



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI ENZIM SUKROSAFOSFORILASE REKOMBINAN
DARI *Escherichia coli* BL-21 STAR™ DAN ESEI AKTIVITAS
TRANSGLIKOSILASI TERHADAP SUBSTRAT ASAM KOJAT**

SKRIPSI

**FURQON DWI CAHYO
0806398234**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI ENZIM SUKROSAFOSFORILASE REKOMBINAN
DARI *Escherichia coli* BL-21 STAR™ DAN ESEI AKTIVITAS
TRANSGLIKOSILASI TERHADAP SUBSTRAT ASAM KOJAT**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains

**FURQON DWI CAHYO
0806398234**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 12 Juli 2012



Furqon Dwi Cahyo

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

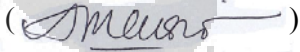
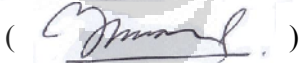
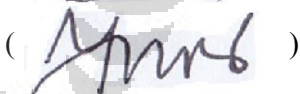
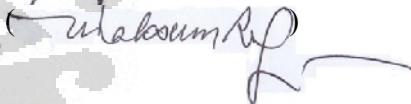
Nama : Furqon Dwi Cahyo
NPM : 0806398234
Tanda Tangan : 
Tanggal : 12 Juli 2012 .

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Furqon Dwi Cahyo
NPM : 0806398234
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Isolasi Enzim Sukrosafosforilase Rekombinan dari
Escherichia coli BL-21Star™ dan Esei Aktivitas
Transglukosilasi terhadap Substrat Asam Kojat.

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Amarila Malik, M.Si. ()
Pembimbing II : Dr. Herman Suryadi, M.S. ()
Penguji I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt. ()
Penguji II : Prof. Maksum Radji, M. Biomed., Ph.D. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 12 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji serta syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT., karena atas rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Dalam proses penelitian sampai penulisan skripsi ini, penulis banyak sekali mendapat bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan kali ini penulis ingin mengucapkan rasa terima kasih kepada:

- (1) Ibu Dr. Amarila Malik, M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian, sabar dalam membimbing penulis serta banyak memberikan dukungan yang sangat bermanfaat berupa nasehat, ilmu, dan motivasi selama penelitian berlangsung dan penyusunan skripsi.
- (2) Bapak Dr. Herman Suryadi, M.S. selaku dosen pembimbing II yang membimbing serta memberikan ilmu dan nasihat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
- (3) Lembaga Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) Universitas Indonesia yang telah memberikan Hibah Riset Kolaborasi Internasional Universitas Indonesia no.924/H2.R21/ppm.001.01/2011.
- (4) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., selaku Kepala Departemen Farmasi FMIPA UI.
- (5) Seluruh Staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia atas Ilmu pengetahuan, pengalaman nasihat serta Motivasi yang diberikan kepada penulis.
- (6) Seluruh laboran serta staf karyawan Farmasi terutama Mbak Catur dan Mas Tri yang telah banyak membantu penulis selama masa pendidikan dan penelitian.
- (7) Orang tua penulis yang telah memberikan dukungan penuh baik secara materi maupun non materi.
- (8) Rekan peneliti Laboratorium Bioteknologi dan teman-teman satu

angkatan farmasi 2008 atas kerjasama, suka duka, motivasi, dan bantuan yang diberikan kepada penulis.

- (9) Serta seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah berjasa dan berarti bagi penulis.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini jauh dari sempurna, dan penulis mengharapkan saran serta kritik yang membangun. Akhir kata, penulis berharap Allah SWT. membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis
2012



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

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

Nama : Furqon Dwi Cahyo
NPM : 0806398234
Program Studi : Sarjana
Departemen : Farmasi
Fakultas : MIPA
Jenis karya : Skripsi

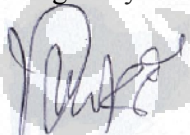
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Isolasi Enzim Sukrosafosforilase Rekombinan dari *Escherichia coli* BL-21 StarTM dan Esei Aktivitas Transglukosilasi terhadap Substrat Asam Kojat.

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan 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 : Depok
Pada tanggal : 12 Juli 2012
Yang menyatakan


(Furqon Dwi Cahyo)

ABSTRAK

Nama : Furqon Dwi Cahyo
Program Studi : Farmasi
Judul : Isolasi Enzim Sukrosafosforilase Rekombinan dari *Escherichia coli* BL-21StarTM dan Esei Aktivitas Transglukosilasi terhadap Substrat Asam Kojat.

Sukrosafosforilase (SPase) merupakan suatu enzim yang dapat mengkatalisis reaksi pemindahan gugus glukosil dari molekul donor ke suatu molekul aseptor (glukosilasi). Glukosilasi telah banyak dimanfaatkan, terutama untuk meningkatkan stabilitas dan karakteristik suatu senyawa bioaktif. Pada penelitian ini dilakukan isolasi SPase dari bakteri *Escherichia coli* BL-21 STARTM rekombinan yang membawa gen penyandi sukrosafosforilase asal *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3(1). Uji konfirmasi berat molekul enzim telah berhasil dilakukan dengan SDS PAGE dan ditunjukkan bahwa berat molekul SPase rekombinan berkisar antara 45—66 kDa, hal tersebut sesuai dengan studi sebelumnya. Aktivitas enzim diketahui dengan metode spektrofotometri dan didapatkan bahwa aktivitas relatif SPase rekombinan sebesar 98,5%. Esei aktivitas transglukosilasi SPase rekombinan terhadap substrat asam kojat telah berhasil dilakukan. Berdasarkan pengamatan KLT Densitometer, didapatkan bahwa produk transglukosilasi hasil esei aktivitas transglukosilasi SPase rekombinan dan SPase standar terhadap asam kojat memiliki kemiripan.

Kata Kunci : SPase, Sukrosafosforilase, esei aktivitas transglukosilasi enzim, Asam Kojat, Asam Kojat Glukosida, AKG.
xvii+72 halaman; 36 gambar; 9 tabel, 13 lampiran
Daftar Pustaka : 33 (1931-2011)

ABSTRACT

Name : Furqon Dwi Cahyo
Program Study : Pharmacy
Title : Isolation of Recombinant Sucrose Phosphorylase Enzyme from
Escherichia coli BL-21 Star™ and Its Transglycosylation Activity
Assay using Kojic Acid as Substrate

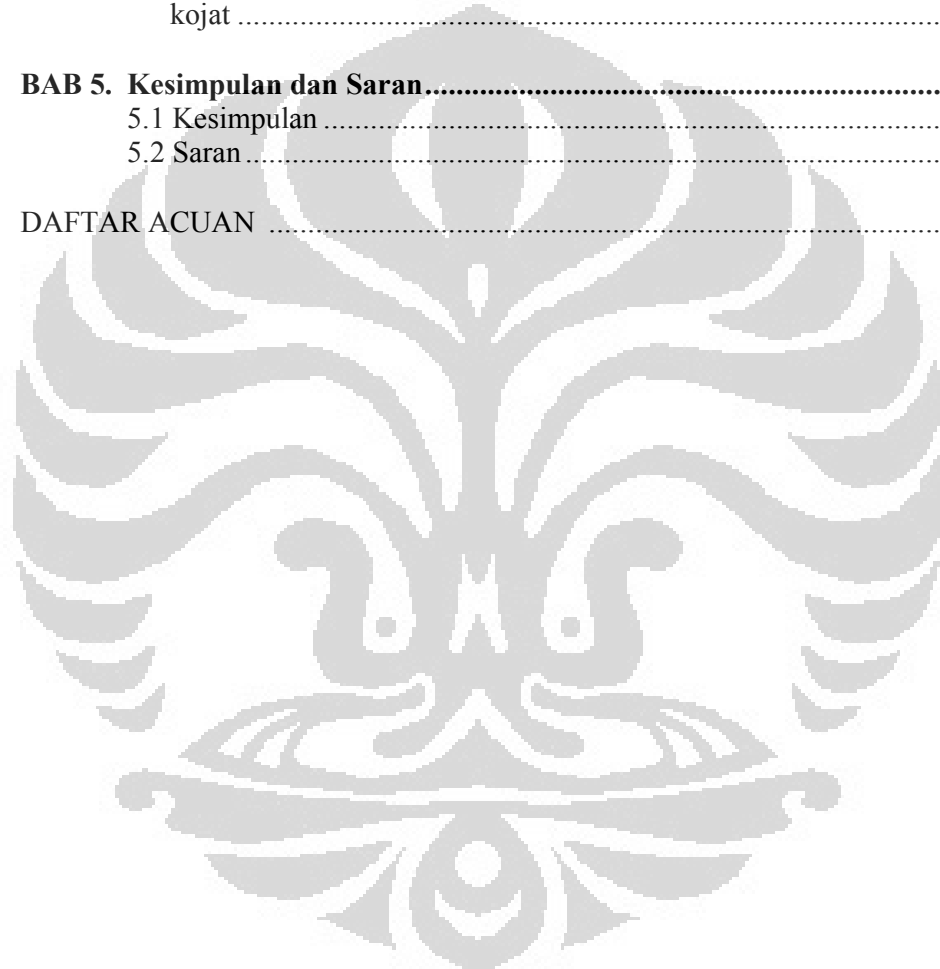
Sucrose Phosphorylase (SPase) is an enzyme that catalyzes glucosyl transfer reaction from donor molecules to acceptor molecules (glucosylation). Glucosylation has been used for many things, especially to increase chemical stability and improving characteristic of several bioactive compounds. In this study SPase has isolated from *Escherichia coli* BL-21 STAR™ recombinants that carried gene of SPase expression from *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3(1). Confirmation of molecular weight has done by SDS PAGE and showed that the molecular weight of SPase was in range 66—45 kDa, as reported in other existed SPase studies. The activity enzyme obtained by using the spectrophotometric method, and performed relative activity 98.5 %. Transglucosylation activity assay of SPase recombinant has done to kojic acid. Based on TLC Densitometry analyzes, transglucosylation product of SPase recombinant was similarly to transglucosylation product of SPase standart.

Keywords : SPase, sucrose phosphorylase, enzymatic activity,
glucosylation, SDS PAGE, KAG.
xvii+ 72 pages : 36 pictures; 9 tables; 13 appendixes
Bibliography : : 33 (1931-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1. 1 Latar Belakang	1
1. 2 Tujuan	3
BAB 2 Tinjauan Pustaka	4
2.1 Sukrosafosforilase	4
2.2 Bakteri Penghasil Sukrosafosforilase	6
2.3 Bakteri <i>Escherichia coli</i> BL-21 Star™	7
2.4 Asam Kojat	8
2.4.1 Sifat Fisika Kimia Asam Kojat	9
2.4.2 Asam Kojat Terglikolisasi.....	9
2.5 Pengukuran Konsentrasi Protein dengan Metode BCA	10
2.6 Elektroforesis Gel Poliakrilamid	11
2.7 Analisis Aktivitas Sukrosafosforilase	11
2.8 Kromatografi Lapis Tipis.....	12
BAB 3 Metode Penelitian	15
3.1 Lokasi Penelitian	15
3.2 Alat	15
3.3 Bahan	15
3.3.1 Sampel.....	15
3.3.2 Bahan Kimia	15
3.3.3 Medium dan Pembuatan Medium.....	16
3.3.4 Pembuatan Larutan Dapar dan Perekasi	17
3.4 Cara Kerja	21
3.4.1 Pembiakan dan Peremajaan Kultur.....	21
3.4.2 Pembuatan Kultur Inokulum cair dan Pemanenan sel.....	21
3.4.3 Pemecahan Sel dan Perolehan Supernatan.....	22
3.4.4 Pemurnian Protein Rekombinan.....	22
3.4.5 Eletroforesis Gel Poliakrilamid	22
3.4.6 Pengukuran Konsentrasi Protein Rekombinan.....	24
3.4.7 Esei Aktivitas Enzim	25
3.4.8 Esei Aktivitas Transglukosilasi Enzim SPase Terhadap Asam Kojat.....	26

BAB 4. Hasil dan Pembahasan	27
4.1 Pembiakan dan Peremajaan Kultur	27
4.2 Pembuatan Kultur Inokulum	27
4.3 Pembuatan Kultur Cair dan Pemanenan Sel	28
4.4 Pemecahan Sel dan Perolehan Supernatan	29
4.5 Pemurnian Protein Rekombinan	29
4.6 Elektroforesis Gel Poliakrilamid	30
4.7 Pengukuran Konsentrasi Enzim SPase dengan metode BCA	32
4.8 Esei Aktivitas Enzim SPase	34
4.9 Analisa Hasil Esei Aktivitas Transglukosilasi SPase terhadap asam kojat	38
 BAB 5. Kesimpulan dan Saran	 43
5.1 Kesimpulan	43
5.2 Saran	43
 DAFTAR ACUAN	 44



DAFTAR GAMBAR

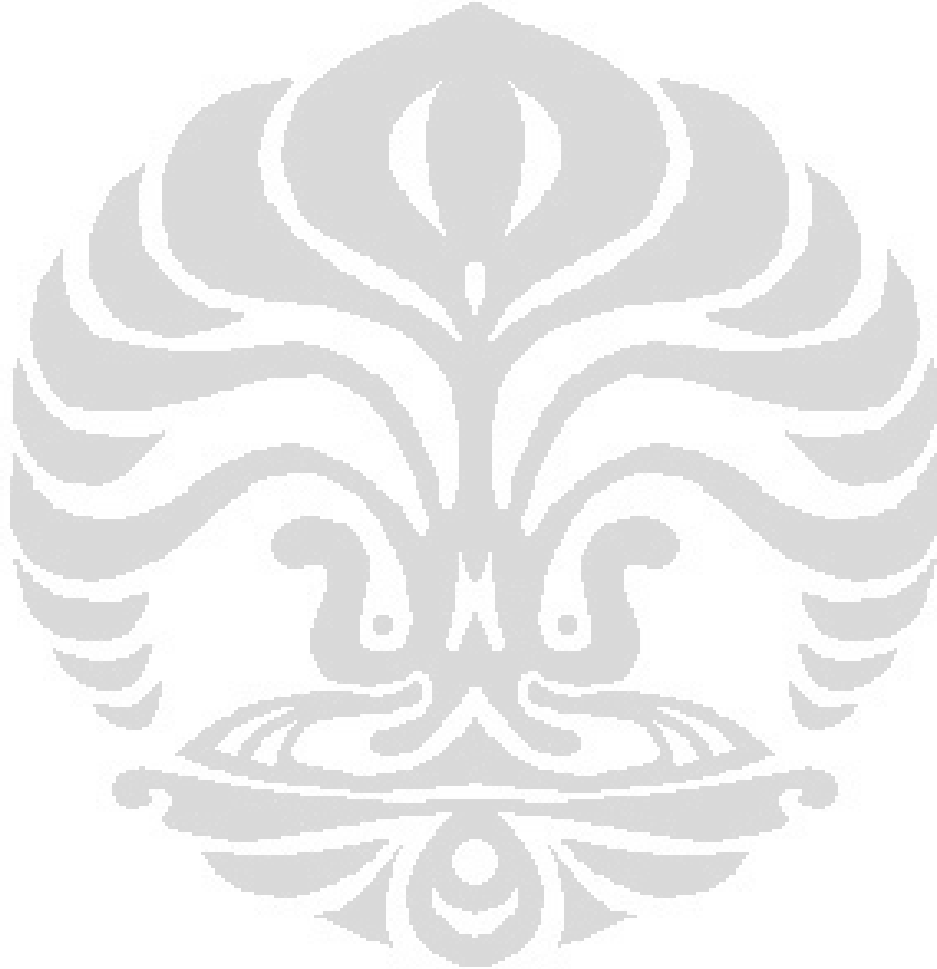
Gambar 2.1	Mekanisme Aksi Enzim Sukrosafosforilase.....	5
Gambar 2.2	Plasmid rekombinan pAW SPase WRS-3(1) mengandung 1,7 kb DNA insert yang mengandung 1,476-bp <i>spWRS-3(1)</i>	7
Gambar 2.3	Struktur Asam kojat	9
Gambar 2.4	Struktur Asam kojat Terglikosilasi Pada posisi C-7 (A), dan posisi C-5 (B).....	10
Gambar 2.5	Analisis Kromatografi Lapis Tipis.....	13
Gambar 2.6	Perbandingan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Sampel dengan Standart	14
Gambar 3.1	Skema SDS PAGE	24
Gambar 3.2	Alat-alat yang Digunakan	66
Gambar 4.1	Kultur <i>E. coli</i> BL-21 STAR™ rekombinan dalam medium agar	27
Gambar 4.2	Gambar inokulum cair: [A] Setelah Inkubasi, dan [B] Sebelum Inkubasi	28
Gambar 4.3	Pelet sel.....	28
Gambar 4.4	Gel SDS PAGE dengan Konsentrasi gel pemisah 15 %.....	30
Gambar 4.5	Hasil SDS PAGE pada Konsentrasi gel pemisah Sebesar 10 %	31
Gambar 4.6	Kurva Kalibrasi BSA	33
Gambar 4.7	Kurva Hubungan antara Suhu dan Aktivitas relatif Enzim SPase Rekombinan terhadap SPase standart	35
Gambar 4.8	Kurva Hubungan antara pH dan Aktivitas relatif Enzim SPase Rekombinan terhadap SPase standart.	36
Gambar 4.9.	Reaksi Lengkap Esei Aktivitas Enzim SPase.....	37
Gambar 4.10.	Perbandingan serapan antara NADH,NADPH dengan NAD ⁺ NADP ⁺	38
Gambar 4.11.	Serapan Hasil Reaksi Esei Aktivitas.....	38
Gambar 4.12.	Pengamatan KLT Hasil Reaksi pada berbagai waktu inkubasi ..	39
Gambar 4.13.	Grafik Transfer Ratio Pada berbagai waktu inkubasi.....	41
Gambar 4.14.	Kurva Hubungan Antara Serapan Aktivitas Enzim SPase Standar dan Rekombinan terhadap Variasi Suhu	47

Gambar 4.15. Kurva Hubungan Antara Serapan Aktivitas Enzim SPase Standar dan Rekombinan terhadap Variasi pH	48
Gambar 4.16 Kromatogram KLT Densitometer Kontrol Negatif Esei Aktifitas Transglikosilasi terhadap Asam Kojat yang Diinkubasi selama 7 Jam	49
Gambar 4.17 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglikosilasi SPase Standar terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 7 jam	50
Gambar 4.18 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglikosilasi SPase Rekombinan terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 7 Jam	51
Gambar 4.19 Kromatogram KLT Densitometer Kontrol Negatif Esei aktivitas Transglikosilasi terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 8 Jam	52
Gambar 4.20 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglikosilasi SPase Standart terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 8 jam	53
Gambar 4.21 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglikosilasi SPase Rekombinan terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 8 Jam	54
Gambar 4.22 Kromatogram KLT Densitometer Kontrol Negatif Esei aktivitas Transglikosilasi terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 12 Jam	55
Gambar 4.23 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglikosilasi SPase Standart terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 12 Jam	56
Gambar 4.24 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglikosilasi SPase Rekombinan terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 12 jam	57
Gambar 4.25 Kromatogram KLT Densitometer Kontrol Negatif Esei aktivitas Transglikosilasi terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama Inkubasi 24 Jam	58

Gambar 4.26 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglikosilasi
SPase Standar terhadap Asam kojat yang Diinkubasi Inkubasi 24
jam..... 59

Gambar 4.27 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglikosilasi
SPase Rekombinan terhadap Asam kojat yang Diinkubasi Inkubasi
24 Jam..... 60

Gambar 4.28 Spektrum Serapan Semua Bercak Analisis KLT Densitometer ... 61



DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Konsentrasi Kurva Kalibrasi BSA Standar.....	25
Tabel 4.1.	Kurva Kalibrasi BSA.....	33
Tabel 4.2	Hubungan antara suhu inkubasi dan Aktivitas Enzim SPase standart (KIRI) dan enzim SPase rekombinan (KANAN).....	47
Tabel 4.3	Hubungan antara pH dan Aktivitas Enzim SPase standart (KIRI) dan SPase Rekombinan (KANAN).....	48
Tabel 4.4	Hubungan antara pH dan Aktivitas relatif Enzim SPase Rekombinan terhadap SPase standart	34
Tabel 4.5	Hubungan antara suhu inkubasi dan Aktivitas relatif Enzim SPase Rekombinan terhadap SPase standart.....	35
Tabel 4.6	Hasil analisis dengan KLT Densitometri pada berbagai waktu inkubasi.....	40
Tabel 4.7	Interpretasi Transfer Ratio	40
Tabel 4.8	Protein Standar Marker.....	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hubungan Antara Suhu dan Aktivitas Sukrosafosforilase Standar dan Rekombinan	47
Lampiran 2. Hubungan Antara pH dan Aktivitas Sukrosafosforilase Standar dan Rekombinan	48
Lampiran 3. Hasil KLT Densitometri Pada Inkubasi 7, 8, 12, dan 24 jam.....	49
Lampiran 4. Cara memperoleh regresi linear	62
Lampiran 5. Sekuens Asam Amino SPase WRS-3(1) dan perbandingan dengan 1355SPase dan 1149SPase.....	63
Lampiran 6. Skema Penelitian.....	64
Lampiran 7. Marker SDS-PAGE (GE Healthcare Amersham).....	65
Lampiran 8. Alat-alat yang digunakan.....	66
Lampiran 9. Sertifikat Analisis Sukrosafosforilase standar	68
Lampiran 10. Sertifikat Analisis Glukosa-6-fosfat dehidrogenase	69
Lampiran 11. Sertifikat Analisis Glukosa-1,6-bifosfat.....	70
Lampiran 12. Sertifikat Analisis NADP ⁺	71
Lampiran 13. Sertifikat Analisis Asam Kojat	72

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 . Latar Belakang

Sukrosafosforilase (*disaccharide glucosyltransferase*, EC 2.4.1.7) merupakan enzim anggota dari kelas fosforilase yang merupakan anggota 13 dari *glycosyl hydrolase*. Enzim tipe ini, pertama kali ditemukan oleh Kagan et al. pada tahun 1942 (van den Broek, van Boxtel, Kievit, Verhoef, Beldman, & Voragen, 2004). Enzim tersebut telah banyak digunakan sebagai katalisator reaksi glikosilasi, salah satu reaksi yang sudah dikenal pada tahun 70-an yaitu konversi reversibel dari sukrosa dan fosfat inorganik menjadi α -D-glukosa-1-fosfat dan fruktosa (Sylverstein, Voet, Reed, & Abeles, 1967; Shin, Cheong, Lee, & Kim, 2009).

Sukrosafosforilase telah berhasil diperoleh dan dikarakterisasi dari beberapa organisme, antara lain sukrosafosforilase yang dihasilkan oleh *Pseudomonas saccharophila*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Clostridium pasteurianum*, *Pullularia pullulans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Agrobacterium vitis* dan *Streptococcus mutans* (Kitao & Sekine, 1994; van den Broek, van Boxtel, Kievit, Verhoef, Beldman, & Voragen, 2004; Shin, Jung, Lee, Kim, & Kim, 2008). Penelitian lebih lanjut dilaporkan telah berhasil mengklon gen penyandi SPase dari berbagai sumber organisme penghasil sukrosafosforilase ke *E.coli*. Beberapa macam gen yang telah berhasil diklon adalah gen penyandi sukrosafosforilase diklon dari berbagai macam strain *L. mesenteroides*, yaitu gen klon (*1149sp*), dan (*742sp*) dari strain B-1149, dan NRRL B-742 yang dan menghasilkan protein *1149SPase* (60 kDa) dan *742SPase* (55,3 kDa) (Lee, et al., 2008; Lee, Yoon, Nam, moon, moon, & Kim, 2006), gen klon *1355SPase* dari strain NRRL B-1355 yang menghasilkan protein *1355SPase* (56,6 kDa) (Abada, Osman, Lee, & Kim, 2008), dan gen klon *spWRS-3(1)* dari strain MBFWRS-3(1) yang menghasilkan *SPaseWRS-3(1)* (57 kDa) (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011). Kloning gen SPase dilaporkan juga dapat dihasilkan dari organisme lain, diantaranya adalah gen penyandi SPase *splP* dan *splR* dari

Bifidobacterium longum SJ32 yang menghasilkan protein SPase 56 kDa (Kim, et al., 2003), gen klon *sucP* penyandi enzim sukrosafosforilase 56,189 Da dari *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083 (Shin, Jung, Lee, Kim, & Kim, 2008), dan gen klon *supE* dari *S. mutans* (Nomura, et al., 2008). Sumber penghasil enzim SPase yang beragam telah menghasilkan biodiversitas enzim SPase yang tinggi dan perlu untuk dipelajari lebih lanjut.

Aktivitas beberapa tipe enzim SPase dilaporkan memiliki spesifitas reseptor yang luas (*broad range receptor*). Tipe enzim SPase yang mempunyai spesifitas reseptor berspektrum luas salah satunya adalah SPase yang berasal dari *L. mesentroides* yang berhasil menunjukkan aktivitas reaksi transglukosilasi asam kojat, yang mengubah asam kojat menjadi asam kojat-5-O- α -D-glukopiranosid dan asam kojat-7-O- α -D-glukopiranosid (Kitao & Sekine, 1994). Selain itu enzim dari spesies *L. mesentroides* juga mampu memberikan aktivitas transglukosilasi pada senyawa-senyawa bioaktif lainnya, seperti asam benzoat, katekin, dan rutin, menjadi bentuk glukosidanya (Kitao & Sekine, 1994; Sugimoto, et al., 2007). Enzim SPase yang memiliki spektrum spesifitas reseptor yang luas, dilaporkan juga pada enzim SPase dari *B. longum*, dan *S. mutans*. SPase asal *B. longum* menunjukkan aktivitas transglukosilasi terhadap asam askorbat, dan asam kafeat. (Shin, Cheong, Lee, & Kim, 2009; Kwon, Kim, & Lee, 2007). Sedangkan SPase asal *S. mutans* menunjukkan aktivitas transglukosilasi terhadap asam asetat (Nomura, et al., 2008), dan asam benzoat (Sugimoto, et al., 2007).

Penelitian sebelumnya telah berhasil dikonstruksi dan ditransformasi plasmid penyandi SPase (pAM_SPaseWRS-3(1)) asal *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3(1) ke dalam bakteri rekombinan *E. coli* BL-21 Star™, serta diteliti ekspresinya (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011). Enzim tersebut mempunyai berat molekul sekitar 57 kDa. Kemiripan urutan residu asam amino SPaseWRS-3(1) dengan anggota SPase *L. mesentroides* satu pohon Filogenetik cukup tinggi, yaitu antara 84—98%, terutama dengan protein *1149SPase* dan *1355SPase* (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011).

Pada penelitian ini dilakukan ekspresi dan isolasi SPase WRS-3(1) dari *E.*

coli BL-21 Star™ dalam skala besar. Kemudian terhadap enzim tersebut dilakukan uji pendahuluan, untuk mengkonfirmasi berat molekul, yaitu sekitar 57 kDa, konsentrasi enzim, serta aktivitas relatifnya dengan pembandingan SPase baku dari *Leuconostoc mesenteroides*. Uji aktivitas transglukosilasi lanjutan dilakukan dengan melibatkan senyawa bioaktif asam kojat.

Model esei aktivitas Asam Kojat dianggap potensial. Asam Kojat mempunyai sifat yang kurang baik kelarutannya dalam air, serta dapat bersifat iritatif terhadap kulit. Bentuk asam kojat terglukosilasi mampu memperbaiki sifat-sifat tersebut (Kitao & Sekine, 1994). Asam kojat mempunyai gugus-gugus hidroksil, fenol dan alkohol, yang potensial sebagai akseptor gugus glukosil dari senyawa donornya, yaitu sukrosa.

1. 2. Tujuan

1. Memperoleh produk enzim Sukrosafosforilase rekombinan dari *Escherichia coli* BL-21 Star™ dalam skala besar.
2. Mempelajari karakter enzim Sukrosafosforilase rekombinan, berdasarkan bobot molekul, dan aktivitas.
3. Mengetahui aktivitas transglukosilasi enzim sukrosafosforilase rekombinan terhadap asam kojat.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sukrosafosforilase

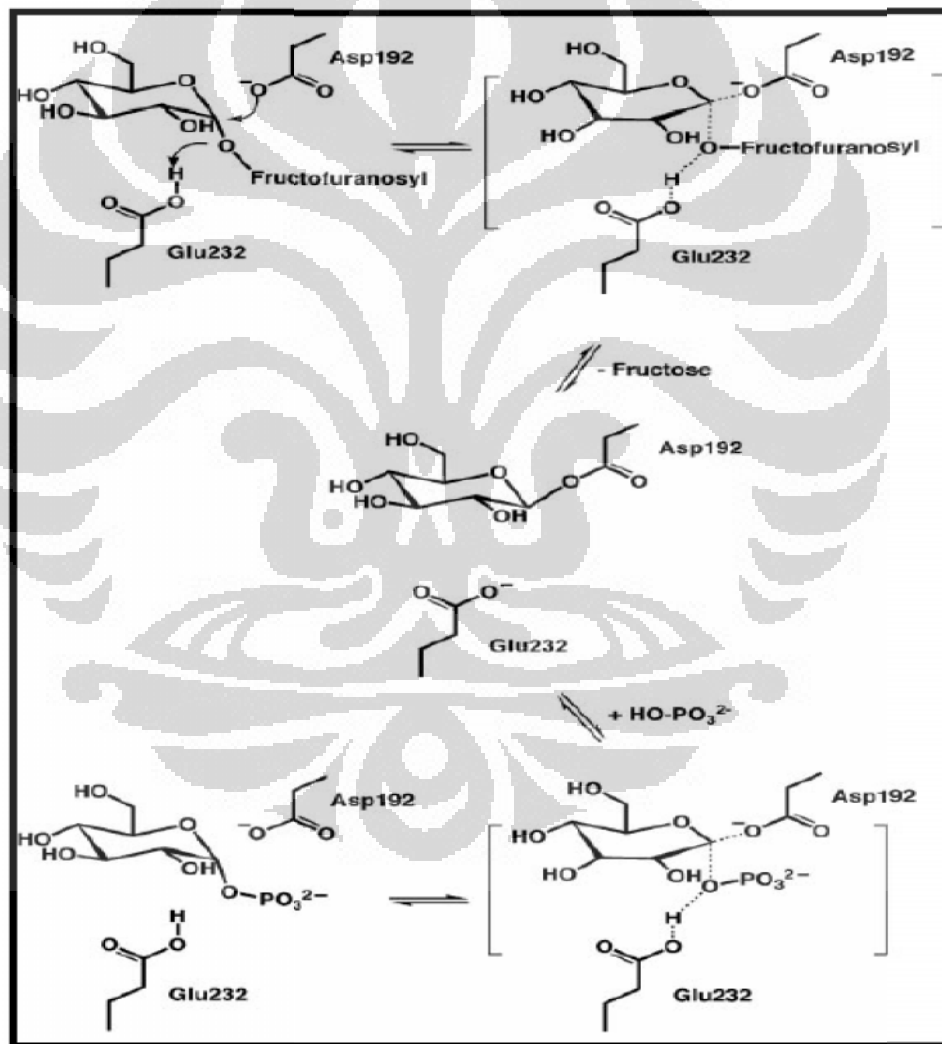
Sukrosafosforilase (*disaccharide glucosyltransferase*, EC 2.4.1.7) dapat mengkatalisis sejumlah reaksi pemindahan gugus glukosil misalnya reaksi yang mengkatalisis sukrosa menjadi glukosa-1-fosfat dengan adanya fosfat inorganik (Kitao & Sekine, 1994; Sylverstein, Voet, Reed, & Abeles, 1967). SPase pertama kali dilaporkan dari *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 1229, kemudian SPase lainnya juga dilaporkan berhasil dimurnikan dari berbagai bakteri, seperti *Pseudomonas saccharophila* dan *Pseudomonas putrefaciens*, *Streptococcus mutans* dan *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. (Lee, Yoon, Nam, moon, moon, & Kim, 2006).

Sukrosafosforilase (SPase) adalah anggota dari kelas fosforilase yang merupakan anggota 13 dari glikosil hidrolase (Henrissat, 1991). Sukrosafosforilase dapat memindahkan gugus glukosil dari α -D-glukosa-1-fosfat (G-1-P) dan sukrosa ke sejumlah molekul aseptor misalnya asam asetat dan senyawa-senyawa alkohol serta fenol (Kitao & Sekine, 1994). Sukrosafosforilase tersusun atas empat domain yang disebut domain A, B, B', dan C. Domain A, B', dan C terdapat sebagai dimer disekeliling sisi aktif enzim (Sprogøe, D. et al., 2004).

Sukrosafosforilase dapat dihasilkan dari berbagai sumber organisme. hal tersebut berdampak pula pada karakteristik serta aktivitas reaksi transglukosilasi enzim. Reaksi transglukosilasi merupakan suatu reaksi transfer glukosil dari senyawa donor glukosil, seperti sukrosa dan golongan gula lainnya, ke senyawa aseptor gugus glukosil, seperti gugus hidroksil (OH) baik berupa gugus fenol ataupun alkohol dan gugus karboksil (COO) (Kitao & Sekine, 1994; Sugimoto, et al., 2007). Reaksi glukosilasi pada awalnya dilakukan ke unsur sederhana fosfat inorganik menjadi α -D-glukosa-1-phosphate (G-1-P) (Sylverstein, Voet, Reed, & Abeles, 1967). Namun pada studi terakhir dilaporkan bahwa beberapa type enzim SPase tertentu mempunyai spesifitas reseptor yang luas sehingga mempunyai aktivitas yang mampu mengkatalisis reaksi transglukosilasi pada beberapa

senyawa lain (Kitao & Sekine, 1994).

Enzim Sukrosafosforilase mengkatalisis reaksi konversi sukrosa menjadi D-fruktosa dan α -D glukosa-1-fosfat, mekanisme reaksi konversi tersebut yaitu sukrosa terlebih dahulu berikatan dengan sisi aktif enzim dan melepaskan D-fruktosa (Lihat gambar 2.1). Gugus glukosa yang masih terikat dengan enzim membentuk kompleks glukosa-enzim dengan ikatan beta antara atom oksigen dari gugus karboksil residu aspartat dengan atom C-1 dari glukosa. Reaksi tahap akhir adalah pemecahan ikatan glikosida menghasilkan α -D-glukosa-1-fosfat (Mirza, et al., 2006).



[Sumber : Mirza, et al., 2006]

Gambar 2.1 Mekanisme Aksi Enzim Sukrosafosforilase

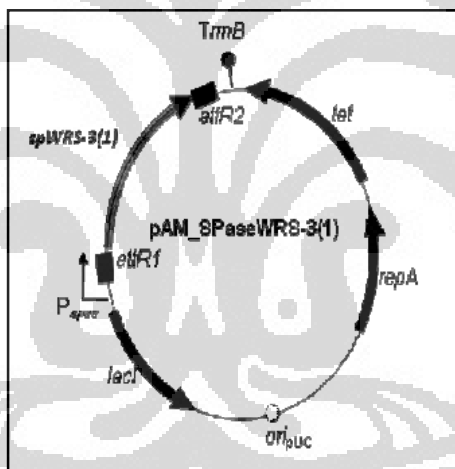
2.2 Bakteri Penghasil Sukrosafosforilase

Bakteri penghasil Sukrosafosforilase (SPase; EC 2.4.1.7) merupakan bakteri asam laktat (BAL). Bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif berbentuk batang dan bulat yang dapat menghasilkan asam laktat. Anggota dari jenis bakteri ini mendapatkan energi hanya dari hasil metabolisme gula. Bakteri asam laktat merupakan bakteri anaerobik. Tidak seperti bakteri anaerobik lainnya, bakteri asam laktat tidak sensitif terhadap O₂ dan tetap dapat tumbuh dengan adanya O₂ sehingga mereka juga sering disebut sebagai *aerotolerant anaerobs* (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011).

Spesies bakteri yang secara alami menghasilkan sukrosafosforilase, antara lain *Pseudomonas saccharophila*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Clostridium pasteurianum*, *Pullularia pullulans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Agrobacterium vitis* dan *Streptococcus mutans* (Kitao & Sekine, 1994; van den Broek, van Boxtel, Kievit, Verhoef, Beldman, & Voragen, 2004; Shin, Jung, Lee, Kim, & Kim, 2008). Namun, Penelitian terakhir melaporkan bahwa gen penyandi sukrosafosforilase dapat diekspresikan pada bakteri rekombinan, diantaranya ialah beberapa gen penyandi sukrosafosforilase diklon dari berbagai macam strain *L. mesenteroides*, yaitu gen klon (742sp) dari strain NRRL B-742 yang dan menghasilkan protein 742SPase (55,3 kDa) (Lee, et al., 2008), gen klon 1355SPase dari strain B-1355 yang menghasilkan protein 1355SPase (56,6 kDa), dan gen klon *spWRS-3(1)* dari strain MBFWRS-3(1) yang menghasilkan *SPaseWRS-3(1)* (57 kDa) (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011). Kloning gen SPase dilaporkan juga dapat dihasilkan dari organisme lain, diantaranya adalah gen penyandi SPase *spLP* dan *spLR* dari *Bifidobacterium longum* SJ32 yang menghasilkan protein SPase 56 kDa (Kim, et al., 2003), gen klon *SucP* penyandi enzim sukrosafosforilase 56,189 Da dari *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083 (Shin, Jung, Lee, Kim, & Kim, 2008), dan gen klon *supE* dari *S. mutans* (Nomura, et al., 2008).

Berbagai macam metode dan strategi kloning untuk menghasilkan bakteri rekombinan telah dilakukan oleh banyak peneliti, dan yang terbaru adalah kloning SPase dari *Leuconostoc mesenteroides* MBWRS-3(1), yang menghasilkan SPase

WRS-3(1) 57 kDa (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011). Pada penelitian tersebut dilakukan kloning 1476-bp gen *spWRS-3(1)* fragmen dari *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3 (1), yang kemudian diekspresikan oleh dua jenis *host*, yaitu *E. coli* DH5 α dan *E. coli* BL21 StarTM. Strategi mengekspresikannya adalah dengan mengisolasi DNA genom dari sumber organisme asalnya yaitu *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3 (1), yang kemudian dilakukan amplifikasi konstruksi dengan metode PCR yang menggunakan sistem pDONR201 hingga menjadi fragmen *spWRS-3(1)*, fragmen gen tersebut didisain sehingga sesuai dengan vektor tujuan, yaitu pO-GW. Selanjutnya fragmen *spWRS-3(1)* dan vektor pO-GW diligasi dengan enzim LR-clonase^R menjadi pAM_SPase WRS-3(1) seperti terlihat pada gambar 2.2, yang kemudian ditransformasikan dengan metode *heat shock* ke dalam organisme *E. coli* DH5 α dan *E. coli* BL21 StarTM.



[Sumber : Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011]

Gambar 2.2 Plasmid rekombinan pAW SPase WRS-3(1) mengandung 1,7 kb DNA insert yang mengandung 1,476-bp *spWRS-3(1)*.

2.3 Bakteri *Escherichia coli* BL-21 StarTM

Bakteri *Escherichia coli* BL21 StarTM merupakan suatu strains yang cocok untuk ekspresi protein rekombinan skala besar. Strain mikroorganisme tersebut merupakan strain bakteri komersial dari Invitrogen[®] yang telah banyak digunakan untuk mengekspresikan gen heterolog dari berbagai ekspresi gen berbasis T7 vektor. Secara umum, bakteri BL21 StarTM yang tersedia dipasaran terdiri dari

dua jenis, yaitu bakteri BL21 Star™ (DE3) dan bakteri BL21 Star™ (DE3) pLysS. Bakteri *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) digunakan untuk mengekspresikan gen heterolog dengan tingkat multiplikasi yang rendah (contoh : vektor pET), sedangkan bakteri *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) pLysS digunakan untuk mengekspresikan gen heterolog dengan tingkat multiplikasi yang tinggi (misalnya Invitrogen PCR® T7 vektor) (Invitrogen™, 2010).

Strain bakteri *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) pLysS memproduksi T7 lisozim yang dapat membantu mereduksi kadar basal enzim T7 RNA polimerase sehingga menjaga agar kadar T7 RNA polimerase tidak berlebihan. Kondisi T7 RNA polimerase yang berlebihan dapat mengakibatkan peningkatan ekspresi beberapa gen. Peningkatan ekspresi gen tertentu dapat menimbulkan toksisitas terhadap sel sehingga akan menurunkan ekspresi gen protein rekombinan yang diinginkan (Robichon, Luo, Causey, Benner, & Samuelson, 2011).

Proses ekspresi protein rekombinan pada strain bakteri *Escherichia coli* perlu ditambahkan suatu penginduksi seperti IPTG. Hal tersebut dikarenakan strain bakteri *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) dan BL21 Star™ (DE3) pLysS memiliki gen polimerase T7 yang dikendalikan oleh promotor *IPTG-inducible lacUV5*. Aktivitas yang sangat tinggi T7 RNA polymerase akan terjadi, ketika *lacUV5* tidak diinduksi oleh IPTG, dengan demikian akan terjadi peningkatan beberapa ekspresi tingkat basal gen. Hal tersebut dapat berakibat buruk apabila gen yang diinginkan menyebabkan toksisitas bagi sel bakteri (Robichon, Luo, Causey, Benner, & Samuelson, 2011).

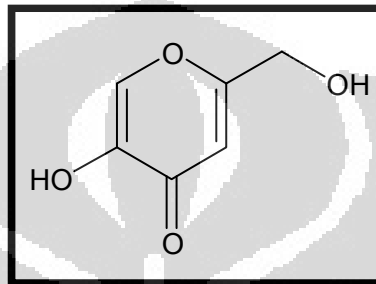
2.4 Asam Kojat

Asam Kojat merupakan senyawa yang dapat menghambat enzim tirosinase untuk menghambat pembentukan melanin, sehingga dapat dijadikan sebagai agen pemutih (Noh, Kwak, Kim, & Lee, 2006), Selain itu asam kojat juga memiliki sifat lain yang menguntungkan yaitu antioksidan, bakteriostatik, dan zat pengkelat logam. asam kojat dapat digunakan sebagai pencegah perubahan warna krustasea, daging dan sayuran segar (World Health Organization, 2001).

Asam kojat merupakan senyawa yang ditemukan pertama kali dari hasil

isolasi miselium *Aspergillus oryzae* oleh Saito pada tahun 1907, kemudian dianalisis dan dikenalkan sebagai “asam kojat” oleh Yabuta 1912 (Birkinshaw, 1931). Asam Kojat disintesis oleh jamur dari sejumlah besar senyawa karbon misalnya, mono-dan polisakarida, dan juga dari beberapa komponen mengandung atom karbon tiga dan lima dalam molekul, misalnya, gliserol dan xylose (Birkinshaw, 1931).

2.4.1 Sifat Fisika Kimia Asam Kojat



[Sumber : Merck Index edisi xiii]

Gambar 2.3 Struktur Asam kojat

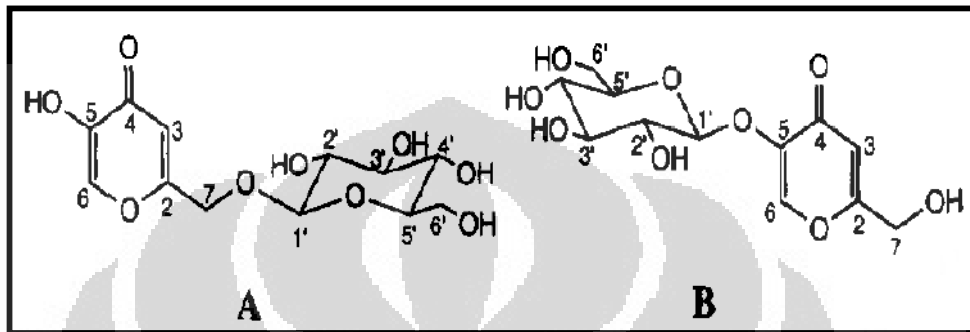
Asam Kojat (5-Hidroksi-2-(hidroksimetil)-4H-piran-4-on) merupakan suatu senyawa organik yang memiliki rumus molekul $C_6H_6O_4$ dengan berat molekul 142,11, struktur dapat dilihat pada gambar 2.3. Asam kojat larut dalam air (43,85 g/L), etanol, aseton, sedikit larut dalam eter, etil asetat, kloroform dan piridin (Merck & Co, 2001). Asam kojat memiliki pKa 7,90; 8,03 dengan titik lebur 153—154 °C.

2.4.2 Asam Kojat Terglikosilasi

Bentuk glikosida asam kojat lebih baik dibandingkan bentuk asam kojat base, hal tersebut dikarenakan bentuk glikosida mempunyai keunggulan dalam hal rasa, kelarutan terhadap air dan stabilitas terhadap cahaya dan panas (Kitao & Sekine, 1994). Asam Kojic dapat glucosylated pada kelompok hidroksil fenolik pada C-5 posisi atau gugus hidroksil primer di C-7 posisi, menghasilkan pembentukan dua regioisomers, asam kojat-5-O-alpha-D-glukopiranosida dan asam kojat 7 -O-alpha-D-glukopyranosida (Hsin-Ju, Giridhar, & Wu, 2007).

Modifikasi struktur dari gugus C-7 hidroksil asam kojat menjadi bentuk glikosida asam kojat merupakan salah satu strategi untuk memperbaiki sifat-sifat asam kojat, sehingga dapat di gunakan sebagai kosmetik ataupun obat pemutih

kulit (Noh, Kwak, Kim, & Lee, 2006). Reaksi pembentukan glikosida disebut dengan Glikosilasi. Glikosilasi merupakan metode modifikasi yang penting struktural dari berbagai senyawa eksogen, dengan menyisipkan gugus gula dari senyawa pendonor seperti galaktosa, sukrosa manosa dan golongan gula lain, reaksi ini dikatalisis oleh enzim sukrosafosforilase (Lee, et al., 2008).



[Sumber : Nakajima, Ishihara, & Hamada, 2001]

Gambar 2.4 Struktur Asam kojat Terглиkosilasi Pada posisi C-7 (A), dan posisi C-5 (B)

2.5 Pengukuran Konsentrasi Protein dengan Metode BCA

Uji asam bichoninoat (BCA assay), dikenal juga sebagai uji Smith, karena ditemukan pertama kali oleh Paul K. Smith, adalah tes biokimia untuk menentukan konsentrasi total protein dalam larutan. Uji tersebut mirip dengan uji protein Lowry, dan Bradford. Konsentrasi protein ditentukan secara kolorimetri, setelah bereaksi larutan akan berubah warna dari hijau menjadi ungu. (Schoel, Welzel, & Kaufmann, 1995; Bainor, Chang, McQuade, Webb, & Gestwicki, 2011).

Prinsip analisa konsentrasi protein dengan BCA adalah reaksi. Reduksi peptide protein ion Cu^{2+} dari sulfat tembaga (CuSO_4) menjadi Cu^+ . Jumlah ion Cu^{2+} yang tereduksi sebanding dengan jumlah protein dalam larutan tersebut. Selanjutnya, dua molekul asam bichoninoat membentuk ikatan kompleks dengan ion Cu^+ yang terbentuk di dalam larutan. Kompleks tersebut berwarna ungu dan dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 562 nm. Kompleks asam bichoninoat— Cu^+ terbentuk akibat pengaruh residu-residu asam amino seperti sistein, sistin, tirosin, dan triptofan. Pada suhu antara $37^\circ\text{—}60^\circ\text{C}$, residu-residu peptide tersebut dapat secara optimal berperan dalam

pembentukan produk kompleks hasil reaksi tersebut. Oleh karena itu, inkubasi uji konsentrasi protein BCA direkomendasikan dilakukan pada suhu yang lebih tinggi sehingga dapat meningkatkan sensitivitas uji dan meminimalkan variasi hasil akibat adanya perbedaan residu asam amino antara satu protein dengan protein lain (Bainor, Chang, McQuade, Webb, & Gestwicki, 2011).

2.6 Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Secara umum, prinsip pemisahan dengan menggunakan filtrasi gel adalah pemisahan berdasarkan ukuran molekul. Keunggulan dari teknik elektroforesis gel poliakrilamid adalah kita dapat mengestimasi ukuran protein dengan membandingkan dengan penanda protein (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977).

Secara umum, molekul protein yang memiliki berat molekul lebih rendah akan bergerak lebih jauh dari sumuran dibandingkan dengan molekul protein yang memiliki berat molekul lebih besar. Metode SDS-PAGE terbatas untuk protein dengan berat molekul antara 10,000 hingga 200,000 g/mol (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977).

Berat molekul dari protein dapat diestimasi dengan teknik elektroforesis dengan adanya deterjen sodium dodesil sulfat (SDS) dan agent pereduksi ikatan disulfide, merkaptotanol. Metode ini biasanya disebut sebagai *denaturing electrophoresis*. Ketika protein dipaparkan dengan SDS, deterjen ini akan merusak struktur sekunder, tersier, dan kwartener dari protein dan menghasilkan rantai polipeptida linear yang terselubungi oleh muatan negatif dari molekul SDS. Adanya merkaptotanol akan membantu proses denaturasi protein dengan cara mereduksi ikatan disulfida. Muatan negatif yang terjadi akibat terselubunginya protein dengan SDS akan menghasilkan mobilitas elektroforetik sehingga kompleks SDS-protein terelusi pada gel (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977).

2.7 Analisis Aktivitas Sukrosafosforilase

Beberapa reaksi enzimatik dapat diukur secara langsung baik dengan mengukur penurunan jumlah substrat maupun dengan mengukur kenaikan jumlah

produk dengan menggunakan suatu metode tertentu. Meskipun demikian banyak reaksi enzimatik yang menghasilkan produk atau spesi yang tidak dapat diukur. Dalam kondisi seperti ini dapat dilakukan modifikasi yaitu dengan mengubah produk menjadi senyawa lain yang dapat diukur baik melalui proses pengkoplingan maupun dengan menggunakan indikator (Mikkelsen, S.R., & E. Corton, 2004).

Dalam metode spektrofotometri, senyawa yang dapat diukur adalah senyawa yang memiliki warna atau yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi (gugus kromofor) yang dapat memberikan serapan baik pada daerah UV maupun visible sehingga senyawa-senyawa yang tidak memiliki gugus kromofor atau warna tidak dapat diukur menggunakan metode spektrofotometri salah satu contohnya adalah glukosa-1-fosfat dari substrat sukrosa yang merupakan produk reaksi katalisis dengan enzim sukrosafosforilase. Oleh karena itu agar reaksi enzimatik sukrosafosforilase dapat diukur aktivitasnya maka reaksi katalisis sukrosa menjadi glukosa-1-fosfat dan fruktosa harus dikopling dengan reaksi lain yang menghasilkan produk yang dapat diukur secara spektrofotometri (Mikkelsen, S.R., & E. Corton, 2004).

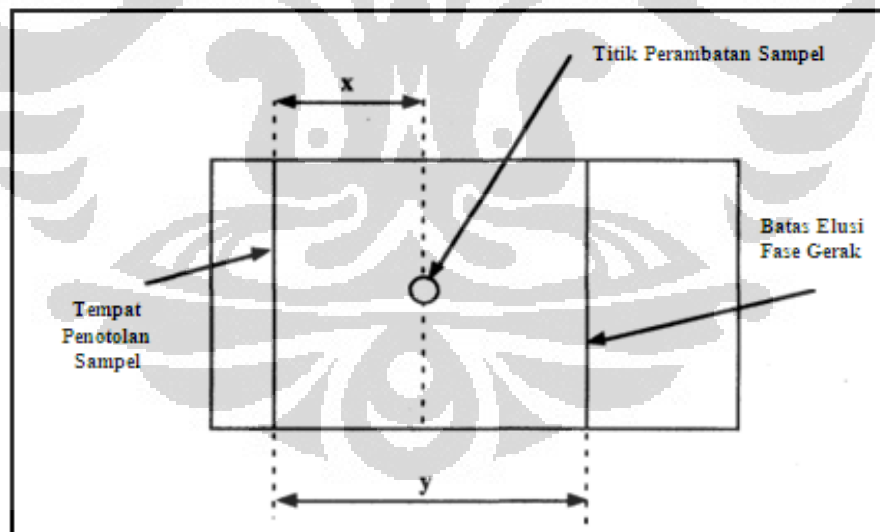
2.8 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis adalah teknik pemisahan campuran yang didasarkan atas perbedaan distribusi di antara dua fase, yaitu fase diam (Lempeng tipis) dan fase gerak, dari komponen-komponen yang terkandung dalam campuran tersebut. Interaksi suatu campuran dengan fase terlarut dan fase diam, dapat berupa dispersif, polar, dan interaksi ionik. Pada dasarnya analisis KLT merupakan analisis sederhana dan dapat digunakan sebagai analisis senyawa atau campuran senyawa secara kualitatif maupun analisis kuantitatif (Cazes & Scott, 2002).

Pada kromatografi lapis tipis, zat penyerap (adsorben) merupakan lapisan tipis serbuk halus yang dilapiskan pada lempeng kaca, plastik, atau logam secara merata (Departemen Kesehatan, 1995). Teknik kromatografi lapis tipis (KLT) sangat bermanfaat untuk analisis obat dan bahan lain dalam laboratorium karena hanya memerlukan peralatan sederhana, waktu cukup singkat (15-60 menit), dan

jumlah zat yang diperiksa cukup kecil (kira-kira 0,01 g senyawa murni, 0,1 g simplisia). Di samping itu tidak diperlukan ruang besar dan teknik pengerjaan sederhana (Harmita, 2006).

Dalam kromatografi lapis tipis, perbandingan jarak rambat suatu senyawa tertentu terhadap jarak rambat fase gerak, yang diukur dari titik penotolan, dinyatakan sebagai harga R_f senyawa tersebut. Perbandingan jarak rambat suatu senyawa tertentu dengan jarak perambatan baku pembanding dinyatakan sebagai R_f . Harga R_f berubah sesuai kondisi percobaan, oleh karena itu identifikasi sebaiknya dilakukan penotolan baku pembanding pada lempeng kromatogram yang sama. Zat uji yang diidentifikasi dapat dikatakan merupakan senyawa yang sama dengan baku pembanding, apabila terdapat kesesuaian antara bercak zat uji dan sampel pada kromatogram dalam warna dan harga R_f yang mendekati satu.. (Departemen Kesehatan, 1995). Jarak dapat diukur dengan cara manual menggunakan alat pengukur sederhana atau dengan teknik *scanning* untuk mendapatkan data yang lebih akurat (Cazes & Scott, 2002).



[Sumber : Cazes & Scott, 2002, Telah dimodifikasi]

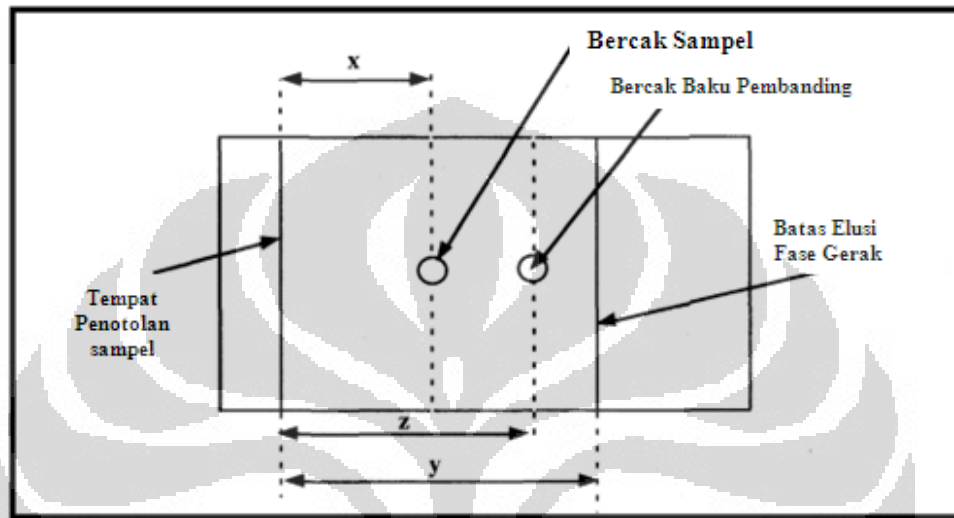
Gambar 2.5 Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Keterangan :

x = jarak antara bercak zat uji dengan tempat penotolan awal sampel

y = jarak antara batas elusi fase gerak dengan tempat penotolan sampel

$$Rf = \frac{\text{Jarak antara bercak zat uji dengan tempat penotolan awal sampel}}{\text{Jarak antara batas elusi fase gerak dengan tempat penotolan sampel}} \quad (2.1)$$



[Sumber : Cazes & Scott, 2002, Telah dimodifikasi]

keterangan :

x = jarak antara bercak zat uji dengan tempat penotolan awal sampel

y = jarak antara batas elusi fase gerak dengan tempat penotolan sampel

z = jarak antara bercak zat baku pembanding dengan tempat penotolan

Gambar 2.6. Perbandingan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Sampel dengan Standart

$$Rr = \frac{Rf(\text{sampel})}{Rf(\text{baku pembanding})} = \frac{x}{z} \quad (2.2)$$

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik [Scout[®] dan Acculab[®], USA], pemanas dengan *magnetic stirrer* [Torrey Pins Scientific, USA] Perangkat SDS-PAGE [Biometra[®], Jepang], mikrosentrifuse berkecepatan tinggi dan berpendingin [Tomy[®] MX-305, Jepang], mikrosentrifus dengan pendingin [Sorvall-fresco[®], Jerman], autoklaf [Hirayama[®], Jerman], dry bath thermoblock, mikropipet, matt pipet, inkubator 37°C [Memmet], orbital shaker inkubator, pH meter [Eutech Instruments[®], Singapura], *Freezer* -20°C [GEA[®], Korea], *Ultra Low Temperature Freezer*-80°C [New Brunswick Scientific U101 Innova, Inggris], lemari pendingin [GEA[®], Korea dan Toshiba[®], Jepang], oven penyimpanan [WTB Binder[®], Jerman], oven pengering [LAB-Line, USA], Lempeng KLT *silica gel* GF254 [Merck[®], Jerman], chamber kaca, pipa kapiler, spektrofotometer UV-Vis [Shimadzu, Jepang dan GeneQuant[®]], sonikator [Labsonic[®], Inggris], HisTrap[®] FF kolom 1 ml [GE Healthcare, Swedia], kolom afinitas *His Spin Trap*[®] [GE Healthcare, Swedia], KLT Densitometer [CAMAG] dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam laboratorium.

3.3 Bahan

3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah Stok beku bakteri *Escherichia coli* BL-21StarTM (pAM_SPaseWRS3) rekombinan milik Laboratorium Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

3.3.2 Bahan Kimia

Asam kojat (Nacalai tesque, Jepang), BCA Assay Protein (Merck Bioscience), Kalium fosfat monobasa dan dibasa (Merck, Jerman), aquadest, aquabidest steril (Otsuka Indonesia), PMSF (Sigma, USA), Protein Staining

Solution (BioRad, USA), Tris base (Amersham Bioscience, Swedia), Natrium Dodesil Sulfat (Wako, Jepang), Trisin (Aldrich, Jerman), Loading Buffer (Fermentas, USA), Reducing Agent (2-merkaptotanol) (Fermentas, USA), Premixed preweighted akrilamid/bisakrilamid (BioRad, Inggris), Amonium persulfat (Merck, Jerman), TEMED (N,N,N',N'- tetrametilendiamin) (Merck, Jerman), Prestained protein ladder (GE Lifescience, Swedia), Isopropanol (Aldrich, Jerman), asam asetat (Aldrich, Jerman), sukrosa (Wako, Jepang), Na₂EDTA (Merck, Jerman), MgCl₂ (Merck, Jerman), NADP⁺ (Wako, Jepang), fosfoglukomutase (Sigma, USA), glukosa-1,6-difosfat (Sigma, USA), glukosa-6-fosfat dehidrogenase (Wako, Jepang), Sukrosafosforilase Standar (Wako, Jepang), asetonitril (Merck, Jerman),

3.3.3 Medium dan Pembuatan Medium

3.3.3.1 Medium

Medium yang digunakan adalah medium agar dan medium cair Luria Bertani (LB). Adapun kandungan dari medium LB adalah :bactotryptone, bacto yeast dan NaCl. Dalam penelitian ini digunakan medium LB yang sudah jadi sehingga tidak perlu diracik lagi.

3.3.3.2 Pembuatan Medium

Medium yang digunakan adalah medium agar dan cair LB. Medium agar digunakan untuk meremajakan kultur bakteri sedangkan medium cair digunakan untuk membuat kultur inokulum dan kultur cair bakteri.

Untuk membuat 100 ml medium agar LB ditimbang 2 g serbuk medium LB dan 1,5 g serbuk bacto agar dilarutkan dalam aquadest dalam labu bulat dengan bantuan pengaduk magnetik dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih, medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Setelah agak dingin, ditambahkan 100 µl larutan tetrasiklin konsentrasi 5 mg/ml sehingga medium mengandung 5 µg/ml tetrasiklin. Medium selanjutnya dituang ke dalam cawan petri steril secara aseptis dan dibiarkan dingin dan mengeras. Medium yang sudah mengeras disimpan dalam lemari pendingin.

Untuk memmbuat 500 ml medium cair LB ditimbang 20 g serbuk medium cair dan dilarutkan dalam 1 liter aquadest dalam labu bulat. Medium yang sudah jadi selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15

menit. Setelah agak dingin, ditambahkan 1 ml larutan tetrasiklin konsentrasi 5 mg/ml sehingga medium mengandung 5 µg/ml tetrasiklin. Medium cair selanjutnya dapat langsung digunakan untuk pembuatan kultur cair atau disimpan dalam lemari pendingin untuk digunakan keesokan harinya.

3.3.4 Pembuatan Larutan Dapar dan Pereaksi

3.3.4.1 Dapar Fosfat pH 5,0; 6,0; 6,8 ; 7,0; 7,5; 8,0 1,23 x 10⁻¹ M (DeAngelis K.M., 2007)

K₂HPO₄ dan KH₂PO₄ ditimbang dengan seksama seperti berikut untuk membuat larutan dengan konsentrasi masing-masing 1,23 M :

- a. Untuk 250 ml Larutan 1,23 M K₂HPO₄ (174.18g mol⁻¹) = 53,560 g
- b. Untuk 250 ml Larutan 1,23 KH₂PO₄ (136.09g mol⁻¹) = 41,848 g

kemudian masing-masing dilarutkan dalam 250 ml aquadest. Untuk membuat larutan dapar pH 5,0; 100 ml, dilakukan dengan membuat campuran kedua larutan seperti berikut :

- a. Larutan 1,23 M K₂HPO₄ (174.18g mol⁻¹) = 0,14 ml
- b. Larutan 1,23 KH₂PO₄ (136.09g mol⁻¹) = 9,86 ml

Untuk membuat larutan dapar pH 6,0; 100 ml, dilakukan dengan membuat campuran kedua larutan seperti berikut :

- a. Larutan 1,23 M K₂HPO₄ (174.18g mol⁻¹) = 1,32 ml
- b. Larutan 1,23 KH₂PO₄ (136.09g mol⁻¹) = 8,68 ml

Untuk membuat larutan dapar pH 7,0; 100 ml , dilakukan dengan membuat campuran kedua larutan seperti berikut :

- a. Larutan 1,23 M K₂HPO₄ (174.18g mol⁻¹) = 6,15 ml
- b. Larutan 1,23 KH₂PO₄ (136.09g mol⁻¹) = 3,85 ml

Untuk membuat larutan dapar pH 7,5; 100 ml , dilakukan dengan membuat campuran kedua larutan seperti berikut :

- a. Larutan 1,23 M K₂HPO₄ (174.18g mol⁻¹) = 8,14 ml
- b. Larutan 1,23 KH₂PO₄ (136.09g mol⁻¹) = 1,86 ml

Untuk membuat larutan dapar pH 8; 100ml, dilakukan dengan membuat campuran kedua larutan seperti berikut :

- a. Larutan 1,23 M K₂HPO₄ (174.18g mol⁻¹) = 0,6 ml
- b. Larutan 1,23 KH₂PO₄ (136.09g mol⁻¹) = 9,4 ml

Untuk membuat larutan dapar pH 6,8; 1 L, dilakukan dengan membuat campuran kedua larutan seperti berikut :

- a. Larutan 1,23 M K_2HPO_4 ($174.18g\ mol^{-1}$) = 49,7 ml
- b. Larutan 1,23 KH_2PO_4 ($136.09g\ mol^{-1}$) = 50,3 ml

Pencampuran kedua jenis larutan dilakukan bertahap, lakukan juga pengecekan berkala saat pencampuran dengan pH meter agar campuran larutan menghasilkan pH larutan yang tepat. Kemudian campuran larutan tersebut dihomogenkan dan diad-kan dengan aquadest hingga 100 ml dan untuk larutan pH 6,8 dicukupkan hingga 1 L. Dapar fosfat yang sudah jadi selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ selama 15 menit. Kemudian stok dapar fosfat dan stok K_2HPO_4 dan KH_2PO_4 disimpan dalam kulkas $4^{\circ}C$.

3.3.4.2 Larutan Stok IPTG 1 M

Sebanyak 1 g IPTG dilarutkan dengan 4,2 ml aquabidest steril, kemudian larutan yang telah siap di lewatkan dalam filter bakteri kemudian filtrate yang lolos dari filter ditampung di dalam tube yang telah disterilkan, sehingga didapatkan larutan stok IPTG dengan konsentrasi 1 M.

3.3.4.3 Dapar 4X Tris-HCl/SDS pH 8,8 (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977)

Sebanyak 9,1 g tris base dan 0,2 g *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) ditimbang kemudian tris base dilarutkan dalam kurang lebih 30 ml. Atur pH dengan penambahan larutan HCl 1 N hingga tercapai pH 8,8. Selanjutnya SDS ditambahkan dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml. Kemudian dapar disimpan dalam lemari pendingin suhu $4^{\circ}C$.

3.3.4.4 Dapar 4X Tris-HCl/SDS pH 6,8 (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977)

Sebanyak 1,21 g tris base 0,08 g SDS ditimbang kemudian tris base dilarutkan dalam kurang lebih 10 ml. Selanjutnya pH diatur dengan penambahan larutan HCl 1 N hingga tercapai pH 6,8. Selanjutnya SDS ditambahkan dan dicukupkan volumenya hingga 20 ml. Kemudian dapar disimpan dalam lemari pendingin suhu $4^{\circ}C$.

3.3.4.5 Dapar Katoda (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977)

Sebanyak 6,05 g tris base; 8,96 g trisin dan 0,5 g SDS ditimbang dan

semua bahan dilarutkan dalam 500 ml aquadest steril secara aseptis. Tidak perlu pengaturan pH. Selanjutnya dapat disimpan dalam lemari pendingin suhu 4° C.

3.3.4.6 Dapar Anoda (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977)

Sebanyak 24,22 g tris base ditimbang dan dilarutkan dalam 500 ml aquadest. Selanjutnya pH diatur dengan penambahan HCl 1 N hingga dicapai pH 8.9. Kemudian dapat disimpan dalam lemari pendingin suhu 4° C.

3.3.4.7 Larutan Campuran Akrilamid-Bis Akrilamid 29:1

Sebanyak 22,5 g serbuk campuran akrilamid dan bis akrilamid dilarutkan dalam 54,75 ml aquabidest steril.

3.3.4.8 Larutan Fiksasi (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977)

Larutan fiksasi mengandung 25% isopropanol dan 10% asam asetat. Dibuat dengan cara melarutkan 125 ml isopropanol dan 50 ml asam asetat dengan aquadest hingga volume akhir 500 ml.

3.3.4.9 Larutan Stok Sukrosa $3,09867 \times 10^{-1}$ M (Sucrose Phosphorylase, n.d.)

Sebanyak 5,3 g sukrosa ditimbang dan dilarutkan dalam 50 ml aquabidest steril.

3.3.4.10 Larutan Stok EDTA $9,96 \times 10^{-3}$ M (Sucrose Phosphorylase, n.d.)

Sebanyak 37,1 mg Na₂EDTA ditimbang dan dilarutkan dalam 10 ml dapar fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8.

3.3.4.11 Larutan Stok MgCl₂ $9,96 \times 10^{-1}$ M (Sucrose Phosphorylase, n.d.)

Sebanyak 0,95 g MgCl₂ anhidrat ditimbang dan dilarutkan dalam 10 ml aquabidest steril.

3.3.4.12 Larutan Stok NADP⁺ $1,1952 \times 10^{-2}$ M (Sucrose Phosphorylase, n.d.)

Sebanyak 18,82 mg NADP-Na ditimbang dan dilarutkan dalam 1 ml larutan dapar fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8.

3.3.4.13 Larutan Stok Glukosa-1,6-Bifosfat $4,98 \times 10^{-5}$ M (Sucrose Phosphorylase, n.d.)

Sebanyak 10 mg α -D-glucose 1,6-bisphosphate tetra (cyclohexylammonium) *salt hydrate* ditimbang dan dilarutkan dalam 27,26 ml aquabidest steril, kemudian larutan tersebut dipipet 10 ml dan dimasukkan ke dalam wadah dan dicukupkan volumenya hingga 100 ml dengan aquadest yang telah disterilkan.

3.3.4.14 Larutan Dapar Fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8 (Sucrose Phosphorylase, n.d.)

Sebanyak 40,65 ml larutan dapar fosfat $1,23 \times 10^{-1}$ M pH 6,8 diambil dan

diencerkan dengan aquabidest steril hingga volume 100 ml.

3.3.4.15 Larutan Dapar Pencuci Kolom Afinitas (*His Spin Trap® Kit manual*, 2007)

Larutan dapar pencuci kolom afinitas mengandung 20 mM fosfat, 500 mM NaCl dan 60 mM imidazol. Larutan dibuat dengan mengencerkan 12,5 ml larutan stok dapar fosfat yang mengandung 160 mM fosfat dan 4 M NaCl pH 7,4 dan 3 ml larutan stok imidazole yang mengandung 2 M imidazol dengan aquadest steril hingga volume akhir 100 ml. Larutan dapar selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin suhu 4° C.

3.3.4.16 Larutan Dapar Pengelusi Kolom Afinitas (*His Spin Trap® Kit manual*, 2007)

Larutan dapar pencuci kolom afinitas mengandung 20 mM fosfat, 500 mM NaCl dan 500 mM imidazol. Larutan dibuat dengan mengencerkan 6,25 ml larutan stok dapar fosfat yang mengandung 160 mM fosfat dan 4 M NaCl pH 7,4 dan 12,5 ml larutan stok imidazol yang mengandung 2 M imidazol dengan aquadest steril hingga volume akhir 50 ml. Larutan dapar selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin suhu 4° C.

3.3.4.17 Larutan Fosfoglukomutase (EC 5.4.2.2) 0,2 unit/μl (*Sucrose Phosphorylase*, n.d.)

Sebanyak 19,52 μl suspensi stok enzim yang setara dengan 50 unit aktivitas dipipet dan disentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm. Supernatan dibuang dan endapan dilarutkan dengan 250 μl larutan dapar fosfat 5 x 10⁻² M pH 6,8. Larutan selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin suhu 4° C.

3.3.4.18 Larutan Glukosa-6-fosfat Dehidrogenase (EC 1.1.1.49) 0,2 unit/μl (*Sucrose Phosphorylase*, n.d.)

Sebanyak 1,12 mg (tertera dilabel) serbuk enzim yang setara dengan 1000 unit aktivitas dilarutkan dengan 1000 μl larutan dapar fosfat 0,05 M pH 6,8 menghasilkan larutan stok enzim dengan konsentrasi 1 unit/μl. Sebanyak 100 μl larutan stok enzim dengan konsentrasi 1 unit/μl dipipet dan ditambahkan 400 μl larutan dapar fosfat 5 x 10⁻² M pH 6,8 menghasilkan 500 μl larutan glukosa-6-fosfat dehidrogenase 0,2 unit/ μl. Larutan selanjutnya disimpan dalam freezer - 20°C.

3.3.4.19 Larutan Sukrosafosforilase (EC 2.4.1.7) 0,2 unit/μl

Sebanyak 6,2 mg (tertera dilabel) serbuk enzim yang setara dengan 500 unit aktivitas dilarutkan dengan 500 μl larutan dapar fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8 menghasilkan larutan 1 unit/μl. Sebanyak 100 μl larutan stok enzim dengan konsentrasi 1 unit/μl dipipet dan ditambahkan 200 μl larutan dapar fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8 dan 200 μl gliserol sehingga menghasilkan 500 μl larutan SPase 0,2 unit/ μl. Larutan selanjutnya disimpan dalam *freezer* -20°C.

3.3.4.20 Larutan Stok Sukrosa 0,8 mg/μl

Sebanyak 0,8 g sukrosa ditimbang dan dilarutkan dalam 1 ml aquabidest steril.

3.3.4.21 Larutan Stok Asam Kojat 50 μg/μl

Sebanyak 50 mg Asam kojat ditimbang dan dilarutkan dalam 1 ml aquabidest steril.

3.3.4.22 Larutan Stok Tetrasiklin 5 mg/ml

Sebanyak 50 mg Tetrasiklin ditimbang dan dilarutkan dalam 5 ml etanol kemudian di cukupkan volumenya hingga 10 ml dengan aquabidest steril.

3.4. Cara Kerja

3.4.1 Pemiakan dan Peremajaan Kultur (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011)

Kultur yang digunakan adalah kultur beku *E. coli* BL-21 STAR™ (pAM_SPaseWRS3) rekombinan yang telah membawa gen penyandi SPase rekombinan asal *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3(1). Pemiakan kultur dilakukan dengan cara menggoreskan satu ose bakteri ke medium agar LB yang mengandung 5 μg/ml tetrasiklin secara aseptis, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Kultur yang digunakan harus selalu dari kultur beku, untuk menjaga kualitas dan kuantitas produk yang nantinya akan dihasilkan.

3.4.2 Pembuatan Kultur inokulum Cair dan Pemanenan Sel (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011)

Bakteri diinokulasikan pada medium cair LB 5 ml yang mengandung tetrasiklin 5 μg/ml dan diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37° C dengan di-*shake* pada 175 rpm. Hasil inokulasi tersebut disebut kultur stater inokulum. Kemudian sejumlah volume kultur inokulum dipipet dan diinokulasikan kembali ke dalam

500 ml medium cair LB sehingga didapatkan estimasi OD 0,2, lalu kultur cair tersebut diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam. Setelah 1 jam inkubasi, tetrasiklin 500 µl (5 µg/ml) di tambahkan kedalam kultur cair, kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37° C selama 2 jam dengan kecepatan *shaker* 200 rpm. Kemudian setelah 2 jam diinkubasi, kultur cair diukur OD-nya (estimasi OD 0,6—0,8). Setelah diketahui OD kultur cair sesuai, kultur cair diinduksi menggunakan IPTG dengan konsentrasi 1 mM kemudian diinkubasikan kembali pada suhu 30° C selama 2 jam dan di-*shake* pada 175 rpm. Setelah 2 jam, kultur cair dipanen dengan cara disentrifugasi pada 15 000 x g selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet yang diperoleh kemudian disimpan pada *freezer* -20° C.

3.4.3 Pemecahan Sel dan Perolehan Supernatan (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011)

Pelet sel yang telah diperoleh selanjutnya dipecah dengan alat sonikator. Sonikasi dilakukan dalam dapar fosfat pH 6,8 selama 15 menit dengan kekuatan 20 kHz. Sonikasi dilakukan diatas penangas es dengan tujuan agar tidak terjadi kenaikan suhu selama sonikasi berlangsung yang dapat menyebabkan kerusakan protein rekombinan. Setelah sel dipecah, debris sel dipisahkan dari filtrat pelet sel dengan cara disentrifugasi pada 6000 x g selama 10 menit pada suhu 4° C. Lysate yang dihasilkan kemudian dilakukan pemurnian dengan HisTrap FF kolom 1 ml.

3.4.4 Pemurnian Protein Rekombinan (GE *HisTrap FF*® Protocol, 2005).

Kolom purifikasi protein yang digunakan adalah HisTrap kit FF 1 ml. Selanjutnya kolom dicuci dengan Dapar Pencuci (20 mM fosfat, 60mM Imidazol, 200mM NaCl) 10 ml sebanyak dua kali, kemudian 5-10 ml lisat hasil pemecahan sel dilewatkan ke kolom, filtrat yang lolos kemudian ditampung untuk diSDS-PAGE, selanjutnya kolom dicuci dengan 10 ml dapar pencuci cairan yang lolos juga ditampung untuk SDS-PAGE. Kemudian SPase dielusi dengan 10 ml Dapar Pengelusi (20 mM fosfat, 500mM Imidazol, 200mM NaCl). Filtrat protein SPase yang lolos dari kolom kemudian ditampung dan sebagiannya dipekatkan dengan menggunakan konsentrator dengan ukuran 30 kDa, disentrifugasi pada 7500 x g selama 10 menit pada suhu 4° C (Millipore Corporation, 2003).

3.4.5 Elektroforesis Gel Poliakrilamid (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977; Schägger, 2006)

Seluruh sampel yang telah disiapkan sebelumnya dilakukan SDS PAGE. Untuk memberikan hasil gambar yang baik dilakukan *running* SDS PAGE pada konsentrasi gel pemisah yang optimum.

Terlebih dahulu dilakukan pembuatan larutan dan dapar yang diperlukan untuk elektroforesis maupun untuk pembuatan gel yaitu dapar katoda dan anoda serta dapar Tris-HCl/SDS pH 6,8 dan 8,8. Gel yang digunakan ada dua macam yaitu gel penahan dan gel pemisah. Konsentrasi gel penahan yang digunakan adalah 3,9 % dan gel pemisah 10 %.

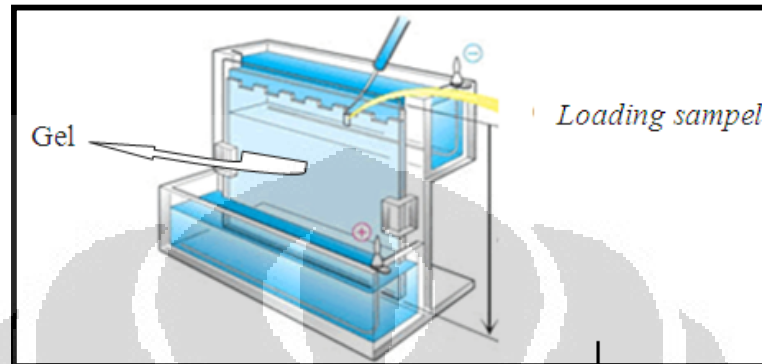
Formulasi gel penahan terdiri dari 0,39 ml larutan campuran akrilamid/bis akrilamid; 0,75 ml larutan 4X Tris-HCl/SDS pH 6,8; 1,83 ml aquabidest steril; 0,015 ml larutan Ammonium persulfat (APS) 10%; 0,003 ml TEMED. Formulasi gel pemisah terdiri dari 2 ml larutan campuran akrilamid/bis akrilamid; 1,5 ml larutan 4X Tris-HCl/SDS pH 8,8; 2,5 ml aquabidest steril; 0,020 ml larutan Ammonium persulfat (APS) 10%; 0,004 ml TEMED. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam gelas piala dan setiap larutan diambil dengan menggunakan mikropipet.

Cetakan untuk gel diisi dengan larutan gel pemisah dan di atasnya diisikan larutan isopropanol untuk mencegah agar gel pemisah tidak cekung saat membeku dan sekaligus untuk mencegah terbentuknya gelembung udara dalam gel. Setelah gel pemisah membeku, lapisan isopropanol lalu dibuang dan cetakan diisikan dengan larutan gel penahan. Segera setelah gel penahan dimasukkan, sisir yang akan digunakan untuk mencetak sumuran gel dimasukkan. Setelah gel membeku, sisir dapat diangkat dan terbentuk sumuran-sumuran pada gel penahan. Gel dapat langsung digunakan atau disimpan dalam aquadest steril di lemari pendingin untuk digunakan keesokan harinya. Penyimpanan dalam aquadest steril dilakukan agar gel tidak kering dan pecah.

Setelah gel siap digunakan, gel dipasangkan pada alat elektroforesis. Chamber atas diisi dengan dapar katoda dan chamber bawah diisi dengan dapar anoda. Chamber atas harus diisi dengan dapar katoda sedemikian rupa sehingga semua sumuran terendam dengan larutan dapar

Sampel disiapkan dengan cara mencampurkan 2 μ l reducing agent berupa 2- merkaptoetanol, 8 μ l loading buffer. Campuran 10 μ l sampel dan 15 μ l

selanjutnya dipanaskan di atas dry bath suhu 95° C selama kurang lebih 3 menit. Kemudian 10 µl sampel, dan 4 µl penanda protein dimasukkan ke dalam sumuran gel sedemikian rupa sesuai Gambar 3.1.



[sumber : www.bioinformatics.com (yang telah dimodifikasi)]

Gambar 3.1. Skema SDS PAGE

Tegangan mula-mula diatur pada 30 V dengan arus sebesar 10 mA. Elektroforesis dilakukan hingga sampel memasuki batas antara gel penahan dengan gel pemisah. Setelah sampel memasuki perbatasan antara gel penahan dan gel pemisah, tegangan dinaikkan menjadi 150 V dengan arus sebesar 15 mA. Elektroforesis diteruskan hingga sampel mencapai batas bawah gel pemisah dan penanda protein terpisah dengan baik (Firdausi, W., 2009).

Gel hasil elektroforesis selanjutnya direndam dalam larutan fiksasi yang mengandung 25 % isopropanol dan 10 % asam asetat selama kurang lebih 10-15 menit. Selanjutnya gel dicuci dengan aquadest steril untuk menghilangkan larutan fiksasi. Gel kemudian direndam dalam protein staining solution yang berisi Coomassie Brilliant Blue selama 1 malam (Hadi, 2010)

Setelah satu malam, gel dicuci dengan larutan *destaining* dan menggunakan aquadest steril hingga tampak pita-pita protein yang berwarna biru. Gel disimpan dalam aquadest steril di lemari pendingin agar tidak rusak dan pecah. Gel didokumentasikan dengan menggunakan digital scanner (Hadi, 2010)..

3.4.6 Pengukuran Konsentrasi Protein Rekombinan

Konsentrasi Protein diukur dengan menggunakan metode assay protein BCA. Terlebih dahulu dibuat kurva kalibrasi menggunakan Bovine Serum

Albumin (BSA) sebagai standar protein. Pembuatan kurva kalibrasi dilakukan dengan pengenceran larutan stok 2000 ppm hingga menjadi enam buah titik kurva kalibrasi, seperti pada tabel 3.1, sbb :

Tabel 3.1 Konsentrasi Kurva Kalibrasi BSA Standar

Volume BSA	Dapar fosfat 0,05 M pH 6,8 (µl)	Konsentrasi akhir BSA (µg/ml)
250 µl dari stok 2 mg/ml	250	1.000
250 µl dari tube 1	250	500
250 µl dari tube 2	250	250
300 µl dari tube 3	300	125
100 µl dari tube 4	400	25

Reaksi analisis dilakukan dengan mencampurkan 50 µl dari setiap konsentrasi larutan standart dengan 1 ml reagen BCA, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Serapan hasil reaksi diukur pada panjang gelombang 560 nm dan diamati serapannya selama 10 menit. Selanjutnya diplotkan serapan yang terukur dengan konsentrasi BSA dan dibuat persamaan kurva kalibrasinya. Hal yang sama juga dilakukan pada sampel. Hasil serapan sampel kemudian dikonversi menjadi satuan konsentrasi dengan menggunakan kurva kalibrasi yang telah dibuat.

3.4.7 Esei Aktivitas Enzim (Lee, Yoon, Nam, moon, moon, & Kim, 2006)

Analisis aktivitas enzim dilakukan dengan metode spektrofotometri. Sebanyak 1,66 ml campuran reaksi yang mengandung : 0,66 ml dapar fosfat 1,23 x 10⁻¹ M; 0,75 ml larutan 3,09867 x 10⁻¹ M sukrosa; 0,015 ml larutan 9,96 x 10⁻³ M EDTA; 0,025 ml larutan 9,96 x 10⁻¹ M MgCl₂; 0,05 ml larutan 1,1592 x 10⁻² M NADP⁺; 0,05 ml larutan 4,98 x 10⁻⁵ M glukosa-1,6-bifosfat; 0,05 ml fosfoglukomutase yang mengandung 10 unit aktivitas; 0,05 ml glukosa-6-fosfat dehidrogenase yang mengandung 10 unit aktivitas. Campuran larutan kemudian ditambahkan sebanyak 0,01 ml sampel dimasukkan dalam campuran larutan. Kemudian Campuran reaksi dengan komposisi 50 mM dapar fosfat; 140 mM sukrosa; 0,09 mM EDTA; 15 mM MgCl₂; 0,36 mM NADP⁺; 0,0015 mM Glukosa-1,6-bifosfat; 10 Unit fosfoglukomutase; 10 Unit Glukosa-6-fosfat dehidrogenase, diinkubasi pada variasi suhu 25, 30, 35 37, 40°C. Serta dilakukan juga variasi pH yaitu pada pH 5; 6; 7; 7,5; 8. Kemudian dilakukan perbandingan

antara SPase rekombinan dengan standar untuk mendapatkan aktivitas relatifnya.

3.4.8 Esei Aktivitas Transglukosilasi Enzim SPase terhadap Asam Kojat (Kitao & Sekine, 1994)

Esei aktivitas transglukosilasi asam kojat dilakukan dengan membuat campuran reaksi 20 μl (pH 7,5), yang mengandung 0,4 Unit SPase, asam kojat 200 μg (1%), buffer Fosfat 100mM dan sukrosa (30 %). Larutan tersebut dibuat dengan mencampurkan 2 μl larutan SPase 0,2 Unit/ μl , 4 μl larutan asam kojat 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 7,5 μl sukrosa 1 mg/ μl dan 2 μl larutan buffer Fosfat 1 M(pH 7,5), Kemudian diinkubasi pada 37 $^{\circ}\text{C}$ dan dilakukan pada beberapa variasi waktu inkubasi.

3.4.8.1 Analisa Produk Transglukosilasi SPase dengan Kromatografi Lapis Tipis

Untuk menganalisis produk hasil reaksi transglukosilasi digunakan KLT dengan metode *ascending* menggunakan gel silica sebagai fase diam dan fase gerak asetonitril-air. Sampel hasil inkubasi ditotolkan sebanyak 2 μl pada lempeng, kemudian lempeng dielusi dengan fase gerak asetonitril-air (80:20), kemudian bercak dapat diamati pada panjang gelombang 254 nm.

3.4.8.2 Analisa Produk Transglukosilasi SPase dengan KLT Densitometer

Lempeng KLT yang telah terelusi kemudian diletakkan pada cakram lempeng KLT sedemikian rupa, kemudian dimasukkan kedalam alat *TLC Scanner*. Selanjutnya alat akan memindai dan akan menganalisis kromatogram secara komputerisasi.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pemiakan dan Peremajaan Kultur inokulum

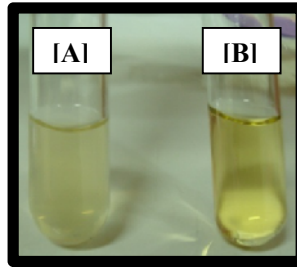
Tahap awal penelitian ini adalah dengan menumbuhkan *E. coli* BL-21 STAR™ (pAM_SPaseWRS3) rekombinan yang membawa plasmid penyandi SPase asal *Leuconostoc mesenteroides*. Pemiakan kultur *E. coli* BL-21 STAR™ (pAM_SPaseWRS3) rekombinan menghasilkan koloni-koloni yang berwarna putih dan berbentuk bulat dengan permukaan yang halus. Kultur tumbuh dengan baik pada medium agar LB yang mengandung tetrasiklin dengan konsentrasi 5 µg/ml. Hasil pemiakan dan peremajaan kultur dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Kultur *E. coli* BL-21 STAR™ rekombinan dalam medium agar

4.2 Pembuatan Kultur Inokulum

Kultur inokulum *E. coli* BL-21 STAR™ (pAM_SPaseWRS3) rekombinan yang telah tumbuh dalam medium agar kemudian diinokulasikan ke dalam medium cair LB. Kemudian ditumbuhkan selama 16 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan *shaking* 200 rpm. Hasil inkubasi semalaman membuat medium cair LB menjadi keruh dengan nilai OD \sekitar 5,945 yang setara dengan 5945 sel/ml, terlihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Gambar inokulum cair: [A] Setelah Inkubasi, dan [B] Sebelum Inkubasi

4.3 Pembuatan Kultur Cair dan Pemanenan Sel

Kultur inokulum yang ditumbuhkan selama 16 jam, selanjutnya dimasukkan ke dalam 500 ml medium cair LB yang mengandung 5 $\mu\text{g/ml}$ tetrasiklin dan didapatkan nilai OD 0,254 atau setaradengan 254 sel/ml. Kultur cair ditumbuhkan selama 3 jam sehingga didapatkan nilai OD dalam kultur cair sebesar 0,673. Nilai OD tersebut sudah cukup baik untuk kemudian ditambahkan IPTG 1 mM untuk menginduksi fermentasi yang kemudian diinkubasi pada suhu 30° C selama sekitar 2 jam.

Selanjutnya sel dipanen dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 6000 x g selama 10 menit pada suhu 4° C. Sel dipanen dengan cara sentrifugasi dan dilakukan pada suhu 4° C dengan tujuan agar enzim tidak kehilangan aktivitas enzimatisnya akibat kenaikan suhu yang mungkin terjadi selama proses sentrifugasi. Hasil sentrifugasi berupa pelet sel yang berwarna coklat muda seperti pada Gambar 4.3. Pelet selanjutnya disimpan semalaman dalam Freezer -20 °C



Gambar 4.3 Pelet sel

4.4 Pemecahan Sel dan Perolehan Supernatan

Sel yang telah disimpan semalaman kemudian diresuspensikan dalam dapar fosfat pH 6,8 dan di tambahkan PMSF, dengan tujuan untuk menjaga stabilitas enzim SPase dengan cara inhibisi enzim protease yang kemungkinan dapat memotong enzim SPase. Suspensi sel kemudian disonikasi dengan tujuan untuk memecahkan sel secara mekanik sehingga terbentuk supernatant yang mengandung SPase, kemudian dilakukan pemurnian dengan kolom afinitas.

4.5 Pemurnian Protein Rekombinan

Supernatan hasil sonikasi kemudian dilakukan purifikasi dengan kolom afinitas *HisTrap® FF 1 ml*. Teknik pemurnian dengan kolom afinitas atau seringkali dikenal pula dengan nama *Immobilized Metal-chelate Affinity Chromatography* (IMAC), bekerja berdasarkan kemampuan asam amino tertentu, dalam hal ini adalah histidin, untuk berikatan secara reversibel dengan ion logam transisi, yaitu Ni^{2+} yang terikat kuat pada suatu matriks penahan. Protein rekombinan yang telah dirancang dengan suatu tag berupa deretan asam amino histidin dapat dimurnikan dengan teknik ini karena deretan asam amino histidin sebanyak 12 kali yang telah di tag 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.

Pada saat purifikasi protein rekombinan, dibutuhkan dua jenis larutan yang akan dialirkan ke dalam kolom yaitu dapar pencuci dan pengelusi. Perbedaan antara kedua larutan tersebut adalah pada konsentrasi imidazolnya. Dapar pencuci mengandung 60 mM imidazol sedangkan dapar pengelusi mengandung imidazol konsentrasi tinggi yaitu 500 mM. Perbedaan konsentrasi kedua larutan tersebut dikarenakan perbedaan fungsi kedua larutan tersebut pada saat purifikasi.

Dapar pengelusi yang mengandung imidazol konsentrasi tinggi berfungsi untuk mengelusi protein rekombinan yang tertahan dalam kolom. Prinsip dasarnya ialah terjadi kompetisi antara Imidazol dan protein rekombinan untuk berikatan dengan ion Ni^{2+} . Ikatan antara tag asam amino histidin dengan ion logam Ni^{2+} dapat digantikan oleh imidazol apabila konsentrasi imidazol tinggi,

hal tersebut sesuai dengan konsentrasi imidazol yang tinggi dalam dapar pengelusi. (Mikkelsen S.R., 2004)

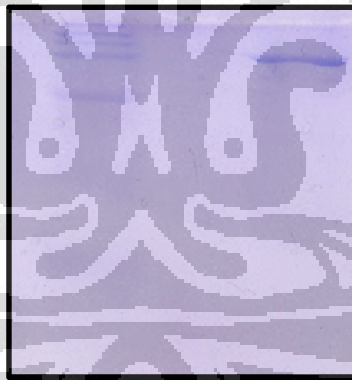
Adapun larutan dapar pencuci yang digunakan hanya mengandung 20 mM imidazol. Fungsi dapar ini adalah untuk mengelusi protein lain yang berikatan lemah dengan Ni^{2+} karena tidak memiliki tag histidin (Mikkelsen S.R., 2004).

Protein rekombinan yang berhasil dilepaskan selanjutnya ditampung fraksinya dalam mikrotube untuk selanjutnya dikonfirmasi dengan elektroforesis gel poliakrilamid.

4.6 Elektroforesis Gel Poliakrilamid

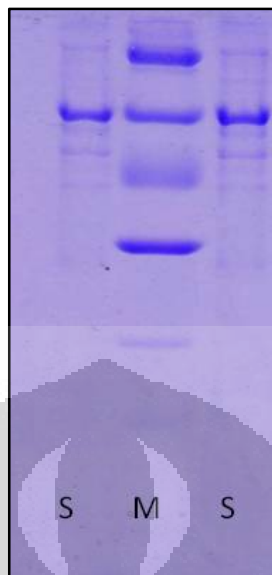
Isolat enzim hasil purifikasi kemudian dilakukan elektroforesis dengan gel poliakrilamid. Untuk mendapatkan hasil yang baik, SDS PAGE dilakukan pada konsentrasi gel penahan 3,9 % dan konsentrasi gel pemisah 10%, dan 15%.

SDS PAGE dilakukan terlebih dahulu pada konsentrasi gel pemisah 15 % menghasilkan yang kurang dapat menginterpretasikan data karena pita-pita yang dihasilkan tertahan diatas gel, terlihat pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Gel SDS PAGE dengan Konsentrasi gel pemisah 15 %

Untuk menghasilkan intepretasi data yang baik dilakukan pula elektroforesis pada gel pemisah 10 %. Berdasarkan pengamatan, diperoleh pita-pita yang cukup terelusi, dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Hasil SDS PAGE pada Konsentrasi gel pemisah Sebesar 10 %

Perbedaan hasil SDS PAGE yang didapatkan pada beberapa variasi konsentrasi gel pemisah, kemungkinan disebabkan karena perbedaan srstruktur gel poliakrilamid yang terbentuk. Gel poliakrilamid terbentuk dari polimerisasi antara akrilamid dan bis akrilamid dimana reaksi polimerisasinya dikatalis oleh APS dan TEMED (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977). Konsentrasi akrilamid berbanding lurus dengan kekompakan dan kepadatan gel, namun berbanding terbalik dengan pori-pori yang terbentuk, jadi semakin tinggi konsentrasi akrilamid dalam gel akan menghasilkan gel yang semakin kompak dengan ruang pori-pori, yang semakin mengecil begitu pula sebaliknya (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977). Hal tersebut sesuai dengan hasil yang didapatkan, dimana pada konsentrasi 15 %, pita-pita protein tertahan diatas, tidak halnya dengan pita protein pada 10%.

Pengamatan SDS PAGE selanjutnya adalah untuk mengkonfirmasi kemurnian dan berat molekul enzim SPase yang telah diisolasi yaitu diantara sekitar 56 kDa (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011). Bobot molekul spase didapatkan dengan cara membandingkan pita yang terbentuk dengan pita-pita protein marker, interpretasi pita marker dapat dilihat pada Lampiran 7.

Berdasarkan hasil pengamatan, didapatkan bahwa, sampel enzim SPase rekombinan terlihat cukup murni, hanya tampak satu buah pita tebal, yang terletak diantara pita kedua dan pita ketiga marker yaitu pita 66 dan 45 kDa, hasil tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya. Hasil elektroforesis gel lengkapnya dapat dilihat pada Gambar. 4.5.

Prinsip dasar pemisahan SDS PAGE hampir sama dengan prinsip dasar kromatografi. Pada elektroforesis gel poliakrilamid, sampel berupa protein dipisahkan berdasarkan bobot masing-masing rantai tunggal protein. Pemisahan tersebut didasarkan pada kemampuan protein tersebut menembus pori-pori yang terbentuk akibat ikatan polimerisasi antara akrilamid dan bis-akrilamid dengan bantuan gaya elektromagnetik, yaitu pergerakan menembus gel akibat adanya perbedaan muatan di kedua kutub saat dilakukan elektroforesis. (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977).

Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa enzim SPase rekombinan mempunyai bobot protein sekitar 56 kDa. Penelitian kali ini mendapatkan pita protein terletak diantara pita protein marker 66 dan 45 kDa. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa boot molekul SPase rekombinan hasil isolasi berada dalam range 45-66 kDa dan sesuai dengan penelitian sebelumnya.

4.7 Pengukuran Konsentrasi Enzim SPase dengan metode BCA

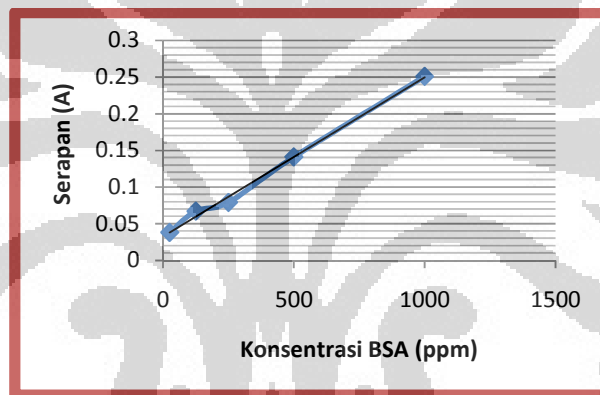
Isolat yang telah diketahui cukup murni dan merupakan enzim SPase rekombinan yang diinginkan, dengan berat molekul sekitar 56 kDa, melalui analisis dengan SDS PAGE kemudian dilanjutkan dengan pengukuran konsentrasi protein dengan metode assay konsentrasi BCA. Kurva kalibrasi didapatkan dari hasil plot antara serapan terukur dengan konsentrasi BSA standart (Tabel 4.1), dan didapatkan persamaan :

$$y = 0,039328 + 0,000195x \dots\dots\dots (4.1)$$

$$r = 0,997757$$

Tabel 4.1. Kurva Kalibrasi BSA

Konsentrasi Larutan Standar ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan (A)
25	0,038
125	0,067
250	0,079
500	0,141
1000	0,251
2000	0,422

**Gambar 4.6** Kurva Kalibrasi BSA

Kemudian dengan metode yang sama dilakukan pengukuran serapan untuk mendapatkan konsentrasi SPase rekombinan, terlebih dahulu dilakukan pengenceran, untuk sebesar 5 kalinya dan didapatkan serapan 0,084 A. Kemudian setelah dilakukan kalkulasi dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi dan dikalikan faktor pengenceran, maka diketahui bahwa kadar sampel SPase adalah 1145,435 $\mu\text{g/ml}$.

Serapan dari hasil reaksi sampel dengan pereaksi BCA, yang terukur pada panjang gelombang 562 nm. merupakan serapan dari kompleks Cu^+ -protein. Prinsip reaksinya adalah reduksi Cu^{+2} dari CuSO_4 oleh Bichinchoninic acid yang terdapat pada pereaksi BCA, menjadi Cu^+ . Ion Cu^+ yang terbentuk kemudian akan membentuk ikatan kompleks dengan protein, yang menghasilkan warna

ungu dan dapat memberikan serapan pada 562nm.

4.8 Esei Aktivitas Enzim SPase

Protein SPase rekombinan hasil isolasi kemudian dilakukan analisis aktivitas enzimatis dan dibandingkan dengan dan Protein SPase standart menggunakan metode Spektrofotometri. Pada tahapan ini, dilakukan juga optimasi aktivitas enzim dengan melakukan variasi suhu dan kondisi pH. Berdasarkan pengamatan, maka diperoleh suhu optimum untuk SPase standart dan rekombinan adalah 37⁰C , dan untuk kondisi pH optimum keduanya didapatkan optimum pada kondisi pH 7, 5 secara lengkap dapat terlihat pada Tabel 4.2; dan 4.3. (Lampiran 1 dan 2).

Berdasarkan data pengamatan serapan NADPH pada 340 nm yang merupakan hasil dari reaksi transglukosilasi, diperoleh aktifitas relatif enzim SPase rekombinan terhadap Aktivitas Enzim SPase standart, dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\%Aktifitas\ Relatif = \frac{Aktifitas\ SPase\ rekombinan,}{Aktifitas\ SPase\ Standar} \times 100\% \dots\dots\dots (4.2)$$

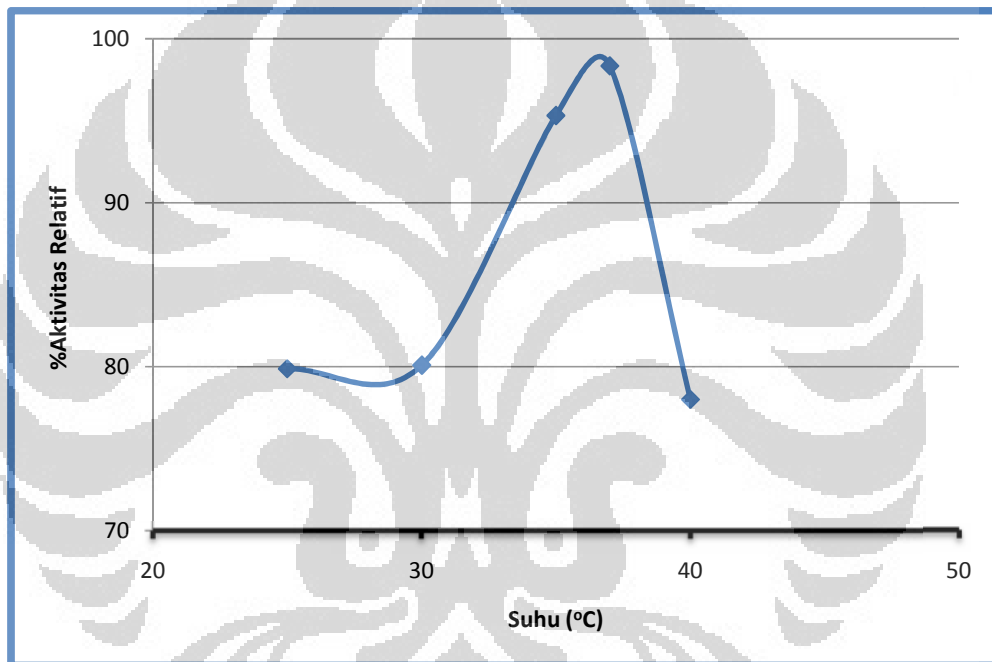
Setelah diolah dengan persamaan 4.2 maka didapatkan hubungan antara kondisi pH dan suhu terhadap %aktifitas relatif SPase rekombinan terhadap Standar seperti pada tabel 4.4, dan 4.5 kemudian diinterpretasikan ke dalam bentuk kurva seperti terlihat pada Gambar 4.6 dan 4.7.

Tabel 4.4 Hubungan antara pH dan Aktivitas relatif Enzim SPase Rekombinan terhadap SPase standart.

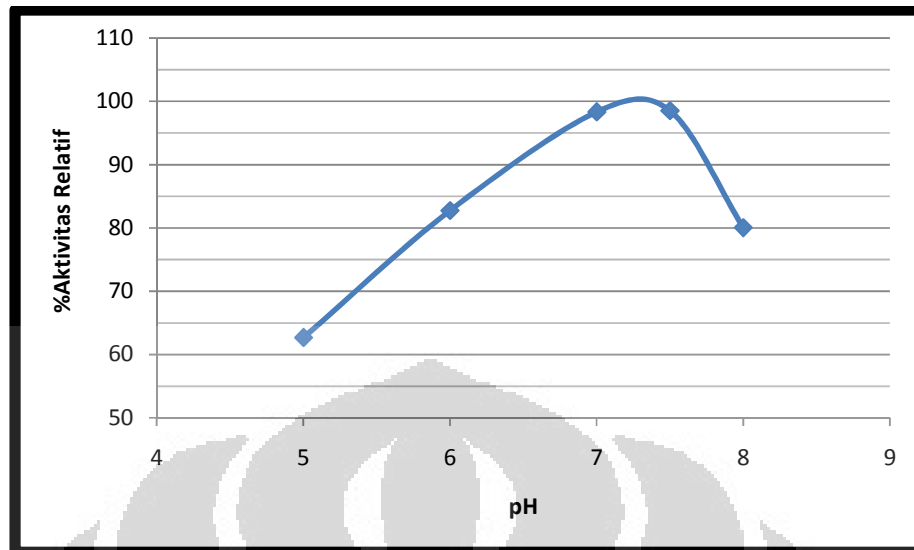
pH	% Aktifitas Relatif
5	62,73
6	82,75
7	98,34
7,5	98,52
8	80,04

Tabel 4.5 Hubungan antara suhu inkubasi dan Aktivitas relatif Enzim SPase Rekombinan terhadap SPase standart.

Suhu (°C)	% Aktifitas Relatif
25	79,87
30	80,08
35	95,31
37	98,34
40	78,01



Gambar 4.7 Kurva Hubungan antara Suhu dan Aktivitas relatif Enzim SPase Rekombinan terhadap SPase standart.

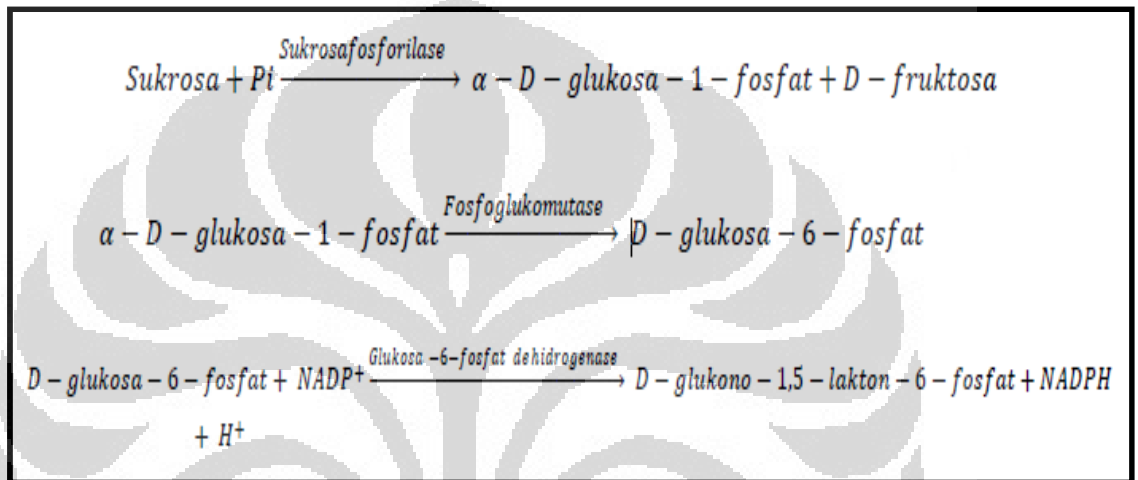


Gambar 4.8 Kurva Hubungan antara pH dan Aktivitas relatif Enzim SPase Rekombinan terhadap SPase standart.

Berdasarkan data-data tersebut, dapat dikatakan bahwa enzim SPase memiliki aktifitas sangat tinggi hingga mencapai 98 %.. Hal tersebut jauh melebihi ekspresi gen *spWRS-3(1)* yang sama namun diekspresikan dalam *Escherichia coli* DH5a yang dilakukan dalam penelitian sebelumnya, yang dilaporkan memiliki aktivitas relatif lebih rendah dibandingkan dengan SPase standar (Hadi, 2010). Perbedaan organisme pengeksprosi protein rekombinan merupakan factor utama yang mempengaruhi perbedaan yang cukup signifikan antara aktifitas yang didapatkan pada penelitian ini dengan aktifitas pada penelitian sebelumnya. D dilaporkan bahwa organisme yang digunakan untuk ekspresi pada penelitian ini, yaitu *Escherichia coli* BL21 StarTM merupakan organisme yang sangat sesuai untuk ekspresi protein rekombinan skala besar. Bakteri strain *Escherichia coli* BL21 StarTM merupakan organisme yang didisain secara khusus dapat mengurangi ekspresi gen basal yang dapat menyebabkan toksisitas sel bakteri dan penurunan produksi protein rekombinan yang diinginkan.

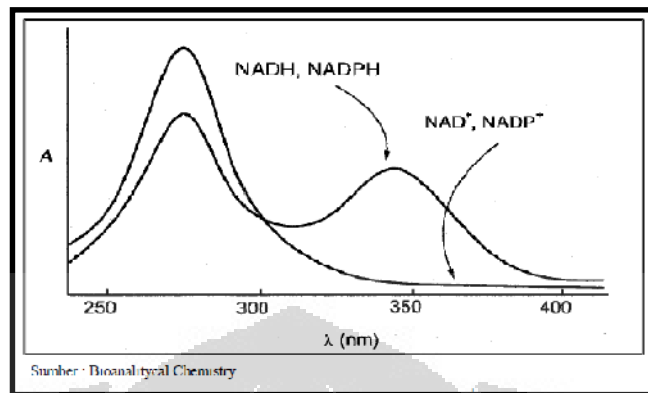
Berdasarkan pengamatan, spektrum serapan yang dihasilkan sesuai dengan literatur, terlihat pada gambar 4.10 dan 4.11. Pada kontrol negatif menunjukkan serapan yang sangat rendah, yaitu sebesar 0,02 A. Pengamatan serapan dilakukan pada panjang gelombang 340 nm, pada panjang gelombang

tersebut NADP^+ tidak memberikan serapan, sehingga kontrol negatif memiliki serapan yang kecil, terlihat pada gambar 4.10. Prinsip reaksi ini adalah pereduksian NADP^+ menjadi NADPH, yang sebanding dengan jumlah sukrosa yang dikonversi oleh SPase menjadi glukosa-1-fosfat dan fruktosa, tanpa adanya SPase NADP^+ akan sukar untuk tereduksi, reaksi lengkap lihat Gambar 4.9. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa reaksi berjalan dengan benar.



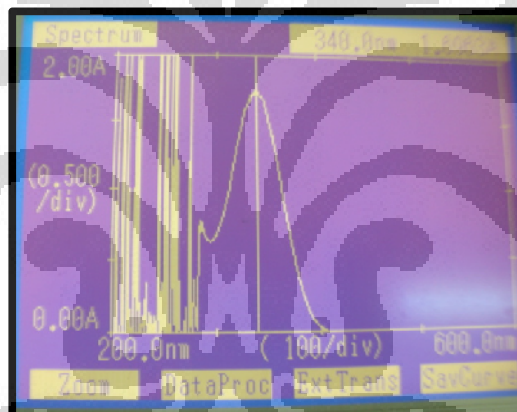
[Sumber : Sylverstein, Voet, Reed, & Abeles, 1967]

Gambar 4.9 Reaksi Lengkap Esei Aktivitas Enzim SPase



[Sumber : Bioanalytical Chemistry]

Gambar 4.10. Perbandingan serapan antara NADH, NADPH dengan NAD⁺ NADP⁺



Gambar 4.11. Serapan Hasil Reaksi Esei Aktivitas

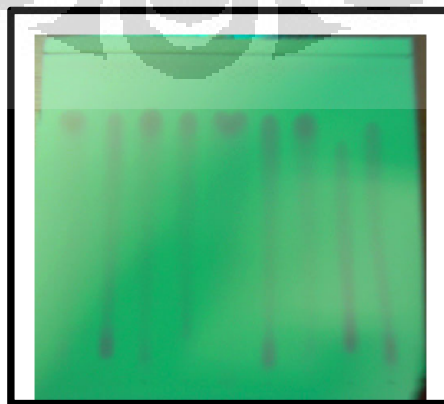
4.9. Analisa Hasil Esei Aktivitas Transglukosilasi SPase terhadap Asam Kojat

Enzim Sukrosafosforilase yang telah, dikonfirmasi berat molekul, kemurnian, serta aktivitasnya dilakukan esei aktivitas transglukosilasi pada substrat, dalam penelitian ini adalah Asam Kojat. Esei aktivitas transglukosilasi SPase terhadap asam kojat telah dilakukan sebelumnya oleh Kitao dan Sekine (1994). Pada penelitian tersebut Kitao dan Sekine melakukan reaksi transglukosilasi skala besar, karena tujuan akhir dari penelitian tersebut adalah mensintesis Asam Kojat (AK) menjadi Asam Kojat Glikosida (AKG), berbeda dengan peneliti, yang bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas

transglukosilasi SPase rekombinan terhadap asam kojat. Oleh karena itu terlebih dahulu dilakukan optimasi memperkecil kondisi reaksi transglukosilasi. Didapatkan, kondisi yang sesuai untuk reaksi transglukosilasi asam kojat skala kecil, yaitu reaksi dengan volume akhir 20 μ l, dengan komposisi yang disesuaikan dengan penelitian sebelumnya namun dengan jumlah enzim yang lebih kecil, yaitu 1 % AK, 30% Sukrosa, 0,1 M Dapar Fosfat, dan 0,4 unit SPase standar.

Akibat perbedaan volume reaksi, yang lebih kecil dari sebelumnya, maka dilakukan pengamatan waktu inkubasi. Setelah reaksi dilakukan dan diinkubasi maka pengamatan produk hasil reaksi dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis.

Berdasarkan pengamatan produk hasil reaksi dengan KLT, didapatkan bahwa bercak produk hasil berubah lebih berada dibawah senyawa asal, dengan Rf yang lebih kecil, hal tersebut terlihat pada inkubasi 7 jam sampai 12 jam, terlihat pada Gambar 4.10. Perubahan spot hasil reaksi yang memiliki Rf lebih kecil dibandingkan dengan Rf senyawa asal, asam kojat, diduga sesuai dengan produk reaksi transglukosilasi pada penelitian sebelumnya. Sistem KLT yang digunakan pada penelitian ini adalah sistem KLT fase normal, dimana fase diam yang digunakan adalah *silica gel* GF254 yang bersifat polar dan fase gerak asetonitril-air (80:20) yang bersifat semipolar. Berdasarkan sistem KLT yang dipakai tersebut maka semakin polar suatu senyawa maka akan semakin tertahan pada fase diamnya (Rf rendah). Hal tersebut dirasa sesuai dengan hasil yang didapatkan, karena Kitao & Sekina (1994) menyatakan bahwa reaksi transglukosilasi asam kojat akan menghasilkan senyawa yang lebih polar, yaitu AKG (Kitao & Sekine, 1994).



Gambar 4.12. Pengamatan KLT Hasil Reaksi pada berbagai waktu inkubasi

Untuk memberikan hasil interpretasi pengamatan produk hasil reaksi transglukosilasi yang lebih baik, maka dilakukan memindai lempeng KLT yang telah dielusi pada panjang gelombang 254 nm, dengan menggunakan KLT Densitometri. Sehingga didapatkan densitas dari masing masing bercak yang dihasilkan, terlihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil analisis dengan KLT Densitometri pada berbagai waktu inkubasi.

NO.	Nama Sampel Analisis	Tinggi Peak	Area Peak	Rf
1	Kontrol Jam ke -7	578,3	33571,42	0,78
2	Standart Jam ke-7	270,12	14755,91	0,78
3	Rekombinan Jam Ke -7	500,82	30479,57	0,78
4	Kontrol Jam ke -8	490,51	28929,43	0,77
5	Standart Jam ke-8			
6	Rekombinan Jam Ke -8	103,36	4628,45	0,76
7	Kontrol Jam ke -12	525,28	30207,92	0,78
8	Standart Jam ke-12	369,86	20934,97	0,78
9	Rekombinan Jam Ke -12	241,14	13535,13	0,77
10	Kontrol Jam ke -24	394,10	33359,06	0,83
11	Standart Jam ke-24	270,02	24336,44	0,82
12	Rekombinan Jam Ke -24	318,03	22002,36	0,80

Kemudian data-data tersebut diolah dengan persamaan 4.3, untuk mendapatkan interpretasi data yang lebih mudah untuk dianalisis.

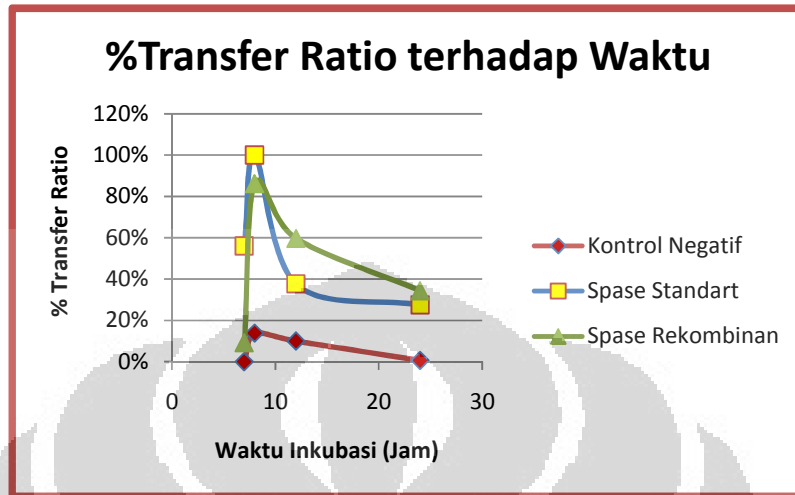
$$\%Transfer\ Ratio = \frac{Luas\ Area\ AK\ Sebelum\ Reaksi - Area\ Setelah\ beraksi}{Aktifitas\ SPase\ Stand\ Area\ AK\ sebelum\ Reaksi} \times 100\%.. (4.2)$$

Sehingga didapatkan hasil pada Tabel 4.7, dan kurva pada gambar 4.13.

Tabel 4.7 Interpretasi Transfer Ratio

Waktu Inkubasi (jam)	% Transfer Ratio		
	Kontrol	Spase Standar	Spase Rekombinan
7	0,00%	56,05%	9,20%
8	13,82%	100,00%	86,21%
12	10,02%	37,64%	59,68%

24	0,63%	27,51%	34,36%
----	-------	--------	--------

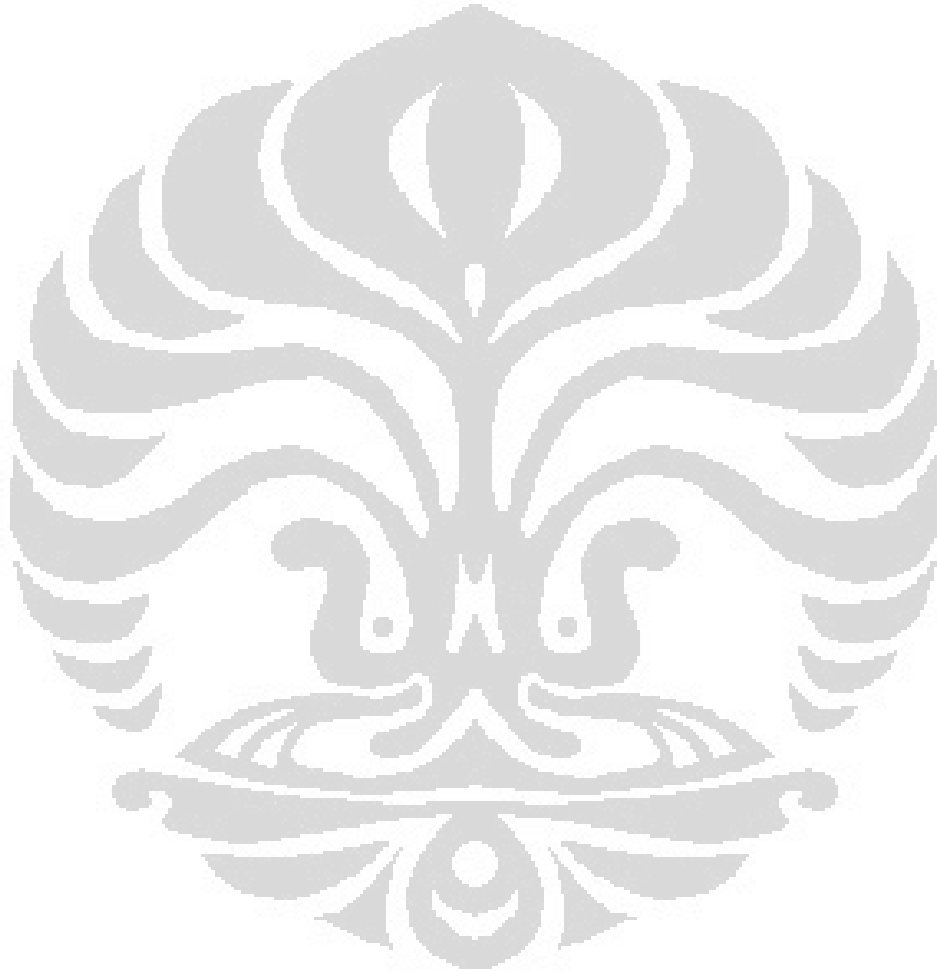


Gambar 4.13. Grafik Transfer Ratio Pada berbagai waktu inkubasi

Bedasarkan intepretasi data-data tersebut, terlihat bahwa konversi Asam Kojat ke produk hasil reaksi terus meningkat dari waktu ke waktu hingga mencapai waktu inkubasi optimum pada Jam ke -8, dan kembali membentuk asam kojat hingga inkubasi ke 24 jam. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa reaksi transglukosilasi bersifat reversible (Kitao & Sekine, 1994; Lee, Yoon, Nam, moon, moon, & Kim, 2006; Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011).

Adanya perbedaan aktifitas transglukosilasi asam kojat SPase rekombinan ,yang hanya memiliki %transfer ratio 86 % ,dengan standar yang memiliki %transfer ratio 100% kemungkinan besar disebabkan oleh biodifersitas enzim SPase. Dalam penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa SPase rekombinan (SPaseWRS-3(1)) memiliki perbedaan residu asam amino dengan SPase yang sama-sama berasal dari *Leuconostoc mesentroides*. Residu asam amino yang identik dilaporkan beragam dari 84 % sampai 98 % , artinya terdapat variasi residu asam amino yang mencapai 16 % . (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011). Walaupun dalam rangkaian polypeptida SPaseWRS-3(1) masih mengandung residu-residu asam amino yang dilaporkan berperan dalam aktifitas, adanya variasi residu asam amino pada rantai polipeptidanya akan menghasilkan perbedaan struktur protein, yang akan berdampak pada penurunan

kesesuaian dengan substrat, perubahan fleksibilitas enzim yang pada akhirnya akan dapat memberikan keragaman aktifitas antara satu jenis enzim dengan enzim lain. Residu asam amino SPase WRS-3(1) ditunjukkan pada Lampiran 5.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Pada penelitian ini telah didapatkan isolat enzim Sukrosafosforilase dari *Escherichia coli* BL-21Star™ rekombinan.
2. Berat molekul isolat Sukrosafosforilase diperoleh antara 66—45 kDa, hasil tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya.
3. Aktivitas enzim didapatkan cukup tinggi, yaitu mencapai 98,5 % relatif terhadap SPase standar.
4. Sukrosafosforilase rekombinan hasil isolasi juga memiliki aktivitas transglukosilasi terhadap substrat asam kojat yang menyerupai aktivitas transglukosilasi SPase standar.

5.2 Saran

1. Perlu dikembangkan metode analisis produk hasil transglukosilasi yang lebih baik.
2. Perlu juga dilakukan esei aktivitas terhadap substrat lain, sehingga informasi mengenai spesifitas reseptor enzim SPase rekombinan dapat diketahui lebih baik lagi
3. Perlu dilakukan pemurnian dan liofilisasi isolat sukrosafosforilase rekombinan, sehingga dapat dilakukan reaksi secara kuantitatif.

DAFTAR ACUAN

- Abada, E., Osman, M., Lee, J., & Kim, D. (2008). Molecular cloning of the gene 13555SPase encoding a sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *J. Biotechnol.*, 7, 463-468.
- Bainor, A., Chang, L., McQuade, T. J., Webb, B., & Gestwicki, J. E. (2011). Bicinchoninic acid (BCA) Assay in Low Volume. *Anal.Biochem.*, 410, 310-312.
- Birkinshaw, J. H. (1931). Kojic Acid (5-Hydroxy-2-Hydroxymethyl-y-Pyrone). *Stud. Biochem. Micro.*, 220, 127-138+366-367.
- Cazes, J., & Scott, R. P. (2002). *Chromatography Teory*. New York: Marcel Dekker Inc, 128-356.
- CambridgeSoft. (2001). The Merck Index. (XIII ed.). Cambridge, UK: Merck & Co., Inc.,
- Departemen Kesehatan RI. (1995). *Farmakope Indonesia* (IV ed.). Jakarta, 1004-1006.
- Hadi, E. S. (2010). *Ekspresi Dan Karakterisasi Sukrosafosforilase Rekombinan Dari Escherichia coli DH5a Asal Galur Bakteri Asam Laktat Leuconostoc Mesenteroides Mbfwrs-3(1) Menggunakan SDS PAGE dan Berdasarkan Produk Transglukosilasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 205-210.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid. *J. Biochem.*, 309-316.
- Hsin-Ju, H., Giridhar, R., & Wu, W.-T. (2007). Regioselective formation of kojic acid-7-o-alpha-d-glucopyranoside by whole cells of mutated *Xanthomonas campestris*. *J. Enzy. Microtech.*, 324-328.
- Kim, M., Kwon, T., Lee, H. J., Kim, K. H., Chung, D. K., Ji, G. E., et al. (2003). Clonig and Expression of Sucrose Phosphorylase Gene From *Bifidobacterium Longum* in *E. coli* and Characterization of The Recombinant Enzyme. *Biotechnol. Lett.*, 25, 1211-1217.
- Kitao, S., & Sekine, H. (1994). Synthesis of Two Kojic Acid Glucosides with Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 419-420.

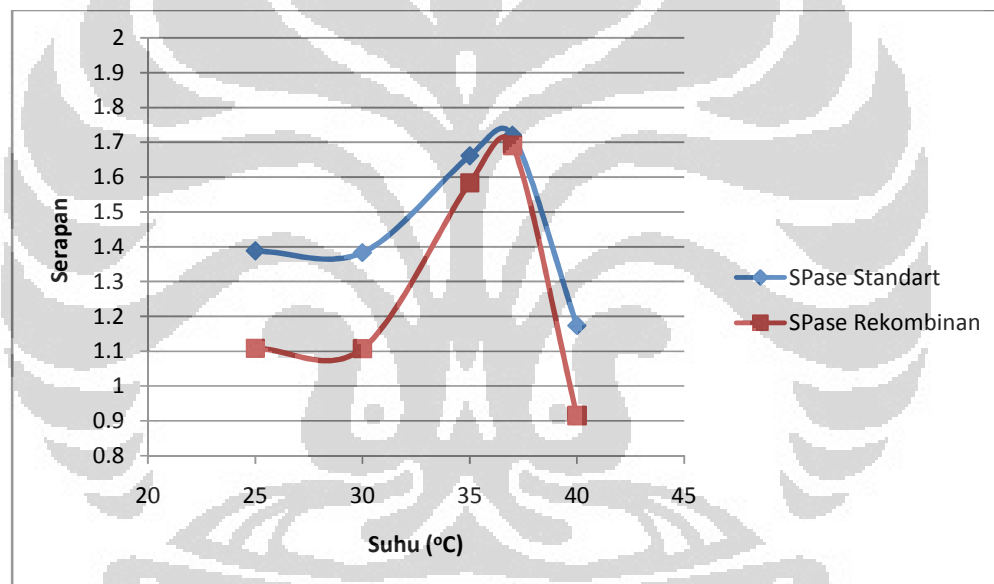
- Koga, T. (1991). Purification and some properties of sucrose phosphorylase. *J. Agric. Biochem.*, 1805-1810.
- Kwon, T., Kim, C. T., & Lee, J.-H. (2007). Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid. *Biotechnol Lett.*, 29, 611–615.
- Laemli, U. K., Cleaveland, D. W., Fischer, S. G., & Kirschner, M. W. (1977). Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis. *J. Biochem.*, 252, 1102-1106.
- Lee, J.-H., Yoon, S.-H., Nam, S.-H., moon, Y.-H., moon, Y.-Y., & Kim, D. (2006). Molecular cloning of a gene encoding the sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1149 and the expression in *Escherichia coli*. *J. Enzy. MicroTech.*, 39 (4), 612-620.
- Lee, J.-H., Moon, Y.-H., Kim, N., Kim, Y.-M., Kang, H.-K., Jung, J.-Y., et al. (2008). Cloning and expression of the sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol. Lett.*, 30, 749–754.
- Malik, A., Ishikawa, S., Sahlan, M., Ogasawara, N., Nguyen, U. Q., & Suryadi, H. (2011). Screening for sucrose phosphorylase in exopolysaccharide producing-lactic acid bacteria reveals SPaseWRS-3(1) in *Leuconostoc mesenteroides* isolated from sugar containing-beverage “Wedang Ronde” from Indonesia. *Afr. J. Biotechnol.*, 16915-16923.
- Merck. (2001). The Merck Index. (13th). Cambridge, UK: Merck & Co. Inc.
- Mirza, O., Skov, L. K., M, L. A., Broek, v. d., & Beldman, G. (2006). Structural Rearrangements of Sucrose Phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* during Sucrose Conversion. *J. Biochem.*, 35576–35584.
- Nakajima, N., Ishihara, K., & Hamada, H. (2001). Functional Glucosylation of Kojic Acid and Daidzein with the Eucalyptus Membrane-Associated UDP-Glucosyltransferase Reaction Systems. *J. Biosci. & Bioeng.*, 469-471.
- Noh, J.-M., Kwak, S.-Y., Kim, D.-H., & Lee, Y.-S. (2006). Kojic Acid–Tripeptide Amide as a New Tyrosinase Inhibitor. *J. Biopol.*, 151-744.
- Nomura, K., Sugimoto, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al. (2008). Glucosylation of Acetic Acid by Sucrose Phosphorylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 82-87.

- Robichon, C., Luo, J., Causey, T. B., Benner, J. S., & Samuelson, J. C. (2011). Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) Derivative Strains To Minimize *E. coli* Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Appl. and Envir. Microb.*, 4634–4646.
- Schägger, H. (2006). *Tricine–SDS-PAGE*. Frankfurt: Nature Protocols.
- Schoel, B., Welzel, M., & Kaufmann, S. (1995). Quantification of protein in dilute and complex samples: modification of the bicinchoninic acid assay. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 30, 199-206.
- Shin, M. H., Cheong, N.-Y., Lee, J.-H., & Kim, K. H. (2009). Transglucosylation of Caffeic Acid by A Recombinant Sucrose Phosphorylase. *Food Chem.*, 115, 1028–1033.
- Shin, M. H., Jung, M. W., Lee, J.-H., Kim, M. D., & Kim, K. H. (2008). Strategies for Producing Recombinant Sucrose Phosphorylase Originating from *Bifidobacterium longum* in *Escherichia coli* JM109. *Pro. Biochem.*, 43, 822–828.
- Sprogøe, D., van den Broek, L., Mirza, O., Kastrup, J., Voragen, A., Gajhede, M., et al. (2004). Crystal structure of sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis*. *J. Biochem.*, 1156-62.
- Sugimoto, K., Nomura, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al. (2007). Novel Transglucosylating Reaction of Sucrose Phosphorylase to Carboxylic Compound Such as Benzoic Acid. *J. Biosci. & Bioeng.*, 104, 22-29.
- Silverstein, R., Voet, J., Reed, D., & Abeles, R. H. (1967). Purification and Mechanism of Action of Sucrose Phosphorylase*. *J. BioChem*, 1338-1346.
- Tedokon, M., Suzuki, K., Kayamori, Y., Fujita, S., & Katayama, Y. (1992). Enzymatic Assay of Inorganic Phosphate with Use of Sucrose Phosphorylase and Phosphoglucomutase. *Clin. Chem.*, 512-515.
- van den Broek, L. A., van Boxtel, E. L., Kievit, R. P., Verhoef, R., Beldman, G., & Voragen, A. G. (2004). Physico-chemical and transglucosylation properties of recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. *Appl. Micro. and Cell Phy.*, 65, 219–227.

Lampiran 1. Hubungan Antara Suhu dan Aktivitas Sukrosafosforilase Standar dan Rekombinan

Tabel 4.2 Hubungan antara suhu inkubasi dan Aktivitas Enzim SPase standar (KIRI) dan enzim SPase rekombinan (KANAN).

Suhu (°C)	Serapan (A)	Suhu (C)	Serapan (A)
25	1,3879	25	1,1086
30	1,3834	30	1,1079
35	1,6614	35	1,5835
37	1,7195	37	1,6910
40	1,1739	40	0,9157

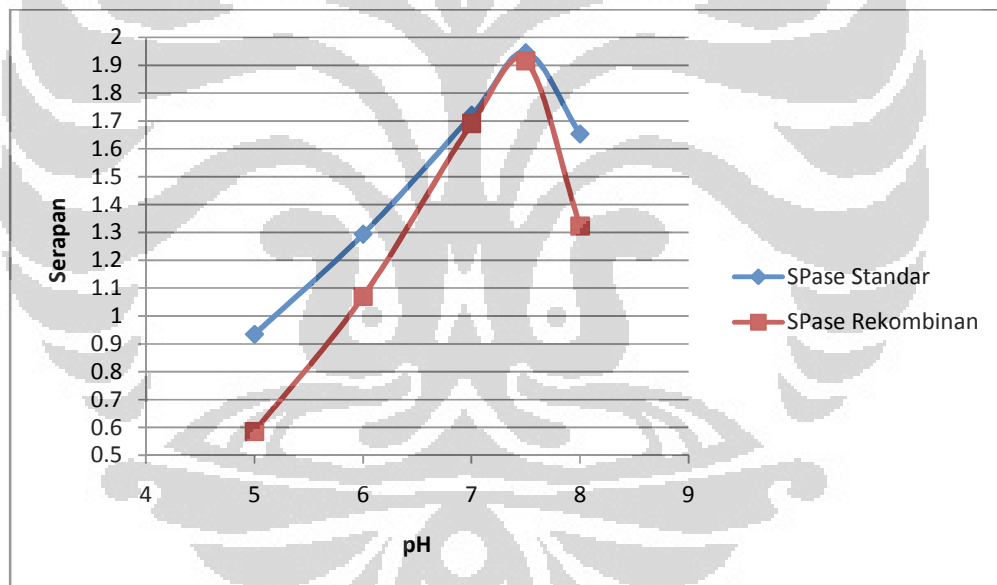


Gambar 4.14. Kurva Hubungan Antara Serapan Aktivitas Enzim SPase Standar dan Rekombinan terhadap Variasi Suhu.

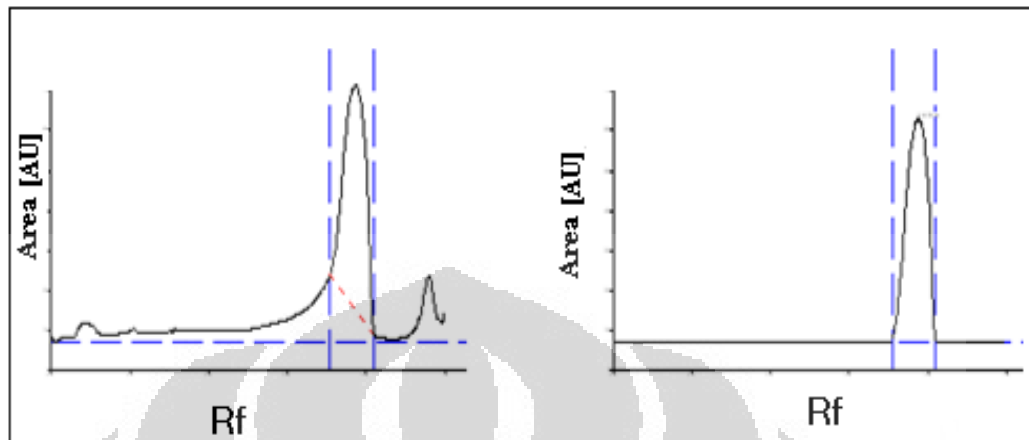
Lampiran 2. Hubungan Antara pH dan Aktivitas Sukrosafosforilase Standar dan Rekombinan

Tabel 4.3 Hubungan antara pH dan Aktivitas Enzim SPase Standart (KIRI) dan SPase Rekombinan (KANAN).

pH	Serapan (A)	pH	Serapan (A)
5	0,9342	5	0,586
6	1,2933	6	1,0702
7	1,7195	7	1,691
7,5	1,9442	7,5	1,9155
8	1,6525	8	1,3227



Gambar 4.15 Kurva Hubungan Antara Serapan Aktivitas Enzim SPase Standart dan Rekombinan terhadap Variasi pH.

Lampiran 3. Hasil KLT Densitometri Pada Inkubasi 7, 8, 12, dan 24 jam

Keterangan :

Rf = 0,78

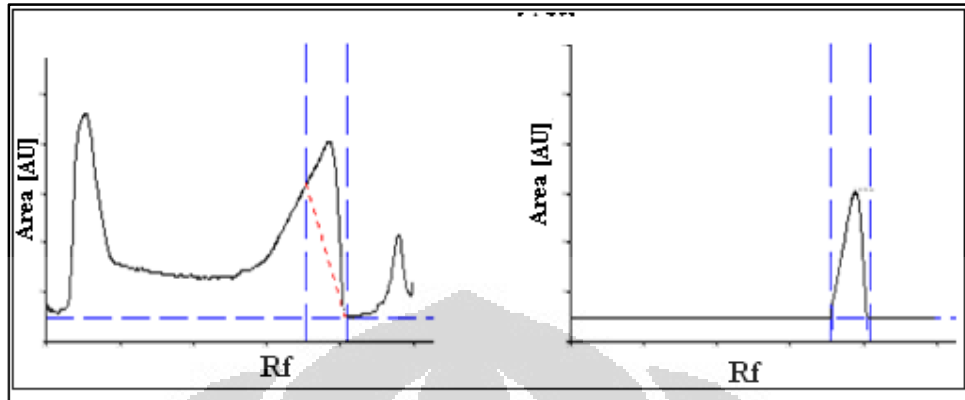
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.16 Kromatogram KLT Densitometer Kontrol Negatif Esei Aktifitas Transglukosilasi terhadap Asam Kojat yang Diinkubasi selama 7 jam

(lanjutan)



Keterangan :

Rf = 0,78

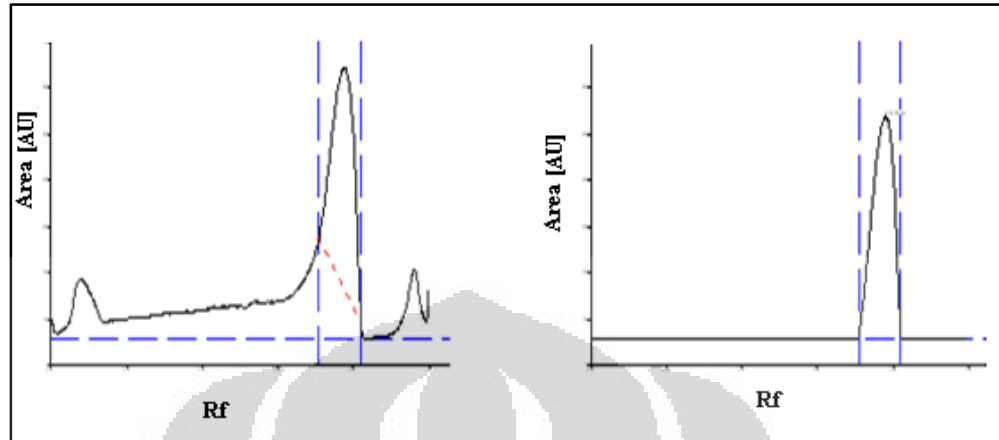
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.17 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglukosilasi SPase Standar terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 7 jam

(lanjutan)



Keterangan :

Rf = 0,78

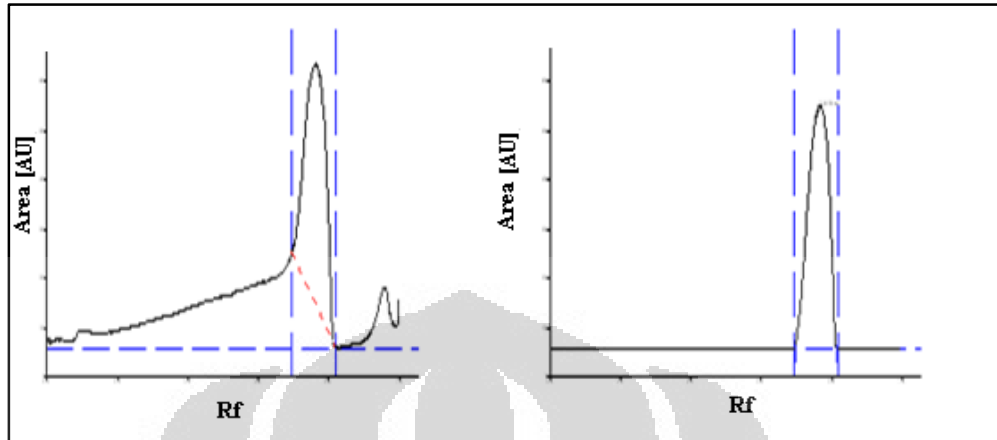
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.18 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglukosilasi SPase Rekombinan terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 7 jam

(lanjutan)



Keterangan :

Rf = 0,77

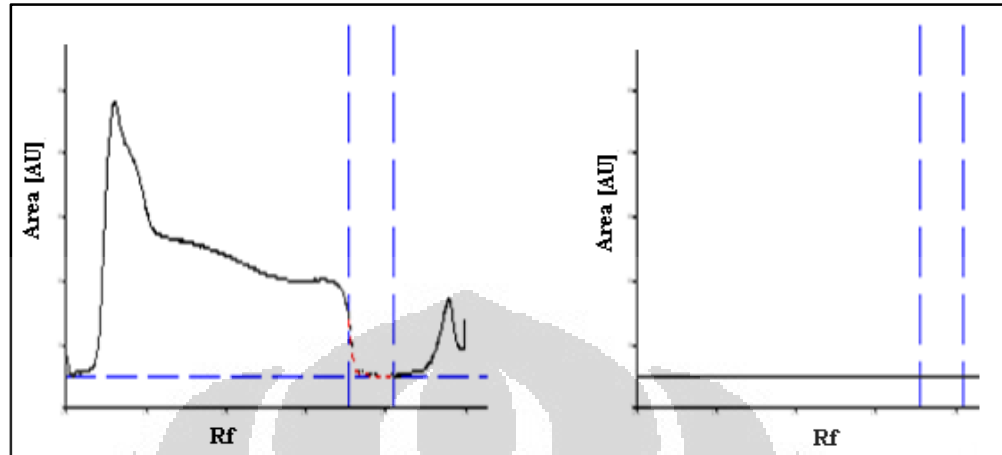
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.19 Kromatogram KLT Densitometer Kontrol Negatif Esei aktivitas Transglukosilasi terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 8 jam

(lanjutan)



Keterangan :

Rf = 0

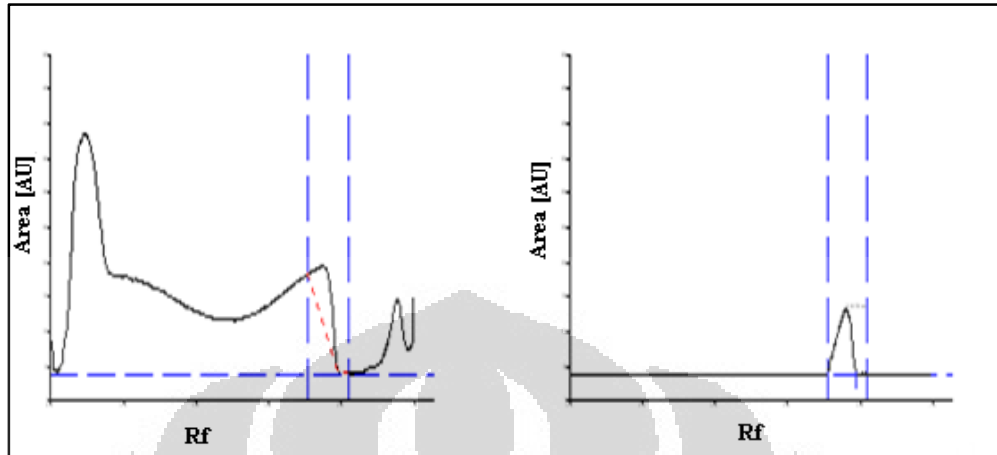
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.20 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglukosilasi SPase Standart terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 8 jam

(lanjutan)



Keterangan :

Rf = 0,76

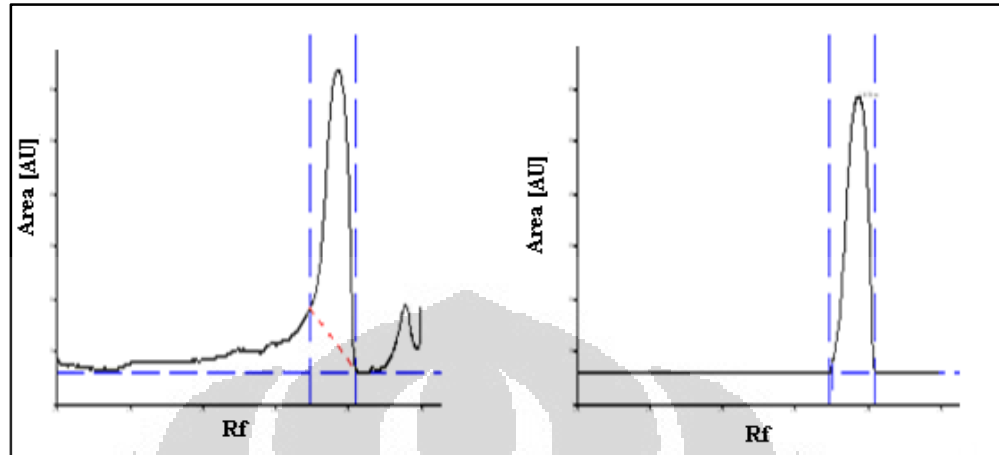
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.21 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglukosilasi SPase Rekombinan terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 8 jam

(lanjutan)



Keterangan :

Rf = 0,78

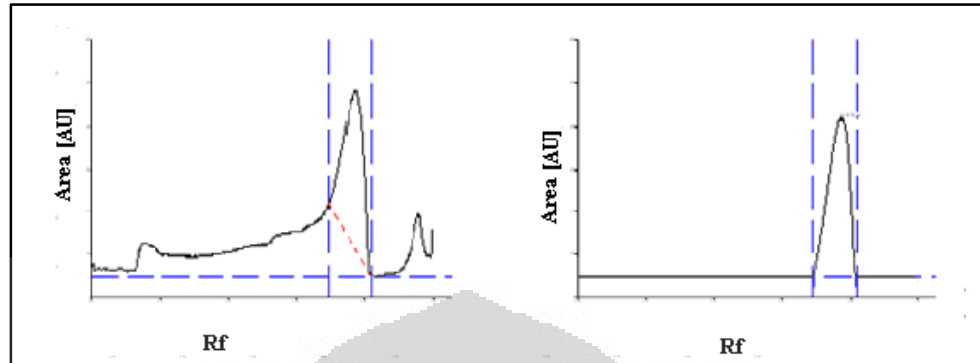
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.22 Kromatogram KLT Densitometer Kontrol Negatif Esei aktivitas Transglukosilasi terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 12 jam

(lanjutan)



Keterangan :

Rf = 0,78

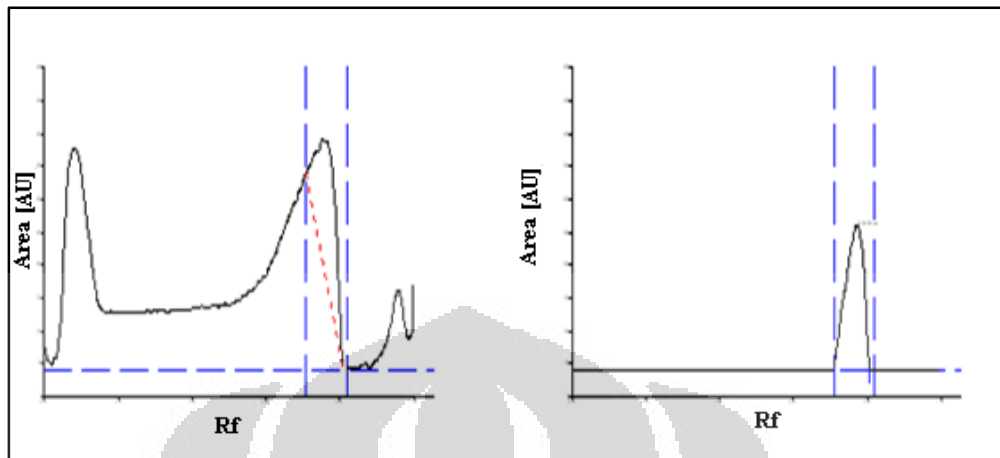
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.23 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglukosilasi SPase Standart terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 12 jam

(lanjutan)



Keterangan :

Rf = 0,77

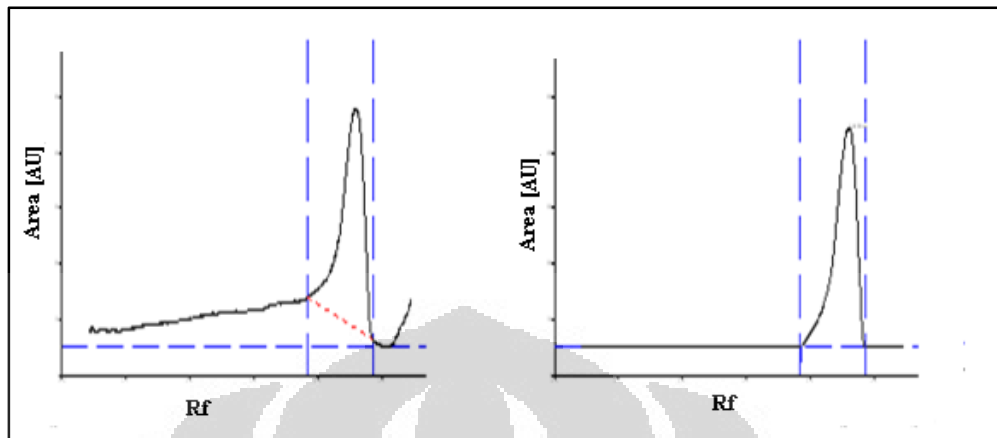
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.24 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglikosilasi SPase Rekombinan terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama 12 jam

(lanjutan)



Keterangan :

Rf = 0,83

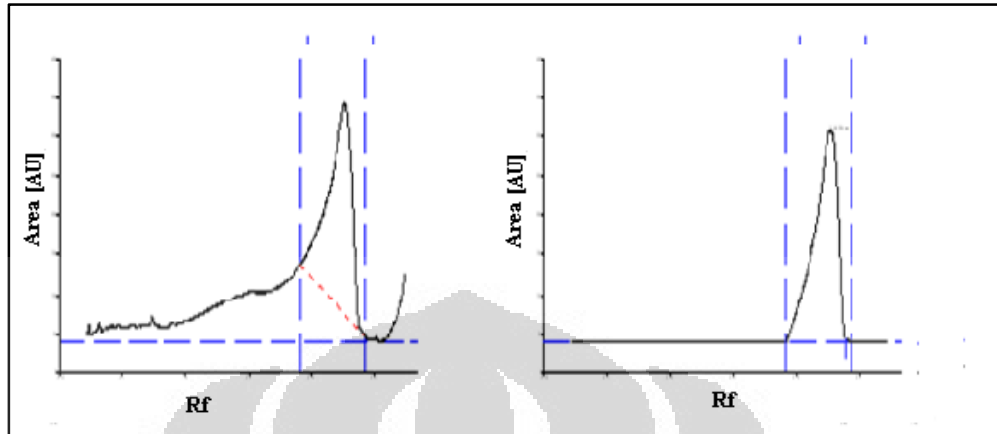
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.25 Kromatogram KLT Densitometer Kontrol Negatif Esei aktivitas Transglikosilasi terhadap Asam kojat yang Diinkubasi selama Inkubasi 24 Jam

(lanjutan)



Keterangan :

Rf = 0,82

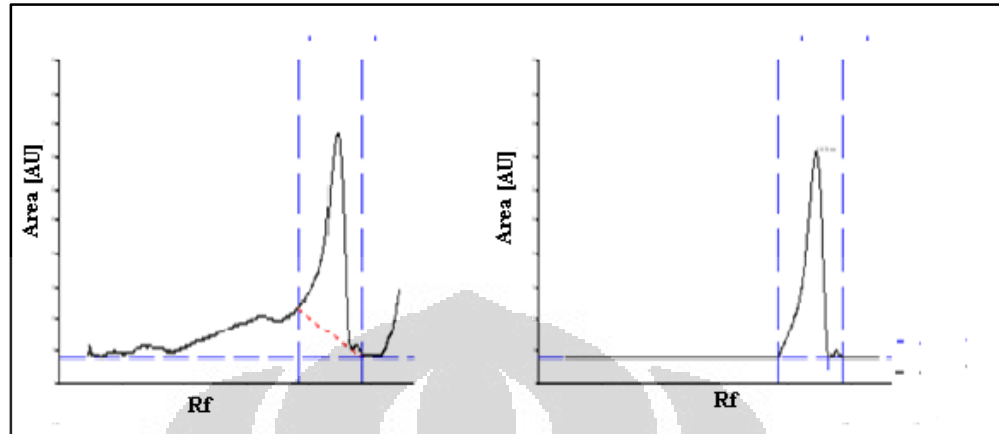
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.26 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglukosilasi SPase Standar terhadap Asam kojat yang Diinkubasi Inkubasi 24 Jam

(lanjutan)



Keterangan :

Rf = 0,80

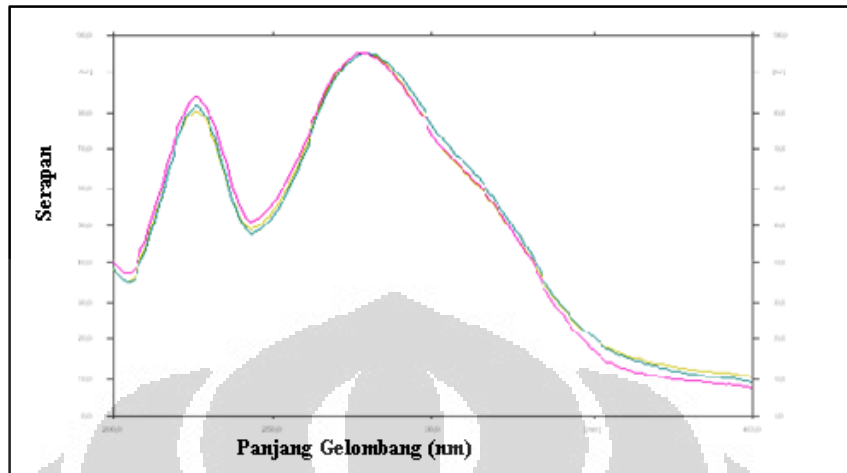
Kondisi analisis

Fase diam : Plat KLT *silica gel* GF-254 (10 x 10 cm)

Fase Gerak : Asetonitril-air (80:20)

Gambar 4.27 Kromatogram KLT Densitometer Esei aktivitas Transglukosilasi SPase Rekombinan terhadap Asam kojat yang Diinkubasi Inkubasi 24 Jam

(lanjutan)



Keterangan :

Panjang Gelombang Maksimum = 278 nm

Gambar 4.28 Spektrum Serapan Semua Bercak Analisis KLT Densitometer

Lampiran 4. Cara memperoleh regresi linear

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum y_i)(\sum x_i^2) - (\sum x_i)(\sum x_i y_i)}{N(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{N(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{[N(\sum x^2) - (\sum x)^2 \times N(\sum Y^2) - (\sum y)^2]^{1/2}}$$

Lampiran 5. Sekuens Asam Amino SPase WRS-3(1) dan perbandingan dengan 1355SPase dan 1149SPase

WRS-3 (1) SPase	1	MEIQNKAMLITYADSLGKNLKDVRKVLKEDIGDAIGGVHLLPPFPSTGDRGFAPSDYTRV	60
1355SPase	1	MEIQNKAMLITYADSLGKNLKDVRKVLKEDIGDAIGGVHLLPPFPSTGDRGFAPSDYTRV	60
1149SPase	1	MEIQNKAMFITYADSLGKNLKDVRKVLKEDIGDAIGGVHLLPPFPSTGDRGFAPSDYTRV	60
		*****:*****	
WRS-3 (1) SPase	61	DSAFGDWSDVEALGEEYYLMFDFMINHISRESVMYQDFKKNHDESKYKDFIRWEKFWAK	120
1355SPase	61	DSAFGDWSDVEALGEEYYLMFDFMINHISRESVMYQDFKKNHDESKYKDFIRWEKFWAK	120
1149SPase	61	DSAFGDWSDVEALGEEYYLMFDFMINHISRESVMYQDFKKNHDESKYKDFIRWEKFWAK	120

WRS-3 (1) SPase	121	AGENRPTQADVLIYKRKDKAPTQEIFDDGTENLWNTFGDEQIDIDVNSAIAKEFIKT	180
1355SPase	121	AGENRPTQADVLIYKRKDKAPTQEIFDDGTENLWNTFGDEQIDIDVNSAIAKEFIKT	180
1149SPase	121	AGENRPTQADVLIYKRKDKAPTQEIFDDGTENLWNTFGDEQIDIDVNSAIAKEFIKT	180

WRS-3 (1) SPase	181	TLEDVVKHGANLIRLDAFAYAVKKVDTNDFVVEPEIWDTLNEVREILTPKAEILPEIHE	240
1355SPase	181	TLEDVVKHGANLIRLDAFAYAVKKVDTNDFVVEPEIWDTLNEVREILTPKAEILPEIHE	240
1149SPase	181	TLEDVVKHGANLIRLDAFAYAVKKVDTNDFVVEPEIWDTLNEVREILTPKAEILPEIHE	240

WRS-3 (1) SPase	241	HYSIPKKINDHGTYFDALPMTTLYTLYSGKTNQAKWLKMSPMKQFTTLDTHDSIGVV	300
1355SPase	241	HYSIPKKINDHGTYFDALPMTTLYTLYSGKTNQAKWLKMSPMKQFTTLDTHDSIGVV	300
1149SPase	241	HYSIPKKINDHGTYFDALPMTTLYTLYSGKTNQAKWLKMSPMKQFTTLDTHDSIGVV	300

WRS-3 (1) SPase	301	DARDVLTDEEIDYASEELYKVGANVKKTYSSASYNLDIYQINSTYYALGNDDAAYLLS	360
1355SPase	301	DARDVLTDEEIDYASEELYKVGANVKKTYSSASYNLDIYQINSTYYALGNDDAAYLLS	360
1149SPase	301	DARDVLTDEEIDYASEELYKVGANVKKTYSSASYNLDIYQINSTYYALGNDDAAYLLS	360

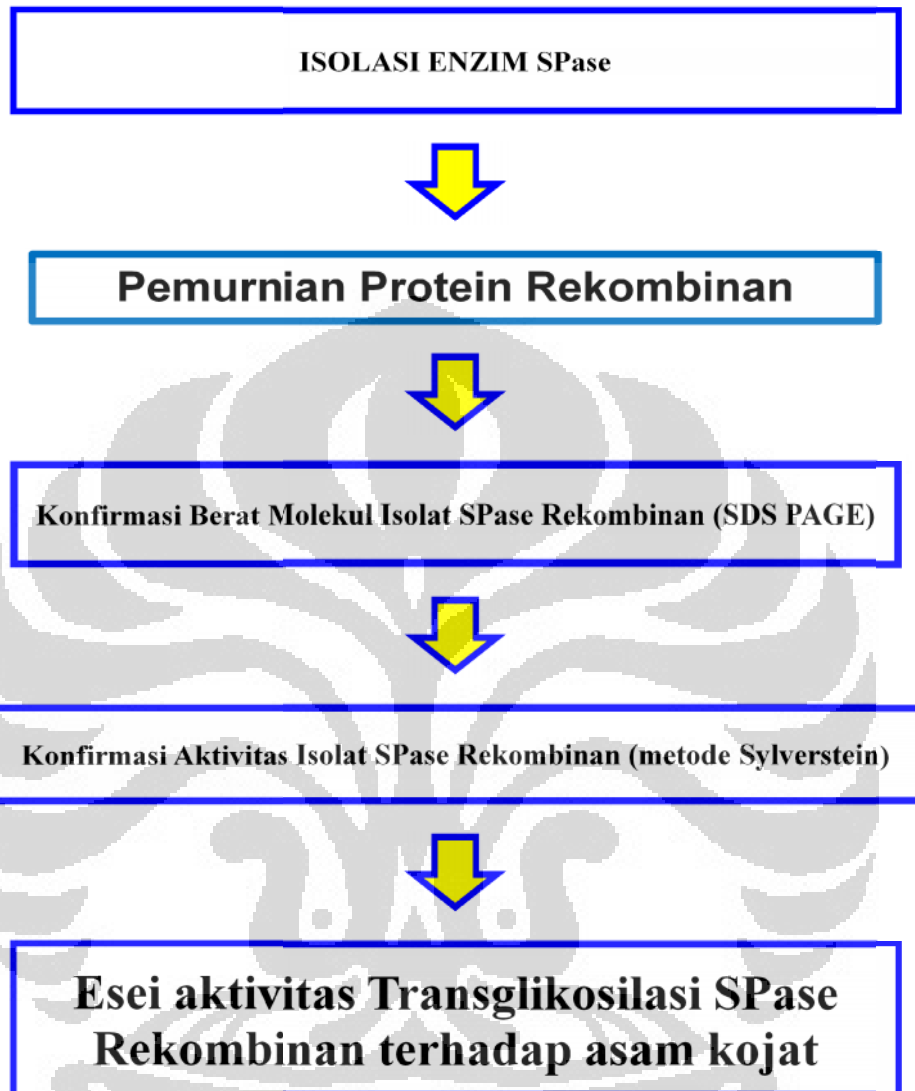
WRS-3 (1) SPase	361	RVFQVFAPGIPQIYYVGLLAGENDIELLESSKEGRNINRHYYSVDEKVEVSRPVVANLL	420
1355SPase	361	RIFQVFAPGIPQIYYVGLLAGENDIELLESSKEGRNINRHYYSVDEIKEVSRPVVAKLL	420
1149SPase	361	RIFQVFAPGIPQIYYVGLLAGESDIELLESSKEGRNINRHYYSVDEKVEVSRPVVAKLL	420
		*:*****:*****:*****	
WRS-3 (1) SPase	421	KLLSWRNNFAAFDLGSDVETPSDITIKITRKDKSGENVAVLVANAADKFTITANGEE	480
1355SPase	421	KLLSWRNNFAAFDLGSDVETPSDITIKITRKDKSGENVAVLVANAADKFTITANGEE	480
1149SPase	421	KLLSWRNNFAAFDLGSDVETPSDITIKITRKDKSGENVAVLVANAADKFTITANGEE	480

WRS-3 (1) SPase	481	VLANSEADKQQL	
1355SPase	481	ILANTEADKQQL	
1149SPase	481	HLANTEADKQQL	
		:*:*****	

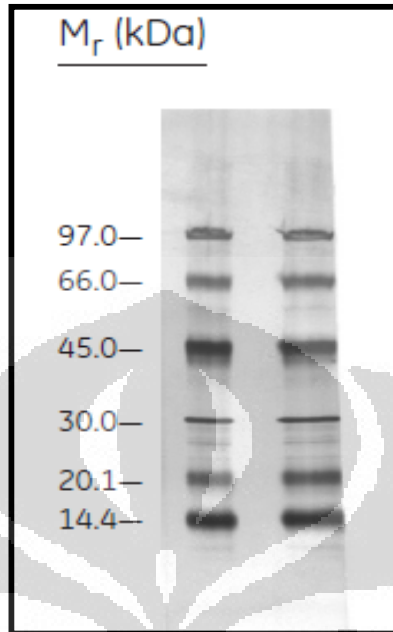
(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011).

Keterangan Gambar:

Perbandingan sekuens asam amino SPase WRS-3(1) yang dibandingkan dengan 1355SPase dan 1149 SPase. Keidentikan sekuens dilambangkan dengan bintang (*) dan variasi sekuens dilambangkan dengan (:). Residu berpengaruh pada katalisis diberikan latarbelakang hitam (Asp-196, Glu-237 dan Asp-295). (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011).

Lampiran 6. Skema Penelitian

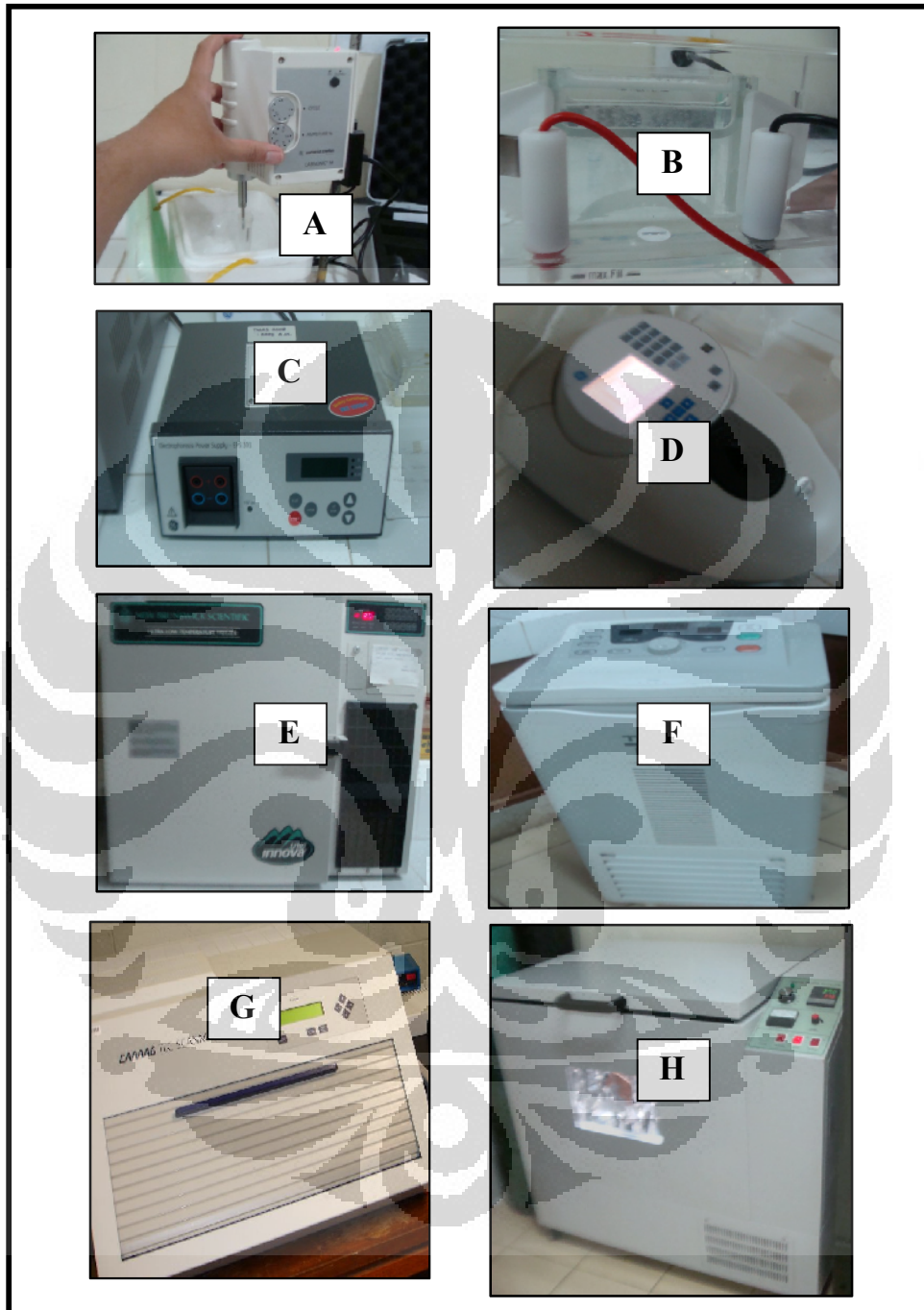
Lampiran 7. Marker SDS PAGE (GE Healthcare Amersham)



Protein Marker
Amersham GE Healthcare Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis

Tabel 4.8 Protein Standar Marker

Protein	M_r (Da)	R_f
Phophorylase b	97 000	0.16
Albumin	66 000	0.26
Ovalbumin	45 000	0.41
Carbonic anhydrase	30 000	0.57
Trypsin inhibitor	20 100	0.71
α -Lactalbumin	14 400	0.80

Lampiran 8. Alat-alat yang digunakan

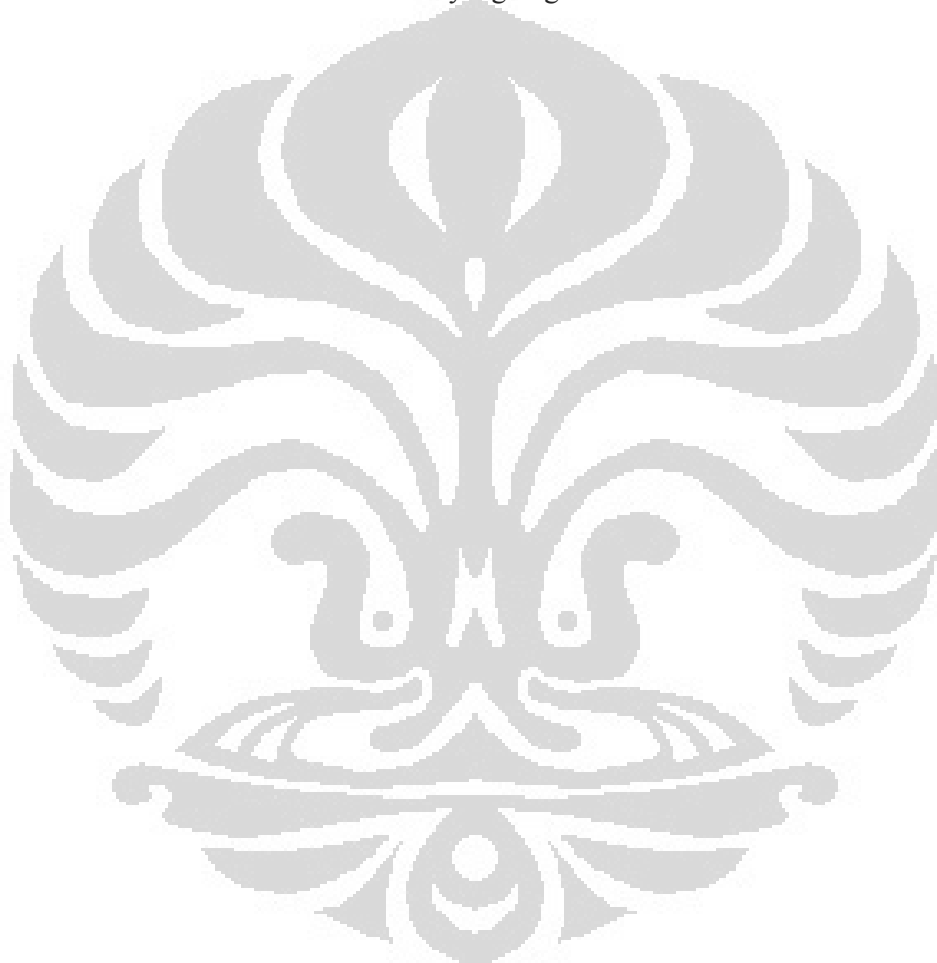
Keterangan :

- A. Sonikator
- B. Elektroforator SDS PAGE
- C. Power Suplay Elektroforator SDS PAGE

(lanjutan)


- D. Spektrofotometer UV-Vis (GeneQuant[®])
- E. Pendingin bersuhu – 80 °C
- F. Mikrosentrifuse berkecepatan tinggi dan berpendingin
- G. *TLC Scanner*
- H. Orbital Inkubator

Gambar 3.2 Alat-alat yang Digunakan dalam Penelitian



Lampiran 9. Sertifikat Analisis Sukrosafosforilase standar

ORIENTAL YEAST CO., LTD.



BIOSCIENCE DIVISION
6-10, 3-CHOME, AZUSAWA, ITABASHI,
TOKYO 174-8505, JAPAN

PHONE: 03(3968) 1192
+81-3-3968-1192
FAX : 03(3968) 4883
+81-3-3968-4883

Notify to Osaka Bio Plant on general information of quality PHONE: 06(6384) 1222 FAX: 06(6338) 3474
+81-6-6384-1222 FAX: 06(6338) 3474

ASSAY DATA

SUCROSE PHOSPHORYLASE
from *Leuconostoc mesenteroides*
Sucrose: orthophosphate α -D-glucosyltransferase (EC 2.4.1.7)

Standard: SP-93

Lot No.: 32793102

	Specification	Result
Activity	—	80 U/mg powder
Specific activity	> 100 U/mg protein	114 U/mg protein
Contaminants (as SP activity = 100%):		
Lactate dehydrogenase	< 0.1 %	0.036 %
Pi	< 0.1 μ g/mg powder	0.006 μ g/mg powder
State: Lyophilized powder of highly purified enzyme		
One mg of powder contains the following		
Protein	600 \pm 300 μ g	700 μ g
PIPES	400 \pm 300 μ g	300 μ g

Date of assay: October 13, 2011 K. Totouya

Approved by: M. Kagei Shipment: Conformable

Storage: below -20 °C

Other details of the assay procedure are available upon request.

for laboratory use only

Lampiran 10. Sertifikat Analisis Glukosa-6-fosfat dehidrogenase

ORIENTAL YEAST CO.,LTD.

OSAKA BIO PLANT

MINAMI-SUITA 4-4-1,
SUITA, OSAKA
564-0043 JAPAN

PHONE : 06 (8384) 1222
FAX : 06 (8338) 3474

ASSAY DATA

GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE
from *Leuconostoc mesenteroides*
D-Glucose-6-phosphate: NADP⁺1-oxidoreductase (EC 1.1.1.49)

Standard: G-6-PDH(L.M.)-63

Lot No.: 36063902

	Specification	Result
Activity	—	1,000 U/vial
Specific activity	> 400 U/mg protein	892 U/mg protein
Contaminants (as G-6-PDH activity = 100%):		
Hexokinase	< 0.01 %	0.000 %
Phosphoglucose isomerase	< 0.005 %	0.000 %
Phosphogluconate dehydrogenase	< 0.001 %	0.000 %
Creatine kinase	< 0.001 %	0.000 %
Glutathione reductase	< 0.001 %	0.000 %
Phosphoglucomutase	< 0.001 %	0.000 %
Myokinase	< 0.001 %	0.000 %
Lactate dehydrogenase	< 0.01 %	0.000 %

State: Lyophilized powder of highly purified enzyme
One mg of powder contains the following

Protein	400 ± 300 µg	500 µg
K-PO ₄	200 ± 150 µg	200 µg
Na-citrate	400 ± 300 µg	300 µg

Date of assay: 2009/01/06 *S. Takahata*

Approved by: M. Kagei Shipment: Conformable

Storage: below -20°C

Other details of the assay procedure are available upon request.

for laboratory use only

Lampiran 11. Sertifikat Analisis Glukosa-1,6-bifosfat

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=G5875&LotNo=025K2795...>

Certificate of Analysis

EDMUND S. ALDRICH

<p>Product Name e-D-Glucose 1,6-bisphosphate (alpha-D-glucopyranosum) salt hydrate</p> <p>Product Number 65875</p> <p>Product Brand SIGMA</p> <p>CAS Number 71592-1-4</p> <p>Molecular Formula $C_6H_{12}O_{12} \cdot nH_2O$</p> <p>Molecular Weight 198.151 (anhydrous basis)</p> <p>Storage Temp -20°C</p>	<p>LOT ANALYSIS RESULTS</p> <p>WHITE POWDER</p> <p>CLEAR COLORLESS</p> <p>4 MOLES/MOLE (0.3%)</p> <p>0.4% METHANO.</p> <p>3.8 MOLES/MOLE</p> <p>65%</p> <p>JANUARY 2008</p>
--	--

<p>TEST</p> <p>APPEARANCE WHITE TO OFF-WHITE POWDER</p> <p>SOLUBILITY CLEAR COLORLESS TO VERY FANT YELLOW SOLUTION AT 50MG/ML IN WATER</p> <p>WATER BY KARL FISCHER 18MT 5MOLES/MOLE</p> <p>SOLVENT CONTENT BY GC APPROX. 4MOLES/MOLE</p> <p>CYCLOHEXYLAMINE CONTENT NLT 95% BASED ON ENZYMATIC ASSAY, PHOSPHORUS AND ELEMENTAL ANALYSIS</p> <p>PURITY* * CORRECTED FOR WATER, SOLVENT, SALT AND ELEMENTAL ANALYSIS</p>	<p>GC RELEASE DATE</p> <p><i>Rodney E. Brueck</i></p> <p>Rodney E. Brueck, Manager Quality Control St. Louis, Missouri, USA</p>
--	--

Lampiran 12. Sertifikat Analisis NADP⁺

ORIENTAL YEAST CO., LTD.
OSAKA BIO PLANT
 MINAMI-SUITA 4-4-1, SUITA, OSAKA 564-0043 JAPAN
 PHONE : 06 (8384) 1222 FAX : 06 (8336) 3474

ASSAY DATA

β-NADP⁺
 β-Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, oxidized form, monosodium salt
 (β-NADP⁺, β-TPN⁺, Coenzyme-II)

Formula : C₂₁H₂₈N₇O₁₇P₃
 Formula weight : 743.4 (as anhydrous free acid)
 : 765.4 (as monosodium anhydrate)
 : 801.4 (as monosodium dihydrate)

Lot No. 045906

	Specification	Result
Purity	≥ 93%	96.7 %
NADP ⁺ contents	—	89.9 %
Sodium contents	3.0 ± 1.5%	2.9 %
Water contents	< 8%	4.1 %
Spectral analysis		
1. ε at 260 nm and pH 7.5	(18.0 ± 0.8) × 10 ³ L/mole/cm	18.1 × 10 ³ L/mole/cm
2. Ratio at pH 7.5		
A250 / A260	0.83 ± 0.03	0.83
A280 / A260	0.21 ± 0.02	0.20
3. ε when reduced with glucose-6-phosphate dehydrogenase at 340nm and pH 7.5		
	(6.2 ± 0.3) × 10 ³ L/mole/cm	6.0 × 10 ³ L/mole/cm
4. Ratio when reduced with glucose-6-phosphate dehydrogenase at pH 7.5		
A340 / A260	0.43 ± 0.02	0.41



Date of assay: 2009/05/28 *Michiko V*

Approved: M. Kagei Shipment: Conformable

Other details of the assay procedure are available upon request.

for laboratory use only

Lampiran 13. Sertifikat Analisis Asam Kojat

 CERTIFICATE OF ANALYSIS		March 9 2011
Product name	: Kojic Acid	NACALAI TESQUE, INC. Manufacturing Department 17-1st floor, Ka-de-sho, Maizumi, Kyoto 597-0001 TEL: 01-075-231-1730 FAX: 01-075-231-1733
Product number	: 19907-02	
Grade	: EP	
Lot number	: N1E0897	
Package size	: 25g	
Test Item	Specification	Results
Assay %	min. 98.0	100.5
Solubility in methanol	Almost clear	Passed test
Melting point deg. C	153 - 156	154.5
Residue on ignition (as sulfate)	max. 0.1	max. 0.1
 M. Yamaga Inspecting Section Manager		