

**KARAKTERISASI ENZIM SUKRASE DARI ISOLAT-ISOLAT BAKTERI  
ASAM LAKTAT PENGHASIL EKSPOLISAKARIDA  
DENGAN SDS-PAGE**

**WANGI FIRDAUSI**

**0305057102**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN FARMASI  
DEPOK  
2009**

**KARAKTERISASI ENZIM SUKRASE DARI ISOLAT-ISOLAT BAKTERI  
ASAM LAKTAT PENGHASIL EKSOPOLISAKARIDA  
DENGAN SDS-PAGE**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

**Oleh :**

**WANGI FIRDAUSI**

**0305057102**



**DEPOK**

**2009**

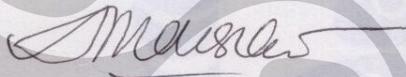
SKRIPSI : KARAKTERISASI ENZIM SUKRASE DARI ISOLAT-ISOLAT  
BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL  
EKSOPOLISAKARIDA DENGAN SDS-PAGE

NAMA : WANGI FIRDAUSI

NPM : 0305057102

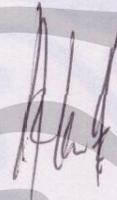
SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JUNI 2009



Dr. AMARILA MALIK, MSi

PEMBIMBING I



Dr. ARRY YANUAR, MSi

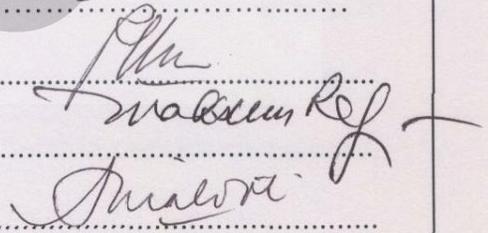
PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana..... 06 Juli 2009

Penguji I : Dr. Retnosari Andrajati, MS.....

Penguji II : Dr. Maksum Radji, M.Biomed.....

Penguji III : Dra. Azizahwati, MS.....



## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan nikmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dr. Amarila Malik, MSi, selaku pembimbing I, yang telah banyak memberikan bantuan berupa bimbingan, nasehat, ilmu, dukungan, motivasi dan bantuan biaya selama penelitian berlangsung dan penyusunan skripsi.
2. Bapak Dr. Arry Yanuar, MSi, selaku pembimbing II, yang telah memberikan bimbingan, ilmu, dan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI
4. Ibu Dra. Juheini Amin, MS, selaku pembimbing akademis yang telah banyak memberikan bimbingan dan nasehat selama penulis menempuh pendidikan di Farmasi FMIPA UI.

5. Bunda dan bapak serta adik-adik yang selalu mengisi hari-hari penulis dengan keceriaan dan senantiasa memberikan doa, dukungan, serta kasih sayang.
6. Seluruh staf pengajar, karyawan dan laboran Departemen Farmasi FMIPA UI, terutama Mbak Catur dan Mas Tri yang telah banyak membantu penulis selama masa pendidikan dan penelitian.
7. Anita, Adinda, Kak Tri, Ami, Wilzar, Eko, Githa dan Kak Kris yang telah menjadi teman-teman satu tim penelitian di laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi yang kompak dan banyak membantu dan memberikan dukungan bagi penulis selama penelitian berlangsung.
8. Miranti, Ruth, Vita, Yanti, Rina, Ita dan tim HACHI, atas persahabatan, kekeluargaan, kekompakan, keceriaan dan dukungan kepada penulis.
9. Teman-teman Farmasi angkatan 2005 terutama sahabat penulis, Desti.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga dapat terselesaikannya skripsi ini.

Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan semua pihak yang memerlukan.

Penulis

2009

## ABSTRAK

Eksopolisakarida (EPS) yang diproduksi dari bakteri asam laktat (BAL) memiliki nilai ekonomis yang penting karena berguna bagi industri makanan, farmasi dan kesehatan. Untuk mensintesis EPS dari substrat berupa sukrosa, BAL menggunakan suatu enzim ekstraselular berukuran besar yaitu enzim sukrase. Dari penelitian terdahulu, telah diketahui bahwa beberapa isolat-isolat BAL mengandung gen-gen sukrase seperti *gtf* dan *fff* yang berturut-turut menyandikan glukansukrase dan fruktansukrase. Penelitian ini bertujuan untuk melihat aktivitas dari enzim-enzim sukrase pada beberapa isolat-isolat BAL yang secara molekuler telah diketahui memiliki gen-gen sukrase. Supernatan dan pelet sel dari isolat-isolat BAL tersebut dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel SDS poliakrilamid (SDS-PAGE). Dengan melakukan SDS-PAGE menggunakan penanda protein, ukuran molekuler dari enzim dapat diperkirakan, dan dengan menginkubasi gel dalam buffer sukrosa dan *staining* dengan pereaksi Schiff asam periodat, EPS yang berupa glukosa dan/atau fruktan yang diproduksi oleh enzim-enzim tersebut dapat diamati. Semua isolat BAL yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu *Weisella confusa* MBF 8-1, *W. confusa* MBF 8-2, *Leuconostoc mesenteroides* MBF 3-1 dan *W. confusa* MBF PDG10(1) menunjukkan adanya aktivitas-aktivitas sukrase pada ukuran yang bervariasi, mulai dari 10 hingga 43 kDa.

Kata kunci : eksopolisakarida, bakteri asam laktat, enzim sukrase, SDS-PAGE, reaksi Schiff asam periodat

x + 89 hlm; gbr; tab; lamp.

Bibliografi: 49 (1981-2009)



## ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) produced by lactic acid bacteria (LAB) have an important economic value due to their application in food, pharmaceutical and medical industries. To produce EPS from sucrose, LAB uses a large extra cellular enzyme, sucrase. In previous study, it was stated that several LAB have sucrases genes such as *gtf* and *fff*, which encodes glucansucrase and fructansucrase, respectively. This study aimed to see the activity of sucrases enzymes in some LAB which molecularly have been proven to have sucrases genes. Supernatant and cell pellet obtained from LAB were analyzed performing sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). By performing SDS-PAGE using protein ladder, molecular size can be predicted, and then by incubating it in sucrose buffer and stained with periodic acid Schiff reagent, EPS glucan and/or fructan produce by the enzymes can be observed. All LAB strains used in this study, i.e *Weisella confusa* MBF 8-1, *W. confusa* MBF 8-2, *Leuconostoc mesenteroides* MBF 3-1 and *W. confusa* MBF PDG10(1) showed the sucrase enzyme activities at various molecular sizes ranged from 10 to 43 kDa.

Keyword: exopolysaccharide, lactic acid bacteria, sucrase anzyme, SDS-PAGE, Periodic Acid Schiff reaction

x + 89 pages; figures; tables; appendixes.

Bibliography: 49 (1981- 2009)

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR LAMPIRAN .....	x
BAB I. PENDAHULUAN .....	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	
A. Bakteri Asam Laktat (BAL).....	4
B. Eksopolisakarida (EPS).....	6
C. Sukrase.....	10
D. Spektrofotometer GeneQuant <sup>®</sup> .....	13
E. Elektroforesis Gel Poliakrilamid.....	14
F. Aktivitas Enzim.....	17
G. Reaksi Schiff Asam Periodat.....	21
BAB III. BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA .....	

A. Lokasi Penelitian.....	23
B. Bahan.....	23
C. Alat.....	33
D. Cara Kerja.....	33
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	
A. Hasil.....	43
B. Pembahasan .....	45
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	
A. Kesimpulan .....	64
B. Saran .....	64
<b>DAFTAR ACUAN</b> .....	65

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hasil purifikasi beberapa isolat pada medium agar MRS.....	71
2. Elektroforesis sampel berupa supernatan dengan <i>staining</i> Coomassie Blue pada gel elektroforesis tris-glisin 5%.....	72
3. Elektroforesis protein berupa pelet sel dengan <i>staining</i> Coomassie Blue pada gel elektroforesis tris-glisin 5%.....	73
4. Aktivitas enzim sukrase dengan substrat sukrosa pada sampel berupa pelet sel dengan <i>staining</i> asam periodat Schiff.....	74
5. Penanda protein yang digunakan pada elektroforesis.....	75
6. Perbandingan kemampuan gel formulasi tris-trisin 7% dengan formulasi tris-glisin 5% dalam memisahkan penanda protein.....	75
7. Inkubator.....	76
8. <i>Deep freezer</i> -70 <sup>0</sup> C.....	76
9. Mikrosentrifuse dengan pendingin.....	77
10. Dri-Bath.....	77
11. Vortex Mixer .....	78
12. Spektrofotometer GeneQuant.....	78
13. Alat SDS PAGE dan <i>power supply</i> .....	79

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data kultur-kultur BAL yang digunakan dalam penelitian.....	81
2. Nilai OD kultur inokulum yang diukur pada panjang gelombang 600 nm dan volume inokulasi kultur inokulum.....	81
3. Pengukuran serapan Bovine Serum Albumin sebagai kurva kalibrasi yang diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan pereaksi Bradford.....	82
4. Konsentrasi enzim dalam sampel pelet sel yang diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan pereaksi Bradford.....	83
5. Hasil analisis aktivitas sukrase pada gel elektroforesis .....	84
6. Perbandingan hasil pengamatan penelitian yang dilakukan dengan data hasil penelitian sebelumnya.....	85

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Certificate of Analysis PageRuler™ <i>prestained protein ladder</i> .....	87
2. Skema alur kerja pada penelitian.....	89



# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan organisme yang memiliki status GRAS (*Generally Recognize As Safe*). Beberapa BAL diketahui dapat memproduksi eksopolisakarida (EPS) yang memiliki nilai ekonomi yang penting karena berguna bagi industri makanan, farmasi dan kesehatan (1,2).

EPS telah dilaporkan mempunyai banyak aplikasi yang berpotensi dalam industri farmasi, kosmetik dan makanan, beberapa di antaranya adalah inulin, levan, dekstran dan lain-lain. Salah satu aplikasi yang berpotensi dari EPS adalah inulin, suatu biopolimer fruktan yang banyak terdapat dalam tanaman sebagai cadangan karbohidrat. Inulin banyak digunakan dalam pola diet manusia, dan banyak terkandung di dalam tanaman. Dalam formulasi makanan, inulin secara signifikan meningkatkan karakteristik organoleptik, memungkinkan peningkatan rasa dan kenyamanan saat dikonsumsi. Selain itu, inulin dapat meningkatkan stabilitas busa dan emulsi (3).

EPS dapat dibedakan menjadi dua tipe, yaitu homopolisakarida dan heteropolisakarida. Untuk sintesis EPS homopolisakarida dari sukrosa, BAL menggunakan enzim ekstraselular berukuran besar yaitu glukosiltransferase

(GTF) atau glukansukrase, dan fruktosiltransferase (FTF) atau fruktansukrase. Enzim-enzim ini berguna untuk sintesis EPS glukana dan EPS fruktana berbobot molekul besar dari substrat sukrosa (2).

Penelitian mengenai sukrase yang dimiliki oleh BAL telah banyak dilakukan. Penelitian sebelumnya telah melakukan proses skrining dan isolasi dari berbagai isolat BAL (4,5,6,7). Dari koleksi isolat tersebut, di antaranya terdapat galur MBF 8-1, MBF 8-2 dan MBF PDG10(1) yang teridentifikasi sebagai *Weissella confusa* dan galur MBF 3-1 yang teridentifikasi sebagai *Leuconostoc mesenteroides* menggunakan metode molekuler 16S rDNA. Pada penelitian sebelumnya, telah diperoleh dugaan bahwa galur MBF 8-1 mengandung gen yang menyandikan glukansukrase, galur MBF 8-2 mengandung gen yang menyandikan glukansukrase dan fruktansukrase, galur MBF 3-1 mengandung gen yang menyandikan glukansukrase dan galur PDG 10(1) mengandung gen yang menyandikan glukansukrase yang dilakukan secara molekuler dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (4,7,8). Selain itu, penelitian mengenai aktivitas fruktansukrase dalam medium rafinosa yang dilakukan pada galur PDG10(1) menunjukkan adanya fruktansukrase (9). Adapun pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas enzimatis terhadap enzim-sukrase yang telah dilaporkan tersebut.

Uji aktivitas enzimatis tersebut dilakukan dengan metode elektroforesis menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Gel akan diinkubasi dalam substrat sukrosa dan setelah itu

akan diberikan *staining* dengan menggunakan Schiff asam periodat. Pembentukan eksopolisakarida pada gel elektroforesis dapat diamati sebagai aktivitas sukrase (10).

## **B. TUJUAN PENELITIAN**

Mengetahui aktivitas sukrase, baik glukansukrase maupun fruktansukrase pada beberapa galur isolat BAL penghasil eksopolisakarida dengan menggunakan teknik SDS-PAGE dan analisis aktivitas enzim dengan substrat sukrosa.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL)**

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri gram positif, biasanya nonmotil, tidak bersporulasi dan menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari metabolisme fermentatif. Semua BAL bersifat fakultatif anaerob, yaitu BAL dapat hidup pada keadaan adanya oksigen, tetapi mereka tidak menggunakannya untuk respirasi. Sebaliknya, satu-satunya cara BAL memperoleh energi adalah melalui fermentasi gula. Kebanyakan BAL memerlukan nutrisi yang kompleks, seperti asam amino, vitamin, bahkan ada yang memerlukan purin dan pirimidin untuk dapat tumbuh. Oleh sebab itulah, kebanyakan BAL ditemukan pada lingkungan yang kaya akan bahan-bahan organik, seperti tanaman dan hewan yang membusuk (11).

Satu perbedaan penting di antara sub-grup oleh BAL terletak dari asal produk yang terbentuk selama fermentasi gula. Perbedaan itulah yang mendasari adanya dua kelompok BAL, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Pada homofermentatif, fermentasi yang berlangsung sifatnya sederhana, yaitu hanya menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk dari fermentasi gula. Adapun pada heterotatif, fermentasi gula menghasilkan asam laktat, etanol dan karbondioksida. Adapun BAL

yang memiliki banyak aldolase mengalami metabolisme homofermentatif (11).

Morfologi sel, komposisi dasar DNA dan tipe metabolisme fermentatif dari berbagai macam jenis BAL telah banyak dijelaskan. Anggota genus *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, dan *Pediococcus* memiliki rasio komposisi DNA yang hampir mirip. Selain itu, variasi di antara galur pun sangat kecil. Sebaliknya, genus *Lactobacillus* memiliki anggota dengan komposisi DNA yang sangat bervariasi (1).

BAL merupakan bakteri yang resisten terhadap asam yang mereka hasilkan, bahkan BAL merupakan satu-satunya organisme yang bertahan di lingkungan dimana mereka tumbuh dan memproduksi asam laktat dalam jumlah yang besar (11). Karena asam laktat yang dihasilkan BAL mencegah pertumbuhan organisme lain, terutama jika pH diturunkan sampai 5,0 atau lebih, maka prinsip ini digunakan untuk pembuatan acar, dan *kim chee* (1).

Beberapa BAL dapat memproduksi eksopolisakarida (EPS), yang diekskresikan dalam medium pertumbuhan sebagai lendir atau tetap berada dalam keadaan terikat pada dinding sel bakteri membentuk suatu EPS kapsuler. Dalam industri susu, BAL yang memproduksi EPS, termasuk genus *Streptococcus*, *Lactobacillus* dan *Lactococcus*, digunakan secara *in situ* untuk meningkatkan karakteristik tekstur dari produk susu fermentasi. BAL merupakan bakteri *food grade* yang dapat memproduksi berbagai jenis EPS yang berbeda secara struktur dan memiliki potensi sebagai aplikasi baru seperti gellan, pullulan, xanthan dan alginat bakteri yang saat ini telah

diproduksi oleh bakteri *non-food-grade*. Karena BAL dianggap sebagai bahan alam dan telah banyak digunakan dalam makanan, BAL merupakan sumber yang baik bagi polimer yang berpotensi untuk digunakan dalam makanan sehat (12,13,14).

## **B. EKSOPOLISAKARIDA**

Beberapa bakteri asam laktat, termasuk spesies *Lactobacillus*, telah diketahui dapat memproduksi eksopolisakarida (EPS). EPS tersebut merupakan molekul berukuran besar dengan massa molekuler bervariasi antara 10 hingga  $10^4$  kDa, misalnya kurang lebih 50 hingga 50.000 unit glikosil. Fungsi fisiologis dari EPS dalam bakteri-bakteri tersebut belum terlalu jelas, serta kemungkinan berbeda-beda pada tiap bakteri dan bersifat kompleks. Pernah diusulkan bahwa EPS mungkin berperan dalam melindungi sel dari kekeringan, fagositosis dan serangan fage. EPS juga dapat berkontribusi dalam menyediakan tekanan oksigen yang tinggi dan berpartisipasi dalam ambilan ion logam. Lebih jauh lagi, EPS dapat berfungsi sebagai agen adesif dan memfasilitasi interaksi antara tanaman dan bakteri (2).

EPS dapat digunakan sebagai agen pengental, penstabilisasi, pengemulsi, prebiotik, pembuat gel atau pun pengikat air pada industri makanan maupun bukan. Terlebih lagi, polisakarida dapat berkontribusi pada

kesehatan manusia, baik sebagai fraksi makanan yang tidak dicerna maupun sebagai antitumor, antiulcer, imunomodulator atau penurun kolesterol (2,15).

Polisakarida mikrobial dapat berada sebagai bahan penyusun dinding sel, sebagai bagian dari lipopolisakarida (LPS) yang juga sering disebut sebagai O-antigen, atau sebagai polisakarida kapsuler (CPS) yang berhubungan dengan permukaan sel, atau dapat pula dieksresikan sebagai EPS dalam lingkungan sel. Produksi EPS sendiri dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti suhu inkubasi, pH, kadar oksigen, kecepatan agitasi, waktu inkubasi, dan media pertumbuhan khususnya sumber karbon yang digunakan (16).

Berdasarkan komposisi dan mekanisme biosintesisnya, EPS dapat dibagi menjadi dua kelas, yaitu homopolisakarida (polimer yang tersusun atas unit-unit glukosa atau fruktosa) dan heteropolisakarida. Heteropolisakarida tersusun atas berbagai jenis residu gula, terutama glukosa, galaktosa, fruktosa dan rhamnosa. Pada beberapa kasus, terdapat kelompok yang mengandung muatan seperti asetat, fosfat atau gliserolfosfat (2).

Homopolisakarida dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu  $\beta$ -fruktan dan  $\alpha$ -D-glukan. Contoh dari homopolisakarida golongan  $\beta$ -fruktan adalah levan dan inulin. Levan, yang utamanya tersusun atas residu fruktosa yang terikat dengan ikatan  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6) disintesis oleh streptococci, *Leuconostoc mesenteroides* dan dua lactobacilli yang berbeda, yakni *Lactobacillus reutri* 121 dan *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. Beberapa lactobacilli lain, seperti *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, dan

*Weisella confusa* juga memproduksi fruktan, namun jenis ikatan yang pasti belum ditentukan. Pembentukan levan juga telah diamati pada bakteri non-asam laktat seperti *Bacillus* spp. Inulin yang mengandung molekul-molekul fruktosa yang terikat dengan ikatan  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1), disintesis oleh spesies *Streptococcus*, *Leunostoc citreum* CW28 dan oleh suatu inulosukrase dari *Lactobacillus reutri* 121 (17).

Adapun contoh dari homopolisakarida golongan  $\alpha$ -D-glukan adalah reuteran, dekstran, mutan, alternan dan polimer glukan yang mengandung sejumlah besar ikatan  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2). Reuteran, yang mengandung sejumlah besar ikatan glukosida  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), disintesis oleh *Lactobacillus reutri* 121 dan *Lactobacillus reutri* BioGaia. Dekstran utamanya mengandung unit-unit glukopiranosil yang terikat pada rantai utama dengan ikatan  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Mutan merupakan suatu poliglukosa dengan ikatan utama  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3). Alternan merupakan glukan dengan unit-unit yang dapat berubah antara ikatan  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) dengan  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) pada D-glukopiranosil (17).

Dalam lima kelompok tersebut, glukan-glukan dapat berbeda dalam asal dan jumlah ikatan glukosida, derajat percabangan, tipe titik percabangan, berat molekul, konformasi polimer dan susunan spasial. Sebagai hasilnya, terdapat variasi yang luas dalam hal kelarutan dan sifat fisik lain dari glukan. Banyak faktor, termasuk tipe medium pertumbuhan, waktu inkubasi, konsentrasi sukrosa dan adanya enzim yang memecah polisakarida, kemungkinan dapat mempengaruhi berat molekuler, struktur dan sifat fisik dari polimer-polimer tersebut (17).

Sintesis homopolisakarida seperti dekstran dan levan dari sukrosa oleh sukrase dipelajari secara intensif pada *Leuconostoc*, *Streptococcus* dan *Lactobacillus*. Produksi homopolisakarida dari galur BAL lain seperti *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* dan *Weisella* belum dipelajari secara intensif, namun telah dilaporkan bahwa galur MBF 8-2 yang diidentifikasi sebagai *Weisella confusa* memiliki satu gen fruktansukrase dan dua gen glukansukrase. Selain itu dilaporkan pula bahwa galur MBF 3-1 yang diidentifikasi sebagai *Leuconostoc mesenteroides* memiliki gen glukansukrase (4,8).

EPS telah dilaporkan mempunyai banyak aplikasi yang berpotensi dalam industri farmasi, kosmetik dan makanan, beberapa di antaranya adalah inulin, levan, dekstran dan lain-lain. Salah satu aplikasi yang berpotensi dari EPS adalah inulin, suatu fruktan yang banyak terdapat dalam tanaman sebagai cadangan karbohidrat. Inulin banyak digunakan dalam pola diet manusia (3). Dalam formulasi makanan, inulin meningkatkan karakteristik organoleptik dan memungkinkan peningkatan rasa dan kenyamanan saat dikonsumsi. Selain itu, inulin juga dapat meningkatkan stabilitas busa dan emulsi, juga menunjukkan sifat seperti lemak saat digunakan untuk membentuk gel dalam air. Karena inulin berada di dalam usus dalam bentuk utuh, inulin dapat berperan sebagai *fertilizer* bagi bakteri-bakteri usus, khususnya spesies Bifidus. Bakteri Bifidus mencerna inulin menghasilkan asam lemak rantai pendek, seperti asam asetat, propionat dan butirrat. Kedua

asam yang pertama dapat digunakan oleh hati untuk produksi energi, sementara asam butirat telah menunjukkan sifat mencegah kanker di dalam usus (18).

### **C. SUKRASE**

Sukrase merupakan enzim yang memecah sukrosa dan menggunakan energi yang dilepaskan untuk menggabungkan unit gula sehingga membentuk rantai polimer gula (poligula). Dengan keberadaan akseptor yang efisien, oligosakarida yang akan disintesis adalah oligosakarida yang memiliki berat molekul kecil, dan bukan polimer yang memiliki berat molekul besar sebagaimana umumnya. Enzim yang bertanggung jawab atas sintesis polimer glukosa dikenal dengan sebutan glukosiltransferase atau glukansukrase. Sukrase yang bertanggung jawab untuk produksi polimer yang tersusun atas fruktosa disebut sebagai fruktosiltransferase atau fruktansukrase (2).

Fruktan bakterial disintesis oleh fruktosiltransferase (FTF). Enzim ekstraseluler ini memotong substrat yang berupa sukrosa (dan pada beberapa kasus, rafinosa) dan menggunakan energi yang dilepaskan untuk menyambungkan suatu unit fruktosa pada (i) suatu rantai fruktan yang sedang berkembang (dapat berupa inulin atau levan) yang prosesnya dikenal dengan istilah transfruktosilasi, (ii) sukrosa (iii) air dengan proses hidrolisis

atau (iv) pada akseptor lain seperti rafinosa (48). Terdapat dua jenis polimer yang tersusun atas fruktosa sebagai bahan penyusunnya, yaitu inulin dan levan. Inulin disintesis oleh inulosukrase ( $2 \rightarrow 1\text{-}\beta\text{-D}$  fruktan  $1\text{-}\beta\text{-D}$  fruktosiltransferase) sementara levan disintesis oleh levansukrase ( $2 \rightarrow 6\text{-}\beta\text{-D}$  fruktan  $6\text{-}\beta\text{-D}$  fruktosiltransferase) (2,19,20).

Semua levansukrase yang telah diketahui mengkatalisis pemindahan fruktosil dari sukrosa ke berbagai macam akseptor selain levan. Contoh dari akseptor yang mungkin adalah air, asilalkohol rantai pendek dan berbagai macam monosakarida dan disakarida. Dalam golongan BAL, levansukrase baru ditemukan di dalam *S. salivarius* dan *S. mutans*. Seluruh enzim tersebut telah dikarakterisasi pada tingkat gen. Berat molekuler dari sebagian besar levansukrase bervariasi antara 50 hingga 100 kDa (2,19).

Berdasarkan sekuens asam amino, keseluruhan struktur fruktansukrase dapat dibagi menjadi empat daerah. Suatu peptida sinyal, suatu daerah N-terminal dengan panjang tertentu, suatu inti katalis yang mengandung 500 asam amino yang terbagi di antara semua anggota keluarga GH68 (enzim karbohidrat aktif) dan suatu daerah C-terminal dengan panjang yang bervariasi (21).

Glukosiltransferase (yang secara umum juga dikenal sebagai glukansukrase) merupakan enzim ekstraseluler yang banyak dimiliki oleh bakteri asam laktat untuk proses sintesis suatu molekul bermassa besar yakni  $\alpha$ -glukan dari sukrosa. Glukansukrase memutus ikatan glukosida dari substrat berupa sukrosa dan menyambungkan unit glukosa pada rantai

glukan (poliglukosa) yang sedang berkembang yang prosesnya dikenal dengan sebutan transglukosilasi, pada air (hidrolisis) dan pada substrat akseptor lain (reaksi akseptor). Energi yang dihasilkan dari pemutusan ikatan yang kaya energi pada sukrosa tersebut digunakan untuk mensintesis ikatan glukosida yang baru (11,21). Ada beberapa jenis glukansukrase berdasarkan EPS glukan yang dihasilkan. Meski banyak kemiripan di antara enzim-glukansukrase ini, mereka mampu mensintesis  $\alpha$ -glukan dengan tipe ikatan glukosida yang berbeda-beda. Glukan-glukan tersebut dapat dibagi menjadi lima kelompok, yakni reuteran, dekstran, mutan, alternan dan polimer glukan yang mengandung sejumlah besar ikatan  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) (17).

Berdasarkan sekuens asam amino, keseluruhan struktur glukansukrase dapat dibagi menjadi empat daerah yaitu suatu peptida sinyal, suatu daerah N-terminal dengan asam amino yang sangat bervariasi, suatu inti katalis dan/atau daerah pengikatan sukrosa yang mengandung 1000 asam amino dan daerah C-terminal yang terdiri atas suatu seri tandem pengulangan yang diduga terlibat dalam pengikatan glukan. Karakterisasi yang dilakukan pada beberapa glukansukrase heterolog yang dimurnikan menunjukkan bahwa enzim ini dapat menghasilkan berbagai macam jenis ikatan glukosida pada produknya (21).

#### D. SPEKTROFOTOMETER GENE QUANT<sup>®</sup>

Spektrofotometer GeneQuant<sup>®</sup> adalah suatu alat spektrofotometer yang dapat digunakan untuk kuantifikasi dan analisis RNA/DNA. Spektrofotometer ini dapat melakukan pengukuran serapan pada panjang gelombang 230, 260, 280 dan 320 nm secara bersamaan dalam sampel dengan ukuran mikro. Alat ini akan menghitung secara otomatis parameter-parameter yang diperlukan dan menunjukkannya pada layar. Instrumen ini sangat ideal untuk menentukan konsentrasi dan kemurnian dari asam nukleat setelah amplifikasi PCR, untuk penelitian hibridisasi, dan untuk kuantifikasi sediaan DNA dengan jumlah kecil. Sebagai tambahan, konsentrasi protein dapat diukur secara langsung pada 280 nm tanpa penambahan reagent ke dalam sampel yang akan diukur (22).

Metode lain yang dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi protein adalah dengan menggunakan pereaksi warna Bradford. Pengukuran konsentrasi protein dengan menggunakan Bradford bekerja berdasarkan prinsip pengikatan zat warna Coomassie *Brilliant Blue* G-250 dengan protein. Zat warna tersebut memiliki tiga bentuk yaitu kation yang berwarna merah, netral yang berwarna hijau dan anionik yang berwarna biru. Pada keadaan asam, sebagian besar zat warna berada dalam bentuk terprotonasi ganda, yakni kation yang berwarna merah dengan  $\lambda$  maksimum 470 nm. Namun saat zat warna telah berikatan dengan protein, khususnya protein yang mengandung asam amino arginin atau rantai amin aromatis, zat warna akan

berubah menjadi bentuk berwarna biru yang tak terprotonasi dan lebih stabil dengan A maksimum 595 nm. Bentuk berwarna biru yang telah terikat dengan protein inilah yang terdeteksi pada panjang gelombang 595 nm pada pengukuran konsentrasi protein dengan spektrofotometer (23,24).

## **E. ELEKTROFORESIS GEL POLIAKRILAMID**

Elektroforesis digunakan untuk memisahkan suatu campuran protein yang kompleks, untuk menyelidiki komposisi subunit dan untuk memverifikasi homogenitas dari suatu sampel. Metode ini juga dapat digunakan untuk memurnikan protein yang akan diaplikasikan lebih jauh lagi. Dalam elektroforesis SDS gel poliakrilamid, protein bermigrasi sebagai respon terhadap suatu daerah yang bersifat elektrik melalui pori-pori yang ada dalam matriks gel. Ukuran pori-pori matriks akan menurun dengan naiknya konsentrasi akrilamid. Kombinasi ukuran pori gel dan muatan protein, ukuran gel dan bentuk gel menentukan kecepatan migrasi dari protein (25).

Protein di dalam larutan aquaeous membawa suatu muatan elektrik tertentu pada semua nilai pH kecuali pada titik isoelektriknya. Oleh karena itulah protein bermigrasi dalam suatu daerah elektrik. Elektroforesis gel memisahkan protein dengan lebih baik dibandingkan dengan elektroforesis di dalam larutan bebas. Gel tersebut memisahkan protein dengan matriks yang mirip jala dengan variasi ukuran pori. Pemisahan dapat dioptimasi dengan

mengubah derajat *cross-linking* gel. Pada sebagian besar aplikasi, gel dijalankan dengan nilai pH netral atau sedikit basa, dimana sebagian besar protein bermigrasi ke arah anoda. Sistem gel dapat meminimalisasi konveksi dan difusi protein, sehingga pita protein pada gel akan terpisah dan terlihat dengan jelas. Suatu kekurangan dalam elektroforesis gel adalah sedikitnya jumlah protein yang dapat dipisahkan dalam suatu sel single. Oleh karena itu, utamanya gel digunakan untuk tujuan analisis (26).

Natrium Dodesil Sulfat - Elektroforesis gel poliakrilamid atau *Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan suatu teknik yang digunakan secara luas dalam biokimia, forensik, serta biologi genetik dan molekuler untuk memisahkan protein berdasarkan perpindahan elektroforetik (suatu fungsi dari panjang rantai polipeptida, berat molekuler, modifikasi pascatranslasi dan faktor lain). Metode standar untuk analisis protein adalah penggunaan deterjen SDS untuk mendenaturasi protein sebelum elektroforesis. Protein oligomer dengan subunit yang terikat secara nonkovalen terbagi menjadi subunit individual. Ikatan disulfida yang ada dilemahkan dengan penambahan 2-merkapttoetanol atau dithiothreitol. SDS berikatan dengan protein dengan sangat kuat dan sesuai dengan jumlah asam amino, menyebabkan rantai polipeptida mengandung satu molekul SDS per dua asam amino (25,27).

Dibandingkan dengan elektroforesis gel standar, SDS-PAGE memiliki kelebihan sebagai berikut (26):

1. Agregat dan partikel tak larut air akan terlarut dalam SDS dan diubah menjadi rantai peptida tunggal.
2. Pemisahan protein hampir seluruhnya bergantung pada ukuran rantai peptida.
3. Seluruh gel dapat dikalibrasi dengan memuatkan suatu ukuran standar (suatu campuran protein dari komposisi yang telah diketahui).
4. Tingkat *cross-linking* gel, dan oleh karena itu ukuran pori, dapat diatur bergantung pada ukuran protein yang akan dipisahkan. Hal tersebut dapat dilakukan dengan mengganti konsentrasi akrilamid dan konsentrasi *cross-linker* bisakrilamid.

Salah satu zat pewarna yang umum digunakan untuk mewarnai pita-pita protein yang diperoleh sebagai hasil elektroforesis adalah Coomassie *Brilliant Blue*. Coomassie *Brilliant Blue* adalah pewarna yang termasuk dalam zat warna anionik. Sebagian besar strukturnya berupa gugus non-polar sehingga biasanya digunakan dalam larutan metanol dan asam asetat. 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. SDS yang digunakan dalam metode elektroforesis ini juga dapat mempengaruhi proses *staining* karena merupakan senyawa anionik. Oleh karena itu sebaiknya digunakan jumlah larutan Coomassie *Brilliant Blue* yang cukup banyak (28).

Hasil elektroforesis gel SDS-PAGE ini dapat dikombinasikan dengan metode zimografi, suatu metode untuk analisis aktivitas enzim. Gel hasil elektroforesis diinkubasikan di dalam substrat tertentu untuk dilihat ada tidaknya aktivitas enzim di dalam protein yang telah dipisahkan (29,30).

## F. AKTIVITAS ENZIM

Enzim merupakan katalisator yang sangat efisien dan selektif. Untuk memahami berbagai sifat enzim ini, dikenal konsep tapak aktif atau *active site*. Ukuran protein yang besar, relatif terhadap ukuran substrat, menghasilkan konsep bahwa suatu daerah tertentu pada enzim, yang disebut sebagai *active site*, berhubungan dengan fungsi katalisis yang dimiliki oleh enzim (31).

Ada dua buah model yang dapat digunakan untuk menjelaskan mengenai *active site* dalam sebuah enzim. Kedua model tersebut adalah model yang dikemukakan oleh Emil Fischer dan model yang dikemukakan oleh Koshland.

### 1. Model Fischer

Model *active site* yang dikemukakan oleh Emil Fischer memperlihatkan interaksi antara substrat dengan enzim lewat analogi “lubang kunci dan anak kunci” atau “*lock and key*”. Model lubang kunci dan anak kunci merupakan model cetakan yang kaku. Model ini masih dapat digunakan untuk

memahami sifat-sifat tertentu enzim, misalnya pengikatan berurutan dua atau lebih substrat atau kinetik suatu kurva saturasi substrat yang sederhana. Meskipun model Fischer tersebut dapat dengan mudah menjelaskan spesifisitas interaksi enzim dengan substrat, kekakuan atau rigiditas yang diimplikasikan *active site* enzim tidak berhasil menjelaskan perubahan dinamik yang harus berlangsung selama katalisis.

## 2. Model Koshland

Model yang dikemukakan oleh Koshland ini dikenal dengan nama model *induced fit*. Dalam model ini dikatakan bahwa substrat menimbulkan atau menginduksi suatu perubahan bentuk atau konformasi dalam enzim lewat sebuah analogi mengenakan sarung tangan atau dikenal dengan istilah "*hands and gloves*". Perubahan ini menempatkan residu asam amino atau gugus-gugus lain pada enzim menurut arah spasial yang benar untuk pengikatan, katalisis substrat, maupun keduanya. Selanjutnya, enzim akan menginduksi perubahan timbal-balik pada substratnya, yang mengubah orientasi dan konfigurasinya menjadi orientasi dan konfigurasi yang terdapat pada status transisi.

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas dari suatu enzim, Faktor-faktor tersebut adalah:

### 1. Suhu

Peningkatan suhu akan meningkatkan kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim. Akan tetapi, kenyataan ini hanya berlaku pada kisaran suhu yang sangat terbatas. Kecepatan reaksi mula-mula meningkat seiring

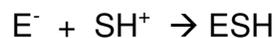
meningkatnya suhu akibat peningkatan energi kinetik pada molekul-molekul yang bereaksi. Akan tetapi, pada akhirnya, energi kinetik enzim akan melampaui rintangan energi untuk memutuskan ikatan hidrogen dan hidrofobik yang lemah, yang mempertahankan struktur sekunder-tersiernya. Pada suhu tersebut, terutama terjadi denaturasi, disertai hilangnya aktivitas katalitik secara cepat. Kisaran suhu dimana suatu enzim akan mempertahankan konformasi yang stabil serta memiliki kemampuan katalisis umumnya akan bergantung pada suhu sel tempat enzim tersebut terdapat, dan sedikit melebihi suhu sel tersebut.

## 2. pH

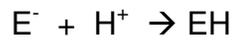
Ketika aktivitas enzim diukur pada berbagai nilai pH, aktivitas optimal secara khas terlihat di antara nilai-nilai pH 5 sampai 9. Meskipun demikian, beberapa enzim seperti pepsin, bekerja aktif pada nilai pH yang berada di luar kisaran ini.

Bentuk kurva aktivasi pH ditentukan oleh denaturasi enzim pada pH yang tinggi atau rendah, dan perubahan pada status muatan enzim dan/atau substrat.

Pada keadaan pH normal, enzim bermuatan negatif akan berikatan dengan substrat bermuatan positif:



Pada pH rendah atau asam, enzim mengalami protonasi dan kehilangan muatan negatifnya, sehingga tidak bisa berikatan dengan substrat yang bermuatan positif:



Pada pH tinggi atau basa, substrat mengalami ionisasi dan kehilangan muatan positifnya dan tak bisa berikatan dengan enzim yang bermuatan negatif:



### 3. Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi akan bertambah seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat hingga tercapai suatu keadaan yang enzimnya dikatakan telah jenuh oleh substrat karena semua active site telah berikatan dengan substrat. Kecepatan awal yang terukur akan mencapai suatu nilai maksimal dan tidak dipengaruhi lagi oleh peningkatan konsentrasi substrat lebih lanjut karena substrat terdapat dalam jumlah molar berlebihan yang melampaui jumlah molar enzim (31).

Enzim tidak dapat dilihat langsung sebagaimana substrat tempat enzim bekerja atau produk yang dihasilkan. Oleh karena itu, aktivitas enzim dapat diamati melalui pengamatan terhadap konsentrasi substrat yang tersisa setelah reaksi selesai atau pun konsentrasi produk yang terbentuk (32). Salah satu metode yang umum digunakan untuk mengamati aktivitas enzim adalah metode zimografi, suatu metode elektroforesis yang melibatkan substrat yang terkopolimerisasi dengan gel poliakrilamid untuk mendeteksi enzim dan aktivitasnya. Setelah elektroforesis, gel direndam dalam suatu buffer yang mengaktivasi enzim yang memungkinkan enzim di dalam sampel menjadi aktif dan mampu bereaksi dengan substrat yang terkopolimerisasi di

dalam gel. Gel kemudian di-*staining* sehingga area aktivitas enzim dapat teramati (33).

Gelatin merupakan bahan yang paling umum digunakan sebagai substrat untuk mengamati aktivitas protease yang mendegradasi gelatin, akan tetapi zimografi telah banyak diaplikasikan pada berbagai macam enzim seperti xylanase, protease, lipase dan lain-lain (30,34). Metode ini cocok untuk penemuan obat dan skrining enzim dalam jumlah kecil dan isomer-isomernya dalam suatu campuran yang kompleks (33).

#### **G. REAKSI SCHIFF ASAM PERIODAT**

Reaksi Schiff asam periodat atau *Periodic Acid Schiff (PAS)* pada dasarnya menggunakan dua macam pereaksi yaitu asam periodat dan pereaksi Schiff. Pereaksi Schiff sendiri merupakan larutan yang dapat bereaksi dengan aldehid membentuk suatu produk berwarna merah. Metode ini banyak digunakan untuk mewarnai berbagai macam jaringan yang kaya akan polisakarida, mukopolisakarida atau glikolipid. Pereaksi Schiff dibuat dengan menggunakan pararosanilin yang direaksikan dengan asam sulfur. Hal tersebut menyebabkan perubahan pada struktur kromofor pararosanilin dengan adanya penambahan gugus asam sulfat pada karbon inti. Asam sulfur yang digunakan dapat berasal dari berbagai macam reaksi. Salah satunya dengan mereaksikan gas sulfurdioksida ke dalam larutan

pararosanilin. Cara lainnya adalah dengan menggunakan natrium atau kalium metabisulfit atau sulfit yang dicampurkan ke dalam pararosanilin kemudian ditambahkan asam klorida. Reaksi tersebut akan menghasilkan asam sulfur dalam larutan pereaksi. Pararosanilin yang digunakan juga dapat berupa campuran dengan zat pewarna lain, misalnya seperti apabila digunakan basic fuchsin. Pewarna lain yang umum digunakan biasanya merupakan homolog dari pararosanilin seperti rosanilin dan magenta II (35).

Asam periodat adalah agen pengoksidasi yang dapat memecah ikatan rantai karbon tertentu dalam berbagai macam struktur kimia dan kemudian mengubahnya menjadi dialdehid. Reaksi PAS bekerja dengan prinsip bahwa asam periodat mengoksidasi ikatan karbon-karbon dari karbohidrat dimana atom karbonnya memiliki gugus hidroksil atau gugus amin primer atau sekunder untuk menghasilkan dialdehid yang dapat beraksi dengan peraksi Schiff. Pereaksi Schiff akan mewarnai bagian yang teroksidasi tersebut menjadi berwarna merah. Warna merah yang terjadi merupakan suatu senyawa baru hasil penggabungan fuchsin (dari pereaksi Schiff) dengan dialdehid, bukan akibat terjadinya re-oksidasi fuchsin (36). Warna merah inilah yang menunjukkan terbentuknya EPS sebagai hasil dari aktivitas sukrase.

## **BAB III**

### **BAHAN, ALAT DAN CARA KERJA**

#### **A. LOKASI PENELITIAN**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penelitian dilakukan dari bulan Februari sampai bulan Mei 2009.

#### **B. BAHAN**

##### **1. Sampel**

Sampel yang digunakan adalah bakteri asam laktat koleksi milik Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi FMIPA UI. Kultur-kultur yang digunakan adalah Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi (MBF) 8-1, MBF 8-2, MBF 3-1 dan MBF PDG 10(1) sebagaimana yang ditampilkan pada Tabel 1.

## 2. Bahan Kimia

Larutan Coomassie *Brilliant Blue* G-250 [Fermentas, USA], tris base [Amersham Biosciences, Hongkong], natrium dodesil sulfat [SIGMA, USA], *premixed preweighed* akrilamid/bisakrilamid [Bio-Rad, Inggris], amonium persulfat [Merck, Jerman], TEMED (N,N,N',N'- tetrametilendiamin) [Merck, Jerman], Bovine Serum Albumin [Fermentas, USA], glisin [SIGMA, USA], trisin [SIGMA, USA], gliserol [Merck, Jerman], *protein loading buffer pack* [Fermentas, USA], PageRuler™ *prestained protein ladder* [Fermentas, USA], trikloro asetat [Merck, Jerman], asam periodat [Merck, Jerman], fuchsin base [Wako Pure Chemical, Jepang], natrium metabisulfit [Merck, Jerman], natrium sulfit [Merck, Jerman], natrium azida [Merck, Jerman], asam asetat [Fluka BioChemika], kalsium klorida [Merck, Jerman], asam klorida [Merck, Jerman], natrium hidroksida [Merck, Jerman], isopropanol [Aldrich, Jerman], aquadest, aquabidest [Otsuka Indonesia, Indonesia].

## 3. Medium dan Pembuatan Medium

### a. Medium

Medium yang digunakan adalah medium MRS (*de Man Rogosa Sharpe*). Terdiri atas bahan-bahan berikut: Pepton [Difco, USA], LAB-Lemco

[Oxoid, Inggris], *yeast extract* [Difco, USA], dikalium hidrogen fosfat [Merck, Jerman], natrium asetat [Merck, Jerman], di-amonium hidrogen sitrat [Merck, Jerman], magnesium sulfat [Merck, Jerman], mangan sulfat [Merck, Jerman], agar bakto [Pronadisa, Spanyol], Tween 80 [Merck, Jerman], dekstrosa [SIGMA, USA], sukrosa [Pronadisa, Spanyol], rafinosa [Waco, Jepang], kalsium karbonat [Merck, Jerman].

**b. Pembuatan Medium (37,38,39)**

Medium yang digunakan antara lain medium agar MRS, medium MRS untuk agar miring, medium cair MRS, modifikasi medium cair MRS-sukrosa 5%, modifikasi medium cair MRS-rafinosa 5% dan modifikasi medium cair MRS-rafinosa 5%+glukosa 1%.

**(1). Medium Agar MRS**

Ditimbang 5 g pepton, 4 g LAB-Lemco, 2 g *yeast extract*, 1 g dikalium hidrogen fosfat, 2,5 g natrium asetat, 1 g amonium sitrat, 0,1 g magnesium sulfat dan 0,025 g mangan sulfat, kemudian semuanya dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan aquadest secukupnya dan 0,25 ml Tween 80 kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer*. Larutan medium ini diatur pH-nya dengan pH-meter hingga pH  $6,2 \pm 0,2$  dengan menggunakan larutan asam

klorida 1 N. Kemudian timbang agar bakto sebanyak 7,5 g, dimasukkan ke dalam larutan medium dan diaduk homogen. Setelah itu volume dicukupkan hingga 250 ml. Sementara itu dekstrosa ditimbang sebanyak 10 g, dimasukkan dalam labu bulat dan ditambahkan aquadest dan diaduk. Setelah itu volume dicukupkan hingga 250 ml. Kedua medium ini disterilisasi dengan autoklaf masing-masing 15 menit. Apabila medium akan digunakan, *Laminar Air Flow* (LAF) disiapkan. Larutan dekstrosa tersebut dicampurkan ke dalam medium MRS secara aseptis dan dihomogenkan setelah medium hangat. Medium tersebut dituang secara aseptis ke cawan petri. Setelah membeku cawan petri dibalik dan disimpan.

**(2). Medium MRS untuk Agar Miring**

Ditimbang 1 g pepton, 0,8 g LAB-Lemco, 0,4 g *yeast extract*, 0,2 g dikalium hidrogen fosfat, 0,5 g natrium asetat, 0,2 g amonium sitrat, 0,02 g magnesium sulfat, 0,005 g mangan sulfat, 2 g dekstrosa, dan 0,5 g kalsium karbonat, kemudian semuanya dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan aquadest secukupnya dan 0,05 ml Tween 80 kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer*. Larutan medium ini diatur pH-nya dengan pH-meter hingga pH  $6,2 \pm 0,2$  dengan menggunakan larutan asam klorida 1 N. Kemudian timbang agar bakto sebanyak 1,5 g, dimasukkan ke dalam larutan medium dan diaduk homogen. Setelah itu volume dicukupkan hingga 100 ml

dengan aquadest dan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit. Medium yang masih hangat tersebut dipipet sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi sambil terus dihomogenkan agar kalsium karbonat tidak mengendap. Tabung reaksi dimiringkan hingga membeku dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin untuk digunakan keesokan harinya.

### (3). **Medium Cair MRS**

Ditimbang 1 g pepton, 0,8 g LAB-Lemco, 0,4 g *yeast extract*, 0,2 g dikalium hidrogen fosfat, 0,5 g natrium asetat, 0,2 g amonium sitrat, 0,02 g magnesium sulfat, 0,005 g mangan sulfat, dan 2 g dekstrosa. Kemudian semuanya dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan aquadest secukupnya dan 0,05 ml Tween 80 kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer*. Kemudian pH-nya diatur dengan pH-meter hingga  $\text{pH } 6,2 \pm 0,2$  dengan menggunakan larutan asam klorida 1 N. Kemudian volume dicukupkan hingga 100 ml dengan aquadest. Medium tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 ml. Kemudian seluruh tabung reaksi disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit. Setelah dingin, dapat langsung digunakan atau dimasukkan ke dalam lemari pendingin untuk digunakan keesokan harinya.

**(4). Modifikasi Medium Cair MRS-sukrosa 5% (MRS-s5%)**

Ditimbang 1 g pepton, 0,8 g LAB-Lemco, 0,4 g *yeast extract*, 0,2 g dikalium hidrogen fosfat, 0,5 g natrium asetat, 0,2 g amonium sitrat, 0,02 g magnesium sulfat, dan 0,005 g mangan sulfat. Semuanya dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan aquadest secukupnya dan 0,05 ml Tween 80 kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer*. Setelah itu volumenya dicukupkan hingga 50 ml. Larutan medium ini diatur pH-nya dengan pH-meter hingga  $\text{pH } 6,2 \pm 0,2$  dengan menggunakan larutan asam klorida 1 N. Sementara itu, sukrosa ditimbang sebanyak 5 g, lalu dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan aquadest secukupnya dan diaduk hingga homogen. Kemudian volume dicukupkan hingga 50 ml. Kedua medium tersebut disterilisasi dengan autoklaf secara terpisah selama 15 menit. Apabila medium akan digunakan, LAF disiapkan. Larutan sukrosa tersebut dicampurkan ke dalam medium modifikasi MRS secara aseptis dan dihomogenkan.

**(5). Modifikasi Medium Cair MRS-rafinosa 5% (MRS-r5%)**

Ditimbang 1 g pepton, 0,8 g LAB-Lemco, 0,4 g *yeast extract*, 0,2 g dikalium hidrogen fosfat, 0,5 g natrium asetat, 0,2 g amonium sitrat, 0,02 g magnesium sulfat, dan 0,005 g mangan sulfat. Semuanya dimasukkan ke

dalam labu bulat, ditambahkan dengan aquadest secukupnya dan 0,05 ml Tween 80 kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer*. Setelah itu volumenya dicukupkan hingga 50 ml. Larutan medium ini diatur pH-nya dengan pH-meter hingga pH  $6,2 \pm 0,2$  dengan menggunakan larutan asam klorida 1 N. Sementara itu, rafinosa ditimbang sebanyak 5 g, lalu dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan aquadest secukupnya dan diaduk hingga homogen. Kemudian volume dicukupkan hingga 50 ml. Kedua medium tersebut disterilisasi dengan autoklaf secara terpisah selama 15 menit.

**(6). Modifikasi Medium Cair MRS-rafinosa 5%+glukosa 1% (MRS-r5% + g1%)**

Ditimbang 1 g pepton, 0,8 g LAB-Lemco, 0,4 g *yeast extract*, 0,2 g dikalium hidrogen fosfat, 0,5 g natrium asetat, 0,2 g amonium sitrat, 0,02 g magnesium sulfat, dan 0,005 g mangan sulfat. Semuanya dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan aquadest secukupnya dan 0,05 ml Tween 80 kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer*. Setelah itu volumenya dicukupkan hingga 50 ml. Larutan medium ini diatur pH-nya dengan pH-meter hingga pH  $6,2 \pm 0,2$  dengan menggunakan larutan asam klorida 1 N. Sementara itu, rafinosa dan glukosa masing-masing ditimbang sebanyak 5 g dan 1 g, lalu dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan aquadest secukupnya dan diaduk hingga homogen. Kemudian volume dicukupkan

hingga 50 ml. Kedua medium tersebut disterilisasi dengan autoklaf secara terpisah selama 15 menit.

#### **4. Pembuatan Larutan, Dapar dan Preaksi**

##### **a. 4X Tris-HCl/SDS pH 8,8 (25)**

Sebanyak 91 g tris base dilarutkan dalam 300 ml aquadest steril. Atur pH dengan asam klorida 1 N. Tambahkan aquadest steril hingga 500 ml kemudian tambahkan 2 g SDS. Aduk hingga homogen.

##### **b. 4X Tris-HCl/SDS pH 6,8 (25)**

Sebanyak 6,05 g tris base dilarutkan dalam 40 ml aquadest steril. Atur pH dengan asam klorida 1 N. Tambahkan aquadest steril hingga 100 ml kemudian tambahkan 0,4 g SDS. Aduk hingga homogen.

##### **c. 40% larutan akrilamid dan bisakrilamid (25)**

Sebanyak 30 g serbuk campuran akrilamid dan bisakrilamid dilarutkan dalam 24 ml aquadest steril. Volume akhir yang diperoleh adalah 75 ml

**d. 10% Amonium Persulfat (25)**

Sebanyak 0,1 g amonium persulfat dilarutkan dalam 1 ml aquadest steril. Reagen harus dibuat sesaat sebelum membuat gel elektroforesis.

**e. 5X Running Buffer (25)**

Sebanyak 15,1 g tris base, 72 g glisin dan 5 g SDS ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 1000 ml aquadest steril.

**f. Buffer sukrosa (10)**

Sebanyak 4,1 g natrium asetat, 0,21 g kalsium klorida dan 50 g sukrosa ditimbang dan dilarutkan dalam 200 ml aquabidest steril. Kemudian buat larutan 2% azida dengan cara menimbang 0,2 g natrium azida dalam 10 ml aquadest steril. Ambil 2,5 ml dan larutkan bersama bahan-bahan yang telah ditimbang sebelumnya. Cukupkan volume hingga 250 ml.

**g. 12,5% Trikloro asetat (TCA) (40)**

Buat larutan stok 30% TCA dengan melarutkan 15 g TCA dalam 50 ml aquadest steril. Dari larutan stok tersebut, ambil 10 ml dan larutkan dalam 24 ml aquadest steril.

**h. 1% Asam periodat/3% Asam asetat (40)**

Larutkan 0,25 g asam periodat dalam 1-2 ml aquadest steril. Setelah larut, bersama 0,75 ml asam asetat 96%, larutan tersebut dilarutkan dalam 25 ml aquadest steril. Reagen ini harus dibuat segar sebelum melakukan reaksi *staining*.

**i. Schiff Fuchsin Sulfite (35,36)**

0,05 g Fuchsin dilarutkan dalam 30 ml aquadest steril, didinginkan dengan penangas es. Tambahkan larutan 1 g natrium sulfit dalam 5 ml aquadest steril, dinginkan. Tambahkan sedikit demi sedikit 0,5 ml HCl 25% b/v BD 1.12. Tambahkan aquadest steril hingga 50 ml. Sebelum digunakan, harus didiamkan selama 1 malam dalam tempat yang gelap.

**j. 0,5% natriummetabisulfit (40)**

Larutkan natriummetabisulfit sebanyak 0,5 g dalam 100 ml aquadest steril.

### **C. ALAT**

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah mikrosentrifuse [Sorvall Fresco, Jerman], mikropipet [Gilson, Perancis], inkubator [Orbital Shaker Incubator], pemanas dengan *magnetic stirrer* [Torrey Pins Scientific, USA], autoklaf [Hirayama, Jepang], *Laminar Air Flow Cabinet* [Esco, Cina], pH meter [Eutech Instruments pH510 CyberScan, Singapura], timbangan analitik [Acculab dan Scout, USA], *deep freezer* -70<sup>0</sup>C [New Brunswick Scientific U101 Innova, Inggris], *freezer* -20<sup>0</sup>C [GEA, Korea], oven pengering [LAB-Line, USA], oven penyimpanan [WTB Binder, Jerman], alat SDS-PAGE [ATTO AE-6530, Jepang], spektrofotometer GeneQuant<sup>TM</sup> 100 [GE Healthcare, Swedia], *electrophoresis power supply* EPS 301 [GE Healthcare, Swedia], digital scanner [CanonScan 4400F, USA] dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

### **D. CARA KERJA**

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, pembuatan kultur cair dan inokulasi kultur cair. Pada tahap bioteknologi dilakukan pengukuran konsentrasi protein, elektroforesis SDS

gel poliakrilamid, *staining* gel hasil elektroforesis dan analisis aktivitas sukrase dengan menggunakan reaksi Schiff asam periodat.

## 1. Pemiakan dan Peremajaan Kultur (41)

Isolat-isolat BAL yang digunakan, yaitu MBF 8-1, MBF 8-2, MBF 3-1 dan MBF PDG 10(1) pertama-tama dikulturkan dalam medium agar MRS pada cawan petri. Dengan menggunakan ose, isolat-isolat bakteri dari kultur stok beku digoreskan pada medium agar MRS secara aseptis, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 32<sup>0</sup>C. Setelah diperoleh koloni tunggal, dilakukan identifikasi bakteri menggunakan metode pewarnaan Gram. Setelah diperoleh hasil identifikasi bahwa bakteri yang digunakan benar-benar bakteri asam laktat yang berupa bakteri Gram positif, kemudian isolat ditanam pada MRS untuk agar miring dan diremajakan setiap dua minggu sekali dengan cara memindahkan kembali kultur dari agar miring ke cawan petri. Jika telah diperoleh koloni tunggal, maka isolat ditanam kembali pada agar miring sebagai kultur kerja. Peremajaan tersebut dilakukan dengan tujuan agar bakteri yang dikulturkan tidak tumbuh terlalu tua dan mati.

## **2. Pembuatan Kultur Cair BAL dan Perolehan Supernatan dan Pelet Sel (10,42,43)**

Setelah diperoleh kultur kerja, isolat diinokulasi dalam medium cair MRS dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil inokulasi ini disebut sebagai kultur inokulum. Kemudian kultur inokulum tersebut diukur secara kuantitatif dengan menggunakan metode turbidimetri dengan alat spektrofotometer. Serapannya diukur pada panjang gelombang 600 nm untuk mengetahui jumlah sel yang terdapat dalam setiap ml medium cair. Setelah itu, sejumlah volume kultur inokulum dipipet dan diinokulasikan kembali pada medium cair MRS, MRS-s5%, MRS-r5% dan MRS-r5%+g1% masing-masing sebanyak 5 ml dan diinkubasi pada suhu 32<sup>0</sup>C. Dilakukan pula optimasi waktu inkubasi, yang mencakup inkubasi selama 8 jam, 12 jam, 16 jam dan 24 jam. Setelah diinkubasi, kemudian 1 ml kultur diambil dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4<sup>0</sup>C untuk diambil supernatannya. Kemudian diambil lagi 1 ml kultur dan disentrifugasi kembali. Proses ini dilakukan berulang kali hingga semua kultur habis dan diperoleh supernatan serta pelet sel yang pekat. Supernatan dan pelet sel ini kemudian akan digunakan sebagai sampel untuk analisis aktivitas sukrase.

### **3. Pengukuran Kuantitatif Protein dengan Spektrofotometer GeneQuant® (23,44,45)**

Ada dua jenis sampel yang akan diukur konsentrasinya, yaitu sampel yang berupa supernatan serta sampel yang berupa pelet sel. Supernatan dapat langsung diukur konsentrasinya. Sebanyak 20 µl supernatan dipipet dan dilarutkan dengan 1 ml pereaksi warna Bradford. Kemudian larutan tersebut diinkubasikan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama minimal 5 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang 595 nm. Sementara itu, sampel yang berupa pelet sel, mula-mula dicuci dengan menggunakan buffer fosfat pH 6,5. Setelah itu, pelet sel dihomogenkan dalam 50 µl aquabidest steril. Campuran pelet sel ini kemudian diencerkan dengan pengenceran 100X untuk pelet sel yang berasal dari medium MRS, MRS-s5% dan MRS-r5%+g1% serta pengenceran 50X untuk pelet sel yang berasal dari medium MRS-r5%. Setelah itu konsentrasi protein diukur dengan proses yang sama dengan yang dilakukan pada supernatan.

Adapun standar protein yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi adalah Bovine Serum Albumin (BSA). Larutan standar protein dibuat dalam 6 variasi konsentrasi yang berbeda, yaitu 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; dan 1,4 mg/ml. Masing-masing konsentrasi diukur serapannya dengan menggunakan metode yang sama dan kemudian dibuat kurva kalibrasi.

#### 4. Elektroforesis SDS Gel Poliakrilamid (10,25)

Terlebih dahulu dilakukan pembuatan larutan-larutan dan dapar-dapar yang akan digunakan untuk pembuatan gel elektroforesis maupun untuk proses elektroforesis itu sendiri. Mula-mula dilakukan optimasi untuk memperoleh formula gel elektroforesis yang baik. Diperlukan formulasi yang mampu memisahkan penanda protein dengan baik. Dilakukan perbandingan kemampuan memisahkan penanda protein antara formulasi gel elektroforesis tris-trisin 7% dengan formulasi tris-glisin 5%. Hasil perbandingan tersebut dapat dilihat pada Gambar 6. Dari hasil tersebut diperoleh formulasi gel yang optimal untuk memisahkan penanda protein adalah formulasi tris-glisin 5%.

Formulasi gel elektroforesis terdiri atas dua bagian, yaitu gel pemisah (*separating gel*) dan gel penahan (*stacking gel*). Dengan formulasi tris-glisin 5%, gel pemisah yang digunakan terdiri atas 1,25 ml larutan campuran akrilamid/bisakrilamid, 1,875 ml dapar tris-Cl/SDS pH 8,8, 4,375 ml aquabidest steril, 50 µl 10% amonium persulfat dan 10 µl TEMED. Adapun formulasi gel penahan terdiri atas 0,325 ml larutan campuran akrilamid/bisakrilamid, 0,625 ml dapar tris-Cl/SDS pH 6,8, 1,5 ml aquabidest steril, 25 µl 10% amonium persulfat dan 5 µl TEMED. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam *beaker glass* dan setiap larutan diambil dengan menggunakan mikropipet.

Cetakan untuk gel elektroforesis kemudian diisi dengan larutan gel pemisah dengan menggunakan mikropipet. Di atas lapisan gel pemisah

tersebut diisikan sejumlah volume isopropanol untuk mencegah agar gel pemisah tidak berbentuk cekung saat membeku serta mencegah terbentuknya gelembung udara dalam gel. Setelah gel pemisah membeku, lapisan isopropanol tersebut dibuang dan cetakan diisikan dengan larutan gel penahan. Segera setelah gel penahan diisikan, sisir yang digunakan untuk mencetak sumuran gel dimasukkan. Setelah gel memadat, sisir dapat diangkat dan sumuran-sumuran pada gel terbentuk. Gel dapat langsung digunakan atau dapat digunakan pada hari berikutnya. Apabila tidak langsung digunakan, gel harus direndam di dalam aquadest atau di dalam *running buffer* dan disimpan di dalam lemari es suhu 4°C agar gel tidak kering dan pecah.

Setelah gel siap digunakan, gel dipasangkan ke alat elektroforesis. Kemudian alat elektroforesis dipenuhi dengan *running buffer* baik bagian bawah alat maupun bagian atas. Bagian atas alat elektroforesis harus dipenuhi dengan *running buffer* sedemikian rupa hingga seluruh sumuran terendam oleh buffer.

Penyiapan sampel dilakukan dengan melarutkan sampel di dalam 1/5 volume *loading buffer* dan 1/20 volume agen pereduksi yang berupa 2-merkapttoetanol. Kemudian sampel dihangatkan selama 3 menit pada suhu 95°C. Sebelum digunakan, sumuran gel dibilas dengan menggunakan *running buffer*, kemudian cetakan gel dipasangkan ke alat elektroforesis. *Running buffer* diisikan ke ruangan bagian atas dan bagian bawah alat elektroforesis. Buffer yang dimasukkan tingginya harus melebihi sumuran gel.

Kemudian 10 µl sampel dan 4 µl penanda protein dimuatkan ke dalam tiap-tiap sumuran. Pada umumnya tegangan listrik diatur sedemikian rupa hingga elektroforesis bisa berjalan secepat mungkin tanpa membuat gel menjadi terlalu panas. Mula-mula tegangan diatur pada 30 volt dengan arus sebesar 55 amper. Tegangan ini dipertahankan hingga sampel memasuki daerah perbatasan antara gel penahan dengan gel pemisah. Setelah protein masuk ke dalam gel pemisah, tegangan dapat dinaikkan hingga 100 volt sampai proses elektroforesis selesai. Elektroforesis terus dijalankan hingga seluruh protein yang ada di dalam penanda protein telah terpisah dengan baik.

Selanjutnya gel dibagi dua dengan cara dipotong di bagian tengah. Bagian pertama digunakan untuk mengamati ukuran protein dan bagian lain digunakan untuk analisis aktivitas sukrase pada gel.

#### **5. Staining Hasil Elektroforesis SDS Gel Poliakrilamid (25)**

Gel hasil elektroforesis yang digunakan untuk mengamati ukuran protein kemudian direndam di dalam larutan Coomassie *Briliant Blue*. Sebelumnya dilakukan fiksasi protein dengan merendam gel hasil elektroforesis di dalam larutan 10% asam asetat dan 25% isopropanol selama sekitar 15 menit. Setelah itu, larutan fiksasi tersebut dibuang dan gel direndam dalam larutan Coomassie *Briliant Blue*. Setelah gel direndam, wadah yang berisi gel kemudian digoyangkan perlahan dengan

menggunakan *rotary shaker* selama 1 malam dalam temperatur kamar. Gel kemudian dicuci beberapa kali dengan menggunakan aquadest steril dan disimpan di dalam wadah plastik dalam keadaan terendam oleh air. Hasil *staining* tersebut kemudian dibandingkan dengan penanda protein untuk mengetahui perkiraan ukuran protein yang berhasil diperoleh.

#### **6. Analisis Aktivitas Sukrase pada SDS Gel Poliakrilamid (10,25)**

Setelah elektroforesis, gel yang digunakan untuk analisis aktivitas sukrase disiapkan untuk diinkubasi di dalam substrat. Substrat yang digunakan adalah sukrosa. Mula-mula gel dicuci sebanyak tiga kali dengan aquadest steril dan diinkubasi pada suhu 37°C di dalam buffer sukrosa. Inkubasi gel dilakukan selama satu malam untuk keesokan harinya di-*staining* dengan Schiff asam periodat.

#### **7. Staining Hasil Inkubasi dengan Schiff asam periodat (10,35,36)**

Setelah gel hasil elektroforesis diinkubasi di dalam substrat sukrosa, hasil inkubasi diberikan *staining* yang menggunakan Schiff asam periodat (PAS) untuk melihat adanya pembentukan EPS. Untuk membuat bahan *staining* tersebut, diperlukan bahan-bahan seperti 12,5% TCA, 1% asam periodat/3% asam asetat, reagen Schiff's yang mengandung fuchsin-sulfit

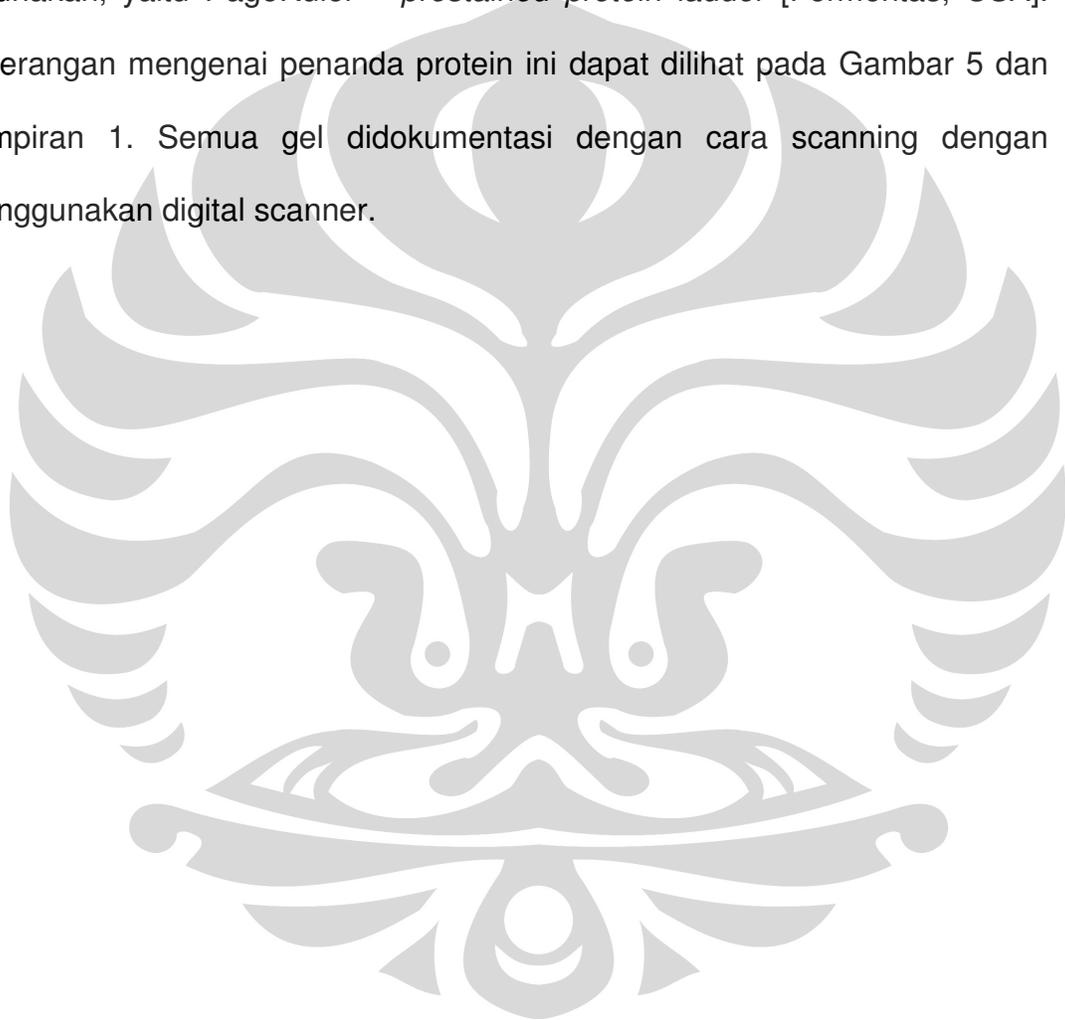
dan 0,5% natriummetabisulfit. Pereaksi 1% asam periodat/3% asam asetat harus dibuat segar sebelum dilakukan proses *staining*.

Gel yang telah diinkubasi dicuci beberapa kali dengan aquadest steril dan diinkubasi dengan 12,5% TCA selama 30 menit, dikocok pada temperatur kamar, kemudian dicuci kembali dengan aquadest steril. Setelah itu, gel diinkubasi dengan 1% asam periodat/3% asam asetat selama 50 menit. Kemudian dicuci sebanyak 6 kali selama 10 menit dalam aquadest steril, dikocok pada temperatur kamar. Selanjutnya gel diinkubasi dalam reagen Schiff's Fuchsin-sulfite selama 50 menit, kemudian reagen dibuang dan gel diinkubasikan dalam 0,5% natriummetabisulfit 3 x 10 menit, kocok pada temperatur kamar. Gel kemudian disimpan dalam wadah plastik dan direndam dalam aquadest steril. Aktivitas enzim dapat teramati dari terbentuknya EPS yang terwarnai oleh reaksi PAS dan menghasilkan warna pink intensif.

## **8. Pengamatan Hasil**

Pada gel yang telah diinkubasikan di dalam substrat sukrosa, adanya aktivitas enzim diamati dengan *staining* PAS yang akan bereaksi dengan EPS yang dihasilkan. Akan terlihat adanya pita berwarna pink intensif. Kemudian gel hasil inkubasi tersebut dibandingkan dengan gel yang hanya di-*staining* dengan Coomassie Brilliant Blue untuk melihat pita protein mana

yang memiliki aktivitas enzim. Pita protein tersebut kemudian dibandingkan dengan penanda protein yang digunakan untuk mengetahui ukuran protein tersebut. Ukuran protein yang teramati dapat diketahui dengan membandingkan letak protein tersebut dengan letak penanda protein yang digunakan, yaitu PageRuler™ *prestained protein ladder* [Fermentas, USA]. Keterangan mengenai penanda protein ini dapat dilihat pada Gambar 5 dan Lampiran 1. Semua gel didokumentasi dengan cara scanning dengan menggunakan digital scanner.



## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. HASIL**

##### **1. Hasil pembiakan dan peremajaan kultur**

Pembiakan kultur MBF 8-1, MBF 8-2, MBF 3-1 dan MBF PDG10(1) membentuk koloni-koloni tunggal yang berbentuk bulat dengan permukaan yang halus dan berwarna putih. Semua kultur dapat tumbuh dengan baik saat dipindahkan ke dalam medium MRS untuk agar miring sebagai kultur kerja. Hasil purifikasi yang berupa koloni tunggal dapat dilihat di Gambar 1.

##### **2. Hasil Pembuatan Kultur Cair BAL**

Satu sengkeli kultur kerja diinokulasi dalam medium cair MRS dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil inokulasi yang disebut sebagai kultur inokulum tersebut diukur secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer. Serapannya diukur pada panjang gelombang 600 nm untuk mengetahui OD-nya. Nilai OD tersebut akan menentukan volume kultur inokulum yang kemudian diinokulasikan ke dalam 4 jenis medium yang berbeda. Tujuannya adalah agar sedapat mungkin jumlah sel yang

diinokulasikan sama banyaknya. Hasil OD dan volume kultur inokulum yang diinokulasikan tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

### **3. Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein dengan Spektrofotometer GeneQuant<sup>®</sup>**

Hasil pengukuran konsentrasi protein diperoleh dari sampel pelet sel yang dilarutkan dalam 50 µl aquabidest steril dan kemudian dilakukan pengenceran tertentu. Kurva kalibrasi yang diperoleh dari pengukuran konsentrasi protein standar berupa Bovine Serum Albumin dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil pengukuran konsentrasi protein sampel pelet sel dapat dilihat pada Tabel 4.

### **4. Hasil Elektroforesis SDS Gel Poliakrilamid dengan *staining* Coomassie Brilliant Blue**

Elektroforesis dilakukan pada kedua jenis sampel. Akan tetapi, sampel yang berasal dari supernatan tidak menunjukkan hasil yang diharapkan. Tidak ada pita-pita protein yang terlihat atau terlihat sangat tipis sehingga tidak dapat diamati dan didokumentasi. Hasil elektroforesis dengan sampel berupa supernatan dapat dilihat di Gambar 2. Elektroforesis yang dilakukan

pada sampel berupa pelet sel menghasilkan pita-pita protein yang tajam dengan berbagai macam ukuran. Hasil elektroforesis dengan sampel berupa pelet sel dapat dilihat di Gambar 3.

## **5. Hasil Analisis Aktivitas Sukrase dengan *staining* Schiff Asam Periodat**

Analisis aktivitas sukrase dilakukan pada kedua jenis sampel. Akan tetapi, tidak dapat diamati adanya aktivitas sukrase berupa pita berwarna pink intensif pada sampel yang menggunakan supernatan. Sementara itu, hasil analisis aktivitas sukrase yang dilakukan dengan sampel berupa pelet sel menunjukkan adanya aktivitas sukrase yang terlihat dari terbentuknya EPS yang terawarnai oleh *staining* Schiff asam periodat berupa pita-pita berwarna pink intensif dengan berbagai macam ukuran mulai dari 43 kDa sampai 10 kDa. Hasil analisis aktivitas sukrase dengan substrat berupa sukrosa dapat dilihat pada Gambar 4 dan Tabel 5.

## **B. PEMBAHASAN**

Tahap awal penelitian ini dimulai dengan menumbuhkan isolat-isolat BAL yang secara molekuler telah diketahui memiliki gen yang menyandikan

sukrase, yaitu MBF 8-1, MBF 8-2, MBF 3-1 dan MBF PDG10(1). Rincian mengenai hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa keempat isolat tersebut mengandung sukrase dapat dilihat di Tabel 6. Keempat isolat tersebut sudah berhasil diidentifikasi dengan menggunakan metode 16S rDNA. MBF 8-1, MBF 8-2 dan PDG10(1) teridentifikasi sebagai *Weisella confusa* sementara MBF 3-1 teridentifikasi sebagai *Leuconostoc mesenteroides*. Dalam penelitian ini tidak digunakan kontrol positif berupa sukrase karena isolat-isolat yang digunakan telah positif mengindikasikan adanya gen-gen yang menyandikan sukrase berdasarkan molekuler (7,37) maupun penapisan dengan pengamatan visual pada substrat spesifik (9,46). Purifikasi isolat-isolat yang ditumbuhkan dilakukan dengan tujuan agar koloni yang kelak digunakan sebagai kultur kerja adalah benar-benar koloni dari isolat yang dimaksud, bukan dari kontaminan yang kebetulan tumbuh pada medium yang sama.

Tahap penumbuhan kultur dan purifikasi dilakukan dengan menginkubasi kultur pada suhu 32<sup>0</sup>C selama 24 jam (6,7,37). Kultur dalam medium MRS untuk agar miring dapat dijadikan sebagai kultur kerja karena pada pembuatannya ditambahkan kalsium karbonat. Kalsium karbonat berfungsi untuk menjaga agar pH medium tidak menjadi terlalu rendah akibat asam laktat yang dihasilkan dari isolat BAL itu sendiri. Asam laktat yang dihasilkan oleh BAL dapat menurunkan pH medium hingga mencapai pH 5 dan dapat menyebabkan kematian oleh BAL itu sendiri. Dengan adanya

kalsium karbonat, pH medium menjadi lebih stabil dan kultur dapat bertahan lebih lama (1).

Kultur kerja tersebut diremajakan setiap dua minggu sekali. Peremajaan dimaksudkan agar bakteri tidak tumbuh terlalu tua. Bakteri yang tumbuh terlalu lama kemungkinan akan mati karena kalsium karbonat yang ada sudah habis terpakai untuk menetralkan asam laktat yang terus menerus dikeluarkan oleh BAL.

Pengukuran OD kultur cair BAL dimaksudkan agar dapat diperhitungkan jumlah volume kultur yang harus diinokulasikan ke dalam berbagai jenis medium modifikasi di tahapan berikutnya. Volume kultur cair yang diinokulasikan disesuaikan dengan jumlah sel per ml agar protein yang diperoleh kelak sedapat mungkin memiliki konsentrasi yang mendekati sama.

Ada empat jenis medium cair yang digunakan untuk menginokulasi kultur cair BAL yang telah diperoleh, yaitu medium cair MRS dengan gula glukosa konsentrasi 2%, medium cair MRS dengan sukrosa 5%, medium cair MRS dengan rafinosa 5% dan medium cair MRS dengan rafinosa 5% dan glukosa 1%. Medium cair modifikasi dengan gula sukrosa dan rafinosa ini digunakan untuk menginduksi sukrase yang dimiliki BAL, yang mana sukrosa dan rafinosa merupakan substrat bagi sukrase (1,10). Rafinosa dapat menjadi substrat bagi sukrase karena rafinosa tersusun atas galaktosa, glukosa dan fruktosa. Sukrase akan bekerja dengan memutus ikatan glukosida antara glukosa dan fruktosa. Rafinosa merupakan substrat spesifik bagi fruktansukrase.

Penambahan glukosa sebanyak 1% terhadap rafinosa dilakukan berdasarkan data dari penelitian lain (9,46) yang melaporkan ada indikasi bahwa BAL memerlukan pertumbuhan dengan diinduksi oleh gula sederhana, dalam hal ini glukosa. Oleh karena itu, dilakukan penambahan glukosa agar BAL dapat tumbuh secara optimum terlebih dahulu, sebelum BAL dapat memanfaatkan keberadaan rafinosa untuk membentuk EPS.

Pada tahapan ini dilakukan optimasi waktu inkubasi, untuk mengetahui waktu inkubasi yang paling cocok. Waktu inkubasi yang dipilih adalah 8 jam, 12 jam, 16 jam dan 24 jam. Optimasi waktu inkubasi tidak dilakukan pada semua kultur melainkan hanya pada kultur MBF 8-2. Semua hasil inkubasi kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C (23). Supernatan diambil dan diukur serapannya dengan spektrofotometer GeneQuant® pada panjang gelombang 595 nm dengan pereaksi warna Bradford (23). Nilai serapan tertinggi diperoleh dari kultur yang diinkubasi selama 16 jam. Hasil ini kemungkinan disebabkan karena pada kultur yang diinkubasi selama 24 jam, enzim yang dihasilkan oleh BAL telah mulai didegradasi oleh protease endogen sehingga konsentrasi enzim berkurang jika dibandingkan dengan enzim yang dihasilkan pada kultur yang diinkubasi selama 16 jam. Oleh karena itu, ditetapkan bahwa waktu inkubasi optimum adalah 16 jam.

Pelet sel yang telah diperoleh dari hasil sentrifugasi kultur cair kemudian dicuci dengan menggunakan buffer fosfat pH 6,5. Pencucian ini dilakukan untuk memperoleh pelet sel bebas EPS karena ada kemungkinan

endapan yang terbentuk masih tercampur dengan EPS yang sudah diproduksi dan ikut mengendap bersama pelet sel. Supernatan yang dihasilkan dibuang dengan hati-hati agar pelet sel tidak ikut terbang hingga diperoleh pelet sel bebas EPS. Pelet sel tersebut kemudian dilarutkan dalam 50  $\mu$ l aquabidest steril. Larutan inilah yang digunakan sebagai sampel untuk diterapkan pada tahap pengukuran konsentrasi protein dan tahap elektroforesis SDS gel poliakrilamid.

Sukrase dapat berupa enzim ekstraseluler, enzim yang terikat dengan sel, maupun berupa keduanya. Oleh karena itu secara teoritis, enzim tersebut ada di dalam supernatan hasil sentrifugasi kultur cair BAL karena sebagai enzim ekstraseluler, sukrase akan disekresikan ke dalam medium tempat bakteri ditumbuhkan (42). Akan tetapi, saat supernatan tersebut digunakan sebagai sampel dalam tahap elektroforesis SDS gel poliakrilamid, ternyata tidak nampak pita-pita protein yang seharusnya ada dan menunjukkan keberadaan sukrase. Kemungkinan besar hal tersebut dikarenakan konsentrasi enzim maupun protein-protein lain di dalam supernatan terlalu kecil sehingga tidak dapat dideteksi dengan menggunakan elektroforesis SDS gel poliakrilamid dengan *staining* Coomassie Brilliant Blue.

Sebenarnya konsentrasi protein di dalam supernatan dapat dipisahkan dengan dua metode. Yang pertama adalah dengan menggunakan alat bernama *concentrator* Amicon<sup>®</sup> (47). Yang kedua adalah dengan pengendapan menggunakan amonium sulfat, dimana amonium sulfat ditambahkan ke dalam supernatan untuk mengendapkan protein-protein kecil

dan tidak penting yang kemungkinan dapat mengganggu. Setelah supernatan ditambahkan amonium sulfat, supernatan disentrifugasi agar endapan terkumpul. Supernatan hasil presipitasi tersebut banyak mengandung garam dalam konsentrasi tinggi, sehingga harus dihilangkan dengan dialisis. Adapun cara dialisis adalah supernatan dimasukkan ke dalam membran dialisis (biasanya berupa tube kecil), kemudian membran direndam di dalam sejumlah besar buffer. Pori-pori dalam membran dialisis akan menahan protein yang berada di dalam, sementara garam akan mengalir keluar (48). Setelah itu dilakukan pemekatan dengan alat yang sama.

Akan tetapi, kedua alat yang digunakan untuk memekatkan konsentrasi supernatan tersebut tidak tersedia sehingga metode tersebut tidak dapat dilakukan. Oleh karena itu, yang kemudian digunakan sebagai sampel adalah pelet sel dari kultur dan bukan supernatan, dengan asumsi bahwa sukrase ada yang berasosiasi dengan sel dan dapat dianalisis aktivitasnya.

Pelet sel ini kemudian diukur konsentrasinya dengan cara melakukan pengenceran terhadap larutan stok pelet sel sebanyak 50  $\mu$ l yang telah disebutkan di atas. Hasil pengenceran tersebut kemudian dipipet sebanyak 20  $\mu$ l dan dilarutkan dalam 1 ml pereaksi warna Bradford. Pengukuran konsentrasi protein dengan menggunakan Bradford bekerja berdasarkan prinsip pengikatan zat warna Coomassie *Brilliant Blue* G-250 dengan protein (23). Zat warna Coomassie akan mengalami pergeseran serapan maksimum saat berikatan dengan asam amino arginin maupun asam amino rantai

aromatis yang ada di dalam protein (24). Zat warna tersebut berikatan dengan protein sebagai akibat adanya gaya tarik elektrostatik pada bagian asam sulfonat yang ada dalam zat warna (49). Bentuk anion (bentuk terikat) dari zat warna tersebut memiliki spektrum serapan maksimum pada 595 nm sementara bentuk kation (bentuk bebas) memiliki serapan maksimum pada 470 nm. Peningkatan serapan pada panjang gelombang 595 nm berbanding lurus dengan peningkatan jumlah zat warna yang terikat dan oleh karena itu juga sebanding dengan jumlah protein di dalam sampel (24).

Sebagai standar bagi pengukuran konsentrasi protein, digunakan Bovine Serum Albumin yang dibuat dalam enam jenis konsentrasi yang berbeda. Setelah direaksikan dengan pereaksi warna Bradford kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 595 nm. Pengukuran konsentrasi sampel dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui berapa banyak konsentrasi yang dibutuhkan oleh suatu enzim untuk dapat menunjukkan aktivitasnya yang dapat teramati. Sehingga apabila hasil analisis aktivitas enzim nanti tidak menunjukkan hasil yang diharapkan, bisa dianggap bahwa konsentrasi sampel yang dimuatkan pada gel elektroforesis terlalu kecil. Konsentrasi yang terukur untuk sampel dapat dijadikan sebagai tolok ukur bagi penelitian mengenai aktivitas enzim selanjutnya yang menggunakan metode yang sama.

Setelah diperoleh konsentrasi dari masing-masing sampel yang berupa larutan pelet sel, tahapan selanjutnya adalah pembuatan gel untuk elektroforesis. Mula-mula formulasi gel yang digunakan adalah formulasi gel

tris-trisin 7%, dimana trisin menjadi salah satu bahan penyusun untuk *running buffer*-nya. Gel ini hasilnya baik dan tidak mudah rusak saat perlakuan dikeluarkan dari cetakan dan saat penanganan untuk tahapan *staining*. Akan tetapi, ternyata formulasi gel ini tidak dapat memisahkan protein dengan baik. Kemampuan untuk memisahkan protein ini dapat dilihat dari pola pemisahan penanda protein. Gel elektroforesis dengan formulasi tris-trisin 7% tidak berhasil memisahkan protein-protein berukuran besar dengan baik, sementara protein target yang kemungkinan besar ada dalam sampel adalah protein-protein berukuran besar, mengingat glukansukrase memiliki ukuran sekitar 160 kDa (19).

Formulasi gel kemudian diganti dengan menggunakan formulasi tris-glisin dimana glisin menjadi salah satu bahan penyusun untuk *running buffer*-nya. Formulasi yang digunakan adalah tris-glisin 5% untuk bagian gel pemisah. Formulasi gel ini ternyata berhasil memisahkan protein berukuran besar pada penanda protein dengan baik, sehingga formulasi gel ini yang digunakan di dalam penelitian ini. Perbedaan kemampuan antara dua buah formulasi gel tersebut dalam memisahkan protein-protein dalam penanda protein dapat dilihat pada Gambar 6. Seperti yang terlihat pada gambar, formulasi gel tris-trisin tidak dapat memisahkan protein berukuran besar pada penanda protein, yakni protein-protein berukuran 170, 130 dan 75 kDa. Setelah menggunakan formulasi tris-glisin, protein-protein berukuran besar tersebut dapat dipisahkan.

Perbedaan kemampuan suatu gel dalam memisahkan protein bergantung dari tingkat *cross-linking* dan ukuran pori gel. Hal ini dapat diatur dengan mengubah konsentrasi akrilamid/bisakrilamid dalam suatu campuran (26). Pada formulasi tris-trisin, konsentrasi akrilamid/bisakrilamid yang digunakan lebih besar dibandingkan dengan pada formulasi tris-glisin. Adanya gliserol dalam formulasi juga menyebabkan gel semakin padat dan kaku, sehingga sulit untuk memisahkan protein berukuran besar. Formulasi ini lebih tepat digunakan untuk memisahkan protein-protein berukuran kecil sekitar 5 sampai 20 kDa.

Bahan-bahan penyusun suatu gel dicampurkan di dalam *beaker glass*. Perlu dicatat bahwa salah satu bahan penyusun gel, yakni larutan amonium persulfat harus selalu dibuat segar sebelum pembuatan gel. Bahan TEMED harus disimpan di dalam lemari es dan baru dikeluarkan saat akan membuat gel. Kecepatan gel berpolimerisasi 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 ditambah tanpa mempengaruhi ukuran pori-pori gel yang akan terbentuk. Kegagalan gel untuk berpolimerisasi kemungkinan besar mengindikasikan adanya masalah pada amonium persulfat, TEMED atau pun keduanya (25).

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 berpolimerisasi. Selain itu isopropanol juga berfungsi untuk menjaga bentuk gel agar tidak menjadi cekung setelah gel berpolimerisasi (25,28).

Tahapan selanjutnya adalah aplikasi sampel. Sampel yang berupa larutan pelet 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 ia 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 terlihat dan elektroforesis bisa dihentikan sebelum protein turun keluar dari gel (28). 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 agen pereduksi berupa 2-merkaptotanol. Agen pereduksi ini berfungsi untuk memutus ikatan disulfida yang ada di dalam struktur protein sehingga protein dapat berjalan dengan seragam saat elektroforesis (25).

Setelah sampel dicampurkan dengan kedua bahan tersebut, sampel dihomogenkan dengan *vortex* dan kemudian dipanaskan dengan menggunakan *dri-bath* pada suhu 95°C selama 3 menit. Pemanasan ini bertujuan untuk lebih mendenaturasi protein dan memecah struktur protein kuartener (28) serta untuk menginaktivasi protease endogen (25). Setelah sampel dicampur dengan *loading buffer* sampel harus segera dipanaskan dan jangan dibiarkan terlalu lama dalam suhu kamar. Hal ini untuk mencegah terjadinya degradasi protein oleh enzim protease mengingat enzim protease sangat aktif di dalam *loading buffer* (25).

Setelah selesai dipanaskan, sampel dapat langsung dimuatkan ke dalam sumuran-sumuran gel elektroforesis. Volume sampel yang dimuatkan adalah 10 µl sementara volume penanda protein yang dimuatkan adalah 4 µl. Dalam satu buah gel sebaiknya dimuatkan sampel yang berasal dari kultur yang sama, misalnya semua sampel dari MBF 8-2 dimuatkan dalam satu gel. Sumuran 1 diisi dengan penanda protein, sumuran 2 diisi dengan sampel MBF 8-2 yang berasal dari medium cair MRS, sumuran 3 diisi dengan sampel MBF 8-2 yang berasal dari medium cair MRS-s5%, sumuran 4 diisi dengan sampel MBF 8-2 yang berasal dari medium MRS-r5% dan sumuran 5 diisi dengan sampel MBF 8-2 yang berasal dari medium MRS-r5%+g1%. Dan karena gel akan dibagi menjadi dua bagian, yaitu yang akan dilanjutkan dengan tahap *staining* dengan Coomassie *Brilliant Blue* serta yang akan dilanjutkan dengan tahap analisis aktivitas enzim dengan Schiff asam periodat maka urutan yang sama dilakukan pada sumuran 7 sampai 11.

Sumuran 6 dibiarkan kosong agar memudahkan saat akan membelah gel menjadi dua bagian.

Elektroforesis berjalan dari kutub negatif di bagian atas ke kutub positif di bagian bawah alat elektroforesis (26). Setelah elektroforesis selesai, gel diangkat dari cetaknya dengan hati-hati dan dicuci beberapa kali dengan aquadest steril untuk menghilangkan SDS. Gel kemudian dibagi menjadi dua dengan cara dipotong. Satu bagian akan di-*staining* dengan Coomassie *Brilliant Blue* sedangkan satu bagian lagi akan diinkubasi dalam buffer sukrosa. Sebelum di-*staining* dengan Coomassie *Brilliant Blue*, gel direndam di dalam larutan 25% isopropanol dan 10% asam asetat. Larutan ini berfungsi untuk meningkatkan sensitivitas *staining* dengan cara memfiksasi protein. Proses fiksasi mencegah terjadinya difusi protein keluar gel terutama pada protein berukuran kecil serta mempercepat pembersihan SDS. Gel direndam dalam larutan ini selama kurang lebih 15 menit, kemudian larutan ini 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 (28).

Hasil *staining* dengan Coomassie *Brilliant Blue* menunjukkan banyak pita-pita protein yang terlihat dengan berbagai macam ukuran sebagaimana

yang terlihat pada Gambar 3. Pada gambar tersebut terlihat banyak pita-pita berwarna biru namun tidak terlalu tajam dan agar buram. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena sampel berada dalam suhu kamar terlalu lama sehingga sebagian enzim sudah terdegradasi oleh protease (25). Konsentrasi dan kekuatan *running buffer* yang digunakan tidak lagi dihitung karena *running buffer* yang digunakan termasuk ke dalam protokol standar elektroforesis yang telah disesuaikan dengan formulasi gel yang dibuat.

Karena sampel berasal dari pelet sel, maka kemungkinan besar semua protein yang terlihat pada gel hasil elektroforesis berasal dari berbagai macam jenis protein penyusun suatu sel bakteri dan bukan semata hanya berupa sukrase yang merupakan protein target. Untuk mengetahui protein mana yang merupakan sukrase, harus dilakukan analisis aktivitas enzim dengan menginkubasi gel dalam substrat sukrosa dan kemudian diwarnai dengan reaksi Schiff asam periodat.

Bagian lain gel yang akan digunakan untuk analisis aktivitas enzim diinkubasikan dalam buffer sukrosa. Inkubasi dalam buffer sukrosa dilakukan pada sampel yang berasal dari semua kultur, yaitu MBF 8-1, MBF 8-2, MBF 3-1 dan MBF PDG10(1). Inkubasi dilakukan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama satu malam. Buffer sukrosa digunakan sebagai substrat bagi glukansukrase maupun fruktansukrase. Sukrase akan bereaksi dengan substrat membentuk polimer-polimer EPS. Glukansukrase akan memecah sukrosa dan menghasilkan EPS berupa glukosa sementara fruktansukrase akan memecah sukrosa dan menghasilkan EPS berupa fruktan. Polimer-polimer tersebut

akan terbentuk di dalam gel dan dapat diamati dengan pewarnaan berdasarkan reaksi Schiff asam periodat. Reaksi Schiff asam periodat dilakukan keesokan harinya setelah gel selesai diinkubasi.

Gel yang telah selesai diinkubasi kemudian dicuci beberapa kali dengan aquadest steril untuk menghilangkan sisa-sisa sukrosa. Kemudian gel diinkubasi dalam larutan 12,5% TCA selama 30 menit dalam *rotary shaker*. Setelah itu gel kembali dicuci dengan aquadest steril dan diinkubasi dalam larutan 1% asam periodat/3% asam asetat selama 50 menit. Larutan pereaksi ini harus dibuat segar sebelum gel diinkubasikan di dalamnya. Larutan 1% asam periodat/3% asam asetat ini berfungsi untuk mengoksidasi ikatan karbon-karbon dari EPS yang terbentuk dimana atom karbonnya memiliki gugus hidroksil untuk menghasikan dialdehid yang dapat bereaksi dengan pereaksi Schiff (38). Setelah selesai diinkubasi dengan 1% asam periodat/3% asam asetat, gel kemudian dicuci dengan aquadest steril selama 6x10 menit. Kemudian gel diinkubasi di dalam pereaksi Schiff fuchsin sulfit selama 50 menit. Pereaksi Schiff akan mewarnai aldehid yang terbentuk dari EPS yang dioksidasi oleh asam periodat sebelumnya. Warna merah yang terjadi merupakan suatu senyawa baru hasil penggabungan fuchsin (dari pereaksi Schiff) dengan dialdehid, bukan akibat terjadinya re-oksidasi fuchsin (35). Saat inkubasi dengan pereaksi Schiff, wadah gel harus ditutup dengan aluminium foil untuk mencegah terjadinya oksidasi yang dapat menyebabkan warna pereaksi Schiff menjadi merah.

Setelah gel selesai diinkubasi dengan pereaksi Schiff, apabila gel dicuci dengan aquadest steril maka warna air akan menjadi merah dan akan menjadi pewarna biasa yang mewarnai semua gel dan bukan hanya spesifik mewarnai bagian aldehid yang ada di dalam gel. Oleh karena itu, gel dicuci dengan larutan natrium metabisulfit. Dengan begitu, kemungkinan terjadinya pewarnaan pada bagian non-aldehid dapat dihilangkan. Gel diinkubasi dalam larutan natrium metabisulfit ini selama 30 menit hingga semua sisa pereaksi Schiff yang digunakan tercuci bersih (36).

Hasil dari analisis aktivitas enzim ini dapat dilihat pada Gambar 4 dan Tabel 5. Pada Gambar 4 terlihat hasil analisis aktivitas sukrase berupa terbentuknya EPS pada gel yang diinkubasi dalam buffer sukrosa yang dapat diamati sebagai pita berwarna pink. Pada kultur MBF 8-1, terlihat adanya produksi EPS pada sampel yang ditumbuhkan dalam medium cair MRS dan medium cair MRS-s5%. Ukuran enzim yang terlihat pada sampel yang ditumbuhkan dalam medium cair MRS adalah setara dengan ukuran penanda protein antara 34 sampai 43 kDa, sementara ukuran enzim yang terlihat pada sampel yang ditumbuhkan dalam medium cair MRS-s5% adalah antara 17 sampai 26 kDa. Pada kultur MBF 8-2, terlihat adanya produksi EPS pada sampel yang ditumbuhkan dalam medium cair MRS-r5%. Ada dua ukuran enzim yang terlihat, yaitu antara 34 sampai 43 kDa dan antara 10 dan 17 kDa.

Pada kultur MBF 3-1 terlihat adanya aktivitas sukrase yang ditandai dengan produksi EPS pada sampel yang ditumbuhkan dalam medium cair

MRS-s5% dan MRS-r5%+g1%. Ukuran-ukuran enzim yang terlihat pada sampel yang ditumbuhkan dalam medium cair MRS-s5% adalah sekitar 43 kDa dan antara 17 sampai 26 kDa. Sedangkan ukuran enzim yang terlihat pada sampel yang ditumbuhkan dalam medium cair MRS-r5%+g1% adalah sekitar 34 kDa. Pada kultur MBF PDG10(1) terlihat adanya aktivitas sukrase yang ditandai dengan adanya produksi EPS pada sampel yang ditumbuhkan dalam medium cair MRS-s5% dengan ukuran sekitar 10 kDa.

Hasil analisis aktivitas enzim-sukrase yang diamati berupa terbentuknya EPS menunjukkan ukuran yang beragam. Beberapa penelitian sebelumnya telah menyatakan beberapa ukuran dari sukrase. Glukansukrase yang terdapat dalam *Lactobacillus reutri* galur LB 121 dan 35-5 merupakan enzim monomer dengan ukuran 146 kDa. Glukansukrase pada *S. mutans*, *L. mesenteroides*, *S. downei*, *S. sobrinus* dan *S. salivarius* memiliki ukuran sekitar 130 sampai 180 kDa. Sementara itu fruktansukrase yang telah diteliti pada beberapa jenis bakteri memiliki ukuran molekuler antara 50 - 100 kDa (14). Suatu fruktansukrase berukuran 140 kDa dilaporkan terdapat pada *Streptococcus salivarius* (40).

Dekstransukrase yang merupakan salah satu jenis glukansukrase merupakan enzim berukuran besar antara 64 sampai 184 kDa sementara levansukrase yang merupakan fruktansukrase berukuran lebih kecil yakni sekitar 45 sampai 64 kDa dengan perkecualian enzim yang berasal dari *S. salivarius* sebagaimana yang telah disebutkan di atas dan *S. mutans* yang berukuran 87 kDa (42).

Dapat dilihat pada Tabel 1, berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, MBF 8-1 telah diketahui memiliki lebih dari satu gen *gtf* dan hasil analisis HPLC lendir EPS menunjukkan adanya glukukan dan fruktan. Pada penelitian ini, berdasarkan analisis SDS-PAGE dengan *staining* Schiff asam periodat diduga ada dua enzim yang berbeda ukuran. Karena yang menunjukkan hasil positif adalah yang berasal dari medium cair MRS dan MRS-s5%, maka dapat disimpulkan bahwa enzim yang terdeteksi aktivitasnya tersebut adalah glukansukrase. Perbedaan ukuran enzim yang terdapat dalam MBF 8-1 ini kemungkinan disebabkan oleh enzim-glukansukrase yang berbeda dalam satu galur, mengingat ada lebih dari satu gen *gtf* dalam galur ini (8,41).

MBF 8-2 telah diketahui memiliki lebih dari satu gen *gtf* dan satu gen *fff* (8). Hasil penelitian dengan HPLC menunjukkan adanya glukukan dan fruktan (23). Pada penelitian ini, aktivitas sukrase hanya teramati pada medium MRS-r5% yang menunjukkan aktivitas fruktansukrase. Pada MBF 3-1 yang telah diketahui mengandung satu gen *gtf* dan menunjukkan adanya glukukan dan fruktan dengan analisis HPLC (4,41). Pada penelitian ini teramati adanya aktivitas dua glukansukrase yang berbeda ukuran. Hal ini dapat menjadi bahan pertimbangan lanjut pada penelitian genetik dengan metode PCR karena hasil penelitian sebelumnya hanya menemukan satu gen *gtf*. Selain dua glukansukrase yang berbeda ukurannya, teramati pula adanya fruktansukrase, yang mendukung penelitian sebelumnya yang menggunakan analisis HPLC. Adapun MBF PDG10(1) diketahui memiliki gen *gtf* (7) dan hasil skrining menggunakan medium rafinosa menunjukkan adanya lendir

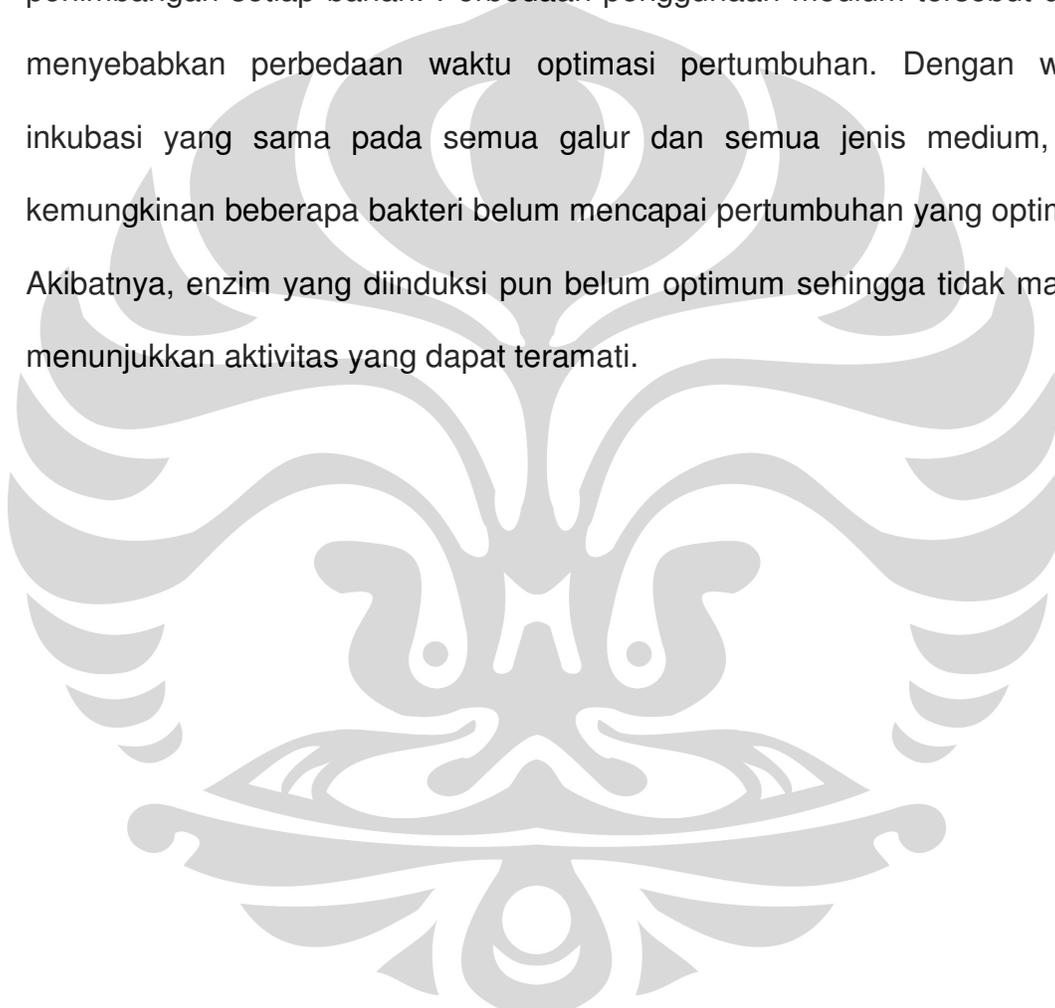
EPS yang mengindikasikan adanya fruktan (9). Pada penelitian ini, yang berhasil teramati hanya aktivitas glukansukrase. Perbandingan antara hasil penelitian ini dengan hasil penelitian sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 6.

Jika dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya ada beberapa perbedaan yang terlihat pada penelitian ini. Hal ini kemungkinan dapat dijelaskan sebagai berikut. Aktivitas glukansukrase atau fruktansukrase yang tidak terdeteksi oleh analisis dengan metode ini bisa diakibatkan karena enzim mengalami denaturasi oleh adanya SDS dan menyebabkan hilangnya aktivitas enzim yang ireversibel (26). Jika memang hal tersebut yang menjadi penyebab maka ada kemungkinan beberapa aktivitas sukrase hanya bisa diamati dengan metode elektroforesis SDS gel poliakrilamid tanpa SDS.

Kemungkinan lainnya adalah konsentrasi sampel yang terlalu kecil, sehingga aktivitas enzim tidak dapat diamati dan didokumentasi. Selain itu, sukrase bisa berupa enzim ekstraseluler yang diekskresi keluar sel, enzim yang terasosiasi dengan sel maupun keduanya. Karena yang teramati pada penelitian ini adalah hanya aktivitas enzim yang berasal dari protein yang terasosiasi dengan sel, ada kemungkinan bahwa aktivitas enzim yang tidak berhasil teramati adalah karena enzim tersebut termasuk ke dalam enzim ekstraseluler yang disekresikan ke dalam supernatan. Akan tetapi, karena konsentrasi supernatan pun terlalu kecil, sebagaimana yang telah dibahas sebelumnya, sehingga aktivitas enzimnya pun belum dapat teramati.

Faktor lain yang dapat menyebabkan perbedaan hasil tersebut jika dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya adalah variasi

pertumbuhan. Pada penelitian sebelumnya digunakan medium MRS broth [Pronadisa, Spanyol]. Pada penelitian ini digunakan medium MRS racikan yaitu MRS dengan bahan-bahan yang masing-masing ditimbang sendiri sehingga tidak menutup adanya kemungkinan perbedaan dalam proses penimbangan setiap bahan. Perbedaan penggunaan medium tersebut dapat menyebabkan perbedaan waktu optimasi pertumbuhan. Dengan waktu inkubasi yang sama pada semua galur dan semua jenis medium, ada kemungkinan beberapa bakteri belum mencapai pertumbuhan yang optimum. Akibatnya, enzim yang diinduksi pun belum optimum sehingga tidak mampu menunjukkan aktivitas yang dapat teramati.



## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. KESIMPULAN**

Dengan teknik SDS-PAGE dan analisis aktivitas enzim dengan substrat sukrosa, teramati adanya aktivitas sukrase pada keempat galur BAL penghasil EPS. Pada galur MBF 8-1 dan MBF PDG10(1) teramati adanya aktivitas glukansukrase, pada galur MBF 8-2 teramati adanya aktivitas fruktansukrase dan pada galur MBF 3-1 teramati adanya aktivitas glukansukrase dan fruktansukrase.

#### **B. SARAN**

1. Agar aktivitas sukrase di dalam supernatan juga dapat teramati, supernatan harus dipekatkan sehingga konsentrasi protein cukup tinggi.
2. Perlu dilakukan penelitian yang sama dengan substrat rafinosa untuk memastikan aktivitas fruktansukrase karena rafinosa merupakan substrat spesifik untuk fruktansukrase dan bukan untuk glukansukrase.

## DAFTAR ACUAN

1. Perry, JJ & Staley JT. *Microbiology Dynamics and Diversity*. New York: Saunders College Publishing, 1997: 479-486
2. Van Geel-Schutten, GH General Introduction. *Dalam: Van Geel-Schutten, GH. Exopolysaccharide Synthesis by Lactobacillus reutii: Molecular Characterization of A Fructosyltransferase and A Glucansucrase*. Centrum voor Koolhydraat Bio-engineering TNO-RUG, 2000: 8-18
3. Franck, A & L De Leenheer. *Inulin*. 8 hlm. [www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf\\_v06/bpol6014\\_439\\_448.pdf](http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v06/bpol6014_439_448.pdf), 18 Oktober 2008, 23:29
4. Malik, A, E Saepudin, A Oetari, S Kralj & L Dijkhuizen. Screening for Glucan- and Fructansucrase Genes in Lactic Acid Bacteria Isolated from Indonesia. *International Meeting of Second Symposium and Workshop on Carbohydrate and Carbohydrate Acting Enzymes Bioengineering*, 2007 (Abstrak)
5. Felicia. *Skrining, Isolasi dan Identifikasi BAL Penghasil Eksopolisakarida Menggunakan Gen Penyandi 16S rRNA*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok, 2006: x + 89 hlm
6. Hestingtyas, Mahardika. *Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Berbagai Makanan dan Minuman Tradisional dan Identifikasi Isolat-isolatnya secara Molekuler menggunakan DNA Ribosomal 16S*. Departemen Farmasi FMIPA UI, 2008: ix + 128 hlm
7. Hermawati, Ajitya K. *Identifikasi Gen gtf pada Koleksi Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Beberapa Makanan dan Minuman Tradisional dengan Teknik Polymerase Chain Reaction*. Departemen Farmasi FMIPA UI, 2007: xi + 120 hlm
8. Malik, A, E Saepudin, A Oetari, S Kralj & L Dijkhuizen. Identification of Two gtf and One ftf Genes in *Weissella* sp. *International Meeting of Second Symposium and Workshop on Carbohydrate and Carbohydrate Acting Enzymes Bioengineering*, 2007 (Abstrak)
9. Handayani, Tri. *Pencarian Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida yang Mempunyai Aktivitas Fruktansukrase dari Koleksi Isolat Asal Sumber Lokal*. (skripsi dalam pengerjaan)

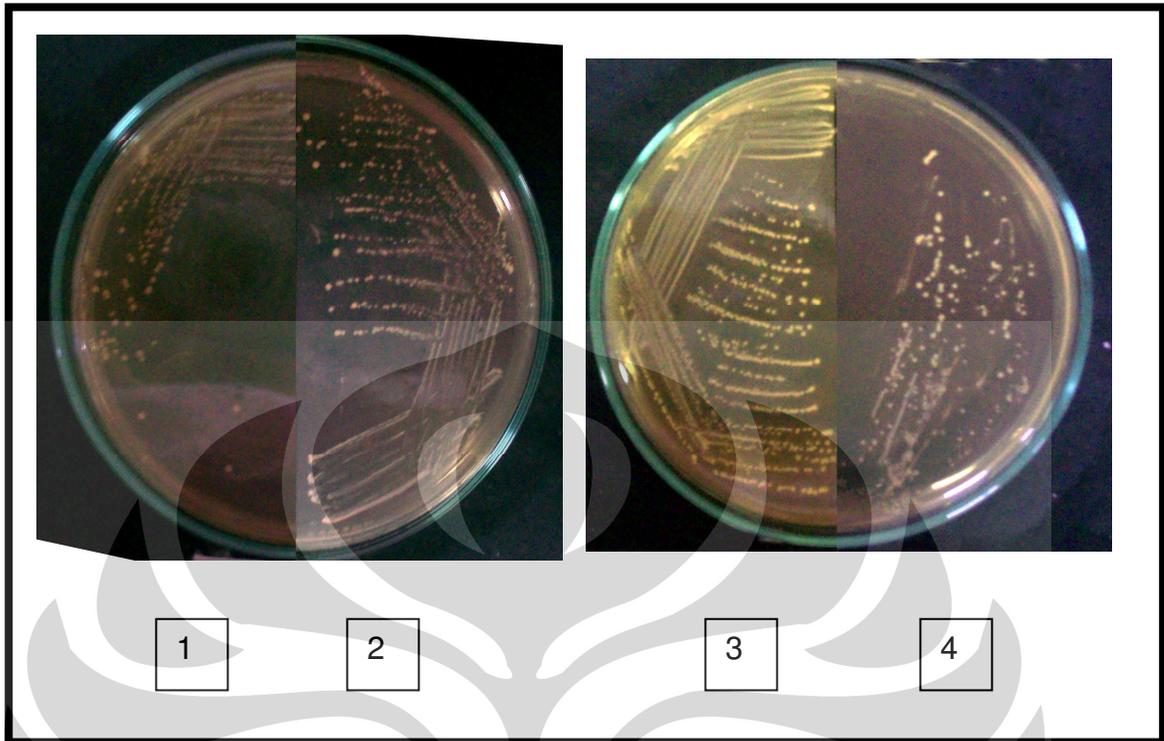
10. Van Geel-Schutten, GH, *et al.* Biochemical and Structural Characterization of The Glucan and Fructan Exopolysaccharides Synthesized by *Lactobacillus reutri* Wild-type and Mutant Strains. *Applied and Enviromental Microbiology*, 1999. **65**: 3008-30014
11. Dabour, N & LaPointe G. Identification and Molecular Characterization of the Chromosomal Exopolysaccharide Biosynthesis Gene Cluster from *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Applied and Enviromental Microbiology*, 2005. **71**: 7414-7425
12. Dabour, N & LaPointe G. Identification and Molecular Characterization of the Chromosomal Exopolysaccharide Biosynthesis Gene Cluster from *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Applied and Enviromental Microbiology*, 2005. **71**: 7414-7425
13. Knoshaug, Eric P, Jeff A Ahlgren & Janine A Trempey. Exopolysaccharide Expression in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Ropy352: Evidence for Novel Gene Organization. *Applied and Enviromental Microbiology*, 2007. **75**: 897-905
14. Korakli, M, M Pavlovic, Micheal G Ganzle & Rudi F Vogel. Exopolysaccharide and Ketose Production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Applied and Enviromental Microbiology*, 2003. **69**: 2073-2079
15. Boels, C, A Ramos & M Kleerebezem. Functional Analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE Genes and Their Impact on Sugar Nucleotide and Exopolysaccharide Biosynthesis. *Applied and Enviromental Microbiology*, 2001. **67**: 3033-3040
16. Petry, S, S Furlan, MJ Crepeau, J Cerning & M Desmazeaud. Factors Affecting Exocellular Polysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in A Chemically Defined Medium. *Applied and Enviromental Microbiology*, 2000. **66**: 3427-3431
17. Van Hijum, SAFT, S Kralj, L Dijkhuizen & GH van Geel-Schutten. General Introduction. *Dalam: Van Hijum, SAFT. Glucansucrases of Lactobacilli Characterization of Genes, Enzymes and Products Synthesized.* Ponsen&Looijen BV, 1976: 10-15
18. Natural News. *Inulin: Friend or Foe.* 6 hlm. <http://www.naturalnews.com/022356.html>, 9 Januari 2009, 23:53

19. Van Hijum, SAFT, GH van Geel-Schutten, H Rahaoui, MJE van der Maarel & L Dijkhuizen. Characterization of a Novel Fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* That Synthesizes High-Molecular-Weight Inulin and Inulin Oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002: 4390-4398
20. Beine, Rafael, *et al.* Synthesis of Novel Fructooligosaccharides by Substrate and Enzyme Engineering. *Journal of Biotechnology*, 2008. **138**: 33-41
21. Van Hijum, SAFT, S Kralj, L Dijkhuizen, LK Ozimek & GH van Geel-Schutten. Structure-Function Relationship of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2006. **70**: 157-176
22. Anonim. *GeneQuant RNA/DNA Calculator*. 1 hlm. <http://biocitd01.uuhost.uk.uu.net/genequant.htm>, 20 Januari 2009, 02:54
23. Anonim. *Quick Start™ Bradford Protein Assay Instruction Manual*. USA: Bio-Rad Laboratories Inc, 2000: 1-33
24. Chemistry Daily. *Bradford Protein Assay*. 2 hlm. [http://www.chemistrydaily.com/chemistry/Bradford\\_protein\\_assay](http://www.chemistrydaily.com/chemistry/Bradford_protein_assay), 27 Juni 2009, 11:19
25. Coligan, JE, BM Dunn, HL Ploegh, DW Speicher & PT Wingfield. *Current Protocols in Protein Science. Volume 1 Editional Board*. USA: John Wiley&Sons Inc, 1995: unit 10.1
26. Wink, Micheal. *An Introduction to Molecular Biotechnology: Molecular Fundamentals, Methods and Applications in Modern Biotechnology*. German: Willey-VCH, Weinhem, 2006 : 131-137
27. Anonim. *SDS-PAGE (Polyacrilamide Gel Electrophoresis)*. 3 hlm. <http://www.bio.davidson.edu/COURSES/GENOMICS/method/SDSPA GE/SDSPAGE.html>, 21 Desember 2008, 21:32
28. Rybicki, Ed & P Maud. *SDS Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*. 3 hlm. <http://www.mcb.uct.ac.za/sdspage.html>, 14 Januari 2009, 16:40
29. Biology Online. *Zymography*. 1 hlm. [http://www.biology-online.org/articles/metabolic\\_mapping\\_proteinase\\_activity/zymography.html](http://www.biology-online.org/articles/metabolic_mapping_proteinase_activity/zymography.html), 3 Januari 2009, 20:55

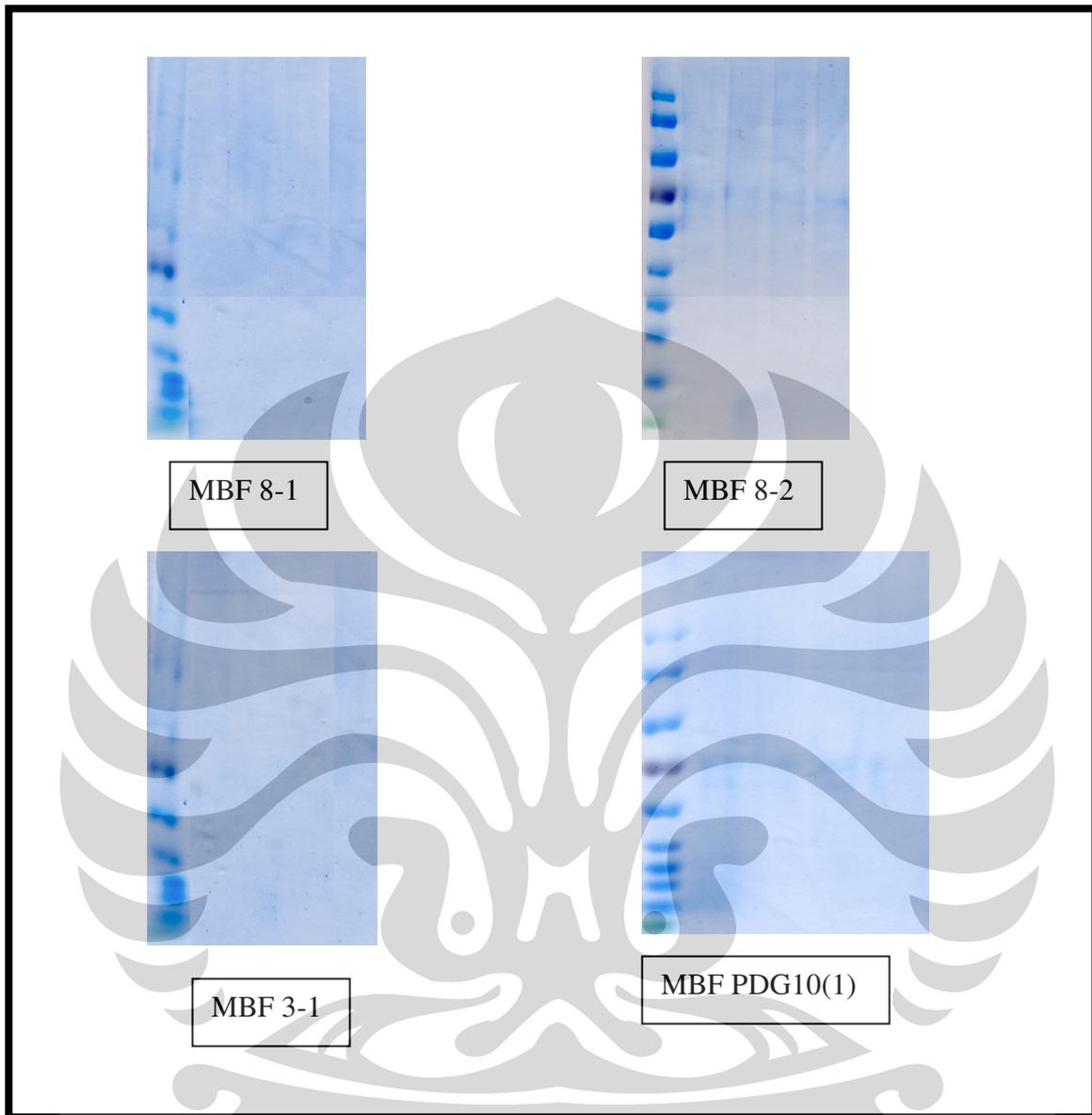
30. Royer, John C & JP Nakas. Simple, Sensitive Zymogram Technique for Detection of Xylanase Activity in Polyacrylamide Gels. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990. **56**: 1516-1517
31. Murray RK, Granner DK, Mayes PA & Rodwell VW. *Biokimia Harper Edisi 25*. Jakarta: Penerbit buku kedokteran EGC, 2000: 70-113
32. Anonim. The Measurement of Enzyme Activity. 1 hlm. <http://www.trinity.edu/slibs/enzymelab/default.htm>, 1 Juli 2009, 05:16
33. G Biosciences. MSDS Zymogram: Study of an Active Enzyme with Electrophoresis. 1 hlm. <http://www.gbiosciences.com/ZymogramStudyofanActiveEnzymeWithElectrophoresis-desc.aspx>, 1 Juli 2009, 05:30
34. Valence, Florence & Sylvie Lortal. Zymogram and Preliminary Characterization of *Lactobacillus helveticus* Autolysins. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1995. **61**: 3391-3399
35. American Ukrainian Medical Project. *Periodic Acid Schiff Reaction*. 2 hlm. [www.aump.org](http://www.aump.org), 3 April 2009, 23:21
36. StainsFile. *What is Schiff's Reagent?*. 5 hlm. <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/schiff/schiffwhatis.htm>, 13 April 2009, 17:49
37. Malik, A, DM Ariestanti, A Nurfachtiyani & A Yanuar. Skrining Gen Glukosiltransferase (gtf) dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. *Makara (seri sains)*. 2008. **12**: 1-6
38. Harley, JP & LM Prescott. *Laboratory Exercise in Microbiology*. Boston: Mc. Graw Hill Companies, 1999: 42-46
39. Van Geel-Schutten, GH, F van Flesch, B ten Brink, MR Smith & L Dijkhuizen. Screening and Characterization of *Lactobacillus* Strain Producing Large Amount of Exopolysacharides. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1998. **50**: 697-703
40. Milward CP & NA Jacques. Secretion of Fructosyltransferase by *Streptococcus salivarius* Involves The Sucrose-dependent Release of The Cell-Bound form. *J.Gen. Microbiol*, 1990. **136**:165-169
41. Sheilla. *Identifikasi Produk Eksopolisakarida dan Penentuan Viskositas Kultur dari Beberapa Isolat Bakteri Asam Laktat*. Departemen Farmasi FMIPA UI, 2007: xii + 98 hlm

42. Olivares-Illana, V, C Wachter-Rodarte, S Le Borgne & A Lopez-Mungula. Characterization of A Cell-associated Inulosucrase from A Novel Source: A *Leuconostoc citreum* Strain Isolated from Pozol, A Fermented Corn Beverage of Mayan Origin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002. **28**: 112-117
43. Bauman, Robert W. *Microbiology*. San Fransisco: Pearson Education Inc, 2004: 193-194
44. Sudarmanto, Arie. *Penetapan Kadar Protein Total*. 1 hlm. <http://ariebs.staff.ugm.ac.id/?p=23>, 27 Januari 2009, 22:42
45. Anonim, *GeneQuant™ 100 User Manual*. Inggris: Biochrom Ltd, 2001: 19, 27-30
46. Pratiwi, Tri Vita. *Skrining Aktivitas Fruktansukrase Bakteri Asam Laktat Menggunakan Medium Mengandung Rafinosa*. Departemen Farmasi FMIPA UI, 2009: x + 73 hlm
47. Anonim. *Amicon Spiral Cartridge Concentrator*. 5 hlm. <http://www2.kumc.edu/soalab/LabLinks/protocols/amiconspiral.htm>, 2 Juni 2009, 22:14
48. The Biotechnology Project. *Dialysis Desalting and Buffer Exchange*. 3 hlm. [http://matcmadison.edu/biotech/resources/proteins/labManual/chapter\\_4/section4\\_3.htm](http://matcmadison.edu/biotech/resources/proteins/labManual/chapter_4/section4_3.htm), 2 Juni 2009, 21:50
49. Ahmed, Hafiz. *Principles and Reaction of Protein Extraction, Purification and Characterization*. Boca Raton: CRC Press, 2005: 55-57

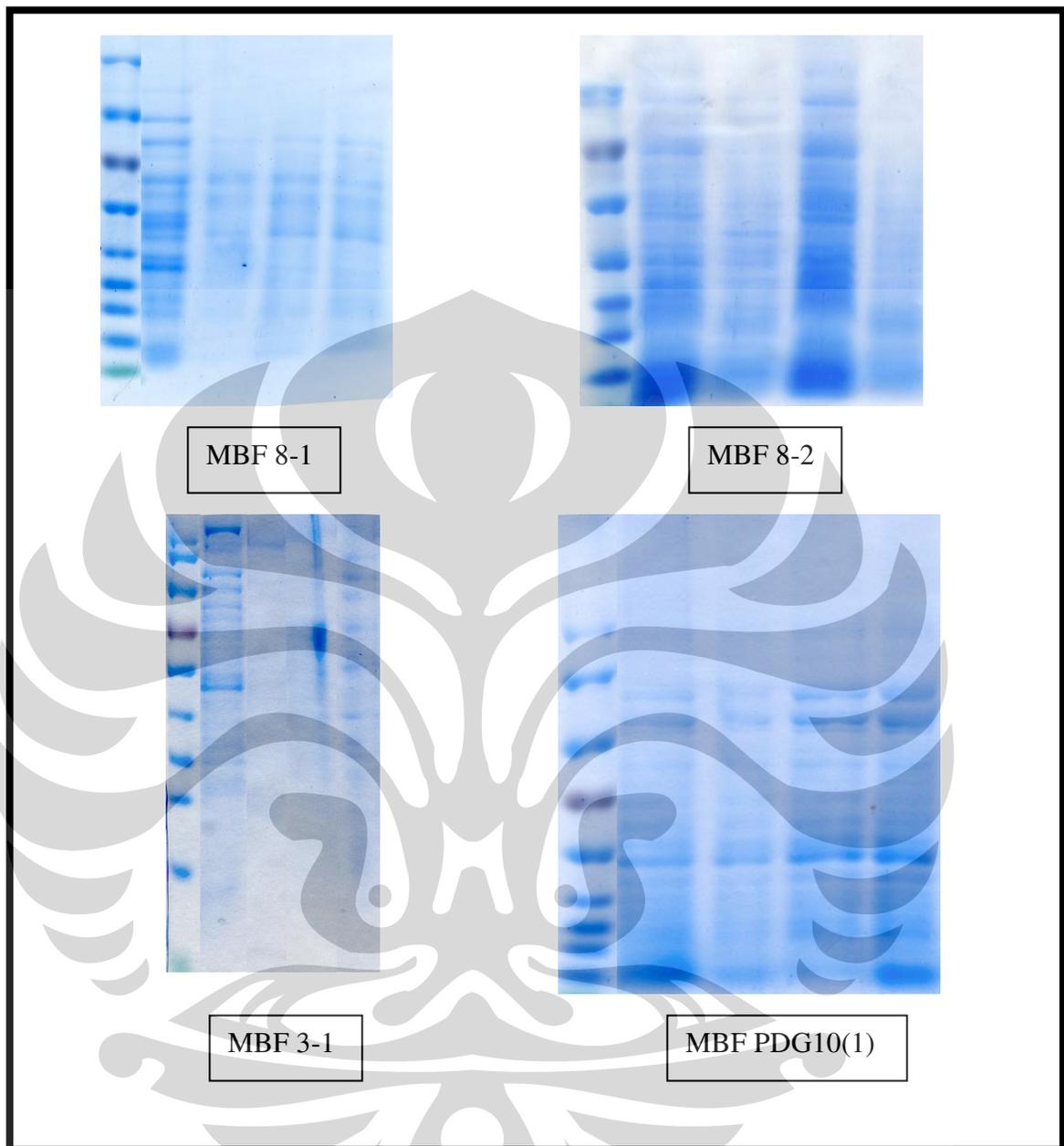




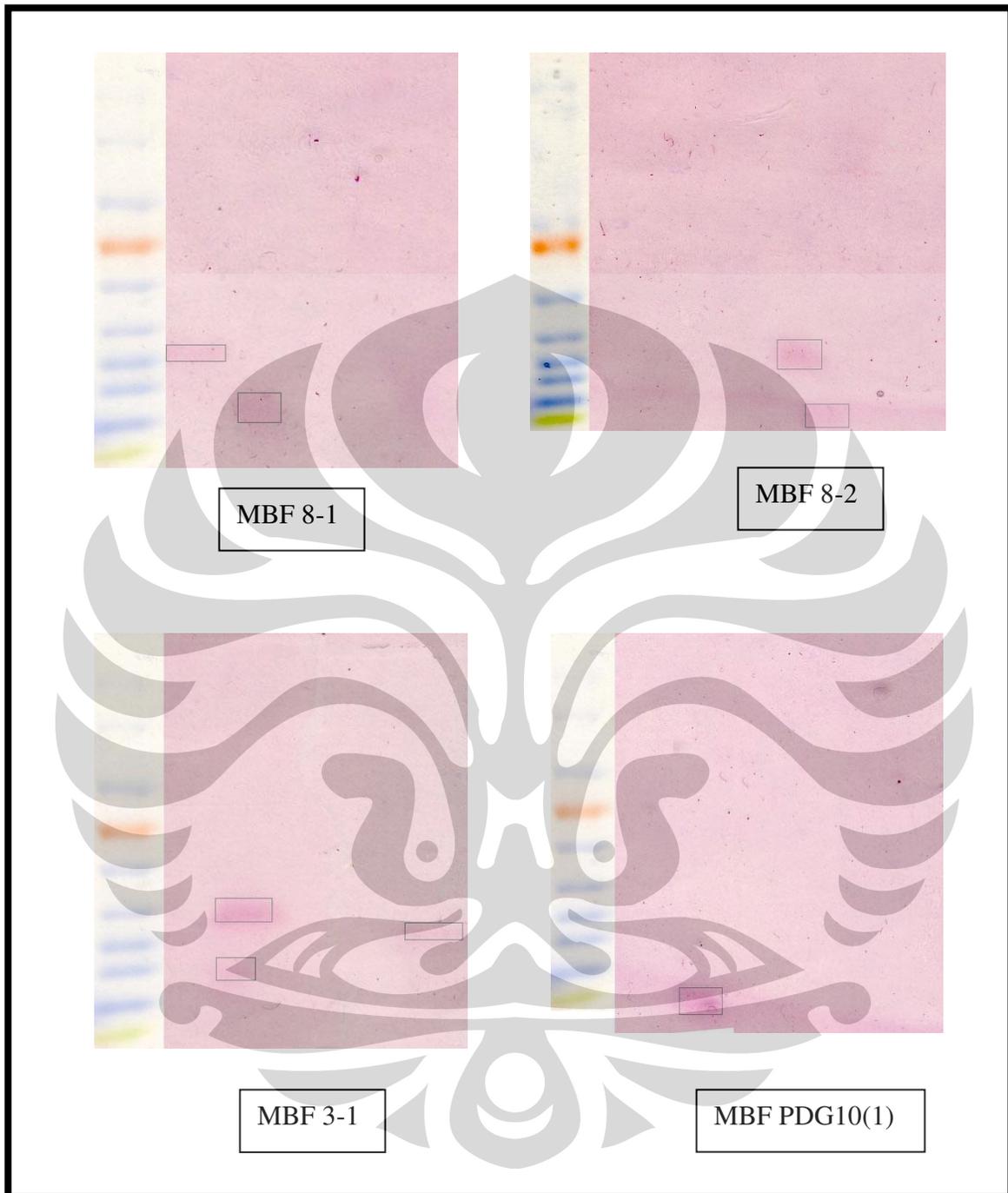
Gambar 1. Hasil purifikasi beberapa isolat pada medium agar MRS. 1. MBF 8-1; 2. MBF 8-2; 3. MBF 3-1; 4. MBF PDG10(1)



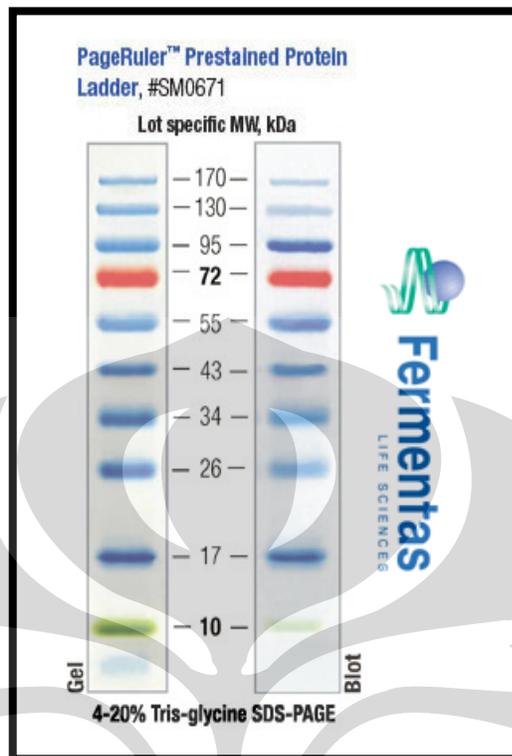
Gambar 2. Elektroforesis sampel berupa supernatan dengan *staining* Coomassie Blue pada gel elektroforesis tris-glisin 5%



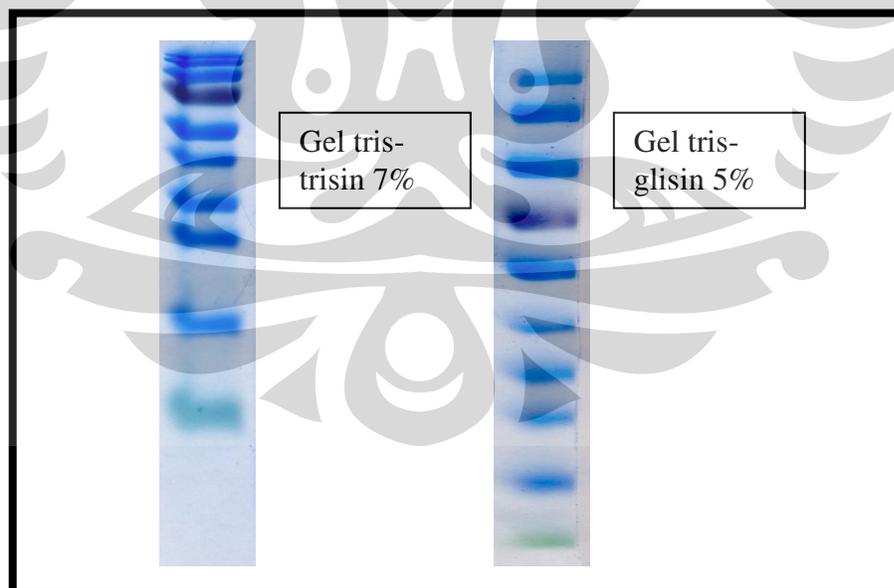
Gambar 3. Elektroforesis sampel berupa pelet sel dengan *staining* Coomassie Blue pada gel elektroforesis tris-glisin 5%



Gambar 4. Aktivitas enzim sukrase dengan substrat sukrosa pada sampel berupa pelet sel dengan *staining* Schiff asam periodat pada gel elektroforesis tris-glisin 5%



Gambar 5. Penanda protein yang digunakan pada elektroforesis [Fermentas]



Gambar 6. Perbandingan kemampuan gel formulasi tris-trisin 7% dengan formulasi tris-glisin 5% dalam memisahkan penanda protein



Gambar 7. Inkubator  
[Orbital Shaker Incubator]



Gambar 8. *Deep freezer -70°C*  
[New Brunswick Scientific U101 Innova]



Gambar 9. Mikrosentrifuse dengan pendingin  
[Sorvall Fresco]



Gambar 10. Dri-Bath  
[Barnstead Thermolyne]



Gambar 11. Vortex Mixer  
[Maxi Mix]



Gambar 12. Spektrofotometer GeneQuant  
[GE Healthcare]



Gambar 13. Alat SDS PAGE dan *power supply*  
[ATTO AE-6530 dan GE Healthcare]



Tabel 1

Data kultur-kultur BAL yang digunakan dalam penelitian

No	Kultur	Identitas	Sukrase Positif	gff positif	fff positif
1	MBF 8-1	<i>Weisella confusa</i>	+	+	-
2	MBF 8-2	<i>Weisella confusa</i>	+	+	+
3	MBF 3-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	-
4	MBF PDG10(1)	<i>Weisella confusa</i>	+	+	-

Tabel 2

Nilai OD kultur inokulum yang diukur pada panjang gelombang 600 nm dan volume inokulasi kultur inokulum

No	Kultur	OD (x1000 sel/ml)	Volume Inokulasi ( $\mu$ l)
1	MBF 8-1	134	89,5
2	MBF 8-2	96	125
3	MBF 3-1	176	68,2
4	MBF PDG10(1)	60	200

Tabel 3

Pengukuran serapan Bovine Serum Albumin sebagai kurva kalibrasi yang diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan pereaksi Bradford

Konsentrasi (mg/ml)	Serapan (A)
0,2	0,050
0,4	0,121
0,6	0,171
0,8	0,178
1,0	0,293
1,4	0,354

Dari hasil pengukuran serapan tersebut, diperoleh nilai:

$$a = 8,914 \times 10^{-3}$$

$$b = 0,253$$

$$r = 0,9799$$

Persamaan kalibrasi yang diperoleh adalah:

$$y = 8,914 \times 10^{-3} + 0,253x$$

Tabel 4

Konsentrasi enzim dalam sampel pelet sel yang diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan pereaksi Bradford

Kultur	A	Kons (mg/ml)	Faktor pengenceran	Kons stlh dikali faktor pengenceran (mg/ml)
8-1 (MRS)	0,271	1,0359	100x	103,59
8-1 (MRS-S)	0,177	0,6644	100x	66,44
8-1 (MRS-R)	0,045	0,1426	50x	7,13
8-1 (MRS-R+G)	0,155	0,5774	100x	57,74
8-2 (MRS)	0,233	0,8857	100x	88,57
8-2 (MRS-S)	0,359*	2,7675	100x	276,75
8-2 (MRS-R)	0,210	0,7948	50x	39,74
8-2 (MRS-R+G)	0,336	1,2928	100x	129,28
3-1 (MRS)	0,200	0,7553	100x	75,53
3-1 (MRS-S)	0,344	1,3245	100x	132,45
3-1 (MRS-R)	0,216	0,8185	50x	40,925
3-1 (MRS-R+G)	0,213	0,8066	100x	80,66
PDG10(1) (MRS)	0,332	1,3748	100x	137,48
PDG10(1) (MRS-S)	0,439*	3,3998	100x	339,98
PDG10(1) (MRS-R)	0,112	0,4075	50x	20,375
PDG10(1) (MRS-R+G)	0,203	0,7671	100x	76,71

\* hasil pembacaan pertama kali di atas 0,8 sehingga diencerkan setengahnya kemudian diukur ulang.

Tabel 5

Hasil analisis aktivitas sukrase pada gel elektroforesis

<b>Galur</b>	<b>Medium</b>	<b>Jumlah</b>	<b>Ukuran</b>
<b>MBF 8-1</b>	MRS	1	34 - 43 kDa
	MRS-s5%	1	17 - 26 kDa
	MRS-r5%	-	-
	MRS-r5%+g1%	-	-
<b>MBF 8-2</b>	MRS	-	-
	MRS-s5%	-	-
	MRS-r5%	2	34 - 43 kDa 10 - 17 kDa
	MRS-r5%+g1%	-	-
<b>MBF 3-1</b>	MRS	-	-
	MRS-s5%	2	43 kDa 17 - 26 kDa
	MRS-r5%	-	-
	MRS-r5%+g1%	1	34 kDa
<b>MBF PDG10(1)</b>	MRS	-	-
	MRS-s5%	1	10 kDa
	MRS-r5%	-	-
	MRS-r5%+g1%	-	-

Tabel 6

Perbandingan hasil pengamatan penelitian yang dilakukan dengan data hasil penelitian sebelumnya

No	Nama Isolat	Aktivitas Sukrase pada Gel Elektroforesis				Hasil penelitian sebelumnya		
		MRS	MRS-s5%	MRS-r5%	MRS-r5%+g1%	Hasil PCR untuk gen sukrase (gtf/ftf) (4,7,37)	Hasil analisis HPLC lendir EPS (41)	Hasil aktivitas fruktansukrase pada medium rafinosa (9,46)
1	MBF 8-1	1	1	-	-	gtf	Glukan dan fruktan	Ada
2	MBF 8-2	-	-	2	-	gtf/ftf	Glukan dan fruktan	Ada
3	MBF 3-1	-	2	-	1	gtf	Glukan dan fruktan	Ada
4	MBF PDG10(1)	-	1	-	-	gtf	-	Ada

Keterangan:

- : tidak ada aktivitas enzim yang teramati
- 1 : satu aktivitas enzim teramati
- 2 : dua aktivitas enzim teramati



# LAMPIRAN

Lampiran 1  
 Certificate of Analysis PageRuler™ prestained protein ladder  
 [Fermentas, USA]



**CERTIFICATE OF ANALYSIS**  
**PageRuler™**  
**Prestained Protein Ladder**

**#SM0671** 2 x 250 µl  
 (for 100 mini gel applications 5 µl per well or 50 large gel applications 10 µl per well)

**Lot:**                      **Expiry Date:**

**Storage:** stable at 4°C for up to 3 months.  
 For long term storage, store at -20°C.

**Description**  
 PageRuler™ Prestained Protein Ladder is a mixture of 10 recombinant, highly purified colored proteins with apparent molecular weights of 10 kDa to 170 kDa. Ladder proteins are covalently coupled with a blue dye except for two reference bands prestained with different colors. The 72 kDa reference band is orange and 10 kDa reference band is green.  
 The ladder is supplied in gel loading buffer and is ready-to-use; no heating, further dilution or addition of a reducing agent is required.

**Contents**  
 Approximately 0.1-0.2 mg/ml of each protein in the storage buffer (62.5 mM Tris-H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.5 at 25°C), 1 mM EDTA, 2% (w/v) SDS, 10 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, and 33% (v/v) glycerol).

**Applications**

- Monitoring of protein separation during SDS-PAGE (1).
- Verifying Western transfer efficiency (2, 3).
- Approximate sizing of proteins on SDS-polyacrylamide gels and Western blots.

SM067\_57\_9.doc  www.fermentas.com

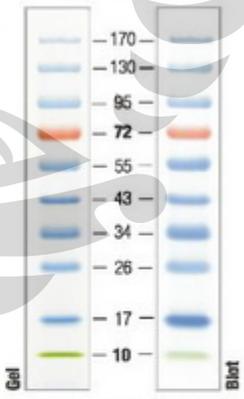
**Instruction for Use**

- 1 Thaw the ladder at room temperature for a few minutes to dissolve precipitated solids. **DO NOT BOIL!**
- 2 Mix gently, but thoroughly, to ensure the solution is homogeneous.
- 3 Load the following volumes of the ladder on an SDS-polyacrylamide gel:
  - 5 µl per well for mini gel,
  - 10 µl per well for large gel.
 Use the same volumes for Western blotting.
- 4 After the run is complete, stain the gel or perform Western transfer procedure as desired.

**Note**

- Each lot of the PageRuler™ Prestained Protein Ladder is calibrated against a precisely sized, PageRuler™ Unstained Protein Ladder and calculated apparent molecular weights are reported in the picture.
- For precise molecular weight determinations use PageRuler™ Unstained Protein Ladder, #SM0661, see [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com).
- In 8 or 10% gels low molecular weight proteins may migrate with the dye front.
- Loading volumes are intended for use in gels with a thickness of 0.75 mm. For thicker gels, the recommended loading volume should be increased.
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder could be used in Western blotting with all common membranes: PVDF, nylon and nitrocellulose.
- Longer transfer times or higher transfer voltages may be required for Western blotting of large (>100 kDa) proteins.

**Lot specific MW, kDa**



**4-20% Tris-glycine SDS-PAGE**

*continued on back page*

## Lampiran 1 (lanjutan)

### Certificate of Analysis PageRuler™ *prestained protein ladder* [Fermentas, USA]

#### QUALITY CONTROL

5 µl of PageRuler™ Prestained Protein Ladder resolves 10 bands of equal intensities in 4-20% SDS-PAGE (Tris-glycine buffer) and after Western blotting onto PVDF membrane.

#### Quality authorized by:

 Jurgita Zilinskiene

#### References

1. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685, 1970.
2. Burnette, W.N., "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein A, *Anal. Biochem.*, 112 (2), 195-203, 1981.
3. Towbin, H., et al., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354, 1979.

This product is manufactured under the license for **Strep-tag**® technology covered by US patents Nos. 5,506,121, 6,103,493 and foreign counterparts.

#### Related Products

- DualColor™ Protein Loading Buffer Pack #R1011
- Loading Buffer Pack #R0891
- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder #SM1841
- PageRuler™ Unstained #SM0661
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder #SM1811
- PageSilver™ Silver Staining Kit #K0681
- PageBlue™ Protein Staining Solution #R0571
- 10X Tris-glycine-SDS Buffer #B46
- 10X Tris-tricine-SDS Buffer #B48
- DTT #R0861
- ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent #K0301
- ProteoJET™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit #K0311
- Bradford Reagent, ready-to-use #R1271
- Bovine Serum Albumin Standard Set, ready-to-use #R1281
- Bovine Gamma Globulin Standard Set, ready-to-use #R1291

#### PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals.

Please refer to [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com) for Material Safety Data Sheet of the product.

## Lampiran 2

### Skema alur kerja pada penelitian

