

Ekstraksi Protein dari *Escherichia coli* BL21 Rekombinan Gen *Mycobacterium tuberculosis* dengan Variasi Waktu Inkubasi Induksi Isopropyl- β -D-Thiogalactosidase (IPTG) dan Metode Lisis Sel

Nabila Swarna Puspa Hermana¹, Endang Kusdiyantini¹, Agung Supriyadi¹, dan Neny Nuraini²

¹ Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Tembalang, Semarang 50275.

² Divisi Riset dan Pengembangan PT Bio Farma (Persero)
hermananabila@gmail.com

Abstrak

Vaksin Bacillus Calmete-Guerin yang digunakan untuk mencegah penyakit tuberkulosis sudah tidak efektif lagi. Vaksin yang saat ini dikembangkan adalah vaksin rekombinan dengan mengkloning gen dari *Mycobacterium tuberculosis* ke dalam *Escherichia coli* BL21 untuk menghasilkan protein yang digunakan sebagai senyawa antigen dalam vaksin. Protein yang dihasilkan merupakan protein intraseluler yang membutuhkan proses lisis sel agar protein dapat diekstraksi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui waktu inkubasi serta metode lisis sel yang optimum dalam ekstraksi protein rekombinan. *E. coli* BL21 rekombinan diinkubasi selama 4 jam, 8 jam, 12 jam, dan 16 jam, kemudian sel dilisis dengan menggunakan metode enzimatik, freeze thaw, sonikasi, dan beads vortex. Kuantifikasi SDS PAGE menunjukkan sampel inkubasi 12 jam yang dengan metode lisis freeze thawing memiliki konsentrasi protein rekombinan terbesar yaitu sebesar 4.327.870,4 piksel.

Kata kunci: E. coli BL21 rekombinan, ekstraksi protein, enzimatik, freeze thaw, sonikasi, beads vortex

Abstract

*Bacillus Calmete-Guerin vaccine is no more effective in preventing tuberculosis. The vaccine developed now is vaccine recombinant using *Mycobacterium tuberculosis* gen cloned in *Escherichia coli* to produce protein which is used as antigen compound in vaccine. The protein produced an intercellular protein which is needed cell lysis process so that the protein could be extracted. The aim of this research was to investigate the incubation time, and the optimum cell lysis method in protein recombinant extraction. Recombinant *E. coli* BL21 was incubated for 4, 8, 12, and 16 hours, and followed by, freeze thaw, sonication, and beads vortex lysis method. SDS PAGE quantification showed that the sample with 12 hour incubation with freeze thawing lysis method had the highest protein recombinant concentration by 4.327.870,4 pixel.*

Keywords: *E. coli BL21 recombinant, protein extraction, enzymatic, freeze thaw, sonication, beads vortex*

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB – dulu dikenal dengan TBC) merupakan penyakit menular dan dalam banyak kasus bersifat mematikan. Penyakit ini disebabkan oleh berbagai galur mikobakteria, umumnya *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulosis biasanya menyerang paru-paru, namun juga bisa berdampak pada bagian tubuh lainnya. Tuberkulosis tidak tersebar secara merata di

seluruh dunia. Sebanyak 80% populasi di berbagai negara di Asia dan Afrika yang melakukan tes tuberculin menunjukkan hasil positif, sementara di Amerika Serikat, hanya 5–10% saja yang menunjukkan hasil positif.

Keberhasilan vaksinasi membuat peneliti mengembangkan vaksin yang dapat mencegah penyebaran tuberkulosis. Vaksin

tersebut adalah vaksin Bacille Calmette-Guérin (BCG) yang terbuat dari basil tuberkulosis (*Mycobacterium bovis*) yang dilemahkan dengan dikulturkan di medium buatan selama bertahun-tahun. Vaksin BCG 80% efektif dapat mencegah selama 15 tahun, tetapi efeknya bervariasi tergantung kepada kondisi geografis. Saat ini berkembang pula resistensi obat dalam terapi TB atau biasa disebut dengan istilah *Multi Drug Resistace* (MDR) yang terjadi karena penderita terkena TB yang disebabkan oleh *M. tuberculosis* resisten in vitro terhadap isoniazid (H) dan rifampisin (R) yang merupakan obat TB. MDR dapat terjadi ketika ada penyalahgunaan obat, misalnya ketika pasien tidak menyelesaikan pengobatannya hingga selesai dan pemberian dosis obat yang tidak tepat.

Berdasarkan uraian di atas, maka diperlukan vaksin terbaru untuk mencegah penyebaran penyakit TB. Alternatif yang ditawarkan adalah dengan membuat vaksin TB dengan teknologi DNA rekombinan. Vaksin rekombinan mengandung fragmen antigenik dari suatu mikroorganisme yang dapat merangsang respon imun. Vaksin rekombinan ini lebih aman dibandingkan dengan vaksin yang mengandung seluruh sel virus maupun mikroorganisme. Fragmen antigenik yang terdapat dalam vaksin rekombinan tidak dapat bereproduksi di dalam tubuh penerima, disamping itu vaksin rekombinan umumnya tidak menimbulkan efek samping (Radji, 2009).

M. tuberculosis membutuhkan waktu 16-20 jam untuk bereproduksi, sehingga membutuhkan waktu yang lama untuk mengkulturkan, sedangkan industri produksi vaksin membutuhkan waktu yang singkat untuk menekan biaya produksi. Masalah tersebut dapat dicegah dengan mentransformasikan gen pengkode protein rekombinan dari *M. tuberculosis* ke dalam *Escherichia coli* BL21 yang waktu generasinya lebih singkat.

E. coli BL21 rekombinan hasil transformasi gen dari *M. tuberculosis* memiliki potensi memproduksi protein

rekombinan yang akan digunakan sebagai antigen yang digunakan dalam pembuatan vaksin. Protein rekombinan dapat diekspresikan dengan menginduksi Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). IPTG merupakan senyawa yang berfungsi sebagai penginduksi ekspresi gen (Yildir, 1998). Pertumbuhan *E. coli* BL21 rekombinan juga dapat berpengaruh terhadap produksi protein rekombinan. Pertumbuhan *E. coli* BL21 rekombinan berhubungan dengan waktu inkubasi dan kepadatan sel. Semakin lama waktu inkubasi, semakin padat sel yang dihasilkan. Banyaknya sel yang dihasilkan sebanding dengan banyaknya protein rekombinan yang dihasilkan.

Protein rekombinan yang dihasilkan oleh *E. coli* merupakan protein intraseluler, sehingga perlu dilakukan proses lisis sel untuk mengekstraksi protein rekombinan. Berbagai metode telah diketahui dapat melisis sel antara lain metode enzimatik, metode mekanik, dan metode kimiawi. Metode lisis sel yang saat ini digunakan oleh divisi Riset vaksin TB yaitu metode lisis enzimatik dengan menggunakan enzim lysozyme. Keuntungan penggunaan metode lisis enzimatik ini adalah protein rekombinan yang dihasilkan dalam jumlah banyak, namun metode enzimatik ini memiliki kelemahan yaitu harga enzim yang mahal serta proses lisis membutuhkan waktu yang lama. Hal ini tentu saja tidak efektif jika diterapkan dalam skala industri yang menuntut proses cepat, hasil banyak, serta biaya produksi yang rendah. Metode lisis sel akan menentukan hasil jumlah protein rekombinan yang terekstraksi, untuk itu perlu metode yang tepat untuk menghasilkan protein rekombinan yang optimum.

Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi waktu inkubasi *E. coli* BL21 rekombinan dalam mengekspresikan protein rekombinan dan mencari metode lisis sel yang optimum dalam mengekstraksikan protein rekombinan dalam jumlah banyak.

Bahan dan Metode

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan antara lain *E.coli* BL21 rekombinan resisten ampisillin milik Divisi Penelitian dan Pengembangan PT Bio Farma (Persero). Medium yang digunakan yaitu Luria Bertani pH 7,4 yang mengandung ampisillin serta IPTG untuk ekspresi protein. Bahan kimia yang digunakan untuk lisis sel yaitu buffer lisis tris HCl pH 8 40 mM. Lisis sel enzimatis menggunakan buffer lisis yang ditambahkan dengan protease inhibitor, enzim lisozim, dan enzim benzonase. Lisis dengan beads vortex membutuhkan buffer lisis dan glass beads 425-600 μm . Lisis sonikasi dan freeze thaw hanya membutuhkan buffer lisis. Bahan kimia untuk SDS PAGE antara lain gliserol, bromphenol blue, glisin, acrylamide, SDS, ammonium persulfat, TEMED, mercaptoethanol, buffer running tris HCl+SDS, staining solution yang terdiri atas metanol, asam asetat glasial dan coomasie blue. Bahan untuk uji BCA antara lain phosphate buffer saline (PBS) dan kit uji BCA.

Metode

a. Pertumbuhan dan Pemanenan *E.coli* BL21 Rekombinan

E.coli BL21 rekombinan ditumbuhkan pada medium LB agar dengan metode *four way streak*. Kultur diinkubasi dalam suhu 37°C selama 16 jam. Koloni tunggal yang tumbuh diambil lalu diinokulasi pada 2 mL medium LB cair dalam 6 buah falcon tube berbeda dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama enam jam dengan kecepatan shaker 225 rpm. Saat akhir inkubasi, masing-masing kultur diukur nilai absorbansi dengan panjang gelombang 600nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$). Keenam kultur kemudian dicampurkan menjadi satu dan dihomogenkan.

Sebanyak 2 mL kultur yang sudah dihomogenkan diinokulasikan ke dalam 5 erlenmeyer yang masing-masing berisi 400 mL medium LB dan diinkubasi dengan

inkubator shaker suhu 37°C kecepatan agitasi 225 rpm. Kultur lalu diukur $\text{OD}_{600\text{nm}}$ setiap satu jam untuk menghitung kerapatan sel sampai nilai absorbansi mencapai 0,5. IPTG sebanyak 200 μL ditambahkan ke dalam empat buah erlenmeyer dan suhu di dalam inkubator diturunkan menjadi 25°C. Masing-masing erlenmeyer diukur nilai $\text{OD}_{600\text{nm}}$ setiap 4 jam sekali dengan memanen kulturnya.

Kultivasi *E. coli* dilakukan setiap empat jam sekali dengan mengeluarkan satu erlenmeyer yang sudah diinduksi IPTG setiap empat jam. Kultur dimasukkan ke dalam falcon tube sebanyak 24 buah dengan masing-masing falcon tube berisi 15 mL kultur. Kultur kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm dalam suhu 4°C selama 20 menit. Bagian supernatant dibuang, sedangkan bagian pellet disimpan di dalam suhu -80°C.

b. Lisis Sel

sampel yang dilisis antara lain sampel inkubasi 4 jam, 8 jam, 12 jam, dan 16 jam masing-masing sebanyak 3 falcon sebagai pengulangan. Buffer lisis enzimatis sebanyak 1,2 mL ditambahkan ke dalam falcon kemudian diinkubasi selama 3 jam dalam suhu ruang. Sampel disentrifugasi selama 20 menit dalam suhu 4°C dengan kecepatan 4000 rpm. Supernatant diambil dan disimpan di suhu 4°C.

Sampel lisis freeze thaw ditambahkan 1,2 mL buffer lisis kemudian diinkubasi dalam freezer -20°C selama 15 menit dan suhu 25°C dalam water bath selama 15 menit. Siklus diulang sebanyak tiga kali. Sampel disentrifugasi dalam suhu 4°C dengan kecepatan 4000 rpm. Supernatant diambil dan disimpan di suhu 4°C.

Sampel lisis sonikasi ditambahkan 1,2 ml buffer lisis kemudian disonikasi dengan gelombang 20 kHz selama 100 menit dengan siklus 10 menit sonikasi dan 2 menit jeda serta 20 menit sonikasi dan 2 menit jeda. Sampel disentrifugasi dalam suhu 4°C dengan kecepatan 4000 rpm. Supernatant diambil dan disimpan di suhu 4°C.

Sampel lisis beads vortex ditambahkan 1,2 ml buffer lisis dan glass beads ukuran 425-600 μm dengan konsentrasi 10%, 25% dan 50%. Falcon berisi campuran suspensi sel dan glass beads kemudian divortex selama 1 menit dan disimpan di es selama 1 menit. Proses beads vortex diulang sebanyak 15 kali siklus. Sampel disentrifugasi dalam suhu 4°C dengan kecepatan 4000 rpm. Supernatant diambil dan disimpan di suhu 4°C.

c. Uji BCA dan SDS PAGE

Sampel kemudian dilakukan uji BCA metode Smith. Standar dan sampel yang dimasukkan ke dalam well mikroplate sebanyak 25 μL dengan tiga kali pengulangan. Reagen BCA dimasukkan ke dalam masing-masing well sebanyak 200 μL lalu diinkubasi selama 30 menit dalam suhu 37°C. Hasil inkubasi dibaca menggunakan microplate reader dengan panjang gelombang 562 nm.

Sampel dilakukan uji SDS PAGE dengan arus 100 volt selama 60 menit. Hasil SDS PAGE dikuantifikasi dengan menggunakan software GelQuant.Net.

Hasil dan Pembahasan Pertumbuhan *E.coli* BL21 rekombinan

E.coli yang tumbuh di medium LB agar dengan ampisilin menunjukkan bahwa *E.coli* tersebut merupakan *E.coli* BL21 rekombinan.

Kepadatan sel yang diukur dengan OD_{600nm} menunjukkan adanya peningkatan pertumbuhan pada setiap erlenmeyer. Sampel yang diinduksi IPTG memiliki kerapatan sel lebih rendah dibandingkan dengan sampel yang tidak diinduksi IPTG dengan nilai OD_{600nm} induksi T16 sebesar 4,910 dan OD_{600nm} uninduksi sebesar 11,1 (Tabel 1). Nilai OD_{600nm} yang rendah pada kultur yang diinduksi menunjukkan pertumbuhan *E.coli* lebih diutamakan untuk ekspresi protein.

IPTG memiliki efek negatif terhadap pertumbuhan *E.coli* karena IPTG merupakan analog dengan laktosa yang bekerja dengan berikatan dan menginaktivasi represor lac (Law, 2002). Protein yang over-ekspresi dapat menghambat pertumbuhan sel, misalnya ada agregasi protein yang kuat atau ketika protein rekombinan bersifat racun bagi bakteri. Hal tersebut dapat mengakibatkan sampel yang diinduksi IPTG memiliki nilai OD_{600nm} yang rendah (Ramirez-Sarmiento, 2014

Tabel 1. Nilai OD_{600nm} Sebelum dan Sesudah Induksi IPTG

Tahap	Waktu Inkubasi (Jam)	Erlenmeyer (E)				
		E1	E2	E3	E4	E5
Pre Induksi (P)	T0	0,003	0,006	0,005	0,005	0,006
	T1	0,007	0,008	0,008	0,008	0,008
	T2	0,011	0,014	0,014	0,013	0,013
	T3	0,026	0,035	0,032	0,030	0,029
	T4	0,087	0,108	0,096	0,094	0,094
	T5	0,499	0,638	0,567	0,572	0,563
Induksi (I)	T0	0,499	0,730	0,668	0,660	0,619
	T4	3,06	1,659	1,628	1,564	1,553
	T8	6,520	-	2,350	1,660	2,940
	T12	8,740	-	-	2,420	3,920
	T16	11,1	-	-	-	4,910

Keterangan: PI = Pre Induksi

I = Induksi

Erlen 5 tidak diinduksi IPTG (kontrol)

Lisis Sel

Lisis enzimatik memerlukan waktu lama untuk dapat melisis sel *E.coli* BL21 rekombinan. Pellet sel hasil inkubasi 16 jam memerlukan waktu lebih lama dalam proses lisis yaitu selama 5 jam, karena kepadatan sel inkubasi 16 jam lebih besar dibandingkan dengan inkubasi lainnya. Proses lisis enzimatik dapat diamati dengan terjadinya pengurangan ukuran gumpalan sel dan adanya perubahan warna larutan dari coklat keruh menjadi bening.

Lysozyme dapat melisis sel dengan menghidrolisis ikatan beta (1-4) glikosida antara N-asetilmuramik dan N-asetilglikosamin yang merupakan penyusun peptidoglikan dinding sel. Lysozyme memiliki sisi aktif spesifik yang dapat berikatan hanya pada enam cincin gula dari rantai polisakarida. Ketika lysozyme berikatan dengan rantai, lysozyme menghidrolisis rantai tersebut dengan mengubah gula keempat pada kompleks enam gula tersebut. Lysozyme memproduksi stress pada molekul dan memecah ikatan glikosidik (Sears, 2010).

Lisis dengan metode freeze thaw berbeda dengan metode lisis enzimatik dimana saat proses lisis tidak ada proses pengurangan ukuran gumpalan sel. Lisis freeze thaw terjadi karena adanya kerusakan dinding sel sebagai akibat dari pembekuan dan pencairan yang dilakukan berkali-kali. Pengulangan siklus freeze thaw merusak integritas dinding sel, sehingga membentuk pori-pori sementara (Johnson, 1994). Freeze thaw membuat sel membengkak dan pecah dalam bentuk kristal es saat proses pembekuan dan kemudian berkontraksi saat pencairan.

Lisis dengan metode sonikasi serupa dengan metode freeze thaw dimana tidak ada pengurangan ukuran gumpalan sel serta perubahan warna pada larutan. Lisis

metode sonikasi terjadi karena adanya gelombang suara berfrekuensi tinggi yang mengagitasi serta melisis sel. Gelombang suara dipancarkan melalui probe yang dirambatkan pada suspensi sel. Energi mekanik yang dihasilkan probe membentuk gelembung mikroskopik dan kemudian pecah yang mengakibatkan gelombang kejut yang meradiasi sampel (Promega, 2012). Pembentukan dan pecahnya gelembung gas tersebut menghasilkan tekanan tinggi dan panas, sehingga perlu ada pendinginan untuk mencegah kerusakan pada sampel protein. Gelombang kejut tersebut dapat mengubah permeabilitas dinding sel, sehingga akhirnya mengarah pada rusaknya dinding sel.

Proses lisis beads vortex terjadi proses perubahan warna larutan dari coklat keruh menjadi bening. Glass beads berukuran 425-600 μm memiliki area permukaan lebih besar per unit massa dan memungkinkan untuk melakukan kontak lebih sering dengan *E.coli* (Fujimoto, 2004). Beads vortex dapat melisis sel dengan cara memvortex yang mengakibatkan terjadinya benturan antara glass beads dengan sel. Benturan tersebut dapat mengakibatkan kerusakan pada dinding sel, sehingga dapat mengeluarkan isi sel tersebut (Caprioglio, 2012).

Uji BCA

Hasil uji BCA menunjukkan konsentrasi protein yang fluktuatif pada berbagai waktu inkubasi (Tabel 3). Penurunan konsentrasi umumnya terjadi pada inkubasi T16. Hal ini diduga karena proses lisis pada sampel inkubasi T16 belum maksimal karena nilai $\text{OD}_{600\text{nm}}$ T16 lebih besar diantara waktu inkubasi lainnya. Tingginya kepadatan sel tersebut proses lisis pada sampel inkubasi T16 belum maksimal, sehingga perlu dioptimasi lagi

Tabel 2. Rerata Konsentrasi Protein Lisat Hasil Uji BCA

Metode Lisis	Konsentrasi Protein Lisat (mg/mL)			
	T4	T8	T12	T16
Enzimatik	1098.0	1093.6	1289.3	1208.2
Freeze Thaw	1156.1	1187.6	1555.8	1154.7
Sonikasi 10'	1338.0	1747.4	2696.9	1252.9
Sonikasi 20'	1246.4	1641.9	4316.0	1675.8
Beads Vortex 10%	887.3	1124.1	582.9	1103.8
Beads Vortex 25%	1273.1	1811.2	5221.5	1593.4
Beads Vortex 50%	1192.7	1763.1	723.2	1133.7

SDS PAGE

Lisis T4, T8, dan T16 menunjukkan band protein rekombinan hasil lisis enzimatik paling tipis. Band target hasil lisis metode lain pada T4 dan T8 secara kasat mata terlihat memiliki ukuran yang hampir sama (Gambar 4.2). SDS PAGE lisat T12 menunjukkan lisat enzimatik, beads vortex 10%, dan beads vortex 50% memiliki band protein rekombinan yang tipis sedangkan lisat beads vortex 25%, freeze thaw, sonikasi 10 menit dan sonikasi 20 menit memiliki band protein rekombinan yang tebal. SDS PAGE lisat T16 menunjukkan lisat beads vortex 10%, dan beads vortex 50% memiliki band protein rekombinan yang tampak tipis. Lisat beads vortex 25%, freeze thaw, sonikasi 10 menit dan sonikasi 20 menit memiliki band protein rekombinan yang tebal (Gambar 4.2).

Hasil kuantifikasi SDS PAGE menunjukkan protein rekombinan lisat enzimatik berbagai waktu inkubasi memiliki nilai volume terkecil dibanding hasil lisis lainnya (Tabel 3). Nilai volume protein rekombinan terbesar pada T4 yaitu berasal dari lisis beads vortex 50%, pada T8 berasal dari lisis freeze thaw, pada T12 dan T16 berasal dari beads vortex 25%.

Lisat enzimatik memiliki rerata nilai volume terkecil yaitu sebesar dikarenakan adanya SDS dalam buffer lisis yang dapat menghambat kerja lysozyme. SDS merupakan agen surfaktan yang dapat menghambat kerja lysozyme ketika rantai karbon yang ada minimal 12 atau lebih

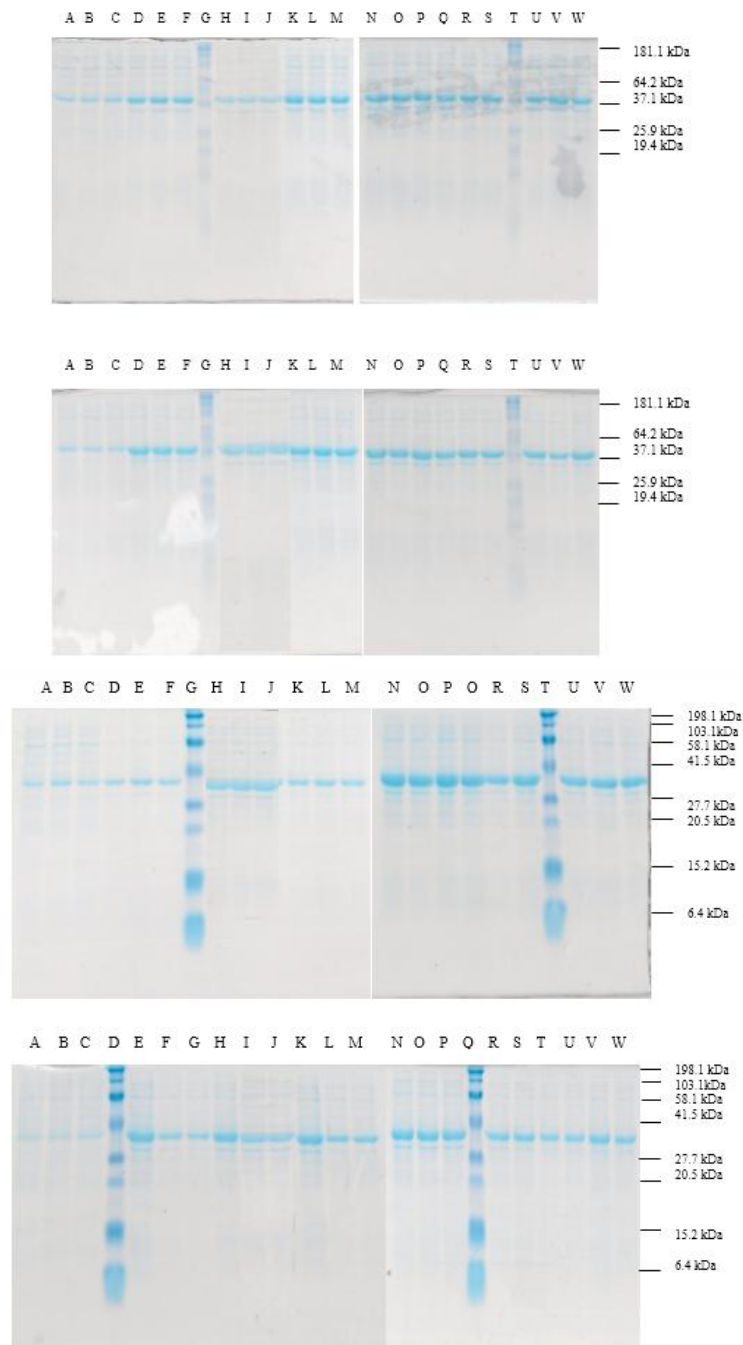
(Sigma-Aldrich, 2011). Adanya kandungan SDS dalam buffer lisis membuat kerja lysozyme terhambat, sehingga mengakibatkan lisis enzimatik memiliki band protein rekombinan terkecil.

Lisis dengan menggunakan beads vortex 10%, 25% dan 50% menunjukkan nilai volume yang bersifat fluktuatif pada lisat inkubasi T12 dan T16 (tabel 3). T12 dan T16 memiliki nilai OD_{600nm} yang lebih besar jika dibandingkan dengan T4 dan T8. Nilai OD_{600nm} yang besar menunjukkan jumlah sel yang dimiliki juga lebih banyak. Jumlah sel yang lebih banyak membutuhkan siklus lisis yang lebih banyak. Faktor lain yang menyebabkan hasil lisis beads vortex bersifat fluktuatif yaitu pergerakan glass beads saat divortex tidak merata, sehingga ada kemungkinan sebagian sel tidak terlisasi dengan sempurna.

Hasil lisis dengan freeze thawing mengalami peningkatan dari T4 ke T12 dan menurun pada T16 berdasarkan hasil kuantifikasi SDS PAGE. Serupa dengan beads vortex, nilai volume T16 mengalami penurunan karena jumlah sel T16 lebih banyak, sehingga membutuhkan siklus lisis lebih banyak.

Hasil lisis sonikasi menunjukkan hasil yang serupa dimana terjadi penurunan nilai volume protein rekombinan pada T16. Protein rekombinan sonikasi 10 menit lebih tinggi dibandingkan dengan sonikasi 20 menit. Hal tersebut menunjukkan sonikasi selama 20 kurang efektif dalam melisiskan sel. Proses sonikasi menghasilkan tekanan

tinggi serta peningkatan suhu yang dapat membuat protein terdenaturasi (Promega 2012).



Keterangan: A, B, C: Lisat Enzimatik
D, E, F: Lisat Beads Vortex 10%
H, I, J : Lisat Beads Vortex 25%
K, L, M: Lisat Beads Vortex 50%
N, O, P : Lisat Freeze Thaw
Q, R, S: Lisat Sonikasi 10'
U, V, W: Lisat Sonikasi 20'
G, T : Ladder

Gambar 4.3. Hasil SDS PAGE (A): T4, (B): T8, (C): T12, (D):T16

Tabel 3. Rerata Nilai Volume Band Protein rekombinan Hasil SDS PAGE (dalam piksel)

Metode	T4	T8	T12	T16
Enzimatik	739821	461644	537269	158044
Freeze Thaw	3441897	3536981	4327870	2708236
Sonikasi 10'	3393260	2541742	3309533	1711754
Sonikasi 20'	3291670	2327185	2521670	1839447
Beads Vortex 10%	1375861	2455157	968224	1697025
Beads Vortex 25%	918428	2153439	2417728	2726443
Beads Vortex 50%	3629546	2904089	1305372	1612319

Analisa two way anova hasil SDS PAGE menunjukkan adanya pengaruh waktu inkubasi, penggunaan metode lisis sel yang berbeda, serta interaksi antara waktu inkubasi dan metode lisis sel terhadap konsentrasi protein rekombinan. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai P metode lisis sel sebesar 228,72; Nilai P waktu inkubasi 34,56 dan nilai P interaksi waktu inkubasi induksi IPTG dan metode lisis sel 1,56. Nilai P yang lebih besar daripada 0.05 menunjukkan adanya beda nyata pada metode lisis sel, waktu inkubasi serta interaksi antara waktu inkubasi induksi IPTG dan metode lisis sel.

Hasil two way anova kemudian diuji lebih lanjut dengan menggunakan uji Fisher's Least Significance Different atau uji beda nyata terkecil. Uji Fisher dipilih karena nilai koefisien keragaman (KK) dari data sebesar 10.69830. Uji Fisher menunjukkan terdapat 11 varian data yang memiliki beda nyata secara signifikan dilihat dari nilai rata-ratanya, antara lain freeze thaw T4, freeze thaw T8, freeze thaw T12, beads vortex 25% T4, beads vortex 50% T4, beads vortex 50% T8, sonikasi 10 menit T4, sonikasi 10 menit T12, sonikasi 20 menit T4, enzimatik T12 dan enzimatik T16. Freeze thaw T12 memiliki nilai rata-rata terbesar dibandingkan data lain yang memiliki beda nyata signifikan dengan nilai 4327870, sedangkan enzimatik T12 memiliki nilai rata-rata terkecil dengan nilai 158044.

SIMPULAN

Waktu inkubasi yang paling optimal dalam ekstraksi protein rekombinan dari *E.coli* BL21 yaitu selama 12 jam dengan menggunakan metode lisis sel freeze thaw. Optimasi lanjut perlu dilakukan untuk sampel inkubasi T 16 jam karena protein yang terekstraksi memiliki jumlah lebih sedikit dibandingkan dengan T 12.

DAFTAR PUSTAKA

- Caprioglio, D. R. 2012. *Cell Free Break*. <http://faculty.colostate-pueblo.edu/dan.caprioglio/412L/CFbreak>. Maret 2015.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2011. *BCG Vaccine*. <http://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/prevention/bcg.htm>. 26 Oktober 2014
- Johnson, B.H. and Hecht, M.H. 1994. Recombinant Proteins Can Be Isolated From *E. Coli* Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing. *Biotechnology* 12(13): 1357-60.
- Law, J., Lee, S. Tseng, A., Tsui, K.W. dan Yu, N. 2002. The Role of Glycerol and Isopropyl Thiogalactoside in *Escherichia coli* Growth and Lactose Induction of -Galactosidase. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*. 2: 97-102.

Promega. 2012. *Bacterial Strain for Protein Expression*. Promega Press, USA.

Ramirez-Sarmiento, C.A. 2014. *Is There Any Difference in OD between Inducted with IPTG and Unindukced Culture*. http://www.researchgate.net/post/Is_there_any_difference_in_OD_between_Induced_with_IPTG_and_uninduksi_Culture. Maret 2015.

Smith, P.K. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 150:76-85.

Yildir, C., Onsan, Z.I., and Kirdar, B., 1998. Optimization of Starting Time and Period of Induction and Inducer Concentration in the Production of the Restriction Enzyme EcoRI from Recombinant Escherichia coli 294. *Turk. J. Chem.* 22: 221–22