skripsi ini dapat terselesaikan
5. Seluruh bapak ibu dosen, serta staf Departemen Kimia atas didikan, dukungan, bantuan, dan ilmu yang bermanfaat yang telah diberikan.
6. Kakak-kakak staf Laboratorium Proteomik, PUI-PT Pusat Riset Rekayasa Molekul Hayati (*Research Center for Bio-Molecule Engineering* – BIOME), Universitas Airlangga, yang telah memberikan masukan dalam penyusunan naskah skripsi.
7. Teman-teman angkatan 2018 (H18RID) atas doa dan bantuan yang telah diberikan selama proses penyusunan naskah skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan naskah skripsi ini masih banyak kekurangan, sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi kebaikan penulisan naskah skripsi ini yang lebih baik. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Surabaya, 22 Juli 2022

Penulis,

Mikhail Naufal

Naufal, M., 2022, Ekspresi dan Purifikasi Parsial Interferon- α 2b Rekombinan Terlarut di *Escherichia coli* dengan Sistem *Chaperone-Substrate Co-localized Expression* (CLEX), Skripsi ini di bawah bimbingan Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si., dan Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si., Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Interferon- α 2b merupakan protein terapeutik yang berperan dalam pengobatan kanker, seperti leukemia sel berbulu, melanoma, dan karsinoma sel ginjal. Saat ini, Interferon- α 2b rekombinan diproduksi dengan menggunakan *Escherichia coli* sebagai sel inang karena ekonomis dan sederhana. Namun, permasalahan utama dari sistem produksi tersebut adalah terbentuknya badan inklusi. Salah satu sistem ekspresi yang berhasil mengatasi masalah tersebut adalah *chaperone-substrate co-localized expression* (CLEX). Digunakan sekuen *chaperone* DnaJ yang disusun secara *bi-sistronic* dengan sekuen protein rekombinan, sehingga DnaJ dapat segera berinteraksi dengan protein rekombinan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum ekspresi Interferon- α 2b terlarut dengan sistem CLEX dan memurnikannya secara parsial. Kondisi ekspresi divariasikan terhadap suhu, waktu, dan konsentrasi *isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside* (IPTG). Kondisi ekspresi dilakukan pada suhu 20 °C dan 37 °C. Selanjutnya, waktu inkubasi yang dilakukan adalah 4 jam dan *overnight*. Ekspresi Interferon- α 2b juga diinduksi dengan variasi konsentrasi IPTG 0,1–1,0 mM. Pada hasil visualisasi dengan SDS-PAGE terdapat pita protein dengan berat molekul relatif ± 19 kDa yang menunjukkan Interferon- α 2b. Densitas pita diukur secara semi kuantitatif menggunakan ImageJ. Hasilnya menunjukkan bahwa kondisi ekspresi pada suhu 20 °C selama *overnight* dengan induksi IPTG 0,5 mM memiliki densitas pita paling tebal. Proses purifikasi dilakukan dengan menggunakan kolom Ni-NTA. Berdasarkan hasil kromatogram dan visualisasi SDS-PAGE, Interferon- α 2b terlarut berhasil dipurifikasi secara parsial.

Kata kunci: Interferon- α 2b, CLEX, DnaJ, *chaperone*, purifikasi

Naufal, M., 2022, Expression and Partial Purification of Soluble Recombinant Interferon- α 2b in *Escherichia coli* by *Chaperone-Substrate Co-localized Expression* (CLEX) system, This final project is under guidance of Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si., and Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si., Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Surabaya.

ABSTRACT

Interferon- α 2b is a therapeutic protein that can cure cancer, such as hairy cell leukemia, melanoma, and renal cell carcinoma. Currently, recombinant Interferon- α 2b is produced using *Escherichia coli* as a host cell because it is economical and simple. Nonetheless, the main problem of this production system is the formation of inclusion bodies. The expression system that has succeeded in overcoming this problem is chaperone-substrate co-localized expression (CLEX). DnaJ chaperone sequence is arranged bi-cistronic with recombinant protein sequence so that DnaJ can immediately interact with recombinant proteins. This study aimed to determine the optimum conditions for soluble Interferon- α 2b expression using the CLEX system and partially purify it. The expression conditions varied with temperature, time, and concentration of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Expression conditions were carried out at 20 °C and 37 °C. The incubation time is 4 hours and overnight. Interferon- α 2b expression was conducted with variations in IPTG concentration 0,1–1,0 mM. In the visualization by SDS-PAGE, there is a protein band with molecular weight $\pm$ 19 kDa that indicates Interferon- α 2b. The band density was measured semiquantitatively using ImageJ. The results showed that the experimental conditions at 20 °C overnight with 0,5 mM IPTG induction had the thickest band density. The purification process was carried out using a Ni-NTA column. Based on the chromatogram result and SDS-PAGE visualization, soluble Interferon- α 2b was successfully partially purified.

Keywords: Interferon- α 2b, CLEX, DnaJ, chaperone, purification

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Mikhail Naufal
NIM : 081811533036
Program Studi : S1 Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Jenjang : Sarjana (S1)

Menyatakan bahwa tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul:

Ekspresi dan Purifikasi Parsial Interferon- α 2b Rekombinan Terlarut di *Escherichia coli* dengan Sistem *Chaperone-Substrate Co-localized Expression* (CLEX)”

Apabila suatu saat nanti terbukti melakukan tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang ditetapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 22 Juli 2022



Mikhail Naufal
NIM. 081811533036

DAFTAR ISI

LEMBAR JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI.....	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Interferon- α 2b	5
2.2 Teknologi DNA Rekombinan	7
2.1.1 Vektor Plasmid	8
2.1.2 Transformasi.....	9
2.1.3 Seleksi Hasil Transformasi.....	9

2.3	<i>Molecular Chaperones</i>	10
2.4	Sistem <i>Chaperone-Substrate Co-localized Expression</i> (CLEX) ..	13
2.5	<i>Escherichia coli</i>	14
2.6	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ..	15
2.7	Metode Purifikasi Protein	17
2.7.1	Fraksinasi Amonium Sulfat	17
2.7.2	Kromatografi Penukar Ion	18
2.7.3	Kromatografi <i>Size Exclusion</i>	18
2.7.4	Kromatografi Afinitas	19
BAB III METODE PENELITIAN		21
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian	21
3.2	Bahan dan Alat	21
3.2.1	Bahan Penelitian	21
3.2.2	Alat Penelitian	22
3.3	Diagram Alir Penelitian	23
3.4	Prosedur Penelitian	23
3.4.1	Pembuatan Media dan Reagensia	23
3.4.1.1	Pembuatan Media Luria Bertani (LB) Cair dan Padat	23
3.4.1.2	Pembuatan Larutan Kanamisin 100 mg/ml	24
3.4.1.4	Pembuatan Larutan Bufer Lisis	24
3.4.1.5	Pembuatan SDS-PAGE <i>Loading Buffer</i>	24
3.4.1.6	Pembuatan SDS-PAGE <i>Running Buffer</i>	24
3.4.1.7	Pembuatan Larutan <i>Staining</i>	25
3.4.1.8	Pembuatan Larutan <i>Destaining</i>	25
3.4.1.9	Pembuatan Larutan Bufer A	25

3.4.1.10	Pembuatan Larutan Bufer B	25
3.4.2	Pembuatan Sel Kompeten <i>E. coli</i>	25
3.4.3	Transformasi pRSFDuet-1- <i>IFNα2b/J</i> ke <i>E. coli</i> DH5 α	26
3.4.4	Isolasi Plasmid Rekombinan pRSFDuet-1- <i>IFNα2b/J</i>	26
3.4.5	Analisis Hasil Isolasi pRSFDuet-1- <i>IFNα2b/J</i>	26
3.4.6	Transformasi pRSFDuet-1- <i>IFNα2b/J</i> ke <i>E. coli</i> BL21(DE3)	27
3.4.7	Ekspresi <i>IFNα2b</i> Rekombinan pada <i>E. coli</i> BL21(DE3)	27
3.4.8	Optimasi Kondisi Ekspresi <i>IFNα2b</i> Rekombinan pada <i>E. coli</i> BL21(DE3)	28
3.4.9	Panen dan Lisis Sel.....	28
3.4.10	Analisis SDS-PAGE.....	28
3.4.3.1	Pembuatan <i>Stacking</i> dan <i>Separating Gel</i>	28
3.4.3.2	Preparasi Sampel	29
3.4.3.3	<i>Running</i> Elektroforesis.....	29
3.4.11	Purifikasi <i>IFNα2b</i> Rekombinan Terlarut.....	29
3.4.12	Analisis SDS-PAGE Hasil Purifikasi.....	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		31
4.1	Transformasi pRSFDuet-1- <i>IFNα2b/J</i> ke <i>E. coli</i> DH5 α	31
4.2	Isolasi dan Konfirmasi pRSFDuet-1- <i>IFNα2b/J</i>	32
4.3	Transformasi pRSFDuet-1- <i>IFNα2b/J</i> ke <i>E. coli</i> BL21(DE3)	34
4.4	Ekspresi <i>IFNα2b</i> Rekombinan	36
4.4.1	Ekspresi dengan Protokol Standar.....	36
4.4.2	Optimasi Waktu Inkubasi	39
4.4.3	Optimasi konsentrasi IPTG	40
4.5	Purifikasi <i>IFNα2b</i> Rekombinan Terlarut	42

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
5.1 Kesimpulan	46
5.2 Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	51

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Tabel	Halaman
2.1	Jenis <i>chaperones</i> dalam <i>E. coli</i> (Fatima <i>et al.</i> , 2021)	11

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
2.1	Struktur protein IFN α 2b (Ningrum, 2014)	6
2.2	Persinyalan Jalur JAK-STAT IFN α 2b (Ningrum, 2014)	7
2.3	Peta pRSFDuet-1	8
2.4	Transformasi metode <i>heat shock</i> (Brown, 2010)	9
2.5	Ilustrasi mekanisme <i>chaperone</i> DnaK/DnaJ/GrpE (Imamoglu <i>et al.</i> , 2020)	12
2.6	Skema Sistem CLEX (Bui <i>et al.</i> , 2019)	14
2.7	Morfologi <i>Escherichia coli</i> (Lange & Hengge-Aronis, 1991)	14
2.8	Peralatan SDS-PAGE	16
2.9	Fraksinasi amonium sulfat	17
2.10	Kromatografi penukar ion dengan matriks penukar kation	18
2.11	Kromatografi <i>size exclusion</i> (Prapulla & Karanth, 2014)	18
2.12	Ilustrasi kromatografi afinitas	19
3.1	Diagram alir penelitian	23
4.1	Hasil transformasi pRSFDuet-1-IFN α 2b/J ke sel <i>E. coli</i> DH5 α pada media luria bertani agar mengandung kanamisisn	31
4.2	Elektroforegram hasil restriksi pRSFDuet-1-IFN α 2b/J dari <i>E. coli</i> DH5 α	34
4.3	Hasil transformasi pRSFDuet-1-IFN α 2b/J ke sel <i>E. coli</i> BL21(DE3) pada media luria bertani agar mengandung kanamisisn	35
4.4	Elektroforegram hasil restriksi pRSFDuet-1-IFN α 2b/J dari <i>E. coli</i> BL21(DE3)	36
4.5	Elektroforegram SDS-PAGE hasil ekspresi protein <i>E. coli</i> BL21(DE3) rekombinan yang mengandung pRSFDuet-1-IFN α 2b/J dengan protokol standar	38

4.6	Elektroforegram SDS-PAGE hasil ekspresi protein <i>E. coli</i> BL21(DE3) rekombinan yang mengandung pRSFDuet-1- <i>IFNα2b/J</i> pada suhu 20 °C dengan variasi waktu	39
4.7	Elektroforegram SDS-PAGE hasil ekspresi protein <i>E. coli</i> BL21(DE3) rekombinan yang mengandung pRSFDuet-1- <i>IFNα2b/J</i> pada suhu 20 °C selama <i>overnight</i> dengan variasi konsentrasi IPTG ganjil	41
4.8	Elektroforegram SDS-PAGE hasil ekspresi protein <i>E. coli</i> BL21(DE3) rekombinan yang mengandung pRSFDuet-1- <i>IFNα2b/J</i> pada suhu 20 °C selama <i>overnight</i> dengan variasi konsentrasi IPTG genap	41
4.9	Grafik densitas pita IFN α 2b terlarut pada SDS-PAGE dengan software ImageJ	42
4.10	Kromatogram hasil purifikasi protein IFN α 2b rekombinan terlarut dengan kolom <i>HisTrap FF</i> 1 ml menggunakan ÄKTA GO	44
4.11	Elektroforegram SDS-PAGE hasil purifikasi protein IFN α 2b rekombinan terlarut dengan kolom <i>HisTrap FF</i> 1 ml menggunakan ÄKTA GO	45

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran
1	Peta plasmid rekombinan pRSFDuet-1- <i>IFNα2b/J</i>
2	Sekuen gen <i>IFNα2b/J</i> , <i>IFNα2b</i> , dan <i>DnaJ</i>
3	Perhitungan pembuatan bufer fosfat pH 8,0 0,5 M

DAFTAR SINGKATAN

APS	: <i>Ammonium Persulfate</i>
bp	: <i>Base pair</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
Hsp	: <i>Heat Shock Proteins</i>
IFN α 2b	: <i>Interferon-α2b</i>
IPTG	: <i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
kDa	: <i>Kilodalton</i>
Ni-NTA	: <i>Nickel – Nitrilotriacetic acid</i>
rpm	: <i>Rotation per minute</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TAE	: <i>Tris-Asetat EDTA</i>
TEMED	: <i>N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine</i>