

PROSIDING

SEMINAR NASIONAL DAN KONGRES INDONESIAN PROTEIN SOCIETY (IPS)

Jember, 6–7 Juli 2012

Tema:

**Eksplorasi dan Inovasi Sumber Protein
untuk Penguatan Sains dan Teknologi**

Editor:

Dr. Ir. Miswar, M.Si.

Netty Ermawaty, SP., M.Sc, Ph.D.

Tri Handoyo, SP., Ph.D



PROSIDING

SEMINAR NASIONAL DAN KONGRES INDONESIAN PROTEIN SOCIETY (IPS)

Jember, 6–7 Juli 2012

Tema:

**Eksplorasi dan Inovasi Sumber Protein
untuk Penguatan Sains dan Teknologi**

Editor:

Dr. Ir. Miswar, M.Si.

Netty Ermawaty, SP., M.Sc, Ph.D.

Tri Handoyo, SP., Ph.D

PROSIDING

SEMINAR NASIONAL DAN KONGRES INDONESIAN PROTEIN SOCIETY (IPS)

Tema: Eksplorasi dan Inovasi Sumber Protein untuk Penguatan Sains dan Teknologi

Jember, 6–7 Juli 2012

Editor Dr. Ir. Miswar, M.Si.
Netty Ermawaty, SP., M.Sc., Ph.D.
Tri Handoyo, SP., Ph.D.

ISBN 978-979-803684-2

Penerbit



Kartika Mulya (Anggota IKAPI)

Jl. Potro Agung III No. 41C, Surabaya 60135

Tel. (031) 3715941, Fax. (031) 3770687

email: kartikamulya@gmail.com



UNIVERSITAS JEMBER



Indonesian Protein Society

Hak cipta dilindungi undang-undang.

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian/seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari penerbit

KATA PENGANTAR

Seminar Nasional dan Kongres Indonesian Protein Society merupakan forum ilmiah yang diselenggarakan oleh Universitas Jember bekerja sama dengan Organisasi profesi *Indonesian Protein Society* (IPS) pada tanggal 6-7 Juli 2012 di Jember. Seminar Nasional IPS dengan tema “Eksplorasi dan Inovasi Sumber Protein Untuk Penguatan Sains dan Teknologi” dimaksudkan sebagai sarana dalam pengembangan keilmuan dan informasi bagi peneliti dibidang protein dari semua aspek ilmu hayati.

Seminar ini menghadirkan beberapa pembicara tamu dari luar dan dalam negeri, antara lain Prof. Dr. Kyun Oh Lee (Korea), Prof. Dr. Young Ryun Chung (Korea), Prof. Dr. Sang Yeol Lee (Korea) Prof. Dr. Toshiharu Hase (Japan), Prof. Tomohiko Yamazaki (Japan), Prof. Dr. Nico Tjandra (USA), Prof. Dr. Maggy T. (IPB) dan Prof. Dr. Bambang Sugiharto (Univ. Jember), serta dihadiri oleh peneliti-peneliti dari berbagai institusi di Indonesia.

Makalah-makalah yang diseminarkan dan terangkum dalam prosiding ini terbagi dalam 3 bidang yaitu Bidang Pertanian dan Pangan, Bidang Kesehatan dan Farmasi serta Bidang Lingkungan dan Industri. Tim editor dalam menyusun prosiding ini tidak mengubah isi makalah, dan hanya melakukan beberapa penyesuaian menurut format redaksional yang telah ditetapkan. Adapun isi dari setiap makalah menjadi tanggung jawab masing-masing penulis.

Kami berharap semoga prosiding ini bermanfaat dan dapat menambah khasanah dalam pengembangan dan penerapan ilmu di bidang protein untuk kemakmuran dan kesejahteraan umat manusia.

Jember, Februari 2013

Tim Editor

Dr. Ir. Miswar, M.Si

Netty Ermawaty, SP., M.Sc, Ph.D

Tri Handoyo, SP., Ph.D.

DAFTAR ISI

	Halaman
Kata Pengantar	iii
Daftar Isi	iv
Sambutan Ketua Panitia	viii
Sambutan Ketua IPS	ix
Sambutan Rektor Universitas Jember	x
Molecular Machineries for Photosynthetic Bio-Assimilation in Ferredoxin-Dependent Redox Metabolisms Toshiharu Hase	1
Molecular Properties of Redox-Chaperones and Their Physiological Roles Against External Stresses in Eukaryotic Cells Kyun Oh Lee and Sang Yeol Lee	3
N-Glycan Modification and Plant Development Kyun Oh Lee, Rikno Harmoko, Wahyu Indra Duwi Fanata, and Sang Yeol Lee	4
Structural Study Of Actin Cytoskeleton Regulation Nico Tjandra	5
Protein and Peptide Bioactive Maggy Thenawidjaja Suhartono	6
Having Future Sweet with Sucrose-Phosphate Synthase and Sucrose-Transporter Protein Bambang Sugiharto	8
Application of Protein Engineering to Biosensors Tomohiko Yamazaki	10
Upaya Peningkatan Produksi dan Kualitas Tanaman Jagung Lokal Madura Melalui Seleksi Daur Ulang Fenotipe Sri Hartatik dan Zahratus Saktijah	13
Pembuatan Antibodi Poliklonal Menggunakan Antigen Protein Rekombinan <i>Sucrose Transporter (sut1)</i> Popy Hartatie Hardjo, Nurul Holifah, Triliani Farlisa, Tri Handoyo, dan Bambang Sugiharto	19
Analisis lokasi gen carbonic anhydrase (MVFACS, MAFACS dan LVFACS) pada <i>Flaveria bidentis</i> Didik Pudji Restanto	24
Peranan <i>Synechococcus</i> sp. sebagai biofertilizer untuk meningkatkan kadar protein biji tanaman kedelai (<i>Glycine max</i> L. Merrill) R. Soedradjad dan Anang Syamsunihar	28

Penggunaan Prebiotik Oligosakarida dalam Ransum terhadap Performa dan Populasi Mikroflora Saluran Cerna Ayam Pedaging yang Diinfeksi <i>E.Coli</i> Muhammad Daud, M.Aman Yaman, Wiranda G Piliang, Komang G Wiryawan dan Agus Setiyono	36
Peran <i>Sucrose Phosphate Synthase</i> (SPS) dan <i>Sucrose Transporter</i> (SUT) dalam Akumulasi Sukrosa pada Tomat (<i>Lycopersicon esculentum</i>) Transgenik Parawita Dewanti, Tri Ratnasari, Septyan Christanto dan Bambang Sugiharto	45
Fungsional karakterisasi protein nac32 transkripsi faktor (TF) dari tanaman arabidopsis sebagai respon terhadap stres Netty Ermawati and Daeyoung Son	52
Suplementasi protein limbah asal sereal dalam ransum fermentasi untuk memacu produksi, meningkatkan kualitas karkas dan efisiensi pakan ayam Lokal pedaging unggul M. Aman Yaman , Zulfan, Muhammad Daud dan Abinawanto	60
Perakitan Mutan Kedelai Tahan Kering Berkadar Protein Biji Tinggi dengan Ethyl methanesulfonate (EMS) Denna Eriani Munandar	71
Kajian protein ketahanan kekeringan pada beberapa Varietas tebu non komersial Ardian Firmansyah, Tri Handoyo, Anis Khikmawati, Netty Ermawati	79
Pengaruh Pupuk Organik dan Bioorganik Terhadap Kandungan Protein Pada Tanaman Sawi (<i>Brassica juncea</i>) Minhajil Abidin, Boedi Santoso, Tri Agus Siswoyo	84
Pemanfaatan Kuskus Sebagai Sumber Protein Bagi Masyarakat Lokal Di Pulau Yamna Kabupaten Sarani Diana Sawen dan Faidiban O. Rudolf	88
Transformasi Gen <i>SoSut1</i> Pada Tanaman Tebu (<i>Saccharum officinarum L.</i>) Menggunakan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dan Eksplan Tunas Lateral Anandang Ganni Wiyono, Nina Oktaria, Netty Ermawati, Nurmalasari Darsono, Tri Handoyo dan Bambang Sugiharto	92
Peningkatan Aktivitas <i>Sucrose Phosphat Synthase</i> Pada Tanaman Tomat (<i>Lycopersicon esculentum</i>) T1 Overekspresi Gen SoSPSI Purnama Okviandari, Tri Ratnasari, Evy Hanizar , Bambang Sugiharto	97
POSTER: Produksi dan Purifikasi <i>Loop Domain</i> Protein Rekombinan <i>Sucrose Transporter</i> Melalui cDNA- <i>SoSUTI</i> Tanaman Tebu Pada Sel <i>Escherichia coli</i> Triliani Farlisa, Nurul Holifah, Poppy Rahardjo, Rikno Harmoko, Tri Handoyo dan Bambang Sugiharto	103
POSTER: Ekspresi dan Karakterisasi Isoform <i>Sucrose-Phosphate Synthase</i> (SPS) Tanaman Tebu Pada <i>Escherichia coli</i> strain BL21 Ahmad Fudhaili and Bambang Sugiharto	104
Efektifitas Transformasi Gen <i>SoSPSI</i> (<i>Sucrose Phosphate Synthase</i>) Menggunakan Agen Seleksi Kanamycin dan Phosphinothricin Pada Tanaman Tebu (<i>Saccharum officinarum L.</i>) Aji Baskoro, Yunianzi Tiara, Didik Pudji Restanto, Tri Handoyo, Netty Ermawati, dan Bambang Sugiharto	105
POSTER: Efektifitas Transformasi Gen <i>SoSPSI</i> Menggunakan Promoter <i>Rice Ubiquitin2</i> (RUBQ2) dan Eksplan Epikotil Tanaman Tomat (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) Mutik Mahtuhfatul B. dan Bambang Sugiharto	112

Formulasi <i>Filler</i> dan Uji Kinerja Enzim Bromelin untuk Pengempuk Daging (<i>Meat Tenderizer</i>) Ika Rahmatul Layly, Deden Rosid Waltam, Ayi Mufti dan Ruby Setiawan	113
Pengujian Nilai Kualitas Protein Hidrolisat Kacang Hijau dengan Metode NPU (<i>Net Protein Utilization</i>) Secara <i>In Vivo</i> Galib Kusuma Aji, Noer Laily, Alit Pangestu, Sri Peni Wijayanti, dan Fajarwati Utami	121
Metode Sterilisasi Permukaan Yang Murah Untuk Eksplan Daun Majegau (<i>Dysoxylum caulostachyum</i> Miq.) Pada Kultur <i>In Vitro</i> Novi Harun AR	127
ILUSTRASI	
Cloning And <i>In Vitro</i> Antimycobacterial Activity Of Lectin Protein in Combination with Streptomycin To Increase Sensitivity Against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Ahyar Ahmad and Muh. Nasrum Massi	135
Isolasi dan Karakterisasi Protein Bioaktif dari Beberapa Jenis Spons sebagai Agent Antimikroba Andi Ilham Latunra dan Ahyar Ahmad	145
Spesifisitas Antibodi <i>hP</i> -116kDa Hasil Induksi Protein Non Kinase Membran Spermatozoa Manusia Pada Jaringan Somatik dan Reproduksi Manusia Umie Lestari	150
Identifikasi Protein Spesifik <i>Insulin-Like Growth Factors (IGFs)</i> pada Ayam Broiler sebagai Bahan Bioaktif Rosa Tri Hertamawati	155
Kajian Potensi Alergenisitas Nira Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) NXI 4T dan NXI 6T Melalui Uji Praklinik Pada Hewan Coba Tikus Putih Nurmalasari, Natalia Tri Astuti, Agus Heri Setyo Wahyudi, Herra Studiawan, Tutik Sri Wahyuni	162
POSTER: Structure of 3-Ketosteroid Δ^1 -Dehydrogenase From <i>Rhodococcus erythropolis</i> SQ1: Where Fad Meets Tyrosines Ali Rohman, Niels van Oosterwijk and Bauke W. Dijkstra	168
Respon Antibodi Manusia terhadap Protein Salivary Gland (SG) <i>Aedes aegypti</i> Berpotensi sebagai Indikator Resistensi terhadap Demam Berdarah (DBD) Rike Oktarianti, Syubbanul Wathon, Dwi Esti F dan Kartika Senjarini	169
Efek Penghambatan Ekstrak Kelenjar Saliva Nyamuk Anopheles terhadap Derajat Parasitemia pada Mencit Model Untuk Malaria Yunita Armiyanti, Ina Soraya, Vinny dan Kartika Senjarini	176
Kajian Protein Alergi dan Fisiologi Biji Kakao Selama Proses Pra-Perkecambahan Tri Handoyo, Mega Kartika Sari, Irwan Sadiman, Denna Eriani	183
Analisis Bioinformatika Motif Residu Lestari Domain (β/α) ₈ -Barrel GH51 A-L-Arabinofuranosidase Yang Berperan Pada Spesifitas Substrat Melalui Interaksi Sidik Jari Gugus Arabinofuranosil Much Zaenal Fanani, One Asmarani, Hery Suwito, Ni Nyoman Tri Puspaningsih	188
Isolasi Gen Pengkode Protein Antioksidan (AOP) pada Biji Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i>) Arya Bagus Boedi Iswanto dan Tri Agus Siswoyo	193

Identifikasi Protein Spermatozoa dan Cairan Lumen pada Epididimis Sapi, Kaitannya dengan Maturasi Spermatozoa Mahriani dan Della Ratna Kartini	196
Diskriminasi Daun Gandarusa (<i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.) Asal Surabaya, Jember dan Mojokerto Menggunakan Metode Elektroforesis Moch. Amrun Hidayat, Tri Handoyo dan Bambang Prajogo E.W.	205
Peningkatan Kemampuan Antioksidan Pada Biji Melinjo (<i>Gnetum Gnetum</i>) dengan Metode Enzimatis Tri Agus Siswoyo	210
Skrining Enzim Fibrinolitik dari Bakteri Tanah Madaniyah, Sattya Arimurti dan Evi Umayah Ulfa	216
Transformasi Gen Sy86 dalam Vektor Ekspresi pET TOPO 200 untuk Mendapatkan Protein Rekombinan sY86 Evi Hanizar	222
Aktivitas Trombolitik dan Antikoagulan Ekstrak Jamur Tiram Putih (<i>Pleoturus ostrarus</i>) Secara <i>In Vitro</i> Khilwiyah Eka Putri, Evi Umayah Ulfa dan Sattya Arimurti	226
Isolasi Bakteri Penghasil dan Karakterisasi Enzim Dekstranase Miswar	233
PRODUKSI DAN APLIKASI ENZIM	
Produksi dan Aplikasi Kitinase Dari <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a dalam Menghidrolisis Kitin dari Limbah Udang dan Dinding Sel Jamur <i>Ganoderma</i> sp. Hasnah Natsir, Abd. Rauf Patong, Maggy T.Suhartono dan Ahyar Ahmad	239
Pembuatan Keju Kedelai (<i>Soycheese</i>) Rendah Garam dengan Menggunakan <i>Rhizopus oligosporus</i> Neny Novita Yuliany, Eka Ruriani dan Nurhayati	244
Identifikasi Tanaman Potensial Penghasil Bahan Aktif Tanin Protein Komplek untuk Penghambatan Aktivitas Alpha Amylase Asriyah Firdausi dan Tri Agus Siswoyo	251
Kloning Gen B-Endoxilase Asal Mikroorganisme dalam Abdominal Rayap A.A. Istri Ratnadewi, Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Wuriyanti Handayani dan Previta	255
Analisis <i>Scanning Electron Microscope</i> Terhadap Perubahan Struktur Permukaan Bonggol Kelapa Sawit Akibat Aktivitas Xilanase Dan Selulase Anita Kurniati dan Ni Nyoman Tri Puspaningsih	263
Profil Aktivitas Xilanase dalam Ionic Liquid Ika Oktavianawati	267
Skrining Bakteri Xilanolitik Asal Kulit Buah Kakao Esti Utarti, Audiananti Meganandi Kartini dan Sattya Arimurti	271
Optimasi Ekstraksi Enzim Bromelin Berbahan Dasar Limbah Nanas Lokal Subang Ika Rahmatul Layly, Deden Rosid Waltam, Ayi Mufti dan Ruby Setiawan	279

Pembuatan Antibodi Poliklonal Menggunakan Antigen Protein Rekombinan *Sucrose Transporter (SUT1)*

Popy Hartatie Hardjo¹⁾, Nurul Holifah²⁾, Triliani Farlisa²⁾,
Tri Handoyo³⁾, dan Bambang Sugiharto²⁾

¹⁾Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya, ²⁾Fakultas MIPA Universitas Jember,
³⁾Fakultas Pertanian Universitas Jember
e-mail: poppy_hardjo@ubaya.ac.id

Abstrak

Translokasi sukrosa dari jaringan fotosintesis (*source*) ke jaringan penyimpan (*sink*) pada tanaman diperantarai oleh protein *sucrose transporter* (SUT), sehingga protein ini diketahui menentukan besarnya akumulasi sukrosa pada tanaman. Deteksi protein SUT pada tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan antibodi spesifik untuk protein tersebut. Penelitian ini ditujukan untuk pembuatan antibodi poliklonal SUT1 menggunakan protein rekombinan SUT1 yang diproduksi dalam sel *Escherichia coli*. Produksi protein rekombinan SUT1 dilakukan menggunakan fragmen cDNA-*SoSUT1* dari tanaman tebu yang disisipkan dalam plasmid pET28a (Invitrogen). Isolasi protein rekombinan SUT1 dilakukan dengan ekstraksi protein fraksi *insoluble* dari sel transforman *E.coli* dan purifikasi protein menggunakan kolom kromatografi afinitas resin Ni-NTA. Untuk pembuatan antibodi poliklonal sebanyak 0.5 mg protein rekombinan SUT1 murni dicampur dengan adjuvant lengkap Freund dan diinjeksikan secara subkutan dipunggung kelinci *New Zealand White*. Sedangkan injeksi kedua dan seterusnya digunakan 0.1 mg antigen per injeksi yang dicampur dengan adjuvant tak lengkap Freund. Sampel darah dikoleksi sebelum dan setiap minggu setelah injeksi yang keempat, kemudian dipisahkan serum darahnya untuk pengujian terbentuknya antibodi. Pengujian terhadap serum darah menggunakan metoda imunodifusi *Ouchterlony* menunjukkan terbentuknya antibodi poliklonal SUT1 pada serum darah yang diambil setelah minggu ke enam injeksi antigen. Uji *Western Blot* menggunakan antibodi poliklonal SUT1 dapat mendeteksi keberadaan protein rekombinan SUT1 hingga konsentrasi 1,0 ng. Antibodi tersebut juga dapat mendeteksi keberadaan protein SUT1 pada tanaman tebu dan tomat. Ketersediaan antibodi poliklonal SUT1 ini akan dapat digunakan untuk mempelajari keberadaan dan peranan protein SUT1 pada proses translokasi serta akumulasi sukrosa pada tanaman, khususnya tanaman tebu.

Kata kunci : *protein rekombinan SUT1, antibodi poliklonal, Ouchterlony, Western Blot, protein SUT1 pada tanaman.*

PENDAHULUAN

Fotosintesis tanaman menghasilkan sukrosa yang dikirimkan ke seluruh organ tanaman sebagai sumber karbon dan energi ataupun disimpan sebagai makanan cadangan. Pada sebagian besar tanaman, jalur translokasi sukrosa dari *source* ke *sink* diperkirakan melibatkan kombinasi kedua tahapan transpor simplasmik dan apo-

plasmik, tergantung tipe jaringan dan tahapan perkembangan (Lalonde *et al.*, 2003). Protein SUT adalah protein yang berperan penting dalam proses translokasi sukrosa secara apoplasmik pada tumbuhan, dan terdapat di membran plasma sel floem (Riesmeier *et al.*, 1994; Kuhn *et al.*, 1999; Slewinski *et al.*, 2009). Mengingat pentingnya peranan protein SUT dalam translokasi sukrosa, maka perlu

mempelajari karakter protein SUT. Karakterisasi protein SUT ini penting dalam usaha untuk meningkatkan akumulasi sukrosa dan produksi gula pada tanaman tebu.

Perkembangan bidang biologi molekul saat ini tidak saja dapat memanfaatkan pertumbuhan bakteri *E. coli* untuk keperluan rekayasa genetika tetapi juga untuk keperluan produksi dalam jumlah besar antibiotika maupun protein (Das, 1990). Apabila DNA sebagai kode genetik ditransformasikan kedalam sel bakteri *E. coli*, maka akan ditranskripsikan dan ditranslasikan membentuk protein. Oleh karena itu, tersedianya *cDNA-SoSUT1* dari tanaman tebu (Sugiharto dkk, 2010) dapat digunakan untuk memproduksi protein rekombinan SUT1 sehingga dapat digunakan untuk pembuatan antibodi SUT1. Lebih lanjut terbentuknya antibodi dapat digunakan untuk keperluan analisis fisiologis tanaman seperti penentuan kandungan protein SUT, lokalisasi protein SUT, dan karakterisasi fisiologis lainnya.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh antibodi yang dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan dan kandungan protein SUT sehingga dapat dipelajari proses translokasi sukrosa pada tanaman dalam upaya meningkatkan kandungan sukrosa pada tanaman, khususnya tebu.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan antibodi poliklonal SUT1 pada kelinci

Bakteri *E. coli* transforman yang mengandung plasmid pET28a yang disisipi fragmen *cDNA-SoSUT1* ditumbuhkan pada LB cair yang mengandung kloramfenikol 35 ppm dan kanamisin 50 ppm selama semalam pada 37°C. Pellet sel diambil dan diekstraksi menggunakan buffer yang mengandung urea menurut metode Crowe (1992). Protein yang diperoleh lebih lanjut diisolasi menggunakan kolom kromatografi afinitas (Ni-NTA). Kemurnian protein

SUT1 dicek dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), bila masih tercampur dengan protein lain maka protein SUT1 diisolasi dengan memotong pita protein dari gel akrilamid, lalu protein dielusi dari gel menggunakan alat protein elutor. Protein yang terelusi kemudian didialisis semalam untuk menghilangkan SDS.

Protein rekombinan SUT1 yang telah dimurnikan digunakan sebagai antigen, dan diinjeksikan pada kelinci betina jenis *New Zealand White*. Injeksi dilakukan dengan mencampur antigen protein rekombinan SUT1 (0,5 mg) dengan *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) (1:1), lalu diinjeksikan pada bagian bawah kulit (subkutan) punggung kelinci. Selang dua minggu dilakukan *booster* injeksi dengan mencampur antigen protein rekombinan SUT1 (0,1 mg) dengan *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA) (1:1) dan seterusnya setiap minggu (Dunbar and Schwoebel, 1990). Terbentuknya antibodi dianalisis menggunakan uji *Ouchterlony* (Timmons and Dunbar, 1990). Injeksi dihentikan bila sudah didapat antibodi dengan titer tertinggi.

Uji *Ouchterlony* dan uji *Western Blot*

Uji *Ouchterlony* dilakukan dengan melarutkan gel agarose 0.8 % dengan agarose buffer solution yang terdiri dari 0.5 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA, NaCl, dan 0.1 M NaN₃. Larutan dipanaskan dengan *microwave* sampai homogen dan jernih, kemudian dituang ke dalam *glass plate* secara merata ke seluruh permukaan. Larutan dibiarkan hingga dingin dan membeku, kemudian dibuat sumuran dengan diameter 2-3 mm dan jarak antar sumuran 0,5 cm. Selanjutnya larutan antigen dan antibodi masing-masing dimasukkan kedalam sumuran sebanyak 20 µl, diinkubasi selama 2-3 hari lalu diamati. Garis presipitasi yang telah terbentuk diwarnai dengan menggunakan pewarna Coomassie Blue (CBB) 0.1%.

Analisis SDS-PAGE dilakukan dengan konsentrasi akrilamid 15 % seperti metode yang disebutkan Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1998). Protein rekombinan SUT1 ataupun protein SUT tanaman ditambah *buffer loading* dengan perbandingan 1 : 1 kemudian didiamkan dan dimasukkan ke dalam sumur gel dan elektroforesis dilakukan pada 70 volt selama 2,5 - 3 jam.

Protein yang telah dipisahkan dengan SDS-PAGE ditransfer ke membran *nitrocellulose* melalui aliran listrik sebesar 250 mA selama 2 jam dengan suhu 4°C. Membran dicuci dengan *tris buffered saline* (TBS) sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit. Setelah dicuci, protein-protein yang tidak diinginkan ditutup (*blocking*) dengan cara direndam 0,5% *skim milk* dalam TBS selama 30 menit.

Deteksi antigen yaitu protein rekombinan SUT1 ataupun protein SUT tanaman dilakukan dengan inkubasi membran yang diberi antibodi I (antibodi SUT1) pada *shaker* semalam. Membran dicuci kembali dengan TBS sebanyak 3 kali 5 menit, lalu diberi antibodi sekunder (*Alkaline phosphatase Goat-Anti IgG Rabbit conjugated*) dalam TBS *skim milk* dan diinkubasi selama 1 jam. Pewarnaan dilakukan dengan pemberian 25 µl 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate disodium salt (BICP) dan 50 µl nitrotetrazolium blue chlorine (NBT) yang dilarutkan dalam 10 ml buffer alkali fosfat (pH 9,5). Pita protein yang terbentuk merupakan pita protein SUT1. Protein yang mampu terdeteksi pada konsentrasi tertentu menunjukkan tinggi rendahnya titer antibodi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari pemurnian hasil isolasi protein rekombinan SUT1 dalam kondisi *denaturing* menggunakan kolom kromatografi afinitas Ni-NTA selain didapatkan protein murni juga didapatkan protein yang lain. Lebih lanjut protein yang terkontaminasi dilakukan purifikasi secara elektroelusi sehingga didapatkan protein murni. Metode tersebut cukup mudah untuk mengisolasi protein denaturasi yang murni untuk pembuatan antibodi poliklonal spesifik.

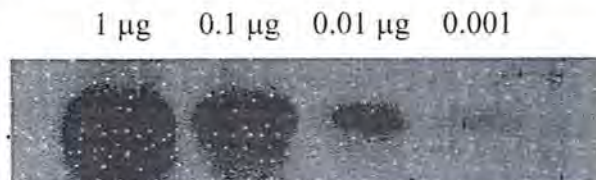
Imunodifusi *Ouchterlony* dalam gel merupakan metoda untuk analisis reaksi antigen dan antibodi. Metode ini sering digunakan untuk memeriksa spesifitas dari antibodi poliklonal. Antigen dan antibodi akan bermigrasi ke arah satu sama lain dalam gel dan garis presipitasi terbentuk ketika kedua reaktan bertemu. Reaksi presipitasi ini sangat spesifik. Berdasarkan uji *Ouchterlony*, serum I yang diambil pada minggu ke-5 setelah imunisasi belum menunjukkan adanya antibodi poliklonal SUT1 dalam serum. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya garis presipitasi yang terbentuk seperti pada serum pre-imunisasi. Kelinci yang diimunisasi menunjukkan adanya pembentukan antibodi SUT1 pada minggu ke-6 (serum II), namun serum yang terbentuk masih memiliki titer yang rendah yang ditunjukkan dengan garis presipitasi yang tipis. Pada minggu ke-7 sampai minggu ke-8 titer antibodi meningkat, sedangkan minggu ke-9 sampai minggu ke-10 cenderung mengalami penurunan titer antibodi (gambar 1).



Gambar 1. Hasil uji *Ouchterlony* antibodi poliklonal SUT1 dengan antigen protein rekombinan SUT1 Pre- serum pre-imunisasi Ab.1-Ab.6: serum antibodi Poliklonal SUT1 minggu ke-5 -10.

Deteksi titer antibodi dilakukan dengan uji *Western Blot*. Antigen yang digunakan adalah protein rekombinan SUT1 hasil over ekspresi *E. coli* dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 10 μg , 1 μg , 0.1 μg , 0.01 μg , dan 0.001 μg . Uji

Western Blot menunjukkan antibodi poliklonal SUT1 pada serum IV (Ab.4) mampu mendeteksi antigen SUT1 sampai pada konsentrasi 1 ng dengan pengenceran antibodi 1 : 2000 (gambar 2).



Gambar 2. Hasil uji *Western Blot* antibodi SUT1 pada beberapa konsentrasi antigen protein rekombinan SUT1 (1 μg - 0,001 μg).

Deteksi protein SUT1 pada tanaman tebu dilakukan pada bagian daun, pelepah, batang atas dan batang bawah dengan dua metoda uji yaitu uji *Ouchterlony* dan *Western Blot*. Berdasarkan uji *ouchterlony*, antibodi poliklonal SUT1 mampu mendeteksi keberadaan protein SUT1 yang terdapat di daun, pelepah, batang atas dan batang bawah pada bagian *insoluble*. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya garis presipitasi pada bagian *insoluble* sedangkan pada bagian *soluble* tidak terbentuk garis presipitasi yang menandakan bahwa pada bagian tersebut tidak terdapat protein SUT1. Hasil ini sesuai dengan laporan Riesmeier *et al.*, (1992) bahwa protein SUT terdapat pada membran plasma. Berdasarkan uji *Western Blot*, antibodi poliklonal SUT1 dapat mendeteksi protein SUT pada tanaman tebu dan tomat.

KESIMPULAN

Antibodi poliklonal SUT1 yang dibuat dengan menggunakan protein rekombinan SUT1 sebagai antigen memiliki titer antibodi tinggi dan dapat mendeteksi keberadaan protein SUT1 pada tanaman tebu dan tomat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian didanai oleh Hibah Penelitian Fundamental 2011 Dirjen Dikti Depdiknas dan sebagian oleh PTPN XI.

DAFTAR PUSTAKA

Crowe, J. 1992. QIA express, The high level expression and protein purification system. Qiagen Inc. Hilden, Germany, 69p.

- Das, A., 1990. Overproduction of Protein in *Escherichia coli*: Vectors, Hosts, and Strategies. In M.P. Deutscher (Ed.) *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymol.* vol. 182. 93-111.
- Dunbar, B.S. and Schwoebel, E.D. 1990. Preparation of Polyclonal Antibodies. In M.P. Deutscher (Ed.) *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology* vol. 182:663-669
- Kuhn, C., L. Barker, L. Burkle, and W.B. Frommer. 1999. Update on sucrose transport in higher plants. *J. of Experiment. Botany* vol. 50 (Special Issue): 935-953.
- Lalonde, S., M. Tegeder, M. Throne-Holst, W.B. Frommer., and J.W. Patrick. 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell Environ.* 26:37-56.
- Rae, A.L., JM perroux, CPL. Grof, 2005. Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem. A potensial role for the ShSUT1 Sucrose Transporter. *Planta* 220 : 817-825.
- Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., Frommer, W. B. 1992. Isolation and Characterization of a Sucrose Carrier cDNA from Spinach by Functional Expression in Yeast. *The EMBO Journal* 11: 4705-4713
- Riesmeier, J.W., L. Willmitzer, and W.B. Frommer. 1994. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *The EMBO Journal* Vol.13 no.1: 1-7.
- Slewinski, T.L., R. Meeley and D.M. Braun. 2009. *Sucrose transporter1* functions in phloem loading in maize leaves. *J. of Experiment. Bot.* vol. 60 (3): 881-892.
- Sugiharto, B., M. Hazmi, Slameto, dan P. Dewanti. 2010. Peningkatan produksi gula melalui overekspresi gen *sucrose phosphate synthase* dan *sucrose transporter* pada tanaman tebu. Laporan penelitian Hibah Kompetensi.
- Timmons, T.M. and Dunbar, B.S. 1990. Protein Blotting and Immunodetection. In M.P. Deutscher (Ed.) *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology* 182:679-687.