

MODUL PRAKTIKUM BIOLOGI MOLEKULER
“DASAR-DASAR TEKNIK ISOLASI PROTEIN”



Uhamka
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

Oleh Dr. Suci Lestari, M.Pd.

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
JAKARTA
2023

Dasar-dasar Teknik Isolasi Protein

Tujuan Praktikum

1. Mahasiswa mengetahui teori dan prinsip kerja dari isolasi protein
2. Mahasiswa mengetahui metode ekstraksi dan presipitasi protein
3. Mahasiswa mengetahui alat, bahan, dan cara kerja isolasi protein bakteri

PENDAHULUAN

Protein adalah salah satu molekul organik yang paling melimpah dalam sistem kehidupan dan memiliki rentang fungsi yang paling beragam dari semua makromolekul, merupakan polimer dari monomer-monomer asam amino yang dihubungkan satu sama lain dengan ikatan peptida yang mengandung unsur-unsur C, H, O, N dan ada pula yang mengandung unsur S dan P.

Untuk mempelajari suatu protein secara detail, peneliti harus dapat memisahkannya dari protein lain dalam bentuk murni dan harus memiliki teknik untuk menentukan sifat-sifatnya. Metode klasik untuk memisahkan protein memanfaatkan sifat yang bervariasi dari satu protein ke protein berikutnya, termasuk ukuran, muatan, dan sifat pengikatan. Sumber protein umumnya adalah jaringan atau sel mikroba. Tahapan isolasi protein terdiri dari **Ekstraksi** dan **Presipitasi**.

I. EKSTRAKSI PROTEIN

Langkah pertama dalam prosedur pemurnian protein adalah membuka sel-sel ini, melepaskan proteinnnya ke dalam larutan yang disebut ekstrak kasar. Untuk mengisolasi protein intraseluler, sel harus dirusak/ lisis. Metode lisis sel dibedakan menjadi:

- a. Metode lisis kimia: dengan alkali, enzim atau detergen. Dapat meminimalisir denaturasi.
- b. Metode lisis fisik: menggunakan sonikasi, pressure cell, homogenizer, bead beater. Lebih ekonomis dan untuk skala preparasi sel yang banyak.

Keberhasilan lisis sel tergantung pada sejumlah variabel, seperti pilihan buffer, keberadaan inhibitor protease, dan osmolaritas buffer resuspensi. Kondisi dan konstituen buffer ekstraksi untuk prosedur isolasi protein bergantung pada: Tipe sample; Lokasi protein yang diinginkan; Hasil protein yang diperlukan; Aplikasi yang akan dilakukan selanjutnya: Western blotting, ELISA, GEL Shift Assay (EMSA), reporter assay, mass spectrometry, immunoprecipitation (IP)

Protein sangat sensitif terhadap perubahan di lingkungan alaminya, sehingga setiap perubahan yang terjadi akan meningkatkan risiko degradasi, denaturasi dan presipitasi. Untuk menghindari hal tersebut, kondisi tertentu harus dipenuhi untuk menjaga integritas dan aktivitasnya. Protein sangat tidak stabil selama ekstraksi protein, karena adanya pH, suhu, dan konsentrasi ion yang berbeda dalam larutan.

Hal yang perlu dilakukan untuk melindungi protein selama **proses ekstraksi** adalah sebagai berikut:

1. Mempersiapkan buffer

Faktor yang memengaruhi pemilihan buffer: pK_a (pH buffer) dan efek suhu, interaksi dengan komponen lain (enzim atau ion metal), kompatibilitas dengan teknik purifikasi yang berbeda, absorpsi UV, permeabilitas melalui membrane biologi, dan biaya.

Lingkungan buffer yang baik harus disediakan untuk menghindari perubahan pH yang tiba-tiba. Buffer biologis yang paling umum digunakan (fosfat, Tris, MOPS dan HEPES) memiliki pK_a (pH buffer) mendekati 7 sehingga dapat digunakan pada pH fisiologis.

2. Menggunakan inhibitor protease

Penggunaan inhibitor protease berguna untuk mencegah terjadinya proteolisis karena proteolisis dapat menghasilkan protein yang terdegradasi. Ekstraksi harus dilakukan pada suhu yang tepat. Sementara protein dari sel mamalia dan bakteri dapat diekstraksi pada suhu 37°C, protein nabati harus diekstraksi pada suhu yang jauh lebih rendah (4°C) untuk mengurangi aktivitas protease yang ada dalam larutan. Gunakan garam, inhibitor protease/peptidase, osmolit dan zat pereduksi dalam jumlah yang tepat untuk membantu proses ekstraksi. *Protease inhibitor harus digunakan selama preparasi ekstrak dari tumbuhan karena vakuola pada tumbuhan mengandung alkaloid dan berbagai hidrolase seperti protease.*

3. Menggunakan detergen

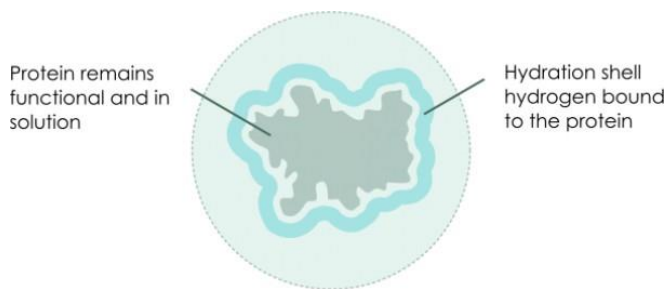
Deterjen yang meningkatkan kelarutan protein dapat digunakan paling efektif dengan mempertimbangkan kondisi media percobaan, terutama buffer. Penggunaan deterjen yang sesuai, memungkinkan protein yang sulit diekstraksi (protein membran atau protein inti) juga dapat diperoleh dalam jumlah yang diinginkan. Detergen akan *berikatan dengan membran sel dan menginisiasi pelisisan sel*, meningkatkan *solubilisasi membran dalam bentuk kompleks detergen-lipid-protein*. Dapat juga membentuk *kompleks detergen-protein dan kompleks detergen-lipid*. Beberapa teknik gangguan, baik mekanik (Fisik) dan kimia, dapat dilihat pada Tabel 1 berikut:

| Teknik | Prinsip | Waktu lisis | Contoh |
|-------------------------|---|-------------|--|
| <i>Enzyme digestion</i> | Pencernaan dinding sel menyebabkan gangguan osmotik membran sel | 15-30 menit | Bakteri gram positif, lisis enzimatik menghasilkan lisat yang bebas DNA kromosomal karena enzim litik dapat membentuk lubang yang cukup besar hanya untuk mengeluarkan protein. Sel khamir dapat dihancurkan dengan berbagai enzim seperti zymolase, lyticase. |

| | | | |
|--------------------------------------|--|-------------|--|
| <i>Osmotic shock lysis</i> | Gangguan osmotik membran sel | < 5 menit | Sel darah merah |
| <i>Hand homogenization</i> | Sel dipaksa melalui celah sempit yang menyebabkan gangguan pada membran sel | 10-15 menit | Jaringan hati |
| <i>Blade homogenizer</i> | Sel-sel besar dipecah dengan tindakan pemotongan | 5-10 menit | Jaringan otot, jaringan hewan, jaringan tumbuhan |
| <i>Grinding with alumina or sand</i> | Dinding sel robek oleh kekasaran mikro | 5-15 menit | Bakteri |
| <i>Grinding with glass beads</i> | Dinding sel terkoyak oleh getaran kaca yang cepat | 10-20 menit | Bakteri |
| <i>French press</i> | Sel dipaksa melalui lubang kecil pada tekanan yang sangat tinggi. Gaya geser mengganggu sel. | 10-30 menit | Bakteri, sel tumbuhan |
| <i>Sonication</i> | Gangguan sel oleh gaya geser dan kavitasi yang disebabkan oleh gelombang suara bertekanan tinggi | 5-10 menit | Bakteri |

II. PRESIPITASI PROTEIN

Presipitasi atau pengendapan protein dilakukan untuk 2 tujuan yaitu *memisahkan protein dari kontaminan* yang tidak diinginkan dan memurnikan serta *mengkonsentrasikan protein yang diperoleh*. Hasil ekstraksi protein umumnya menghasilkan sejumlah besar protein encer, karena bahan awal biasanya diperlukan dalam jumlah besar untuk memanen protein dalam jumlah yang cukup. Oleh karena itu protein perlu diendapkan dengan memicu terbentuknya agregasi hidrofobik melalui 2 cara berikut:



1. Gangguan halus pada struktur lipatan protein agar lebih banyak interior hidrofobik terekspos ke larutan.

2. Dehidrasi cangkang (hydration shell) molekul air yang mengelilingi tambalan hidrofobik pada permukaan protein yang terlipat dengan benar

Ketika protein telah menggumpal (agregasi) menjadi struktur yang lebih besar, jumlah air per protein sangat berkurang dan perbedaan densitas antara protein dan zat terlarut meningkat

secara signifikan. Jika agregat yang terbentuk cukup besar untuk mengganggu jalur cahaya melalui larutan, maka dapat dibuat pelet dengan sentrifugasi. Pelarut ekstra dan kontaminan lain yang tidak diinginkan kemudian dihilangkan agar ideal untuk penggunaan selanjutnya.

Meskipun ada beberapa metode presipitasi yang berbeda, dua yang paling populer adalah Salt Induced Precipitation (“Salting Out”) dengan amonium sulfat atau Precipitation Isoelectric dengan asam trikloroasetat. Tabel 2 berikut, mencantumkan beberapa teknik pengendapan yang dapat digunakan. Jika preparasi sampel memerlukan presipitasi, biasanya hanya satu teknik presipitasi yang digunakan.

Tabel 2. Prosedur Presipitasi

| Metode Preparasi | Prosedur Umum | Keterbatasan |
|---|---|--|
| <p>Presipitasi amonium sulfat (“Penggaraman”)</p> <p>Dengan adanya konsentrasi garam yang tinggi, protein cenderung beragregasi dan mengendap dari larutan. Banyak kontaminan potensial (misalnya asam nukleat) akan tetap berada dalam larutan.</p> | <p>Siapkan protein sehingga konsentrasi akhir larutan protein > 1 mg/mL dalam larutan buffer > 50 mM dan mengandung EDTA. Perlahan tambahkan amonium sulfat ke persentase saturasi yang diinginkan (44) dan aduk selama 10–30 menit. Protein pelet dengan sentrifugasi.</p> | <p>Banyak protein tetap larut pada konsentrasi garam yang tinggi, sehingga metode ini tidak dianjurkan ketika representasi protein total diinginkan.</p> <p>Metode ini dapat, bagaimanapun, digunakan untuk prefraksinasi atau pengayaan. Amonium sulfat sisa akan mengganggu IEF dan harus dihilangkan melalui proses penghilangan garam yang dapat dilakukan dengan dialysis, contohnya menggunakan <i>Desalting sampel menggunakan Mini Dialysis Kit</i>.</p> |
| <p>Presipitasi TCA</p> <p>TCA (asam trikloroasetat) adalah pengendap protein yang sangat efektif.</p> | <p>TCA ditambahkan ke ekstrak hingga konsentrasi akhir 10-20% dan protein dibiarkan mengendap di atas es selama 30 menit. Atau, jaringan dapat dihomogenisasi langsung dalam 10-20% TCA.</p> <p>Pendekatan ini membatasi proteolisis dan modifikasi protein lainnya.</p> <p>Sentrifugasi dan cuci pelet dengan aseton atau etanol untuk menghilangkan sisa TCA.</p> | <p>Protein mungkin sulit untuk dilarutkan kembali dan mungkin tidak dapat dilarutkan kembali sepenuhnya. Sisa TCA harus dihilangkan dengan pencucian ekstensif dengan aseton atau etanol.</p> <p>Pemaparan yang lama terhadap larutan pH rendah ini dapat menyebabkan beberapa degradasi atau modifikasi protein.</p> |
| <p>Pengendapan aseton</p> <p>Pelarut organik ini biasanya digunakan untuk mengendapkan protein. Banyak kontaminan organik-</p> | <p>Tambahkan setidaknya tiga volume aseton dingin ke dalam ekstrak. Biarkan protein mengendap pada -20 C selama minimal 2 jam. Protein pelet</p> | <p>Pemulihan protein tidak lengkap semua.</p> <p>Kompatibilitas aseton dengan tabung mungkin menjadi</p> |

| | | |
|---|--|--|
| larut (misalnya deterjen, lipid) akan tetap dalam larutan. | dengan sentrifugasi. Aseton sisa dihilangkan dengan pengeringan udara atau liofilisasi. | masalah. |
| Pengendapan dengan TCA dalam aseton Kombinasi TCA dan aseton biasanya digunakan untuk mengendapkan protein selama preparasi sampel untuk elektroforesis 2-D, dan lebih efektif daripada TCA atau aseton saja. | Suspensikan sampel yang lisis atau dirusak dalam 10% TCA dalam aseton dengan 2-merkaptotanol 0,07% atau 20 mM DTT. Endapkan protein setidaknya selama 45 menit pada -20 °C. Sentrifugasi protein untuk memperoleh pellet dan cuci pelet dengan aseton dingin yang mengandung 0,07% 2-merkaptotanol atau 20 mM DTT. Hilangkan sisa aseton dengan pengeringan udara atau liofilisasi. | Protein mungkin sulit untuk dilarutkan kembali dan mungkin tidak dapat dilarutkan kembali sepenuhnya. Pemaparan yang lama terhadap larutan pH rendah ini dapat menyebabkan beberapa degradasi atau modifikasi protein. |
| Pengendapan dengan amonium asetat dalam metanol setelah ekstraksi fenol Teknik ini telah terbukti berguna dengan sampel tanaman yang mengandung zat pengganggu tingkat tinggi. | Protein dalam sampel diekstraksi menjadi air atau fenol jenuh buffer. Protein diendapkan dari fase fenol dengan amonium asetat 0,1 M dalam metanol. Pelet dicuci beberapa kali dengan amonium asetat dalam metanol dan kemudian dengan aseton. Sisa aseton diuapkan | Caranya rumit dan memakan waktu |

<https://www.sigmaaldrich.com/ID/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-lysis-and-extraction/precipitation-procedures>

PREPARASI EKSTRAKSI DARI BAKTERI

Alat dan Bahan

| Alat | Bahan |
|---|-------------------------------|
| 1. Sonikator | 1. <i>Buffer</i> fosfat pH 7 |
| 2. Mikropipet ukuran 1-10ul | 2. Kultur agar <i>E. coli</i> |
| 3. Mikropipet ukuran 10-100ul | 3. Microtube 1.5ml |
| 4. Mikropipet ukuran 100-1000ul | 4. Tips putih |
| 5. <i>Centrifuge</i> 4° C (lab instrumentasi terpadu) | 5. Tips kuning |
| 6. Ice box | 6. Sarung tangan lateks |
| 7. Gabus pengapung | 7. Plastik limbah |
| 8. Ose | 8. Es batu |
| | 9. RNase & DNase (optional) |

Cara Kerja

1. Dimasukkan pellet bakteri ke dalam microtube 1.5 sebanyak kurang lebih 100µg.
2. Pellet disuspensikan dengan menambahkan 200µl buffer fosfat, kemudian dihomogenisasi.
3. Tabung diletakkan pada gabus pengapung kemudian dimasukkan ke dalam sonikator.
4. Sonikator dinyalakan selama 30 menit.
5. Apabila terbentuk gelembung pada suspensi, alat dimatikan sebentar hingga gelembung hilang, kemudian dinyalakan lagi hingga total waktu kerja 30 menit.
6. Setelah disonikasi, tabung dipindahkan ke centrifuge 4° C dan disentrifugasi pada 12.000 g selama 1 jam.
7. Supernatant didekantasi ke microtube baru dan disimpan pada -20° C.

Supernatant yang diperoleh belum merupakan protein murni, masih berupa ekstrak kasar protein, sehingga selanjutnya harus dilakukan proses presipitasi protein.

Presipitasi kloroform/metanol

Metode ini bekerja sangat baik untuk mengendapkan protein dari berbagai sumber, dan menghasilkan bahan protein kering yang bebas garam dan deterjen. Berikut langkah kerja protokol ini:

1. Tambahkan air pada ekstrak protein yang jumlahnya telah ditentukan sebelum hingga volumenya 100 ul.
2. Tambahkan metanol sebanyak 4 x volume (400 ul) dan vortex dengan baik.
3. Tambahkan kloroform sebanyak 1 x volume (400 ul) dan vortex kuat-kuat.
4. Sentrifugasi selama dua menit pada 15000 x g. Protein akan terlihat sebagai lapisan kue wafer tipis atau serpihan melingkar pada antarmuka cairan. Namun, ada kalanya protein yang diendapkan tidak terlihat.
5. Buang air lapisan atas (campuran air-metanol) tanpa mengganggu antarmuka.
6. Tambahkan 4 x volume metanol untuk mencuci endapan.
7. Vortex dengan kuat dan sentrifus selama dua menit pada 15000 x g.
8. Buang supernatan sebanyak mungkin tanpa mengganggu endapan halus yang menempel pada dinding atau mengendap di dasar tabung.
9. Keringkan di bawah vakum atau nitrogen.
10. Pellet dilarutkan dalam buffer yang sesuai dan siap disimpan untuk penggunaan selanjutnya. (dapat di simpan di suhu ruang 1-2 hari atau di suhu 4°C)

Daftar Pustaka

- Ahmed, H. 2005. *Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization*. CPC Press LLC, Florida: xx + 379 hlm.
- Berg, J.M., J.L.Tymoczko, & L. Stryer. 2007. *Biochemistry*. 6th Ed. W. H. Freeman and Company, New York: xxxv + 1156 hlm.
- Nelson, L.D. & M.M.Cox. 2008. *Lehninger Principle of Biochemistry*. 5th Ed. W. H. Freeman and Company, New York: xxix + 1284 hlm.

<https://www.sigmaaldrich.com/ID/en/technical-documents/technical-article/protein->

[biology/protein-lysis-and-extraction/precipitation-procedures](#)