Jurnal PDGI
Vol. 64, No. 1, Januari-April 2015 | Hal. 11-16 | ISSN 0024-9548

Purifikasi *secretory leukocyte protease inhibitor* membran amnion rekombinan sebagai kandidat biomaterial menggunakan kromatografi afinitas

(*Purification of recombinant secretory leukocyte protease inhibitor amniotic membrane as a biomaterial candidat by chromatography affinity*)

Meiriani Putri, Elly Munadziroh, dan **Soebagio**
Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
Surabaya-Indonesia

Korespondensi *(correspondence)*: Meiriani Putri, Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jln. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: meiriani_020911044@yahoo.com

ABSTRACT

Background: *SLPI is a non-glycosylated protein as a biomaterial active in the wound healing process. Recombinant SLPI Amniotic Membrane expressed in E.coli BL21 star with histidin tag. Purification performed using affinity chromatography with Ni-NTA column.* ***Purpose:*** *Purify recombinant SLPI amniotic membrane as a biomaterial candidat using affinity chromatography with Ni-NTA column.* ***Method:*** *Rocked recombinant SLPI amniotic membrane with Ni-NTA column. Eluted Ni-NTA bound protein by imidazole. Optimization of the concentration gradient of imidazole with a storied, 50, 100, 150 and 200 mM. Results calculated elution of protein concentration using Bradford assay.* ***Results:*** *Decrease in the concentration of the flowtrough and washing than the crude, from 3,745 decrease to 1,857 for flowtrough and 1,348 for washing. Significant increase in the concentraation of the elution concentration of 50 mM imidazole of a second fraction at 1,0125, third fraction at 0,9225, and fourth fraction at 0,7425. In fractions of 100 mM and 200 mM obtained a low protein concentration.* ***Conclusion:*** *Recombinant SLPI amniotic membrane can be purified using affinity chromatography with Ni-NTA column.*

Keywords: *SLPI; chromatography affinity; Ni-NTA column*

ABSTRAK

Latar belakang: SLPI adalah protein non glikosilasi sebagai biomaterial aktif penyembuhan luka. SLPI membran amnion rekombinan diekspresikan pada E.coli BL21 star telah dilengkapi tag histidin. Purifikasi dilakukan menggunakan kromatografi afinitas dengan kolom Ni-NTA. Tujuan: Memurnikan SLPI membran amnion rekombinan sebagai kandidat biomaterial menggunakan kromatografi afinitas dengan kolom Ni-NTA. Metode: SLPI membran amnion rekombinan dimasukkan dalam kolom Ni-NTA. Elusi protein yang terikat pada Ni-NTA menggunakan imidazol. Optimasi konsentrasi imidazol dengan gradien bertingkat, yaitu 50, 100, 150 dan 200 mM. Hasil elusi dihitung konsentrasi protein menggunakan Bradford assay. Hasil: Penurunankonsentrasi pada flowthrough dan washing dibandingkan dengan ekstrak kasar, yaitu dari 3,745 menjadi 1,857 untuk flowtrough dan 1,348 untuk washing. Peningkatan konsentrasi yang bermakna pada konsentrasi imidazol 50 mM fraksi ke-2 sebesar 1,0125, fraksi ke-3 sebesar 0,9225 dan fraksi ke-4 sebesar 0,7425. Pada fraksi-fraksi imidazol 100 mM sampai 200 mM didapatkan konsentrasi protein yang rendah. Simpulan: SLPI membran amnion rekombinan dapat dimurnikan menggunakan kromatografi afinitas dengan kolom Ni-NTA.

Kata kunci: *SLPI; kromatografi afinitas; kolom Ni-NTA*

PENDAHULUAN

Konsep perawatan dan penyembuhan luka saat ini telah berkembang, seiring berkembangnya biomaterial di bidang kedokteran gigi. Material alami saat ini dipertimbangkan pemakaiannnya karena mengandung komponen yang menunjang perawatan dan penyembuhan luka seperti pada perawatan resesi gingiva secara bedah dapat menimbulkan luka muko gingiva yang cukup besar karena tarikan gingiva ke arah koronal pada.[1]

Salah satu material alami yang diharapkan dapat mempercepat penyembuhan luka adalah membran amnion. Biomaterial banyak yang direkayasa dengan teknik rekayasa genetika untuk mendapatkan protein rekombinan, salah satunya *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI) yang berasal dari membran amnion. Penelitian sebelumnya telah berhasil megekspresikan SLPI manusia yang berasal dari membran amnion sebagai SLPI rekombinan *full-length* (rSLPI) di *E.coli*BL21 *star* dengan dilengkapi tag histidin (*E. coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI).[2]

SLPI adalah protein rantai tunggal dengan berat molekul 11,7 kDa yang terdiri dari 107 asam amino, tidak mengalami glikosilasi, stabil dalam kondisi asam, dan terdiri dari dua domain homolog kaya sistein dan domain C-terminal yaang berperan dalam inhibisi elastase.[3]

Hasil purifikasi SLPI rekombinan sebelumnya menggunakan *fast protein liquid chromatography* (FPLC) dengan kolom *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC) berisi resin *iminodiacetic acid* (Ni-NDA) didapatkan SLPI dengan tingkat kemurnian rendah.[4] Pada penelitian ini, purifikasi SLPI rekombinan menggunakan kromatografi afinitas dengan kolom resin *nitrilotiacetic acid* (Ni-NTA). Agarosa Ni-NTA banyak digunakan untuk purifikasi protein karena mempunyai afinitas tinggi dan selektivitas untuk protein rekombinan yang ditandai dengan enam residu histidin.[5]

Teknik purifikasi protein yang digunakan harus disesuaikan dengan tujuan pemanfaatan protein tersebut, sehingga dapat diperoleh dengan tingkat kemurniaan yang diharapkan. Teknik kromatografi berdasarkan afinitas merupakan teknik yang cukup efektif untuk purifikasi protein.[6]

SLPI membran amnion rekombinan yang telah dimurnikan dengan kromatografi afinitas menggunakan kolom Ni-NTA dilakukan penentuan konsentrasi protein untuk elektroforesis gel menggunakan *Bradford assay*.[7]

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan bioproduk SLPI membran amnion rekombinan murni sebagai kandidat dental biomaterial pempercepat penyembuhan luka resesi gingiva.

BAHAN DAN METODE

Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah *E.coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI.[2] Bahan yang digunakan adalah *E.coli*BL-21 *star* DE3 pET_SLPI, NaCl (1.06404.1000, Merck KgaA), tripton (Cat 1612.00, Conda), *yeast extract* (REF 212750, Becton, Dickinson and Company), bacto-agar (REF 214010, Becton, Dickinson and Company), aquades, kolom manual, *Ni-NTA agarose* (Nat. No. 1018244, Qiagen GmbH), IPTG (#PC0708, Vivantis Inc. USA), imidazol (L59139916 029, Merck KGaA), ampisilin (M. W. 371.39, MDBio, Inc), bufer fosfat pH 8, bufer A (50 mM NaH_2PO_4, 300 ml NaCl, 20 mM imidazol, pH 8), bufer B (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCL, 250 mM imidazol, pH 8,0) dan *Bradford working bufer*.

Perlengkapan alat yang digunakan adalah Autoklaf (OSK 6508 *Steam pressure apparatus* Ogawa Seiki Co., LTD), *laminar flow* (Bio clean Bench), *shaker incubator* (Laboshake, Gerhadt), *high speed micro refrigerated centrifuge* (MRX-150 merk TOMY), timbangan analitik (Mettler AJI 50), oven (Memmert, Jerman), lemari pendingin -20 ^{0}C (Royal Chest Freezer BD195), pipet mikro (NichipetEX, Nichiryo), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu 1700 pharma), vortex (Labinco L46) dan kolom manual.

Pembuatan media padat LB-ampisilin dengan cara, 0,4 gram *bacto-agar*, 0,2 gram tripton, 0,2 gram NaCl, 0,1 gram *yeast extract* dilarutkan pada 20 ml aquades. Disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121º C selama 15 menit. Media steril yang telah hangat ditambah dengan 20 µl ampisilin (100mg/ml), dihomogenkan kemudian dituang ke dalam cawan petri. Pembuatan media cair LB-ampisilin sebanyak 5 ml dan 500 ml. Untuk 5 ml, ditimbang 0,05 g tipton, 0,05 g NaCl, dan 0,025 g *yeast extract*, dilarutkan dalam 5 ml aquades. Sedangkan untuk 500 ml ditimbang 5 g tripton, 5 g NaCl, dan 2,5 g *yeast extract*, dilarutkan dalam 500 ml aquades. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121^{0}C selama 15 menit setelah media hangat ditambahkan 5 µl ampisilin untuk 5 ml media cair LB dan 500 µl ampisilin untuk 500 ml media cair LB.[8]

Peremajaan *E.coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI dari stok gliserol yang sudah mencair dan sudah dapat dilakukan pengambilan menggunakan jarum ose kemudian digoreskan pada media padat LB-ampisilin secara aseptik. Diinkubasi pada suhu 37 ^{o}C selama ± 18 jam. Nantinya koloni tunggal yang

terbentuk diambil untuk diinokulasikan ke 5 ml media cair LB-ampisilin kemudian dimasukkan dalam *shaker incubator* pada suhu 37 °C dengan kecepatan 150 rpm selama ± 18 jam.[9]

Biakan *E.coli*BL21 *star* DE3 pET_SLPI sebanyak 5 ml diinokulasikan ke dalam 500 ml media cair LB-ampisilin, kemudian digojog selama 2 jam hingga mendapat OD_{600} sekitar 0,5-0,8. Ditambahkan sebanyak 1,25 ml IPTG 0,4 M ke dalam media produksi, lalu digojog selama 4 jam, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang dan pelet ditampung. Pelet diambil dan dilarutkan dalam bufer fosfat pH 8 sebanyak 20 ml, lalu disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan pelet ditampung. Pelet diambil dan dilarutkan dalam bufer A sebanyak 5 ml. Pelet dilisis menggunakan ultrasanikator dengan frekuensi 20 Hz (15 detik *on* + 30 detik *off*, diulang 7 kali). Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, supernatan ditampung dan pelet dibuang.

Kolom dipreparasi dengan cara dimasukkan 1 ml agarosa Ni-NTA, ditambahkan 500 µl bufer A sebanyak 5 kali untuk proses pencucian kemudian hasil pencucian dikeluarkan melalui ujung kolom. Supernatan sebanyak 5 ml dimasukkan dalam kolom Ni-NTA kemudian diinkubasi pada penangas es selama 2 jam. Ditampung hasil inkubasi. Kolom dicuci 5 kali dengan 500 µl bufer A lalu hasil ditampung. Kolom dicuci 5 kali dengan 500 µl bufer B (konsentrasi imidazol 50 mM), kemudian setiap hasil ditampung. Kolom dicuci 5 kali dengan 500 µl bufer B (konsentrasi imidazol 100 mM), kemudian setiap hasil ditampung kembali. Kolom dicuci 5 kali dengan 500 µl bufer B (konsentrasi imidazol 150 mM), kemudian setiap hasil ditampung kembali. Kolom dicuci 5 kali dengan 500 µl bufer B (konsentrasi imidazol 200 mM), kemudian setiap hasil ditampung kembali. Setiap hasil supernatan yang telah ditampung dihitung konsentrasi protein menggunakan *Bradford assay*.

Pada uji *Bradford*[7] diperlukan adanya kontrol, yaitu berupa akuades. Kontrol dan tiap sampel yang akan dilakukan pengujian, diambil sebanyak 20 µl, ditambahkan 1 ml *Bradford Working Bufer*. Campuran reaksi dicampurkan menggunakan vortek dengan tanpa menimbulkan buih selama 30 detik, kemudian diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang. Absorbansi larutan protein diukur pada panjang gelombang 595 nm. Setelah 2 menit, sampel dimasukkan dalam spektrofotometer UV-VIS untuk dilakukan penentuan konsentrasi protein.

HASIL

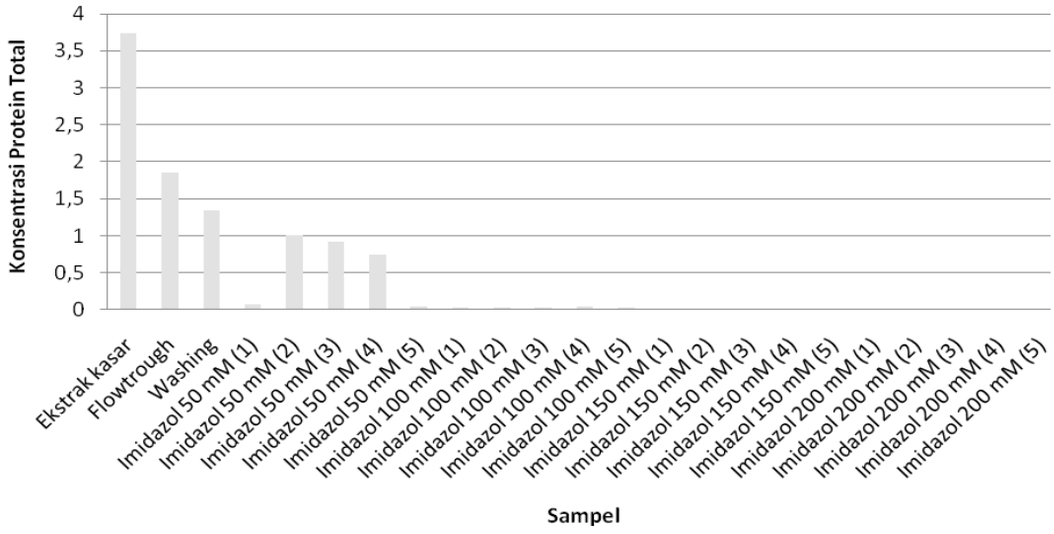
Hasil peremajaan isolat *E. coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI pada media padat LB-ampisilin yaitu tampak pertumbuhan *E. coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI. Hasil inokulum berupa perubahan tingkat kekeruhan yang terjadi pada media cair LB-ampisilin sebelum dan setelah dilakukan inokulasi. Ekstrak kasar SLPI membran amnion rekombinan berupa supernatan, hasil lisis pelet yang didapatkan dari hasil panen *E. coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI dari media produksi. Ekstrak kasar SLPI membran amnion rekombinan berupa supernatan yang didapatkan berwarna kekuningan. Hasil purifikasi ekstrak kasar SLPI membran amnion rekombinan yaitu berupa pembuangan protein yang tidak terikat (*flowthrough*) dan pencucian dari protein yang tidak terikat (*washing*). Pada saat pembuangan protein yang tidak terikat didapatkan larutan berwarna kekuningan pucat, sedangkan hasil proses pencucian dari protein yang tidak terikat yaitu didapatkan larutan berwarna kekuningan dengan intensitas yang lebih pucat dibandingkan dengan *flowthrough*. Hasil proses elusi didapatkan larutan yang tidak berwarna atau bening.

Pembuatan kurva standar protein dilakukan sebelum mengukur konsentrasi SLPI membran amnion rekombinan. Pembuatan kurva standar protein dilakukan menggunakan metode Bradford dengan variasi konsentrasi Bovine Serum Albumin (BSA). Hasil pengukuran konsentrasi BSA dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data hasil pengukuran konsentrasi BSA

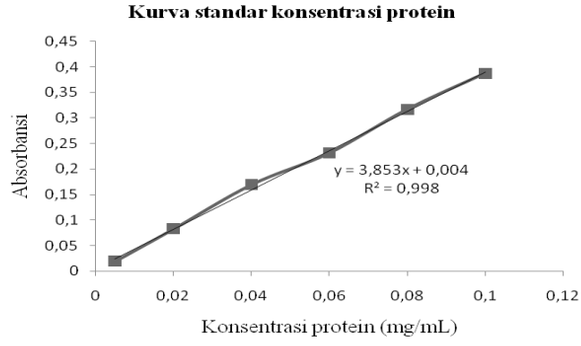
Konsentrasi BSA (mg/mL)	Absorbansi		Rata-rata Absorbansi
	A_1	A_2	
0.005	0.02	0.018	0.019
0.02	0.078	0.087	0.082
0.04	0.168	0.17	0.169
0.06	0.248	0.214	0.231
0.08	0.301	0.332	0.316
0.1	0.382	0.392	0.387

Setelah didapatkan data absorbansi untuk masing-masing konsentrasi BSA maka dapat diperoleh persamaan regresi kurva standar dengan persamaan Y=bX+a, Y sebagai fungsi absorbansi



Gambar 2. Konsentrasi SLPI membran amnion rekombinan total dalam bentuk grafik batang.

dan X sebagai fungsi konsentrasi BSA (mg/mL). Persamaan regresi linier yang diperoleh dari grafik dibawah ini yaitu Y=3.853x + 0.004 dengan nilai R^2 =0.998.



Gambar 1. Kurva standar konsentrasi protein.

Perubahan warna yang tampak hasil reaksi antara SLPI membran amnion rekombinan dengan pereaksi *Bradford* yaitu warna biru kehijauan menjadi biru terang. Pengukuran absorbansi SLPI membran amnion rekombinan setiap sampel dilakukan sebanyak dua kali (*duplo*). Sebelumnya telah dilakukan pengukuran absorbansi pada kontrol dan didapatkan hasil 0,31. Hasil pengukuran setiap absorbansi SLPI membran amnion rekombinan dikurangi 0,31. Rata-rata absorbansi yang didapatkan kemudian dimasukkan dalam persamaan regresi linier untuk mendapatkan konsentrasi SLPI membran amnion rekombinan pada setiap sampel. Tetapi hasil konsentrasi SLPI membran amnion tersebut bukan konsentrasi total karena pada beberapa sampel dilakukan pengenceran. Sehingga konsentrasi total pada setiap sampel didapatkan dari konsentrasi SLPI membran amnion rekombinan dikalikan dengan banyaknya pengenceran yang dilakukan. Hasil konsentrasi SLPI membran amnion rekombinan total ditampilkan pada gambar 2.

Hasil pengukuran konsentrasi SLPI membran amnion rekombinan menunjukkan bahwa terjadi penurunan konsentrasi protein pada fraksi *flowthrough* dan *washing* dibandingkan dengan ekstrak kasar, yaitu dari 3,745 menjadi 1,857 untuk *flowtrough* dan 1,348 untuk *washing*. Tetapi terdapat peningkatan konsentrasi protein pada elusi protein dengan konsentrasi imidazol 50 mM. Peningkatan konsentrasi protein yang bermakna pada konsentrasi imidazol 50 mM fraksi ke-2 sebesar 1,0125, fraksi ke-3 sebesar 0,9225 dan fraksi ke-4 sebesar 0,7425 imidazol 50 mM disebabkan oleh adanya imidazol yang ditambahkan pada larutan elusi. Kemudian pada konsentrasi imidazol selanjutnya didapatkan fraksi dengan konsentrasi protein yang sangat kecil. Pada fraksi-fraksi imidazol 100 mM sampai dari 200 mM didapatkan konsentrasi protein yang rendah.

PEMBAHASAN

SLPI yang berasal dari membran amnion diharapkan menghasilkan bioproduk SLPI membran amnion rekombinan murni sebagai kandidat dental biomaterial pempercepat penyembuhan luka resesi gingiva. Untuk mendapatkan SLPI rekombinan, terlebih dahulu SLPI direkayasa dengan teknik rekayasa genetika. Penelitian sebelumnya telah

berhasil megekspresikan SLPI manusia yang berasal dari membran amnion sebagai SLPI rekombinan *full-length* (rSLPI) di *E.coli* BL21 *star* dengan dilengkapi tag histidin (*E.coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI).[2]

SLPI membran amnion rekombinan diharapkan dalam kondisi murni untuk menghilangkan debris, meningkatkan konsentrasinya dan menjaga protein tetap stabil sehingga dapat dimanfaatkan menjadi kandidat biomaterial pempercepat penyembuhan luka resesi gingiva. Sebelum dilakukan purifikasi, SLPI membran amnion rekombinan harus diproduksi dalam jumlah banyak.

Peremajaan isolat *E.coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI dari stok gliserol dilakukan dengan cara digoreskan pada media padat LB-ampisilin. Dapat diketahui hasil dari peremajaan isolat tampak tumbuh mengikuti alur goresan pada media padat LB-ampisilin. Daerah sekitar goresan tampak bersih, hal ini membuktikan tidak terjadi kontaminasi. *E.coli* dapat tumbuh pada media LB-ampisilin karena bakteri ini resisten terhadap ampisilin.[10] Koloni tunggal hasil peremajaan isolat *E. Coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI digunakan untuk pembuatan inokulum. Setelah didapatkan inokulum isolat *E. coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI, maka dapat dilakukan produksi dengan menginokulasikan inokulum isolat *E. coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI pada media produksi LB-ampisilin. Adanya pertumbuhan isolat *E. coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI ditandai dengan perubahan tingkat kekeruhan dari media cair LB-ampisilin. Setelah diketahui adanya pertumbuhan bakteri, dilakukan proses induksi IPTG ke dalam media produksi setelah 2 jam. Hal ini dilakukan karena OD_{600} telah mencapai 0,6, yakni sel berada pada fase pertumbuhan logaritma (eksponensial). Pada fase ini sel membelah diri paling cepat dengan waktu generasi pendek dan konstan. Selama fase logaritma, metabolisme sel paling aktif, sintesis bahan sel sangat cepat dangan jumlah konstan sampai nutrisi habis atau terjadinya penimbunan hasil metabolisme yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan. Kondisi ini sesuai dengan prosedur standar induksi IPTG pada *E.Coli*, dimana waktu ideal saat memulai induksi adalah ketika OD_{600} berkisar 0,5-0,8. Penggunaan IPTG sebagai induser, karena IPTG tidak dimetabolisme oleh sel.[4]

Panen dari media produksi dipisahkan melalui proses sentrifugasi, sehingga didapatkan pelet. Untuk mendapatkan ekstrak kasar SLPI rekombinan diperlukan proses pemecahan dinding sel *E.coli* BL21 *star* DE3 pET_SLPI secara fisika yaitu menggunakan alat sonikator. Ekstrak kasar SLPI rekombinan dipisahkan dari debris sel melalui proses sentrifugasi. Pada tahap ini telah didapatkan ekstrak kasar SLPI rekombinan yang akan ditentukan konsentrasi protein dan digunakan untuk tahapan purifikasi.

Penelitian purifikasi sebelumnya menggunakan FPLC dengan kolom IMAC berisi resin Ni-NDA. Penelitian kali ini menggunakan kromatografi afinitas dengan kolom berisi resin Ni-NTA. Pada proses purifikasi protein, umumnya digunakan ligan NTA dibanding IDA, terutama proses purifikasi dengan kolom manual. Secara umum, NTA lebih kuat dalam mengikat protein karena memiliki sisi pengikatan yang lebih banyak untuk berinteraksi dengan ion logam daripada IDA. Sedangkan jika menggunakan IDA, level pelepasan ion logam cenderung lebih besar dan pengikatan proteinnya menjadi lebih rendah dari NTA.[11]

Protein SLPI rekombinan telah dilengkapi dengan tag histidin (6xHis), sehingga kolom yang digunakan dalam proses purifikasi adalah dengan kolom Ni-NTA. NTA adalah *chelator tetradentate* karena menempati dari 6 sisi pengikat dalam lingkup koordinasi ion Ni^{2+}. Sisanya dua sisi koordinasi biasanya ditempati oleh molekul air dan dapat digantikan dengan residu histidin dari protein rekombinan. Pembentukan sisi koordinasi telah berubah menjadi optimal untuk purifikasi protein tag histidin.[5]

Tag histidin dalam SLPI rekombinan akan terikat selektif pada ligan Ni^{2+}, kemudian akan terelusi dengan bufer yang mengandung imidazol. Imidazol memiliki struktur yang sama dengan cincin rantai samping residu histidin. Hal ini menjadikan imidazol dapat menggantikan protein untuk berikatan dengan ligan, sehingga protein target dapat terlepas dari kolom. Konsentrasi imidazol dalam bufer elusi selama purifikasi kromatografi afinitas dioptimasi secara manual.[5]

Elusi pada protein his tag efektif dengan kosentrasi imidazol 20-250 Mm.[12] Pada penelitian ini, bufer A sebagai pencuci menggunakan imidazol 20 mM, sedangkan bufer B sebagai elusi menggunakan imidazol bertingkat, yaitu 50 mM, 100 mM, 150 mM dan 200 mM.

Pengukuran konsentrasi protein dilakukan setelah proses elusi selesai. Kosentrasi protein dalam sampel sangat penting untuk diketahui. Situasi paling umum dimana informasi tersebut diperlukan terdapat dalam 3 kategori, diantaranya karakterisasi dan purifikasi pada protein dan enzim, studi fisiologis pada ekspresi protein, dan diagnosa klinis kadar protein yang diubah dalam cairan tubuh

yaitu untuk indikasi berbagai penyakit.[13]

Salah satu cara untuk mengukur konsentrasi protein adalah menggunakan *Bradford assay*. *Bradford assay* direkomendasikan untuk penggunaan umum, terutama menentukan kadar protein fraksi sel dan menilai konsentrasi protein untuk elektroforesis gel, seperti *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-page).[14] *Bradford assay* adalah metode penentuan protein yang melibatkan pengikatan dari *Coomassie Brilliant Blue G-250* sebagai *dye* dengan protein.[7] Pengikatan *dye, Coomassie Brilliant Blue G-250*, untuk protein menyebabkan pergeseran pada absorbsi maksimum *dye* dari 465 nm (merah) sampai 595 nm (biru) di cairan asam.[15]

Pengenceran dilakukan pada beberapa sampel diantaranya ekstrak kasar, *flowtrough*, *washing* dan elusi imidazol 50 mM fraksi ke-2 sampai ke-4. Pengenceran dilakukan pada beberapa sampel tersebut di atas karena saat dilakukan pengukuran absorbansi didapatkan hasil lebih dari 0,387. Hasil absorbansi lebih dari 0,387 tidak dapat dimasukkan dalam persamaan regresi linier yang telah didapatkan dari kurva standar sehingga perlu dilakukan pengenceran sampai didapatkan absorbansi kurang dari sama dengan 0,387.

Hasil pengukuran konsentrasi protein menunjukkan bahwa terjadi penurunan konsentrasi protein pada fraksi *flowthrough* dan *washing* dibandingkan dengan ekstrak kasar, yaitu dari 3,745 menjadi 1,857 untuk *flowtrough* dan 1,348 untuk *washing*. Hasil ini menunjukkan adanya protein yang diduga terikat atau tertahan pada ligan. Dugaan ini diperkuat setelah dilakukan elusi menggunakan imidazol 50 mM yang menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi protein yang bermakna pada fraksi ke-2 sampai dari ke-4, yaitu pada konsentrasi imidazol 50 mM fraksi ke-2 sebesar 1,0125, fraksi ke-3 sebesar 0,9225 dan fraksi ke-4 sebesar 0,7425 imidazol 50 mM disebabkan oleh adanya imidazol yang ditambahkan pada larutan elusi. Kemudian pada konsentrasi imidazol selanjutnya didapatkan fraksi dengan konsentrasi protein yang sangat kecil. Pada fraksi-fraksi imidazol 100 mM sampai dari 200 mM didapatkan konsentrasi protein yang rendah. Oleh karena itu untuk membuktikan kebenaran apakah SLPI rekombinan terelusi pada imidazol 50 mM maka dilakukan analisis protein menggunakan SDS-page pada penelitian yang lainnya.

Simpulan dari penelitian ini adalah SLPI membran amnion rekombinan dapat dimurnikan menggunakan kromatografi afinitas dengan kolom Ni-NTA.

DAFTAR PUSTAKA

1. Newman MG, Takei HH. Carranza's clinical periodontology. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 2002. p. 651.
2. Munadziroh E. Karakterisasi, ekspresi, dan kloning gen penyandi protein secretory leukocyte protease inhibitor membran amnion sebagai kandidat untuk mempercepat penyembuhan luka gingiva. Disertasi. Surabaya: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga; 2007.
3. Angelov N, Moutsopoulos N, Jeong Moon-Jin, Nares S, Aschroft G, Wahl SM. Aberrant mucosal wound repair in the absence of secretory leukocyte protease inhibitor. Thromb Haemost 2004; 92: 288-97.
4. Purnamasari S. Analisis inhibisi secretory leukocyte protease inhibitor (slpi) terhadap enzim porcine pankreatic elastase (ppe). Tesis. Surabaya: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga; 2011.
5. Invitrogen. Ni-NTA purification system: For purification of polyhistidine-containing recombinant proteins. Invitrogen Corporation 2006; p. 1-23.
6. Hage SD. Handbook of affinity chromatography. 2nd ed. Boca Raton: CRC press; 2006. p. 593.
7. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
8. Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. Escherhia coli physiology in Luria Bertani Broth. J of Bacteriology 2007; 189(23): 8746-49.
9. Black Jacquelyn G. Microbiology: Principles and explorations. 4th ed. New York: John Wiley Sons; 1999. p. 155.
10. Kutmanova MD, Ainura. Antimicrobial resistance of pathogens of acute intestinal infection in Kyrgyz Republic. Turkiye EKMUD Kongresi 2012.
11. Chaga G, Bochkariov DE, Jokhadze GG, Hopp J, Nelson P. Natural poly-histidine affinity tag for purification of recombinant proteins on cobalt(II)-carboxymethylaspartate crosslinked agarose. J Chromatography 1999; 864(2): 247-56.
12. Terpe K. Overview of tag protein fusions: frommolecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 2003; 60: 523-24.
13. Ninfa AJ, Ballou DP, Benore M. Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology. New York: John Wiley Sons; 2009. p. 114.
14. Stoscheck CM. Quantification of protein. Methods Enzymol 1990; 182: 50-68.
15. Sedmark JJ, Grossberg, Sidney E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. Anal Biochem 1977; 79: 544-552.