

Optimasi Purifikasi Darbepoetin Alfa Berdasarkan Metode Kromatografi Penukaran ION dengan Dua Variasi Resin

Optimization of Purification of Darbepoetin Alfa Based on ION Exchange Chromatography Method with Two Variations of Resin

Indah Shaliha ^{1*}

Marlia Singgih Wibowo ²

Neny Nurainit ³

¹Program Studi Farmasi,
STIKES Khas Kempek,

²Program Studi Sains dan
Teknologi Farmasi, Institut
Teknologi Bandung, Bandung,
Jawa Barat, Indonesia

³Penelitian dan Pengembangan,
PT Biofarma

*email: shalihaindah@gmail.com

Abstrak

Kasus gagal ginjal merupakan kasus yang setiap tahunnya mengalami peningkatan. Kasus ini tak bisa dianggap sepele karena bisa mengancam nyawa seseorang. Memang penyakit gagal ginjal tidak menular seperti penyakit lainnya dan disebabkan oleh pola hidup yang buruk. Kasusnya di Indonesia sendiri mengalami angka kenaikan yang cukup tajam. Sebagai contoh di Kepulauan Riau angka pasien cuci darah mengalami lonjakan tajam dari 85 orang menjadi 700 orang dan kenaikannya mencapai 10 kali lipat. Darbepoetin (merupakan EPO yang memiliki gula lebih banyak) yang dikenal pula dengan nama lain hematopoietin adalah senyawa glikoprotein yang mengendalikan proses eritropoiesis (produksi sel darah merah). Hormon ini dihasilkan di ginjal, juga ada yang dihasilkan di hati. Tujuan dari penelitian ini adalah memurnikan darbepoetin itu sendiri dan menghilangkan beberapa protein lain atau zat pengotor yang mengganggu agar darbepoetin ini sendiri siap diproduksi dan membantu banyak orang yang mengalami gagal ginjal. Metode yang digunakan adalah kromatografi penukar ion dengan resin Toyopearl DEAE 650 M. Selanjutnya dilakukan optimasi dengan berbagai variasi khususnya variasi resin yang digunakan adalah resin Toyopearl DEAE 650 M dan GE-DEAE. Berdasarkan hasil, DPO bisa dimurnikan dengan resin Toyopearl. Setelah itu dilakukan optimasi pemurnian dan didapat jika resin TOSOH-DEAE memang merupakan resin yang lebih baik daripada GE-DEAE.

Kata Kunci:

EPO
Kromatografi Penukaran ION
Pemurnian

Keywords:

EPO
ION Exchange
Chromatography
Purification

Abstract

Kidney failure cases are cases that increase every year. This case cannot be considered trivial because it can threaten someone's life. Indeed, kidney failure is not contagious like other diseases and is caused by a bad lifestyle. The number of cases in Indonesia itself has increased quite sharply. For example, in the Riau Islands the number of dialysis patients experienced a sharp jump from 85 people to 700 people and the increase reached 10 times. Darbepoetin (which is EPO which has more sugar) which is also known as hematopoietic, is a glycoprotein compound that controls the process of erythropoiesis (red blood cell production). This hormone is produced in the kidneys, and some is also produced in the liver. The aim of this research is to purify darbepoetin itself and remove several other proteins or interfering impurities so that darbepoetin itself is ready to be produced and help many people who experience kidney failure. The method used was ion exchange chromatography with Toyopearl DEAE 650 M resin. Optimization was then carried out with various variations, especially the resin variations used were Toyopearl DEAE 650 M and GE-DEAE resins. Based on the results, DPO can be purified with Toyopearl resin. After that, purification optimization was carried out and it was found that TOSOH-DEAE resin was indeed a better resin than GE-DEAE.



© 2023 The Authors. Published by Institute for Research and Community Services Universitas Muhammadiyah Palangkaraya. This is Open Access article under the CC-BY-SA License (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>). DOI: <https://doi.org/10.33084/jsm.v9i2.5685>

PENDAHULUAN

Eritropoetin merupakan hormon yang diketahui memiliki peranan penting untuk produksi sel darah merah dan memiliki fungsi fisiologis yang kompleks. Saat hormon ini berkurang atau tidak diproduksi dalam tubuh tentunya tubuh akan mengalami anemia. Adanya

stimulasi pemberian hormon eritropoetin dari luar biasanya untuk penderita kasus gagal ginjal kronis dan kanker (Falck, 2017).

Eritropoetin yang dikenal pula dengan nama lain hematopoietin, adalah senyawa glikoprotein yang mengendalikan proses eritropoiesis (produksi sel darah

merah). Hormon ini dihasilkan di ginjal, juga ada yang dihasilkan di hati. Produksi eritropoetin di hati umumnya terjadi pada janin, sedangkan produksi eritropoetin di ginjal terjadi pada masa dewasa. Eritropoetin digunakan pada kondisi anemia akibat penyakit gagal ginjal kronik, serta anemia akibat kemoterapi kanker (Farmakoterapi, 2017).

Dalam skala industri, Indonesia memperoleh produk EPO dari beberapa produsen di negara-negara Eropa dan Amerika. Kebutuhan EPO Indonesia untuk tahun 2012 mencapai 850.000 IU per tahun yang berupa obat dalam bentuk 2000 IU, 4000 IU, dan 10.000 IU. IU adalah satuan internasional unit untuk EPO (LIPI, 2015). Berkat adanya eritropoetin sel-sel darah merah bisa dikendalikan dan diproduksi karena umumnya sel darah merah menua dan harus diganti dalam waktu 3 bulan sekali. Jika ginjal tidak dapat melaksanakan fungsinya sebagai penghasil hormon eritropoetin maka diperlukan asupan eritropoetin dari luar.

Meski eritropoetin ditemukan sangat efektif untuk mengatasi pasien anemia namun pendeknya waktu paruh membuat injeksi hormon ini harus berlangsung berkali-kali dalam satu minggu dan kondisi ini tentu kurang efektif. Oleh karena itu para pakar menemukan cara dengan mensintesis darbepoetin yang merupakan turunan eritropoetin (Macdougall, 2003),

Darbepoetin alfa merupakan glikoprotein yang memiliki 2 ikatan ekstra situs N-glikosilasi. Oleh karenanya darbepoetin alfa mempunyai 5 ikatan N-rantai karbon dibandingkan dengan rHuEpo biasa yang hanya memiliki 3 ikatan saja. Adanya ikatan tambahan membuat waktu paruh DPO lebih lama daripada EPO biasa yaitu 3 kali lebih lama (Macdougall, 2003).

Produksi dari darbepoetin tersebut tentunya merupakan hasil dari rekayasa genetika. Dalam proses sintesisnya diperlukan pemurnian dari eritropoetin tersebut karena jika belum dalam keadaan murni tentunya tubuh akan menolak karena adanya partikel asing yang masuk ke dalam tubuh.

Oleh sebab itu diperlukan suatu metode pemurnian darbepoetin alfa agar kasus penolakan dalam tubuh bisa dicegah sebisanya mungkin. Karena darbepoetin yang belum murni tentunya bisa membahayakan tubuh.

Metode penelitian yang digunakan dalam kasus ini yaitu menggunakan kromatografi penukar ion dengan memanfaatkan muatan yang terkandung di dalam DPO tersebut dalam keadaan basa. Dengan begitu tentunya proses pemurnian DPO pun akan lebih mudah dalam bentuk anionnya.

Tujuan dari penelitian ini adalah memurnikan eritropoetin itu sendiri dan menghilangkan beberapa protein lain atau zat pengotor yang mengganggu agar eritropoetin ini sendiri siap diproduksi dan membantu banyak orang yang mengalami gagal ginjal.

METODOLOGI

Alat

Alat hitung sel (Cedex hires (roche), Alat sentrifugasi (High Zentrifugen Rotanta 460R), Alat BSC (*biological science culture*), Tabung ukuran 25 mL dan 50 mL (Falcon), Tabung kecil ukuran 5 mL (Eppendorf), Filter ukuran 0,42 μ m (Millipore), Syringe (Thermo Syringe), strip glucose dan lactate (Roche), pH meter (Thermo), Mikro pipet berukuran 2 μ L-1000 μ L, Pipet steril ukuran 5 mL-50 mL, Labu erlenmeyer ukuran 1L (Corning), Alat IEF (Serva), Alat SDS Page (BR Biochem Life Sciences Private), Alat BCA Assay (Thermo Fisher), Kit BCA Assay (Thermo) dan Alat IEC (*Ion Exchange Chromatography*).

Bahan

Sel CHO (*Chinese Hamster Ovary*), feed, galaktosa, NAMA, glukosa, Larutan rehidrasi (Serva), Servalit, Gel IEF, Cooling fluid (serva), Sampel standar (Aranesp), Buffer tris pH 8, pH meter, TBS-BSA 2%, Antibodi I 2% BSA-TBS, TBST-T, Antibodi 2%, Substrate BCIP-NBT, DIWF (*deionization water*), Membran ukuran 100 KDA, Larutan NaOH 0,5 M, antibodi primer, antibodi sekunder, PBS, PBS-Tween, Ladder, Running Buffer SDS

Page, Buffer Fosfat (Merck), Larutan NaCl (Merck), Larutan Histidin (Merck).

Proses Resusitasi sel CHO

Lampu BSC UV dinyalakan selama 30 menit untuk menghilangkan kontaminan dan bakteri patogen lainnya. Setelah itu alat hitung sel dinyalakan dan dimasukan DIWF sebagai standar. Alat-alat lain yang dibutuhkan seperti alat sentrifugasi juga dinyalakan. Semua alat-alat dan bahan yang dibutuhkan disiapkan terlebih dahulu dan kaca BSC dibuka sampai batas. Terlebih dulu desinfektan disemprotkan untuk menghilangkan bakteri kontaminan. Lalu pada tabung sebesar 50 mL ditambahkan glutamin dengan kadar 4% serta opti CHO sesuai perhitungan. L-glutamin dikocok keras dan dimasukkan sebanyak 1,4 mL saja. Sedangkan untuk opti CHO ditambahkan dalam tabung sebesar 33,6 mL, dihomogenisasi menggunakan filter steril dengan ukuran 10 mL.

Selanjutnya diambil 5 mL menggunakan filter steril lalu dimasukkan ke dalam tabung. Sel CHO diambil dari nitrogen cair dan dimasukkan ke sebuah wadah isopropanol es. Sel CHO lalu dicairkan dan dipindahkan ke tabung 15 mL yang berisimedia untuk membuang DMSO. Setelah itu disentrifugasi selama 5 menit pada 2000 rcf, supernatannya diambil lalu dibuang. Selanjutnya diambil 5 mL media lalu dimasukkan ke dalam tabung 15 mL yang mengandung pelet hasil dari sentrifugasi. Media dan pelet dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer dan direkatkan dengan menggunakan parafilm. Selanjutnya selama 18 hari sel diberi glukosa dan feed dan dipanen.

Proses Isoelectric Focusing (IEF)

Seluruh bahan yaitu larutan rehidrasi dan servalit dicampurkan ke dalam tabung ukuran 50 mL. Lalu dilakukan homogenisasi dan dimasukkan ke suatu wadah plastik. Gel tersebut direndam dan disimpan ke dalam inkubator pada suhu 25^o C selama 1 malam. Wadah yang berisi gel IEF yang telah diinkubasi selama 1 malam disimpan di atas alat IEF. Sebelumnya dasar dari gel tersebut diberi *cooling fluid* untuk menghindari panas.

Pada katoda diberi buffer asam fosfat sedangkan pada anoda diberi buffer EPO. Gel disimpan di atas alat IEF, sampel dimasukkan ke dalam sumur dan alat ini dinyalakan selama kurang lebih 4 jam.

Proses western blot

Gel yang didapatkan dari proses IEF, direndam dalam buffer tris pH 8 dan ditiriskan. Nitroselulosa dan *paper block* direndam dalam buffer tris pH 8 dan ditiriskan. Gel diletakkan dibawah membran nitroselulosa. *Paper block* diletakkan diatas membran nitroselulosa. Beberapa tisu disimpan di atas *paper block*. Perendaman gel berlangsung selama semalam. Setelahnya membran diblok oleh BSA 2% dalam larutan TBSA selama 3-4 jam. Setelah itu gel tersebut dicuci dengan larutan TBST dengan konsentrasi 0,05% selama 3 kali selang 2 menit. Selanjutnya antibodi pertama dimasukkan selama kurang lebih 2 jam dan selanjutnya dicuci kembali dengan menggunakan TBST sebanyak 3 kali. Antibodi kedua selanjutnya dimasukkan pula ke dalam gel selama 1 jam saja dan selanjutnya dicuci kembali dengan TBST. Langkah selanjutnya ditambahkan substrat BCIP/NBT sampai gel memiliki pita warna biru. Substrat tersebut dibuang kemudian langkah terakhir cuci gel tersebut sampai kering.

Purifikasi protein DPO dengan kromatografi pertukaran ion

Resin yang digunakan dalam penelitian ini adalah toyopearl DEAE 650M. Sistem TFF diatur dahulu dengan menggunakan membran 100 KDA dan luas permukaan 0,005 m². Sistem TFF disanitasi terlebih dahulu dengan larutan NaCl 0,5M selama 1 jam. Sistem TFF diekuilibrasikan dengan buffer elusi fosfat dan filtrat port serta retentat port dibuka dan diatur lajunya. Terdapat dua buffer dalam sistem yaitu buffer fosfat dan buffer fosfat yang mengandung NaCl. Sebelumnya sampel dimasukkan ke dalam sistem. IEC pool disirkulasikan menggunakan pompa peristaltik dengan kecepatan 30 mL/min hingga mencapai 10-20mL selanjutnya residu dibilas dari sistem TFF dengan menutup filtrat port dan buffer dialirkan selama

beberapa menit dengan kecepatan 50 mL/min sebanyak 20-30 mL dengan menggunakan buffer elusi fosfat. Filtrat port dibuka dan diatur serta disirkulasikan bilasan hingga mencapai 10-20 mL dicampur konsentrasinya serta dicuci. Konsentrat IEC di sampling sebanyak 500 μ L.

Prosedur SDS Page

Sebelum proses SDS Page dilakukan alat-alat disambungkan terlebih dahulu, termasuk gel SDS untuk mengetahui seberapa besar kemurnian sampel yang telah dipisahkan. Karena sampel yang digunakan cukup banyak maka proses running pun dilakukan dengan 2 gel sekaligus. Setelah itu suatu larutan *running buffer* dimasukkan sampai penuh untuk mencegah gel mengering dan membantu proses protein bergerak sesuai dengan berat molekulnya. Kemudian sampel dengan pemberat dan *ladder* dimasukkan ke sumur-sumur yang telah dibuat dan dilakukan proses running selama kurang lebih 2 jam untuk mendapatkan proses pemisahan protein yang lebih efisien.

Proses kontak sampel dengan dua variasi resin

Sampel dimasukkan ke dalam microplate sebanyak 32 percobaan. Tiap sampel mendapatkan perlakuan yang berbeda sesuai desain eksperimen yang telah dibuat. Supaya sampel dapat melakukan kontak secara maksimal dengan resin serta buffer, dilakukan proses sentrifugasi selama kurang lebih 4 jam dengan kecepatan 300 rpm. Setelah itu sampel dalam mikroplate diambil kembali dengan tabung kecil eppendorf.

Menentukan konsentrasi protein dengan BCA Assay

Hal pertama yang dilakukan adalah preparasi standar dan reagen sesuai dengan prosedur yang berlaku. Albumin (BSA) disiapkan dengan berbagai variasi konsentrasi dari mulai konsentrasi paling tinggi sampai konsentrasi albumin yang paling rendah (dari konsentrasi 2000 μ g/mL sampai 25 μ g/mL). Selanjutnya disiapkan BCA reagent dengan menyiapkan 50 bagian reagent A dan 50 bagian reagen B. Standar dan reagen dimasukkan dalam microplate sebesar 25 μ L. Selain itu sampel dan reagen

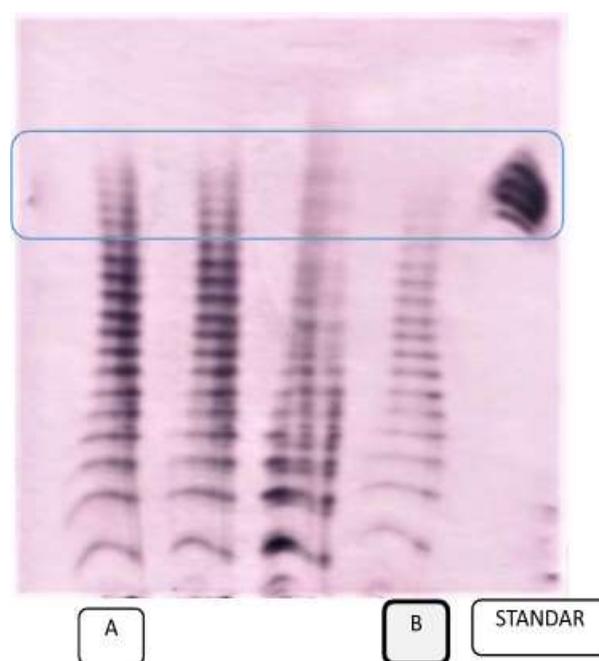
pun dimasukkan dan perlakuannya samadengan standar dan reagen. Setelah itu microplate dimasukkan dalam suatu instrumen hingga konsentrasi total dari sampel yang diinginkan pun akhirnya bisa diketahui.

HASIL DAN PEMBAHASAN

PEMBAHASAN

Hasil IEF DPO yang belum dipurifikasi

Berdasarkan titik isoelektriknya ternyata ada protein DPO yang memiliki nilai bervariasi. Untuk lebih meyakinkannya ada pita standar yang muatan isoelektriknya sebanding dengan eritropoetin, pita standar ini disebut dengan Nersp. Karena ini merupakan hasil *iso electrofocusing* tanpa proses purifikasi, tentunya terdapat pita-pita protein lain yang muatannya lebih rendah dan bukan protein yang diharapkan.



Gambar 1. Hasil isoelectric focusing DPO yang belum dipurifikasi. Sampel (A) dan (B) merupakan sampel DPO yang belum dipurifikasi sedangkan (S) merupakan standar Aranesp yang digunakan dalam percobaan.

Dengan kata lain protein-proteintersebut merupakan zat pengotor atau proteinyang tidak diharapkan yang nantinya akan dilakukan proses pemurnian. Proses *isoelectric focusing* merupakan hal yang lumrah untuk mendeteksi adanya protein berdasarkan titik isoelektriknya. Teknik IEF merupakan pemisahan komponen amfolitikarena molekul bisa berlaku seperti asam lemah maupun basa tergantung dari titik isoelektriknya (Pergande, 2017). Titik isoelektrik merupakan muatan yang sama antara muatan positif dan negatif sehinggatotal muatan dalam protein tersebut biasanya bernilai nol (Rozycki, 2018).

Standar yang digunakan untuk metode isoelektrik poin ini adalah ARANESP yang merupakan darbepoetin alfa. Biasanya titik isoelektriknya ada pada rentang 3,7-4,7 karena rentangnya lumayan besar maka terdapat 4 pita utama saat metode IEF ini dilakukan. Oleh sebab itu sampel yang pitanya sejajar dengan standar maka hal tersebut menunjukkan adanya DPO yang diinginkan.

Proses IEF memang tidak menghasilkan 1 pita spesifik karena beberapa DPO rekombinan biasanya memiliki 4 pita bahkan ada yang lebih. Hal ini disebabkan muatan isoelektrik DPO yang lumayan besar sehingga rentangnya pun lumayan besar. DPO memang pada umumnya memiliki pita banyak karena sifatnya sebagai molekul besar dan memiliki gugus fungsi yang banyak (Kang. dkk., 2010). Pada dasarnya titik isoelektrik protein terkadang bersifat lebih asam dan terkadang bersifat lebih basa. Saat titik isoelektrik tinggi itu menandakan bahwa protein lebih bersifat basa atau muatannya lebih negatif sedangkan jika pita titik isoelektrik rendah itu menandakan jika protein tersebut bersifat lebih asam (Breidbach et al., 2003). Pada gambar bisa terlihat bahwa titik isoelektrik EPO cenderung tinggi itu artinya EPO bersifat asam dan anionnya bersifat sangat basa.

Hal ini terjadi karena adanya penambahan situs N-glycosylation menyebabkan DPO menjadi lebih asam (sekitar 3,7-4). Dengan penambahan dua N-

Glycosylation kestabilan DPO menjadi meningkat (Delanghe, 2008).

Pada dasarnya pita IEF menghasilkan banyak variasi yaitu ada yang pitanya tinggi maupun rendah. Hal ini karena struktur DPO yang kompleks seperti adanya terminal asam sialat (sialic acid) yang berikatan dengan rantai glikan pada posisi α 2-3, oligomer N-asetilglukosamin dan residu α manosa (Schmidt et al., 2003).

Namun proses *isoelektrofocusing* memerlukan tahap lain yaitu proses western blot karena gel agarosa tidak mampu membaca pita yang dihasilkan dari proses *isoelektrofocusing* tersebut. Dengan begitu diperlukan transfer membran ke western blot.

Transfer membran nitroselulosa dengan western blot memerlukan waktu semalam penuh dengan cara yang manual dan memerlukan waktu hanya 5 menit dengan menggunakan instrumen. Sebenarnya western blot sendiri merupakan suatu proses pemindahan protein dari gel hasil elektroforesis ke membran agar hasilnya mudah terbaca. Karena seperti yang diketahui jika gel hasil elektroforesis tidak memberikan hasil dan pita apapun sehingga membutuhkan metode western blot didalamnya.

Pita sampel sebelah kiri terlihat lebih tebal daripada pita sampel di sebelah kanan. Hal ini karena pita sampel sebelah kanan mengandung kadar DPO yang lebih sedikit sehingga saat proses IEF pita yang dihasilkan pun cenderung tipis bahkan dengan beberapa kali pemekatan. Namun seperti yang terlihat di atas jika DPO yang kita harapkan masih bisa dipakai karena pita yang dihasilkan masih sebanding dengan standar yang telah ditetapkan.

Karena pita sampel sejajar dengan standar maka sampel ini bisa dimurnikan dengan perlakuan lebih lanjut dan membuktikan jika ada darbapoetin dalam sampel.

Purifikasi sampel dengan kromatografi penukar ion

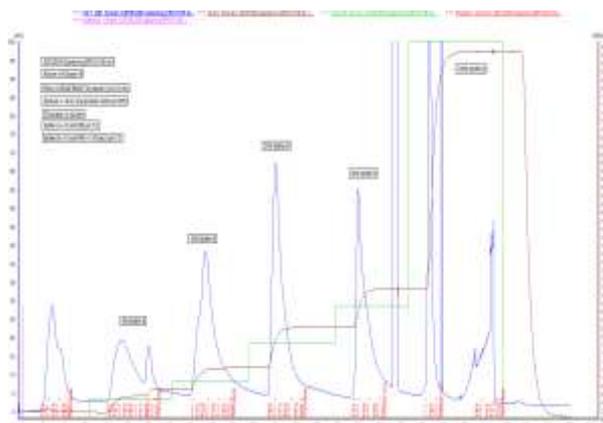
Metode yang selanjutnya dilakukan adalah pemurnian sampel pertama atau A dengan kromatografi penukar ion. Resinyang digunakan dalam penelitian ini adalah

resin toyopearl DEAE ukuran 650 kda. Karena protein yang ingin dipisahkan adalah anionnya (negatif) maka resin yang digunakan adalah resin penukar anion.

Dari kromatogram dapat terlihat bahwa ada beberapa puncak yang mengindikasikan adanya DPO. Fase gerak yang digunakan dalam proses pemisahan ini adalah larutan NaCl. Karena protein sering memiliki pH yang berubah-ubah, maka dalam proses pemisahan ini diperlukan sebuah buffer untuk menstabilkan pH agar tidak berubah-ubah. Buffer yang digunakan dalam penelitian ini adalah buffer fosfat pH 7.

Tingginya puncak menandakan bahwa intensitas DPO dalam larutan tersebut besar. Hanya saja dalam proses pemisahan ini DPO belum benar-benar murni dan masih terdapat beberapa protein pengotor yang menempel di dalam sampel. DPO memiliki muatan atau charge yang cenderung lebih negatif dibandingkan protein lainnya dalam bentuk anion (Jelkman, 2013) sehingga diperlukan suatu senyawa yang bisa ditukarkan saat berikatan dengan resin penukar anion. Biasanya spesi yang ditukarkan adalah anion yang keelektronegatifannya tinggi seperti ion klorin (-). Karena ion ini jauh lebih bermuatan negatif daripada DPO sehingga cenderung bisa ditukarkan untuk berikatan dengan resin sehingga fraksi DPO pun bisa dipisahkan (Garcia, 2013).

Molekul DPO merupakan molekul yang besar dan bermuatan cenderung negatif sehingga tidak bisa langsung murni dengan satu kali tahap pemisahan. Diperlukan pemisahan berkelanjutan sampai DPO tersebut murni sehingga diperlukan sampel yang banyak agar tahap pemurnian bisa lebih efisien.



Gambar II. Hasil kromatogram dari sampel (terdapat 8 puncak kromatogram) yaitu pada sampel IA3 dan IA4 dengan konsentrasi 0%, buffer B IB3 dan IC4 dengan konsentrasi buffer 5 %, 2A4 dengan konsentrasi 10% buffer B, 2B5 dengan konsentrasi 20% buffer B, IA2' dengan konsentrasi 30% buffer B, IB2' dengan konsentrasi 100% buffer B dimana buffer B merupakan buffer fosfat 10 mM dan 1 M natrium klorida pH 7.

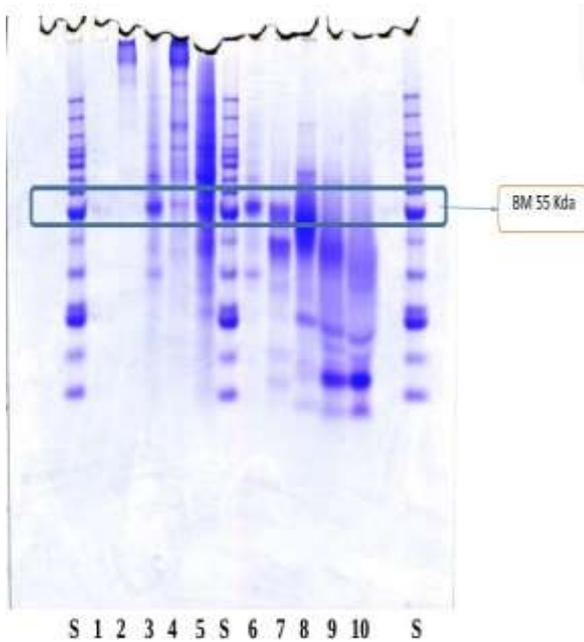
Proses pemisahan DPO harusnya berjalan dengan maksimal melalui proses kromatografi penukar ion namun tentunya semua itu tergantung dari penggunaan resinnya (Hernandez et al., 2015).

Pemilihan resin biasanya didasari oleh sifat pengikatan resin terhadap sampel atau protein yang ingin dipisahkan. Selain itu resin tersebut harus bersifat selektif dimana hanya protein yang diinginkan saja yang dapat bertukar secara kation atau anion dengan resin tersebut. Ketika selektivitas resin tersebut tinggi tentunya proses pemurnian EPO atau DPO pun semakin baik (Ostrihonova et al., 2019).

Resin Toyopearl biasanya dapat memurnikan DPO dari protein lain dengan kadar kemurnian sebesar 90%. Namun resin ini juga seringkali dimodifikasi entah dengan rantai lurus maupun siklik dengan harapan proses pemurnian DPO berjalan dengan lebih maksimal (Stanley, 2016).

Hasil SDS page dari sampel I DPO

Setelah sampel A dipurifikasi dengan menggunakan metode kromatografi ion exchange maka langkah selanjutnya adalah SDS page. Metode ini merupakan pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya. Biasanya protein yang berat molekulnya sangat kecil akan berada paling bawah begitupun jika berat molekul suatu protein besar maka akan berada paling atas.



Gambar III. SDS Page dari DPO, dari kiri ke kanan (S) merupakan standar yang biasa digunakan untuk SDS Page, nomor 1 sampai 10 merupakan sampel yang telah dipurifikasi dan terdapat puncak kromatogram saat proses kromatografi penukar ion.

Molekul protein yang diinginkan dalam penelitian ini adalah darbepoetin yang memiliki berat molekul 55 Kda. Bisa terlihat pada gambar jika molekul DPO mulai nampak pada berat molekul sekitar 55 Kda. Beberapa fraksi sampel tersebut ada yang masih memiliki banyak zat pengotor dan ada yang mulai sedikit zat pengotornya. Fraksi yang sudah memiliki zat pengotor sedikit adalah fraksi no 3 dan fraksi no 6.

Sampel yang mengalami proses SDS page merupakan sampel yang diketahui memiliki puncak kromatogram saat melalui purifikasi dengan kromatografi penukar ion sehingga hanya ada 10 sampel saja yang melalui proses SDS page.

Pemisahan dengan kromatografi penukar ternyata berhasil dengan indikasi pada fraksi no 3 dan 6 yang sudah sedikit pengotornya. Namun karena SDS page memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya, sampel yang nampak pada gambar tentu saja bukan hanya DPO. Selain itu meskipun berat molekul DPO

adalah 55 Kda tapi kita tetap harus mengkonfirmasi jika ini benar-benar DPO dengan metode *isoelectric focusing* kembali.

Sebenarnya sampel ini harus melalui metode kromatografi penukar ion kembali untuk mendapatkan sampel yang benar-benar murni. Hanya saja sampel sangatlah terbatas dan tidak mencukupi sehingga sampel tidak dapat dimurnikan kembali dengan metode kromatografi.

Namun menurut beberapa penelitian ada juga proses kromatografi penukar ion hanya dengan sekali proses *running* karena resin toyopearl biasanya dapat memurnikan sampel sampai 87% (Stanley, 2016). Sedangkan menurut sumber lain jika proses pemurnian atau purifikasi dengan kromatografi penukar ion menghasilkan sampel yang murni minimal 58% dalam sekali *running* (Falck, 2017).

Hal ini karena resin Toyopearl memiliki muatan yang positif dan dapat menarik muatan negatif dengan baik sehingga resin ini kapasitas kerjanya lebih baik daripada resin lain (Hong, 2017).

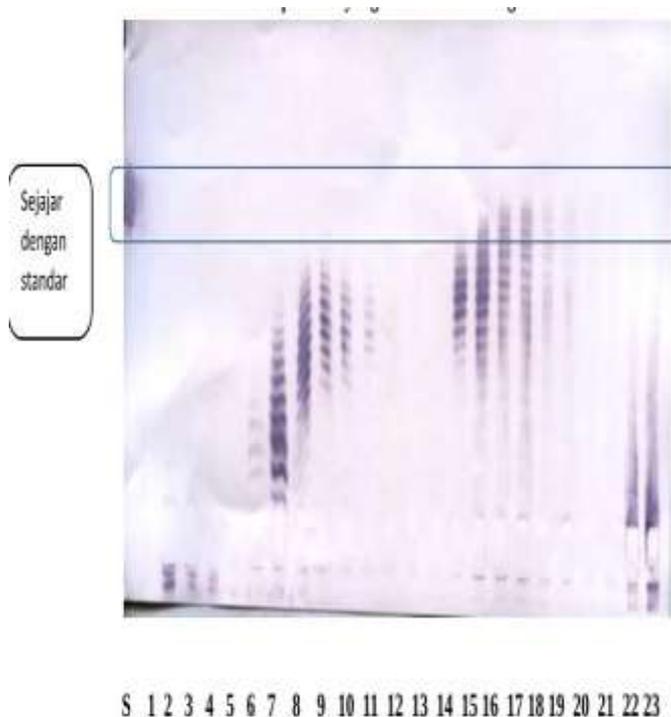
DPO memiliki berat molekul yang bervariasi dari yang berat molekulnya rendah hingga tinggi. Namun biasanya molekul EPO yang diharapkan memiliki berat molekul kurang lebih 50 Kda (Kang, dkk, 2010).

Sehingga tentunya diperlukan sampel dalam jumlah yang besar ketika ingin memurnikan DPO lewat metode kromatografi penukar ion. Namun proses mendapatkan DPO memang diperlukan waktu yang lumayan lama dan faktor-faktor pendukung lainnya. Saat menginginkan DPO dalam jumlah yang banyak diperlukan suatu fermentor saat pembiakan sel CHO. Sehingga semakin banyak sel CHO yang dikembangkan maka diharapkan DPO yang dihasilkan pun semakin banyak.

Hasil IEF dari sampel EPO yang sudah di kromatografi

Berdasarkan hasil yang tertera pada pita sampel menunjukkan setara dengan pita standar. Pita standar selalu memiliki 4 pita utama karena titik isoelektrik DPO yang bervariasi. Molekul darbepoetin yang besar dan memiliki

banyak gugus fungsi membuat pita yang dihasilkan harus banyak yaitumemiliki 4 pita.

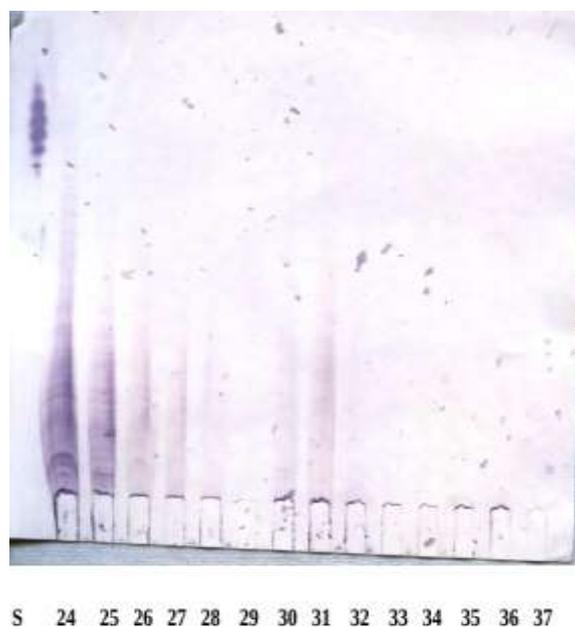


Gambar IV. Hasil IEF setelah di kromatografi, (S) merupakan standar yang biasa digunakan dalam IEF, nomer (1) sampai (23) merupakan fraksi-fraksi sampel yang sudah mendapatkan perlakuan kromatografi penukar ion, pita sampel yang sejajar dengan standar merupakan indikasi adanya DPO dan muatan atau charge sampel sama dengan standar.

Berdasarkan hasil yang tertera pita sampel menunjukkan setara dengan pita standar. Pita standar selalu memiliki 4 pita utama karena titik isoelektrik DPO yang bervariasi. Molekul darbapoetin yang besar dan memiliki banyak gugus fungsi membuat pita yang dihasilkan harus banyak yaitumemiliki 4 pita.

Proses IEF menggunakan semua sampel yang telah dipurifikasi oleh KPI, baik yang terdapat puncak kromatogram ataupun tidak. Berbeda dengan SDS karena SDS hanyalah sampel yang mengandung sinyal dalam kromatogram bukan semuanya.

Seperti yang terlihat pada gambar setelah melalui metode kromatografi ion exchange sampel sudah memiliki banyak fraksi-fraksi yang terpisah yang memiliki titik isoelektrik bervariasi dari muatan rendah sampai yang bermuatan tinggi.



Gambar V. Hasil IEF lanjutan sampel nomer (24) sampai (37) tidak terdapat pita yang sejajar dengan standar sehingga bisa disimpulkan jika sampel ini tidak terdapat DPO yang diinginkan.

Oleh sebab itu meskipun sudah mencapai dan sejajar dengan pita standar tetap saja ada beberapa pita yang belum benar-benar melampaui standar seperti yang diharapkan. Meski begitu setidaknya muatan atau charge sampel yang diharapkan sudah tinggi dan sejajar dengan standar.

Meskipun muatannya bervariasi, sampel ini tetaplah eritropoetin namun memang yang muatannya atau charge tinggi lebih diharapkan daripada yang muatannya rendah. Meskipun dari hasil SDS page sudah terdapat pita dengan berat molekul kurang lebih 55 KDA tetap saja untuk memastikan apakah sampel ini DPO atau bukan harus dengan metode *isoelectric focusing*.

Karena titik isoelektrik DPO bersifat spesifik tentunya metode *isoelectric focusing* cenderung efektif untuk memastikan apakah dalam sampel terdapat eritropoetin atau tidak.

Desain eksperimen untuk pemurnian DPO

Saat ini untuk memurnikan DPO memang masih menggunakan metode kromatografi pertukaran ion. Hal ini karena umumnya metode kromatografi penukar ion sudah efektif memisahkan DPO dari protein-protein pengotor lainnya. Sebenarnya ada metode lain yang sangat selektif memurnikan DPO yaitu kromatografi afinitas dengan resin yang digunakan yaitu resin Ni-NTA (Singh, 2015). Namun diperlukan sampel yang sangat banyak saat memisahkan dengan resin Ni-NTA karena selektivitasnya yang tinggi dan hanya menghasilkan sample murni yang relatif sedikit.

Untuk menentukan metode mana yang paling efektif dalam pemisahan tentunya diperlukan metode DOE dan sampel yang digunakan adalah sampel no B untuk pencarian mana perlakuan paling maksimum dalam proses percobaan yang mana nantinya hasil screening sampel menggunakan DOE ini digunakan untuk proses purifikasi sampel lain.

Metode DOE merupakan hal yang lumrah dilakukan dalam memprediksi suatu percobaan atau eksperimen. Biasanya ada dua variabel yang berlaku dalam DOE yaitu variabel input (X) dan variabel respon (Y). Dengan menggunakan metode ini biasanya suatu penelitian akan mendapatkan hasil yang berkembang dan terdapat kemajuan yang signifikan sehingga DOE sering digunakan di beberapa industri seperti industri farmasi, makanan, kimia hingga pemasaran atau marketing (Durakovic, 2017).

Desain eksperimen diketahui merupakan metode statistika yang digunakan oleh ilmuwan untuk memahami fenomena yang kompleks. Ini menggunakan pendekatan sistematis dan penyelesaian masalah sehingga nantinya didapat gabung data dan kesimpulan yang valid (Kaselvoya, 2014).

Biasanya desain eksperimen digunakan sebagai metode optimasi kondisi suatu percobaan sehingga didapat data yang optimal dan valid dengan menggunakan beberapa parameter yang saling mempengaruhi (Dennison, 2015). Desain eksperimen ini melibatkan beberapa faktor yang mempengaruhi pada proses pemisahan. Faktor yang digunakan adalah jenis resin, variasi pH buffer, jenis buffer, jenis larutan blocking, variasi konsentrasi larutan blocking serta variasi konsentrasi dari buffer yang digunakan.

Dengan adanya variasi faktor untuk proses pemisahan tersebut diharapkan dapat tercapainya optimasi dan pemurnian DPO tersebut. Selanjutnya untuk desain eksperimen diperlukan suatu software untuk membuat desain optimasi seperti yang diharapkan selama ini. Software yang digunakan untuk proses ini adalah software Minitab 19. Berikut desain eksperimen untuk optimasi pemurnian dari sampel DPO:

Run Order	Factor Order	Center Pt	Block	pH	Jenis Buffer	Conc Buffer	Jenis Blocking	Conc Blocking	Resin
15	1	1	1	6,5	TrisHCl	15	Hi	1	Tosoh-DEAE
1	2	1	1	6,5	PH	5	NaCl	1	GE-DEAE
4	3	1	1	7,5	TrisHCl	5	NaCl	1	GE-DEAE
8	4	1	1	7,5	TrisHCl	15	NaCl	1	Tosoh-DEAE
18	5	1	1	7,5	TrisHCl	15	Hi	1	GE-DEAE
27	6	1	1	6,5	TrisHCl	5	Hi	1	Tosoh-DEAE
11	7	1	1	6,5	TrisHCl	15	Hi	1	GE-DEAE
26	8	1	1	7,5	PH	5	Hi	1	Tosoh-DEAE
24	9	1	1	7,5	TrisHCl	15	NaCl	1	GE-DEAE
9	10	1	1	6,5	PH	5	Hi	1	Tosoh-DEAE
20	11	1	1	7,5	TrisHCl	5	NaCl	1	Tosoh-DEAE
13	12	1	1	6,5	TrisHCl	5	NaCl	1	GE-DEAE
30	13	1	1	7,5	PH	5	Hi	1	GE-DEAE
29	14	1	1	6,5	PH	15	Hi	1	Tosoh-DEAE
10	15	1	1	7,5	PH	15	NaCl	1	Tosoh-DEAE
2	16	1	1	7,5	PH	5	NaCl	1	Tosoh-DEAE
25	17	1	1	6,5	PH	5	Hi	1	GE-DEAE
12	18	1	1	7,5	TrisHCl	5	Hi	1	Tosoh-DEAE
28	19	1	1	7,5	TrisHCl	5	Hi	1	GE-DEAE
14	20	1	1	7,5	TrisHCl	15	Hi	1	Tosoh-DEAE
17	21	1	1	6,5	PH	5	NaCl	1	Tosoh-DEAE

Tabel 1. Desain eksperimen untuk purifikasi EPO. Percobaan dilakukan sebanyak 32 kali dengan perbedaan perlakuan untuk mendapatkan pemisahan yang maksimal

Dari beberapa faktor yang mempengaruhi proses pemisahan terdapat 32 percobaan berbeda untuk menentukan optimasi pemurnian sampel. Faktornya pun beragam seperti misalnya menggunakan 2 variasi resin. Resin yang digunakan dalam desain percobaan ini salah satunya adalah resin GE-DEAE yang sifatnya gel. Meski begitu resin ini tetap memiliki prinsip penukar ion sama seperti resin TOSOH atau resin Toyopearl DEAE. Resin GE-DEAE disini bersifat penukar anion sama

seperti resin TOSOH. Karena sifatnya yang reaktif sama maka kedua resin ini dibandingkan agar proses pemisahan pun menjadi lebih baik.

Sedangkan seperti yang kita tahu jika toyopearl merupakan resin penukar anion dalam proses kromatografi dan sudah sering dijadikan sebagai metode pemisahan protein yang lumayan efektif.

Ada faktor lainnya yang tak kalah penting adalah variasi buffer. Seringkali buffer fosfat selalu dijadikan larutan penyangga agar pH larutan tidak berubah-ubah saat proses kromatografi. Namun tentunya diperlukan variasi buffer lainnya pula untuk mengetahui apakah buffer fosfat memang larutan penyangga terbaik atau tidak dalam proses pemisahan ini. Tak kalah penting pula besarnya konsentrasi antar buffer tersebut. Konsentrasi yang dipilih sebesar 5 dan 15mM karena sejauh ini konsentrasi 10 mM adalah yang dipakai untuk proses pemisahan DPO.

Selanjutnya faktor yang juga dimasukkan dalam desain eksperimen adalah blocking buffer. Terdapat 2 variasi blocking buffer yaitu histidin dan NaCl. Diharapkan dengan adanya variasi *blocking buffer* maka proses pemurnian pun berjalan dengan maksimal dan sesuai yang kita harapkan. Fungsi blocking buffer sendiri adalah agar spesi-spesi lain yang tidak diinginkan tidak ikut dalam proses pemisahan sehingga akhirnya pemisahan hanya terfokus pada spesi yang diinginkan. Tidak hanya berfungsi sebagai blocking buffer, histidin maupun NaCl pun berfungsi sebagai penukar anion. Saat DPO berikatan dengan resin tentunya harus ada spesi yang mampu ditukarkan

Dengan adanya desain eksperimen yang telah disebutkan di atas maka pemurnian protein pun sudah teroptimasi sehingga kedepannya kita tinggal memilih mana metode terbaik yang bisa dipilih untuk kemajuan penelitian di masa mendatang.

1	20	1	1	7,5	TrisHCl	15	H ₂ O	1	Toyos-DEAE
2	21	1	1	6,5	PE	5	NaCl	1	Toyos-DEAE
3	22	1	1	6,5	PE	15	H ₂ O	0	GE-DEAE
4	23	1	1	6,5	PE	15	NaCl	0	Toyos-DEAE
5	24	1	1	7,5	PE	15	H ₂ O	0	Toyos-DEAE
6	25	1	1	6,5	TrisHCl	15	NaCl	1	Toyos-DEAE
7	26	1	1	7,5	PE	5	NaCl	1	GE-DEAE
8	27	1	1	7,5	PE	15	H ₂ O	1	GE-DEAE
9	28	1	1	6,5	TrisHCl	5	H ₂ O	0	GE-DEAE
10	29	1	1	6,5	TrisHCl	5	NaCl	0	Toyos-DEAE
11	30	1	1	7,5	PE	15	NaCl	0	GE-DEAE
12	31	1	1	6,5	TrisHCl	15	NaCl	0	GE-DEAE
13	32	1	1	6,5	PE	15	NaCl	1	GE-DEAE

Tabel II. Desain eksperimen lanjutan untuk purifikasi EPO. Percobaan dilakukan sebanyak 32 kali dengan perbedaan perlakuan untuk mendapatkan pemisahan yang maksimal

Meski metode DOE sering digunakan dalam suatu percobaan namun keberhasilan metode tersebut tentunya tergantung dari peneliti dan variabel-variabel yang mempengaruhinya. Sehingga tentunya hasil yang didapat tidak selalu sempurna seperti yang kita harapkan.

Desain optimasi pemurnian protein ini menggunakan 2 variasi resin yaitu Toyopearl dan GE-DEAE yang diharapkan diantara kedua resin ini mampu memberikan hasil terbaik dalam pemisahan EPO.

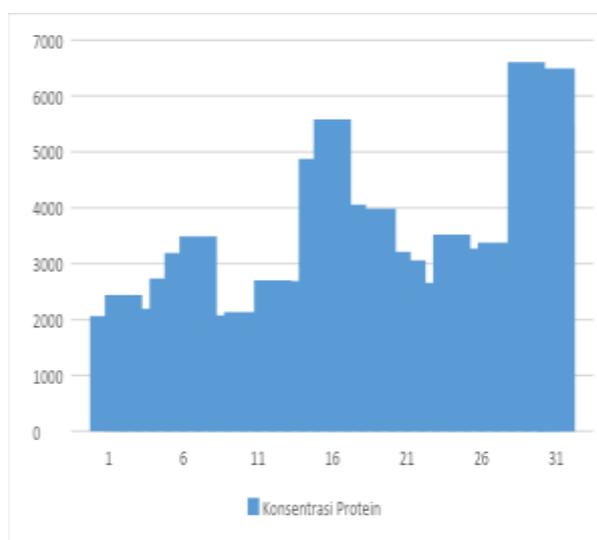
Penggunaan resin GE DEAE tak lepas karena kemampuannya memisahkan protein EPO. Resin ini mampu mengadsorpsi protein selama 200 detik dan menukarnya dengan ion yang bermuatan lebih besar dari protein EPO tersebut (Emanuelsson et al., 2008).

Desain eksperimen ini menggunakan *factorial functional* dan hanya bertujuan mencari metode terbaik agar nantinya proses pemurnian DPO berjalan dengan baik serta selektif.

Penentuan kadar protein berdasarkan metode BCA Assay

Penentuan kadar protein pada sampel setelah optimasi pemurnian dengan beberapa variasi bahan bertujuan untuk mengetahui seberapa besar proses pemisahan terjadi. Dengan menggunakan metode ini tentunya kita bisa mengetahui kadar protein keseluruhan dari sampel yang sudah dimurnikan.

Meski begitu metode ini memang tidak bisa menentukan kadar protein dari EPO saja melainkan semua protein yang ada dalam sampel sehingga tentunya diperlukan tahap lain agar kita yakin jika protein yang sudah terpisah ini merupakan EPO. Namun seperti yang kita tahu jika sampel sudah mendapatkan variasi perlakuan sesuai dengan desain eksperimen yang sudah ditetapkan. Dengan begitu tentunya bisa disimpulkan semakin sedikit kadar protein dengan metode BCA Assay maka itu artinya sampel sudah dapat dipisahkan secara optimum.



Gambar VI. Hasil penentuan konsentrasi protein dengan BCA Assay. Sampel nomor 1 sampai 32 merupakan sampel yang telah mendapatkan perlakuan berbeda-beda berdasarkan DOE untuk mendapatkan hasil purifikasi sampel yang maksimal, sampel yang memiliki nilai paling sedikit yaitu nomor 8 dan 11 merupakan perlakuan paling optimal.

Karena tentunya saat kontak dengan resin pasti ada protein yang terjerap dalam resin tersebut sehingga kadar protein dalam sampel tersebut turun. Terlebih resin yang digunakan merupakan resin penukar ion dan resin GE-DEAE. Meski kedua resin ini cara kerjanya sama dan keduanya sama-sama mampu menangkap

protein yang tidak diperlukan dan meloloskan protein yang diinginkan.

Pada BCA Assay konsentrasi absorbansi dengan standar kurva absorbansi dari variasi serum bovin albumin sebanding dengan konsentrasi protein dalam larutan. Sehingga nilai ini bisa digunakan untuk menentukan kadar protein dari sampel yang diinginkan (Huang, 2010).

Meski begitu pengukuran protein dengan cara ini bisa mengalami bias sehingga bisa saja kadar protein yang diukur kurang akurat. Hal ini karena asam amino seperti cysteine, tirosin dan tryptophan berpartisipasi mereduksi ion cu^{2+} menjadi cu^{+} . Sehingga protein tersebut malah membuat residu tersebut makin reaktif. Akhirnya komposisi protein dan standar bisa saja mengalami perbedaan yang signifikan hingga hasil pengukurannya menjadi tidak akurat (Brady, 2015).

Biasanya pengukuran menggunakan BCA Assay di daerah panjang gelombang 562 nm dan ini berlaku untuk semua protein (Hussain, 2019). Semua pengukuran kadar protein pada BCA merupakan pengukuran secara kuantitatif sekaligus kualitatif. Kuantitatif berdasarkan pengukuran absorbansi dan kualitatif berdasarkan perubahan warna dari hijau menjadi biru (Biru artinya sampel tersebut mengandung protein).

Resin TOSOH mampu menangkap protein yang muatannya lebih negatif. Resin ini pada akhirnya akan mengikat DPO dan spesi DPO ditukarkan dengan spesi lain yang lebih negatif seperti ion Cl^{-} misalnya. Sama halnya dengan resin GE DEAE yang juga merupakan penukar ion hanya saja bentuknya gel. Namun prinsip keduanya sama yaitu sama-sama resin penukar anion yang sifatnya spesifik.

Resin GE-DEAE Sepharose akan memisahkan suatu sampel terhadap pengotor dengan baik namun tergantung dari derajat keasaman atau pH sampel tersebut. Biasanya pH 7-7,5 merupakan pH optimum dan proses pemisahan akan berjalan dengan baik pada pH tersebut (Hong, 2017).

Jadi fungsi BCA Assay disini adalah mengukur konsentrasi total protein dalam sampel tersebut. Semakin sedikit kadar protein yang diukur menandakan resin tersebut sudah maksimal dan selektif dalam memisahkan protein yang diharapkan. Namun jika total konsentrasi protein tersebut masih tinggi itu artinya proses pemisahan pun tidak berjalan dengan maksimal (Ostrihonova et al., 2019).

Hasil BCA Assay menunjukkan jika sampel no 8 dan 11 memiliki kadar protein total paling sedikit. Itu menunjukkan jika sampel yang diinginkan sudah berikatandengan sempurna dengan resin sehingga saat ditukarkan dengan spesi lain yang lebih negatif maka protein yang lolos tersebut adalah DPO.

Sampel no 8 menggunakan buffer PB pada pH 7,5 dan histidin sebagai blocking buffer-nya. Sedangkan resin yang digunakan adalah TOSOH-DEAE atau toyopearl 650 M. Sampel no 11 menggunakan buffer Tris-HCL pada pH 7,5 serta NaCl sebagai blocking buffer sedangkan resin yang digunakan adalah TOSOH-DEAE. Sehingga dapat dikatakan jika resin TOSOH DEAE merupakan resin yang lebih baik daripada GE-DEAE dalam memurnikan protein DPO.

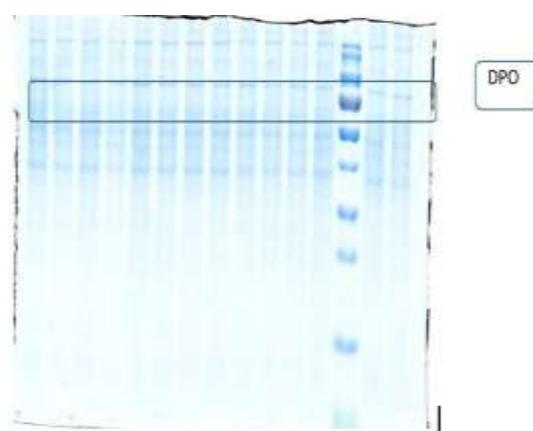
Diharapkan dari dua perbandingan ini kita bisa mengetahui mana resin, buffer serta blocking buffer terbaik untuk mendapatkan EPO yang murni. Ketika sudah mengetahui mana perlakuan terbaik maka proses pemurnian pun akan berjalan lebih mudah.

Hasil SDS Page

Berkurangnya kadar protein pada sampel setelah proses optimasi memang menunjukkan jika proses pemisahan sampel berjalan dengan baik. Namun kita tetap harus melihat hasil SDS page dari sampel yang telah dioptimasi pemisahannya tersebut. Dari hasil SDS Page ditemukan bahwa eritropoetin pada sampel memang terdapat kemiripan antara satu dan yang lainnya dan belum begitu spesifik. Hal ini wajar karena proses optimasi tersebut hanya melalui *screening* saja bukan melalui alat kromatografi penukar ion maupun kromatografi filtrasi gel.

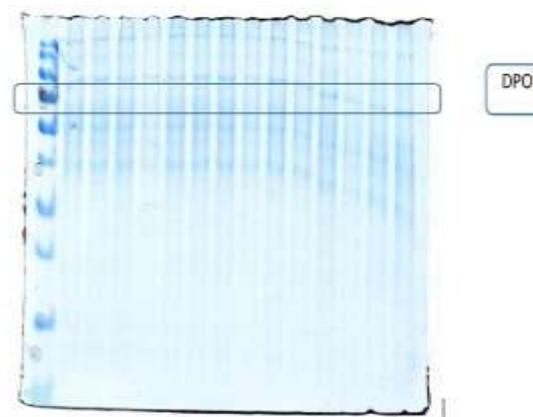
Sebelum mendapatkan pita, proses SDS Page memang melewati serangkaian destaining solution terlebih dahulu. Destaining bertujuan untuk menghasilkan pita yang lebih jelas dan bersih supaya hasil SDS Page dapat terbaca (Jan, 2016). Namun dari hasil bisa terlihat bahwa hasil SDS page sangat tipis karena memang proteinnya tidak mengalami pemekatan dahulu karena bertujuan hanya untuk proses *screening*.

Namun setidaknya lewat proses *screening* ini kita akan mendapatkan perlakuan mana yang memberikan hasil terbaik sehingga kedepannya proses pemisahan DPO berjalan dengan lebih baik.



Sampel no 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 S 2 1

Gambar VII. Hasil SDS page sumur pertama, (S) merupakan standar yang biasanya dipakai untuk SDS Page sedangkan (1) sampai dengan (14) merupakan sampel yang telah mendapatkan perlakuan sesuai DOE



Sampel no S 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Gambar VIII. Hasil SDS page sumur kedua, (S) merupakan standar yang biasa dipakai untuk SDS Page sedangkan nomer (15) sampai (28) merupakan SDS Page lanjutan sampel yang telah mendapatkan serangkaian percobaan sesuai DOE.

Pada sumur pertama bisa dilihat bahwa hasil SDS Page terlihat sangatlah tipis namun tetap memberikan pita yang menunjukkan adanya protein DPO. Tipisnya pita dalam hasil SDS page di atas ini karena hasil optimasi pemurnian sampel dengan berbagai variabel tersebut tidak menjalani proses pemekatan dahulu. Idealnya sampel sebelum dipisahkan dengan metode kromatografi, sampel tersebut harus dipekatkan terlebih dahulu agar protein yang akan dipisahkan terkumpul dan nantinya hasil SDS page pun akan terlihat sangat jelas. Namun karena ini merupakan proses screening saja untuk menentukan mana hasil terbaik dari desain eksperimen yang telah dipilih maka proses pemekatan pun tidak perlu dilakukan.

Tentunya pita SDS page DPO ada yang memang tebal dan tipis tergantung tipe DPO itu sendiri. Karena seperti yang kita tahu ada DPO alfa, DPO beta bahkan EPO beta dan ketiga jenis EPO tersebut memiliki jenis perbedaan pita satu sama lain (Reichel, 2008).

Pada sumur pertama pita sampel tidak sejajar dengan pita standar meski begitu berat molekul antara sampel dan pita standar tidak terlalu berbeda secara signifikan dan masih berada dalam rentangnya. Hal ini bisa terjadi karena proses running pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya dengan SDS page tidak berjalan dengan lama karena waktu yang dipakai hanya selama 90 menit.

Proses running harusnya bisa dimulai dengan voltase yang rendah dulu yaitu sekitar 30 V baru setelah itu bisa dinaikkan tegangannya sesuai kebutuhan. Selain itu arus yang dipakai ada baiknya dimulai 80 mA sebagai

pemanasan supaya proses SDS page berlangsung dengan baik (Schagger, 2006).

Pada sumur kedua hasil pita sampel dan pita standar ada yang sejajar dan adayang tidak. Perbedaan kondisi ini pun bisa terjadi karena waktu running sampel yang tidak terlalu lama yaitu hanya selama 90 menit seperti sumur sebelumnya. Alhasil protein EPO pun munculnya tidak sejajar dengan pita standar.

Baik pada sumur pertama maupun sumur kedua bisa terlihat jika DPO masih belum murni. Hal ini karena protein DPO tersebut hanya melalui proses screening saja dengan prosedur yang menggunakan desain eksperimen. Meski begitu dengan adanya hasil SDS page sudah menunjukkan jika dalam pita tersebut ada DPO sehingga proses perhitungan kadar protein dengan BCA assay tersebut merupakan hal yang valid.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka didapat kesimpulan bahwa :

- Protein EPO dapat dipisahkan dari matriks pengotor dengan metode kromatografi penukar ion.
- Menurut percobaan ini resin TOSOH atau toyopearl 650 DEAE lebih efektif dalam proses pemisahan daripada resin GE-DEAE.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada PT. Biofarma karena telah banyak membantu dalam penelitian ini

REFERENSI

- Brady, Pamlea N dan Megan A. Macnaughtan. (2015). Evaluation of Colorimetric Assays for Analyzing Reductively Methylated Proteins: Biases and Mechanistic Insights. *Anal Biochem.* 2015 December 15; 491: 43–51. Breidbach

- Andreas, Don H. Catlin, Gary A. Green, Inna Tregub. 2003. *America Journal of Pharmacy*. 32(6): 852-9 (2013).
- Delanghe, Joris R. Mathieu Bollen and Monique Beullens. (2008). *Testing for recombinant erythropoietin*. Wiley-Liss, Inc.
- Dennison, Thomas J, Julian Smith, Michael P. Hofmann, Charlotte E. Bland, Raj K. Badhan, Ali Al-Khattawi, Afzal R. Mohammed. (2016). Design of Experiments to Study the Impact of Process Parameters on Droplet Size and Development of Non-Invasive Imaging Techniques in Tablet Coating. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0157267
- Detik com. (2016). Kasus Gagal Ginjal. <https://health.detik.com/berita-detikhealth/d-3129326/kasus-gagal-ginjal-naik-4-kali-lipat-dalam-5-tahun>
- Durakovic, Benjamin. (2017). Design of Experiments Application, Concepts, Examples: State of the Art. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences Vol 5, No 3, December 2017*, pp. 421–439
- Emanuelsson, Ida. Anna Karin Janson. Katarina Riso. (2008). *Characterising of Chromatography Gels for Purification of Erythropoietin*. Hogskolan I Boras.
- Falck, David, Markus Habeger, Rosina Plomp, Michaela Hook, Patrick Bulau, Manfred Wuhler & Dietmar Reusch. (2017). Affinity purification of erythropoietin from cell culture supernatant combined with MALDITOF- MS analysis of erythropoietin N-glycosylation. *Scientific Reports* | 7: 532.
- Farmakoterapi. (2017). *Eritropoietin, Hormon Penghasil Sel Darah Merah*. <http://www.farmakoterapi.com/eritropoietin-hormon-penghasil-sel-darah-merah/>
- Farooqahmed S. Kittura, Elena Arthura, Maikhanh Nguyena, I, Chiu-Yueh Hunga, David C. Saneb, and Jiahua Xiea. (2015). Two-step purification procedure for recombinant human asialoerythropoietin expressed in transgenic plants. *Int J Biol Macromol*. 2015 January ; 72: 1111–1116.
- Garcia, Osnel, Elias Nelson and Leonardo Gordinez. (2013). Improvement in an IonExchange Chromatography Procedure to Increase Recovery and Biological Activity of EPO in Preparation for Pharmaceutical Use. *Latin*
- Hernandez, Lourdes. Diobel Stewart, Lourdes Zumalacárregui, Daniel Amaro. (2015). Comparison Among Three AnionExchange Chromatographic Supports to Capture Erythropoietin From Cell Culture Supernatant. 2015 Jun;33(6):642-6
- Homkhao Sakullapat Homkhao, Pongsatorn Poopisut & Dyah Wulandari. (2017). *SDS Page*. Suranaree University of Technology.
- Hong, Zhi-Wei Hong, Yu-Chi Yang, Timothy Pan,, Huey-Fen Tzeng, Hua-Wen Fu. (2017). Differential effects of DEAE negative mode chromatography and gel-filtration chromatography on the charge status of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Plos One* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173632>
- Huang, Tao, Mian Long and Bo Huo. (2010). Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay. *The Open Biomedical Engineering Journal*, 2010, 4, 271-278
- Hussain, Maryam T, Neil Forbes and Yvonne Perrie. (2019). Comparative Analysis of Protein Quantification Methods for the Rapid Determination of Protein Loading in Liposomal Formulations. *Pharmaceutics* 2019, 11, 39
- Jan, Sohail, Zabta Khan Shinwari, Malik Ashiq Rabbani, Sabir Hussain Shah, Muhamad Ishaq Ibrahim, Muhammad Ilyas. (2016). Optimization of an efficient SDS-PAGE protocol for rapid protein analysis of Brassica rapa. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES) Vol. 9, No. 2, p. 17-24, 2016*
- Jawapos. (2017). Kasus Gagal Ginjal di Kepulauan Riau Melonjak Tajam. <https://www.jawapos.com/ipg-today/10/07/2018/kasus-gagal-ginjal-di-kepulauan-riau-melonjak-tajam/>
- Jelkman Wolfgang. (2013). Physiology and Pharmacology of Erythropoietin. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2013;40:302-309
- Kang Min-Jung, Sang Mi Shin, Hey Hyun Yoo, Oh-Seung Kwon and Changbae Jin. (2010). Characteristics of IEF Patterns and SDS-PAGE Results of Korean EPO Biosimilars. *Bull. Korean Chem. Soc*. 2010, Vol. 31, No. 9

- Kaselvoya Bibiana & Michal Tkac. (2014). Design of Experiments in Truck Company. *KVALITA INOVÁCIA PROSPERITA 19/1 – 2015*
- Khoury, Graziella El Khoury, Basmah Khogeer, Chen Chen, Kheng T Ng, Shaleem I Jacob & Christopher R Lowell. (2015). Bespoke affinity ligands for the Kittur.
- LIPI. (2015). *Eritropoetin*. www.biotek.lipi.go.id/publication/berita/biotek-dalam-berita/1552-erythropoietin-epo-dari-ragi-dan-barley
- Muller, Egbert. (2005). Properties and Characterization of High Capacity Resin for Biochromatography. *Chem. Eng. 2005. 28, 11*.
- Ostrihonova, Marta, Jana Adamíková, Tomáš Molnár, Monika Antošová, Milan Polakovič. (2019). Recombinant human erythropoietin separation using a cation-exchange multimodal adsorbent. *Acta Chimica Slovaca, Vol. 12, No. 1, 2019, pp. 103—107*
- Pergande, Melissa R. and Stephanie M. Cologna. (2017). Isoelectric Point Separations of Peptides and Proteins. *Proteomes 2017, 5, 4; doi:10.3390/proteomes5010004*.
- Reichel. C, R. Kulovics, V. Jordan, M. Watzinger, T. Geisendorfer. (2008). SDS-PAGE of recombinant and endogenous erythropoietins: benefits and limitations of the method for application in doping control. *Sport und Buch Strauß - Köln 2008*.
- Republika. (2018). Kasus Gagal Ginjal Meningkatkan Tajam. <https://www.republika.co.id/berita/gaya-hidup/info-sehat/18/05/06/p8ap02399-jumlah-pasien-penyakit-ginjal-kronis-t-erus-meningkat>
- Rozycki Mirosław, Ewa Chmurzyńska, Ewa Biliska-Zajac, Jacek Karamon, Tomasz Cencek. (2018). Isoelectric focusing of proteins in the pH gradient as a tool for identification of species origin of raw meat. *J Vet Res 62, 151-159, 2018*
- Rubiyana, Yana, Adi Santoso, and Irmanida Batubara. (2015). Comparison of Immobilized Metal Affinity Chromatography Ni-NTA and Co-TALON for the Purification of Recombinant Human Erythropoietin. *Makara Journal of Science 19/4 (2015)137-142*
- Sartika, I Nyoman. Wayan Retayasa, Made Kardana, Ida Bagus Mudita. (2008). Peran Eritropoetin pada Anemia Prematuritas. *Sari Pediatri, Vol. 9, No. 6, April 2008*
- Schagger, Hermann. (2006). *Tricine-SDS-PAGE*. Nature Publishing Group.
- Schmidt Cleber A., Cristiane F. CODEVILLA, Marcio FRONZA, Renata Girardi CASALI & Sérgio L. DALMORA. (2003). Physico-Chemical Characterization and Biological Evaluation of Recombinant Human Erythropoietin in Pharmaceutical Products. *Lat. Am. J. Pharm. 22 (4): 343-50 (2003)*
- Smejkal Gary B and Darren J. Bauer. (2012). High Speed Isoelectric Focusing of Proteins Enabling Rapid Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *University of New Hampshire*
- Stanley, William. (2016). Peptide Affinity Adsorbents for Purification of High Value Biotherapeutics. *Disertation. North California State*.