

ANALISIS FAKTOR YANG MEMPENGARUHI PERTUMBUHAN KULTUR SEL CHO (*Chinase Hamster Ovarium*) PADA PEMBUATAN OBAT TRASTUZUMAB DI PT. BIO FARMA

ANALYSIS OF FACTORS AFFECTING THE GROWTH OF CHO (*Chinase Hamster Ovarian*) CELL CULTURE IN THE MANUFACTURING OF TRASTUZUMAB DRUG IN PT. Bio Farma

¹*Maringan Silitonga, ²Devina Chandra, ²Raissa Fitri, ²Farahlina Nanda

¹Badan Pengawasan Obat dan Makanan

²Program Studi S1 Farmasi, Universitas Sari Mutiara Indonesia

Korespondensi penulis: Badan Pengawasan Obat dan Makanan

Alamat email: maringansilitonga@gmail.com

Abstrak. Studi ini meneliti tentang faktor apa saja yang dapat mempengaruhi pertumbuhan kultur sel CHO yang sering digunakan dalam penelitian biologi dan medis dan secara komersial dalam produksi protein terapi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah sel CHO mampu tumbuh dan berkembangbiak dengan alur proses dan cara pembuatan sediaan obat sesuai dengan persyaratan perundang-undangan yang berlaku. Cara kerja dalam penelitian ini terbagi menjadi dua tahap, yaitu tahap mikrobiologi dan tahap bioteknologi. Tahap mikrobiologi diawali dengan pembuatan kultur kerja, kemudian dilakukan purifikasi untuk peremajaan kultur, pemanenan, pemecahan kultur sel dan pemurnian target sel. Pada tahap bioteknologi dilakukan pengukuran protein, pengamatan Optical Density 600, elektroforesis SDS gel poliakrilamid, dan *staining* gel hasil elektroforesis. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini pada pengukuran nilai absorbansi adalah 2,700 dengan konsentrasi setiap supernatan yang disentrifugasi dengan kecepatan berbeda yaitu 37,35%, 37,65%, 37,95%, 37,05%. Dari hasil SDS gel diperoleh BM pita 1= 180 kDa, BM pita 2= 130 kDa, BM pita 3= 100 kDa, BM pita 4= 70 kDa, BM pita 5= 55 kDa, BM pita 6= 40 kDa, BM pita 7= 35 kDa, BM pita 8= 25 kDa, BM pita 9= 15 kDa, BM pita 10= 10 kDa. Berat molekul protein diperkirakan 55 kDa dan 25 kDa, untuk aktivasinya dilakukan protocol dengan menggunakan *staining* dan dapat diamati pada gel yang di *staining* dengan cara scanning dengan digital scanner.

Kata Kunci: Sel CHO, kultur sel, Purifikasi, Optical Density 600, SDS-PAGE, *staining*,

Abstract. This study examines what factors can affect the growth of CHO cell cultures which are often used in biological and medical research and commercially in the production of therapeutic proteins. The purpose of this study was to determine whether CHO cells were able to grow and reproduce with the process flow and manufacturing method of drug preparations in accordance with the requirements of the applicable legislation. The workings of this research are divided into two stages, namely the microbiological stage and the biotechnology stage. The microbiological stage begins with making a working culture, then purification is carried out for culture rejuvenation, harvesting, cell culture breakdown, and purification of target cells. At the biotechnology stage, protein measurements were carried out, Optical Density 600 observations, polyacrylamide gel SDS electrophoresis, and gel electrophoresis staining. The results obtained in this study on the measurement of the absorbance value was 2,700 with the concentration of each supernatant centrifuged at different speeds, namely 37.35%, 37.65%, 37.95%, 37.05%. From the results of SDS gel obtained BM band 1 = 180 kDa, BM band 2 = 130 kDa, BM band 3 = 100 kDa, BM band 4 = 70 kDa, BM band 5 = 55 kDa, BM band 6 = 40 kDa, BM band 7 = 35 kDa, BM band 8 = 25 kDa, BM band 9 = 15 kDa, BM band 10 = 10 kDa. The molecular weight of the protein was estimated at 55 kDa and 25 kDa. For activation, a staining protocol was carried out for its activation and could be observed on the stained gel by scanning with a digital scanner. **Keywords:** CHO cells, cell culture, Purification, Optical Density 600, SDS-PAGE, *staining*,

PENDAHULUAN

Terdapat beberapa obat yang tersedia untuk kanker payudara dengan status HER-2 positif. Obat yang paling banyak digunakan adalah trastuzumab, yang bekerja pada reseptor HER-2 yang ada pada sel kanker payudara dan menghambat pertumbuhan sel-sel kanker payudara. Trastuzumab terbukti baik sebagai terapi pada stadium awal maupun lanjut (metastatis), dapat diberikan sebagai terapi tunggal ataupun kombinasi dengan atau setelah kemoterapi standar. Trastuzumab adalah antibodi monoklonal

human recombinant yang menghambat reseptor HER-2, dan telah disetujui untuk pengobatan kanker payudara metastasis, baik oleh Amerika Serikat (US-FDA), Eropa (EMA), maupun Indonesia (Badan POM-RI). Sel Ovarium Hamster China (CHO) adalah garis sel epitel yang berasal dari ovarium hamster Cina, yang sering digunakan dalam penelitian biologi dan medis dan secara komersial dalam produksi protein terapi. Sel CHO juga merupakan garis sel mamalia yang paling umum digunakan untuk produksi massal protein terapeutik. Mereka dapat menghasilkan protein rekombinan pada skala 3-10 gram per liter kultur. Sel CHO juga cocok untuk aplikasi manusia, karena memungkinkan modifikasi pasca-translasi untuk protein rekombinan yang dapat berfungsi pada manusia [5]. Sel hamster china ovarium (*Chinese hamster ovary*, CHO) adalah sel mamalia yang sangat sering digunakan untuk produksi obat protein terapeutik. Sel CHO sering digunakan untuk produksi protein mempunyai beberapa keunggulan antara lain [6] : 1) Sel inang yang aman untuk digunakan dalam produksi obat, 2) Tingkat produksi protein yang dihasilkan dapat ditingkatkan dengan melakukan amplikasi gen dengan penambahan methotrexate (MTX) pada media, 3) Tingginya kebutuhan terhadap obat berbasis protein memicu pengembangan pengetahuan dasar dan inovasi dalam produksi protein rekombinan. Kemajuan teknologi yang sangat impresif pada teknologi kultur sel CHO telah membuat sel ini dapat digunakan untuk memproduksi protein sekitar 10 g/liter dalam rangka untuk memenuhi permintaan pasar obat berbasis protein. Protein pertama berhasil diproduksi dengan menggunakan sel mamalia CHO adalah protein terapeutik. Meningkatnya pasar obat berbasis protein tumbuh secara signifikan karena disebabkan oleh meningkatnya penyakit kronis, meningkatnya umur populasi dan meningkatnya teknologi produksi obat jenis ini [8]. Obat-obatan jenis ini banyak digunakan dalam berbagai jenis penyakit termasuk diantaranya adalah berbagai macam jenis penyakit kanker, anemia, rematik, berbagai macam penyakit yang berhubungan dengan darah dan kardiovaskular. Berbeda dengan obat berbasis molekul kecil yang diproduksi secara kimia, obat berbasis molekul besar (protein) diproduksi dalam sel hidup dengan menggunakan teknologi rekayasa genetika. Produksi suatu obat berbasis protein diawali dengan mendesain suatu DNA dimana DNA tersebut kemudian ditransfeksikan ke dalam suatu sel inang (*host cell*). Dengan menggunakan perlakuan tertentu sel inang akan menghasilkan protein yang diinginkan yang akhirnya setelah melalui proses panjang maka akan menghasilkan obat berbasis protein [8]. Agar suatu protein dapat berfungsi secara biologis dengan efektif maka protein yang bersangkutan harus mempunyai struktur yang tepat yaitu memiliki pola struktur tiga dimensi yang benar dan telah melalui proses modifikasi pasca translasi yang tepat [9]. Pada protein terapeutik yang tergolong suatu glikoprotein maka proses modifikasi pasca translasi yang dalam hal ini adalah proses glikosilasi harus berjalan dengan benar. Dalam proses glikosilasi yang terjadi dalam sel inang, beberapa unit karbohidrat yang sangat spesifik diintegrasikan pada protein yang dihasilkan [12]. Sebagian besar obat bioteknologi yang diproduksi pada sel CHO menggunakan proses kultur *batch*. *sistem fed-batch* banyak digunakan untuk meningkatkan hasil produksi protein terapeutik dalam kultur sel [10].

METODE PENELITIAN

Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah sentrifugasi [Torrey Pins Scientific, USA], mikropipet [Gilson, Perancis], pemanas dengan *magnetic stirrer* [Torrey Pins Scientific, USA], pH meter [Eutech Instruments pH510 Cyberscan, Singapura], timbangan analitik [Acculab dan Scout, USA], *deep freeze* -80°C [New Brunswick Scientific U101 Innova, Inggris], alat SDS-PAGE [BIOMETRA, USA], *high speed refrigerated centrifugator* [Tomy *centrifugator* MX-305, Jepang], digital scanner [CanonScan 4400F, USA], *electrophoresis power supply* EPS 301 [GE Healthcare, Swedia], dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam Laboratorium Matriks Riset dan Penelitian PT. Bio Farma.

Bahan

Bahan yang digunakan selama penelitian adalah sampel trastuzumab milik Laboratorium Matriks Riset Penelitian PT. Bio Farma, Bis, Acrylamid 30% (Premixed preweighed akrilamid) [Bio-Rad, Inggris], SDS 10% (Natrium Dodesil Sulfat) [SIGMA, USA], APS 10% (Amonium Persulfat)

[Merck, Jerman], TEMED (N,N,N',N'- tetrametilendiamin) [Merck, Jerman], Ladder (PageRuler™ Protained Protein Ladder) [Fermentas, USA], Larutan Comassie Brilliant Blue G-250 [Fermentor, USA], Aquadest [Otsuka Indonesia, Indonesia],

Prosedur Penelitian

Pada proses penggandaan skala (*scale up*), tingkatan prosesnya biasanya disebut Pilot Plant. Tahap pilot plant ini merupakan jembatan yang dapat membantu produksi skala besar karena skala produksi besar terlalu sulit dilakukan apabila mendesain proses mulai dari skala laboratorium. Tahap pilot plant dapat mengevaluasi hasil dari laboratorium dalam pembuatan produk, mengkoreksi dan mengembangkan proses. Juga dapat menyediakan informasi yang digunakan untuk mengambil keputusan dalam pengembangan proses skala Industri [4]. Pada sampel Trastuzumab kultur di dalam fermentor selama empat belas hari, kemudian setelah hari ke empat belas ketika viabilitas minimumnya 80% maka harus segera diambil dari fermentor untuk dilakukan pengujian terhadap sampel [1]. Cara pengambilan sampel adalah kultur yang ada di dalam fermentor dipindahkan ke dalam botol steril. Kemudian kultur disentrifugasi dengan kecepatan 10.000G dengan suhu 4°C selama 30 menit untuk memperoleh supernatan yang mengandung protein dan selanjutnya untuk di uji [11]. Gel yang telah di-*staining* dengan Comassie Blue memiliki pita protein yang dapat diamati dengan penanda protein yang digunakan untuk mengetahui ukuran protein tersebut. Gel di dokumentasikan dengan cara *scanning* dengan digital [11].

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Pemiakan Sel CHO

Pemiakan sel CHO setelah dipanen sebelum disentrifugasi akan membentuk suatu larutan yang berwarna orange pekat. Kultur sel CHO dapat tumbuh dengan baik saat dipindahkan kedalam bioreaktor yang mengandung suplemen untuk peremajaan kultur.

2. Hasil Kultur Sel Disentrifugasi

Centrifugasi adalah alat untuk memutar sampel pada kecepatan tinggi, memaksa partikel yang lebih berat terkumpul ke dasar tabung centrifuge. Pemakaian centrifuge yang paling sering adalah untuk pemisahan komponen sel darah dari cairannya sehingga cairannya bisa di pakai untuk pemeriksaan. Dalam sebuah laboratorium centrifuge berguna untuk memisahkan partikulat padat dalam cairan. Sebagai contoh, untuk memisahkan serum dan dapat juga untuk pemeriksaan mikroskopis. Dalam metode penelitian ini digunakan centrifugasi berkecepatan tinggi yang berputar dengan kecepatan bervariasi yaitu pada kecepatan 4000 rpm, 6000 rpm, 8000 rpm dan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit. Hasil yang diperoleh dalam kecepatan yang bervariasi tersebut adalah semakin tinggi kecepatan yang berputar, maka semakin terbentuk supernatan yang terpisah dari pelet dan supernatan tampak semakin jernih.

3. Hasil Pengamatan Mikroskopis

Pada hasil penelitian ini, sampel di cek di bawah mikroskopis yaitu protein memperlihatkan variasi yang sangat besar dalam hal ukuran dan strukturnya. Dalam metode penelitian ini tampak terlihat banyaknya sel pada hasil centrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm dan 10.000 rpm.

4. Hasil Elektroforesis SDS Gel Poliakrilamid

Berdasarkan hasil percobaan terbentuk dua pita protein trastuzumab sebesar 55 kDa dan 25 kDa. Hasil tersebut sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa ukuran protein trastuzumab berkisar ~50 kDa dan ~23 kDa [12]. Pita-pita bisa terbentuk atau terlihat disebabkan karena adanya sejumlah partikel sampel yang tersangkut pada titik-titik tertentu dalam gel akibat adanya muatan listrik pada sampel yang bergerak menuju katoda (Hames,2004). Gel yang telah di *staining* dan di analisis di dapatkan band band protein yang terbentuk pada tiap sumuran. Perhitungan berat molekul (BM) dari masing-masing protein didasarkan pada marker yang tersedia. Ukuran marker yang digunakan adalah 10-180 kDa. Dari hasil SDS gel diperoleh BM pita 1= 180 kDa, BM pita 2= 130 kDa, BM pita

3= 100 kDa, BM pita 4= 70 kDa, BM pita 5= 55 kDa, BM pita 6= 40 kDa, BM pita 7= 35 kDa, BM pita 8= 25 kDa, BM pita 9= 15 kDa, BM pita 10= 10 kDa. Berat molekul protein diperkirakan 55 kDa dan 25 kDa (staff pegawai bio farma). Elektroforesis protein dan enzim itu hampir sama prinsipnya. Namun yang membedakan antara elektroforesis enzim dan protein yaitu pada elektroforesis protein mengandung beberapa asam amino yang memiliki berat molekul yang berbeda-beda yang akan terpisah ketika proses running pada gel poliakrilamid. Sedangkan pada elektroforesis enzim hanya memiliki satu komponen spesifik yang tidak bisa dipisahkan lagi [3].

5. Hasil Optical Density 600

Pertumbuhan ialah penambahan teratur semua komponen suatu mikroorganisme. Pertumbuhan jasad renik dapat diukur berdasarkan konsentrasi sel (jumlah sel) atau densitas sel (berat kering dari sel-sel). Menghitung densitas sel dapat dilihat dari nilai absorbansi suatu sampel yang akan diukur [5]. Setiap sel memiliki kurva standar pertumbuhan sel. Metode perhitungan jumlah sel yang digunakan dalam pembuatan kurva standar pada penelitian ini adalah dengan menggunakan spektrofotometri untuk melihat tingkat kekeruhan (optical density) yang terbaca melalui nilai absorbansi yang dihasilkan. Pada penelitian ini panjang gelombang yang digunakan adalah 600 nm. Berdasarkan hasil uji pendahuluan membuktikan bahwa, panjang gelombang ini merupakan panjang gelombang yang optimal dalam membaca densitas dari sampel trastuzumab [8].

Pembahasan

Tahap awal penelitian ini di mulai dengan menumbuhkan sel CHO dalam bioreaktor dengan menambahkan suplemen untuk peremajaan kultur. Hasil tersebut dapat di lihat pada gambar 4.1. Tahap pertumbuhan kultur sel CHO dilakukan dalam bioreaktor 20 L pada suhu 37 °C selama 14 hari. Hal ini di karenakan suhu optimun pertumbuhan dari sel CHO adalah pada suhu 37 °C di perlukan untuk menghasilkan oksigen karena sel ini bersifat aerob yang membutuhkan sedikit oksigen (staff biofarma, 2020). Berikutnya, kultur sel CHO di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 G pada suhu 4 °C selama 30 menit untuk memisahkan supernatan dari peletnya. Setelah diperoleh supernatan maka lanjut ke tahap berikutnya. Pada tahapan berikutnya, kultur sel CHO yang telah disentrifugasi diukur OD600 dipipet sesuai volume inokulum yang mengandung sejumlah tertentu bakteri yang diinginkan per volume medium, pengukuran OD600 terhadap inokulum dimaksudkan agar dapat diperhitungkan jumlah volume inokulum yang harus diinokulasi ke dalam medium. Dalam penelitian ini jumlah sel yang digunakan adalah 1000 sel/5 ml medium. Selain itu, diharapkan agar protein yang diperoleh kelak sedapat mungkin memiliki konsentrasi yang mendekati sama (Suranto,2006). Pertumbuhan ialah penambahan teratur semua komponen suatu mikroorganisme. Pertumbuhan jasad renik dapat diukur berdasarkan konsentrasi sel (jumlah sel) atau densitas sel (berat kering dari sel-sel). Menghitung densitas sel dapat dilihat dari nilai absorbansi suatu sampel yang akan diukur [10]. Setiap sel memiliki kurva standar pertumbuhan sel. Metode perhitungan jumlah sel yang digunakan dalam pembuatan kurva standar pada penelitian ini adalah dengan menggunakan spektrofotometri untuk melihat tingkat kekeruhan (*Optical Density*) yang terbaca melalui nilai absorbansi yang dihasilkan. Pada penelitian ini panjang gelombang yang digunakan adalah 600 nm. Berdasarkan hasil uji pendahuluan membuktikan bahwa, panjang gelombang ini merupakan panjang gelombang yang optimal dalam membaca densitas dari sampel trastuzumab. Panjang gelombang 600-625 digunakan untuk melihat tingkat kekeruhan untuk larutan yang berwarna. Hasil dari pengukuran tingkat kekeruhan (OD) menghasilkan data yang dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Tingkat Kekeruhan (OD)

Nama Sampel	OD ₆₀₀	Kons
20190912 SN 4000 RPM	2.700	37.35
20190912 SN 6000 RPM	2.700	37.65
20190912 SN 8000 RPM	2.700	37.95
20190912 SN 10000 RPM	2.700	37.05

Berdasarkan data pada tabel tersebut kemudian dibuat kurva standar yang merupakan suatu kurva untuk menghitung jumlah sel secara tidak langsung, yaitu dengan meregresikan nilai absorbansi dan konsentrasi kedalam persamaan garis kurva standar $y=ax+b$, dimana y = konsentrasi dan x = besarnya nilai absorbansi. Sehingga dari data tabel tersebut menghasilkan kurva standar dengan persamaan yang dapat dilihat pada gambar 4.5. Hasil analisis regresi menunjukkan bahwa, hubungan antara variasi kecepatan pada centrifugasi menghasilkan nilai absorbansi yang sama dan tidak menimbulkan perbedaan yang signifikan [2]. Setelah dilakukan tahap tersebut maka selanjutnya dilakukan elektroforesis dengan SDS PAGE untuk mengetahui karakterisasi dan selanjutnya dianalisa masuk ke tahap purifikasi. Sistem elektroforesis yang digunakan adalah *Denaturing (SDS) Discontinuous Gel Electrophoresis Laemmli Gel Method*. Formulasi gel elektroforesis terdiri atas dua bagian, yaitu gel pemisah (*separating gel*) dan gel penahan (*stacking gel*). Pada mulanya, formulasi gel yang digunakan mengikuti formula gel yang telah dioptimasi pada penelitian terdahulu, yaitu formula gel pemisah 5%. Namun, formula gel pemisah ini diganti setelah dilakukan optimasi pada formula gel pemisah 10%. Hasil pemisahan penanda protein yang baik ditunjukkan oleh formula gel pemisah 10% sehingga pada penelitian ini digunakan formula gel pemisah tersebut [5]. Bahan-bahan penyusun suatu gel dicampurkan di dalam beaker glass. Bahan amonium persulfat dan TEMED harus disimpan di dalam lemari es dan baru dikeluarkan saat akan membuat gel. Kecepatan gel berpolimerasi membentuk matriks bergantung dari banyaknya larutan amonium persulfat dan TEMED yang dimasukkan ke dalam formulasi. Jika diharapkan gel membeku lebih cepat, maka volume amonium persulfat dan TEMED yang dimasukkan dapat ditambahkan tanpa mempengaruhi ukuran pori-pori gel yang akan terbentuk. Kegagalan gel untuk berpolimerasi kemungkinan besar mengindikasikan adanya masalah pada amonium persulfat, TEMED atau pun keduanya. TEMED dimasukkan terakhir setelah semua bahan penyusun gel yang lain, seperti akrilamid/bisakrilamid, aquabidest steril, buffer tris-Cl/SDS dan amonium persulfat telah selesai dicampurkan. Kemudian campuran segera dipipet dan dimasukkan ke dalam cetakan gel sebelum campuran tersebut membeku di dalam beaker glass. Lapisan gel pemisah dimasukkan terlebih dahulu ke dalam cetakan gel dan kemudian di bagian atasnya dilapisi dengan isopropanol. Lapisan isopropanol ini berfungsi untuk mencegah terbentuknya gelembung udara di dalam gel selama menunggu gel selesai berpolimerasi. Selain itu isopropanol juga berfungsi untuk menjaga bentuk gel agar tidak menjadi cekung setelah gel berpolimerasi [6].

Tahapan selanjutnya adalah aplikasi sampel. Sampel yang berupa supernatan sel dilarutkan dengan loading buffer yang tersusun atas 0,313 M tris-Cl, 10% SDS, 0,05% bromophenol blue dan 50% gliserol. Bromophenol blue berfungsi untuk mewarnai protein karena dapat berikatan lemah dengan protein. Karena protein pada umumnya tidak berwarna, maka perlu diberikan suatu zat warna yang mampu mendeteksi letak protein pada saat proses elektroforesis berjalan. Dengan adanya warna, maka protein dapat dilihat dan elektroforesis bisa dihentikan sebelum protein turun keluar dari gel (Departement of Biology, Davidson Colleg., n.d.). Gliserol berfungsi sebagai bahan pengawet dan bahan penambah berat protein. Dengan adanya gliserol yang dicampurkan dengan protein, protein dapat turun ke dalam sumuran saat dimuatkan tanpa menyebabkan protein menjadi menyebar ke luar sumuran. Ditambahkan pula senyawa pereduksi berupa 2-merkaptotanol. Senyawa pereduksi ini berfungsi untuk memutus ikatan disulfida yang ada di dalam struktur protein sehingga protein dapat berjalan dengan seragam saat elektroforesis [4]. Setelah sampel dicampurkan dengan kedua bahan tersebut, sampel dihomogenkan dengan *vortex* dan kemudian dipanaskan dengan menggunakan *dry bath* pada suhu 95 C selama 3 menit. Pemanasan ini bertujuan untuk lebih mendenaturasi protein dan memecah struktur protein kuaterner (Departemen of Biology, Davidson College., n.d.) serta untuk menginaktivasi protease endogen [6]. Setelah sampel dicampur dengan *loading buffer* sampel harus segera dipanaskan dan jangan dibiarkan terlalu lama. Hal ini untuk mencegah terjadinya degradasi protein oleh enzim protease mengingat enzim protease sangat aktif di dalam *loading buffer* [4].

Setelah selesai dipanaskan, sampel dapat langsung dimuatkan ke dalam sumuran-sumuran gel elektroforesis. Volume yang dimuatkan adalah 10ul sementara volume penanda protein yang dimuatkan adalah 4ul. Elektroforesis berjalan dari kutub negatif di bagian atas ke kutub positif di

bagian bawah alat elektroforesis. Setelah elektroforesis selesai, gel diangkat dari cetaknya dengan hati-hati dan dicuci beberapa kali dengan aquadest steril untuk menghilangkan SDS [4]. Hasil elektroforesis yang digunakan untuk mengamati ukuran protein kemudian direndam dengan larutan *Coomassie Brilliant Blue*. Sebelumnya dilakukan fiksasi protein dengan merendam gel hasil elektroforesis tersebut di dalam larutan 10% asam asetat dan 25% isopropanol selama sekitar 15 menit untuk mencegah terjadinya difusi protein keluar gel terutama pada protein berukuran kecil serta mempercepat pembersihan SDS. Setelah itu, larutan fiksasi tersebut dibuang dan gel direndam dalam larutan *Coomassie Brilliant Blue*. *Coomassie Brilliant Blue* adalah pewarna yang umum digunakan pada staining untuk protein dan termasuk dalam zat warna anionik. *Coomassie Brilliant Blue* mampu berikatan dengan protein. Kelebihan pewarna yang terkumpul di dalam gel dapat dihilangkan dengan aquadest atau dengan campuran metanol dan asam asetat. Protein akan terdeteksi sebagai pita berwarna biru dengan latar belakang jernih. Hasil *staining* dengan *Coomassie Brilliant Blue* menunjukkan banyak pita protein yang terlihat dengan berbagai macam ukuran bila sampel belum dimurniakan (Departement of Biology, Davidson Collge., n.d.; Rybicki, E., dan Purves, M., n.d.). Berdasarkan hasil percobaan terbentuk dua pita protein trastuzumab sebesar 55 kDa dan 25 kDa. Hasil tersebut sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa ukuran protein trastuzumab berkisar ~50 kDa dan ~23 kDa [11].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dari penelitian tersebut terdapat beberapa faktor yang perlu diperhatikan pada pertumbuhan kultur yaitu dengan memperoleh hasil transformasi dengan frekuensi tinggi, yaitu kemurnian dari reagen yang digunakan dalam buffer, kondisi pertumbuhan sel dan kebersihan peralatan yang digunakan. Keuntungan yang signifikan ketika bekerja dengan produk rekombinan adalah bahwa cukup tersedianya informasi tentang produk dan kontaminan. Dengan informasi ini, strategi tiga tahap pemurnian (*Capture Intermediate, Purification, Polishing*) dapat diterapkan. Adanya sel yang terdapat pada kultur harus melewati beberapa tahap yaitu dengan pembiakan sel, lisis standard metode homogenisasi dengan suhu <4°C. pengukuran nilai absorbansi yang memperoleh hasil nilai OD600 yaitu 2,700 dengan konsentrasi yang berbeda dan pengamatan elektroforesis SDS gel poliakrilamid membentuk 2 pita protein trastuzumab sebesar 55 kDa dan 25 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Amtiria, R., & Berawi, K. N. (2018). *Peran Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 pada Kanker Payudara Role of Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 in Breast Cancer*, 5, 644–647.
- [2] Bustan. M. N. 2015. *Epidemiologi Penyakit Tidak Menular*. Jakarta : PT. Rineka Cipta.
- [3] Cahyawati, P. N. (2018). *Imunoterapi pada Kanker Payudara*. WICAKSANA, *Jurnal Lingkungan & Pembangunan*, 2(1), 52–55.
- [4] Coligan, J. E. 1995. *Current protocols in protein science volume 1 editorial Board*. USA : John Wiley&Sons Inc.
- [5] Hacker, D. L., & Wurm, F. M. (2017). *Recombinant DNA Technology for Production of Protein Therapeutics in Cultured Mammalian Cells ☆. Reference Module in Life Sciences*. Elsevier Ltd.
- [6] Lebediker, M. 2002. *PAGE-SDS Laemmli protocol*. Faculty of Science, The_Hebrew University of Jerusalem.
- [7] Lee, F. W. F., Elias, C. B., Todd, P., & Kompala, D. S. (1998). *growth - associated production of a foreign protein , fi -galactosidase*, 73–80.
- [8] Registre, M., & Proudlock, R. (2016). *The In Vitro Chromosome Aberration Test. Genetic Toxicology Testing* (Vol. 227). Elsevier Inc.
- [9] Rybicki, E., dan Purves, M. (n.d.). *SDS Poluacrilamide Gel Electrophoresis (SDSPAGE)*.
- [10] States, U., Puck, T. T., & Yerganian, G. (1990). *Chinese hamster ovary cell*, (Wurm), 1–3.

- [11] Van Hijum, S. A. F. T., et al. 2006. *Structure-function relationships of glucan sucrase and fructansucrase. Microbiology and Molecular Biology reviews*, 07, 157-176.
- [12] William D. Stansfield, J. S. 2006. *Schaum's easy outlines biologi molekuler dan sel*. Jakarta: Penerbit Erlangga.