

TEKNIK DASAR ANALISIS PROTEIN UNTUK MENUNJANG PENELITIAN PERIKANAN DI ERA “OMICS”

DETEKSI ABNORMALITAS SIRIP PEKTORAL IKAN DENGAN TEKNIK SDS PAGE DAN WESTERN BLOTTING

Oleh; Farikhah, S.Pi,M.Si

*Disampaikan dalam pertemuan Jejaring Laboratorium Propinsi Jawa Timur,
27 September 2018-Hall Sang Pencerah, Universitas Muhammadiyah Gresik*

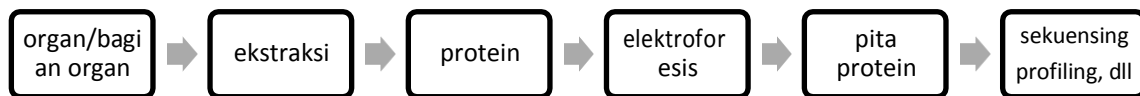
Pendahuluan

Sektor perikanan saat ini dihadapkan pada permasalahan dan tantangan yang semakin kompleks seiring dengan adanya kemajuan teknologi budi daya, tuntutan konsumen, dan perubahan lingkungan global. Tingginya tuntutan masyarakat terhadap produk ikani dari hasil akuakultur sebagai penyeimbang atau pengganti produk tangkapan laut yang menurun (FAO, 2010), membuat semua proses dalam sistem akuakultur harus serba cepat. Di satu sisi, tantangan berupa aneka permasalahan yang sangat bervariasi dan spesifik komoditas (species) terus muncul. Keadaan itu menuntut pengkajian perikanan di tingkat seluler dan molekuler untuk memperoleh data akurat dan solusi yang cepat dan tepat.

Era `Omics` yang bergulir sejak tahun 90'an telah mengeksplorasi level *genomics*, *transkriptomics*, *proteomics*, dan *metabolomics*, di berbagai sektor termasuk sektor perikanan. Prieto-Alamo, *et al* (2012) menguraikan, genomik mempelajari variasi DNA, transkriptomik mengkarakterisasi ekspresi gen-gen secara luas di dalam genom melalui mRNA, proteomik menilai ekspresi protein di dalam sel dan jaringan, serta metabolomik melakukan penilaian global konsentrasi metabolit. Jadi objek penelitian di era 'Omics' menyandarkan diri pada dogma sentral biologi molekuler yaitu DNA melakukan transkripsi untuk menghasilkan mRNA dan kemudian mRNA melakukan translasi untuk menghasilkan protein. DNA, mRNA, protein, serta dilengkapi dengan kuantifikasi metabolits, adalah objeknya. Hasil kajian 'Omics' dapat memberikan informasi molekuler terperinci yang membantu mengidentifikasi respons jalur (*pathway respons*) dan untuk menentukan mekanisme dan mode tindakan tanpa memerlukan pengetahuan sebelumnya.

Makalah ini membatasi objek pembahasan di tingkat protein pada aspek dasar yaitu teknik ekstraksi protein dan elektroforesis dilanjutkan spesifitas gen tertentu dengan teknik *Western Blotting*. Posedur teknis **ekstraksi protein** sangat menentukan

tercapainya tujuan penelitian protein karena sifatnya yang khas dan mudah rusak pada saat berada di luar sistem organisme hidup. Elektroforesis membantu pengenalan karakter protein, berat molekul protein, ekspresi protein dalam sel dan jaringan tertentu, serta mempelajari lebih lanjut aspek fungsionalnya. *Western Blotting* dapat menentukan kelainan mekanisme aksi gen tertentu sehingga mendukung usaha pemecahan masalah dari sisi genetic.



Gambar 1. Tahap-tahap memperoleh profil protein

Ekstraksi Protein

Protein di dalam suatu jaringan ikan yang telah mati mudah mengalami degradasi dan kerusakan. Agar dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama tanpa mengalami kerusakan maka protein harus diisolasi dari organ atau jaringan target. Proses isolasi harus dilakukan segera secepatnya setelah sampel dimatikan atau dikoleksi. Sampel yang masih segar akan menghasilkan isolat protein yang lebih baik daripada sampel yang tidak segar.

Struktur Protein

Ikan adalah organisme yang sebagian besar tubuhnya tersusun dari protein. Dalam tingkat sel pun, protein merupakan komponen utama yang menyusun lebih dari 50% bagian-bagian sel (Fatchiyah dkk, 2011). Protein tergolong dalam biomakromolekul yang sangat heterogen dalam hal ukuran, muatan listrik, bentuk, dan stabilitas saat di luar sistem hidup. Oleh sebab itu diperlukan strategi dan teknik yang tepat dalam mengisolasi atau mengekstraksi protein dari ikan agar kondisinya dapat dipertahankan sama dengan kondisi aslinya dan terhindar dari kerusakan.

Struktur protein terdiri dari rantai polipeptida. Polipeptida tersusun dari rantai peptida. Peptida tersusun dari asam-asam amino yang saling bergabung membentuk rantai asam amino dengan ikatan peptida. Urutan dan jumlah asam amino setiap jenis protein tertentu dan khas. Asam amino sebagai unit dasar dari struktur protein, merupakan atom karbon yang memiliki 4 lengan yang mengikat gugus amino, gugus karboksil, atom H dan gugus R. Berdasarkan gugus R, asam amino terbagi menjadi 4 golongan yaitu (1) Asam amino dengan gugus R nonpolar antara lain Alanin, Leusin, Isoleusin, Prolin, Valin, Metionin, Fenilalanin, dan triptofan. (2) Asam amino dengan gugus R bersifat anion pada pH 6-7, yaitu Asam aspartat dan Asam glutamat (3) Asam

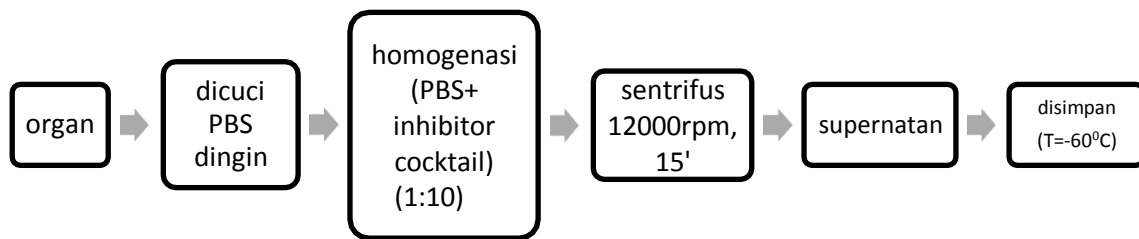
amino dengan gugus R bersifat polar yaitu Glisin, Serin, sistein, Glutamin, Asparagin, Treonin, dan Tirosin (4) Asam amino yang mengandung gugus R bersifat kation pada pH 6-7 yaitu Lisin, Arginin, dan Histidin (Fatchiyah dkk, 2011).

Protein memiliki bentuk struktur yang bertingkat-tingkat yaitu struktur primer, sekunder, tersier, dan kuarterner. Pada struktur primer, hanya ada satu ikatan yang mengikat asam amino satu dengan yang lainnya yaitu ikatan peptida. Ikatan peptida terbentuk dari interaksi dua asam amino melalui gugus amino dan gugus karboksil dengan melepaskan satu molekul H₂O. Ikatan non-kovalen terbentuk pada struktur tersier, antara gugus R pada rantai polipeptida. Selain itu ada pula ikatan disulfida.

Teknis ekstraksi

Bahan-bahan yang harus disiapkan yaitu balok es secukupnya dan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) KCl dingin (PBS, pH 7,5). PBS KCl dibuat dari 8g NaCl (Merck), 1,44g Na₂HPO₄ (Merck), 0,24g KH₂PO₄ (Merck), 0,2g KCl (Merck), dan 1l Akuadest.

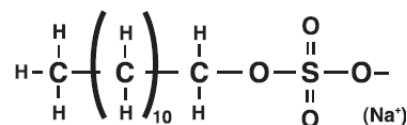
Ikan sampel yang masih hidup disiapkan kemudian dimatikan dengan cara menekan sistem saraf pusat. Ikan diletakkan di atas nampan datar yang berisi balok-balok es. Balok es berfungsi sebagai pengatur temperatur rendah eksternal ikan sehingga protein yang terkandung di dalam ikan sampel tetap terjaga dan terhindar dari kerusakan-kerusakan enzimatik. Ikan diletakkan di atas balok es dan dibedah menggunakan *sectio set* untuk mengambil organ target. Organ target dipotong secukupnya kemudian dicuci 2 kali dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) KCl dingin (PBS, pH 7.5) untuk menghilangkan darah-darah yang menempel. Setelah bersih, organ target ditimbang beratnya (g). Potongan organ ditimbang dengan timbangan analitik (0,000g) dan secara individual dihomogenisasi di dalam mortar dingin dan ditambahkan PBS dingin (pH 7.5). Terlebih dahulu, PBS ditambah dengan *Protein inhibitor cocktail* (Invitrogen, 1 tablet untuk 10ml PBS) dengan rasio 1:10 dari massa basah per volume buffer. Homogenat kemudian disentrifugasi (*Hettich*) pada 12.000rpm selama 15 menit pada 4°C. Supernatan yang terbentuk disedot dengan mikropipet (100µl) lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf (Germany) berlabel 2ml yang aman dan segera dianalisis lebih lanjut untuk elektroforesis atau dibekukan pada -60°C jika tidak langsung segera dielektroforesis saat itu. Kuantifikasi protein dilakukan dengan bantuan NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer.



Gambar 2. Diagram alir ekstraksi protein dari sampel organ padat

Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS–PAGE)

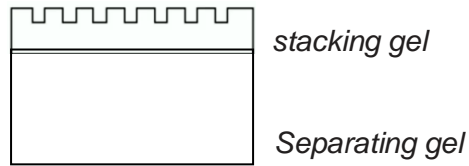
Elektroforesis merupakan teknik memisahkan molekul-molekul penyusun protein berdasarkan berat molekul dengan bantuan aliran listrik. Salah satu cara elektroforesis yang mudah dilakukan yaitu SDS-PAGE. SDS-PAGE adalah cara yang efektif untuk memisahkan protein yang bentuk, muatan, dan ukurannya bermacam-macam. Ada 3 unsur utama dalam melakukan SDS-PAGE yaitu, SDS, gel acrylamide, dan alat elektroforesis. SDS berperan sebagai bahan pendenaturasi polipeptida, yaitu melepaskan struktur sekunder atau tersier sehingga struktur protein yang pada mulanya bervariasi diubah menjadi homogen yaitu berstruktur primer seluruhnya. Disamping sebagai bahan penghomogen struktur protein, SDS juga berperan dalam menghomogenkan muatan listrik seluruh molekul di dalam protein, dari awalnya protein bermuatan bermacam-macam (negatif, positif, tidak bermuatan), maka SDS memberikan muatan negatif pada seluruh protein terdenaturasi. SDS mampu bekerja karena dia memiliki karakteristik yang khas. Molekul SDS mengandung gugus polar dan non polar serta bersifat surfaktan (*surface active agent*). Molekul ini dapat dengan cepat merusak seluruh bangunan membran protein dan bersifat mudah larut dalam NaCl.



Gambar 3. Struktur kimiawi molekul SDS, terdiri dari gugus karboksilat (hidrofilik, polar) dan rantai karbon (hidrofobik, non polar) (Sumber: Edvotek, 2011)

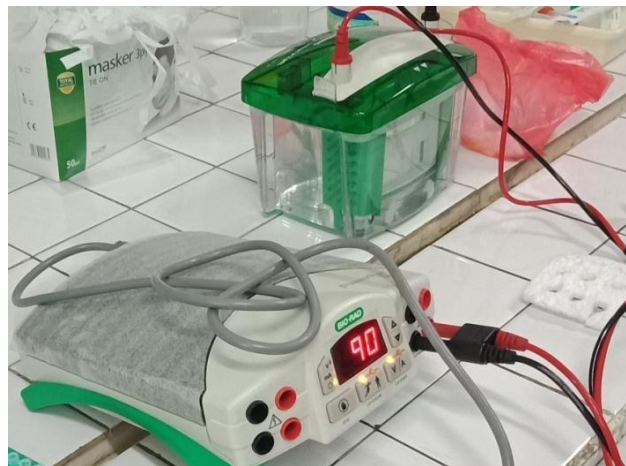
Gel poliakrilamid ideal untuk separasi protein karena sifatnya yang transparan, tidak bereaksi, elektrifitasnya netral, dan bersifat hidrofilik. Gel poliakrilamid dapat diatur tingkat kepekatannya tergantung berat molekul yang ditargetkan. Jika target molekul proteinnya kecil maka gel dapat ditingkatkan kekentalannya, demikian sebaliknya jika target molekulnya besar. Ada dua fungsi gel poliakrilamid di dalam SDS-PAGE, yaitu *stacking gel* dan *separating gel*. Keduanya disusun berlapis di

dalam slab tangki elektroforesis, *separating gel* dan di atasnya dibuat *stacking gel* (Gambar 4). *Stacking gel* viskositas atau kekentalannya lebih rendah (4%) sedangkan *separating gel* lebih tinggi (>10% tergantung berat molekul target).

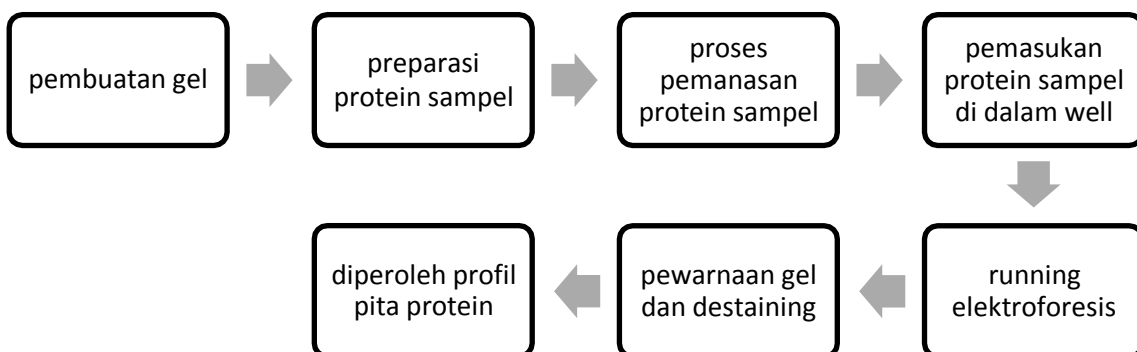


Gambar4. Susunan gel di dalam *slab*

Tangki elektroforesis terdiri dari flat bed, slab, kolom, dan selang. Tangki dilengkapi dengan electric transformer untuk mengubah arus AC menjadi DC.



Gambar 5. Perangkat alat elektroforesis terdiri dari tangki elektroforesis dan pengubah daya (sumber: dokumentasi pribadi, 2018)



Gambar 6. Diagram alir langkah-langkah SDS PAGE

Bahan-bahan

Bahan-bahan yang disiapkan yaitu separating gel, stacking gel, TEMED, RSB, larutan pewarna coomassie blue, dan larutan destaining. Separating gel 12% dan stacking gel 4% mengikuti standar alat elektroforesis. Jika menggunakan mini protean electrophoresis (BioRad), Separating gel 12% dibuat dari 4ml Acrylamide 30% (Sygma), 2.5ml Tris-HCL 1.5M pH 8.8 (Bio World), 3,4ml H₂O, 0,1ml SDS 10% (Sygma), 50µl Aps 10% (Sygma), dan 10µl Temed (Nacalay Tesque). Stacking gel 4% gel dibuat dari komposisi 1.3ml Acrylamide 30% (Sygma), 2.5ml Tris-HCl 1.5M pH 6.8, 6.1ml H₂O, 0.1ml SDS 10%, 50µl Aps 10%, dan 10µl Temed. Reducing Sample Buffer (RSB) dibuat dengan komposisi Tris-Cl pH 6,8 sebanyak 1ml, Gliserol (Nacalay Tesque) 0,8ml, SDS 10% (m/v) 1,6ml, Beta-mercaptoetanol (Sygma) 0,4ml, Bromo Phenol Blue (Sygma) 1% (m/v) 0,2ml, dan H₂O 8ml. Larutan pewarna coomassie blue dibuat dengan komposisi 0,25g Coomassive Blue (R, Sygma) 0,1%, 40ml metanol (Merck) 40%, 10ml asam asetat glasial (Merck) 10%, lalu ditambah 100ml H₂O. Larutan destaining dibuat dari 20ml Metanol (Merck) 20%, 10ml asam asetat glasial 10% dan 100ml H₂O.

Sampel protein dikeluarkan dari freezer penyimpanan dan dicairkan. Diambil sampel protein sebanyak 20µl lalu ditambahkan RSB dengan perbandingan 1:1, dimasukkan ke dalam eppendorf 20ml. Bersama eppendorf, sampel dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Sampel selanjutnya dimasukkan dalam sumuran gel. Sampel dirunning pada 200mV selama 90 menit. Gel diangkat lalu diwarnai dengan larutan Coomassive Blue (R, Sygma) 0,1% selama 2-4jam. Setelah masa inkubasi, larutan pewarna dibuang dan diganti dengan larutan destaining, diinkubasi hingga backgroundstain benar-benar hilang. Gel diletakkan dalam UV transiluminator lalu difoto. Selanjutnya diamati pita protein yang terbentuk menggunakan *Gel Doc EZ Imager*.

Western Blotting

Western blot adalah teknik yang digunakan untuk mendeteksi protein spesifik di dalam suatu homogenate atau ekstrak jaringan tertentu (Laemmli, 1970). Teknik ini mulai berkembang pesat sejak ditemukannya teknik transfer protein dari gel ke membrane, pada tahun 1979 (Kurien, 2006). Teknik ini dianggap bermanfaat besar karena dapat mendeteksi satu protein tertentu yang terkandung di dalam homogenate dan dapat memberi informasi tentang protein tersebut. Dasar teoritis teknik ini adalah penggunaan antibody tertentu yang akan berinteraksi dengan antigen di dalam protein. Prinsip kerjanya, berdasarkan Yang & Ma (2009) seperti tertera di Gambar 7.



Gambar 7. Prinsip kerja Western Blotting (modifikasi dari Yang, 2009)

Prosedur Western blotting

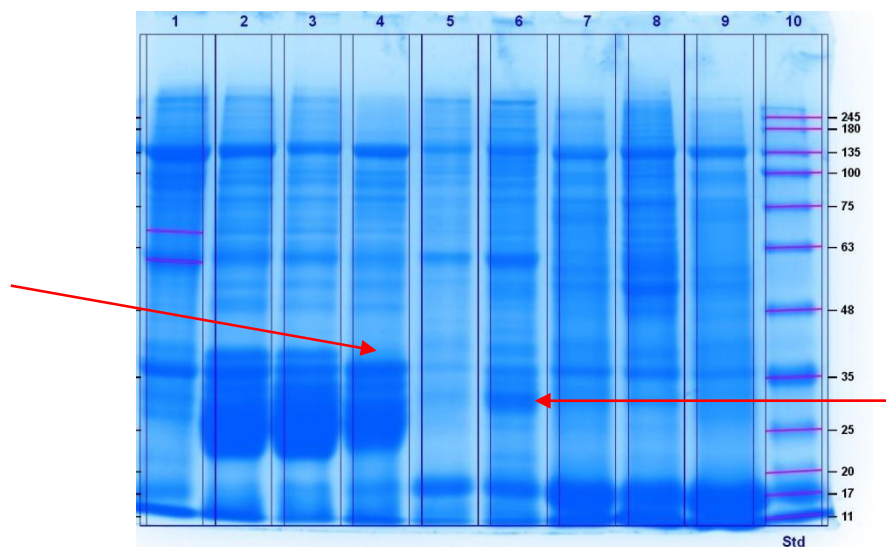
Sampel protein dikeluarkan dari freezer -60°C dan dithawing. Protein dielektroforesis menggunakan prosedur yang sama dengan SDS PAGE. Pita protein yang terbentuk ditransfer ke dalam membran Nitroselulose (Amersham Bioscience) dengan sistem Semi Dry Transfer Membrane (BioRad) pada 20V selama 2jam. Sebelumnya, membran dan gel direndam dalam transfer buffer selama 30menit. Setelah proses transfer, membran diangkat, dipastikan bahwa pita telah tertransfer, dengan menggunakan Larutan Ponceau (Sygma). Dilakukan blocking dengan cara merendam membran dalam 5% susu instan tanpa lemak Carnation di TBST 1jam di dalam refrigerator. Membran dicuci TBST 0,05% (Sygma) dengan cara perendaman selama 3menit sambil digoyang-goyang pelan. Pencucian dilakukan berulang sebanyak 3kali. Membran kemudian diinkubasi dengan antibodi primer selama overnight. Membran dicuci TBS% 0,05% dengan cara yang sama dengan di atas, selama 3menit diulang 3kali. Membran diinkubasi dalam antibodi sekunder. Membran kemudian dicuci TBST 0,05% (Sygma) sebanyak 3x3menit. Inkubasi dengan SA-HRP selama 40menit kemudian dicuci TBST 0,05% (Sygma) sebanyak 3x3menit. Inkubasi terakhir dengan menggunakan cairan substrat TMB-membran substrate (KL) selama 10menit. Membran dipindai menggunakan Epson scanner dan difoto menggunakan kamera digital.

Penggunaan SDS PAGE & *Western Blotting* untuk profiling protein ikan lele Afrika *C.gariepinus* bersirip pektoral abnormal

Protein mengandung informasi yang spesifik tentang kondisi internal maupun eksternal suatu organism (Bradley, 2009). Kondisi internal berarti kinerja gen-gen yang bertanggung jawab penuh dalam mengekspresikan protein. Kondisi eksternal berarti adakah *factor stress* yang dialami oleh ikan sehingga ikan tersebut melakukan proses adaptasi dan terhadap kondisi yang dialaminya. Ekspresi protein juga spesifik fase hidup, ukuran, umur, dan jenis organ ikan. Ikan yang hidup di fase juvenile akan

berbeda profil proteiinya dengan ikan dewasa. Setiap organ yang ada pun, akan mengekspresikan profil protein yang berbeda-beda pula.

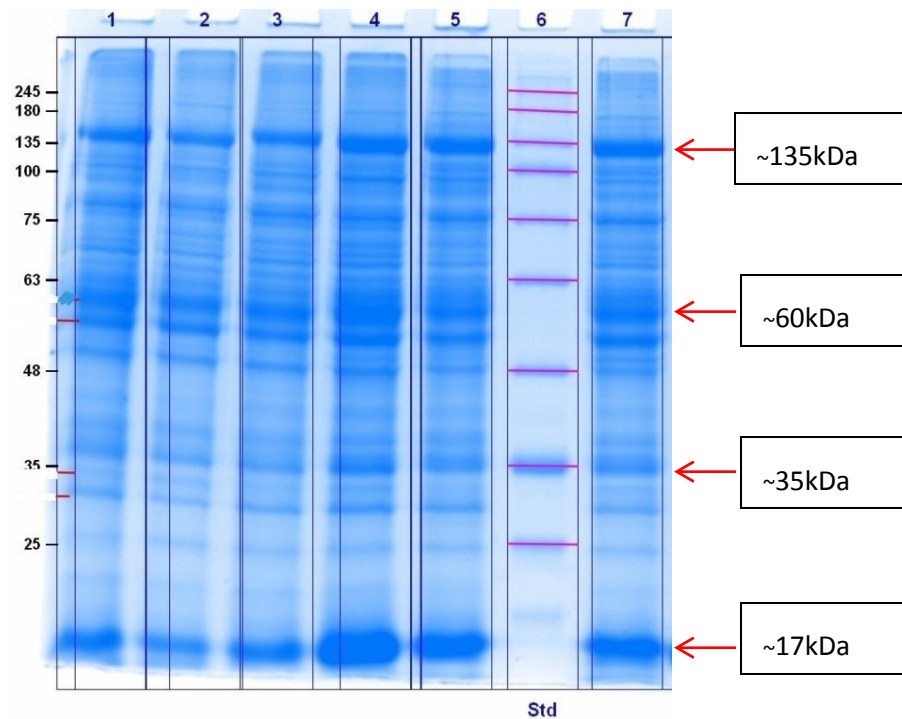
Abnormalitas pada ikan budi daya adalah permasalahan lama yang telah diteliti selama lebih dari 40 tahun ke belakang akan tetapi permasalahan ini masih tetap terjadi sampai dengan hari ini. Berbagai kajian ditinjau dari aspek eksternal telah banyak dilakukan dan sebaliknya tinjauan dari aspek internal sangat jarang dilakukan. Adanya kelainan pada sirip pektoral ikan lele dumbo *C.gariepinus* tidak dapat dijelaskan lebih jauh apabila hanya mengamati morfologisnya saja. Untuk itu dilakukan elektroforesis pada ikan abnormal sirip pektoral dan sebagai pembandingnya adalah ikan bersirip pektoral normal, menggunakan teknik SDS-PAGE dan standard *wide range* (sd 245kDa). Hasilnya diperoleh profil protein Gambar 8. Berdasarkan gambar tersebut diketahui bahwa pita protein ikan bersirip pektoral abnormal yang berbeda dari ikan normal ditemukan di organ mata (lane 4; berat molekul 38kDa) dan organ arborescent (lane 6; berat molekul 30kDa). Berdasarkan kajian literature, diketahui bahwa protein dengan berat molekul kecil <50kDa, adalah kelompok protein yang berperan dalam *signaling* atau protein-protein fungsional.



Gambar 8. Salah satu contoh profil ekspresi protein yang diperoleh dari teknik SDS-PAGE (separating gel 10%, dengan *ladder wide-range*)(sumber: dokumentasi pribadi, 2018)

Dengan asumsi bahwa abnormalitas sirip pektoral adalah disebabkan (salah satunya) oleh kinerja gen *Tbx5* yang berubah dari kondisi normal, maka ingin dicari ekspresi protein, berorientasi pada protein *TBX5* (60kDa). Running SDS-PAGE pun diulang dengan meningkatkan viskositas separating gel dari 10% menjadi 12%. Hasilnya didapat profil pita protein di Gambar 9. Homogenat yang digunakan diperoleh dari jaringan jantung ikan lele dumbo *C.gariepinus* bersirip pektoral abnormal (lane 4,5,7) dan ikan bersirip pektoral normal (lane 1-3). Hasilnya diperoleh pita protein yang

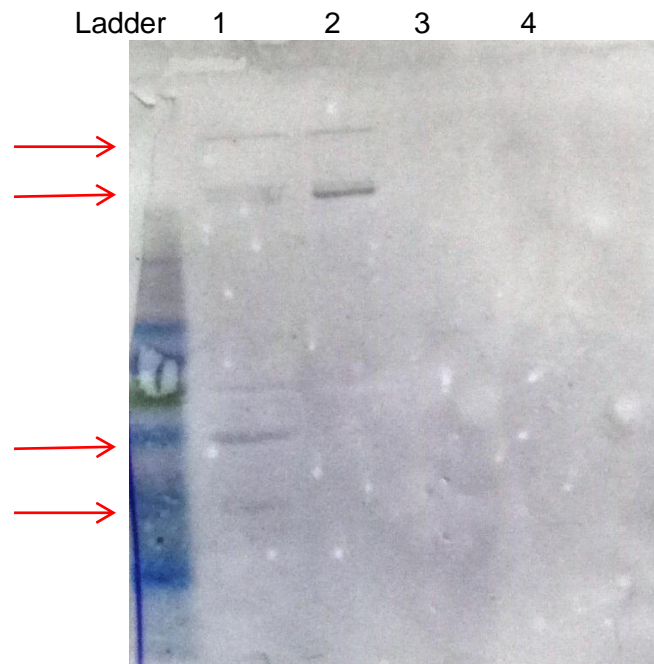
hampir sama antara ikan abnormal dan ikan normal, namun pada ikan abnormal, beberapa protein di berat molekul (tanda panah merah).



Gambar 10. Salah satu contoh profil ekspresi protein yang diperoleh dari teknik SDS-PAGE (separating gel 10%, dengan ladder wide-range)(sumber: dokumentasi pribadi, 2018)

Pada berat molekul 135kDa, 60kDa, 35kDa, dan 17kDa, terlihat bahwa ikan bersirip pektoral abnormal memiliki jumlah protein yang lebih banyak dibandingkan dengan ikan normal. Jumlah molekul yang lebih banyak menunjukkan produksi gen-gen tertentu yang bertanggung jawab atas hal itu, berlimpah. Perlu diingat bahwa protein yang ada di setiap posisi berat molekul itu belum spesifik, masih beraneka ragam. Jadi seluruh jenis protein yang memiliki berat molekul sama, akan terkonsentrasi di posisi yang sama.

Kita tidak dapat mengetahui jenis protein apakah yang berlimpah di jaringan ikan abnormal, hanya dengan SDS PAGE sehingga jika ika ingin mengetahuinya, maka analisis dilanjutkan dengan uji spesifitas protein, yaitu dengan *Western Blotting*. Di sini kita membutuhkan antibody khusus agar dapat memperoleh jawaban. Hasilnya seperti tertera di Gambar 11.



Gambar 10. Salah satu contoh hasil *Western Blotting* pada ikan lele dumbo *C.gariepinus* abnormal bersirip pektoral abnormal (lane 1-2) dan bersirip pektoral normal (lane 3-4) (sumber: dokumentasi pribadi, 2018)

Penutup

Makalah ini membahas objek pembahasan di tingkat protein pada aspek dasar yaitu teknik ekstraksi protein dan elektroforesis dilanjutkan spesifitas gen tertentu dengan teknik *Western Blotting*. Posedur teknis **ekstraksi protein** sangat menentukan tercapainya tujuan penelitian protein karena sifatnya yang khas dan mudah rusak pada saat berada di luar sistem organisme hidup. Elektroforesis membantu pengenalan karakter protein, berat molekul protein, ekspresi protein dalam sel dan jaringan tertentu, serta mempelajari lebih lanjut aspek fungsionalnya. *Western Blotting* dapat menentukan kelainan mekanisme aksi gen tertentu sehingga mendukung usaha pemecahan masalah dari sisi genetic.

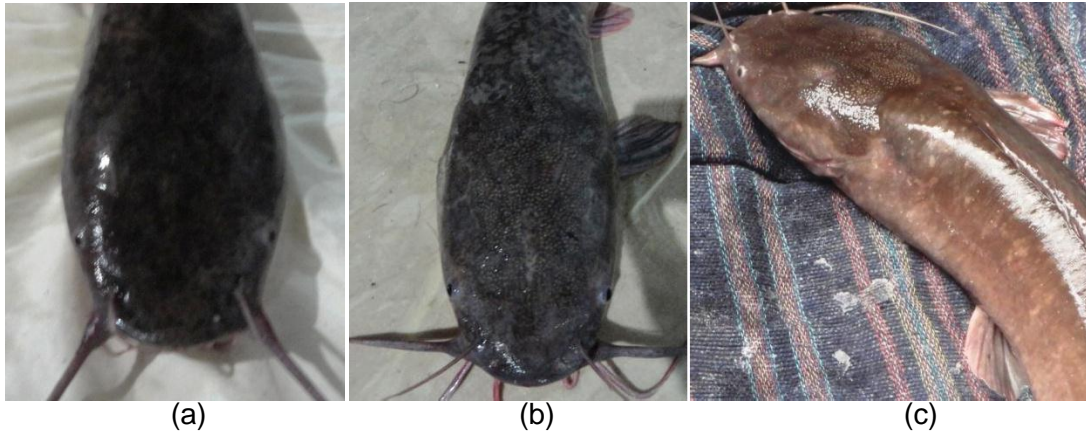
DAFTAR PUSTAKA

- Bradley, B.P., B. Kalampanayil, and M.C.O'Neill. 2009. Protein expression profiling. *Methods in Molecular Biology*, 519: 455-68.
- Edvotek, 2011. *Diversity of Proteins*. The Biotechnology Education Company. www.edvotek.com
- Fatchiyah, EL. Arumingtyas, S.Widyarti, S.Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler-Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. Jakarta
- Laemmli, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*;227:680-685.

Prieto-Alamo, M.J, E.O. Jimenes, N. Abril, J. Alhama. 2012. Omics Methodologies:
New Tools in Aquaculture Studies.
<https://www.researchgate.net/publication/221923323>

Yang, Y, H. Ma. 2009. Western Blotting and ELISA Techniques. Researcher 1(2):67-
86

Lampiran 1. Berbagai bentuk abnormalitas sirip pektoral ikan lele dumbo *C.gariepinus*



(a) (b) (c)
Gambar 1. Ikan lele dumbo *C.gariepinus* bersirip pektoral abnormal, tak bersirip pektoral (a), hilang sirip pektoral kanan (b), dan hilang sirip pektoral kiri (c) (sumber: dokumentasi pribadi, 2013)



Gambar 2. Individu bersirip pektoral abnormal sekaligus bersirip ventral abnormal (sumber: dokumentasi pribadi, 2013)



Gambar 3. Berbagai bentuk kecacatan sirip pektoral pada ikan lele dumbo *C.gariepinus* (sumber; dokumentasi pribadi, 2016)