



UNIVERSITAS INDONESIA

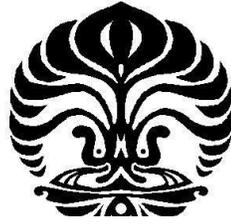
**PEMURNIAN PROTEIN REKOMBINAN
SUKROSAFOSFORILASE DARI *Leuconostoc
mesenteroides* MBFWRS-3(1) YANG DIEKSPRESIKAN DI
Escherichia coli BL21DE**

SKRIPSI

PAULINE LEON ARTHA

0806460553

**FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPOK
2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMURNIAN PROTEIN REKOMBINAN
SUKROSAFOSFORILASE DARI *Leuconostoc
mesenteroides* MBFWRS-3(1) YANG DIEKSPRESIKAN DI
Escherichia coli BL21DE**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
sarjana teknik**

PAULINE LEON ARTHA

0806460553

**FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPOK
2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Pauline Leon Artha

NPM : 080640553

Tanda Tangan : *Pauline*

Tanggal : 8 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Pauline Leon Artha
NPM : 0806460553
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul Skripsi : Pemurnian protein rekombinan sukrosafosforilase dari *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3(1) yang diekspresikan di *Escherichia coli* BL21DE

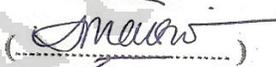
Telah berhasil dipertahankan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknologi Bioproses, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Muhamad Sahlan, S.Si, M.Eng

()

Pembimbing : Dr. Amarila Malik, M.Si

()

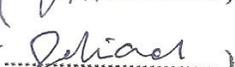
Penguji : Dr. Tania Surya Utami, ST., MT

()

Penguji : Prof.Dr.Ir. Anondho Wijarnako, M.Eng

()

Penguji : Dr. Ir. Setiadi, M.Eng

()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 8 juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus, karena cinta kasih-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk menjapai gelar Sarjana Teknik pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia.

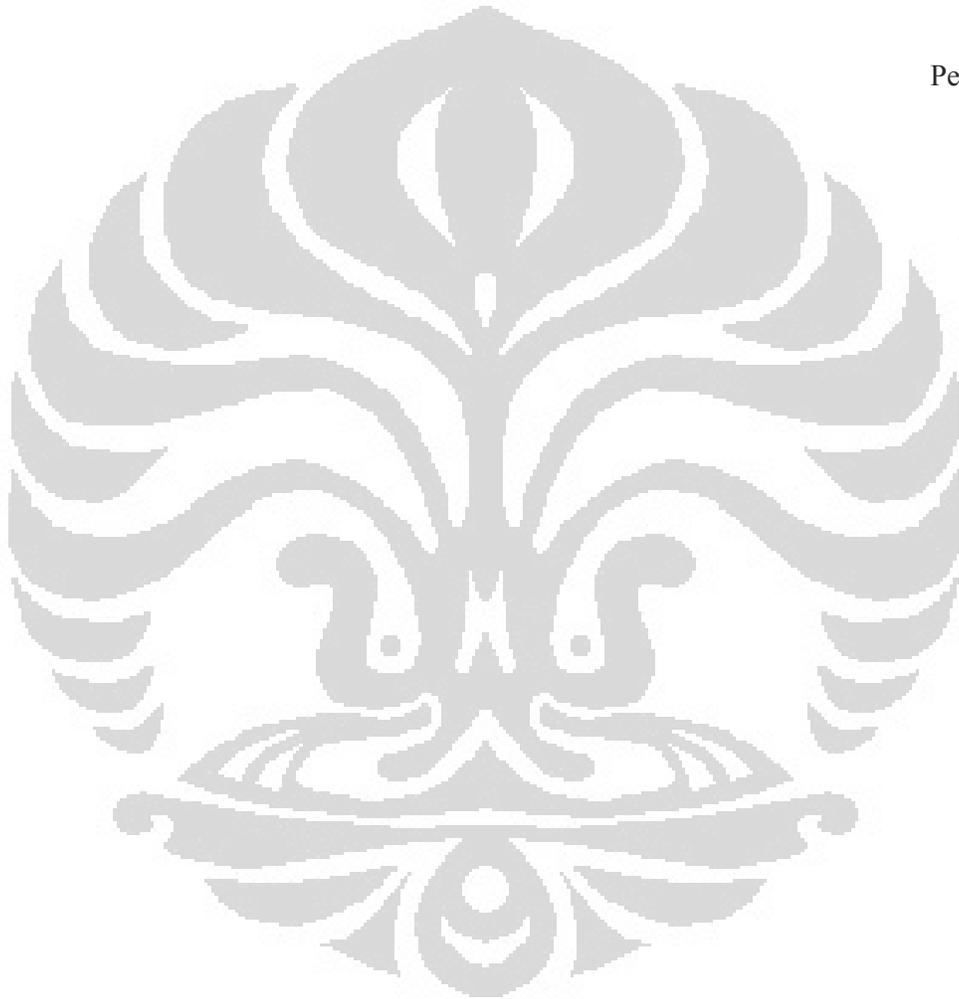
Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis secara khusus mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Muhamad Sahlan, S.Si, M.Eng selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan motivasi, bantuan, dan kesempatan berupa ilmu, nasehat, bimbingan, dan dana selama penelitian berlangsung dan penyusunan skripsi.
2. Ibu Dr. Amarila Malik, M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan kesempatan dan ilmu selama penelitian.
3. Seluruh staf pengajar, karyawan dan laboran Fakultas Farmasi dan Departemen Teknik Kimia.
4. Papa, Mama, Ella (adik) dan Anjas (kakak) yang telah memberi semangat, doa, dan cinta serta menemani penulis disaat-saat sulit selama penelitian dan penyusunan skripsi.
5. Editha, Furqon, Radit, Evelina, Neti, Kenny, Iqbal, Purwa, Bianca, Ola, dan Febrianti yang telah menjadi teman-teman yang baik di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi.
6. Bu Imelda yang telah mengajari teknik penelitian dan memberikan semangat untuk berpikir positif.
7. Indri, Darul, Dara, Desi, Yongki, dan Khotib sebagai teman-teman satu riset grup yang telah memberikan inspirasi dan teman diskusi.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu-persatu yang telah memberikan bantuan hingga terselesaikannya skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Akhir kata penulis mengharapkan semoga skripsi ini dapat 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 : Pauline Leon Artha

NPM : 0806460553

Program Studi : Teknologi Bioproses

Departemen : Teknik Kimia

Fakultas : Teknik

Jenis karya : Skripsi

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

Pemurnian protein rekombinan sukrosafosforilase dari *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3(1) yang diekspresikan di *Escherichia coli* BL21DE

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di :

Pada tanggal:

Yang menyatakan



(Pauline Leon Artha)

ABSTRAK

Nama : Pauline Leon Artha

Program Studi : Teknologi Bioproses

Judul :Pemurnian protein rekombinan sukrosafosforilase dari *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3(1) yang diekspresikan di *Escherichia coli* BL21DE

Enzim sukrosafosforilase termasuk dalam kelompok enzim glukosiltransferase, yang dapat mengkatalisis sukrosa dan fosfat menjadi D-fructose dan α -D-glucose 1-phosphate. SPase berperan dalam pemindahan gugus glukosil ke sejumlah senyawa (transglukosilasi). Reaksi transglukosilasi dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan stabilitas kimia dan memperbaiki karakteristik senyawa bioaktif. Tujuan penelitian ini adalah melakukan pemurnian SPase rekombinan yang dihasilkan oleh *Escherichia coli* BL21DE yang membawa gen penyandi sukrosafosforilase asal *Leuconostoc mesenteroides* dengan kromatografi afinitas pada kondisi optimum dan menguji aktivitas SPase rekombinan dengan metode spektrofotometri. Pada esei enzimatis, SPase direaksikan menggunakan substrat sukrosa dan produk akhirnya diukur sebagai NADPH pada 340 nm. Hasil SDS PAGE, menunjukkan SPase rekombinan berhasil dimurnikan dengan berat molekul yang telah diidentifikasi dari penelitian sebelumnya adalah 55-57 kDa. Hasil esei aktivitas enzimatis menggunakan metode spektrofotometri menunjukkan bahwa SPase rekombinan ini terbukti aktif meskipun aktivitasnya lebih rendah dibandingkan SPase standar dari *Leuconostoc mesenteroides*.

Kata kunci : sukrosafosforilase, SDS PAGE, spektrofotometri, aktivitas enzimatis, transglukosilasi

xvi+70 halaman :16 gambar ; 8 tabel; 10 lampiran

Daftar Pustaka : 25 (1990-2011)

ABSTRACT

Name : Pauline Leon Artha

Study Program : Teknologi Bioproses

Title :Purification protein recombinant sucrosephosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3(1) which is expressed in *Escherichia coli* BL21DE

Sucrose phosphorylase belongs to glycosyltransferase which catalyze sucrose and phosphate become D-fructose dan α -D-glucose 1-phosphate. SPase has role in transglucosylation to increase chemical stability and repair characteristic of bioactive compound. The object of this research are purification SPase recombinant from *E. coli* BL21DE which carries out SPase gene from *Leuconostoc mesenteroides*. Affinity chromatography is used to purify SPase recombinant in optimum condition and try assay enzymatic activity of SPase recombinant with spectrophotometry method. SPase recombinant use sucrose as substrate and the final product is measured as NADPH at 340 nm. SDS Page reveal that SPase recombinant is succeeded to be purified with molecular mass 55-57 kDa based on previous research. SPase recombinant has lower enzymatic activity than SPase from *Leuconostoc mesenteroides*.

Keywords: sucrosephosphorylase, SDS PAGE, spectrophotometry, enzymatic activity, transglycosylation

xvi+70 page : 16 Figures; 8 tables; 10 attachment

Bibliography : 25 (1990-2011)

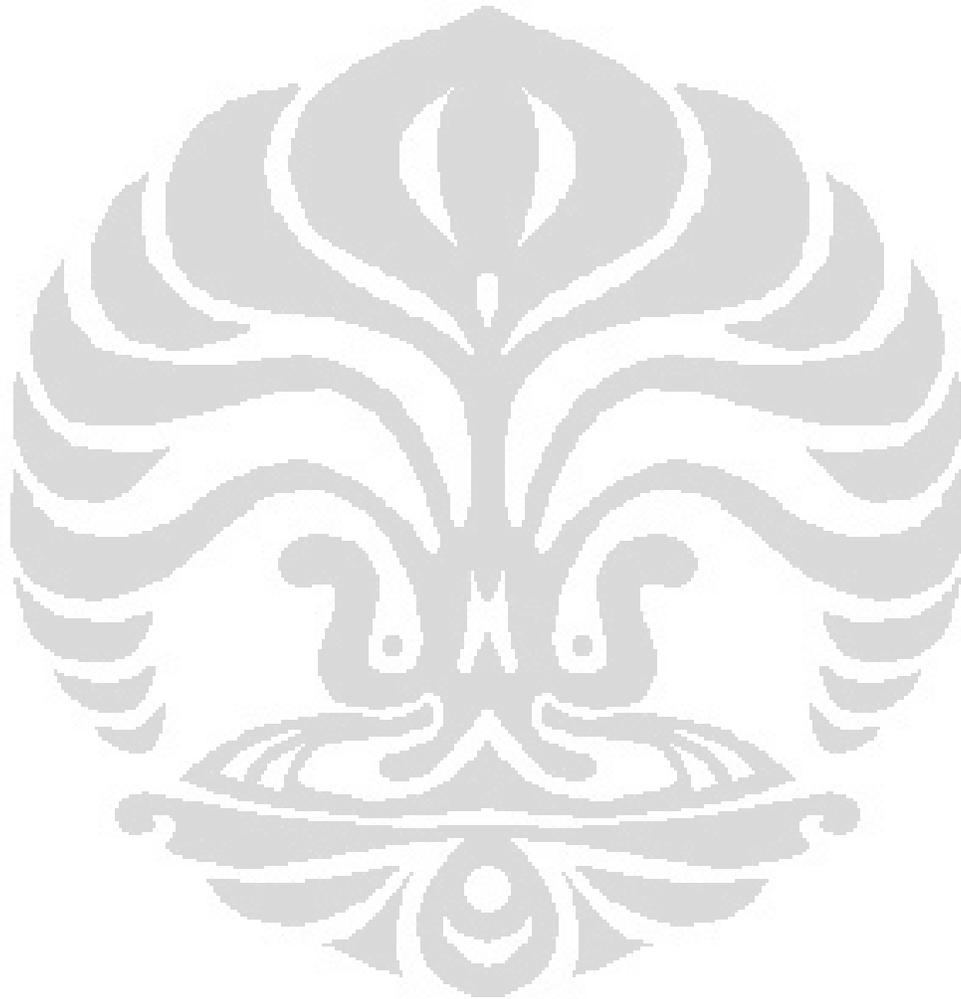
DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PENGESAHAN	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
1.PENDAHULUAN	1
1.1 Latarbelakang Masalah.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Batasan Masalah.....	3
1.5 Metodologi Penelitian.....	3
1.6 Sistematika Penulisan.....	3
LANDASAN TEORI	5
2.1 Enzim Sukrosafosforilase.....	5
2.2 DNA Rekombinan.....	8
2.3 Kloning DNA.....	9
2.4 Pemurnian Protein Rekombinan	11
2.4.1 Filtrasi	13
2.4.2 Sentrifugasi.....	14
2.4.3 Presipitasi	14
2.4.4 Kromatografi	14
2.4.4.1 Kromatografi fase tetap.....	15
2.4.4.2 Kromatografi Adsorpsi	16
2.4.4.3 Kromatografi Pertukaran Ion	16
2.4.4.4 Kromatografi Affinitas	16
2.5 Elektroforesis Gel Poliakrilamid.....	19

2.6 Penetapan Kadar Protein dengan Metode Lowry	21
2.7 Pengujian Aktivitas Sukrosafosforilase dengan Metode Silverstein, Voet et al. 1967	21
3.METODOLOGI PENELITIAN	24
3.1 Diagram Alir Penelitian.....	24
3.2 Lokasi Penelitian	25
3.3 Bahan	25
3.3.1 Sampel.....	26
3.4 Alat	26
3.5 Pembuatan Medium.....	27
3.5.1 Medium Agar.....	27
3.5.2 Medium Cair.....	27
3.6 Pembuatan Larutan, Dapar, dan Pereaksi.....	28
3.6.1 Larutan Stok IPTG 1 M.....	28
3.6.2 Dapar fosfat pH 6,8 (S.P.L. Sorensen).....	28
3.6.3 Tris-HCl 1,5 M; pH 8,8 (Bio-Rad,1998).....	28
3.6.4 Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8 (Bio-Rad, 1998).....	28
3.6.5 SDS 10 % (Bio-Rad, 1998).....	28
3.6.6 Amonium persulfat (APS) 10% sebanyak 5 ml.....	28
3.6.7 Buffer pemisah pH 8,3 (Bio-Rad, 1998).....	28
3.6.8 Larutan Fiksasi.....	29
3.6.9 Larutan pencuci (<i>destaining solution</i>) (Bio-Rad, 1998)	29
3.6.10 Larutan 2 M Imidazole (<i>His Spin Trap® Kit Manual,2007</i>).....	29
3.6.11 Dapar pencuci kolom affinitas (<i>His Spin Trap® Kit Manual,2007</i>)	29
3.6.12 Dapar pengelusi kolom affinitas (<i>His Spin Trap® Kit Manual,2007</i>).....	29
3.6.13 Larutan Stok Sukrosa $3,09867 \times 10^{-1}$ M	30
3.6.14 Larutan Stok EDTA $9,96 \times 10^{-3}$ M	30
3.6.15 Larutan Stok $MgCl_2$ $9,96 \times 10^{-1}$ M	30
3.6.16 Larutan Stok $NADP^+$ $1,1952 \times 10^{-2}$ M.....	30
3.6.17 Larutan Stok Glukosa-1,6-Bifosfat $4,98 \times 10^{-5}$ M.....	30
3.6.18 Larutan Dapar Fosfat $1,23 \times 10^{-1}$ M pH 6,8	30
3.6.19 Larutan Dapar Fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8.....	31

3.6.20 Larutan Fosfoglukomutase (EC 5.4.2.2) 0,2 unit/ μ l	31
3.6.21 Larutan Glukosa-6-fosfat Dehidrogenase (EC 1.1.1.49) 0,2 unit/ μ l.....	31
3.6.22 Larutan Sukrosafosforilase (EC 2.4.1.7) 0,05 unit/ μ l	31
3.6.23 Reagen Lowry (Boyer, 1993).....	31
3.6.23.1 Larutan A	31
3.6.23.2 Larutan B	32
3.6.23.3 Larutan C	32
3.6.23.4 Larutan D	32
3.6.23.5 Reagen Fenol Folin Ciocalteu.....	32
3.6.23.6 Protein Standar BSA 200 μ g/ml.....	32
3.7 Cara Kerja.....	32
3.7.1 Pembiakan dan Peremajaan Kultur.....	32
3.7.2 Pembuatan Kultur Cair dan Pemanenan Sel.....	33
3.7.3 Isolasi Protein dari Bakteri.....	33
3.7.4 Purifikasi Kolom Afinitas	34
3.7.5 Pemekatan dan <i>Desalting</i> Protein.....	34
3.7.6 Elektroforesis Gel Poliakrilamid	34
3.7.7 Uji Konsentrasi Protein dengan Metode Lowry	36
3.7.8 Analisis Aktivitas Enzim (<i>Silverstein, Voet et al. 1967</i>).....	37
4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Pembiakan dan Peremajaan Kultur	39
4.2 Preparasi Bakteri Starter.....	40
4.3 Isolasi Protein dari Bakteri	42
4.4 Kromatografi Afinitas dengan Kolom Nikel	43
4.5 Elektroforesis Gel Poliakrilamid.....	45
4.6 Pemekatan dan <i>Desalting</i> Protein	47
4.7 Uji Konsentrasi Protein dengan Metode Lowry	47
4.8 Analisa Aktivitas Enzim.....	50
5.KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1 Kesimpulan	53

5.2 Saran	53
LAMPIRAN	56



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mekanisme Reaksi Sukrosafosforilase (Mirza, Skov et al. 2006).....	6
Gambar 2.2 Struktur Sukrosafosforilase (Mirza, Skov et al. 2006).....	7
Gambar 2.3 Rangkaian Proses Pembuatan DNA Rekombinan dan Penggandaan Jumlahnya melalui Kloning DNA	11
Gambar 2.4 Diagram pemurnian enzim dengan kromatografi afinitas Sumber : BIOKIMIA-Teknik Penelitian	17
Gambar 2.5 Pembentukan gel poliakrilamida melalui inisiasi TEMED dan amonium persulfat (Sumber: Wilson, dkk, 2004)	20
Gambar 4.1 Hasil pembiakan dan peremajaan kultur menumbuhkan <i>E.coli</i> BL21 Star™ (pAM_SPaseWRS3)	40
Gambar 4.2 Hasil Elektroforesis SDS Page	44
Gambar 4.3 Hasil Elektroforesis SDS Page	44

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Komposisi Gel Bawah	35
Tabel 3.2 Komposisi Gel Atas.....	35
Tabel 3.3 Komposisi larutan uji lowry.....	37
Tabel 4.2 Nilai OD ₆₀₀ Kultur cair selama proses penumbuhan dan induksi	42
Tabel 4.1 Serapan Larutan Standar BSA	49
Tabel 4.3 Absorbansi SPase Rekombinan Suhu 25°C.....	50
Tabel 4.4 Absorbansi SPase Rekombinan Suhu 30°C.....	51
Tabel 4.5 Absorbansi SPase Rekombinan Suhu 37°C.....	51
Tabel 4.6 Absorbansi Spase standar	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Analisis sekuens asam amino dan sekuens nukleotida.....	57
Lampiran 2 <i>Screening</i> , Identifikasi dan Kloning Gen SPase	59
Lampiran 3 Sertifikat Analisis Sukrosafosforilase standar	60
Lampiran 4 Sertifikat Analisis Fosfoglukomutase	61
Lampiran 5 Sertifikat Analisis Glukosa-6-Fosfat Dehidrogenase.....	62
Lampiran 6 Sertifikat Analisis Glukosa-1,6-bifosfat.....	63
Lampiran 7 Sertifikat Analisis NADP ⁺	64
Lampiran 8 Penanda Molekular Protein.....	65
Lampiran 9 Panduan Pembuatan Dapar Elusi dan Dapar Pencuci (<i>GE Healthcare His SpinTrap</i> (Code: 28-4013-53)).....	66

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latarbelakang Masalah

Enzim sukrosafosforilase termasuk dalam kelompok enzim glukosiltransferase. Sukrosafosforilase (EC 2.4.1.7) merupakan enzim yang dapat mengkatalisis reaksi fosforilasi yaitu sukrosa dan fosfat menjadi D-fructose dan α -D-glucose 1-phosphate. Selain reaksi fosforilasi, SPase juga mengkatalisis reaksi transglukosilasi (Aerts, Verhaeghe et al. 2011). Sukrosafosforilase pertamakali ditemukan pada *Leuconostoc mesenteroides* (Kagan et al) yang merupakan bakteri asam laktat. *Leuconostoc mesenteroides* mempunyai keunggulan dalam hal konsentrasi *crude extract* yang dihasilkan daripada *Pseudomonas saccharophila* atau *Pseudomonas putrefaciens* (Mieyal dan Abeles, 1972). Beberapa bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai sumber gen penyandi SPase yang telah diklon dan diekspresikan, yaitu *Bifidiobacterium longum* (Sprogoe, van den Broek et al. 2004), *B. Adolescentis* DSM20083(van den Broek, van Boxtel et al. 2004) , *Agrobacterium vitis* (Fournier, de Ruffray et al. 1994), dan *Streptococcus mutans* (Russell, Mukasa et al. 1988).

Reaksi transglukosilasi adalah reaksi pemindahan unit gula ke akseptor yang memiliki gugus -OH (Kometami et al,1996), menggunakan enzim glukosiltransferase pada senyawa polifenol sebagai akseptor (Sulistyo et al, 1998), mengingat bahwa beberapa senyawa polifenol memiliki peranan sebagai antioksidan (Funayama et al,1995). Namun, penggunaan senyawa polifenol masih terbatas, sehingga belum dapat dimanfaatkan secara optimal, mengingat senyawa polifenol tidak stabil terhadap pengaruh cahaya, oksidasi, dan perubahan kimia, sehingga apabila teroksidasi strukturnya akan berubah dan fungsinya sebagai bahan aktif akan menurun bahkan hilang dengan sifat kelarutannya yang rendah (Kitao et al, 1993). Untuk meningkatkan kestabilan dan kelarutan dapat dilakukan dengan cara modifikasi bahan aktif biologik yaitu mengubah senyawa polifenol

menjadi bentuk glikosida melalui reaksi transglikosilasi dengan bantuan sukrosafosforilase (SPase). SPase 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. SPase dapat diaplikasikan untuk menentukan kadar fosfat inorganik dalam klinik serta memperbaiki karakteristik beberapa senyawa seperti mengurangi rasa pahit (neohesperidin), dan mengurangi rasa pedas (capsaicin).

Gen penyandi SPase rekombinan dari *Leuconostoc mesentroides* MBFWRS-3(1) diekspresikan pada *Escherichia coli* BL21 Star™. Kemampuan untuk mengeskpresikan protein rekombinan sukrosafosforilase dalam jumlah besar adalah salah satu keuntungan yang dapat diperoleh dari kloning cDNA. Tujuan dari pembuatan protein rekombinan adalah membuat obat aktif secara biologi dalam jumlah tanpa batas, mendapatkan sumber enzim yang melimpah, mengetahui struktur protein dan skrining obat. Ekspresi SPase rekombinan dari *Leuconostoc mesenteroides* diekspresikan pada *Escherichia coli*. *E. coli* merupakan sumber yang penting untuk mengekspresikan protein rekombinan. *E. coli* paling baik digunakan untuk ekspresi protein intraseluler yang reaktif kecil dan tidak memerlukan modifikasi pascatranslasi yang terlalu banyak untuk dapat berfungsi. Protein diekspresikan dengan bantuan vektor plasmid untuk ekspresi, yang diantaranya dapat diinduksi dengan pemberian reagen IPTG untuk menghasilkan ekspresi dalam jumlah tinggi sebelum kemudian dipurifikasi. Salah satu keuntungan sistem ekspresi pada *E. coli* adalah mudah untuk memanipulasi DNA rekombinan (mirip seperti kloning plasmid) dan proses seleksi dan ekspresi yang cepat. Kerugiannya adalah ketidakmampuan untuk melakukan proses kompleks seperti glikosilasi dan beberapa protein bersifat toksik pada *E. coli*. Selain itu, protein yang besar biasanya tidak diproduksi atau tidak terlipat dengan efisien.

1.2 Perumusan Masalah

Bagaimana cara memurnikan Gen penyandi SPase rekombinan dari *Leuconostoc mesentroides* MBFWRS-3(1) direkayasa dengan menambahkan label

(His-tag) pada ujung-C dari peptida SPase rekombinan sehingga dapat dibuktikan aktivitas enzimatis SPase dengan metode *Silverstein et al*?

1.3 Tujuan Penelitian

Melakukan pemurnian SPase rekombinan dengan kromatografi affinitas pada kondisi optimum dan menguji aktivitas SPase rekombinan dengan metode *Silverstein et al 1967*.

1.4 Batasan Masalah

Gen penyandi SPase rekombinan dari *Leuconostoc mesentroides* MBFWRS-3(1) direkayasa dengan menambahkan label (His-tag) yang telah dipurifikasi kepada protein yang diekspresikan untuk memudahkan mengisolasi protein setelah diekspresikan. His-tag ditambahkan pada ujung-C dari peptida SPase rekombinan. SPase rekombinan selanjutnya akan dikarakterisasi dengan metode elektroforesis SDS Page dan dimurnikan dengan kromatografi affinitas, serta dianalisis aktivitas enzimatisnya dengan metode *Silverstein et al* berdasarkan serapan yang dihasilkan oleh pembentukan NADPH (*Silverstein R. et al., 1966*).

1.5 Metodologi Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode penelitian eksperimen. Hasil pemurnian protein rekombinan SPase dapat dilihat dengan adanya pita protein pada SDS PAGE sebagai data kualitatif. Untuk mengetahui konsentrasi SPase rekombinan menggunakan metode Lowry sebagai data kuantitatif. Aktivitas enzim SPase dapat diketahui dengan hasil serapan pada spektrofotometer.

1.6 Sistematika Penulisan

Secara garis besar sistem penelitian ini disusun sebagai berikut :

Bab 1 Pendahuluan, bab ini berisi tentang uraian latar belakang permasalahan, tujuan penelitian, ruang lingkup penelitian, serta sistematika penulisan laporan penelitian (skripsi).

Bab 2 Landasan Teoritis, bab ini berisi tentang konsep dan teori-teori yang berhubungan dengan judul dan masalah yang sedang diteliti. Juga berisi tentang kerangka pemikiran penelitian.

Bab 3 Metode Penelitian, bab ini berisi tentang objek dan desain penelitian yang akan digunakan dalam penulisan penelitian, meliputi objek penelitian, metode penelitian, teknik pengumpulan data, sumber data dan teknik- teknik analisis.

Bab 4 Analisa dan Pembahasan, bab ini berisi tentang gambaran umum objek penelitian, pelaksanaan penelitian, pengolahan data, analisa data, serta pembahasan hasil penelitian berdasarkan data-data yang sudah diperoleh.

Bab 5 Penutup, bab ini berisi kesimpulan dari semua hasil penelitian, serta saran-saran yang sifatnya memberi masukan dan perbaikan selanjutnya yang didasarkan pada kesimpulan yang telah dikemukakan.

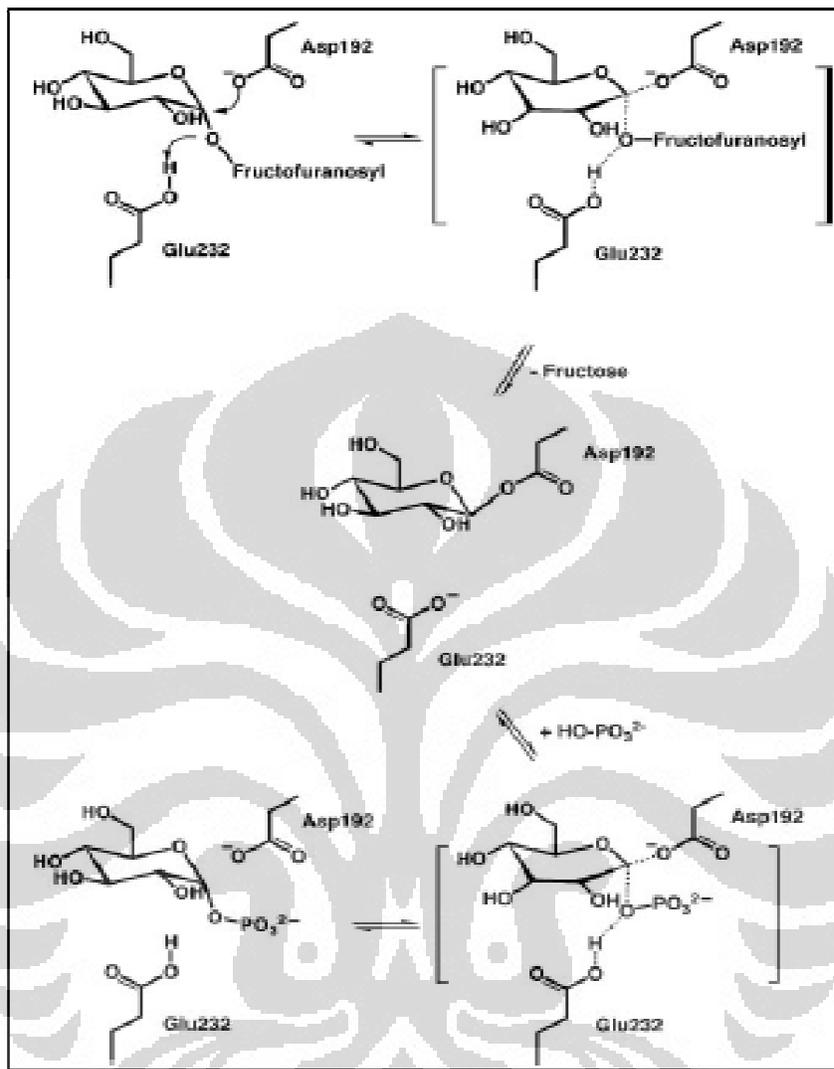
BAB 2

LANDASAN TEORI

2.1 Enzim Sukrosafosforilase

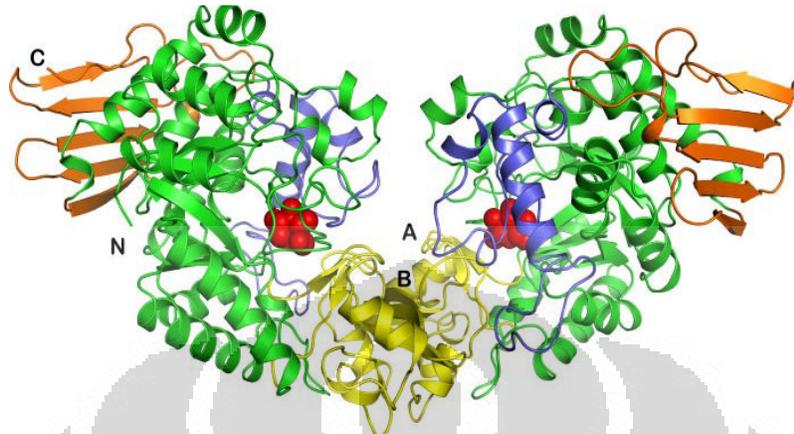
Sukrosafosforilase adalah (EC 2.4.1.7) adalah enzim yang mengkatalisis sukrosa (α -D-glucopyranosyl-1,2- β -D-fructofuronoside) dan fosfat menjadi D-fructose dan α -D-glucose 1-phosphate. (Goedl, Schwarz et al. 2007). Sukrosafosforilase termasuk dalam anggota glycoside hydrolases yang berperan dalam reaksi transglukosilasi daripada katalisis hidrolisis. (Henrissat 1991).

Sukrosafosforilase merupakan enzim yang penting untuk metabolisme. Dalam reaksi katalisisnya, sukrosafosforilase menghasilkan α -D-glucose-1-phosphate and fruktosa. α -D-glucose-1-phosphate secara reversibel menjadi glukosa-6-fosfat oleh fosfoglukomutase (Tedokon et al. 1992). Gambar 2.1 menunjukkan tahapan-tahapan reaksi katalisis sukrosafosforilase. Pertama-tama, Glu²³² memberikan donor proton dan serangan nukleofil oleh Asp¹⁹² pada karbon anomeric (C-1) gugus glukosa. Reaksi tersebut menghasilkan lepasnya fruktosa dan gugus glukosa masih terikat dengan enzim membentuk kompleks glukosa-enzim (*glucose-enzyme complex*) dengan ikatan beta antara atom oksigen dari gugus karboksil residu aspartat. Kemudian, kompleks glukosa enzim ini akan bereaksi dengan fosfat (HPO_4^{2-} dan H_2PO_4^-) dan α -D-glucose-1-phosphate dihasilkan.



Gambar 2.1 Mekanisme Reaksi Sukrosafosforilase (Mirza, Skov et al. 2006)

Sukrosafosforilase mempunyai empat domain, yaitu A,B,B', dan C. Domain A terdiri dari (β/α)-barrel, domain B terdiri dari dua anti-paralel β -sheet pendek dan dua α -helix pendek, domain B' terdiri dari satu α -helix panjang dan satu α -helix pendek, sedangkan domain C terdiri dari tunggal lima untaian anti-paralel β -sheet. Sukrosafosforilase merupakan dimer dengan berat molekul 55 kDa dan terdiri dari 504 asam amino Gambar 2.2



Keterangan: Domain A warna hijau. Domain B warna kuning. Domain B' warna biru. Domain C warna merah-jingga

Gambar 2.2 Struktur Sukrosafosforilase (Mirza, Skov et al. 2006)

Glukosa-6-fosfat merupakan senyawa penting yang digunakan untuk glikolisis. Fruktosa secara reversibel menjadi fruktosa-6-fosfat yang digunakan juga untuk glikolisis. Glikolisis yaitu reaksi pelepasan energi yang memecah satu molekul glukosa (terdiri dari 6 atom karbon) atau monosakarida yang lain menjadi 2 molekul asam piruvat (terdiri dari 3 atom karbon), 2 NADH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide H*), dan 2 ATP. Pada saat kondisi aerob, piruvat dapat dikonversi menjadi Acetyl-Coa untuk katabolisme pada siklus asam sitrat untuk menghasilkan energi. Pada anabolisme, asam piruvat digunakan untuk membentuk asam lemak sebagai penyimpanan energi (Reid and Abratt 2005). Glukosa-6-fosfat yang berasal dari α -D-glucose-1-fosfat juga terlibat dalam reaksi pentosa fosfat. Glukosa-6-fosfat dikonversi menjadi ribosa-5-fosfat yang digunakan untuk nukleotida, koenzim, DNA dan RNA. Hubungan ini membuktikan bahwa sukrosafosforilase penting untuk regulasi molekul sel (Nelson and Cox 2005).

2.2 DNA Rekombinan

Terjadinya proses rekombinasi secara alami dapat terjadi sehingga gen dapat berpindah dari satu organisme ke organisme lain. Biasanya, proses itu terjadi pada organisme yang berkerabat dekat. Dengan kemajuan teknologi molekuler, perpindahan gen dapat terjadi antarorganisme yang sama sekali berkerabat tidak dekat, misalnya gen manusia dipindahkan ke bakteri atau gen manusia dipindahkan ke ternak sapi. Perpindahan tersebut mengakibatkan terbentuknya molekul DNA yang berasal dari sumber yang berbeda dapat digabungkan menjadi apa yang disebut DNA rekombinan.

Biasanya, DNA rekombinan merupakan gabungan antara DNA vektor yang merupakan molekul DNA yang dapat mereplikasi diri dan DNA asing yang biasanya berupa gen dari suatu makhluk hidup. Vektor tersebut berfungsi sebagai pembawa DNA asing yang berasal dari satu organisme untuk dipindahkan ke dalam organisme lain. Di dalam organisme yang membawa DNA rekombinan tersebut (organisme resipen), gen diharapkan dapat untuk menghasilkan protein. Sebagai contoh klasik adalah gen penyandi insulin (hormon yang digunakan bagi penderita penyakit diabetes) yang disisipkan ke vektor dan kemudian vektor rekombinan tersebut dimasukan ke dalam sel *Escherichia coli*. Sel ini kemudian dapat menghasilkan hormon insulin, yang secara alami sel tersebut tidak mampu menghasilkannya.

Untuk membuat DNA rekombinan, setidaknya digunakan dua macam enzim yaitu enzim *endonuclease* yang berfungsi sebagai pemotong molekul DNA. Berdasarkan fungsinya, enzim ini sering disebut sebagai enzim pemotong (*restriction enzyme*). Enzim lainnya adalah enzim *ligase* yang berfungsi menggabungkan molekul DNA yang sudah dipotong tadi ke molekul DNA lain. DNA vektor dipotong pada bagian yang dikehendaki untuk disisipi DNA asing. Adapun DNA asing yang akan disisipkan juga dipotong sesuai yang dikehendaki. Pemotongan dan penggabungan molekul DNA dilakukan secara *in vitro* melalui suatu reaksi yang sederhana.

Molekul DNA plasmid yang berbentuk bulat dan berukuran sekitar 3 kb dipotong dengan enzim *endonuklease* yang sama dengan enzim endonuklease yang digunakan untuk memotong gen X tersebut di atas. Yang terpenting

diperhatikan di sini adalah tempat pemotongan pada molekul DNA plasmid yaitu pada lokasi gen *Lac-Z*. Kedua jenis pemotongan molekul DNA tersebut kemudian digabungkan oleh enzim ligase. Penggabungan kedua macam molekul dapat terjadi secara acak, sehingga sedikitnya ada dua kemungkinan, yaitu:

1. Molekul DNA plasmid menggabung kembali seperti bentuk semula (bulat) dan tidak membawa gen X. Pada kasus ini, ukuran molekul DNA tetap 5 kb.
2. Molekul DNA plasmid bergabung dengan gen X. Ini merupakan DNA rekombinan yang dikehendaki, dengan ukuran $5 \text{ kb} + 3 \text{ kb} = 8 \text{ kb}$.

Untuk mengetahui berhasil tidaknya pembentukan DNA rekombinan sebagaimana yang diharapkan, kita melanjutkan dengan proses kloning DNA. Ini dimaksudkan untuk melipatgandakan jumlah molekul DNA agar mudah dianalisis.

2.3 Kloning DNA

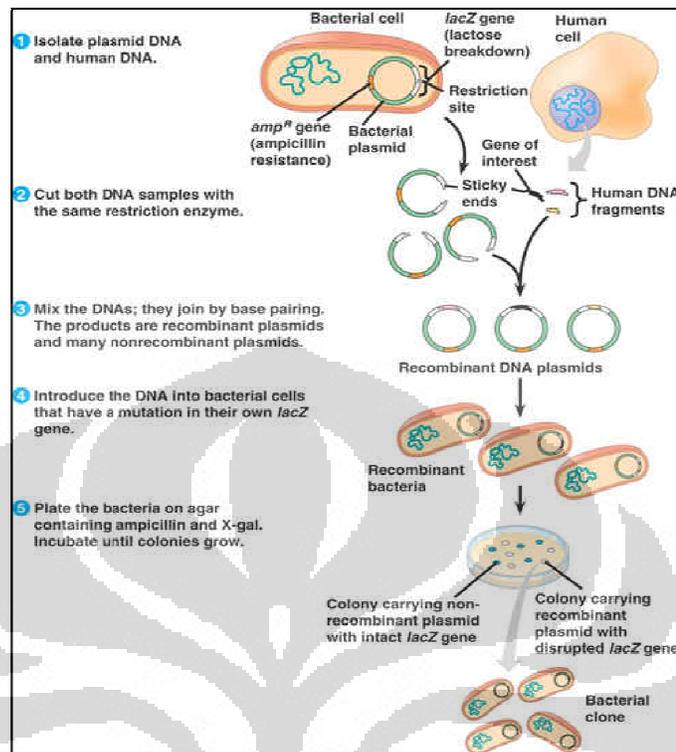
Kloning DNA adalah proses penggandaan jumlah DNA rekombinan melalui proses perkembangbiakan sel bakteri (biasanya *E.coli*). Ini dilakukan dengan memasukan DNA rekombinan yang dihasilkan dari penggabungan ke dalam sel *E. coli*. Selanjutnya sel ini diinkubasi pada suhu optimal sehingga sel dapat berkembang biak secara eksponensial. Karena masuknya molekul DNA ke dalam sel akan mengubah fenotip sel tersebut, proses pemasukan molekul DNA ke dalam sel juga termasuk transformasi. Sel yang digunakan dalam proses transformasi ini biasanya disebut dengan sel kompeten.

Dalam proses transformasi, sel kompeten yang dicampur dengan molekul DNA hasil penggabungan di atas akan mengalami tiga kemungkinan, yaitu:

1. Sel kompeten tidak kemasukan molekul DNA apapun,
2. Sel kompeten kemasukan DNA vektor yang tidak membawa gen X,
3. Sel kompeten kemasukan DNA vektor yang membawa gen X (yaitu DNA rekombinan)

Untuk mengetahui ketiga kemungkinan yang terjadi pada sel kompeten, tiga cawan yang berisi media padat disiapkan, yang masing-masing diberi label A, B,

dan C. Cawan A hanya berisi media padat, cawan B berisi media padat yang mengandung antibiotik, *X-gal* dan IPTG. Masing-masing cawan digunakan untuk menumbuhkan sel kompeten hasil transformasi. Ketika sel ditumbuhkan pada ketiga cawan tersebut, jumlah koloni terbanyak pada cawan A, karena semua sel kompeten hidup semua. Pada cawan B, jumlah koloni jauh lebih sedikit daripada cawan A karena semua sel kompeten dapat hidup semua. Hanya koloni sel pembawa DNA plasmid yang dapat hidup karena pada plasmid mengandung gen “tahan terhadap antibiotik”. Pada cawan C, jumlah koloni relatif sama dengan jumlah koloni pada cawan B tetapi ada dua macam warna koloni, yaitu putih dan biru. Adanya perbedaan warna koloni ini terjadi akibat adanya zat kimia *X-gal* dan IPTG yang bereaksi dengan produk gen *Lac-Z* pada plasmid. Warna putih pada koloni diakibatkan adanya kerusakan pada gen *Lac-Z* pada plasmid. Warna putih pada koloni diakibatkan adanya kerusakan pada gen *Lac-Z* yang disisipi oleh gen X. Dengan kata lain, koloni berwarna putih berarti sel kompeten membawa DNA rekombinan (DNA plasmid + gen X). Adapun koloni berwarna biru berarti sel kompeten yang tumbuh di cawan ini membawa DNA plasmid saja (tidak disisipi gen X). Gambar 2.3 dibawah ini memberi ilustrasi proses penyisipan gen asing ke dalam plasmid, dan diikuti proses perbanyakan gen melalui kloning DNA.



Keterangan:

- 1) DNA plasmid dan DNA asing masing-masing dipotong dengan enzim. Enzim yang memotong plasmid akan merusak gen *Lac-Z*.
- 2) DNA asing disisipkan ke dalam plasmid sehingga merusak gen *Lac-Z*.
- 3) Plasmid rekombinan dimasukkan ke dalam sel bakteri dengan media yang mengandung antibiotik ampicilin, IPTG dan *X-gal*. Hanya bakteri dari koloni bewarna putih yang digandakan.
- 4) Sel bakteri dikembangkan untuk digandakan jumlahnya.

Gambar 2.3 Rangkaian Proses Pembuatan DNA Rekombinan dan Penggandaan Jumlahnya melalui Kloning DNA

2.4 Pemurnian Protein Rekombinan

Proses pemurnian protein dari kultur sel merupakan tahapan yang sangat penting dalam produksi protein rekombinan. Umumnya produk hasil rekayasa genetika terdapat dalam larutan yang sangat encer. Kadar senyawa terendah berkisar antara 10-200 mg/l, sedangkan kadar tertinggi antara 500-800 mg/l. Tahapan yang harus dilakukan pada proses purifikasi produk hasil rekayasa genetika adalah:

1. Memekatkan larutan kultur sel agar lebih pekat, sehingga dengan volume yang lebih kecil proses purifikasi dapat dilakukan dengan baik.
2. Menghilangkan sebagian besar kontaminan utama termasuk DNA yang berasal dari kultur sel.
3. Setelah proses purifikasi, senyawa yang diperoleh harus dikarakterisasi sesuai dengan sifat-sifat fisikokimia senyawa, uji bioaktivitas dan kemudian dilanjutkan dengan proses formulasi dan sterilisasi untuk menghasilkan produk yang stabil untuk digunakan sebagai obat.

Pengembangan proses hilir suatu produk hasil rekayasa genetika, yaitu proses isolasi dan purifikasi produk yang diinginkan skala besar atau skala industri, pada dasarnya tergantung pada dua aspek penting yaitu, aspek perencanaan dan purifikasi, kedua adalah aspek peningkatan skala produksi (*scale up*).

Proses pemisahan senyawa protein rekombinan dari kontaminan memerlukan proses perencanaan yang baik. Umumnya kultur sel mengandung sel hospes, pecahan sel, dan komponen medium yang harus dihilangkan. Dengan memahami komponen utama kontaminan produk hasil rekayasa genetika yang dihasilkan, dapat dijadikan dasar utama dalam proses pemecahan dan purifikasi. Informasi harus jelas tentang sumber bahan yang digunakan apakah bakteri atau sel mamalia, dan kontaminan utama, misalnya albumin atau senyawa sejenis, sifat-sifat fisikokimia dari produk protein antara lain stabilitas produk terhadap pemanasan, titik isoelektrik, berat molekul, hidrofobisitas, densitas dan sifat ikatan protein spesifik, merupakan faktor yang sangat menentukan dalam proses perencanaan dan purifikasi senyawa protein.

Scale up adalah suatu proses untuk meningkatkan prosedur produksi skala laboratorium ke skala industri yang lebih ekonomis. Selama fasa peningkatan skala laboratorium menjadi skala industri, biasanya dilakukan terlebih dahulu suatu fasa pilot projek. Tujuan dari *scale up* adalah untuk memproduksi produk hasil rekayasa genetika yang berkualitas dan lebih ekonomis yang mampu bersaing secara komersial. Karena proses pemurnian yang merupakan komponen

utama produksi, mencapai 50-80% dari biaya proses produksi, harus dipilih metode purifikasi yang ekonomis, agar produk hasil rekayasa genetika yang dihasilkan dapat bersaing di pasaran.

Metode yang digunakan untuk mengisolasi dan memurnikan molekul protein, sedapat mungkin dihindari menggunakan metode yang dapat mempengaruhi stabilitas protein, misalnya pemanasan atau suasana pH yang ekstrem.

Produk protein yang digunakan sebagai preparat injeksi harus bebas dari pirogen dan harus steril. Proses pemurnian protein harus mampu mengeleminasi dan menghilangkan virus kontaminan. Demikian pula berbagai kontaminan minor termasuk DNA asing harus dapat dihilangkan dari produk hasil rekayasa genetika.

Dewasa ini berbagai metode purifikasi protein rekombinan telah dikembangkan dan divalidasi. Beberapa metode pemurnian antara lain adalah filtrasi, sentrifugasi, presipitasi, dan berbagai cara kromatografi, yaitu kromatografi adsorpsi, kromatografi pertukaran ion, kromatografi afinitas, kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi permiasi gel. Metode purifikasi yang digunakan untuk memurnikan produk hasil rekayasa genetika tergantung pada jenis dan sifat fisikokimia senyawa yang diproduksi.

2.4.1 Filtrasi

Produk-produk hasil rekayasa genetika harus dimurnikan dengan cara memisahkan produk tersebut dengan kultur sel yang mengandung senyawa lain, meliputi zat yang tersuspensi dalam media, sel yang digunakan sebagai sistem ekspresi, materi yang berasal dari pecahan sel, dan fragmen sel ketika dilisiskan. Salah satu cara yang efektif untuk memisahkan produk hasil rekayasa genetika dengan senyawa kontaminan tersebut adalah dengan cara filtrasi.

Filtrasi dapat juga digunakan untuk memekatkan biomassa sebelum dilakukan purifikasi selanjutnya. Berbagai teknik filtrasi telah dikembangkan untuk memisahkan sel dari medium perbenihan. Sistem ultrafiltrasi dikembangkan untuk memisahkan kontaminan bakteri dan virus yang terdapat di dalam larutan.

2.4.2 Sentrifugasi

Partikel subseluler dan organel sel umumnya tersuspensi dalam larutan yang kental, sehingga seringkali sulit dipisahkan melalui penyaringan. Namun, dapat dipisahkan secara efisien dengan cara sentrifugasi pada kecepatan yang berbeda-beda. Sebagai contoh, misalnya inti sel dapat dipisahkan pada kecepatan sentrifugasi 400 rpm selama 20 menit, sedangkan untuk membran plasma memerlukan kecepatan sentrifugasi yang lebih tinggi dan waktu yang lebih lama. Teknik sentrifugasi gradien, sering digunakan untuk memisahkan DNA plasmid dan DNA kromosomal.

2.4.3 Presipitasi

Kelarutan protein tergantung pada suasana larutan antara lain, pH, dan kekuatan ionik. Dengan cara menaikkan kekuatan ionik perlahan-lahan pada larutan, secara selektif dapat mengendapkan protein. Fenomena ini disebut dengan *salting out*. Amonium sulfat sering digunakan pada purifikasi sistem *salting out* tersebut.

Presipitasi merupakan cara yang ekonomis dan banyak digunakan untuk mengisolasi protein dari dalam larutan supernatan kultur sel. Namun, metode presipitasi biasanya dilakukan pada produksi skala kecil, dan kurang digunakan untuk purifikasi protein rekombinan skala industri.

2.4.4 Kromatografi

Pemisahan molekul dari materi biologis seringkali melibatkan isolasi jenis molekul tertentu dari campuran molekul lain yang memiliki sifat yang hampir sama. Metode kromatografi merupakan metode purifikasi yang efektif untuk memisahkan molekul-molekul tersebut. Dalam sistem kromatografi, komponen sampel dipisahkan berdasarkan perbedaan distribusi molekul diantara dua fase yaitu fase diam dan fase bergerak. Fase diam biasanya terdiri dari zat padat, sedangkan fase gerak terdiri dari cairan atau gas. Pada prakteknya fase diam merupakan partikel padat yang dimasukkan ke dalam suatu kolom dimana fase bergerak mengalir diantara partikel yang terdapat dalam kolom tersebut.

Beberapa jenis kromatografi yang sering digunakan pada proses purifikasi produk hasil rekayasa genetika antara lain adalah:

2.4.4.1 Kromatografi fase tetap

Kromatografi fase tetap menggunakan material konvensional atau adsorben yang memiliki pori-pori yang dapat dilewati oleh senyawa yang akan dipisahkan. Material adsorben yang digunakan umumnya merupakan senyawa anorganik antara lain, silika gel, hidroksiapatit, beberapa jenis oksida logam (alumina, butiran kaca= *glass bead*) dan polimer dekstran, cellulosa, dan agarosa. Pemisahan senyawa terjadi karena perbedaan interaksi antara komponen sampel dengan media kromatografi.

Gugus ion seperti senyawa amina dan asam karboksilat, senyawa bipolar seperti gugus karbonil dan ikatan hidrogen berperan penting dalam mengontrol interaksi antara komponen sampel dengan fase diam dan fase gerak dari sistem kromatografi, sehingga mempengaruhi kecepatan elusi dan migrasi masing-masing komponen senyawa yang terdapat dalam sampel.

Fase diam yang ideal untuk digunakan pada proses pemisahan protein harus memiliki beberapa persyaratan, diantaranya adalah berkapasitas besar, memiliki matriks yang stabil untuk berbagai jenis eluen, dan tidak ada reaksi nonspesifik antara protein dengan matriks kolom. Selain itu, kolom yang digunakan tahan terhadap proses sterilisasi secara berkala.

Sistem kromatografi cair kinerja tinggi (*high performance liquid chromatography*, HPLC), merupakan sistem yang sesuai dengan kriteria yang diperlukan untuk purifikasi produk hasil rekayasa genetika. Walaupun demikian, fase cair yang digunakan harus dipilih dengan tepat agar tidak mempengaruhi bioaktivitas hasil rekayasa genetika.

Sistem *reverse phase* HPLC yang menggunakan fase diam kurang polar daripada fase gerak merupakan sistem kromatografi yang efektif untuk purifikasi produk dalam skala besar. Namun sayangnya, perangkat HPLC sangat mahal sehingga HPLC jarang digunakan dalam purifikasi produk hasil rekayasa genetika skala industri.

2.4.4.2 Kromatografi Adsorpsi

Dalam sistem kromatografi adsorpsi atau disebut juga kromatografi fase normal, digunakan fase diam yang lebih polar dibandingkan dengan fase gerak. Protein yang akan dipisahkan secara selektif terikat pada kondisi berbeda.

2.4.4.3 Kromatografi Pertukaran Ion

Kromatografi pertukaran ion (*ion exchange chromatography*) merupakan kromatografi yang sangat potensial untuk digunakan dalam proses purifikasi dan mudah dipakai dalam peningkatan skala produksi (*scale up*).

Kromatografi pertukaran ion, dapat digunakan dalam suatu kondisi tertentu, dimana kontaminan produk yang dialirkan melalui kolom, dapat terikat dan diadsorpsi oleh matriks, sedangkan protein yang dikehendaki dapat terikat. Jenis kolom yang digunakan tergantung pada sifat protein yang akan dipurifikasi, antara lain titik isoelektrik protein. Penukar anion mengikat molekul yang bermuatan negatif sedangkan penukar kation mengikat molekul yang bermuatan positif. Dengan cara menaikkan konsentrasi garam secara bertahap atau secara kontinyu dalam larutan elusi, maka protein yang lebih kuat terikat pada penukar ion yang terelusi paling akhir dalam larutan buffer elusi. Sedangkan individu protein yang terikat paling lemah akan terelusi paling awal. Proses penambahan kadar garam secara bertahap dikenal dengan *salt-gradient ion-exchange chromatography*.

Selain itu, pH larutan buffer dapat diubah secara bertahap atau secara kontinyu, sehingga protein yang terikat pada penukar ion pada pH tertentu akan terlepas jika terjadi perubahan pH larutan buffer. Proses tersebut dikenal dengan *pH-gradient ion-exchange chromatography*.

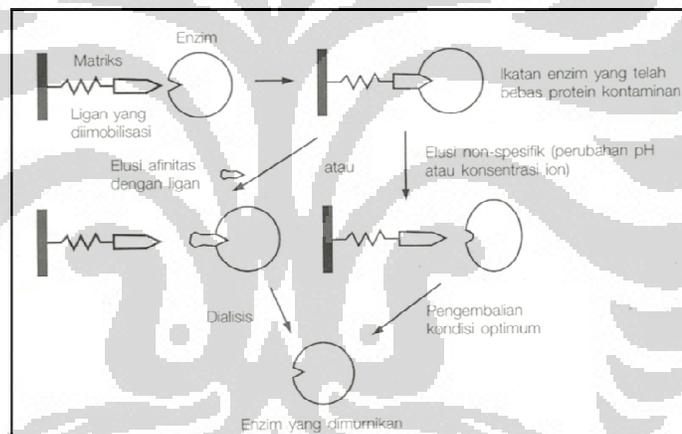
2.4.4.4 Kromatografi Afinitas

Prinsip kromatografi afinitas adalah pengikatan molekul yang diteliti secara kovalen pada matriks *immobile* seperti kolom agarosa. Suatu campuran yang mengandung makromolekul yang diteliti dibiarkan untuk meresap ke dalam matriks. Sebagian besar molekul di dalam campuran tidak memiliki afinitas terhadap molekul pengikat atau ligand (komponen yang bersifat selektif dan

reversibel) sehingga molekul mengalir melalui matriks tanpa hambatan. Akan tetapi, makromolekul yang dikehendaki dapat mengenal molekul pengikat dan terikat padanya, dan dengan demikian diikat. Setelah semua komponen yang dikehendaki terelusi dari kolom, kondisi larutan pencuci atau pengelusi diubah untuk memungkinkan berlangsungnya disosiasi antara makromolekul dengan ligand, sehingga makromolekul yang dikehendaki dapat diperoleh dalam bentuk murni dan efluen.

Prosedur yang dilakukan untuk mengikat ligand pada matriks penyangga adalah sebagai berikut:

1. Aktivasi gugus-gugus fungsional matriks.
2. Pengikatan ligand pada gugus-gugus fungsional yang telah aktif



Gambar 2.4 Diagram pemurnian enzim dengan kromatografi afinitas

Sumber : BOKIMIA-Teknik Penelitian

Reaksi kimia yang digunakan untuk melakukan pengikatan ligand pada matriks harus cukup lunak, sehingga tidak merusak keduanya. Selanjutnya, matriks penyangga harus dicuci agar terbebas dari ligand yang tidak terikat, dan jumlah ligand yang terikat harus ditetapkan terlebih dahulu.

Pada prinsipnya, metode kromatografi afinitas dapat digunakan untuk memurnikan hampir semua makromolekul termasuk enzim, antibodi, asam-asam nukleat, protein-protein pegikat vitamin, imunoglobulin, reseptor-reseptor membran, sel utuh, dan fragmen sel.

Tujuan penggunaan kromatografi afinitas adalah untuk memisahkan komponen dari suatu campuran komponen kompleks, “*impurity*”. Keuntungan memakai kromatografi afinitas adalah pemisahan makromolekul, misalnya protease atau nukleas dari kontaminan yang destruktif dapat berlangsung secara tepat. Selain itu, dapat digunakan untuk menghilangkan produk-produk denaturasi yang diakibatkan oleh perbedaan asosiasinya dengan lokasi aktif ligand, serta memiliki kemurnian, hasil, dan selektivitas yang tinggi.

Kromatografi Afinitas Logam Immobilisasi merupakan salah satu cara yang cukup baik untuk memisahkan protein. Teknik ini didasarkan pada sifat beberapa asam amino misalnya histidin, triptofan, tirosin, dan fenilalanin, yang dapat berikatan secara spesifik dan reversibel dengan suatu ion logam yang biasa disebut dengan ligan. Ligan-ligan tersebut dapat berikatan secara kovalen pada suatu matriks yang disusun dalam suatu kolom kromatografi (Winkler, Pickett et al. 1996).

Hanya protein-protein tertentu saja yang dapat berikatan dengan ligan-ligan tertentu, misalnya protein yang di-*tag* dengan asam amino histidin dapat berikatan cukup kuat dengan ion logam Ni^{2+} yang terikat pada matriks *nitriloacetic acid* (NTA). Faktor penting pada saat pengikatan protein adalah derajat keasaman (pH). Pengikatan protein mempunyai pH 6-8. Pemilihan dapar untuk pengikatan protein sangat penting. Penggunaan dapar EDTA dan sitrat dihindarkan. Biasanya dapar pengikat protein yang digunakan adalah tris, fosfat, dan asetat. Reagen urea, garam, atau detergen juga bisa ditambahkan ke dapar pengikatan protein. Konsentrasi tinggi garam mempunyai efek pertukaran ion. Oleh karena itu, konsentrasi NaCl 0.5 sampai 1 M sudah sangat efisien untuk digunakan.

Molekul-molekul protein yang tidak terikat pada ligan dapat dihilangkan dengan mencuci kolom menggunakan dapar yang sesuai, sedangkan protein yang terikat pada ligan dapat dilepaskan ikatannya dengan mengubah komposisi dapar yang mengandung senyawa lain yang dapat berkompetisi dengan protein dalam hal mengikat ligan misalnya imidazol sehingga ikatan antara protein dengan ligan dapat dilepaskan.

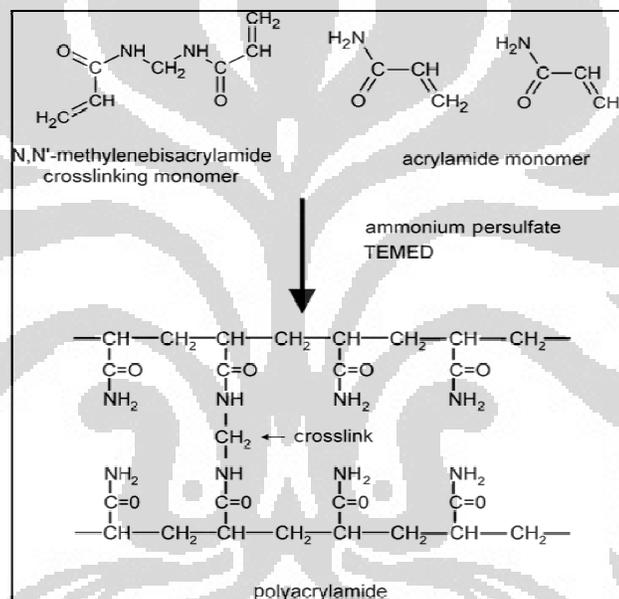
2.5 Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Elektroforesis merupakan proses bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk, dan ukuran. Dengan demikian, elektroforesis dapat digunakan untuk pemisahan makromolekul (seperti protein dan asam nukleat). Posisi molekul yang memisah pada gel dapat dideteksi dengan pewarnaan atau autoradiografi, ataupun dilakukan kuantifikasi dengan densitometer. Elektroforesis untuk makromolekul memerlukan matriks penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dan arus listrik yang digunakan.

Dalam perangkat elektroforesis, gel diletakan diantara dua buffer chamber sebagai sarana untuk menghubungkan kutub negatif dan kutub positif. Banyak molekul biologi bermuatan listrik yang besarnya tergantung pada pH dan komposisi medium dimana molekul biologi tersebut terlarut. Bila berada dalam suatu medan listrik, molekul biologi yang bermuatan positif akan bermigrasi ke elektroda negatif, dan demikian pula sebaliknya. Protein merupakan molekul amfoter karena mempunyai gugus amino positif dan gugus karboksil negatif. Dengan demikian, protein dapat mengion, baik pada pH basa maupun pH asam. Pada pH rendah, protein bersifat kation (bermuatan positif) yang cenderung bergerak ke arah katoda (bermuatan negatif). Pada pH tinggi, protein bersifat anion (bermuatan negatif) yang cenderung bergerak ke arah anoda (bermuatan positif). Nilai di antara kedua pH tersebut dinamakan titik isoelektrik yaitu nilai pH di mana protein menjadi tidak bermuatan. Pada pH tersebut, jumlah muatan negatif yang dihasilkan dari proteolisis sebanding dengan jumlah muatan positif yang diperoleh dari penangkapan proton. Protein yang tidak bermuatan tidak dapat bergerak pada medan listrik. Hampir semua protein mempunyai pH kurang dari 8,0. Oleh karena itu, pH bufer elektroforesis yang berkisar 8-9 akan menyebabkan sebagian besar protein bermuatan negatif yang akan bergerak ke anoda.

Matriks poliakrilamida berfungsi untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran dan menstabilkan pH bufer agar muatan protein tidak berubah.

Poliakrilamida dapat memisahkan protein dengan kisaran berat molekul 500-250.000 atau polinukleotida dengan kisaran 5-2000 bp. Pori matriks ini terbentuk dari ikatan silang antara akrilamida dan bis-akrilamida. Gel poliakrilamida dibentuk dari polimer akrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ dengan suatu *cross-linking agent* yaitu N,N'-metilen bis akrilamida atau $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$. Polimerisasi ini dikatalisis oleh amonium persulfat atau riboflavin yang dapat menghasilkan radikal bebas. Pembentukan radikal bebas dari amonium persulfat dikatalisis oleh N,N,N',N'-tetrametil-etilenediamin (TEMED), sedangkan radikal bebas dari riboflavin terbentuk dengan bantuan cahaya Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Pembentukan gel poliakrilamida melalui inisiasi TEMED dan amonium persulfat (Sumber: Wilson, dkk, 2004)

Pada sistem denaturing, protein dielektroforesis pada bufer yang juga mengandung detergen ionik SDS. SDS akan mengikat pada bagian hidrofobik dan residu asam amino, sehingga menyebabkan perubahan struktur tiga dimensi protein (menjadi *unfolding*). Selain itu, SDS juga menyebabkan seluruh rantai peptida bermuatan negatif. Protein SDS bergerak dalam gel poliakrilamida dengan

kecepatan yang tergantung pada berat molekulnya. Dengan demikian, SDS-PAGE digunakan untuk menentukan berat molekul suatu *crude protein*.

2.6 Penetapan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Metode ini merupakan salah satu pilihan untuk menentukan kadar protein dalam suatu bahan. Dalam keadaan basa, ion tembaga divalen (Cu^{2+}) membentuk suatu ikatan peptida yang mereduksi Cu^{2+} menjadi tembaga monovalen (Cu^+). Ion Cu^+ dan gugus radikal dari tirosin, triptofan, dan sistein bereaksi dengan pereaksi folin untuk menghasilkan suatu produk yang tidak stabil yang mereduksi molibdenum atau tungsten blue. Protein akan bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu membentuk senyawa kompleks yang berwarna. Pembentukan warna tersebut disebabkan adanya reaksi antara tembaga dengan sampel yang diuji. Intesitas warna yang terbentuk tergantung pada jumlah asam aromatik yang berbeda untuk setiap jenis protein (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

2.7 Pengujian Aktivitas Sukrosafosforilase dengan Metode Silverstein, Voet et al. 1967

Pengukuran aktifitas enzim dapat pula dilakukan menggunakan alat spektrofotometer. Sebagai contoh misalnya aktifitas enzim dehidrogenase yang bergantung NAD(P)^+ diperiksa secara spektrofotometris dengan mengukur perubahan absorpsi nya pada 340 nm yang menyertai oksidasi atau reduksi $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$. Oksidasi NADH menjadi NAD^+ terjadi disertai dengan penurunan densitas optik (OD, optical density) pada 340 nm, yang proporsional dengan jumlah NADH yang dioksidasi. Demikian pula, kalau NAD^+ direduksi, OD pada 340 nm akan meningkat sebanding dengan jumlah NADH yang terbentuk. Perubahan OD pada 340 nm ini dapat dimanfaatkan bagi pemeriksaan analisis kuantitatif setiap enzim dehidrogenase yang bergantung NAD^+ atau NADP^+ . Bagi enzim dehidrogenase yang mengatalisis oksidasi NADH oleh substratnya yang teroksidasi, kecepatan penurunan OD pada 340 nm akan berbanding lurus dengan konsentrasi enzim. Oleh karena itu, hasil pengukuran kecepatan penurunan OD pada 340 nm memungkinkan kita menyimpulkan kuantitas enzim.

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).

Dalam penelitian ini digunakan metode yang didiskripsikan oleh *Silverstein et al*, yaitu dengan reduksi NADP^+ menjadi NADPH dengan adanya enzim fosfoglukomutase dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase. NADPH yang terbentuk selanjutnya akan diukur serapannya pada panjang gelombang 340 nm pada temperatur 25°C. Peningkatan jumlah NADPH berbanding lurus dengan peningkatan aktivitas sukrosafosforilase. Satu unit aktivitas sukrosafosforilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan tereduksinya 1 μmol NADP^+ menjadi NADPH per menit pada kondisi analisis. Koefisien daya serap molar untuk NADPH adalah $6,22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Aktivitas SPase diukur dengan menggunakan persamaan 2.1 sebagai berikut (Silverstein, R. et al., 1966; Jin Ha L. et al., 2006)

Volume aktivitas dihitung dengan persamaan 2.1

$$\text{Volume aktivitas} \left(\frac{U}{\text{ml}} \right) = \left(\frac{\Delta A_s - \Delta A_0 \times 1,66 \text{ ml}}{6,22 \times 0,01 \text{ (ml)}} \right) \quad 2.1$$

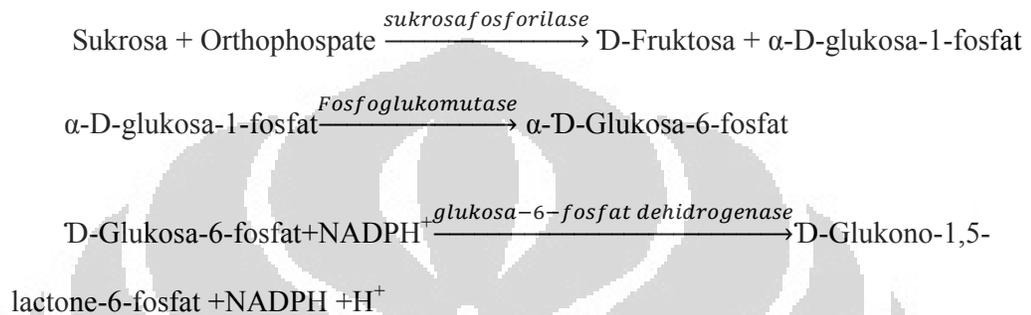
Dimana ΔA_s adalah serapan yang dihasilkan sampel; ΔA_0 adalah serapan yang dihasilkan kontrol negatif; 3,32 ml adalah volume akhir larutan uji; 6,22 adalah koefisien daya serap molar dari NADPH pada 340 nm ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$); 0,02 ml adalah volume sampel.

Aktivitas spesifik dihitung dengan persamaan 2.2

$$\text{Aktivitas spesifik } \left(\frac{U}{\mu g} \right) = \text{Volume aktivitas } \left(\frac{U}{ml} \right) \times \frac{1}{c \left(\frac{\mu g}{ml} \right)} \quad 2.2$$

dimana C adalah konsentrasi enzim ($\mu\text{g/ml}$)

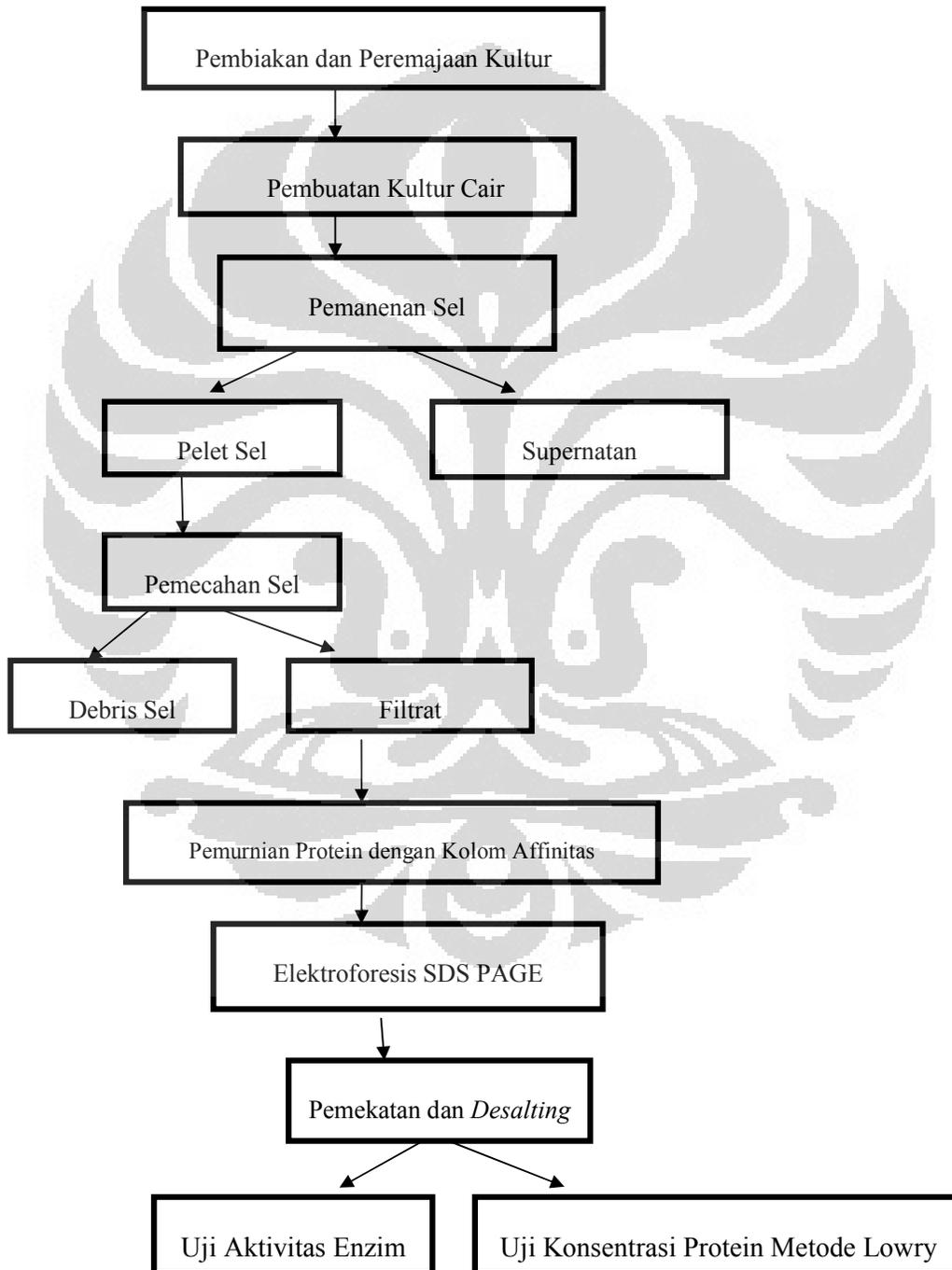
Prinsip reaksi dalam pengukuran aktivitas SPase adalah sebagai berikut (Silverstein, R. et al., 1966):



BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Diagram Alir Penelitian



3.2 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penelitian dilakukan dari Agustus 2011 sampai April 2012.

3.3 Bahan

1. Medium agar dan cair Luria Bertani [Ultapure; USB Cooperation, USA]
2. Natrium hidroksida [Merck, Jerman]
3. Asam klorida [Merck, Jerman]
4. Kalium fosfat monobasa [Merck, Jerman]
5. K_2HPO_4 [Merck, Jerman]
6. Buffer Fosfat His Buffer ® Kit [GE Healthcare, Swedia],
7. Imidazol (MERCK, Jerman]
8. (Bovine Serum Albumin [Aldrich, Jerman],
9. Aquabidest steril [PT Ikapharmindo Putra Mas, Indonesia]
10. Protein Staining Solution [Fermentas, USA]
11. Protein Destaining Solution [Fermentas, USA]
12. Tris base [Amersham Bioscience, Swedia]
13. Sodium Dodesil Sulfat [Aldrich, Jerman]
14. Trisin [Aldrich, Jerman]
15. Loading Buffer [Fermentas, USA]
16. Reducing Agent (2-merkaptotanol) [Fermentas, USA]
17. Premixed preweighed akrilamid/bisakrilamid [BioRad, Inggris]
18. Amonium persulfat [GE Healthcare, Swedia],
19. TEMED (N,N,N',N'- tetrametilendiamin) [Merck, Jerman]
20. Protein Mixture [GE Healthcare, Swedia]
21. Isopropanol [Aldrich, Jerman]
22. Asam asetat [Aldrich, Jerman]
23. IPTG (Isopropil β -D-thiogalaktosida) [Wako, Jepang]
24. Tetrasiklin [Aldrich, Jerman]
25. Sukrosa [Wako, Jepang]
26. Na_2EDTA [Merck, Jerman]

27. MgCl₂
28. NADP⁺ [Oriental Yeast, Jepang]
29. fosfoglukomutase [Sigma, USA]
30. glukosa-1,6-difosfat [Sigma, USA]
31. glukosa-6-fosfat dehidrogenase [Wako, Jepang]
32. Sukrosafosforilase [Oriental Yeast, Jepang].

3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah bakteri *Escherichia coli* BL21 StarTM (pAM_SPaseWRS3) rekombinan galur 2.2.1 koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI. Galur tersebut dikonstruksi agar membawa gen penyandi sukrosafosforilase heterologus (Malik et al 2011) yang dideskripsikan pada Lampiran 1.

3.4 Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah:

1. mikrosentrifuse [Sorvall Fresco, Jerman]
2. sentrifuse dengan pendingin [Tomy, Jepang]
3. mikropipet [Gilson, Perancis]
4. inkubator [Orbital Shaker Incubator]
5. pemanas dengan *magnetic stirrer* [Torrey Pins Scientific, USA]
6. autoklaf [Hirayama, Jepang]
7. pH meter [Eutech Instruments pH510 CyberScan, Singapura]
8. timbangan analitik [Acculab dan Scout, USA]
9. *Ultra Low Temperature Freezer*-80°C [New Brunswick Scientific U101 Innova, Inggris]
10. *Freezer* -20°C [GEA, Korea]
11. oven pengering [LAB-Line, USA]
12. oven penyimpan [WTB Binder, Jerman]
13. alat SDS-PAGE [Biometra, Jepang]
14. spektrofotometer GeneQuantTM 100 [GE Healthcare, Swedia]
15. *electrophoresis power supply* EPS301 [GE Healthcare, Swedia]

16. digital scanner [HPDeskjet 2476, USA]
17. Konsentrator 14ml [Amicon, USA]
18. Konsentrator 50ml [Amicon, USA], ultrasonikator [Branson Sonifier, England]
19. HiTrap® FF Crude 1 ml [GE Healthcare, Swedia]
20. HiTrap® FF Crude 5 ml [GE Healthcare, Swedia]
21. Vortex [Barnstead Thermolyne]
22. Incubator [Memert], Dry Bath [Barnstead Thermolyne]
23. Elektroforesis Power Supply [GE Healthcare, Swedia].

3.5 Pembuatan Medium

Medium yang digunakan adalah medium agar dan medium cair Luria Bertani (LB). Kandungan yang terdapat pada medium adalah *casein peptone* 10mg/L, *yeast extract* 5 mg/L, dan *sodium chloride* 5 mg/L. Dalam penelitian ini, digunakan medium LB yang sudah jadi, sehingga tidak perlu diracik lagi.

3.5.1 Medium Agar

Pembuatan medium agar LB 250 ml dengan menimbang 8,75 gram serbuk medium dan dilarutkan dalam aquadest dalam labu bulat. Kemudian, medium tersebut disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan dengan 250 µL tetrasiklin dengan konsentrasi 5 mg/ml. Medium selanjutnya dituang ke cawan petri yang sudah disterilkan dan dibiarkan dingin, sehingga medium mengeras. Selanjutnya, medium yang telah mengeras disimpan ke lemari pendingin 4°C. Medium agar digunakan untuk meremajakan kultur bakteri.

3.5.2 Medium Cair

Untuk membuat 500 ml medium cair LB, timbang 10 gram serbuk LB dan dilarutkan dengan 500 ml aquades dalam labu erlemeyer. Selanjutnya, medium tersebut disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit.

3.6 Pembuatan Larutan, Dapar, dan Preaksi

3.6.1 Larutan Stok IPTG 1 M

Sebanyak 1 gram IPTG dilarutkan dengan 4,2 ml aquabidest steril secara aseptis untuk menghasilkan larutan stok IPTG dengan konsentrasi 1 M.

3.6.2 Dapar fosfat pH 6,8 (S.P.L. Sorensen)

A:Larutan 1 M Na_2HPO_4 (17,79 gram dalam 100 ml); B:Larutan 1 M NaH_2PO_4 (13,79 gram dalam 100 ml). Larutan A sebanyak 51 ml ditambahkan dengan larutan B sebanyak 49 ml untuk mencapai pH 6,8. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter.

3.6.3 Tris-HCl 1,5 M; pH 8,8 (Bio-Rad,1998)

Tris sebanyak 27,23 gram dilarutkan dengan ± 80 ml aquades, kemudian pH-nya diatur sehingga tepat 8,8 dengan HCl 1 N, lalu tambahkan aquadest sampai volume 100 ml

3.6.4 Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8 (Bio-Rad, 1998)

Tris sebanyak 6 gram dilarutkan dengan aquades ± 60 ml, kemudian pH-nya diatur sehingga tepat 6,8 dengan HCl 1 N, lalu tambahkan aquades sampai volume larutan 100 ml.

3.6.5 SDS 10 % (Bio-Rad, 1998)

Dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 10 gram SDS dalam 100 ml aquades.

3.6.6 Amonium persulfat (APS) 10% sebanyak 5 ml

Larutkan 0,5 gram amonium persulfat dalam 5 ml aquades. Masukkan larutan ini ke dalam botol berwarna gelap dan simpan dalam lemari pendingin.

3.6.7 Buffer pemisah pH 8,3 (Bio-Rad, 1998)

Dibuat dengan cara mencampurkan zat-zat berikut:

Basa Tris 3 gram

Glisin	14,4 gram
SDS	1 gram
Aquades	1 liter

3.6.8 Larutan Fiksasi

Larutan fiksasi dibuat dengan cara mencampurkan zat-zat berikut:

Etanol	100 ml
Asam asetat glasial	25 ml
Aquades s/d	250 ml

3.6.9 Larutan pencuci (*destaining solution*) (Bio-Rad, 1998)

Dibuat dengan cara mencampurkan 70 ml asam asetat pekat, 250 ml metanol 95%, dan aquades sehingga volume larutan 1 L.

3.6.10 Larutan 2 M Imidazole (*His Spin Trap® Kit Manual, 2007*)

Imidazol sebanyak 34,05 gram ditambahkan dengan aquadest 200 ml, kemudian pH-nya diatur dengan HCl 1 N sehingga tepat 7,4, lalu tambahkan aquades sehingga didapatkan larutan stok imidazol 2 M mencapai 250 ml.

3.6.11 Dapar pencuci kolom afinitas (*His Spin Trap® Kit Manual, 2007*)

Untuk menyiapkan 250 ml larutan pencuci kolom afinitas dengan konsentrasi akhir sodium fosfat 20 mM, 500 mM NaCl, dan 60 mM Imidazol, zat-zat yang dicampurkan adalah sebagai berikut: 0,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (177,99 g/mol); 0,35 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (137,99 g/mol); 7,3 g NaCl (58,44 g/mol); 7,5 ml larutan Imidazol 2 M.

Setelah zat-zat yang disebutkan diatas telah dicampur, tambahkan aquadest 200 ml dan larutkan. Selanjutnya, pH diatur dengan HCl 1 N sehingga tepat 7,4. Aquadest ditambahkan sehingga volume akhir yang didapatkan 250 ml

3.6.12 Dapar pengelusi kolom afinitas (*His Spin Trap® Kit Manual, 2007*)

Untuk menyiapkan 250 ml larutan pencuci kolom afinitas dengan konsentrasi akhir sodium fosfat 20 mM, 500 mM NaCl, dan 500 mM Imidazol,

zat-zat yang dicampurkan adalah sebagai berikut: 0,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (177,99 g/mol); 0,35 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (137,99 g/mol); 7,3 g NaCl (58,44 g/mol); 62,5 ml larutan Imidazol 2 M.

Setelah zat-zat yang disebutkan diatas telah dicampur, tambahkan aquadest 200 ml dan larutkan. Selanjutnya, pH diatur dengan HCl 1 N sehingga tepat 7,4. Aquadest ditambahkan sehingga volume akhir yang didapatkan 250 ml

3.6.13 Larutan Stok Sukrosa $3,09867 \times 10^{-1} \text{ M}$

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

3.6.14 Larutan Stok EDTA $9,96 \times 10^{-3} \text{ M}$

Sebanyak 37,1 mg Na_2EDTA ditimbang dan dilarutkan dalam 10 ml dapar fosfat $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ pH 6,8.

3.6.15 Larutan Stok MgCl_2 $9,96 \times 10^{-1} \text{ M}$

Sebanyak 0,95 g MgCl_2 anhidrat ditimbang dan dilarutkan dalam 10 ml aquabidest steril.

3.6.16 Larutan Stok NADP^+ $1,1952 \times 10^{-2} \text{ M}$

Sebanyak 9,411 mg NADP-Na ditimbang dan dilarutkan dalam 1 ml larutan dapar fosfat $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ pH 6,8.

3.6.17 Larutan Stok Glukosa-1,6-Bifosfat $4,98 \times 10^{-5} \text{ M}$

Sebanyak 1 mg $\alpha\text{-D-glucose 1,6-bisphosphate tetra(cyclohexylammonium) salt hydrate}$ ditimbang dan dilarutkan dalam 27,26 ml aquabidest steril.

3.6.18 Larutan Dapar Fosfat $1,23 \times 10^{-1} \text{ M}$ pH 6,8

Sebanyak 1,67 g KH_2PO_4 ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml aquabidest steril lalu pH diatur dengan menambahkan larutan NaOH 1 N hingga mencapai pH 6,8.

3.6.19 Larutan Dapar Fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8

Sebanyak 25 ml larutan dapar fosfat 1 M pH 6,8 diencerkan dengan aquabidest steril hingga volume 500 ml.

3.6.20 Larutan Fosfoglukomutase (EC 5.4.2.2) 0,2 unit/ μ l

Sebanyak 60 μ l suspensi stok enzim yang setara dengan 50 unit aktivitas dipipet dan disentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm. Supernatan dibuang dan endapan yang terbentuk dilarutkan dengan 250 μ l larutan dapar fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8. Selanjutnya, larutan disimpan dalam lemari pendingin suhu 4°C.

3.6.21 Larutan Glukosa-6-fosfat Dehidrogenase (EC 1.1.1.49) 0,2 unit/ μ l

Sebanyak 1,12 mg serbuk enzim yang setara dengan 1000 unit aktivitas dilarutkan dengan 1000 μ l larutan dapar fosfat 0,05 M pH 6,8 untuk menghasilkan larutan stok enzim dengan konsentrasi 1 unit/ μ l. Sebanyak 100 μ l larutan stok enzim dengan konsentrasi 1 unit/ μ l dipipet dan ditambahkan 400 μ l larutan dapar fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8 untuk menghasilkan 500 μ l larutan glukosa-6-fosfat dehidrogenase 0,2 unit/ μ l. Larutan selanjutnya disimpan dalam *freezer* -20° C.

3.6.22 Larutan Sukrosafosforilase (EC 2.4.1.7) 0,05 unit/ μ l

Sebanyak 1,3 mg serbuk enzim yang setara dengan 100 unit aktivitas dilarutkan dengan 500 μ l larutan dapar fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8 untuk menghasilkan larutan stok enzim dengan konsentrasi 0,2 unit/ μ l. Sebanyak 50 μ l larutan stok dengan konsentrasi 0,2 unit/ μ l dipipet dan diencerkan dengan larutan dapar fosfat 5×10^{-2} M pH 6,8 menghasilkan 200 μ l larutan enzim dengan konsentrasi 0,05 unit/ μ l. Larutan selanjutnya disimpan dalam *freezer* -20° C.

3.6.23 Reagen Lowry (Boyer, 1993)

3.6.23.1 Larutan A

Larutan CuSO₄ 1% (b/v) disiapkan dengan melarutkan CuSO₄.5H₂O 1,56 gram kedalam aquabidest sehingga volume total larutan 100 ml.

3.6.23.2 Larutan B

Larutan natrium kalium tartat 1% (b/v) disiapkan dengan melarutkannya NaK-tartat 2,37 gram ke dalam aquabidest sehingga volume total larutan 100 ml.

3.6.23.3 Larutan C

Larutan Na_2CO_3 2% (b/v) dalam NaOH 0,1 N dengan cara melarutkan NaOH 2 g dan Na_2CO_3 10 gram ke dalam aquabidest sehingga volume larutan 500 ml.

3.6.23.4 Larutan D

Larutan A 5 ml dan larutan B 5 ml dicampurkan ke dalam larutan C 500 mL sehingga diperoleh larutan D (larutan Biuret) yang siap digunakan.

3.6.23.5 Reagen Fenol Folin Ciocalteu

Reagen Fenol Folin Ciocalteu (2 N) diencerkan dua kali dengan aquabidest (1:1).

3.6.23.6 Protein Standar BSA 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Sejumlah 2 mg protein standar BSA (Bovine Serum Albumin) ditimbang dan dilarutkan ke dalam aquadest 10 ml.

3.7 Cara Kerja

Dalam penelitian ini, cara kerja yang dilakukan terdiri dari dua tahap yaitu tahap kultur bakteri dan pemurnian serta pengujian aktivitas untuk mengetahui stabilitas enzim. Tahap mikrobiologi meliputi pembiakan dan peremajaan bakteri, dan pembuatan inokulum cair. Tahap bioteknologi meliputi isolasi protein dari bakteri, purifikasi protein rekombinan, elektroforesis SDS gel poliakrilamid, uji konsentrasi protein dan analisis aktivitas enzimatis dengan metode Silverstein, Voet et al. 1967 .

3.7.1 Pembiakan dan Peremajaan Kultur

Kultur yang digunakan adalah *E. coli* BL21 Star™ (pAM_SPaseWRS3) rekombinan. Pembiakan kultur dilakukan dengan cara menggosokkan satu ose

bakteri ke medium agar LB yang mengandung tetrasiklin 5 µg/mL secara aseptis, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, kultur bakteri diremajakan setiap kali diambil dari stok beku dengan digores pada medium agar yang mengandung Luria Bertani dan tetrasiklin.

3.7.2 Pembuatan Kultur Cair dan Pemanenan Sel

Pembuatan kultur cair dan pemanenan sel mengikuti optimasi metode yang dideskripsikan (Eko, 2007). Bakteri *E. coli* BL21 Star™ (pAM_SPaseWRS3) dari medium agar diinokulasikan pada medium cair Luria Bertani (LB) 5 mL yang telah ditambahkan tetrasiklin (5 µg/mL), lalu diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C dengan di-*shake* pada 175 rpm. Hasil inokulasi tersebut disebut kultur inokulum. Kemudian kultur inokulum tersebut diukur OD-nya mencapai 0,2 pada OD₆₀₀. Setelah itu, sejumlah volume kultur inokulum dipipet dan diinokulasikan kembali ke dalam 500 ml medium cair LB yang mengandung tetrasiklin 5 µg/mL. Kemudian, kultur cair ini ditumbuhkan pada suhu 37°C di-*shake* pada kecepatan 175 rpm sehingga pengukuran OD₆₀₀ mencapai 0,8. Setelah itu, kultur cair diinduksi menggunakan IPTG dengan konsentrasi 1 mM. Proses induksi dengan IPTG dilakukan selama 2 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 175 rpm.

Setelah proses induksi dengan IPTG selesai, dilakukan pemanenan sel dengan cara sentrifugasi pada 6000 × g selama 15 menit pada suhu 4°C. Pada saat sentrifugasi akan terbentuk endapan dan supernatan. Endapan tersebut adalah pelet sel, sedangkan supernatan dibuang. Pelet sel disimpan dalam *freezer* -20°C.

3.7.3 Isolasi Protein dari Bakteri

Pelet sel yang telah diperoleh selanjutnya dipecah dengan alat sonikator..Sonikasi dilakukan dalam dapar fosfat pH 6,8 sampai cairan terlihat bening dengan kekuatan 20 kHz. Sonikasi dilakukan diatas penangas es dengan tujuan tidak terjadi kenaikan suhu selama sonikasi berlangsung yang dapat menyebabkan kerusakan protein rekombinan. Setelah sel dipecah, debris sel dipisahkan dari filtrat pelet sel dengan sentrifugasi pada kecepatan 6000 × g selama 10 menit pada suhu 4°C.

3.7.4 Purifikasi Kolom Afinitas

Sebelum kolom afinitas (*HisTrap FF Crude 1 mL*) digunakan, kolom dibersihkan dahulu dengan dapar pengelusi. Dapar pengelusi mempunyai kadar imidazol yang tinggi, yaitu 500 mM. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan protein yang tersisa dalam tabung. Kolom dicuci dengan dapar pengelusi sebanyak 10 mL. Setelah itu, kolom diisi dengan dapar pencuci yang mempunyai kadar imidazol rendah, yaitu 60 mM. Dapar pencuci berperan sebagai pengikat protein yang diinginkan pada kolom afinitas.

Filtrat pelet sel yang didapatkan dari hasil sonikasi, dimasukkan ke kolom afinitas melalui *syringe* 10 ml. Hasil keluaran dari kolom afinitas disimpan sebagai *loading sample*. Kemudian, kolom afinitas dicuci dengan buffer pencuci. Hasil keluaran dari dapar pencuci melalui kolom afinitas merupakan protein selain sukrosafosforilase (SPase). SPase masih tersimpan dalam kolom afinitas, karena ada ikatan ion nikel dengan SPase. Pencucian kolom afinitas dengan dapar pencuci dilakukan dua kali, sehingga dapar pencuci yang diperlukan adalah 20 mL. Selanjutnya, kolom afinitas dielusi dengan dapar elusi. Keluaran yang dihasilkan adalah SPase yang telah dimurnikan.

3.7.5 Pemekatan dan *Desalting* Protein

SPase yang telah dimurnikan melalui kolom afinitas masih terdapat fosfat, imidazol dan NaCl. Oleh karena itu, diperlukan penghilangan komponen garam (*desalting*) yaitu NaCl dari buffer agar diperoleh Spase murni dengan menggunakan Centricon konsentrator dengan *cut-off* 30 kDa. *Desalting* dilakukan dengan sentrifugasi pada $6000 \times g$ selama 10 menit pada suhu 4°C. Setelah itu, tambahkan HEPES (100 mM, pH 7,4) dan sentrifugasi kembali.

3.7.6 Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Gel terdiri dari gel bawah (*resolving gel*) dan gel atas (*stacking gel*) dibuat dengan komposisi seperti pada Tabel 2.1 berikut

Tabel 3.1 Komposisi Gel Bawah

% Gel	10 %
40% Akrilamid/Bis	3 ml
Tris-HCl 1 M pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	100 μ l
Aqubidest	4,35 ml
TEMED	10 μ l
APS 10%	50 μ l

Semua bahan dicampur, kecuali APS dan TEMED dicampur pada saat akan dimasukkan ke dalam cetakan gel.

Tabel 3.2 Komposisi Gel Atas

% Gel	4 %
40% Akrilamid/Bis	3 ml
Tris-HCl 1 M pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	100 μ L
Aqubidest	4,35 ml
TEMED	10 μ L
APS 10%	50 μ L

Semua bahan dicampur, kecuali APS dan TEMED dicampur pada saat akan dimasukkan ke dalam cetakan gel.

Gel bawah yang telah membeku pada cetakan gel, kemudian masukan aquades atau isopropanol 95% sebagai pelapis diatasnya agar permukaan rata dan mencegah hambatan polimerisasi oleh oksigen. Setelah itu, aquades pelapis diambil, kemudian masukan gel atas kira-kira 1 cm. Segera setelah gel atas dimasukkan ke dalam cetakan kotak, masukkan sisir khusus untuk membuat

sumur tempat sampel, lalu tunggu 30 menit. Setelah terbentuk gel atas, kemudian sisir dikeluarkan.

Sebelum sampel dimasukkan ke dalam gel, sampel dicampur dengan loading buffer dan merkaptoetanol, dididihkan selama 5 menit pada suhu 95 °C pada dry bath untuk mereduksi protein sampel sehingga bermuatan negatif, kemudian sampel didinginkan pada suhu ruang.

Cetakan gel ditempatkan ke dalam kotak gel, kemudian reservoir atas dan bawah diisi dengan buffer pemisah. Sebanyak 5 µL sampel dengan menggunakan pipet dimasukkan ke dalam masing-masing sumur (*well*) tempat sampel, dan pada sumur pertama dimasukkan marker atau protein standar. Setelah itu, elektroforesis dihubungkan dengan arus listrik bertegangan 120 V. Arus listrik yang digunakan adalah 20 mA. Arus listrik dihentikan setelah pewarna protein standar mencapai batas akhir kira-kira 1 cm dari ujung gel, dan gel dimasukkan ke dalam wadah pewarnaan.

Sebelum pewarnaan gel, gel direndam terlebih dahulu ke larutan fiksasi selama 15 menit. Setelah itu, gel dilakukan dengan pewarnaan dengan cara merendam gel dalam larutan pewarna selama 6 jam. Setelah proses pewarnaan, gel dicuci dengan larutan pencuci warna (*destaining*). Larutan pencuci dapat diganti-ganti sampai diperoleh gel yang jernih.

3.7.7 Uji Konsentrasi Protein dengan Metode Lowry

Protein diukur dengan metode Lowry. Terlebih dahulu dibuat kurva kalibrasi standar menggunakan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai standar protein. Pertama, larutan stok BSA dibuat dengan konsentrasi 200 µg/ml. Selanjutnya, dibuat seri pengenceran dari larutan stok dengan volume akhir 2 mL. Komposisi larutan-larutan standar dapat dilihat pada Tabel 3.3. Kemudian, tambahkan sebanyak 5 ml larutan biuret, vortex dan biarkan pada suhu ruang selama 10 menit, lalu tambahkan 0,5 ml reagen folin dan vortex dengan segera. Setelah 30 menit, absorban dibaca pada panjang gelombang 750 nm. Buat kurva standar antara absorban dan konsentrasi protein. Untuk blanko digunakan 1 ml aquabidest dengan perlakuan yang sama dengan proten standar (serum albumin sapi). Kadar protein dapat dihitung dengan kurva standar.

Untuk menentukan kadar protein sampel, masukan jumlah sampel yang diinginkan ke dalam tabung. Tambahkan larutan biuret 5 ml, vortex dan biarkan pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah itu, tambahkan reagen folin 0,5 ml, vortex dan biarkan pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian, ukur nilai absorban larutan pada setiap tabung pada panjang gelombang 750 nm.

Tabel 3.3 Komposisi larutan uji lowry

	Blanko	Larutan Standar						Sampel Enzim μ l		
No Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Standar BSA (ml)	-	0,8	1	1,2	1,5	1,8	2			
Sampel SPase	-	-	-	-	-	-	-	2	5	20
Aquabidest (ml)	1	1,2	1	0,8	0,5	0,2	-	1,998	1,995	1,98
Larutan Biuret (ml)	5									
Reagen Folin (ml)	0,5									

3.7.8 Analisis Aktivitas Enzim (*Silverstein, Voet et al. 1967*)

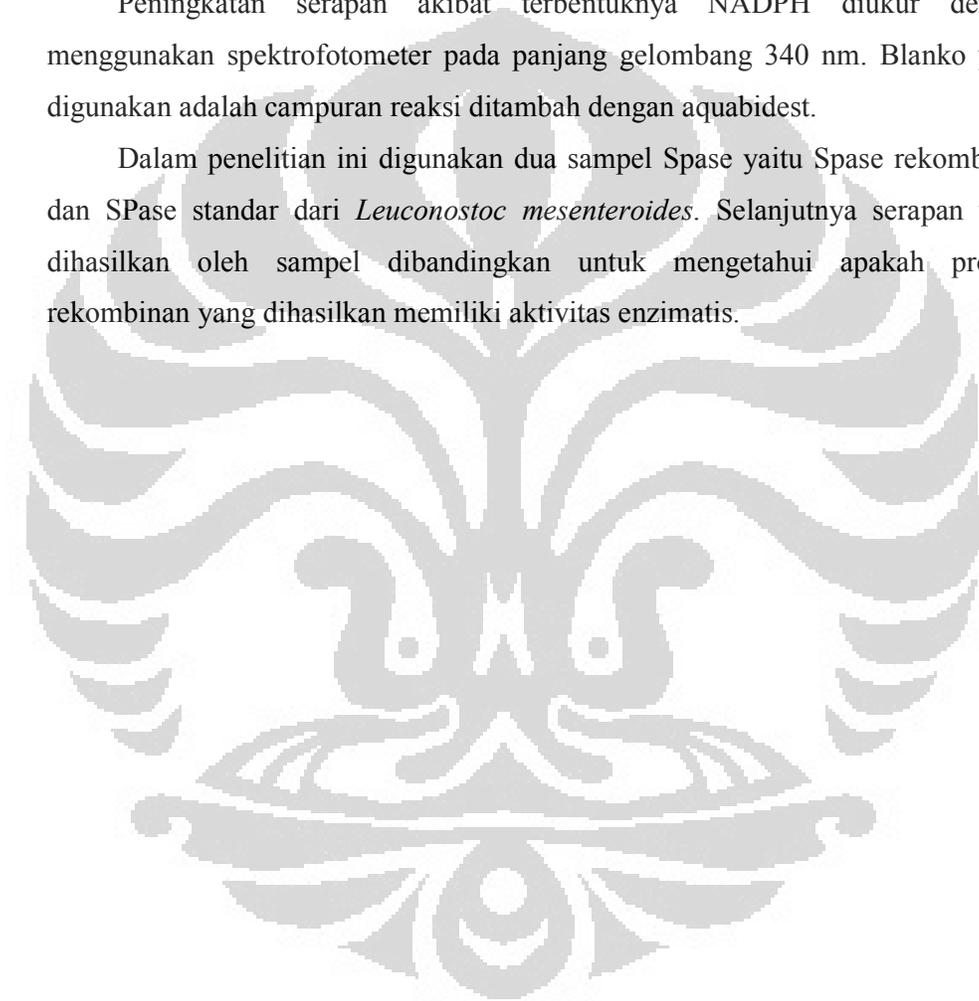
Esei aktivitas enzim protein rekombinan Spase dilakukan dengan metode yang dideskripsikan oleh Silverstein et al (*Silverstein, Voet et al. 1967*) untuk esei aktivitas berdasarkan reaksi reduksi NADP⁺ menjadi NADPH dengan adanya enzim fosfoglukomutase dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase. Jumlah glukosa-1,6-bifosfat (G-1-P) yang diproduksi digabungkan pada reaksi NAD dengan adanya fosfoglukomutase dan glukose-6-phosphate dehydrogenase. Satu unit Spase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan 1 μ mol reduksi NAD per menit dibawah kondisi tersebut (*Koga, Nakamura et al. 1991*).

Spase diuji dengan campuran reaksi yang mengandung 0,66 ml dapar fosfat $1,23 \times 10^{-1}$ M; 0,75 ml larutan $3,09867 \times 10^{-1}$ M sukrosa; 0,015 ml larutan $9,96 \times$

10^{-3} M EDTA; 0,025 ml larutan $9,96 \times 10^{-1}$ M $MgCl_2$; 0,05 ml larutan $1,1592 \times 10^{-2}$ M $NADP^+$; 0,05 ml larutan $4,98 \times 10^{-5}$ M glukosa-1,6-bifosfat; 0,05 ml fosfoglukomutase; 0,05 ml glukosa-6-fosfat dehidrogenase . Campuran larutan diinkubasi pada suhu $25^\circ C$, $30^\circ C$, dan $37^\circ C$ selama lima menit. Selanjutnya sebanyak 0,01 ml sampel SPase dimasukkan dalam campuran larutan. Larutan akhir yang diperoleh sebanyak 1,66 ml.

Peningkatan serapan akibat terbentuknya NADPH diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Blanko yang digunakan adalah campuran reaksi ditambah dengan aquabidest.

Dalam penelitian ini digunakan dua sampel Spase yaitu Spase rekombinan dan SPase standar dari *Leuconostoc mesenteroides*. Selanjutnya serapan yang dihasilkan oleh sampel dibandingkan untuk mengetahui apakah protein rekombinan yang dihasilkan memiliki aktivitas enzimatis.

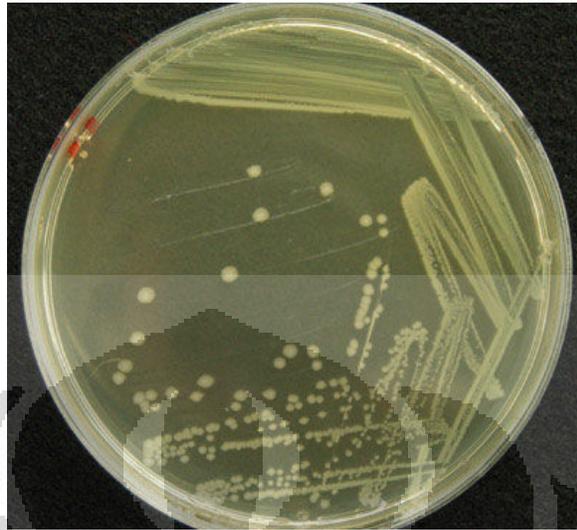


BAB 4

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembiakan dan Peremajaan Kultur

Tahapan awal penelitian ini adalah menumbuhkan *E.coli* BL21 Star™ (pAM_SPaseWRS3) hasil rekombinan yang membawa plasmid penyandi SPase rekombinan asal *Leuconostoc mesenteroides* dari stok beku ke media agar LB yang telah diberi tetrasiklin 5 µg/mL yang berfungsi sebagai antibiotik. Plasmid penyandi SPase rekombinan asal *Leuconostoc mesenteroides* membawa gen yang mempunyai sifat resisten terhadap tetrasiklin. Jika plasmid tersebut dimasukkan ke *E.coli* BL21 Star™ yang berperan sebagai sel inang, sel inang tersebut akan mengambil plasmid tersebut melalui proses transformasi, kemudian memperbanyak plasmid tersebut bersamaan dengan reproduksi genom sel inang itu sendiri. Untuk memastikan bahwa *E.coli* BL21 Star™ membawa plasmid penyandi SPase rekombinan yang melakukan replikasi, plasmid yang digunakan biasanya mengandung gen resistan antibiotik, yaitu tetrasiklin, sehingga pada saat *E.coli* BL21 Star™ diinkubasi dalam medium yang mengandung tetrasiklin, hanya sel dengan plasmid tersebut yang akan bereplikasi. Hal ini ditunjukkan adanya koloni-koloni yang berwarna putih dan berbentuk bulat. Hasil pembiakan dan peremajaan kultur dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil pembiakan dan peremajaan kultur menumbuhkan *E.coli* BL21 Star™ (pAM_SPaseWRS3)

4.2 Preparasi Bakteri Starter

Pada saat melakukan preparasi bakteri starter pada medium cair LB, semua peralatan yang akan digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu. Tujuan dari proses sterilisasi adalah untuk mencegah timbulnya mikroorganisme yang tidak diinginkan selama proses penumbuhan bakteri starter, serta untuk mematikan semua mikroorganisme yang terdapat dalam alat yang akan digunakan dalam penumbuhan starter bakteri. Teknik sterilisasi yang digunakan adalah cara pemanasan dengan bantuan uap air. Salah satu cara sterilisasi panas lembab adalah dengan menggunakan *autoclave*. Alasan penggunaan sterilisasi ini adalah uap jenuh mampu membunuh secara cepat semua bentuk vegetatif mikroorganisme hidup. Uap jenuh dapat menghancurkan spora vegetatif yang tahan terhadap pemanasan tinggi.

Tahapan selanjutnya adalah penumbuhan bakteri (*Escherichia coli*) dalam media cair. Jenis media yang digunakan dalam penumbuhan bakteri tersebut adalah media Luria Bertani. Media Luria Bertani dibuat dari campuran pepton, *yeast extract*, dan sodium klorida. Pepton ialah protein yang terdapat pada daging, air susu, kedelai, dan putih telur. Pepton mengandung banyak N_2 . Adapun fungsi

dari bahan tersebut adalah sebagai nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Salah satu syarat media untuk pertumbuhan bakteri adalah harus ada campuran nutrisi yang menyebabkan bakteri tersebut dapat tumbuh dan membelah secara efektif. Menurut Astuti (2007), terdapat beberapa faktor abiotik yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri, antara lain: suhu, kelembaban, cahaya, pH, dan nutrisi. Apabila faktor-faktor abiotik tersebut memenuhi syarat sehingga optimum untuk pertumbuhan bakteri, bakteri dapat tumbuh dan berkembang biak. Setelah bakteri diinkubasi dalam media cair Luria Bertani selama 18 jam pada suhu 37°C dan kecepatan *shaker* 175 rpm, warna kuning media Luria Bertani menjadi lebih pekat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri starter tumbuh dalam media Luria Bertani.

Pertumbuhan ditentukan dengan cara mengukur kekeruhan (*Optical density/OD₆₀₀*) kultur bakteri tersebut dengan menggunakan spektrofotometer. Sebagai blanko (kontrol) digunakan media kultivasi tanpa inokulasi. Nilai *OD₆₀₀* kultur inokulum yang ditumbuhkan selama 18 jam adalah 0,14. Menurut Brock et al, nilai *OD₆₀₀* 0,1 sampai 0,3 menunjukkan *E. coli* pada fase logaritma akan meningkatkan produksi protein SPase rekombinan. Apabila telah melewati awal fase logaritma, produksi protein rekombinan tidak optimum. Selanjutnya, 10 ml kultur inokulum dimasukkan ke dalam 500 mL medium cair LB. Kultur cair ditumbuhkan selama 3 jam (Eko, 2007), lalu diukur lagi pertumbuhan bakteri (*OD₆₀₀*). Setelah 3 jam, ditambahkan tetrasiklin 5 µg/ml. Waktu penumbuhan tidak boleh terlalu lama agar sel masih aktif membelah pada saat mulai induksi. Sel yang masih aktif membelah diharapkan dapat memproduksi protein rekombinan dalam jumlah yang cukup banyak. Waktu induksi juga menjadi pertimbangan penting. Jika sel diinduksi terlalu lama, kemungkinan terjadinya overekspresi masih tetap besar. Pertumbuhan sel yang terlalu cepat dapat menyebabkan overekspresi protein rekombinan yang dapat menghasilkan badan inklusi. Upaya untuk mengatasinya dapat dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya, memperlambat kecepatan pertumbuhan sel dengan memperpendek waktu penumbuhan atau dengan menurunkan suhu inkubasi. Cara lain yang dapat dilakukan adalah dengan mengurangi konsentrasi IPTG. Dalam penelitian ini, upaya untuk memperlambat kecepatan pertumbuhan sel adalah dengan cara

memperpendek waktu penumbuhan dan suhu inkubasi (Eko, 2007). Konsentrasi IPTG yang digunakan tetap 1 mM dan penumbuhan bakteri selanjutnya dilakukan selama 2 jam. Koleksi sel *E.coli* dilakukan setelah nilai OD mencapai 0,8-1. Absorbansi (OD) yang bernilai 1 menandakan bahwa *E. coli* telah berada dalam fase stasioner. Berdasarkan Brock et al, fase stasioner tidak terjadi pertambahan jumlah sel. Hasil pengukuran OD₆₀₀ dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Nilai OD₆₀₀ Kultur cair selama proses penumbuhan dan induksi

Percobaan	OD
Hasil Inkubasi Overnight	0,14
	0,134
	0,144
Penambahan Tetrasiklin 500 μ L	0,752
	0,8
	0,758
Induksi IPTG	1,622
	1,722
	1,87

4.3 Isolasi Protein dari Bakteri

Pemecahan sel adalah langkah pertama dalam beberapa proses analitik untuk melepaskan dan meneliti kandungan sel. Proses tersebut sangat penting dalam percobaan fraksinasi untuk pemurnian. Dalam proses homogenisasi jaringan dipecah atau dihancurkan, sehingga melepaskan senyawa-senyawa intraseluler membentuk suspensi sel (homogenat). Pelet sel yang telah diresuspensikan dalam dapar fosfat pH 6,8 dipecah dengan ultrasonikator. Pemecahan sel dilakukan sampai cairan yang pada awalnya keruh berubah menjadi bening. Proses ini membutuhkan waktu selama 30 menit pada amplitudo

20 serta *cycle* 0,8. Pemecahan sel dilakukan diatas permukaan es untuk menjaga suhu sel tidak meningkat, sehingga enzim tidak kehilangan aktivitas biologisnya.

Hasil pemecahan sel berupa suspensi sel. Kemudian, suspensi sel disentrifugasi kecepatan $6000 \times g$ selama 15 menit, suhu 4°C . Setelah sentrifugasi, terdapat bagian filtrat pada supernatan dan debris sel yang berbentuk endapan. Filtrat ini yang digunakan untuk pengujian aktivitas enzim.

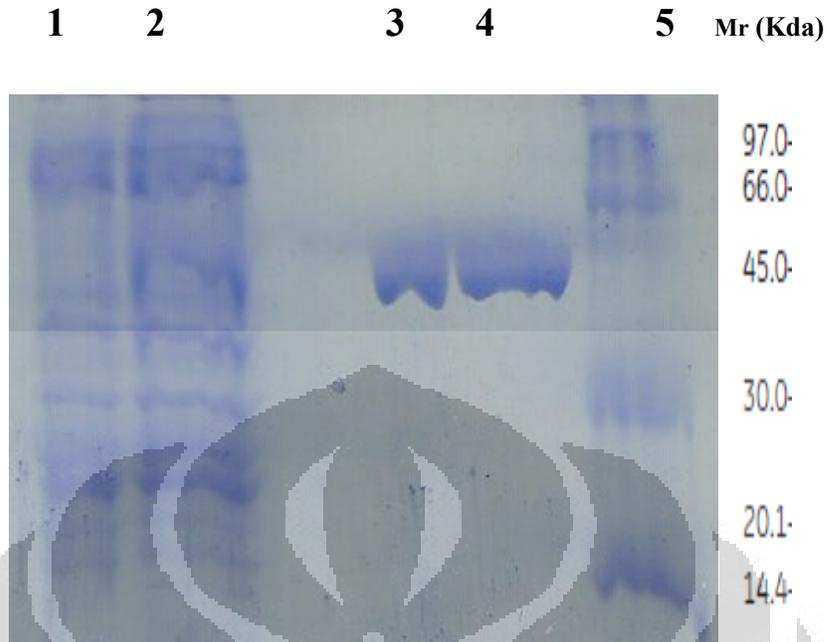
4.4 Kromatografi Afinitas dengan Kolom Nikel

Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) merupakan suatu teknik pemisahan protein yang menggunakan senyawa pengkelat yang terikat secara kovalen pada zat pendukung kromatografi dan zat padat ini dapat mengikat ion logam (Gabere Porekar, et.al, 2001). Prinsip dari ini yaitu interaksi reversible antara beberapa rantai samping asam amino dan *immobilized* ion metal. Kromatografo afinitas merupakan cara yang potensial untuk purifikasi protein.

Protein rekombinan SPase direkayasa agar mengandung residu 12 histidin yang telah di *tag* pada C terminalnya dan protein ini dikenal dengan sebutan His-Tag. Kehadiran His-tag memfasilitasi proses pemurnian protein berdasarkan afinitas selektif protein dengan polihistidin tersebut terhadap adsorben yang dilengkapi dengan pengkelat metal Ni^{2+} .

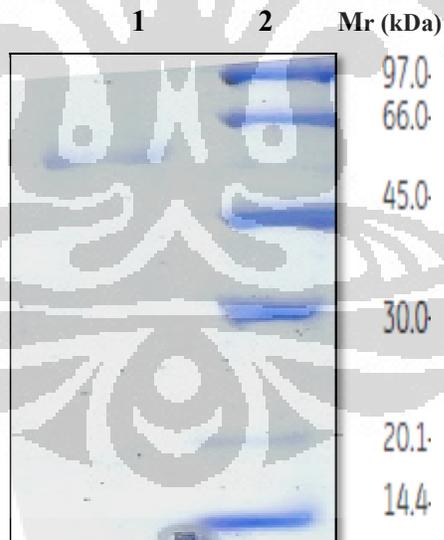
Purifikasi SPase rekombinan dilakukam dengan metode kromatografi afiniitas menggunakan pengkelat metal Ni^{2+} melalui tiga tahap. Tahap pertama merupakan tahap pengikatan protein dengan ion Ni^{2+} . Pengikatan protein terjadi karena nteraksi antara residu histidin pada ujung C SPase rekombinan dengan ion Ni^{2+} bersifat reversibel

Tahap kedua adalah pencucian. Pencucian yang ekstensif pada matriks akan menghilangkan kontaminan, sedangkan protein murni dapat diperoleh dengan cara menaikkan dan menurunkan pH larutan eluen. Protein yang tidak terikat dengan ion logam Ni^{2+} dengan mencuci kolom dengan dapar pencuci yang mempunyai kadar imidazol yang rendah. Hasil pencucian (supernatan) yang dielektroforesis dengan SDS PAGE menunjukkan beberapa pita protein non target pada lajur 1 (Gambar 4.2). Pengulangan tahap pencucian sebanyak dua kali dilakukan agar diperoleh SPase rekombinan dengan kemurnian yang tinggi.



Keterangan : 1. Supernatan (hasil pemecahan sel) 2. *Loading sample*. 3,4 Spase rekombinan yang berhasil dimurnikan. 5 Penanda Protein

Gambar 4.2 Hasil Elektroforesis SDS Page



Keterangan : 1. Spase rekombinan yang berhasil dimurnikan.
2. Penanda Molekular Protein

Gambar 4.4 Hasil Elektroforesis SDS Page

Tahap terakhir adalah tahap elusi. Tahap tersebut dilakukan untuk membuang protein non target dan diperoleh protein target yang lebih spesifik. Imidazole identik dengan rantai samping histidin, maka saat konsentrasi imidazole ditingkatkan, imidazole akan menggantikan polihistidin pada resin dan polihistidin akan terelusi keluar. Larutan dapar pengelusi yang digunakan mengandung 20 mM fosfat, 500 mM NaCl dan 500 Imidazol. Protein rekombinan yang berhasil dikeluarkan, diidentifikasi pemurniannya melalui elektroforesis gel poliakrilamid. Hasil analisis tahap elusi memperlihatkan pita tunggal pada lajur 3 dan 4 (Gambar 4.2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa SPase rekombinan sebagai protein target berhasil dilepaskan dengan imidazol pada konsentrasi 500 mM.

4.5 Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Elektroforesis gel poliakrilamid digunakan untuk pemisahan protein berdasarkan ukuran protein. Media penyangga yang digunakan adalah matriks poliakrilamida. Pada elektroforesis dalam matriks gel poliakrilamida, protein memisah-ketika protein bergerak melalui matriks tiga dimensi dalam medan listrik. Matriks poliakrilamida berfungsi untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran dan menstabilkan pH bufer agar muatan tidak berubah. Dalam penelitian ini, campuran akrilamid dan bis-akrilamid yang digunakan adalah 19:1, Gel poliakrilamida dibentuk dari polimer akrilamida dan bis-metilen akrilamida yang dikatalisis oleh amonium persulfat. Tetrametiletildiamin (TEMED) sebagai awal dan mengatur polimerisasi. Campuran gel dimasukkan ke dalam kotak cetakan gel yang terbuat dari kaca. Pada bagian atasnya diberi air atau isopropanol agar permukaan gel rata dan tidak berhubungan dengan oksigen yang dapat menghambat proses polimerisasi. Protein dapat dipisahkan dengan baik pada akrilamida 7,5%-12,5%. Dalam penelitian ini, akrilamida yang digunakan adalah 10%. Gel yang digunakan ada dua macam yaitu gel penahan dan gel pemisah.

Preparasi sampel protein disiapkan dengan cara mencampurkan 10 μ L *reducing agent* yaitu 2-merkaptotanol dan 40 μ L *loading buffer*, dan 10 μ L sampel. Campuran ini selanjutnya dipanaskan di *dry bath* suhu 95°C selama 5 menit agar terjadi disosiasi, kemudian dibiarkan dingin. Disosiasi ini terjadi dengan bantuan pemanasan dan penambahan disulfida *reducing agent* seperti

merkaptotanol untuk memutuskan ikatan sulfida. Loading buffer yang digunakan mengandung gliserol dan bromofenol biru. Adanya gliserol dimaksudkan untuk menambah berat jenis sampel sehingga sampel tidak mengapung tetapi terdeposit atau turun mengendap pada dasar sumur sampel, sedangkan bromofenol biru digunakan sebagai *tracking dye* untuk menandai batas terjauh dari pergerakan sampel protein pada saat elektroforesis.

Pada saat elektroforesis berlangsung, protein akan bergerak dari elektroda negatif menuju elektroda positif sampai jarak tertentu. Pada gel poliakrilamida, tergantung pada berat molekulnya. Semakin rendah berat molekulnya, maka semakin jauh protein bergerak, dengan kata lain mobilitasnya tinggi. Sebaliknya, protein dengan berat molekul lebih besar akan bergerak pada jarak yang lebih pendek dengan kata lain mobilitasnya rendah.

Berbagai jenis protein pada suatu sampel akan terpisah-pisah pada gel poliakrilamida yang tergantung pada mobilitasnya. Protein dengan mobilitas tinggi akan berhenti bergerak pada bagian gel yang lebih bawah, sedangkan protein dengan mobilitas rendah cenderung berhenti bergerak pada bagian atas gel. Dengan demikian, pada jalur pergerakan protein akan didapatkan jajaran protein (disebut sebagai pita protein) yang sudah memisah berat molekulnya.

Protein dielektroforesis pada sistem denaturing. *Running buffer* yang digunakan mengandung detergen ionik SDS. SDS akan mengikat pada bagian hidrofobik dan residu asam amino, sehingga menyebabkan perubahan struktur tiga dimensi (menjadi *unfolding*). Selain itu, SDS menyebabkan seluruh rantai peptida bermuatan negatif. Protein SDS bergerak dalam gel poliakrilamida dengan kecepatan yang bergantung pada berat molekulnya.

Tahapan selanjutnya adalah pewarnaan. Pada kondisi tidak diwarnai, protein tersebut tidak terlihat karena memang protein dalam sampel tidak berwarna. Setelah diwarnai dengan *staining solution* yang mengandung Coomassie Brilliant Blue R-250, protein yang tidak berwarna tersebut menjadi berwarna biru karena mengikat Coomassie Blue. Pada kondisi ini, kita bisa mengetahui keberadaan dan mengukur mobilitas protein untuk kemudian menentukan berat molekulnya. Sampel SPase hasil elusi dari kolom afinitas terbentuk satu pita. Referensi berat molekul SPase dapat dilihat dari deretan

marker yang digunakan dan literatur yang didapatkan. Menurut literatur yang didapatkan, berat molekul SPase adalah 55-57 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa protein SPase berhasil dimurnikan dari kolom nikel. Sampel lain, yaitu *loading sampel* yang merupakan protein SPase yang belum terelusi menunjukkan puluhan pita dalam gel poliakrilamida. Kasus ini juga serupa dengan sampel supernatan yang menunjukkan banyak pita. Setelah proses pewarnaan, gel dicuci dengan *destaining solution* (larutan pencuci warna). Larutan pencuci dapat diganti-ganti sampai diperoleh gel yang jernih. Hasil elektroforesis gel poliakrilamid dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan Gambar 4.3.

4.6 Pemekatan dan *Desalting* Protein

Pemekatan dilakukan dengan konsentrator (*Centrifugal Filter Devices*). Tujuan dari pemekatan ini adalah menghilangkan pelarut dan imidazole dari hasil keluaran protein SPase yang terelusi dari kolom nikel sehingga konsentrasi SPase meningkat dan konsentrasi imidazolnya menurun. Berdasarkan hasil elektroforesis gel poliakrilamid dan literatur yang didapatkan, protein rekombinan sukrosafosforilase mempunyai berat molekul 56 kDa (Goedl, Schwarz et al. 2007), sehingga SPase rekombinan tidak lolos dari pori-pori konsentrator *cut off* 30 kDa. Volume akhir setelah sentrifugasi selama 15 menit adalah 100 μL dari 4500 μL . Protein SPase yang belum dipekatkan dan sudah dipekatkan menjadi sampel untuk uji konsentrasi protein dengan metode Lowry.

4.7 Uji Konsentrasi Protein dengan Metode Lowry

Pengukuran konsentrasi protein dengan menggunakan metode Lowry adalah suatu uji untuk mengukur konsentrasi protein total dengan cara kalorimeter dalam suatu larutan. Metode Lowry merupakan pengembangan dari metode Biuret. Standar protein yang digunakan adalah Bovine Serum Albumin (BSA). Dalam penelitian ini konsentrasi protein yang digunakan adalah 200 $\mu\text{g/mL}$ yang kemudian dilanjutkan untuk membuat beberapa seri konsentrasi yang berbeda. Hasil serapan larutan standar BSA dapat digunakan untuk membuat persamaan kurva kalibrasi untuk menentukan konsentrasi protein.

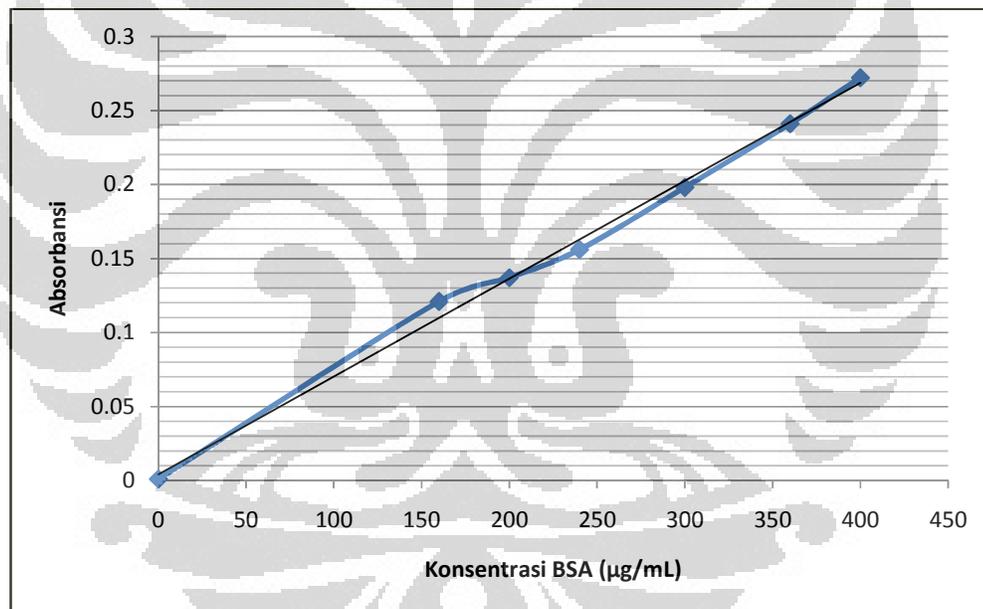
Ketika sampel protein rekombinan SPase dimasukan terlibat dua reaksi yang menyebabkan perubahan warna menjadi biru. Hal tersebut disebabkan karena kompleks Cu(II) akan tereduksi menjadi Cu(I) . Ion Cu^+ kemudian mereduksi reagen Folin-Ciocalteu, kompleks phosphomolibdat-phosphotungstat, menghasilkan *heteropoly-molybdenum blue* akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu , yang memberikan warna biru intensif yang dapat dideteksi secara kalorimetri. Sampel protein rekombinan SPase yang belum dipekatkan memberikan warna biru tidak pekat, sedangkan protein rekombinan SPase yang telah dipekatkan memberikan warna biru yang pekat. Kepekatan atau kekuatan warna biru bergantung pada kandungan residu tryptophan dan tyrosine-nya (Alexander and Griffiths, 1992).

Serapan yang dihasilkan pada pembacaan spektrofotometer dengan panjang gelombang 750 nm merupakan reduksi Cu^{2+} (Larutan D) menjadi Cu^+ oleh tirosin, triptofan, dan sistein yang terdapat pada protein rekombinan SPase. Ion Cu^+ bersama dengan fosfotungstat dan fosfomolibdat (Reagen Fenol Folin Ciocalteu) membentuk warna biru, sehingga dapat menyerap cahaya. Serapan yang dihasilkan oleh larutan standar BSA pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Serapan Larutan Standar BSA

Konsentrasi BSA ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
0	0,000
160	0,121
200	0,137
240	0,156
300	0,198
360	0,241
400	0,272

dan kurva kalibrasinya pada Gambar 4.4 .



Gambar 4.3 Kalibrasi BSA

Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh adalah

$$y = 0,000x + 0,004 \quad 4.1$$

$$R^2 = 0,995$$

Selanjutnya dengan cara yang sama sampel juga diukur serapannya dan konsentrasinya ditentukan menggunakan persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh. Serapan yang dihasilkan oleh sampel protein rekombinan yang tidak pekat adalah 0,102. Setelah diukur menggunakan persamaan 4.1 maka konsentrasi protein yang didapatkan adalah 36,5 $\mu\text{g/mL}$. Karena sampel SPase tidak pekat yang dimasukan 5 μL , maka konsentrasi SPase yang didapatkan sebenarnya adalah 7,3 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan SPase pekat sebanyak 2 μL , serapan yang dihasilkan adalah 0,303. Setelah diukur dengan persamaan 4.1 maka konsentrasi yang diperoleh adalah 434,5714 $\mu\text{g/mL}$. jadi, konsentrasi SPase pekat yang sebenarnya adalah 217,28 $\mu\text{g/mL}$.

4.8 Analisa Aktivitas Enzim

Fraksi protein yang telah dipekatkan digunakan untuk menganalisis aktivitas enzimatis dengan metode yang dideskripsikan oleh (Silverstein, Voet et al. 1967). Setelah semua campuran dengan baik diinkubasi pada suhu 25° C, 30°C, dan 37°C selama lima menit, sampel Spase rekombinan diukur peningkatan serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Hasil serapan Spase rekombinan dapat dilihat pada Tabel 4.3, Tabel 4.4, dan Tabel 4.5.

Tabel 4.3 Absorbansi SPase Rekombinan Suhu 25°C

Menit ke	Absorbansi (A)
5	0,033
10	0,296
15	0,375
20	0,397

Tabel 4.4 Absorbansi SPase Rekombinan Suhu 30°C

Menit ke	Absorbansi (A)
5	0,341
10	0,588
15	1,205
20	1,203

Tabel 4.5 Absorbansi SPase Rekombinan Suhu 37°C

Menit ke	Absorbansi (A)
5	0,120
10	0,759
15	1,631
20	1,619

Tahapan selanjutnya adalah menguji aktivitas enzim pada SPase standar yang berasal dari *Leuconostoc mesenteroides*. SPase standar diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit, kemudian dilihat hasil serapannya pada panjang gelombang 340 nm setiap lima menit. Hasil serapan SPase standar ditunjukkan pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Absorbansi Spase standar

Menit ke	Absorbansi (A)
5	1,39
10	1,403

Aktivitas relatif SPase rekombinan terhadap SPase standar dari *Leuconostoc mesenteroides* adalah 47% pada Tabel 4.7. Hasil perhitungan menggunakan persamaan 2.1 dan persamaan 2.2

Tabel 4.7 Hasil Aktivitas Relatif Sukrosafosforilase Rekombinan

SPase	Absorbansi (340nm)	Kadar Protein (mg/ml)	Volume Total (ml)	Unit	Aktivitas (Unit/ml)	Akt.Spesifik (unit/mg)	Aktivitas Relatif
Rekombinan	0,296	0,21728	1,66	0,49	7,9	36,36	0,47
Standar	1,403	0,485	1,66	2,324	37,36	77	1

Reaksi enzimatik yang dideskripsikan oleh (Silverstein, Voet et al. 1967) terbukti. Hal ini ditunjukkan dengan hasil pemurnian SPase rekombinan dapat diketahui aktivitas enzimnya dengan metode Silverstein, Voet et al. 1967. Dalam reaksi ini, SPase menggunakan koenzim NADP^+ yang direduksi menjadi NADPH adalah sebanding dengan jumlah sukrosa yang dikonversi menjadi glukosa-1-fosfat dan fruktosa. NADPH mempunyai puncak absorban pada panjang gelombang 340 nm yang merupakan daerah ultraviolet dan spektrum. Oleh karena itu, uji reaksi SPase rekombinan menggunakan uji spektrofotometrik. SPase rekombinan dengan cepat mengkonversi sukrosa menjadi menjadi α -D-glukosa-1-fosfat yang menyebabkan NADP^+ tereduksi menjadi NADPH dengan adanya enzim fosfoglukomutase dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase sehingga memberikan serapan yang tinggi pada panjang gelombang 340 nm.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Protein rekombinan sukrosafosforilase dapat dimurnikan dengan kromatografi afinitas berdasarkan pada interaksi yang spesifik antara ligan yang diimobilisasi dan protein yang dikehendaki. Hasil pemurnian SPase rekombinan dapat diketahui aktivitas enzimnya dengan metode Silverstein, Voet et al. 1967.

5.2 Saran

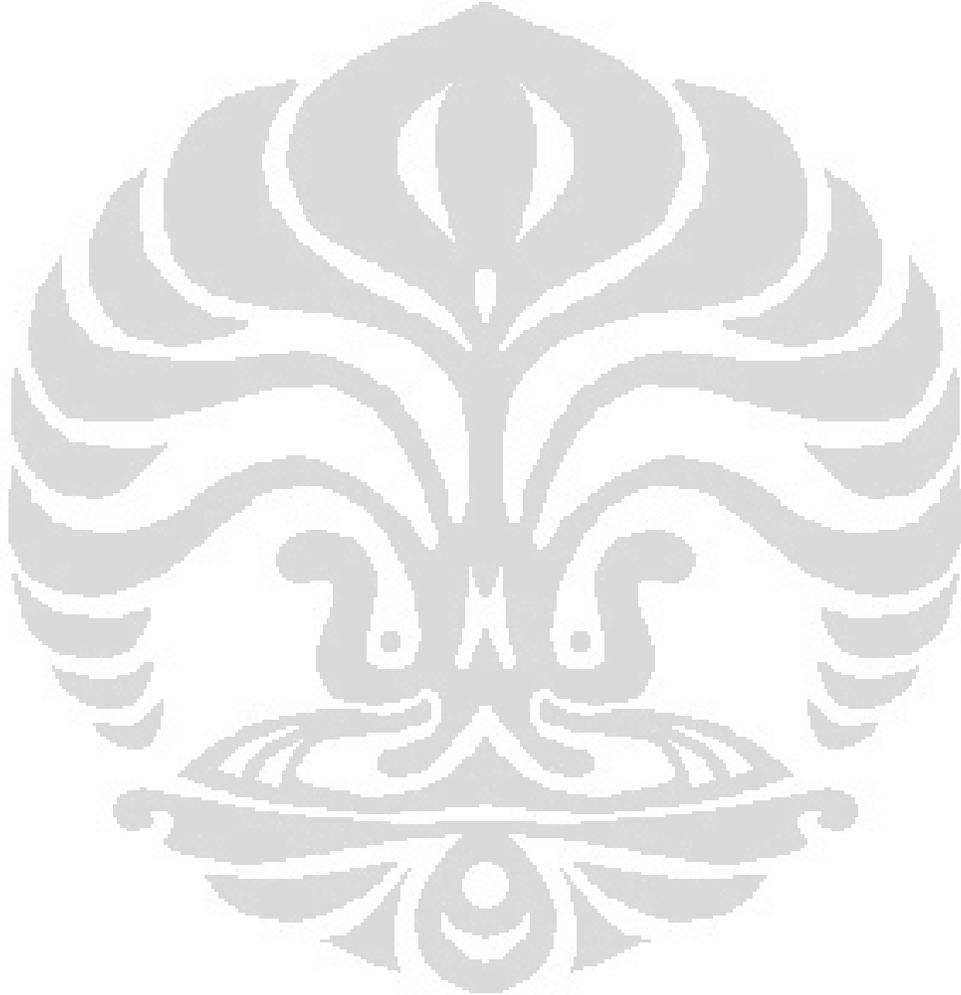
1. Pada saat mengukur pertumbuhan sel dengan cara mengukur kekeruhan (*Optical density*/OD₆₀₀) kultur bakteri menggunakan spektrofotometer, sesuai dengan aturan yang telah ditetapkan. Misalnya, pada saat OD₆₀₀ 0,8 harus segera ditambahkan induksi protein yaitu IPTG.
2. Pada saat melakukan purifikasi dengan menggunakan kolom afinitas, perlu diperhatikan pH larutan dapaar pencuci dan pengelusi yaitu berkisar 7-8. Jika tidak mencapai pH tersebut, purifikasi tidak dapat dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Nelson and Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York, W.H. Freeman and Company: 2005
- Tedokon, M., K. Suzuki, Y. Kayamori, S. Fukita, and Y. Katayama. "Enzymatic assay of inorganic phosphate with use of sucrose phosphorylase and phosphoglucomutase." *Journal of Clinical Chemistry* 38.4 (1992): 512-515.
- Aerts, D., T. F. Verhaeghe, et al. (2011). "Transglucosylation potential of six sucrose phosphorylases toward different classes of acceptors." *Carbohydrate Research* 346(13): 1860-1867.
- Fournier, P., P. de Ruffray, et al. (1994). "Natural instability of *Agrobacterium vitis* Ti plasmid due to unusual duplication of a 2.3-kb DNA fragment." *Mol Plant Microbe Interact* 7(2): 164-172.
- Goedl, C., A. Schwarz, et al. (2007). "Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: characterization, kinetic studies of transglucosylation, and application of immobilised enzyme for production of alpha-D-glucose 1-phosphate." *J Biotechnol* 129(1): 77-86.
- Goedl, C., A. Schwarz, et al. (2007). "Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: Characterization, kinetic studies of transglucosylation, and application of immobilised enzyme for production of α -d-glucose 1-phosphate." *Journal of Biotechnology* 129(1): 77-86.
- Henrissat, B. (1991). "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." *Biochem J* 280 (Pt 2): 309-316.
- Koga, T., K. Nakamura, et al. (1991). "Purification and some properties of sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*." *Agric Biol Chem* 55(7): 1805-1810.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- Mirza, O., L. K. Skov, et al. (2006). "Structural rearrangements of sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* during sucrose conversion." *J Biol Chem* 281(46): 35576-35584.
- Reid, S. and V. Abratt (2005). "Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(3): 312-321.
- Russell, R. R., H. Mukasa, et al. (1988). "Streptococcus mutans gtfA gene specifies sucrose phosphorylase." *Infect Immun* 56(10): 2763-2765.

- Silverstein, R., J. Voet, et al. (1967). "Purification and mechanism of action of sucrose phosphorylase." J Biol Chem **242**(6): 1338-1346.
- Sprogoe, D., L. A. van den Broek, et al. (2004). "Crystal structure of sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis*." Biochemistry **43**(5): 1156-1162.
- van den Broek, L. A., E. L. van Boxtel, et al. (2004). "Physico-chemical and transglucosylation properties of recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083." Appl Microbiol Biotechnol **65**(2): 219-227.
- Winkler, U., T. M. Pickett, et al. (1996). "Fractionation of perforin and granzymes by immobilized metal affinity chromatography (IMAC)." Journal of Immunological Methods **191**(1): 11-20.
- Rahayu, Rita, et al. (2009). "Produksi Maltodekstrin Berbasis Pati Secara Enzimatik dan Uji Reaksi Transglukosilasi." Mikrobiologi **3A**:95-99
- Malik, et al. (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." Biotechnology
- Fatchiyah, et al. (2011). *BIOLOGI MOLEKULER - Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- Kusnandar, Feri. (2011). *Kimia Pangan: Komponen Makro*. Jakarta: PT. Dian Rakyat.
- Deutscher, Murray. (1990). *Guide to Protein Purification*. London: Academic Press Limited.
- Dwidjoseputro, D. (2005). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.
- Bintang, Maria. (2010). *BIOKIMIA - Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga
- Muladno. (2010). *Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: IPB Press.

LAMPIRAN



Lampiran 1: Analisis sekuens asam amino dan sekuens nukleotida

Homologi DNA dan sekuens asam amino didapatkan secara *on-line* menggunakan server BLAST dari National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD.

Sumber : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Gen Bank, Accession Number HM536929.

```

LOCUS       HM536929                1476 bp    DNA    linear    BCT 28-JUL-2010
DEFINITION  Leuconostoc mesenteroides strain MBFWRS-3(1) sucrose phosphorylase
            SPaseWRS-3(1) gene, partial cds.
ACCESSION   HM536929
VERSION     HM536929.1  GI:301130781
KEYWORDS    .
SOURCE      Leuconostoc mesenteroides
  ORGANISM  Leuconostoc mesenteroides
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Leuconostoc.
REFERENCE   1 (bases 1 to 1476)
  AUTHORS   Malik,A., Ishikawa,S., Hadi,E.S., Ogasawara,N. and Suryadi,H.
  TITLE     Cloning and expression of gene coding for sucrose phosphorylase
            from Leuconostoc mesenteroides MBFWRS-3(1) isolated from
            sugar-containing beverage Wedang ronde
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 1476)
  AUTHORS   Malik,A. and Ishikawa,S.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (11-JUN-2010) Department of Pharmacy, Faculty of
            Mathematics and Natural Sciences, Universitas Indonesia, Depok
            16424, Indonesia
FEATURES             Location/Qualifiers
  source              1..1476
                    /organism="Leuconostoc mesenteroides"
                    /mol_type="genomic DNA"
                    /strain="MBFWRS-3(1)"
                    /isolation_source="Wedang ronde beverage"
                    /db_xref="taxon:1245"
                    /country="Indonesia"
                    /collection_date="Jan-2008"
  CDS                1..>1476
                    /EC_number="2.4.1.7"
                    /codon_start=1
                    /transl_table=11
                    /product="sucrose phosphorylase SPaseWRS-3(1)"
                    /protein_id="ADK62363.1"
                    /db_xref="GI:301130782"
                    /translation="MEIQNKAMLITYADSLGKNLKDVRKVLKEDIGDAIGGVHLLPFF
                    PSTGDRGFAPSDYTRVDSAFGDWSDVEALGEEYYLMFDFMINHISRESVMYQDFKKNH
                    DESKYKDFIRWEKFWAKAGENRPTQADVLIYKRKDKAPTQEITFDDGTENLWNTF
                    GDEQIDIVNSAIAKEFIKTILEDVVKHGANLIRLDAFAYAVKKVDTNDFVPEIWD
                    TLNEVREILTPLKAEILPEIHEHYSIPKKINDHGYFTYDFALPMTTLYLYSGKINQL
                    AKWLKMPMKQFTTLDTHDGIGVVDARDVLTDEEIDYASEELYKVGANVKKTYSSASY
                    NNLDIYQINSTYYSALGNDDAAYLLSRVFQVFAPGIPQIYYVGLLAGENDIELLESSK
                    EGRNINRHYSVDEVKEEVKRPVVANLLKLLSWRNNFAAFDLGSDIVETPSDTTIKI
                    TRDKSGENVAVLVANAADKTFTITANGEEVLANSADKQQL"

```

(lanjutan)

ORIGIN

1 atggaaattc aaaacaaagc aatgcttata acatacgtcg attcattagg taaaaactta
 61 aaggatgttc gtaaagtttt gaaggaagac attggtgatg caattggtgg tgttcaactg
 121 ttgccgttct tcccatcaac aggagaccgt ggttttgcac cttctgatta cacacgtggt
 181 gattcagcat ttggtgactg gagtgatgta gaagcattgg gtgaagaata ctacttgatg
 241 tttgatttca tgattaacca catttcacgt gaatctgta tgtatcaaga tttcaagaaa
 301 aatcatgatg aatcaaagta taaagatttc ttcattcgtt gggaaaagtt ctgggccaag
 361 gctggtgaaa accgtccaac acaagccgat gttgacttga ttacaagcg taaggataag
 421 gcaccaactc aagaattac ttttgatgat ggtacaactg aaaatttgtg gaacacattt
 481 ggtgatgaac aaattgatat cगतgtaaac tcagctatcg ctaaagaatt tatcaagaca
 541 actcttgaag acatggtgaa gcagtggagc aacttgatc gtttggatgc ctttgcatac
 601 gctgttaaaa aagttgatac aaatgacttc ttcggtgagc ctgaaatctg ggacacattg
 661 aacgaggttc gtgaaatfff gacacctttg aaggccgaaa ttttgccaga aatccatgaa
 721 cactattcaa ttctaagaa gattaatgat catggttact tcacatatga ttttgctttg
 781 ccaatgaca cactttacac actttattca ggtaagaca atcaattagc taagtggttg
 841 aagatgtcac caatgaagca atttactact ttggatacac acgatgggat tgggtgtgtc
 901 gatgcgctg acgtcttgac tgatgaagaa attgattatg catctgaaga attatacaaa
 961 gttggtgcta acgtgaagaa gacttactct tctgettcat acaacaactt ggatatctac
 1021 caaatcaact caacatacta ctcagctttg ggaaatgatg atgetgcata cttgctgagt
 1081 cgtgtattcc aagtccttgc tcctggtatc ccacaaatct attacgttgg tttgttggcc
 1141 ggtgaaaatg atattgaatt gcttgaatct tcaaaagaag gacgtaacat taaccgtcac
 1201 tactactcag ttgatgaagt taaggaagaa gtttaagcgc cagtgttgc taatttattg
 1261 aaacttttgt catggegtaa caactttgcg gcatttgatt tggatggatc aattgatggt
 1321 gaaacaccat ctgacacaac tatcaagatt actogtaagg ataagtctgg tgaaaatggt
 1381 gcagttttgg ttgctaacgc tgctgacaag acatttacta ttactgcaaa tggcgaagaa
 1441 gttttagcta actcagaggc tgataagcaa caattg

//

Lampiran 2 *Screening*, Identifikasi dan Kloning Gen SPase

Sampel bakteri asam laktat diisolasi untuk produksi ekstraseluler polisakarida. Sampel ini diisolasi dari makanan lokal dan minuman yang terkenal, umumnya mengandung gula. Sampel ini berasal dari beberapa daerah di Indonesia, yaitu Bogor, Ciputat, Tangerang. Solo, dan Yogyakarta. Strain yang dipilih adalah *L. mesenteroides* MBFWRS-3(1). Setelah diidentifikasi dengan PCR yang menggunakan kloning vektor pDONR201 (Gateway® system), *L. mesenteroides* MBFWRS-3(1) menunjukkan ukuran yang sesuai dari produk PCR (data tidak ditampilkan).

Analisis BLAST yang digunakan untuk homologi sekuens DNA menampilkan SPase 1,050-bp mengkodekan gen yang mempunyai homologi signifikan dengan SPase yang berasal dari *L. mesenteroides*. Fragmen DNA SPase berukuran 1,748 bp berhasil diklon menggunakan primer CloneSPaseF dan CloneSPaseR, lalu direkombinasi dengan vektor tujuan pOGW. Hasilnya adalah plasmid pAM_SPaseWRS(3)1 yang ditunjukkan pada Figure 1.

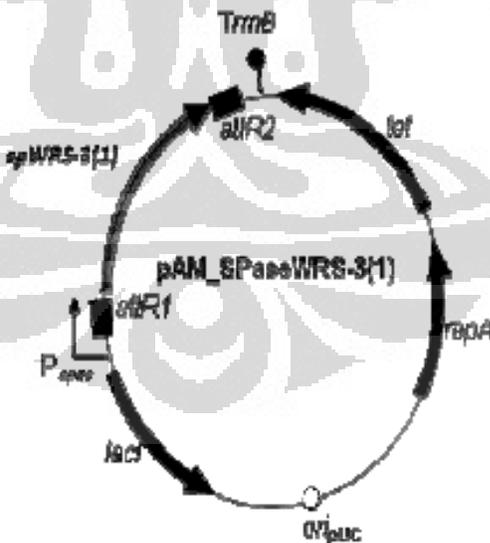


Figure 1. Plasmid rekombinan pAM_SPWRS-3(1) membawa 1,7 kb DNA dengan 1,476-bp spWRS-3(1)

Lampiran 3 Sertifikat Analisis Sukrosafosforilase standar

ORIENTAL YEAST CO.,LTD.

OSAKA BIO PLANT

MIYAMA-SUITA 4-4-1,
SUITA, OSAKA
564-0943 JAPAN

PHONE : 06 (8384) 1222
FAX : 06 (8380) 3474

ASSAY DATA

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

Standard: SP-93

Lot No.: 32793001

Specification	Result
Activity	<u>77</u> U/mg powder
Specific activity	<u>110</u> U/mg protein
Contaminants (as SP activity = 100%):	
Lactate dehydrogenase	<u>< 0.1 %</u> <u>0.036 %</u>
Pi	<u>< 0.1 μg/mg powder</u> <u>0.006 μg/mg powder</u>
State: Lyophilized powder of highly purified enzyme	
One mg of powder contains the following	
Protein	<u>500 \pm 300 μg</u> <u>700 μg</u>
PIPES	<u>400 \pm 300 μg</u> <u>300 μg</u>

Date of assay: January 18, 2010 *K. Totsuya*

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 5 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⁺-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 *P. 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 6 Sertifikat Analisis Glukosa-1,6-bifosfat

<http://www.signalabs.com/catalog/CertificatesAnalysis.asp?Symbol=GSMT5&LotNo=025K3793...>

Certificate of Analysis

Signalabs

<p>Product Name Product Number Product Brand CAS Number Molecular Formula Molecular Weight Storage Temp</p>	<p>Product Name Product Number Product Brand CAS Number Molecular Formula Molecular Weight Storage Temp</p>	<p>Product Name Product Number Product Brand CAS Number Molecular Formula Molecular Weight Storage Temp</p>
---	---	---

TEST

<p>APPEARANCE WHITE TO OFF-WHITE POWDER</p> <p>SOLUBILITY WATER BY KARL FISCHER</p> <p>SOLVENT CONTENT BY GC CYCLOHEXANONE</p> <p>PURITY</p>	<p>APPEARANCE WHITE TO OFF-WHITE POWDER</p> <p>SOLUBILITY CLEAR TO SLIGHTLY TURBID SOLUTION IN WATER</p> <p>SOLVENT CONTENT BY GC CYCLOHEXANONE</p> <p>PURITY</p>	<p>APPEARANCE WHITE TO OFF-WHITE POWDER</p> <p>SOLUBILITY CLEAR TO SLIGHTLY TURBID SOLUTION IN WATER</p> <p>SOLVENT CONTENT BY GC CYCLOHEXANONE</p> <p>PURITY</p>
--	---	---

QC RELEASE DATE

Phy. Lab. Inc.
Quality Control
St. Louis, Missouri, USA

Lampiran 7 Sertifikat Analisis NADP⁺

ORIENTAL YEAST CO.,LTD.

OSAKA BIO PLANT

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

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

ASSAY DATA

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

Formula : C₂₁H₂₈N₇O₁₃P₃
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%	<u>96.7</u> %
NADP ⁺ contents	—	<u>89.9</u> %
Sodium contents	3.0 ± 1.5%	<u>2.9</u> %
Water contents	<8%	<u>4.1</u> %
Spectral analysis		
1. ε at 260 nm and pH 7.5	(18.0±0.8) × 10 ³ L/mole/cm	<u>18.1</u> × 10 ³ L/mole/cm
2. Ratio at pH 7.5		
A250 / A260	0.83±0.03	<u>0.83</u>
A280 / A260	0.21±0.02	<u>0.20</u>
3. ε when reduced with glucose-6-phosphate dehydrogenase at 340nm and pH 7.5	(6.2±0.3) × 10 ³ L/mole/cm	<u>6.0</u> × 10 ³ L/mole/cm
4. Ratio when reduced with glucose-6-phosphate dehydrogenase at pH 7.5		
A340 / A260	0.43±0.02	<u>0.41</u>

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

Approved: M. Kagei Shipment: Conformable

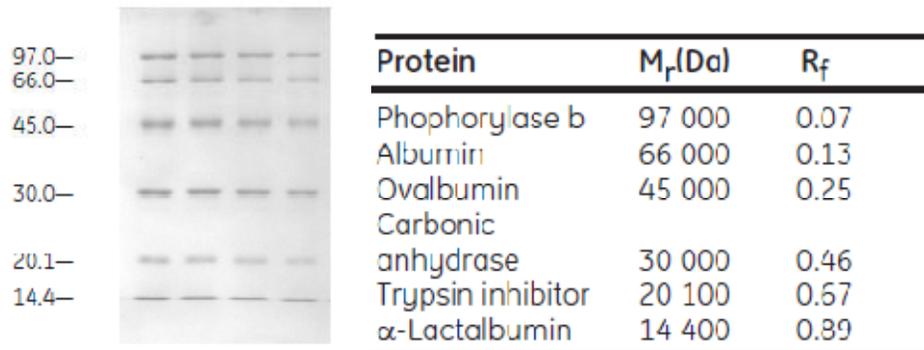
Other details of the assay procedure are available upon request.

for laboratory use only

Lampiran 8 Penanda Molekular Protein

Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis
(Code: 17-0446-01)

M_r (kDa)



Lampiran 9 Panduan Pembuatan Dapar Elusi dan Dapar Pencuci (*GE Healthcare His SpinTrap* (Code: 28-4013-53))

8. Prepare buffers with different imidazole concentrations

8.1. 2 M imidazole stock solution

To prepare binding and elution buffer with different amounts of imidazole a 2 M imidazole stock solution should be used.

Prepare 250 ml 2 M imidazole stock solution:

1. To 34.05 g imidazole, add distilled water to 200 ml and dissolve completely. Use high purity imidazole as this will give no or very low absorbance at 280 nm (imidazole, 68.08 g/mol).
2. Adjust to pH 7.4 with HCl.
3. Add distilled water to 250 ml.

8.2. Binding or elution buffers

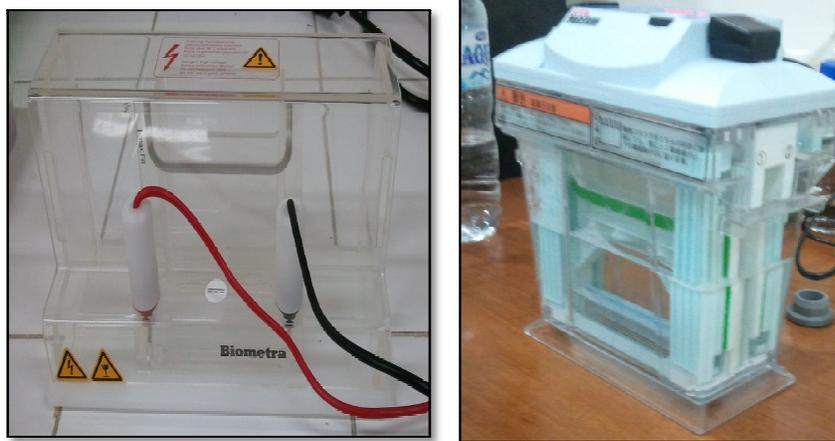
Prepare 250 ml binding or elution buffers with final concentrations, 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl and 10–500 mM imidazole:

1. Take 0.44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (177.99 g/mol), 0.35 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (137.99 g/mol) and 7.30 g NaCl (58.44 g/mol).
2. Add X ml 2 M imidazole stock solution (see Table 3). The volume of imidazole stock solution added depends on the chosen imidazole binding and elution concentrations.
3. Add distilled water to 200 ml and dissolve completely.
4. Adjust to pH 7.4 with HCl.
5. Add distilled water to 250 ml.
6. Filter through a 0.45 μm filter.

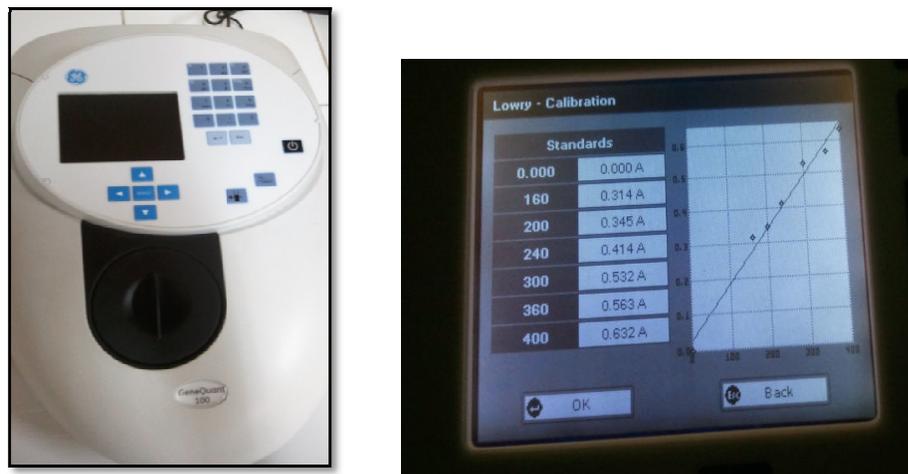
(lanjutan)

Table 3. Phosphate buffers (250 ml) with different imidazole concentrations.

Final imidazole concentration	2M imidazole stock solution volume (ml)
10	1.25
20	2.50
30	3.75
40	5.00
50	6.25
60	7.50
70	8.75
80	10.00
90	11.25
100	12.50
300	37.50
500	62.50



Gambar 1 Alat Elektroforesis



Gambar 2 Spektrofotometer GeneQuant



Gambar 3 Sentrifugasi



Gambar 4 *Orbital Shaker Incubator*



Gambar 5 Ultrasonikator



Gambar 6 Kolom Affinitas (*HiTrap FF Crude*)