



UNIVERSITAS INDONESIA

**EKSPRESI DAN KARAKTERISASI PROTEIN REKOMBINAN
FRUKTANSUKRASE ASAL *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) DI
Escherichia coli DENGAN SDS-PAGE**

SKRIPSI

**NANDA ASYURA RIZKYANI
0606070876**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**EKSPRESI DAN KARAKTERISASI PROTEIN REKOMBINAN
FRUKTANSUKRASE ASAL *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) DI
Escherichia coli DENGAN SDS-PAGE**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**NANDA ASYURA RIZKYANI
0606070876**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Nanda Asyura Rizkyani

NPM : 0606070876

Tanda Tangan : 

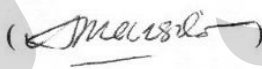
Tanggal : 9 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN


Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Nanda Asyura Rizkyani
NPM : 0606070876
Program Studi : S1 Farmasi Reguler
Judul Skripsi : Ekspresi dan Karakterisasi Protein Rekombinan
Fruktansukrase Asal *Weissella confusa* MBFCNC-2(1)
di *Escherichia coli* dengan SDS-PAGE

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Amarila Malik, MSi ()

Pembimbing II : Dr. Maksum Radji, M. Biomed ()

Penguji I : Drs. Umar Mansur, M. Sc ()

Penguji II : Drs. Hayun, MS ()

Penguji III : Dr. Nelly D. Leswara ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 9 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan rezeki-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, M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah banyak memberikan bantuan dan kesempatan berupa dukungan dana, bimbingan, nasehat, ilmu, dukungan dan motivasi selama penelitian berlangsung dan penyusunan skripsi.
2. Bapak Dr. Maksum Radji, M. Biomed, 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. Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Universitas Indonesia dan Dikrektorat Pendidikan Tinggi Depdiknas RI melalui dana “Hibah Kompetitif Penelitian Strategis Nasional DIKTI (DIPA UI) Tahun Anggaran 2009” untuk ibu Dr. Amarila Malik.
5. Profesor Naotake Ogasawara dan Dr. Shu Ishikawa sebagai mitra kerjasama internasional Ibu Dr. Amarila Malik dari Division of Bioinformatics and Genomics, Graduate School of Biological Science, NAIST, Nara, Jepang yang telah banyak memberikan bantuan berupa diskusi dan saran-saran yang sangat berguna serta dukungan pengadaan bahan-bahan penelitian.
6. Bapak Dr. Hasan Rachmat, Apt, dan Ibu Dr. Katrin, MS, beliau telah memberikan nasehat selama penulis menempuh pendidikan di Farmasi FMIPA UI.

7. Papa, mama, dan kakak-kakak yang selalu memberikan dukungan dan bantuan baik secara moril maupun materiil.
8. 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.
9. Ekos dan Dewi 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.
10. Ibu Ina, ibu Cucu, ibu Ema, dan ibu Ati yang telah memberikan bantuan bahan dan dukungan selama penulis menjalankan penelitian.
11. Teman-teman Farmasi angkatan 2006.
12. 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

2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nanda Asyura Rizkyani
NPM : 0606070876
Program Studi : S1 Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Ekspresi dan Karakterisasi Protein Rekombinan Fruktansukrase Asal *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) di *Escherichia coli* dengan SDS-PAGE

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 9 Juli 2010

Yang menyatakan



(Nanda Asyura Rizkyani)

vii

ABSTRAK

Nama : Nanda Asyura Rizkyani
Program Studi : S1 Farmasi
Judul : Ekspresi dan karakterisasi protein rekombinan fruktansukrase asal *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) di *Escherichia coli* dengan SDS-PAGE

Fruktosiltransferase (FTFase) atau fruktansukrase merupakan enzim ekstraseluler yang digunakan oleh bakteri asam laktat (BAL) untuk mensintesis produk eksopolisakarida (EPS) fruktan dari substrat sukrosa. Manfaat dari produk ini tidak hanya diaplikasikan dalam industri makanan, tetapi juga dalam industri farmasi, kesehatan dan kosmetik. Dalam studi sebelumnya, FTF rekombinan dari *Escherichia coli* telah dikonstruksi. Kemudian *Escherichia coli* rekombinan yang telah membawa gen *ftf* dipelajari ekspresinya untuk memperoleh protein fruktansukrase rekombinan dan mengetahui aktivitas fruktansukrase rekombinan dengan menggunakan teknik SDS-PAGE serta esei aktivitas enzim secara *in situ* pada studi ini. *Escherichia coli* rekombinan ditumbuhkan dan diinduksi dengan IPTG untuk menghasilkan protein FTF. Setelah sel dipecah, filtrat pelet sel dipekatkan dengan konsentrator untuk selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi kolom afinitas Ni^{2+} . Langkah ini dilakukan untuk mengisolasi FTF rekombinan yang bergabung dengan tag *Histidin* agar berikatan secara efisien terhadap Ni^{2+} . Dengan demikian, hanya FTF rekombinan dalam fraksi terakhir akan dielusikan oleh buffer imidazol, dan fraksi ini digunakan untuk melakukan analisis lebih lanjut, yaitu SDS PAGE. Dengan menggunakan SDS PAGE, berat molekul protein diperkirakan 130 kDa, sedangkan untuk aktivitasnya, dilakukan protokol *in situ* dengan menggunakan PAS *staining*. Aktivitas FTF dapat diamati pada gel yang di-*staining* PAS setelah gel diinkubasi dengan rafinosa sebagai substrat, tetapi tidak dapat diamati pada substrat sukrosa.

Kata Kunci : fruktansukrase, *Escherichia coli* rekombinan, SDS PAGE, PAS *staining*

xv+84 halaman ; 27 gambar; 6 tabel; 5 lampiran

Daftar Acuan : 58 (1976-2010)

ABSTRACT

Name : Nanda Asyura Rizkyani
Program Study : S1 Farmasi
Title : Expression and characterizatin of recombinant protein fructansucrase from *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) in *Escherichia coli* by SDS-PAGE

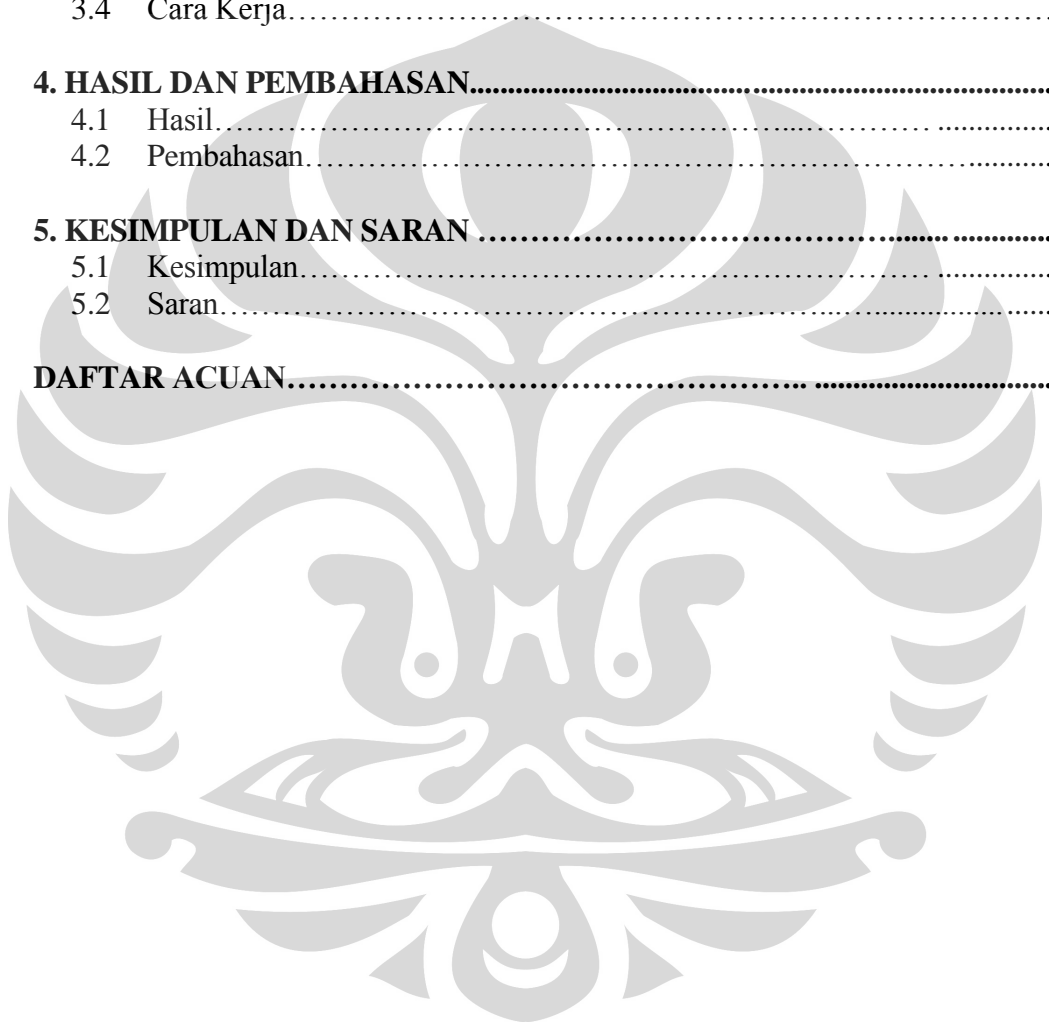
Fructocyltransferase (FTFase) or fructansucrase an extracellular enzyme that is used by lactic acid bacteria (LAB) to synthesize exopolysacharide products (EPS) fructan from the substrate sucrose. The benefits of this product is applied in various pharmaceutical industries, such as food, health and cosmetics. In previous study, the FTF recombinant *E. coli* has been constructed, and here, in this study the expression and the characterization of recombinant FTF was studied. Recombinant *Escherichia coli* carrying the gene encoding the inulosucrase type fructansucrase was growth and induced with IPTG to produce the FTF protein. After disrupted the cell, the filtrate was applied to a concentrator and was subsequently proceed for Ni²⁺ column purification. This step was performed in order to isolate the recombinant FTF which has been fused with a Histidyl tag that can bind efficienlty with Ni²⁺. Therefore, only recombinant FTF will be in the last fraction eluted by imidazole buffer, and this fraction was used for further analysis performing SDS PAGE. By using SDS PAGE, the protein molecular weight was estimated as 130 kDa, whereas for its activity, the in situ protocol was carried out by using PAS staining. FTF activities can be observed on PAS stained gel after incubation with raffinose as substrate, but cannot with sucrose.

Key Words : fructansucrase, recombinant *Escherichia coli*, SDS PAGE, PAS staining
xv+84 pages ; 27 figures; 6 tables; 5 appendix
Bibliography : 58 (1976-2010)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Bakteri Asam Laktat (BAL).....	4
2.2 Eksopolisakarida (EPS).....	5
2.3 Enzim Fruktansukrase/Fruktosiltransferase (FS/FTFase).....	7
2.4 Kloning Gen	8
2.5 Protein Rekombinan	10
2.6 Pemurnian Kultur Sel	12
2.7 Elektroforesis Gel Poliakrilamid.....	14
2.8 Aktivitas Enzim	16
2.9 Reaksi <i>Schiff</i> Asam Periodat	19
2.10 Penentuan Konsentrasi Protein.....	20
3. METODE PENELITIAN	22
3.1 Lokasi Penelitian.....	22
3.2 Bahan.....	22
3.2.1 Sampel.....	22
3.2.2 Bahan Kimia.....	22
3.2.3 Medium dan Pembuatan Medium.....	23
3.2.3.1 Medium.....	23
3.2.3.2 Pembuatan Medium.....	23
3.2.3.2.1 Medium Agar LB.....	23
3.2.3.2.2 Medium Cair LB.....	24
3.2.4 Pembuatan Larutan Dapar dan Pereaksi	24
3.2.4.1 4x Tris-HCl/SDS pH 8,8.....	24
3.2.4.2 4x Tris-HCl/SDS pH 6,8.....	24
3.2.4.3 30% Larutan Akrilamid dan Bisakrilamid (29:1).....	25
3.2.4.4 10% Amonium Persulfat.....	25

3.2.4.5	Buffer Katoda.....	25
3.2.4.6	Buffer Anoda.....	25
3.2.4.7	Buffer Fosfat pH 6,4.....	25
3.2.4.8	Buffer Sukrosa.....	26
3.2.4.9	Buffer Rafinosa.....	26
3.2.4.10	12,5% Trikloro asetat (TCA).....	26
3.2.4.11	Larutan 1% Asam Periodat dalam 3% Asam Asetat... ..	26
3.2.4.12	<i>Schiff Fuchsin Sulfite</i>	27
3.2.4.13	0,5% Natriummetabisulfit.....	27
3.3	Alat.....	27
3.4	Cara Kerja.....	28
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
4.1	Hasil.....	36
4.2	Pembahasan.....	38
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	49
5.1	Kesimpulan.....	49
5.2	Saran.....	49
	DAFTAR ACUAN.....	50



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1	Konsep sintesis enzimatik untuk oligosakarida menggunakan analog sukrosa sebagai substrat dan jalur fruktansukrase dan glukansukrase..... 58
2.2	Mekanisme pemurnian dengan teknik kromatografi kolom affinitas..... 58
3.1	Lemari Pendingin -20°C [GEA]..... 59
3.2	Inkubator [<i>Orbital Shaker Incubator</i>]..... 59
3.3	Sentrifugator [<i>Tomy centrifugator</i> MX-305]..... 60
3.4	<i>Dry Bath</i> [Barnstead Thermolyne]..... 60
3.5	Spektrofotometer GeneQuant [GE Healthcare]..... 61
3.6	Alat SDS PAGE dan <i>power supply</i> [Biometra dan GE Healthcare]..... 61
3.7	<i>Vortex Mixer</i> [Maxi Mix]..... 62
3.8	<i>Deep freezer</i> -80°C [New Brunswick Scientific U101 Innova]..... 62
3.9	Mikrosentrifuse dengan pendingin [Sorvall Fresco]..... 63
3.10	Alat liofilisasi [SCANVAC]..... 63
3.11	<i>Nanodrop spectrophotometry</i> [THERMOSCIENTIFIC]..... 64
3.12	Pemanas dengan <i>magnetic stirrer</i> [Torrey Pines Scientific]..... 64
3.13	<i>Cell disrupters</i> [BRONSON SONIFIER]..... 65
3.14	Tahapan pemurnian ekstrak enzim kasar..... 65
4.1	Galur-galur <i>E. coli</i> rekombinan TOP10 <i>fff</i> CNC-2(1) dan <i>E. coli</i> rekombinan BL21 Star TM <i>fff</i> CNC-2(1) pada medium LB agar yang mengandung 5 µg/ml tetrasiklin..... 66
4.2	<i>E. coli</i> TOP10 kontrol pada medium LB agar yang tidak mengandung tetrasiklin..... 67
4.3	<i>E. coli</i> TOP10 kontrol pada medium LB agar yang mengandung 5 µg/ml tetrasiklin..... 68
4.4	Galur-galur (1) <i>E. coli</i> rekombinan TOP10 <i>fff</i> CNC-2(1) dan (2) <i>E. coli</i> rekombinan BL21 Star TM <i>fff</i> CNC-2(1) pada medium LB cair yang mengandung 5 µg/ml tetrasiklin..... 68
4.5	Hasil elektroforesis sampel supernatan, filtrat pelet sel dan pelet sel yang diinduksi selama 3 dan 5 jam..... 68
4.6	Kurva kalibrasi standar Bovine Serum Albumin (BSA) pada panjang gelombang 595 nm..... 70
4.7	Hasil elektroforesis sampel <i>E. coli</i> rekombinan TOP10 <i>fff</i> CNC-2(1) dan <i>E. coli</i> rekombinan BL21 Star TM <i>fff</i> CNC-2(1)..... 71
4.8	Penanda protein yang digunakan untuk elektroforesis

	[FERMENTAS].....	71
4.9	Hasil <i>staining</i> Schiff Asam Periodat sampel <i>E. coli</i> rekombinan TOP10 <i>ftf</i> CNC-2(1) dan <i>E. coli</i> rekombinan BL21 Star TM <i>ftf</i> CNC-2(1) pada substrat sukrosa.....	72
4.10	Hasil <i>staining</i> Schiff Asam Periodat sampel <i>E. coli</i> rekombinan TOP10 <i>ftf</i> CNC-2(1) dan <i>E. coli</i> rekombinan BL21 Star TM <i>ftf</i> CNC-2(1) pada substrat rafinosa.....	72
4.11	Perbandingan kemampuan gel pemisah formulasi 5% dengan formulasi 10% dalam memisahkan penanda protein.....	73



DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
4.1	Galur-galur <i>E. coli</i> rekombinan <i>fff</i> CNC-2(1).....	75
4.2	Hasil pengukuran OD ₆₀₀ galur-galur <i>E. coli</i> rekombinan TOP10 dan BL21 Star TM <i>fff</i> CNC-2(1) untuk pembuatan <i>frozen stock</i> dan induksi 3 dan 5 jam.....	75
4.3	Hasil pengukuran OD ₆₀₀ galur-galur <i>E. coli</i> rekombinan TOP10 dan BL21 Star TM <i>fff</i> CNC-2(1) untuk induksi 3 dan 5 jam.....	75
4.4	Pengukuran serapan Bovine Serum Albumin sebagai kurva kalibrasi yang diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan pereaksi Bradford.....	76
4.5	Hasil pengukuran sampel yang diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan pereaksi Bradford.....	76
4.6	Data komposisi larutan standar Bovine Serum Albumin.....	77



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Riwayat Konstruksi Gen Rekombinan.....	79
2	Spesifikasi Sel Kompeten <i>E. coli</i> TOP10.....	80
3	Spesifikasi Sel Kompeten <i>E. coli</i> BL21 Star TM	81
4	<i>Certificate of Analysis PageRulerTM prestained protein ladder</i> [Fermentas, USA].....	82
4 (lanjutan)	<i>Certificate of Analysis PageRulerTM prestained protein ladder</i> [Fermentas, USA].....	83
5	Skema Alur Kerja Penelitian.....	84



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan penghasil eksopolisakarida (EPS), baik yang diekskresikan dalam medium pertumbuhan maupun yang melekat pada dinding sel bakteri sehingga membentuk EPS kapsuler. Faktor manfaat atau kegunaan telah lama menjadi perhatian dalam produksi EPS dari bakteri asam laktat (BAL), terutama karena BAL merupakan organisme *food grade* yang memiliki status GRAS (*generally regarded as safe*) dan dikenal sebagai bahan penghasil beragam eksopolisakarida. BAL memiliki kontribusi terhadap berbagai industri yaitu sebagai pemberi pengaruh pada tekstur susu fermentasi, *viscosifying*, menstabilkan, pengemulsi, *gelling*, atau agen-mengikat air dalam berbagai produk makanan, tetapi juga untuk aplikasi baru di farmasi, kesehatan, dan kosmetik. Salah satu contohnya adalah dekstran dan inulin yang secara luas telah diaplikasikan dalam industri sebagai stabilisator protein terapeutik/peptida selama pengeringan dan penyimpanan selanjutnya (Malik, A., Radji, M., Kralj, S., dan Dijkhuizen, L., 2009; Ozimek, L. K., Kralj, S., Van der Maarel, M. J., dan Dijkhuizen, L., 2006; Van den Berg, D., et al., 1995).

Biopolimer inulin telah banyak diteliti dan dilaporkan disintesis dari berbagai sumber, baik tumbuhan maupun mikroorganisme. Sintesis inulin dan EPS fruktan lainnya oleh mikroorganisme merupakan peran dari enzim fruktansukrase (fruktosiltransferase/FTFase). Pemanfaatan inulin dan FOS (frukto-oligosakarida) untuk industri bidang pangan, seperti sebagai *dietary supplement*, maupun di bidang farmasi, seperti bahan penstabilan obat-obat biotek protein/peptida sudah banyak diminati. Inulin dilaporkan sebagai penstabil protein dan peptida yang baik selama proses pengeringan dan penyimpanan (Hinrichs, W. L. J., Prinsen, M. G., dan Frijlink, H. W., 2001).

Inulin dengan bobot molekul tinggi diketahui merupakan protektan yang baik untuk protein berdasarkan karakteristik fisikokimiawi. Potensi produk inulin dengan bobot molekul tinggi telah dilaporkan dari mikroorganisme. Kebutuhan akan biopolimer tipe inulin yang mempunyai kriteria yang unggul diupayakan dengan cara memproduksi biopolimer yang *tailor-made*, baik dengan memodifikasi medium pertumbuhan dengan berbagai substrat, maupun dengan rekayasa genetika gen penyandi enzim sukrase tersebut (Zuccaro, A., Gotze, S., Kneip, S., Dersch, P., dan Seibel, J., 2008).

Dari penelitian sebelumnya telah berhasil diklon gen *fff* tipe inulosukrase berukuran lengkap ke dalam inang *E. coli* yang diisolasi dari bakteri asam laktat galur lokal *Weissella confusa* MBFCNC-2(1). *E. coli* rekombinan pembawa gen *fff* tipe inulosukrase tersebut akan dipelajari ekspresinya, dan karakterisasi terhadap protein rekombinan tersebut akan dianalisis pada SDS PAGE.

Bakteri *Escherichia coli* tipe TOP10 dan BL21 yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai karakterisasi sebagai sel kompeten yang menguntungkan karena mudah tumbuh dan tahan dalam penyimpanan. Umumnya, bakteri ini terlibat dalam transformasi DNA plasmid untuk memperbanyak jumlah plasmid. *Gene of interest* yang telah disisipkan ke dalam plasmid juga ikut diperbanyak (Amersham Biosciences A.B., 2000). Dalam memproduksi protein rekombinan tidaklah mudah karena diperlukan kemampuan dalam teknik isolasi, pemurnian, dan ekspresi untuk memperoleh target protein yang diinginkan (Amersham Biosciences A.B., 2000). Ekspresi dari protein rekombinan fruktansukrase dapat dikarakterisasi dengan melakukan metode elektroforesis menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Setelah protein rekombinan FTFase tersebut terekspresi, aktivitas FTFase dapat dianalisis dengan menggunakan *Periodic Acid Schiff* (PAS) *staining*. Pembentukan eksopolisakarida dapat diamati sebagai aktivitas enzim fruktansukrase.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengekspresikan *E. coli* rekombinan yang sudah membawa gen *fff*.
2. Memperoleh protein fruktansukrase rekombinan.
3. Mengetahui aktivitas fruktansukrase rekombinan dengan menggunakan teknik SDS-PAGE dan esei aktivitas enzim secara *in situ*.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri berbentuk batang atau kokus yang menghasilkan asam laktat sebagai hasil dari fermentasi karbohidrat. Umumnya, bakteri asam laktat adalah bakteri gram positif yang tidak membentuk spora dan dapat tumbuh baik dalam suasana ada maupun tidak ada oksigen (*aerotolerant anaerobes*) (Eggers, N., n.d.).

BAL digunakan dalam berbagai industri. Salah satunya dalam industri makanan, pH rendah yang dihasilkan BAL dapat menghambat perkembangan mikroorganisme lain dalam makanan sehingga bermanfaat untuk mengawetkan makanan dan memperpanjang *shelf-life*. Tingkat kebutuhan oksigen yang rendah selama fermentasi juga faktor penghambat untuk patogen makanan yang potensial (Kenneth T. P., 2008; The Gale Group Inc., 2003).

Secara ekonomi, BAL menguntungkan untuk menghasilkan produk makanan fermentasi, seperti yoghurt (*Streptococcus spp.* dan *Lactobacillus spp.*), keju (*Lactococcus spp.*) dan sosis. Kontribusinya pada rasa dan tekstur makanan terfermentasi (Malik A., et al., 2010).

Metabolisme BAL bersifat kemotropik, yaitu melakukan keseluruhan metabolisme dari oksidasi komponen kimia. Oksidasi gula-gula terdiri dari jalur-jalur untuk menghasilkan energi (Eggers, N., n.d.). Ada dua jenis metabolisme fermentasi dari BAL, yaitu homolaktat (homofermentatif) dan heterolaktat (heterofermentatif) (Eggers, N., n.d.; Kenneth T. P., 2008).

Fermentasi homolaktat terjadi di bawah kondisi banyak glukosa dan oksigen terbatas. BAL homolaktat mengkatabolisasi satu mol dari glukosa pada *Embden-Meyerhof pathway* untuk menghasilkan dua mol piruvat. Keseimbangan redoks intraseluler dipertahankan melalui oksidasi dari NADH, bersamaan dengan

reduksi piruvat menjadi asam laktat. Proses ini memiliki dua mol ATP per glukosa yang dikonsumsi. Contoh BAL yang melakukan metabolisme ini antara lain spesies *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, dan *Pediococcus* (Eggers, N., n.d.; Kenneth T. P., 2008).

BAL heterofermentatif terdiri dari spesies *Leuconostocs*, beberapa *Lactobacilli*, *Oenococci* dan *Weissella*. Proses metabolisme ini menggunakan *phosphoketolase pathway* (*pentose phosphate pathway*) untuk mendisimilasi gula-gula. Satu mol dari glukosa-6-fosfat didehidrogenasi menjadi 6-fosfoglukonat, kemudian didekarboksilasi menjadi satu mol CO₂. Pentosa-5-fosfat yang dihasilkan, terpecah menjadi satu mol gliseraldehid fosfat (GAP) dan satu mol asetil fosfat. Selanjutnya, GAP dimetabolisme menjadi laktat sebagaimana pada homofermentasi, sedang asetil fosfat menjadi etanol (Eggers, N., n.d.; Kenneth T. P., 2008).

2.2 Eksopolisakarida (EPS)

Polimer polisakarida diproduksi dan diekskresi dari mikroorganisme dikenal sebagai eksopolisakarida (EPS). Aplikasi EPS dalam berbagai industri, seperti industri farmasi, kesehatan dan pangan telah lama dilaporkan. EPS bermanfaat sebagai stabilisator, pengental, emulgator, pembentuk gel dan memiliki kemampuan mengikat air yang baik sehingga dapat mempertahankan tekstur agar tetap lembut selama penyimpanan (Malik, A., Radji, M., Kralj, S., dan Dijkhuizen, L., 2009; Kusmiati, F. R., 2006).

Salah satu aplikasi yang berpotensi dari produk polimer EPS, yakni beta-glukan. Polimer ini diisolasi dari *Agrobacterium* sp, dilaporkan dapat menyembuhkan luka terbuka pada hewan coba dalam bentuk sediaan krim (Kusmiati, F. R., 2006). Hasil tersebut menunjang informasi yang sudah banyak dilaporkan bahwa beta-glukan berpotensi untuk ditambahkan ke dalam sediaan kosmetik krim untuk kulit karena mempunyai aktivitas *anti-aging*, peremajaan kulit dan penyembuhan luka bakar, serta aktivitas imunomodulator karena interaksinya dengan reseptor pada sel makrofag pada kulit sehingga menginduksi sistem imun sel pada kulit secara non spesifik (Malik, A., Radji, M., Kralj, S., dan

Dijkhuizen, L., 2009; Malik, A., Ariestanti, D. M., Nurfachtiyani, A., dan Yanuar, A., 2007).

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 (Van Geel-Schutten, G. H., et al., 2000).

Homopolisakarida dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu β -fruktan dan α -D-glukan. Contoh dari homopolisakarida golongan β -fruktan adalah levan dan inulin. Levan, yang utamanya tersusun atas residu fruktosa yang terikat dengan ikatan β -(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 β -(2 \rightarrow 1), disintesis oleh spesies *Streptococcus*, *Leuconostoc citreum* CW28 dan oleh suatu inulosukrase dari *Lactobacillus reutri* 121 (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 1976).

Inulin dan FOS (frukto-oligosakarida) banyak dimanfaatkan untuk industri bidang pangan, seperti sebagai *dietary supplement*, maupun di bidang farmasi, seperti bahan penstabilan obat-obat biotek protein/peptida sudah banyak diminati. Inulin dilaporkan sebagai penstabil protein dan peptida yang baik selama proses pengeringan dan penyimpanan (Hinrichs, W. L. J., Prinsen, M. G., dan Frijlink, H. W., 2001). Biopolimer tipe inulin yang memiliki bobot molekul tinggi dan derajat polimerisasi (DP>7 pada inulin) telah dilaporkan dari mikroorganisme (Anwar, M., et al., 2010). Adanya peningkatan DP akan meningkatkan kemampuannya sebagai protektan protein. (Zuccaro, A., Gotze, S., Kneip, S., Dersch, P., dan Seibel, J., 2008).

Adapun contoh dari homopolisakarida golongan α -D-glukan adalah reuteran, dekstran, mutan, alternan dan polimer glukan yang mengandung sejumlah besar ikatan α -(1 \rightarrow 2) (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 1976). Manfaat dari dekstran telah banyak diteliti di bidang farmasi sebagai salah satu matriks pada sistem penghantaran obat baru berbentuk konjugat, sebagai anti *platelet*, antifibrin, dan *plasma volume expansion* pada kondisi hipovolemia, serta digunakan pada transplantasi *microvascular* dan *microsurgery* sebagai pelindung pembuluh darah dan meningkatkan sirkulasi mikro di dalam pembuluh darah (Malik, A., Ariestanti, D. M., Nurfachtiyani, A., dan Yanuar, A., 2007).

Produksi homopolisakarida dari galur BAL lain seperti Bifidobacterium, Carnobacterium, Oenococcus, Pediococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, dan Weissella belum dipelajari secara intensif, namun telah dilaporkan bahwa galur MBF 8-1 yang diidentifikasi sebagai *Weissella confusa* memiliki satu gen fruktansukrase dan dua gen glukansukrase (Van Geel-Schutten G. H., et al., 1999; Malik, A., Radji, M., Kralj, S., dan Dijkhuizen, L., 2009).

2.3 Enzim Fruktansukrase/Fruktosiltransferase (FS/FTFase)

Fruktansukrase (FTFase) adalah enzim yang dihasilkan dari fruktooligosakarida (FOS). FTFase hanya memiliki aktivitas transfruktosilasi yang berperan pada sukrosa dengan memotong ikatan β -1,2 dan mentransfer kelompok fruktosil menjadi suatu molekul akseptor seperti sukrosa dan FOS yang membebaskan glukosa (Maiorano, A. E, Piccoli, R. M, da Silva, E. S, dan de Andrade Rodrigues, M. F., 2008).

FTFase mengkatalisasi proses transfer residu fruktosil dari sukrosa dan raffinosa menjadi berbagai akseptor substrat. Enzim ini diketahui mengkatalisis dua reaksi berbeda, yaitu transglukosilasi, menggunakan perkembangan rantai fruktan (polimerisasi) atau sukrosa, gluko- dan fruktosakarida (sintesis oligosakarida), sebagai akseptor substrat dan hidrolisis sukrosa, ketika air yang digunakan sebagai akseptor (Ozimek, L. K, Kralj, S., Van der Maarel, M. J., dan Dijkhuizen, L., 2006).

Fruktansukrase bakterial merupakan enzim ekstraseluler yang memotong ikatan glikosidik dari substrat sukrosa (dan pada beberapa kasus juga dari raffinosa) dan menggunakan energi yang dilepaskan untuk menggabungkan satu unit fruktosa ke rantai fruktan yang berkembang (levan atau inulin), proses ini disebut transfruktosilasi. Selanjutnya, menggabungkan ke sukrosa, ke air (tahap ini adalah hidrolisis), atau ke akseptor lain seperti raffinosa (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2006). Skema sintesis fruktansukrase ini dapat dilihat pada Gambar 2.1.

Berat molekular dari fruktan yang dihasilkan menunjukkan adanya variasi, yaitu dari 2×10^4 – 50×10^6 Da. Beberapa laporan menyatakan adanya pengaruh dari kondisi saat inkubasi dan pertumbuhan seperti temperatur, salinitas dan konsentrasi sukrosa yang digunakan (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2006).

Levansukrase dan inulosukrase secara kolektif disebut sebagai fruktansukrase (FS) atau fruktosiltransferase, yang mempolimerisasi separuh fruktosa dari substrat sukrosa menjadi fruktan yang memiliki struktur levan atau inulin dengan ikatan β -(2 \rightarrow 6) dan β -(2 \rightarrow 1) secara berturut-turut. Levansukrase adalah polimer fruktan yang tersusun dari unit fruktan (levan) ikatan β -(2 \rightarrow 6). Inulosukrase menghasilkan polimer fruktan β -(2 \rightarrow 1) (inulin) (Maiorano, A. E, Piccoli, R. M, da Silva, E. S, dan de Andrade Rodrigues, M. F., 2008; Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2006). Inulosukrase secara eksklusif dihasilkan dari BAL, sedangkan enzim levansukrase terdistribusi luas baik pada kelompok bakteri gram positif maupun gram negatif (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2006).

2.4 Kloning Gen

Kloning (pengklonan) adalah perbanyakan salinan dari DNA yang telah direkayasa. Perbanyakan suatu gen hasil klon atau gen yang spesifik, disertai peningkatan tajam produksi produk proteinnya, memudahkan ekstraksi dan pemurnian protein tersebut di dalam laboratorium (William D. Stansfield, J. S., 2006).

Tujuan dari pengklonan adalah mengisolasi gen atau segmen DNA yang diinginkan dari suatu organisme dan mengintroduksinya ke dalam sel inang yang

sesuai sehingga diperoleh gen atau fragmen DNA yang diinginkan dalam jumlah banyak (William D. Stansfield, J. S., 2006).

Teknik pengklonan yang umum, yaitu suatu plasmid (vektor) yang sesuai dipilih untuk menjadi penerima sisipan gen yang diinginkan (DNA donor). Lalu, DNA donor dan vektor akan dipotong dengan enzim restriksi yang sama dan kemudian diinkubasi bersama dengan ligase untuk fragmen-fragmen DNA donor dengan plasmid. Hasilnya adalah plasmid rekombinan yang mengandung fragmen DNA yang diinginkan. Plasmid rekombinan tersebut kemudian digunakan untuk mentransformasi sebuah sel inang bakteri, sehingga dihasilkan sebuah galur genetik baru dari bakteri tersebut yang dapat menjaga plasmid rekombinan agar stabil (William D. Stansfield, J. S., 2006).

Transformasi bakteri berdasarkan observasi dari Mandel dan Higa pada tahun 1970 menunjukkan bahwa bakteri diberikan perlakuan dengan memberikan larutan CaCl_2 yang ekstrim dingin kemudian secara singkat dipanaskan, dapat ditransfeksikan dengan DNA lambda bakteriofage. Metode dasar ini telah dikembangkan oleh para ilmuwan dengan berbagai variasi.

Sel kompeten yang digunakan pada transformasi sel dapat diperoleh dengan membelinya secara komersil dalam kondisi beku atau menyiapkan persediaan bakteri kompeten yang segar. Galur *E. coli* yang dapat menjadi salah satu sel kompeten mempunyai beberapa tipe di antaranya, DH1, DH5, dan MM294.

Adapun tiga faktor yang perlu diperhatikan untuk memperoleh hasil transformasi dengan frekuensi tinggi, yaitu kemurnian dari reagen yang digunakan dalam buffer, kondisi pertumbuhan sel dan kebersihan peralatan yang digunakan saat transformasi (Amersham Biosciences A. B., 2000)

Plasmid rekombinan yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasmid *ftfNS*. Kemudian sel kompeten yang digunakan berasal dari galur *E. coli* tipe TOP10 dan BL21.

2.5 Protein rekombinan

Protein rekombinan merupakan protein yang disandikan oleh DNA rekombinan. Istilah DNA rekombinan berarti dua segmen DNA dalam plasmid. Plasmid biasanya terjadi pada bakteri. Bila DNA rekombinan dimasukkan ke bakteri, bakteri ini akan menghasilkan protein berdasarkan DNA rekombinan. Protein ini disebut protein rekombinan (Recombinant-antibody, n.d.).

Protein adalah rantai asam amino, dikode oleh DNA. Gen yang kode untuk protein tersebut dimasukkan ke dalam vektor khusus, atau unit DNA. Vektor yang dipilih yang akan menghasilkan sejumlah besar protein yang diinginkan. Hal ini dikenal sebagai *overexpression* yang sering dilakukan dalam sel inang khusus. Kadang-kadang *host* adalah bakteri atau ragi (George, H., 2003).

Sejumlah besar kit tersedia secara komersial untuk memfasilitasi baik kloning gen maupun produksi protein rekombinan berikutnya. Kit ini mempunyai vektor khusus yang disebut vektor ekspresi yang memiliki promotor khusus untuk menghasilkan sejumlah besar protein. Promotor adalah bagian DNA yang mendorong produksi dari urutan gen yang mengikutinya. Seringkali, vektor ekspresi ini dapat dimatikan dan diinduksi. Terutama dengan tuan rumah bakteri, menghasilkan terlalu banyak protein sekaligus dapat menjadi racun, menghambat pertumbuhan bakteri (George, H., 2003).

Ada beberapa cara berbeda untuk menginduksi ekspresi. Di antaranya, senyawa yang ditambahkan untuk induksi atau suhu yang diatur sesuai dengan kondisi pertumbuhan bakteri saat diinduksi. Dalam memfasilitasi pemurnian protein dari bakteri, kloning ini sering dilakukan agar ada *tag* pada protein yang akan mengikat matriks. *Tag* ini akan memisahkan protein dari sisa-sisa sel. Sebagai contoh, *tag histidin* pada molekul protein akan mengikat kolom nikel. Setelah protein terikat, *tag* dipotong dan meninggalkan protein murni yang kemudian dapat dialirkan dari kolom. Bila menggunakan metode tradisional, diperlukan waktu hingga bertahun-tahun untuk memurnikan protein (George, H., 2003).

Sebelum isolasi atau pemurnian, sampel harus bersih dan bebas dari partikel sehingga perlu dilakukan adanya ekstraksi. Prosedur ekstraksi harus dipilih

menurut sumber protein, seperti bakteri, tanaman atau mamalia, intraseluler atau ekstraseluler. Pilihan suatu teknik ekstraksi sebanyak tergantung pada peralatan yang tersedia dan skala operasi seperti pada jenis sampel (Amersham Biosciences A. B., 2000).

Seleksi dan kombinasi teknik pemurnian dipengaruhi oleh empat faktor, yaitu kapasitas, kecepatan, pemulihan, dan resolusi. Kapasitas yang dimaksud dalam hal ini adalah jumlah protein target yang akan dimuat selama pemurnian. Dalam beberapa kasus, jumlah sampel yang dapat diambil mungkin akan terbatas pada volume (seperti dalam filtrasi gel) atau dengan jumlah besar kontaminan bukan oleh jumlah protein target. Kecepatan adalah yang paling penting pada awal pemurnian dimana kontaminan seperti protease harus dihilangkan secepat mungkin. Pemulihan menjadi semakin penting sebagai hasil pemurnian karena meningkatkan nilai produk dimurnikan. Pemulihan dipengaruhi oleh proses destruktif dalam sampel dan kondisi yang tidak menguntungkan pada kolom. Resolusi dicapai oleh selektivitas teknik dan kemampuan kromatografi matriks untuk menghasilkan puncak yang sempit. Secara umum, resolusi yang paling sulit dicapai pada tahap akhir dari pemurnian saat kotoran dan protein target cenderung memiliki sangat sifat serupa (Amersham Biosciences A. B., 2000).

Sebuah keuntungan yang signifikan ketika bekerja dengan produk rekombinan adalah bahwa cukup tersedianya informasi tentang produk dan kontaminan. Dengan informasi ini, Strategi Tiga Tahap Pemurnian (*Capture, Intermediate Purification, Polishing*) dapat diterapkan. Strategi ini digunakan baik dalam industri farmasi dan dalam penelitian laboratorium untuk memastikan pengembangan metode terjadi lebih cepat dan memakan waktu yang lebih singkat untuk produk murni dan baik secara ekonomi. Tahap *Capture* ditujukan untuk mengisolasi, mengkonsentrasikan dan menstabilkan produk target. Produk harus terkonsentrasi dan dipindahkan ke lingkungan yang akan menstabilkan potensi yang dimilikinya. Selama fase pemurnian (*Intermediate Purification*), tujuannya adalah untuk menghapus sebagian besar kontaminan, seperti protein dan asam nukleat lainnya, endotoksin dan virus. Pada tahap *Polishing*, sebagian besar kontaminan telah dibuang. Tujuannya adalah untuk mencapai kemurnian akhir dengan membuang kontaminan (Amersham Biosciences A. B., 2000).

Universitas Indonesia

Banyak metode ekspresi dan pemurnian protein FTF yang pernah dibahas dalam penelitian. Salah satunya dalam penelitian Lubbert Dijkhuizen dkk, dijelaskan ekspresi protein dalam kultur yang diendapkan semalam (dalam 600 ml LB medium, yang ditumbuhkan pada 37°C) dari *E. coli* BL21 (DE3 star) yang disisipkan pETInuGA-R, pETInuGA-RM, pETInuGB-R dan pETLevG diinduksi dengan 0,1 mM IPTG selama 1 jam 200 r.p.m. Sel dipanen dengan sentrifugasi pada 3.500 g untuk 15 menit dan protein FTF itu dimurnikan untuk homogenitas oleh Ni-NTA seperti yang dijelaskan oleh Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002 (Anwar, M., et al., 2010)

Kandungan protein sel diperkirakan terdiri dari ribuan jenis protein dengan berbagai ekspresi. Teknologi yang saat ini sedang digunakan melibatkan pengambilan komponen protein, fraksinasi campuran ini sangat kompleks, enzimatik proteolisis masing-masing spesies terpisah dan terisolasi, dan pencocokan data struktural yang dihasilkan dengan database protein yang dikenal. Prosedur ini melibatkan langkah awal menggunakan 1- atau 2-dimensi elektroforesis (DE). Metode paling disarankan dalam pemisahan campuran protein yang lebih kompleks adalah 2-DE. Pada dimensi pertama, fokus pemisahan protein didasarkan muatan pada titik isoelektrik, sedangkan dalam dimensi kedua, pemisahan terjadi akibat perbedaan massa molekul ketika diaplikasikan ke dalam sistem elektroforesis gel natrium dodesil sulfat-poliakrilamid (SDS-PAGE) yang memberikan efisiensi pemisahan tinggi (Molecular Station, n.d.).

2.6 Pemurnian Kultur Sel

Kultur sel bakteri merupakan bahan awal untuk melakukan pemurnian protein. Pemurnian ini ditujukan untuk mengisolasi target protein yang dihasilkan dari *gene of interest*. Prinsip pemurnian yang digunakan berasal dari kromatografi afinitas Ni. Pemisahan protein pada kromatografi afinitas ini didasarkan pada interaksi reversibel antara protein (grup protein) dan ligan spesifik yang bergandengan ke dalam suatu matriks kromatografi. Teknik ini mempunyai selektivitas, resolusi dan kapasitas untuk *protein of interest* yang tinggi (Amersham Biosciences A. B., 2002).

Secara teori, kromatografi afinitas Ni menggunakan kemampuan *His* untuk berikatan dengan nikel. Enam asam amino histidin pada ujung protein (terminal N atau C) diketahui sebagai 6x *His tag*. Nikel diikat ke dalam suatu butiran agarosa dengan khelasi menggunakan butiran asam nitrotriasetat (NTA). Beberapa perusahaan saat ini memproduksi butiran-butiran tersebut sebagai protein *His tag* secara komersil. Ni^{2+} adalah ion logam yang biasa digunakan untuk pemurnian protein *His tag* dan menggunakan imidazol sebagai larutan pengelusi (Provost, J., 2004; Amersham Biosciences A. B., 2002). Mekanisme dari pemurnian ini dapat dilihat pada Gambar 2.2.

Imidazol pada konsentrasi rendah biasa digunakan sebagai buffer pengikat dan pencuci untuk meminimalisir pengikatan dari protein sel inang yang tidak diinginkan. Beberapa alasan yang sama ditujukan dalam keterlibatan imidazol dalam sampel (umumnya, konsentrasi imidazol yang digunakan sebagai buffer pengikat dan pencuci sama). Pada konsentrasi yang lebih tinggi, imidazol dapat menurunkan pengikatan protein *His tag*. Sebaiknya, konsentrasi imidazol dioptimasi terlebih dahulu untuk meyakinkan hasil kemurnian yang tinggi dari protein *His tag* (Amersham Biosciences A. B., 2005).

Metode yang umum digunakan adalah menyerap sejumlah protein ke dalam kolom dengan mencampur butiran-butiran dengan sampel kemudian menuangkan butiran NTA dan protein ke dalam kolom, di mana konsentrasi fosfat dan imidazol yang kecil digunakan untuk memindahkan protein yang terikat dengan afinitas rendah. Bila perlu, konsentrasi imidazol dapat ditingkatkan menjadi 20 mM sebelum protein *His tag* dielusi. Tahap terakhir, konsentrasi imidazol yang lebih tinggi digunakan untuk mengelusi protein dari butiran-butiran NTA (Amersham Biosciences A. B., 2005).

Beberapa faktor penting untuk mempertimbangkan kromatografi afinitas Ni yang digunakan (Amersham Biosciences A. B., 2002):

- Dalam preparasi resin, butiran-butiran NTA-agarosa sangat mahal sehingga perlu diusahakan untuk dapat disimpan dan digunakan kembali selama butiran masih berwarna biru muda yang berarti nikel masih terikat pada butiran.

- Dalam preparasi kolom dan sampel, teknik persiapan sampel harus dapat menghilangkan komponen yang berikatan atau berinteraksi antara molekul target dan ligan sehingga mengganggu pemurnian. Selain itu, tekanan pada kolom cukup memungkinkan untuk menarik gravitasi buffer dan sampel melalui kolom.
- Dalam pemilihan buffer, buffer yang akan digunakan perlu memperhatikan pH dan komposisi dari bahan-bahan penyusunnya, seperti penggunaan imidazol.
- Elusidasi dapat dilakukan dengan konsentrasi imidazol dan garam yang telah diatur sedemikian rupa sehingga mencapai pemurnian yang optimal.
- Regenerasi kolom dengan pencucian menggunakan pelarut khusus.

2.7 Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Elektroforesis digunakan untuk: (1) memisahkan suatu campuran protein yang kompleks, (2) menyelidiki komposisi subunit dan (3) memverifikasi homogenitas dari suatu sampel. Metode ini juga dapat digunakan untuk memurnikan protein yang akan diaplikasikan lebih jauh lagi. Kombinasi ukuran pori gel dan muatan protein, ukuran gel dan bentuk gel menentukan kecepatan migrasi dari protein (Department of Biology, Davidson College., n.d.).

Protein di dalam larutan membawa suatu muatan elektrik tertentu pada semua nilai pH kecuali pada titik isoelektriknya sehingga protein dapat 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 *single cell*.

Oleh karena itu, utamanya gel digunakan untuk tujuan analisis (Rybicki, E., dan Purves, M., n.d.; Molecular Station, 2008).

Natrium Dodesil Sulfat-Elektroforesis gel poliakrilamid atau *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) adalah suatu teknik yang digunakan secara luas dalam biokimia, biologi genetik dan molekuler, serta forensik 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-merkaptotanol 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 (Rybicki, E., dan Purves, M., n.d.; Wink, M., 2006)

Dibandingkan dengan elektroforesis gel standar, SDS-PAGE memiliki kelebihan sebagai berikut (Rybicki, E., dan Purves, M., n.d.; Wink, M., 2006):

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 cara mengamati pita-pita protein yang terbentuk adalah dengan mewarnai hasil elektroforesis menggunakan Coomassie *Brilliant Blue*. Pewarna yang termasuk dalam zat warna anionik ini 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

Universitas Indonesia

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 (Lebendiker, M., 2002).

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 (Department of Biology, Davidson College., n.d.; Geno Technology Inc., USA, 2008).

2.8 Aktivitas Enzim

Enzim merupakan katalisator yang sangat efisien dan selektif. Dalam 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 (Murray R. K, Granner, D., Mayes, P. A., dan Rodwell, V., W., 2000).

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 (Murray R. K, Granner, D., Mayes, P. A., dan Rodwell, V., W., 2000).

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, yaitu:

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 konfirmasi yang stabil serta memiliki kemampuan katalisis umumnya akan bergantung pada suhu sel tempat enzim tersebut terdapat dan sedikit melebihi suhu sel tersebut.

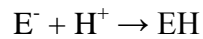
2. pH

Saat 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

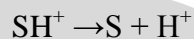
pH normal, enzim bermuatan negatif akan berikatan dengan substrat bermuatan positif:



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.

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 (Murray R. K, Granner, D., Mayes, P. A., dan Rodwell, V., W., 2000).

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 mengaktifasi 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 (Murray R. K, Granner, D., Mayes, P. A., dan Rodwell, V., W., 2000).

2.9 Reaksi Schiff Asam Periodat

Reaksi Schiff asam periodat atau *Periodic Acid Schiff* (PAS) terdiri dari dua macam pereaksi yaitu pereaksi Schiff dan asam periodat. 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 (StainsFile, n.d.).

Asam periodat merupakan 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 bereaksi dengan pereaksi Schiff. Pereaksi ini 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 (StainsFile, n.d.). Pembentukan EPS ditunjukkan dengan warna merah yang muncul dan diamati sebagai hasil dari aktivitas fruktansukrase (Anwar, M., et al., 2010).

2.10 Penentuan Konsentrasi Protein

Metode yang digunakan adalah metode *Bradford protein assay*. Esei ini didasarkan pada hasil pengamatan serapan maksimum untuk larutan Coomassie *Brilliant Blue G-250* dari panjang gelombang 465-595 nm saat pewarna Coomassie *Brilliant Blue G-250* mengikat protein (MSUM Biochemistry, 2006).

Reagen Bradford dibuat dengan cara melarutkan 100 mg Coomassie *Brilliant Blue G-250* dalam 50 ml 95% ethanol dan ditambahkan 100 ml 85% (b/v) phosphoric acid. Larutan dicukupkan hingga 1 liter ketika pewarna telah larut sempurna dan disaring melalui kertas Whatman #1 sebelum digunakan (Lebendiker, M., 2002).

Adapun standar protein yang digunakan adalah Bovine Serum Albumin (BSA). Larutan induk (stok) standard protein biasanya dibuat dalam konsentrasi 1-5 mg/mL atau lebih. Ketika larutan stok dibuat, larutan tidak dikocok, karena akan berakibat denaturasi protein yang akan teramati sebagai buih di permukaan larutan. Untuk membantu pelarutan protein, cukup diaduk perlahan. Simpan larutan stok ini bila belum digunakan dalam *freezer* atau lebih baik pada suhu -20°C (Tekin, S. D., 2004).

Tahap pengukuran konsentrasi protein dengan metode Bradford (Caras, n.d.), yaitu.

1. Sebelum digunakan alat spektrofotometer dinyalakan dan dikondisikan.
2. Sampel diencerkan dengan estimasi, sekitar 5 dan 100 µg protein dalam satu tabung uji mengandung 100 µl sampel.
3. Bila perlu, ditambahkan sejumlah volume 1 M NaOH ke dalam setiap sampel dan di-vortex. Ditambahkan pula NaOH ke dalam standar bila pada sampel juga ditambahkan.
4. Standar yang mengandung protein dengan rentang 5-100 µg dipersiapkan dalam 100 µl volume.
5. Ditambahkan 5 ml reagen dan diinkubasi selama 5 menit.
6. Serapan diukur pada panjang gelombang 595 nm.

Analisis konsentrasi protein dilakukan dengan cara membandingkan kurva standar dari serapan dengan mikrogram protein dan ditentukan jumlahnya dari

Universitas Indonesia

kurva. Konsentrasi sampel ditentukan dari jumlah protein volume/sampel dan faktor pengencerannya.



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

3.2 Bahan

3.2.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah galur-galur *E. coli* rekombinan (*E. coli* TOP10 dan BL21) pembawa gen *ftf* asal galur *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) milik Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi FMIPA UI yang tercantum pada Tabel 1.

3.2.2 Bahan Kimia

IPTG (Isopropil- β -D-tiogalaktopiranosid) [Wako, Jepang], tris base [Amersham Biosciences, Hongkong], natrium dodesil sulfat (SDS) [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], trisin [SIGMA, USA], gliserol [Merck, Jerman], *protein loading buffer pack* [Fermentas, USA], PageRulerTM *prestained protein ladder* [Fermentas, USA], larutan Coomassie Brilliant Blue G-250 [Fermentas, USA], trikloro asetat [Merck, Jerman], asam periodat [Wako, Jepang], 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], sukrosa [Pronadisa, Spanyol], rafinosa [Waco, Jepang], dikalium hidrogen fosfat [Merck, Jerman], isopropanol [Aldrich, Jerman], aquadest, aquabidest [Otsuka Indonesia, Indonesia].

3.2.3 Medium dan Pembuatan Medium

3.2.3.1 Medium

Medium yang digunakan adalah medium LB (*Luria Bertani*) yang terdiri atas bahan-bahan berikut: *yeast extract* [Difco, USA], bakto pepton [Difco, USA], natrium klorida [Difco, USA]. Pada medium LB agar terdapat agar bakto [Difco, USA]. Tetrasiklin [SIGMA, USA] ditambahkan baik pada medium LB agar maupun cair (Sezonov, G., et al., 2007; Studier, F., 2005).

3.2.3.2 Pembuatan Medium

Medium yang digunakan adalah medium agar LB dan medium cair.

3.2.3.2.1 Medium Agar LB

Sabnyak 9,72 g LB agar dan dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan aquadest secukupnya dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Larutan medium ini diatur pH-nya dengan pH-meter hingga pH $7,5 \pm 0,2$ dengan menggunakan larutan NaOH 1 N. Setelah itu, volume dicukupkan hingga 250 ml. Lalu, medium ini diautoklaf masing-masing 15 menit.

Apabila medium akan digunakan, *Laminar Air Flow* (LAF) disiapkan. Larutan medium yang masih panas didinginkan hingga suhunya mencapai 55° - 60° C dan tambahkan antibiotik tetrasiklin ke dalam medium sebanyak 250 μ l (konsentrasi tetrasiklin: 5 μ g/ml medium). Medium tersebut dituang secara aseptis ke cawan

petri. Setelah membeku cawan petri dibalik dan disimpan (Sezonov, G., et al., 2007).

3.2.3.2.2 Medium Cair LB

Sebanyak 9,72 g LB ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan aquadest secukupnya dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Larutan medium ini diatur pH-nya dengan pH-meter hingga pH $7,5 \pm 0,2$ dengan menggunakan larutan NaOH 1 N. Setelah itu, volume dicukupkan hingga 250 ml. Medium tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 ml. Lalu, medium ini diautoklaf masing-masing 15 menit.

Apabila medium akan digunakan, *Laminar Air Flow* (LAF) disiapkan. Larutan medium yang masih panas didinginkan hingga suhunya mencapai 55° - 60° C dan tambahkan antibiotik tetrasiklin ke dalam medium sebanyak 250 μ l (konsentrasi tetrasiklin: 5 μ g/ml medium). Medium tersebut dapat langsung digunakan atau disimpan dalam lemari pendingin (Anwar, M., et al., 2010).

3.2.4 Pembuatan Larutan Dapar dan Pereaksi

3.2.4.1 4x Tris-HCl/SDS pH 8,8 (Lebendiker, M., 2002)

Sebanyak 9,1 g tris base dilarutkan dalam 30 ml aquadest steril. Atur pH dengan asam klorida 1 N. Tambahkan aquadest steril hingga 50 ml. Lalu, tambahkan 200 mg SDS. Aduk hingga homogen.

3.2.4.2 4x Tris-HCl/SDS pH 6,8 (Lebendiker, M., 2002)

Sebanyak 1,21 g tris base dilarutkan dalam 8 ml aquadest steril. Atur pH dengan asam klorida 1 N. Tambahkan aquadest steril hingga 20 ml. Lalu, tambahkan 80 mg SDS. Aduk hingga homogen.

3.2.4.3 30% larutan akrilamid dan bisakrilamid (29:1) (Lebendiker, M., 2002)

Sebanyak 30 g serbuk campuran akrilamid dan bisakrilamid (29:1) dilarutkan dalam 24 ml aquadest steril. Volume akhir yang diperoleh adalah 75 ml.

3.2.4.4 10% Amonium Persulfat (Lebendiker, M., 2002)

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

3.2.4.5 Buffer Katoda (Lebendiker, M., 2002)

Sebanyak 6,05 g tris base dan 8,96 g trisin ditimbang dan dilarutkan dalam 500 ml aquadest steril. Tambahkan 0,5 g SDS (natrium dodesil sulfat). Aduk hingga homogen. Larutan disimpan dalam lemari pendingin.

3.2.4.6 Buffer Anoda (Lebendiker, M., 2002)

Sebanyak 12,11 g tris base ditimbang dan dilarutkan dalam 200 ml aquadest steril. Atur pH hingga 8,9 dengan asam klorida 1 N. Cukupkan dengan aquadest steril hingga 500 ml. Aduk hingga homogen. Larutan disimpan dalam lemari pendingin.

3.2.4.7 Buffer Fosfat pH 6,4 (Farmakope Indonesia Edisi IV, 1995, p. 1144)

Sebanyak 50 ml kalium fosfat monobasa 0,2 M dicampur dengan 12,60 ml natrium hidroksida 0,2 N. Kemudian diencerkan dengan aquadest hingga 200 ml.

3.2.4.8 Buffer Sukrosa (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002)

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.

3.2.4.9 Buffer Rafinosa (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002)

Sebanyak 4,1 g natrium asetat, 0,21 g kalsium klorida dan 50 g rafinosa 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.

3.2.4.10 12,5% Trikloro asetat (TCA) (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002)

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.

3.2.4.11 Larutan 1% Asam periodat dalam 3% Asam asetat (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002)

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*.

3.2.4.12 Schiff Fuchsin Sulfit (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002; Farmakope Indonesia Edisi IV, 1995, p. 1175)

Sebanyak 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%. Tambahkan aquadest steril hingga 50 ml. Sebelum digunakan, harus didiamkan selama satu malam dalam tempat yang gelap.

3.2.4.13 0,5% Natriummetabisulfit (Farmakope Indonesia Edisi IV, 1995, p. 1181)

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

3.3 Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah mikrosentrifuse [Sorvall Fresco, Jerman], mikropipet [Gilson, Perancis], inkubator [Orbital Shaker Incubator], alat konsentrator Millipore [AMICON, USA], 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* -80°C [New Brunswick Scientific U101 Innova, Inggris], *freezer* -20°C [GEA, Korea], oven pengering [LAB-Line, USA], oven penyimpan [WTB Binder, Jerman], alat SDS-PAGE [BIOMETRA, USA], *cell disrupters* [BRONSON SONIFIER, USA], *high speed refrigerated centrifugator* [Tomy centrifugator MX-305, Jepang] spektrofotometer GeneQuant™ 100 [GE Healthcare, Swedia], *electrophoresis power supply* EPS 301 [GE Healthcare, Swedia], digital scanner [CanonScan 4400F, USA], *nanodrop spectrophotometry* [THERMOSCIENTIFIC, USA], alat liofilisasi [SCANVAC, Jerman] dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

3.4 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, inokulasi kultur cair, penginduksian dengan 1 mM IPTG, pemanenan, pemecahan kultur sel, dan pemurnian target sel. Pada tahap bioteknologi dilakukan pengukuran konsentrasi protein, elektroforesis SDS gel poliakrilamid, *staining* gel hasil elektroforesis dan analisis aktivitas fruktansukrase dengan menggunakan reaksi *Schiff* asam periodat (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002).

1. Pemiakan Galur-Galur *E. coli* Rekombinan *ftf* CNC-2(1)

Galur-galur *E. coli* rekombinan Ec1, Ec2, Ec3, Ec4, Ec5 dan Ec6 mula-mula ditumbuhkan dalam medium agar LB pada cawan petri. Semua galur bakteri rekombinan digoreskan pada medium agar LB yang mengandung tetrasiklin secara aseptis dengan menggunakan ose, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diperoleh koloni tunggal, diremajakan setiap seminggu sekali dengan cara memindahkan kembali kultur ke cawan petri yang berisi medium yang baru. Sedangkan untuk kultur stok disimpan pada gliserol 75% steril pada suhu -80°C (Anwar, M., et al., 2010; Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002).

2. Pembuatan Inokulum

Semua galur *E. coli* rekombinan yang telah diperoleh koloni tunggal diinokulasi dalam medium cair LB yang mengandung tetrasiklin. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C sambil dikocok dengan kecepatan 200 rpm menggunakan *orbital shaker incubator* selama 24 jam. Inokulum dari semua galur *E. coli* rekombinan tersebut diukur secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer turbidimetri pada panjang gelombang 600 nm untuk

memperoleh OD-nya. Setelah diperoleh OD₆₀₀, inokulum-inokulum ini digunakan pada tahap berikutnya.

3. Fermentasi, Pemanenan dan Perolehan Ekstrak Enzim Kasar

Inokulum dari semua galur *E. coli* rekombinan yang telah diukur OD₆₀₀-nya dipipet sejumlah tertentu (mengandung 1000 sel/5 ml) dan diinokulasikan masing-masing ke dalam 500 ml medium LB cair yang mengandung tetrasiklin 5 µg/ml medium. Kemudian ditumbuhkan pada suhu 30°C sambil dikocok dengan kecepatan 200 rpm menggunakan *orbital shaker incubator* hingga mencapai fase eksponensial. Inokulum-inokulum ini diukur kembali OD₆₀₀-nya. Apabila OD₆₀₀ telah mencapai rentang 0,6-0,8 maka lanjutkan pada tahap selanjutnya. Pada tahap berikutnya, inokulum-inokulum diinduksi dengan 1 mM IPTG (Isopropil-β-D-tiogalaktopiranosid) lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 dan 5 jam. Inokulum-inokulum tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit kemudian diambil pelet selnya dan diresuspensikan dalam buffer fosfat. Kemudian pelet sel dipecah dengan sonikator menggunakan penangas es, suhu 4°C (dilakukan di laboratorium Mikrobiologi FK-UI) dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan filtrat pelet sel berupa ekstrak enzim kasar (Anwar, M., et al., 2010; Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002).

4. Pemurnian Ekstrak Enzim Kasar

Ekstrak enzim kasar yang diperoleh dari tahap sebelumnya dipekatan terlebih dahulu dengan menggunakan alat konsentrator Millipore 10 dan 30 kDa. Kemudian dimurnikan dengan menggunakan kit kromatografi kolom afinitas Ni, *His Spin Trap Kit*[®] (GE Health Care). Ada empat tahap dalam prosedur pemurnian yang digunakan sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 3.14 dengan tahapan sebagai berikut: (GE Health Care, 2007).

- 1) Larutan dipindahkan ke dalam kolom dengan cara membalikkan dan mengocok kolom secara berulang untuk meresuspensikan medium. Segel yang terdapat pada bagian bawah kolom dipatahkan. Kemudian, kolom

Universitas Indonesia

ditaruh pada tube mikrosentrifugasi ukuran 2 ml dan disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 7000 g (3800 rpm), dan larutan supernatan dibuang.

- 2) Kolom diekuilibrasikan dengan menambahkan 600 μ l buffer pengikat (20 mM natrium fosfat, 500 mM NaCl, 60 mM imidazol, pH 7,4) dan disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 7000 g (3800 rpm).
- 3) Sampel diaplikasikan dengan menambahkan 600 μ l sampel dan disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 7000 g (3800 rpm).
- 4) Kolom dicuci dengan menambahkan 600 μ l buffer pengikat (20 mM natrium fosfat, 500 mM NaCl, 60 mM imidazol, pH 7,4) dan disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 7000 g (3800 rpm).
- 5) Target protein dielusikan dua kali dengan 200 μ l buffer elusi (20 mM natrium fosfat, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 7,4) dan disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 7000 g (3800 rpm). Kemudian sampel yang dimurnikan dikumpulkan.

5. Pengukuran Kuantitatif Protein dengan Spektrofotometer UV

Sampel yang akan diukur konsentrasinya adalah ekstrak enzim kasar yang telah dimurnikan. Sebelum diukur, sampel diliofilisasi untuk mendapatkan konsentrasi yang pekat. Sebanyak 8 μ l sampel dipipet dan dilarutkan dengan 2 μ l pereaksi warna Bradford. Kemudian larutan tersebut diinkubasikan pada suhu kamar selama minimal 5 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang 595 nm. Adapun standar protein yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi adalah Bovine Serum Albumin (BSA). Larutan standar protein dibuat dalam enam variasi konsentrasi yang berbeda, yaitu 31,25; 62,5; 125; 250; 500; dan 750 μ g/ml. Masing-masing konsentrasi diukur serapannya dengan menggunakan metode yang sama dan kemudian dibuat kurva kalibrasi (Caras, n.d.).

6. Elektroforesis SDS Gel Poliakrilamid

Sebelum melakukan elektroforesis, larutan-larutan dan dapar-dapar yang akan digunakan dipersiapkan terlebih dahulu untuk pembuatan gel elektroforesis maupun untuk proses elektroforesis itu sendiri.

Metode elektroforesis yang digunakan adalah *Denaturing (SDS) Discontinuous Gel Electrophoresis Laemmli Gel Method*. Formulasi gel elektroforesis terdiri atas dua bagian, yaitu gel pemisah (*separating gel*) dan gel penahan (*stacking gel*). Formulasi gel yang digunakan adalah formula gel pemisah 10%, yang terdiri atas 2 ml larutan campuran akrilamid/bisakrilamid, 1,5 ml dapar tris-Cl/SDS pH 8,8, 2,5 ml aquabidest steril, 20 µl 10% amonium persulfat dan 4 µl TEMED. Adapun formulasi gel penahan terdiri atas 0,260 ml larutan campuran akrilamid/bisakrilamid, 0,500 ml dapar tris-Cl/SDS pH 6,8, 1,22 ml aquabidest steril, 10 µl 10% amonium persulfat dan 2 µl TEMED. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam *beaker glass* dan setiap larutan diambil dengan menggunakan mikropipet (Lebendiker, M., 2002; Coligan, J. E., 1995; Department of Biology, Davidson College., n.d.).

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 (Lebendiker, M., 2002; Coligan, J. E., 1995; Department of Biology, Davidson College., n.d.).

Penyiapan sampel dilakukan dengan melarutkan sampel di dalam 1/5 volume *loading buffer* dan 1/20 volume senyawa pereduksi yang berupa 2-

merkuptoetanol. Kemudian sampel dihangatkan selama 3 menit pada suhu 95°C. Sebelum digunakan, sumuran gel dibilas dengan menggunakan buffer katoda, kemudian cetakan gel dipasangkan ke alat elektroforesis. Alat elektroforesis dipenuhi dengan buffer katoda pada bagian atas alat dan buffer anoda pada bagian bawah alat. Buffer yang dimasukkan tingginya harus melebihi sumuran gel hingga seluruh sumuran terendam oleh buffer (Lebendiker, M., 2002; Coligan, J. E., 1995; Department of Biology, Davidson College., n.d.; Firdausi, W., 2009).

Sebanyak 10 µl sampel dan 4 µl penanda protein dimuatkan ke dalam tiap-tiap sumuran. Pada gel tersebut, terdapat 24 sumuran. Urutan pemuatan pada gel tersebut dimulai dari penanda protein, sampel dari galur bakteri rekombinan *ff* CNC-2(1) (Ec1, Ec4, Ec2, Ec5, Ec3, dan Ec6), kemudian pemuatan tersebut diulang hingga dua kali dengan mengkosongkan satu sumuran sebagai tempat untuk memudahkan pemotongan gel yang akan digunakan pada tahap berikutnya. 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 10 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 150 volt dengan arus sebesar 15 amper sampai proses elektroforesis selesai. Elektroforesis terus dijalankan hingga seluruh protein yang ada di dalam penanda protein telah terpisah dengan baik (Coligan, J. E., 1995).

Selanjutnya gel yang telah selesai dielektroforesis dibagi tiga sesuai dengan pembagian sumuran kosong yang telah disiapkan saat pemuatan sampel. Bagian pertama digunakan untuk mengamati ukuran protein dan dua bagian lainnya digunakan untuk analisis aktivitas fruktansukrase.

7. *Staining* Hasil Elektroforesis SDS Gel Poliakrilamid

Bagian potongan pertama dari gel hasil elektroforesis digunakan untuk mengamati ukuran protein. Potongan gel ini direndam di dalam larutan Coomassie *Brilliant 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 *Brilliant Blue*. Setelah gel direndam, wadah yang berisi gel kemudian digoyangkan perlahan dan dibiarkan selama satu 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 (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002; Department of Biology, Davidson College., n.d.; Van Hijum, S. A. F. T., et al., 1976; Firdausi, W., 2009).

8. Analisa Aktivitas Fruktansukrase pada SDS Gel Poliakrilamid

Dua potongan gel dari hasil elektroforesis pada tahap enam digunakan untuk analisis aktivitas fruktansukrase. Satu potongan gel ini disiapkan untuk diinkubasi di dalam substrat sukrosa dan yang satunya diinkubasi di dalam rafinosa. Mula-mula masing-masing gel dicuci sebanyak tiga kali dengan aquadest steril dan diinkubasi pada suhu 37°C di dalam buffer sukrosa dan buffer rafinosa. Inkubasi gel dilakukan selama satu malam untuk keesokan harinya di-*staining* dengan Schiff asam periodat (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002; Department of Biology, Davidson College., n.d.; Van Hijum, S. A. F. T., et al., 1976; Firdausi, W., 2009).

9. *Staining* Hasil Inkubasi dengan Asam Periodat Schiff

Setelah potongan-potongan gel hasil elektroforesis pada tahap delapan diinkubasi di dalam substrat sukrosa dan rafinosa, masing-masing hasil inkubasi diberikan *staining* yang menggunakan Schiff asam periodat (PAS) untuk melihat

Universitas Indonesia

adanya pembentukan EPS. Untuk membuat bahan *staining* tersebut, diperlukan bahan-bahan seperti 12,5% TCA, larutan 1% asam periodat dalam 3% asam asetat, reagen *Schiff's* yang mengandung fuchsin-sulfit dan 0,5% natriummetabisulfit. Larutan 1% asam periodat dalam 3% asam asetat harus dibuat segar sebelum dilakukan proses *staining* (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002; StainsFile, n.d.; Firdausi, W., 2009).

Potongan-potongan gel yang telah diinkubasi sebelumnya 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, masing-masing potongan gel diinkubasi dengan larutan 1% asam periodat dalam 3% asam asetat selama 50 menit. Kemudian dicuci sebanyak 6 kali selama 10 menit dalam aquadest steril, dikocok pada temperatur kamar. Selanjutnya masing-masing potongan gel diinkubasi dalam pereaksi *Schiff's Fuchsin-sulfite* selama 50 menit, kemudian pereaksi dibuang dan masing-masing potongan gel diinkubasikan dalam 0,5% natriummetabisulfit 3 x 10 menit, kocok pada temperatur kamar. Masing-masing potongan 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 (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002; StainsFile, n.d.; Firdausi, W., 2009).

10. Pengamatan Hasil

Masing-masing potongan gel yang telah diinkubasikan di dalam substrat sukrosa dan rafinosa pada tahap delapan dan sembilan, diamati terhadap adanya aktivitas enzim dengan PAS *staining*. PAS *staining* mengandung senyawa yang akan bereaksi dengan polimer yang dihasilkan. Kemudian gel-gel hasil inkubasi tersebut dibandingkan dengan gel yang hanya di-*staining* dengan Coomassie 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 (Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002; Van

Hijum, S. A. F. T., et al., 2006; StainsFile, n.d.). Semua gel didokumentasi dengan cara *scanning* dengan digital *scanner*.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

1. Hasil Pembiakan Galur-Galur *E. coli* Rekombinan *ftf* CNC-2(1)

Pembiakan galur-galur *E. coli* rekombinan pembawa gen *ftf* asal galur *Weissella confusa* MBFCNC-2(1), yaitu galur-galur *E. coli* rekombinan Ec1, Ec2, Ec3, Ec4, Ec5 dan Ec6 yang tercantum pada Tabel 4.1 membentuk koloni-koloni tunggal yang berbentuk bulat dengan permukaan yang halus dan berwarna putih, seperti yang terlihat pada Gambar 4.1. Semua galur dapat tumbuh dengan baik saat dipindahkan ke dalam medium LB agar yang mengandung tetrasiklin untuk peremajaan galur dan digunakan kontrol yang terlihat pada Gambar 4.2 dan 4.3. Hasil purifikasi yang muncul berupa koloni tunggal.

2. Hasil Pembuatan Inokulum

Galur-galur *E. coli* rekombinan Ec1, Ec2, Ec3, Ec4, Ec5 dan Ec6 yang telah diperoleh koloni tunggalnya diinokulasi dalam medium LB cair yang mengandung tetrasiklin dan diinkubasi selama 24 jam, dapat dilihat pada Gambar 4.4. Hasil inokulasi tersebut diukur secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer. Serapannya diukur pada panjang gelombang 600 nm untuk mengetahui OD-nya. Hasil pengukuran OD₆₀₀ dapat dilihat pada Tabel 4.2. Nilai OD₆₀₀ tersebut akan menentukan volume inokulum yang kemudian diinokulasikan ke dalam medium LB cair yang mengandung tetrasiklin yang baru. Tujuannya adalah agar sedapat mungkin jumlah sel yang diinokulasikan sama banyaknya.

3. Hasil Fermentasi, Pemanenan dan Perolehan Ekstrak Enzim Kasar

Inokulum dari semua galur *E. coli* rekombinan dari tahap sebelumnya ditumbuhkan pada suhu 30°C dan OD₆₀₀-nya telah mencapai rentang 0,6-0,8, seperti yang tercantum pada Tabel 4.3. Kemudian semua galur *E. coli* rekombinan diinduksi dengan 1 mM IPTG (Isopropil-β-D-tiogalaktopiranosid) dan dipanen untuk mendapatkan pelet selnya. Setelah itu, pelet sel dipecah dengan sonikator dan berhasil diperoleh filtrat pelet selnya berupa ekstrak enzim kasar.

4. Hasil Pemurnian Ekstrak Enzim Kasar

Sebelum dipisahkan dan dimurnikan, ekstrak enzim kasar dielektroforesis terlebih dahulu untuk mengetahui adanya pita-pita protein yang terbentuk. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Gambar 4.5 dapat dilihat bahwa protein rekombinan yang dihasilkan oleh sampel yang diinduksi selama 3 dan 5 jam sama intensitasnya maka pada tahap pemurnian sampel dapat diambil dari keduanya.

5. Hasil Pengukuran Kuantitatif Protein dengan Spektrofotometer UV

Hasil pengukuran konsentrasi protein diperoleh dari sampel yang telah diliofilisasi dan dilarutkan dalam 100 µl aquabidest steril. Kurva kalibrasi yang diperoleh dari pengukuran konsentrasi protein standar berupa Bovine Serum Albumin. Kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.6. Hasil pengukuran konsentrasi sampel dapat dilihat pada Tabel 4.5.

6. Hasil Elektroforesis SDS Gel Poliakrilamid

Elektroforesis dilakukan pada sampel berupa filtrat pelet sel yang telah dimurnikan. Hasil elektroforesis di-*staining* dengan Coomasie Blue.

Mula-mula sebagai orientasi, sampel yang dimuatkan untuk dielektroforesis berasal dari sampel yang belum dimurnikan dari hasil induksi selama 3 jam dan 5 jam, yaitu berupa supernatan, pelet sel dan filtrat pelet sel. Tujuannya untuk mengetahui keberadaan protein. Hasilnya, intensitas pita dari sampel yang berasal

dari pelet sel lebih tipis dibandingkan dengan sampel yang berasal dari filtrat pelet sel, sedangkan pada supernatan tidak ditemukan pita apapun, terlihat pada Gambar 4.5. Dengan demikian, sampel yang akan dimurnikan dan dielektroforesis berikutnya adalah sampel yang berasal dari filtrat pelet sel.

Selanjutnya dilakukan elektroforesis dengan sampel yang telah dimurnikan dari masing-masing filtrat pelet sel dari galur-galur *E. coli* rekombinan Ec1, Ec2, Ec3, Ec4, Ec5 dan Ec6. Ukuran protein rekombinan dapat diketahui dengan melakukan *staining* Coomasie Blue terhadap potongan gel yang disiapkan pada tahapan kerja enam, yaitu sekitar 130 kDa dan hasilnya dapat dilihat dari Gambar 4.7. Hasil ini diketahui dengan membandingkan antara penanda protein yang ada pada gel hasil Coomasie Blue *staining* dan penanda protein FERMENTAS[®], yang dapat dilihat pada Gambar 4.8.

7. Hasil Analisa Aktivitas Fruktansukrase pada SDS Gel Poliakrilamid

Sementara itu, hasil analisis aktivitas fruktansukrase yang dilakukan pada potongan gel yang diinkubasi substrat sukrosa tidak menunjukkan adanya aktivitas fruktansukrase seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.9. Pada potongan gel lain yang diinkubasi di dalam substrat rafinosa ditemukan spot berwarna pink tipis yang terbentuk oleh *staining* Schiff asam periodat pada daerah sekitar 130 kDa, seperti pada Gambar 4.10.

4.2 Pembahasan

Tahap awal penelitian ini dimulai dengan menumbuhkan galur-galur *E. coli* rekombinan pembawa gen *ftf* asal galur *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) (*E. coli* TOP10 dan BL21 StarTM), yaitu galur-galur *E. coli* rekombinan Ec1, Ec2, Ec3, Ec4, Ec5 dan Ec6. Galur-galur rekombinan tersebut diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya berupa kloning dan transformasi (data belum dipublikasikan), keterangan dapat dilihat pada Tabel 4.1. Dalam penelitian ini, *E. coli* TOP10 yang tidak membawa gen *ftf* digunakan sebagai kontrol negatif. Hal ini dapat ditunjukkan dengan membandingkan pertumbuhan *E. coli* TOP10 kontrol pada medium LB agar tanpa antibiotik dan pada medium LB agar yang mengandung

tetrasiklin dengan konsentrasi 5 µg/ml medium. Hasil dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan 4.3. Bakteri kontrol ini dapat tumbuh pada medium tanpa antibiotik, tetapi tidak tumbuh pada medium LB agar yang mengandung tetrasiklin 5 µg/ml medium. Perlu diketahui bahwa bakteri *E. coli* rekombinan pembawa gen *fft* asal galur *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) membawa sifat resistensi terhadap antibiotik tetrasiklin yang dimiliki oleh vektor plasmid yang digunakan sehingga bakteri ini dapat tumbuh dalam medium selektif LB agar yang mengandung tetrasiklin 5 µg/ml medium. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Gambar 4.3, hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi tetrasiklin yang digunakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain sehingga hanya galur *E. coli* rekombinan *fft* CNC-2(1) yang dapat tumbuh. Purifikasi bakteri yang ditumbuhkan dilakukan dengan tujuan agar koloni yang kelak digunakan adalah benar-benar koloni dari bakteri yang dimaksud, bukan dari kontaminan yang kebetulan tumbuh pada medium yang sama, yaitu pada medium LB agar yang mengandung tetrasiklin.

Tahap penumbuhan semua galur *E. coli* rekombinan dilakukan dalam 500 ml medium LB cair yang mengandung tetrasiklin 5 µg/ml medium dan diinkubasi pada suhu 37°C sambil dikocok dengan kecepatan 200 rpm menggunakan *orbital shaker incubator* selama 24 jam. Hal ini dikarenakan suhu optimum pertumbuhan dari bakteri *E. coli* adalah pada suhu 37°C dan pengocokan tersebut diperlukan untuk menghasilkan oksigen karena bakteri ini bersifat aerob yang membutuhkan sedikit oksigen (Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1993).

Pada tahapan berikutnya, inokulum dari semua galur bakteri rekombinan yang telah diukur OD₆₀₀ dipipet sesuai volume inokulum yang mengandung sejumlah tertentu bakteri yang diinginkan per volume medium dan diinokulasikan ke dalam medium LB cair baru yang mengandung tetrasiklin 5 µg/ml medium. Pengukuran OD₆₀₀ terhadap inokulum dimaksudkan agar dapat diperhitungkan jumlah volume inokulum yang harus diinokulasikan ke dalam medium LB cair yang mengandung tetrasiklin 5 µg/ml medium baru sehingga diperoleh jumlah sel yang kurang lebih sama banyak. Dalam penelitian ini jumlah sel yang digunakan adalah 1000 sel/5 ml medium. Selain itu, diharapkan agar protein yang diperoleh kelak sedapat mungkin memiliki konsentrasi yang mendekati sama.

Kemudian inokulum semua galur *E. coli* rekombinan ditumbuhkan pada suhu 30°C sambil dikocok dengan kecepatan 200 rpm menggunakan *orbital shaker incubator* hingga mencapai fase eksponensial/pembelahan di mana bakteri berkembang biak dengan berlipat dua dan jumlah bakteri meningkat secara eksponensial. Pada pertengahan fase ini, pertumbuhan bakteri sangat ideal, pembelahan terjadi secara teratur, semua bahan dalam sel berada dalam keadaan seimbang. Kondisi bakteri dalam fase tersebut jauh berbeda dengan kondisi saat fase lag. Bakteri saat fase lag belum berkembang biak. Hal ini terjadi saat bakteri baru diinokulasikan ke dalam medium. Bakteri berusaha beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang baru. Selama berada di fase ini, bakteri mensintesis berbagai makromolekul yang nantinya dibutuhkan untuk melakukan pembelahan sel termasuk enzim, ribosom dan asam nukleat serta pembentukan energi dalam bentuk ATP (Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., dan Clark, D. P., 2009). Lamanya fase lag bergantung dari kondisi bakteri sebelumnya dan kondisi medium baru tempat bakteri akan ditumbuhkan. Jika sel diinokulasikan dari medium yang kaya nutrisi ke medium yang mengandung nutrisi lebih sedikit, maka fase lag akan menjadi lebih lama sebab bakteri harus membuat enzim untuk mensintesis berbagai makromolekul yang tidak terdapat pada medium yang baru (Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., dan Clark, D. P., 2009). Hal ini dapat diketahui apabila OD₆₀₀ telah mencapai rentang 0,6-0,8 agar sel yang ditumbuhkan tidak terlalu tua sehingga menyebabkan badan inklusi yang terbentuk akibat overekspresi. Badan inklusi adalah agregat dari badan inti atau sitoplasma, biasanya protein yang diduga gagal melipat atau dikenal sebagai *insoluble protein*. Salah satu cara untuk meminimalisir adanya badan inklusi atau *insoluble protein* ini, yaitu dengan memodifikasi kondisi bakteri agar protein rekombinan yang terlalu banyak menghasilkan badan inklusi ini tidak terperangkap di dalam pelet sel dan dapat larut dalam filtrat sehingga dapat dipurifikasi dengan menggunakan kolom afinitas (Amersham Biosciences A. B., 2000).

Berikutnya, inokulum semua galur *E. coli* rekombinan diinduksi dengan 1 mM IPTG (Isopropil- β -D-tiogalaktopiranosid) lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 dan 5 jam dengan tujuan untuk menginduksi ekspresi pada sistem protein rekombinan. Senyawa IPTG ini merupakan analog dari laktosa yang memicu transkripsi operon lac dan mencegah sel untuk menurunkan induktan sehingga konsentrasi IPTG tetap konstan (Hansen, L. H., Knudsen, S., dan Sørensen, S. J., 1998). Kultur sel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan supernatan dan pelet sel. Kemudian supernatan yang hanya mengandung medium dibuang dan pelet sel diambil lalu diresuspensikan dalam buffer fosfat pH 6,8 sebagai buffer sonikasi. Setelah itu, pelet sel dipecah dengan sonikasi menggunakan penangas es, suhu 4°C dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Sonikasi dilakukan untuk memecah sel untuk mendapatkan filtrat pelet sel berupa ekstrak enzim kasar. Namun, perlakuan sonikasi terus menerus akan menyebabkan pemanasan pada sampel sehingga diperlukan penangas es untuk menjaga suhu agar protein tidak terdenaturasi (University of Texas, n.d.; Feliu, J. X., Cubarsi, R., dan Villaverde, A., 1998).

Filtrat pelet sel dari hasil pemanenan dimurnikan untuk memperoleh target protein yang spesifik. Sebelum dimurnikan filtrat pelet sel dipekatkan dengan alat konsentrator 10 dan 30 kDa. Pemekatan ini bertujuan untuk memisahkan protein-protein yang berukuran lebih kecil dari 10 dan 30 kDa sehingga keberadaan kontaminan protein selain protein rekombinan dapat berkurang. Alat konsentrator ini memiliki ukuran pori-pori yang dapat dilewati oleh protein yang berukuran di bawah 10 dan 30 kDa, sehingga semua protein yang berukuran 30 kDa atau di bawahnya dapat lolos dari pori-pori. Fruktosiltransferase rata-rata berukuran 50-100 kDa atau lebih (Van Hijum et al, 2006) sehingga secara teori FTFase tidak akan terbuang dari konsentrator.

Teknik pemurnian dilakukan dengan menggunakan kolom afinitas atau *Immobilized Meta-chelate Affinity Chromatography* (IMAC). Sistem ini bekerja berdasarkan kemampuan asam amino tertentu, yaitu dalam hal ini histidin. Ni²⁺ terikat kuat pada suatu matriks penahan agar dapat berikatan secara reversibel dengan ion logam transisi. Protein rekombinan yang telah dirancang dengan suatu *tag* berupa deretan asam amino histidin dapat dimurnikan dengan teknik ini

Universitas Indonesia

karena deretan asam amino histidin sebanyak 12 kali yang telah difusikan pada protein rekombinan akan berikatan secara reversibel dengan ion logam Ni^{2+} sehingga tertahan dalam kolom. Sementara itu, protein-protein lain yang bukan merupakan rekombinan akan lolos dari kolom karena tidak membawa *tag* berupa deretan asam amino histidin tersebut. Protein rekombinan yang tertahan dalam kolom dapat dilepaskan dari ion logam Ni^{2+} dengan zat yang dapat berkompetisi dalam hal berikatan dengan ion Ni^{2+} , yaitu imidazol, sehingga ikatan antara *tag* asam amino histidin dengan ion logam digantikan oleh imidazol. Protein rekombinan yang berhasil dilepaskan selanjutnya ditampung fraksinya dalam mikrotube untuk selanjutnya dikonfirmasi dengan elektroforesis gel poliakrilamid (Mikkelsen, S. R., dan Corton, E., 2004).

Sebagai standar bagi pengukuran konsentrasi protein, digunakan Bovine Serum Albumin (BSA) yang dibuat dalam enam konsentrasi yang berbeda yang tercantum pada Tabel 4.4 dan komposisi dari standar BSA yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4.6. Setelah direaksikan dengan pereaksi warna Bradford kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 595 nm. Hasil terdapat pada Tabel 4.5. Pengukuran konsentrasi sampel dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui berapa banyak konsentrasi yang dibutuhkan oleh suatu enzim untuk dapat menunjukkan aktivitasnya yang dapat teramati. Konsentrasi yang terukur untuk sampel dapat dijadikan sebagai referensi bagi penelitian mengenai aktivitas enzim selanjutnya yang menggunakan metode yang sama.

Setelah diperoleh konsentrasi dari enzim tersebut, dilakukan elektroforesis dengan SDS PAGE untuk mengetahui karakterisasi dan selanjutnya dianalisa aktivitas enzim dengan PAS *staining*.

Sistem elektroforesis yang digunakan adalah *Denaturing (SDS) Discontinuous Gel Electrophoresis Laemmli Gel Method*. Formulasi gel elektroforesis terdiri atas dua bagian, yaitu gel pemisah (*separating gel*) dan gel penahan (*stacking gel*). Pada mulanya, formulasi gel yang digunakan mengikuti formula gel yang telah dioptimasi pada penelitian terdahulu, yaitu formula gel pemisah 5%. Namun, formula gel pemisah ini diganti setelah dilakukan optimasi pada formula gel pemisah 10%. Hasil pemisahan penanda protein yang baik ditunjukkan oleh formula gel pemisah 10% sehingga pada penelitian ini digunakan formula gel

Universitas Indonesia

pemisah tersebut, dapat dilihat pada Gambar 4.11. 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 (Coligan, J. E., 1995).

Bahan-bahan penyusun suatu gel dicampurkan di dalam beaker glass. Bahan amonium persulfat dan TEMED harus disimpan di dalam lemari es dan baru dikeluarkan saat akan membuat gel. Kecepatan gel berpolimerasi membentuk matriks bergantung dari banyaknya larutan amonium persulfat dan TEMED yang dimasukkan ke dalam formulasi. Jika diharapkan gel membeku lebih cepat, maka volume amonium persulfat dan TEMED yang dimasukkan dapat 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. 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 (Coligan, J. E., 1995).

Tahapan selanjutnya adalah aplikasi sampel. Sampel yang berupa filtrat 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 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 (Department of Biology, Davidson College., n.d.). Gliserol berfungsi sebagai bahan pengawet dan bahan

Universitas Indonesia

penambah berat protein. Dengan adanya gliserol yang dicampurkan dengan protein, protein dapat turun ke dalam sumuran saat dimuatkan tanpa menyebabkan protein menjadi menyebar ke luar sumuran. Ditambahkan pula senyawa pereduksi berupa 2-merkaptotanol. Senyawa pereduksi ini berfungsi untuk memutus ikatan disulfida yang ada di dalam struktur protein sehingga protein dapat berjalan dengan seragam saat elektroforesis (Coligan, J. E., 1995). Setelah sampel dicampurkan dengan kedua bahan tersebut, sampel dihomogenkan dengan *vortex* dan kemudian dipanaskan dengan menggunakan *dry bath* pada suhu 95°C selama 3 menit. Pemanasan ini bertujuan untuk lebih mendenaturasi protein dan memecah struktur protein kuaterner (Department of Biology, Davidson College., n.d.) serta untuk menginaktivasi protease endogen (Coligan, J. E., 1995). 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* (Coligan, J. E., 1995).

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. Elektroforesis berjalan dari kutub negatif di bagian atas ke kutub positif di bagian bawah alat elektroforesis (Coligan, J. E., 1995). Setelah elektroforesis selesai, gel diangkat dari cetakannya dengan hati-hati dan dicuci beberapa kali dengan aquadest steril untuk menghilangkan SDS.

Kemudian gel yang telah selesai dielektroforesis dibagi tiga sesuai dengan pembagian sumuran kosong yang telah disiapkan saat pemuatan sampel. Bagian pertama digunakan untuk mengamati ukuran protein dan dua bagian lainnya digunakan untuk analisis aktivitas fruktansukrase.

Potongan gel pertama hasil elektroforesis yang digunakan untuk mengamati ukuran protein kemudian direndam di dalam larutan *Coomassie Brilliant Blue*. Sebelumnya dilakukan fiksasi protein dengan merendam potongan gel hasil elektroforesis tersebut di dalam larutan 10% asam asetat dan 25% isopropanol selama sekitar 15 menit untuk mencegah terjadinya difusi protein keluar gel terutama pada protein berukuran kecil serta mempercepat pembersihan SDS. Setelah itu, larutan fiksasi tersebut dibuang dan gel direndam dalam larutan *Coomassie Brilliant Blue*.

Coomassie Brilliant Blue adalah pewarna yang umum digunakan pada staining untuk protein dan termasuk dalam zat warna anionik. *Coomassie Brilliant Blue* mampu berikatan dengan protein. Kelebihan pewarna yang terkumpul di dalam gel dapat dihilangkan dengan aquadest atau dengan campuran metanol dan asam asetat. Protein akan terdeteksi sebagai pita berwarna biru dengan latar belakang jernih. Hasil *staining* dengan *Coomassie Brilliant Blue* menunjukkan banyak pita protein yang terlihat dengan berbagai macam ukuran bila sampel belum dimurnikan. (Department of Biology, Davidson College., n.d.; Rybicki, E., dan Purves, M., n.d.).

Berdasarkan hasil elektroforesis dapat dilihat bahwa target protein yang diinginkan diduga berada dalam filtrat pelet sel pada Gambar 4.5. Kemudian dilakukan elektroforesis berikutnya yang menggunakan sampel filtrat pelet sel yang telah dimurnikan dari sampel *E. coli* rekombinan Ec1, Ec2, Ec3, Ec4, Ec5 dan Ec6. Hasil elektroforesis yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 4.7. Tidak ada pita protein yang ditemukan pada jalur sampel *E. coli* rekombinan Ec1, Ec2 dan Ec3, yaitu galur-galur *E. coli* rekombinan TOP10 *ftf* CNC-2(1). Faktor-faktor yang menyebabkan protein rekombinan tidak dapat terekspresi dari galur *E. coli* rekombinan TOP10 *ftf* CNC-2(1), antara lain adalah ketidakcocokan antara vektor dan sel kompeten yang digunakan (Mergulha, F. J. M., Summersb, D. K., dan Monteiroa, G. A., 2005; Choi, J. H., dan Lee, S. Y., 2004) dugaan bahwa sampel protein yang disonikasi tidak terisolasi dengan baik atau tidak terpecah dengan sempurna sehingga target protein yang diinginkan tidak dapat terdeteksi.

Sementara itu dari beberapa percobaan pada jalur sampel *E. coli* rekombinan Ec4 dan Ec5, yaitu galur-galur *E. coli* rekombinan BL21 StarTM *ftf* CNC-2(1)

Universitas Indonesia

ditemukan pita protein tunggal berada pada ukuran sekitar 130 kDa bila dibandingkan dengan penanda ukuran protein, sedangkan pada Ec6 tidak ditemukan pita protein tersebut. Pita protein ini terlihat pada Gambar 4.7. Namun, terkadang ditemukan banyak pita protein di bawah ukuran protein 130 kDa yang mengindikasikan adanya degradasi dari enzim proteolitik (Amersham Biosciences A. B., 2000). Dalam literatur, ukuran FTFase yang berasal dari galur-galur BAL rata-rata berada sekitar 50-100 kDa atau lebih (Van Hijum et al, 2006), sedangkan FTFase yang bukan berasal dari BAL berukuran sekitar 40-70 kDa (Van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., dan Van Geel-Schutten, G. H., 2005). Dengan demikian, ukuran protein rekombinan yang ditemukan dalam penelitian ini mempunyai karakteristik ukuran protein FTFase yang sesuai dengan literatur.

Bagian potongan gel lain yang akan digunakan untuk analisis aktivitas fruktansukrase diinkubasi di dalam substrat. Substrat yang digunakan adalah sukrosa dan rafinosa. Satu potongan gel ini disiapkan untuk diinkubasi di dalam substrat sukrosa dan yang satunya diinkubasi di dalam rafinosa. Mula-mula masing-masing gel dicuci sebanyak tiga kali dengan aquadest steril dan diinkubasi pada suhu 37°C di dalam buffer sukrosa dan buffer rafinosa. Inkubasi masing-masing gel dilakukan selama satu malam untuk keesokan harinya di-*staining* dengan *Schiff* asam periodat. Fruktansukrase akan bereaksi dengan substrat membentuk polimer-polimer EPS dengan 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. Potongan-potongan gel yang telah selesai diinkubasi kemudian masing-masing dicuci beberapa kali dengan aquadest steril untuk menghilangkan sisa-sisa sukrosa dan rafinosa. Kemudian gel diinkubasi dalam larutan 12,5% TCA selama 30 menit dalam *rotary shaker*. Setelah itu, masing-masing gel kembali dicuci dengan aquadest steril dan diinkubasi dalam larutan 1% asam periodat dalam 3% asam asetat selama 50 menit. Larutan ini harus dibuat segar sebelum gel diinkubasikan di dalamnya. Larutan 1% asam periodat dalam 3% asam asetat ini berfungsi untuk mengoksidasi ikatan karbon-karbon dari EPS yang terbentuk dimana atom

Universitas Indonesia

karbonnya memiliki gugus hidroksil untuk menghasikan dialdehid yang dapat bereaksi dengan peraksi *Schiff* (StainsFile, n.d.). Setelah selesai diinkubasi dengan buffer 1% asam periodat-3% asam asetat, masing-masing gel kemudian dicuci dengan aquadest steril selama 6x10 menit. Kemudian masing-masing gel diinkubasi di dalam pereaksi *Schiff fuchsin sulfite* 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. 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, masing-masing gel dicuci dengan larutan natrium metabisulfite. Dengan begitu, kemungkinan terjadinya pewarnaan pada bagian non-aldehid dapat dihilangkan. Masing-masing gel diinkubasi dalam larutan natrium metabisulfite ini selama 30 menit hingga semua sisa pereaksi *Schiff* yang digunakan tercuci bersih ((Firdausi, W., 2009; Van Hijum, S. A. F. T., et al., 2002; StainsFile, n.d.).

Berdasarkan gambar hasil PAS *staining* dari semua galur *E. coli* rekombinan TOP10 *fff* CNC-2(1) dan *E. coli* rekombinan BL21 StarTM *fff* CNC-2(1) pada substrat sukrosa pada Gambar 4.9 tidak ditemukan spot pink intensif. Hal ini menunjukkan tidak ada aktivitas enzim pada substrat sukrosa. Sementara itu, ditemukan adanya spot pink tipis pada daerah ukuran protein 130 kDa di jalur sampel Ec4 dan Ec5, yaitu galur-galur *E. coli* BL21 rekombinan StarTM *fff* CNC-2(1) pada substrat rafinosa. Hasil dapat dilihat pada Gambar 4.10. Galur *E. coli* rekombinan BL21 StarTM *fff* CNC-2(1) no. 2 dan 4 yang memiliki aktivitas enzim FTase merupakan galur-galur yang berhasil terekspresi dengan teknik SDS PAGE. Faktor-faktor yang menyebabkan spot yang terlalu tipis adalah konsentrasi enzim yang diisolasi terlalu kecil sehingga visualisasi pada gel terlihat tipis. Lalu, spot pink tersebut muncul hanya pada substrat rafinosa karena substrat ini

Universitas Indonesia

merupakan substrat spesifik untuk enzim fruktansukrase (Van Geel-Schutten, G. H., 1999).



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Adapun kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Dari keenam galur *E. coli* rekombinan *ftf* CNC-2(1), hanya dua galur dari *E. coli* rekombinan BL21 StarTM *ftf* CNC-2(1) (Ec4 dan Ec5) dapat mengekspresikan protein rekombinan fruktansukrase.
2. Protein rekombinan fruktansukrase yang diekspresi dengan menggunakan teknik SDS-PAGE berukuran sekitar 130 kDa.
3. Protein rekombinan fruktansukrase mempunyai aktivitas terhadap substrat rafinosa, tetapi tidak terhadap substrat sukrosa.

5.2 Saran

Perlu dilakukan pemeriksaan lanjutan dengan teknik kromatografi untuk mengetahui reaksi polimer polisakarida dari protein rekombinan FTFase terhadap substrat sukrosa dan rafinosa.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui konsentrasi protein rekombinan FTFase secara kuantitatif.

DAFTAR ACUAN

- Amersham Biosciences A. B. (2000). *The recombinant protein handbook: Protein amplification and simple purification*. GE Health Care.
http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/content/LD_367585163-R350 (1 April 2010, pukul 20:05 WIB.)
- Amersham Biosciences A. B. (2002). *Affinity chromatography: Principles and methods*. GE Health Care.
http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/content/LD_149605979-F640 (28 Jan. 2010, pukul 19:01 WIB.)
- Amersham Biosciences A. B. (2005). *Protein purification - Laboratory research*. GE Health Care. <http://www.gelifesciences.com/protein-purification> (28 Jan. 2010, pukul 20:23 WIB.)
- Anonim. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Anwar, M., et al. (2010). Inulin and Levan sintetis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology*, 156, 000.
- Biochrom Ltd. (n.d.). *GeneQuant RNA/DNA calculator*.
<http://biocld01.uuhost.uk.uu.net/genequant.htm> ((31 Dec. 2009, pukul 20:28 WIB.)
- Caras. (n.d.). *Bradford assay*. University of Texas.
<http://kitto.cm.utexas.edu/research/Kittolabpage/Protocols/Biochemistry/Bradford.html> (19 Jan. 2010, pukul 20:45 WIB.)
- Choi, J. H., dan Lee, S. Y. (2004). Secretory and extracellular productin of recombinant protein using *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 625-635.
- Coligan, J. E. (1995). *Current protocols in protein science volume 1 editorial Board*. USA: John Wiley&Sons Inc.

- Department of Biology, Davidson College. (2002). *Affinity chromatography method*.
<http://www.bio.davidson.edu/COURSES/GENOMICS/method/Affinity.html> (28 Jan. 2010, pukul 19:10 WIB.)
- Department of Biology, Davidson College. (n.d.). *SDS-PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)*.
<http://www.davidson.edu/academic/biology/courses/Molbio/SDSPAGE/SDSPAGE.html> (27 Okt. 2009, pukul 21:00 WIB.)
- Eggers, N. (n.d.). *Biochemistry of lactic acid*. Department of Chemistry, UBC Okanagan.
<https://people.ok.ubc.ca/neggers/Chem422A/BIOCHEMISTRY%20OF%20LACTIC%20ACID%20BACTERIA.pdf> (1 Dec. 2009, pukul 20:30 WIB.)
- Feliu, J. X., Cubarsi, R., dan Villaverde, A. (1998). Optimised released of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells. *John Wiley & Sons, Inc. Biotechnol Bioeng.* 58, 536–540.
- Firdausi, W. (2009). *Skripsi karakterisasi enzim sukrase dari isolat-isolat bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida dengan SDS PAGE*. Departemen Farmasi FMIPA UI, xi + 89 halaman.
- GE Health Care. (2007). *His Spin Trap® Kit manual GE Healthcare*. Sep 1, 2005.
- Geno Technology Inc., USA. (2008). *MSDS Zymogram: Study of an active enzyme with electrophoresis*.
<http://www.gbiosciences.com/ZymogramStudyofanActiveEnzymeWithElectrophoresis-desc.aspx> (12 Jan. 2010, pukul 20:39 WIB.)
- George, H. (2003). *What is recombinant protein production?*
<http://www.wisegeek.com/what-is-recombinant-protein-production.htm> (1 Apr. 2010, pukul 21:14 WIB.)
- Hansen, L. H., Knudsen, S., dan Sørensen, S. J. (1998). The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Curr. Microbiol*, 36 (6): 341–347.

- Hinrichs, W. L. J., Prinsen, M. G., dan Frijlink, H. W. (2001). Inulin glasses for the stabilization of therapeutic proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 215, 163–174.
- Invitrogen Corporation. (2004). *Oneshot TOP10[®] competent cells*.
http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~inoue-tken/ja/staffs/matsumura/OneshotTOP10_man.pdf (17 Apr. 2010, pukul 21:14 WIB.)
- Kenneth T. P. (2008). *Lactic acid bacteria: Todar's online textbook of bacteriology*. <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html> (4 Jan. 2009, pukul 20:19 WIB.)
- Kralj, S., et al. (2008). Fructansucrase enzymes and sucrose analogues: A new approach for the synthesis of unique fructo-oligosaccharides. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26, 32–41.
- Kusmiati, F. R. (2006). *Produksi beta-1,3 glukon dari Agrobacterium dan aktivitas penyembuhan luka terbuka pada tikus putih*, 10.
- Lebendiker, M. (2002). *Bradford – protein determination*. Faculty of Science, The Hebrew University of Jerusalem.
<http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/Bradford.htm> (19 Jan. 2010, pukul 20:18 WIB.)
- Lebendiker, M. (2002). *PAGE-SDS Laemmli protocol*. Faculty of Science, The Hebrew University of Jerusalem.
http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/Page_SDS.html (8 Feb. 2010, pukul 21:01 WIB.)
- Madigan, M. T., et al. (2009). *Brock biology of microorganism 12th edition*. San Fransisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Maiorano, A., et al. (2008). Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnol Lett*, 30, 1867–1877.
- Malik, A. (2009). *Laporan hasil riset hibah penelitian strategis nasional tailor-made biopolimer fruktan tipe inulin dengan rekayasa genetika mikroba: pencarian dan kloning gen penyandi inulosukrase pada bakteri asam laktat*. FMIPA UI, Depok.

- Malik, A., et al. (2009). Screening of lactic acid bacteria from Indonesia reveals glucansucrase and fructansucrase genes in two different *Weissella confusa* strains from soya. *FEMS Microbiol Lett*, 300, 131–138.
- Malik, A., et al. (2010). Isolasi bakteri asam laktat dari berbagai makanan dan minuman tradisional dan identifikasi isolat-isolatnya secara molekuler menggunakan DNA ribosomal 16S. *Makara (Seri Sains)*, 14, 57-62.
- Malik, A., et al. (2007). Skrining, isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida asal sumber lokal menggunakan gen penyandi 16s rRNA. *Sains Indonesia*, 1-6.
- Mergulha, F. J. M., Summersb, D. K., dan Monteiroa, G. A. (2005). Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*. 23, 177-202.
- Mikkelsen, S. R., dan Corton, E. (2004). *Bioanalytical chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Molecular Station. (2008). *SDS PAGE*. <http://www.molecularstation.com/sds-page-gel-electrophoresis> (30 Jan. 2010, pukul 20:05 WIB.)
- Molecular Station. (n.d.). *Protein identification techniques proteins can be separated by 2-D gel electrophoresis and identified with mass spectrometry*. <http://www.molecularstation.com/proteomics/protein-identification> (1 Apr. 2010, pukul 21:06 WIB.)
- MSUM Biochemistry. (2006). *Bradford protein assay protocol*. <http://www.mnstate.edu/provost/BradfordProteinAssayProtocol.pdf> (19 Jan. 2010, pukul 20:20 WIB.)
- Murray R. K, et al. (2000). *Biokimia Harper Edisi 25*. Jakarta: Penerbit buku kedokteran EGC.
- Ozimek, L., et al. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *The FEBS Journal*, 273, 4104-4113.
- Provost, J. (2004). *Nickel affinity chromatography protocol/guide*. Department of Chemistry, MSU Moorhead. http://www.mnstate.edu/provost/His_TagNiChromatogProtocol.pdf (28 Jan. 2010, pukul 19:21 WIB.)

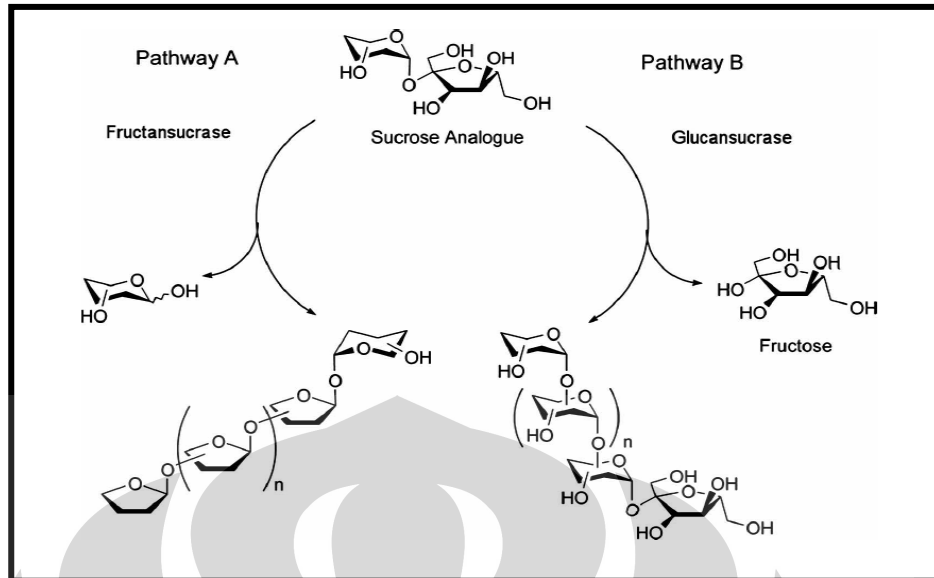
- Recombinant-antibody. (n.d.). *Recombinant protein*. <http://www.recombinant-antibody.com/protein> (1 Apr. 2010, pukul 19:20 WIB.)
- Rybicki, E., dan Purves, M. (n.d.). *SDS Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDSPAGE)*. <http://www.mcb.uct.ac.za/Manual/sdspage.html> (12 Jan. 2010, pukul 20:55 WIB.)
- Sezonov, G., et al. (2007). *Escherichia coli* physiology in luria-bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 8746–8749.
- Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 1993. *Mikrobiologi kedokteran*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- StainsFile. (n.d.). *What is Schiff's reagent?* <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/schiff/schiffwhatis.htm> (12 Jan. 2010, pukul 19:12 WIB.)
- Studier, F. (2005). Expression library. CSBMP. https://www.membrane-biology.org/Library/media_for_coli.pdf (29 Jan. 2010, pukul 20:08 WIB.)
- Tekin, S. D. (2004). *Use of the bradford protein assay*. <http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/minibradford.htm> (19 Jan. 2010, pukul 20:24 WIB.)
- The Gale Group Inc. (2003). *Lactic acid bacteria*. <http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-3409800338.html> (1 Dec. 2009, pukul 19:33 WIB.)
- Trinity University. (n.d.). *The measurement of enzyme activity*. <http://www.trinity.edu/slibs/enzymelab/default.htm> (12 Jan. 2010, pukul 20:07 WIB.)
- University of Texas. (n.d.). *Sonication of bacteria*. <http://kitto.cm.utexas.edu/research/Kittolabpage/Protocols/Biochemistry/sonication.html> (30 Apr. 2010, pukul 19:50 WIB.)
- Van den Berg, D., et al. (1995). Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2840–2844.
- Van Geel-Schutten, G. H., et al. (1999). Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized

by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains.

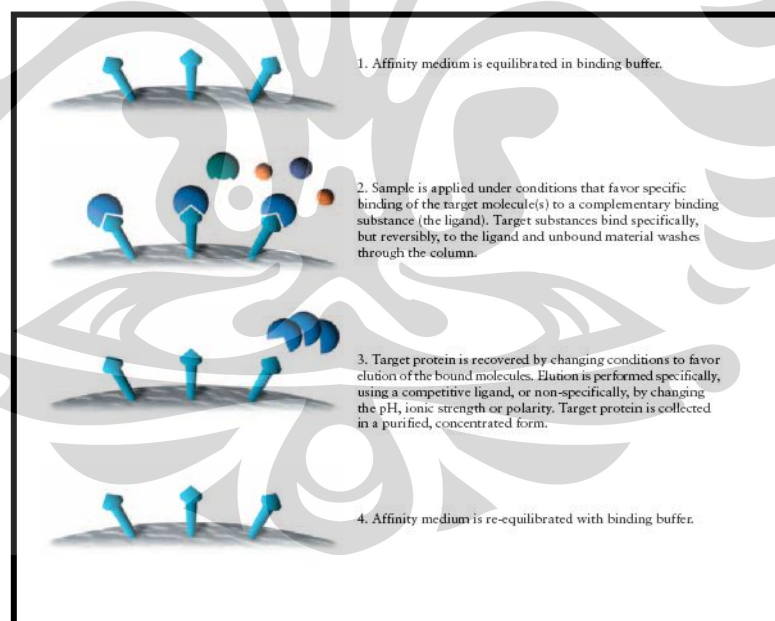
Applied and Environmental Microbiology, 65, 3008-3014.

- Van Geel-Schutten, G. H., et al. (2000). Exopolysaccharide synthesis by *Lactobacillus reuterii*: molecular characterization of a fructosyltransferase and a glucansucrase. *Centrum voor Koolhydraat Bio-engineering TNO-RUG*, 8-18.
- Van Hijum, S. A. F. T., et al. (1976). Glucansucrases of Lactobacilli characterization of genes, enzymes and products synthesized. *Ponsen & Looijen BV*, 10-15.
- Van Hijum, S. A. F. T., et al. (2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 4390-4398.
- Van Hijum, S. A. F. T., et al. (2005). *General introduction: Fructosyltransferases of lactic acid bacteria*.
<http://dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/science/2005/1.k.ozimek/c1.pdf> (13 Jun 2010, pukul 14.39 WIB.)
- Van Hijum, S. A. F. T., et al. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 07, 157-176.
- William D. Stansfield, J. S. (2006). *Schaum's easy outlines biologi molekuler dan sel*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Wink, M. (2006). *An introduction to molecular biotechnology: Molecular*. 131-137.
- Zuccaro, A., et al. (2008). Taylor made fructooligosaccharides by combination of substrate and genetic engineering. *ChemBioChem*, 9, 143-149.





Gambar 2.1 Konsep sintesis enzimatik untuk oligosakarida menggunakan analog sukrosa sebagai substrat dan jalur fruktansukrase dan glukansukrase
[Sumber: Fructansucrase enzymes and sucrose analogues: A new approach for the synthesis of unique fructo-oligosaccharides 2008]



Gambar 2.2 Mekanisme pemurnian dengan teknik kromatografi kolom afinitas

[Sumber: *The recombinant protein handbook: Protein amplification and simple purification* 2000]



Gambar 3.1 Lemari Pendingin -20°C
[GEA]



Gambar 3.2 Inkubator
[Orbital Shaker Incubator]



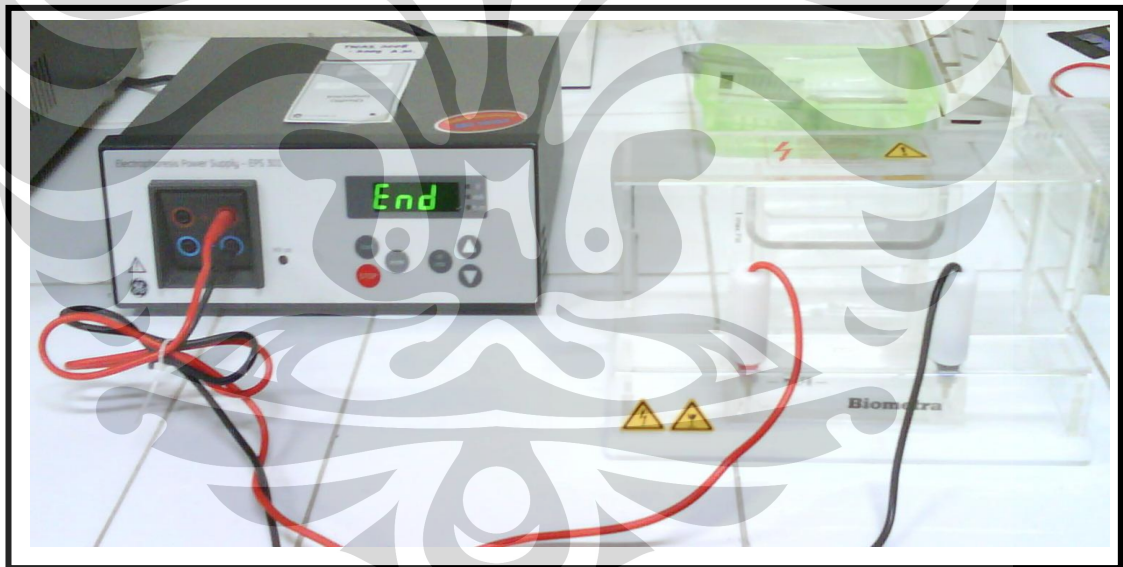
Gambar 3.3 Sentrifugator
[Tomy *centrifugator* MX-305]



Gambar 3.4 *Dry Bath*
[Barnstead Thermolyne]



Gambar 3.5 Spektrofotometer GeneQuant
[GE Healthcare]



Gambar 3.6 Alat SDS PAGE dan *power supply*
[Biometra dan GE Healthcare]



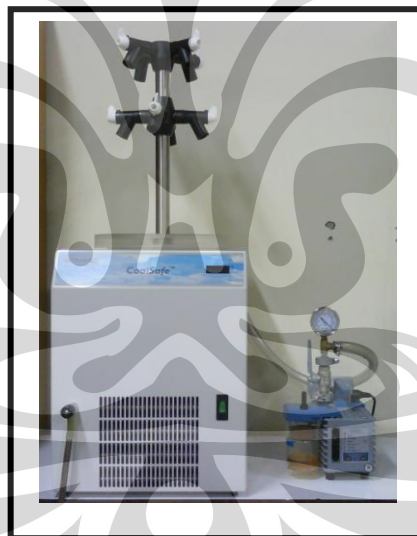
Gambar 3.7 *Vortex Mixer*
[Maxi Mix]



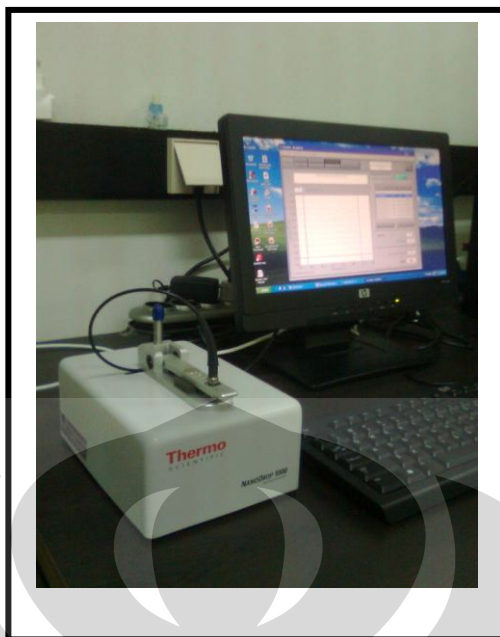
Gambar 3.8 *Deep freezer -80°C*
[New Brunswick Scientific U101 Innova]



Gambar 3.9 Mikrosentrifuse dengan pendingin
[Sorvall Fresco]



Gambar 3.10 Alat liofilisasi
[SCANVAC]



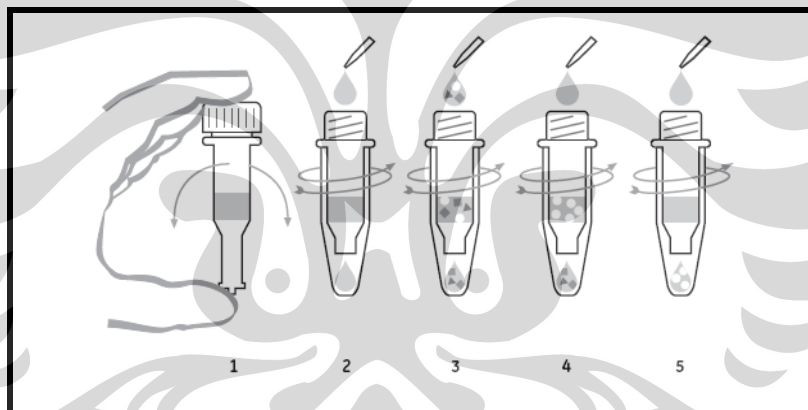
Gambar 3.11 *Nanodrop spectrophotometry*
[THERMOSCIENTIFIC]



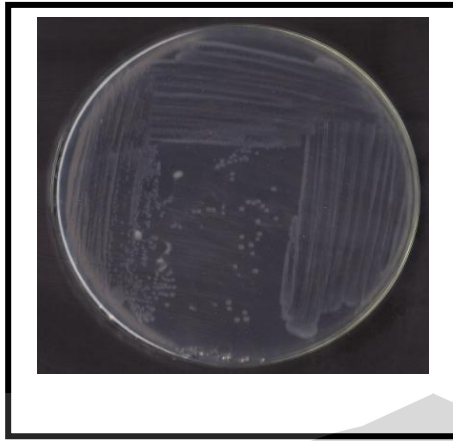
Gambar 3.12 Pemanas dengan *magnetic stirrer*
[Torrey Pins Scientific]



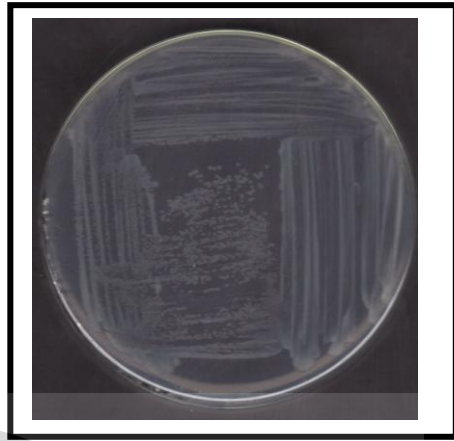
Gambar 3.13 *Cell disrupters*
[BRONSON SONIFIER]



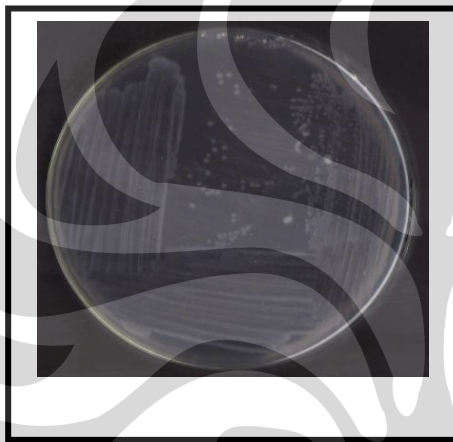
Gambar 3.14 Tahapan pemurnian ekstrak enzim kasar
[Sumber: *His Spin Trap*[®] Kit manual GE Healthcare 2007]



(1)



(2)



(3)



(4)



(5)



(6)

Keterangan: Galur-galur *E. coli* TOP10 rekombinan *ftf* CNC-2(1): no. 1, 3 dan 5.

Galur-galur *E. coli* BL21 StarTM rekombinan *ftf* CNC-2(1): 2, 4 dan 6

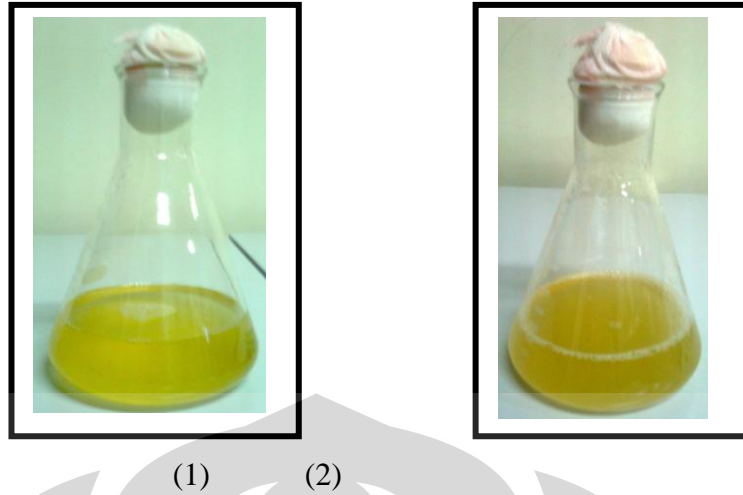
Gambar 4.1 Galur-galur *E. coli* rekombinan TOP10 *ffl* CNC-2(1) dan *E. coli* rekombinan BL21 StarTM *ffl* CNC-2(1) pada medium LB agar yang mengandung 5 µg/ml tetrasiklin



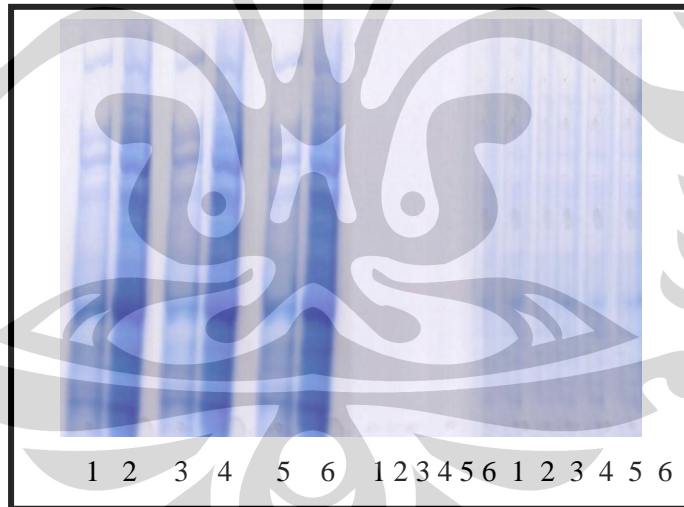
Gambar 4.2 *E. coli* TOP10 kontrol pada medium LB agar yang tidak mengandung tetrasiklin



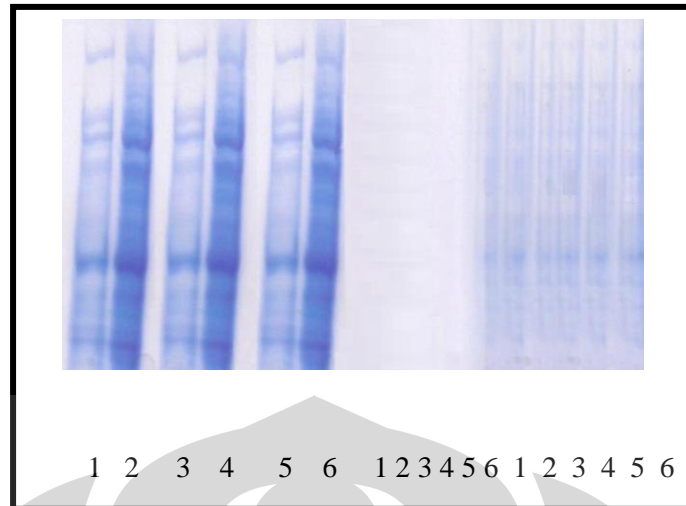
Gambar 4.3 *E. coli* TOP10 kontrol pada medium LB agar yang mengandung 5 µg/ml tetrasiklin



Gambar 4.4 Galur-galur (1) *E. coli* rekombinan TOP10 *ftf* CNC-2(1) dan (2) *E. coli* rekombinan BL21 StarTM *ftf* CNC-2(1) pada medium LB cair yang mengandung 5 µg/ml tetrasiklin

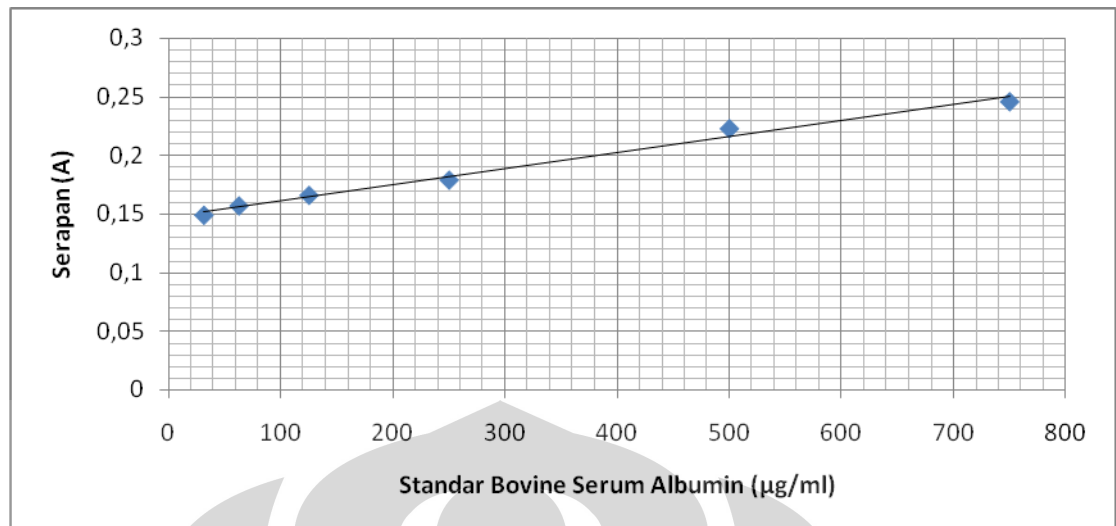


Keterangan: dari kiri ke kanan: filtrat pelet sel, supernatan dan pelet sel dari galur-galur *E. coli* rekombinan TOP10 *ftf* CNC-2(1) dan *E. coli* BL21 rekombinan StarTM *ftf* CNC-2(1) yang diinduksi selama 3 jam



Keterangan: dari kiri ke kanan: filtrat pelet sel, supernatan dan pelet sel dari galur-galur *E. coli* rekombinan TOP10 *ffl* CNC-2(1) dan *E. coli* rekombinan BL21 StarTM *ffl* CNC-2(1) yang diinduksi selama 5 jam

Gambar 4.5 Hasil elektroforesis sampel supernatan, filtrat pelet sel dan pelet sel yang diinduksi selama 3 dan 5 jam



Keterangan:

$$r = 0,994406248$$

$$a = 0,147490916$$

$$b = 1,367589826 \times 10^{-4} = 0,00014$$

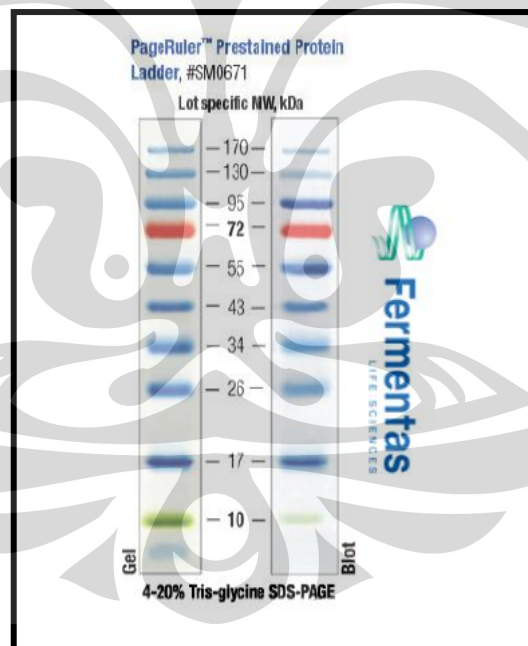
Persamaan kalibrasi:

$$y = 0,14749 + 0,00014x$$

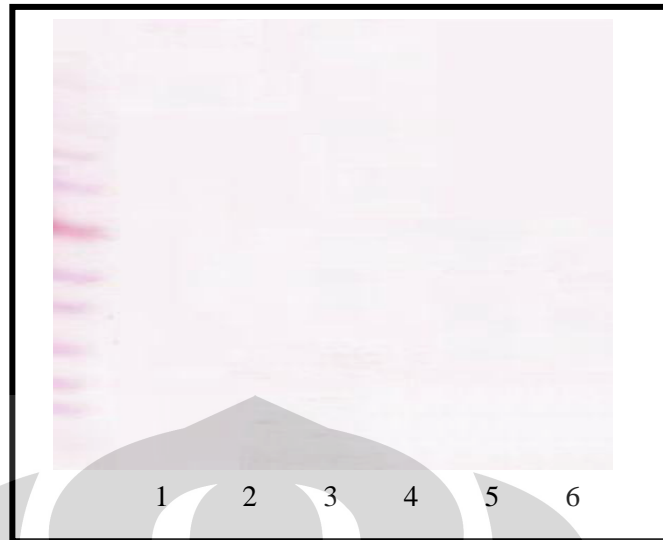
Gambar 4.6 Kurva kalibrasi standar Bovine Serum Albumin (BSA) pada panjang gelombang 595 nm



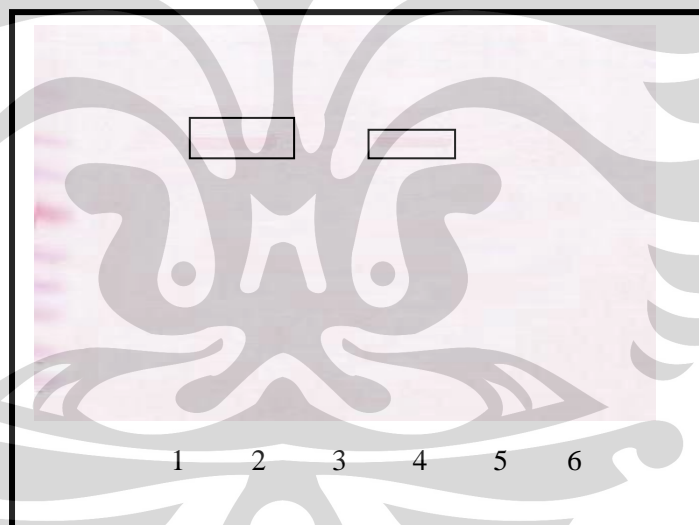
Gambar 4.7 Hasil elektroforesis sampel dari galur-galur *E. coli* rekombinan TOP10 *ftf* CNC-2(1) dan *E. coli* rekombinan BL21 StarTM *ftf* CNC-2(1)



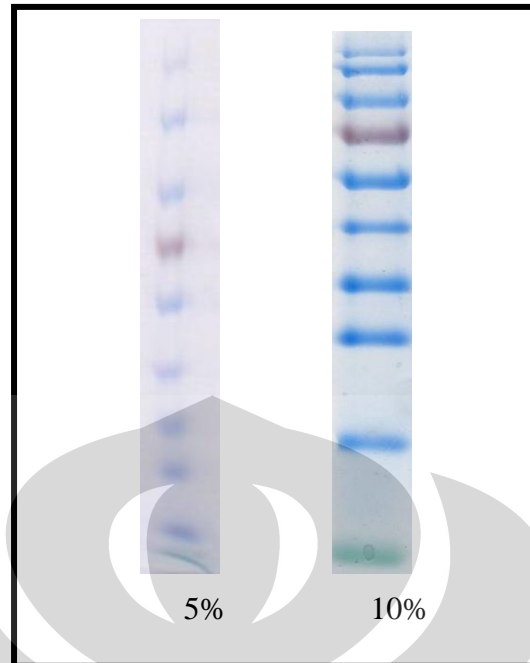
Gambar 4.8 Penanda protein yang digunakan untuk elektroforesis
[FERMENTAS]



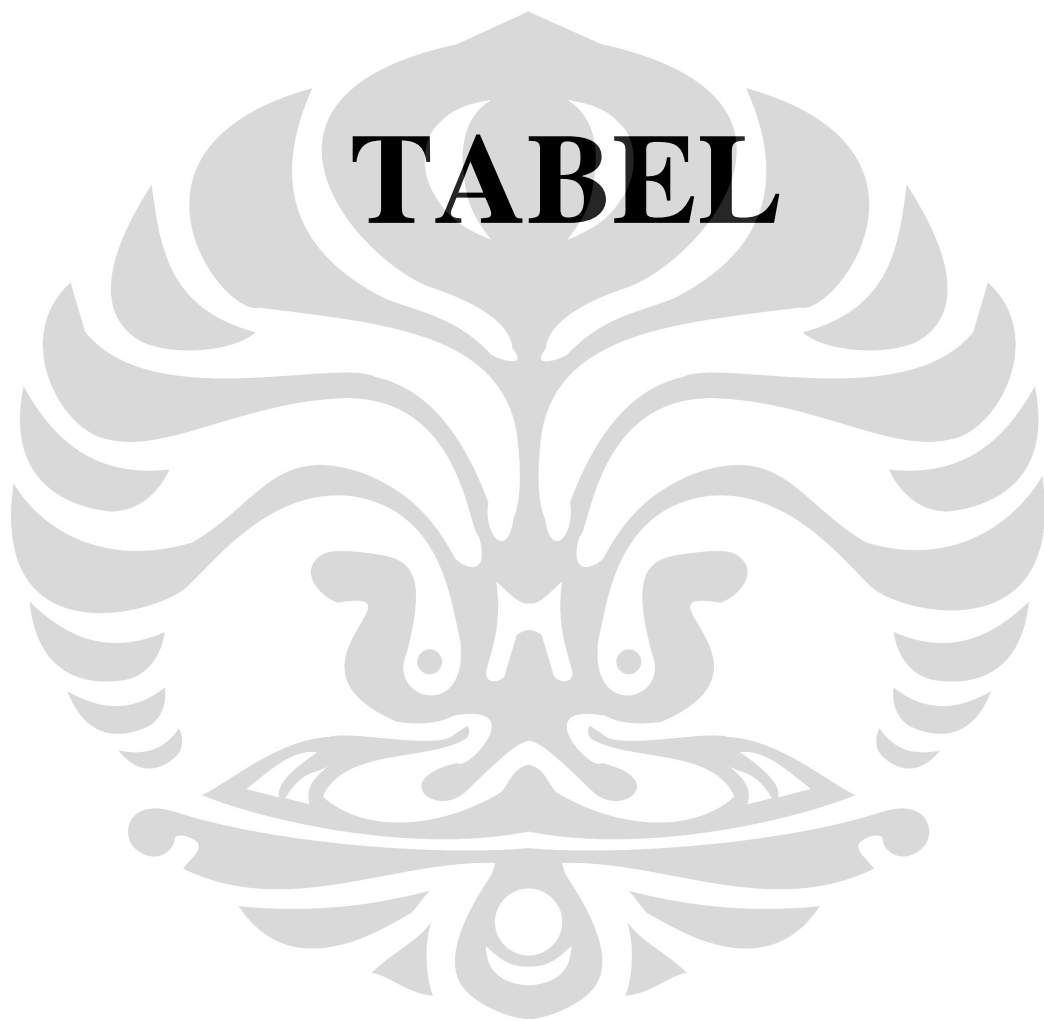
Gambar 4.9 Hasil *staining* Schiff Asam Periodat sampel dari galur-galur *E. coli* rekombinan TOP10 *fff* CNC-2(1) dan *E. coli* rekombinan BL21 StarTM *fff* CNC-2(1) pada substrat sukrosa



Gambar 4.10 Hasil *staining* Schiff Asam Periodat sampel dari galur-galur *E. coli* rekombinan TOP10 *fff* CNC-2(1) dan *E. coli* rekombinan BL21 StarTM *fff* CNC-2(1) pada substrat rafinosa



Gambar 4.11 Perbandingan kemampuan gel pemisah formulasi 5% dengan formulasi 10% dalam memisahkan penanda protein



Tabel 4.1 Galur-galur *E. coli* rekombinan *ftf* CNC-2(1)

No. Kode	Galur-Galur <i>E. coli</i> Rekombinan <i>ftf</i> CNC-2(1)
Ec1	<i>E. coli</i> TOP10 rekombinan <i>ftf</i> CNC-2(1) 1
Ec2	<i>E. coli</i> TOP10 rekombinan <i>ftf</i> CNC-2(1) 3
Ec3	<i>E. coli</i> TOP10 rekombinan <i>ftf</i> CNC-2(1) 5
Ec4	<i>E. coli</i> BL21 Star TM rekombinan <i>ftf</i> CNC-2(1) 2
Ec5	<i>E. coli</i> BL21 Star TM rekombinan <i>ftf</i> CNC-2(1) 4
Ec6	<i>E. coli</i> BL21 Star TM rekombinan <i>ftf</i> CNC-2(1) 6

Tabel 4.2 Hasil pengukuran OD₆₀₀ galur-galur *E. coli* rekombinan TOP10 dan BL21 StarTM *ftf* CNC-2(1) untuk pembuatan *frozen stock* dan induksi 3 dan 5 jam

Sampel	Ec1	Ec2	Ec3	Ec5	Ec6	Ec4
OD ₆₀₀ (faktor pengenceran 10x)	0,188	0,222	0,132	0,386	0,176	0,256

Tabel 4.3 Hasil pengukuran OD₆₀₀ galur-galur *E. coli* rekombinan TOP10 dan BL21 StarTM *ftf* CNC-2(1) untuk induksi 3 dan 5 jam

Jam ke-	OD ₆₀₀ (faktor pengenceran 10x)				
	1	2	3	4	5
Galur <i>E. coli</i> rekombinan TOP10 <i>ftf</i> CNC-2(1)	0,108	0,398	0,846		
Galur <i>E. coli</i> rekombinan BL21 Star TM <i>ftf</i> CNC-2(1)	0,102	0,138	0,184	0,584	0,762

Tabel 4.4 Pengukuran serapan Bovine Serum Albumin sebagai kurva kalibrasi yang diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan pereaksi Bradford

Standar Bovine Serum Albumin (µg/ml)	Serapan (A)
31,25	0,149
62,5	0,157
125	0,166
250	0,179
500	0,223
750	0,246

Dari hasil pengukuran tersebut diperoleh nilai:

$$r = 0,994406248$$

$$a = 0,147490916$$

$$b = 1,367589826 \times 10^{-4} = 0,00014$$

Persamaan kalibrasi yang diperoleh adalah:

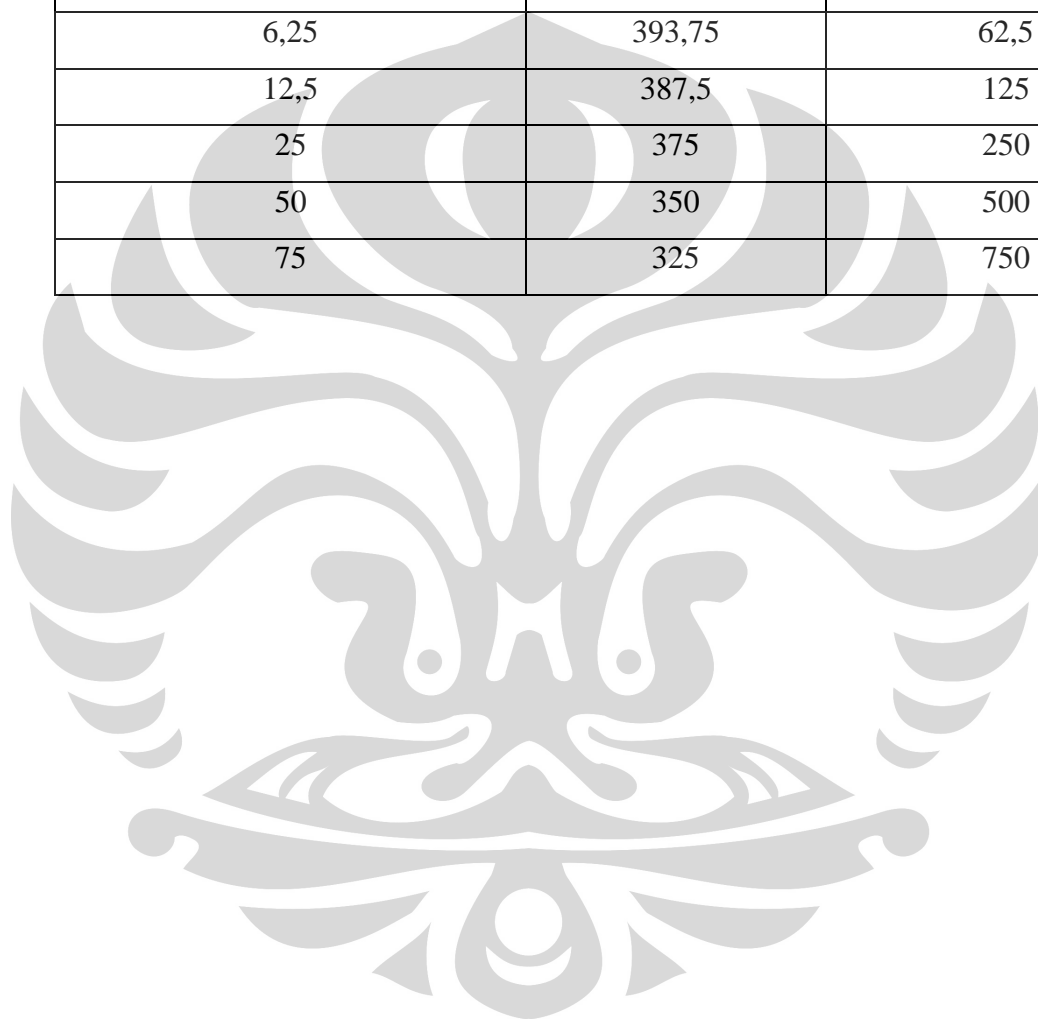
$$y = 0,14749 + 0,00014x$$

Tabel 4.5 Hasil pengukuran sampel yang diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan pereaksi Bradford

Sampel	Serapan (A)	Konsentrasi Sampel (µg/ml)
Ec4	0,170	128,01
Ec5	0,152	31,88

Tabel 4.6 Data komposisi larutan standar Bovine Serum Albumin

Larutan Stok Bovine Serum Albumin 4000 $\mu\text{g/ml}$ (μl)	Aquabidest Steril (μl)	Konsentrasi Akhir Bovine Serum Albumin ($\mu\text{g/ml}$)
3,125	396,875	31,25
6,25	393,75	62,5
12,5	387,5	125
25	375	250
50	350	500
75	325	750



LAMPIRAN

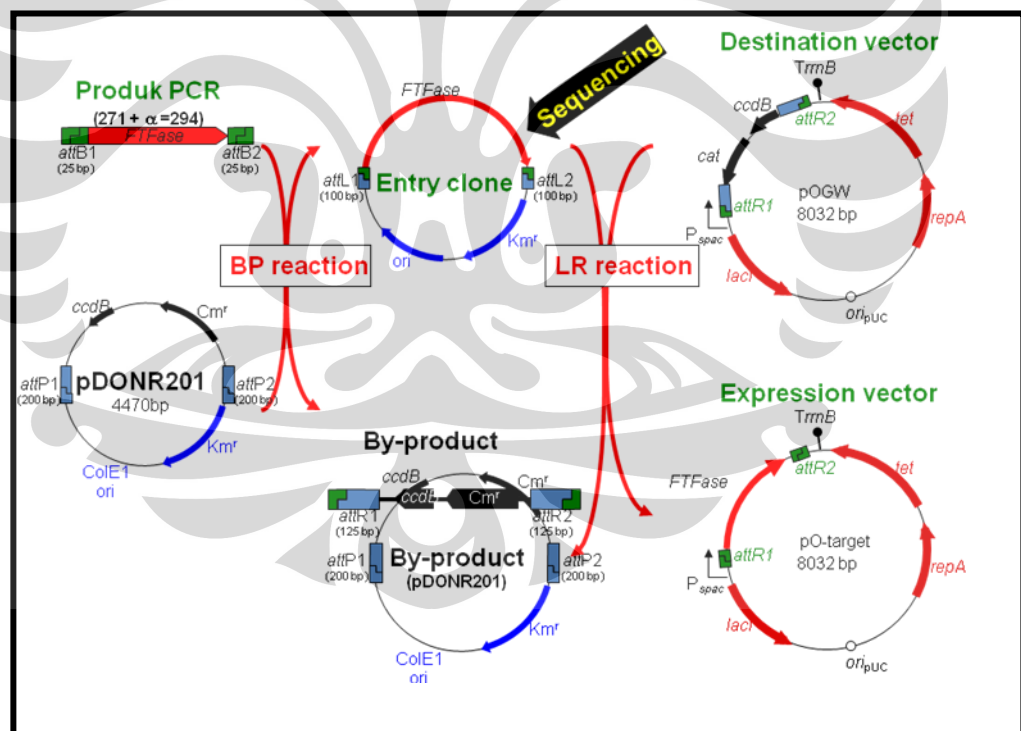


Lampiran 1

Riwayat Konstruksi Gen Rekombinan

Konstruksi *E. coli* rekombinan *ftfCNC-2(1)* dilakukan dengan mengklon gen *ftf* yang berasal dari galur liar *Weissella confusa* MBFCNC-2(1). Plasmid vektor yang digunakan adalah sistem Gateway[®] (Invitrogen, California) yang terdiri dari pDONR201 untuk kloning dan pO-GW untuk ekspresi. Gen lengkap *ftfCNC-2(1)* berukuran 3.534 pasang basa sudah disubmit di GenBank NCBI dengan *accession number* (AN) GQ GQ466164.1. Klon gen tersebut diperoleh dari hasil kloning dengan beberapa kali melakukan *inverse* PCR (iPCR). Pada sistem kloning untuk ekspresi tersebut dirancang *tag* berupa deretan asam amino histidin sebanyak 12 kali untuk proses purifikasi menggunakan kolom Ni-NTA. (Malik, A., 2009).

Secara sederhana prinsip kerja GATEWAY[®] *cloning system* dapat dilihat pada gambar berikut ini.



Skema kloning dengan sistem Gateway[®]

Lampiran 2

Spesifikasi Sel Kompeten *E. coli* TOP10

invitrogen
by life technologies™

Quick Order | Indonesia

Products & Services | Applications | Brands | Guides | Support

Search by catalog number or keyword 0 Items

Product Details

Invitrogen Life Science > Products & Services > Competent Cells & Strains > Cloning Competent Cells > One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* Print Email

One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*
Cat. No. **C4040-10**

Related Product Types

- Cloning Competent Cells
- Expression Competent Cells
- Other Competent Cells & Strains

TOP10 *E. coli* are provided at a transformation efficiency of 1×10^9 cfu/ μ g supercoiled DNA and are ideal for high-efficiency cloning and plasmid propagation. They allow stable replication of high-copy number plasmids. The genotype of TOP10 cells is similar to the DH10B™ strain, and offers the following features:

- hsdR for efficient transformation of unmethylated DNA from PCR amplifications
- mcrA for efficient transformation of methylated DNA from genomic preparations
- lacZ Δ M15 for blue/white color screening of recombinant clones
- endA1 for cleaner preparations of DNA and better results in downstream applications due to the elimination of non-specific digestion by Endonuclease I
- recA1 for reduced occurrence of non-specific recombination in cloned DNA

One Shot® TOP10 Kits are available with either chemically competent or electrocompetent *E. coli* to fit your specific transformation needs. TOP10 *E. coli* are also available in the high-throughput MultiShot™ format. [Less](#)

Cat. No. C4040-10
Unit Size 10 reactions
[See all sizes available](#)

Price (USD)
Contact Us

Qty N/A

Related Applications

- Transformation

Product Systems

Lampiran 3

Spesifikasi Sel Kompeten *E. coli* BL21 Star™
[My Account](#) | [Order Status](#) | [Quick Order](#)
 [Search](#) [View Cart](#) **0 Items** [Checkout](#)
Related Product Types
[Cloning Competent Cells](#)
[Expression Competent Cells](#)
[Other Competent Cells & Strains](#)

 Invitrogen Life Science > Products & Services > Competent Cells & Strains > Expression Competent Cells > OneShot® BL21
 [Print](#) [Email](#)
OneShot® BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent *E. coli*
 Cat. No. C6010-03

BL21 Star™ *E. coli* strains are high-performance BL21 hosts designed for improving protein yield in a T7 promoter-based expression system. Because T7 RNA polymerase synthesizes mRNA more rapidly than *E. coli* RNA polymerases, transcription from the T7 promoter is uncoupled to translation in *E. coli*. This results in mRNA transcripts unprotected by ribosomes, which are then subject to enzymatic degradation by endogenous RNases (1). The reduced level of transcripts in the cell often leads to greatly reduced levels of protein yield (Figure 1). The BL21 Star™ strains contain a mutation in the gene encoding RNaseE (*rne131*), which is one of the major sources of this mRNA degradation (2). BL21 Star™ cells significantly improve the stability of mRNA transcripts and increase protein expression yield from T7 promoter-based vectors (3) (Figure 2).

BL21 Star™(DE3) is ideal for expressing proteins that are non-toxic to *E. coli*.

BL21 Star™(DE3)pLysS offers lower basal-level expression of heterologous genes than BL21 Star™(DE3). It is designed for expressing proteins that are slightly growth inhibitory to *E. coli*.

 Cat. No. C6010-03
 Unit Size 20 reactions

Price (USD)

[Contact Us](#)

Qty N/A

Related Applications


Protein Expression Systems & Vectors

Product Systems
 BL21 Star™ Chemically Competent Cells
 pRSET-EmoFP, pRSET-CFP
 and pRSET-BFP Vectors

Lampiran 4

Certificate of Analysis PageRuler™ prestained protein ladder

[Fermentas, USA]

 **Fermentas**
LIFE SCIENCES

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.

SM067_57_9.doc

ISO 9001
CERTIFIED
www.fermentas.com

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-H₂PO₄ (pH 7.5 at 25°C), 1 mM EDTA, 2% (w/v) SDS, 10 mM DTT, 1 mM NaN₃, and 33% (v/v) glycerol).

Applications

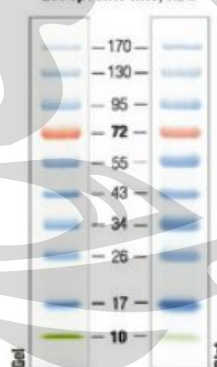
- Monitoring of protein separation during SDS-PAGE (1).
- Verifying Western transfer efficiency (2, 3).
- Approximate sizing of proteins on SDS-polyacrylamide gels and Western blots.

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.
- 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


Universitas Indonesia

Lampiran 4 (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 radioiodinated 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 for Material Safety Data Sheet of the product.

Lampiran 5
Skema Alur Kerja Penelitian

