



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI ENZIM SUKROSAFOSFORILASE REKOMBINAN
DARI BAKTERI *Escherichia coli* BL-21STAR™ DAN ESEI
AKTIVITAS TRANSGLIKOSILASI TERHADAP
ASAM ASKORBAT DAN ASAM BENZOAT**

SKRIPSI

**EDITHA RENESTEEN
0806398114**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI ENZIM SUKROSAFOSFORILASE REKOMBINAN
DARI BAKTERI *Escherichia coli* BL-21STAR™ DAN ESEI
AKTIVITAS TRANSGLIKOSILASI TERHADAP
ASAM ASKORBAT DAN ASAM BENZOAT**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana farmasi

**EDITHA RENESTEEN
0806398114**

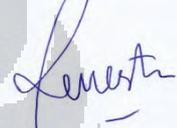
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

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

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

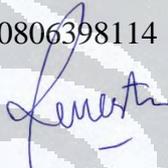
Depok, 12 Juli 2012



Editha Renesteen

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Editha Renesteen
NPM : 0806398114
Tanda Tangan : 
Tanggal : Juli 2012

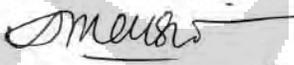
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Editha Renesteen
NPM : 0806398114
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Isolasi Enzim Sukrosafosforilase Rekombinan dari Bakteri *Escherichia coli* BL-21Star™ dan Esei Aktivitas Transglukosilasi Terhadap Asam Askorbat dan Asam Benzoat

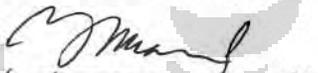
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Amarila Malik, M.Si.


(.....)

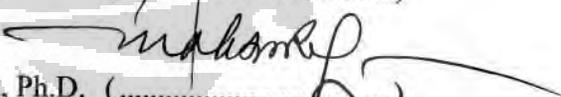
Pembimbing II : Dr. Herman Suryadi, MS.


(.....)

Penguji I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS.


(.....)

Penguji II : Prof. Maksum Radji, M.Biomed., Ph.D.


(.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah S.W.T., karena atas rahmat dan hidayah-Nyalah penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi FMIPA UI.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari dukungan moral dan spiritual seluruh pihak yang ada di sekeliling penulis. Dengan perhatian, motivasi dan waktu yang telah mereka berikan, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini tepat waktu. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ibu Dr. Amarila Malik, M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah banyak memberikan bantuan dan kesempatan baik berupa dana, bimbingan, ilmu, pengalaman, saran, dan solusi terhadap berbagai permasalahan yang dihadapi selama penelitian berlangsung.
2. Bapak Dr. Herman Suryadi, M.S. selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberi bantuan berupa bimbingan, nasehat, ilmu, dukungan dan motivasi selama penelitian berlangsung.
3. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S. selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
4. Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Universitas Indonesia, no. 924/H2.R12/PPM.001.01 sumber pendanaan 2011 melalui Dana Hibah Riset Kolaborasi Internasional kepada Ibu Dr. Amarila Malik, M. Si.
5. Ibu Dr. Berna Elya Apt., M.Si selaku pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, saran, bantuan, dan dukungan selama penulis menjalani perkuliahan hingga penelitian.
6. Seluruh staf pengajar, karyawan dan laboran Departemen Farmasi FMIPA UI, terutama Mbak Catur dan Mas Tri yang telah banyak membantu penulis selama masa pendidikan dan penelitian.

7. Mami, Dady, Reinard, dan Atika yang telah memberikan dukungan, doa, semangat, saran, dan bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini.
8. Hamka yang telah memberikan semangat, dukungan, doa, saran, dan bantuan selama menjalani perkuliahan hingga penelitian.
9. Evelina, Furqon, Neti, Pauline, Radit, Kenny, Iqbal, Bu Imelda, Nurul, Nisa, Ola, Basyar yang telah menjadi teman-teman satu tim penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi atas bantuan dan dukungan yang diberikan selama penelitian.
10. Teman-teman Farmasi 2008 atas bantuan, dukungan dan perhatian yang diberikan selama masa perkuliahan dan penelitian.
11. 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 kritik dan saran yang membangun. Akhir kata penulis mengharapkan semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang farmasi.

Penulis

2012

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

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

Nama : Editha Renesteen
NPM : 0806398114
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

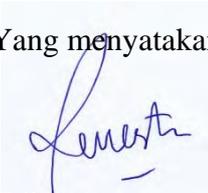
Isolasi Enzim Sukrosafosforilase Rekombinan dari Bakteri *Escherichia coli* BL-21Star™ dan Esei Aktivitas Transglukosilasi Terhadap Asam Askorbat dan Asam Benzoat

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : Juli 2012

Yang menyatakan


(Editha Renesteen)

ABSTRAK

Nama : Editha Renesteen
Program Studi : Farmasi
Judul : Isolasi Enzim Sukrosafosforilase Rekombinan dari Bakteri
Escherichia coli BL-21StarTM dan Esei Aktivitas
Transglukosilasi Terhadap Asam Askorbat dan Asam Benzoat

Sukrosafosforilase (SPase) adalah suatu enzim yang mengkatalisis sejumlah reaksi pemindahan gugus glukosil ke sejumlah molekul aseptor. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh SPase rekombinan dari *E. coli* BL-21 StarTM dalam skala besar, memperoleh karakter enzim berdasarkan bobot molekul dan aktivitas, dan mengetahui aktivitas transglukosilasi terhadap asam askorbat dan asam benzoat. Berdasarkan hasil SDS PAGE, bobot molekul SPase rekombinan adalah antara 45 dan 66 kDa. Aktivitas SPase diukur dengan menggunakan sukrosa sebagai substrat dan produk akhir diukur sebagai NADPH pada 340 nm, dengan hasil aktivitas relatif 98,52% terhadap SPase standar. Aktivitas transglukosilasi menggunakan asam benzoat sebagai substrat menunjukkan produk pada KLT, sedangkan asam askorbat tidak menunjukkan terbentuknya produk pada KLT dan KCKT.

Kata Kunci : sukrosafosforilase, aktivitas enzimatis, transglukosilasi, SDS PAGE, KLT, KCKT
xv + 92 halaman : 33 gambar; 3 tabel; 11 lampiran
Daftar Pustaka : 42 (1966-2011)

ABSTRACT

Name : Editha Renesteen
Program Study : Pharmacy
Title : Isolation of Recombinant Sucrose Phosphorylase Enzyme from *Escherichia coli* BL-21 StarTM and Its Transglycosylation Activity Assay using Ascorbic Acid and Benzoic Acid as Substrate

Sucrosephosphorylase (SPase) is an enzyme that catalyzes glucosyl transfer reaction to the amount of acceptor molecules. The objective of this study was to obtain the recombinant SPase from *E. coli* BL-21 StarTM in a large scale, to characterize the recombinant SPase by its molecular weight and activity, and to determine the transglucosylation activity using ascorbic acid and benzoic acid as substrate. SDS PAGE result showed that molecular weight of recombinant SPase between 45 and 66 kDa. SPase activity was measured by using sucrose as substrate, and the end product was measured as NADPH at 340 nm; this resulting relative activity 98.52% to standard SPase. Its transglucosylation activity using benzoic acid as substrate showed a product by performing TLC while as using ascorbic acid did not by performing TLC and HPLC.

Keywords : sucrosephosphorylase, enzymatic activity, transglycosylation, SDS PAGE, TLC, HPLC
xv + 92 pages : 33 pictures; 3 tables; 11 appendixes
Bibliography : 42 (1966-2011)

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----------|
| HALAMAN JUDUL..... | ii |
| SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME..... | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS..... | iv |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | v |
| KATA PENGANTAR..... | vi |
| HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS..... | viii |
| ABSTRAK..... | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| DAFTAR ISI..... | xi |
| DAFTAR GAMBAR..... | xiii |
| DAFTAR TABEL..... | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xv |
| 1. PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Tujuan Penelitian..... | 3 |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA..... | 4 |
| 2.1 Sukrosafosforilase..... | 4 |
| 2.2 Bakteri Penghasil Sukrosafosforilase..... | 5 |
| 2.3 <i>Escherichia coli</i> BL21 Star™..... | 6 |
| 2.4 Aktivitas Enzim..... | 7 |
| 2.5 Elektroforesis Gel Poliakrilamid..... | 9 |
| 2.6 Purifikasi Protein Rekombinan dengan Menggunakan Kromatografi Afinitas..... | 11 |
| 2.7 Pengukuran Konsentrasi Protein..... | 12 |
| 2.8 Analisis Aktivitas Sukrosafosforilase..... | 13 |
| 2.9 Asam Askorbat..... | 14 |
| 2.10Asam Benzoat..... | 16 |
| 2.11Kromatografi Lapis Tipis..... | 18 |
| 2.12Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)..... | 19 |
| 3. METODE PENELITIAN..... | 21 |
| 3.1 Lokasi Penelitian..... | 21 |
| 3.2 Alat..... | 21 |
| 3.3 Bahan..... | 22 |
| 3.4 Cara Kerja..... | 22 |
| 3.4.1 Medium dan Pembuatan Medium..... | 22 |
| 3.4.2 Pembuatan Larutan, Dapar, dan Pereaksi..... | 23 |
| 3.4.3 Pemiakan dan Peremajaan Kultur..... | 28 |
| 3.4.4 Pembuatan Inokulum..... | 28 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.4.5 | Pembuatan Kultur Cair dan Pemanenan Sel | 29 |
| 3.4.6 | Pemecahan Sel dan Perolehan Supernatan..... | 29 |
| 3.4.7 | Pemurnian Protein Rekombinan dengan Menggunakan Kolom Afinitas..... | 29 |
| 3.4.8 | Analisis Protein Rekombinan Sukrosafosforilase dengan Elektroforesis Gel Poliakrilamid..... | 31 |
| 3.4.9 | Pengukuran Konsentrasi Protein Sukrosafosforilase Rekombinan..... | 33 |
| 3.4.10 | Uji aktivitas Enzim Sukrosafosforilase Rekombinan | 34 |
| 3.4.11 | Analisis Produk Transglukosilasi Asam Askorbat dengan KLT | 35 |
| 3.4.12 | Analisis Produk Transglukosilasi Asam Askorbat dengan KCKT | 35 |
| 3.4.13 | Analisis Produk Transglukosilasi Asam Benzoat dengan KLT..... | 35 |
| 4. | HASIL DAN PEMBAHASAN | 36 |
| 4.1 | Pembiakan dan Peremajaan Kultur..... | 36 |
| 4.2 | Pembuatan Inokulum..... | 36 |
| 4.3 | Pembuatan Kultur Cair dan Pemanenan Sel..... | 37 |
| 4.4 | Pemecahan Sel dan Perolehan Supernatan | 38 |
| 4.5 | Pemurnian Protein Rekombinan dengan Menggunakan Kolom Afinitas | 39 |
| 4.6 | Elektroforesis Gel Poliakrilamid | 40 |
| 4.7 | Pengukuran Konsentrasi Protein Sukrosafosforilase Rekombinan..... | 42 |
| 4.8 | Uji Aktivitas Enzim Sukrosafosforilase Rekombinan..... | 44 |
| 4.9 | Analisis Produk Transglukosilasi Asam Askorbat dengan KLT..... | 47 |
| 4.10 | Analisis Produk Transglukosilasi Asam Askorbat dengan KCKT..... | 49 |
| 4.11 | Analisis Produk Transglukosilasi Asam Benzoat dengan KLT | 54 |
| 5. | KESIMPULAN DAN SARAN | 57 |
| | DAFTAR ACUAN..... | 58 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-------------|--|----|
| Gambar 2.1 | Struktur Asam Askorbat..... | 14 |
| Gambar 2.2 | Struktur 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA2G)..... | 15 |
| Gambar 2.3 | Struktur Asam Benzoat..... | 16 |
| Gambar 2.4 | Struktur Asam Benzoat Terglikosilasi..... | 17 |
| Gambar 3.1 | Skema SDS PAGE | 32 |
| Gambar 4.1 | Kultur <i>E.coli</i> BL-21 Star TM rekombinan pada medium agar LB yang mengandung 5 μ g/ml tetrasiklin..... | 36 |
| Gambar 4.2 | Hasi Inokulasi..... | 37 |
| Gambar 4.3 | <i>E. coli</i> BL-21 Star TM rekombinan pada medium cair LB yang mengandung 5 μ g/ml tetrasiklin..... | 38 |
| Gambar 4.4 | Pelet sel bakteri hasil pemanenan dengan cara sentrifugasi pada 4000 x g selama 15 menit..... | 38 |
| Gambar 4.5 | Gel SDS PAGE dengan Konsentrasi Gel Pemisah 15%..... | 41 |
| Gambar 4.6 | Gel SDS PAGE dengan Konsentrasi Gel Pemisah 10%..... | 41 |
| Gambar 4.7 | Kurva kalibrasi BSA diukur pada panjang gelombang 562 nm..... | 43 |
| Gambar 4.8 | Reaksi Assal Aktivitas Enzim SPase..... | 45 |
| Gambar 4.9 | Perbandingan serapan antara NADH,NADPH dengan NAD ⁺ , NADP ⁺ | 45 |
| Gambar 4.10 | Hubungan antara pH terhadap aktivitas relatif SPase rekombinan ... | 46 |
| Gambar 4.11 | Hubungan antara pH terhadap aktivitas relative SPase rekombinan.. | 46 |
| Gambar 4.12 | Hasil pemisahan asam askorbat dan AA2G menggunakan KLT | 48 |
| Gambar 4.13 | Hasil pemisahan asam askorbat, hasil reaksi, dan AA2G menggunakan KLT..... | 49 |
| Gambar 4.14 | Kromatogram asam askorbat 0,25% menggunakan KCKT | 50 |
| Gambar 4.15 | Kromatogram AA2G 0,1 M menggunakan KCKT | 50 |
| Gambar 4.16 | Kromatogram asam askorbat 0,5% dan sukrosa 30% dalam dapar HEPES 0,1 M menggunakan KCKT | 51 |
| Gambar 4.17 | Kromatogram asam askorbat 0,5%, AA2G 0,1 M, dan sukrosa 30% dalam dapar HEPES 0,1M menggunakan KCKT | 52 |
| Gambar 4.18 | Kromatogram hasil reaksi dengan sukrosafosforilase standar menggunakan KCKT | 52 |
| Gambar 4.19 | Kromatogram hasil reaksi dengan sukrosafosforilase rekombinan menggunakan KCKT..... | 53 |
| Gambar 4.20 | Hasil pemisahan asam benzoat, reaksi dengan sukrosafosforilase standar, dan reaksi dengan sukrosafosforilase rekombinan menggunakan KLT..... | 55 |
| Gambar 4.21 | Alat Elektroforesis..... | 62 |
| Gambar 4.22 | Mikrosentrifuse dengan pendingin..... | 62 |
| Gambar 4.23 | <i>Orbital Shaker Incubator</i> | 63 |
| Gambar 4.24 | Spektrofotometer GeneQuant [®] | 63 |
| Gambar 4.25 | Spektrofotometer UV-Vis | 64 |
| Gambar 4.26 | Sonikator pemecah sel..... | 64 |
| Gambar 4.27 | Proses purifikasi protein rekombinan menggunakan His Trap TM FF 1 ml..... | 65 |
| Gambar 4.28 | His Trap TM FF 1 ml | 65 |

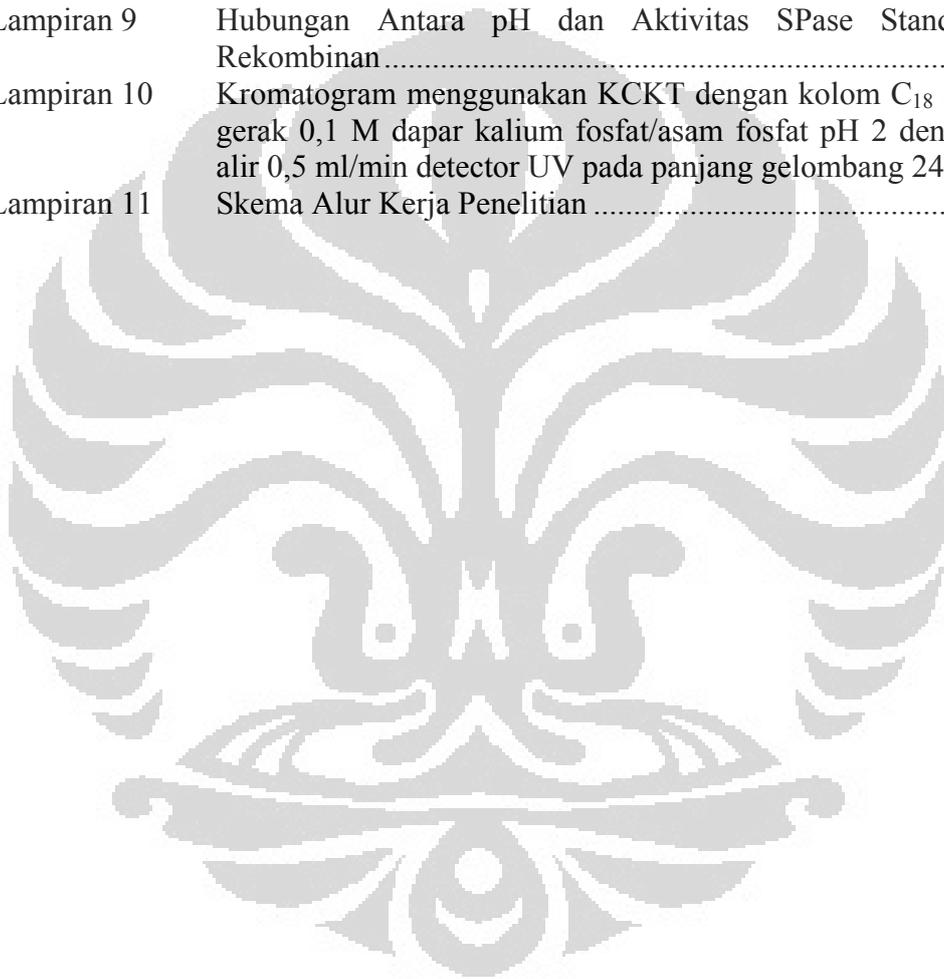
DAFTAR TABEL

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabel 3.1 | Konsentrasi Kurva Kalibrasi BSA Standar | 33 |
| Tabel 4.1 | Tabel Kurva Kalibrasi BSA diukur pada panjang gelombang 562 nm...43 | |
| Tabel 4.2 | Hubungan antara suhu dan pH terhadap aktivitas relatif SPase rekombinan..... | 46 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|-------------|--|----|
| Lampiran 1 | Gambar Alat-alat yang Digunakan Dilaboratorium | 62 |
| Lampiran 2 | Sertifikat Analisis Sukrosafosforilase standar | 66 |
| Lampiran 3 | Sertifikat Analisis Glukosa-6-fosfat dehidrogenase | 67 |
| Lampiran 4 | Sertifikat Analisis Glukosa-1,6-bifosfat | 68 |
| Lampiran 5 | Sertifikat Analisis NADP ⁺ | 69 |
| Lampiran 6 | Sertifikat Analisis Asam Askorbat | 70 |
| Lampiran 7 | Sertifikat Analisis AA2G..... | 71 |
| Lampiran 8 | Hubungan Antara Suhu dan Aktivitas SPase Standar dan Rekombinan..... | 72 |
| Lampiran 9 | Hubungan Antara pH dan Aktivitas SPase Standar dan Rekombinan..... | 73 |
| Lampiran 10 | Kromatogram menggunakan KCKT dengan kolom C ₁₈ dan fase gerak 0,1 M dapar kalium fosfat/asam fosfat pH 2 dengan laju alir 0,5 ml/min detector UV pada panjang gelombang 243 nm..... | 74 |
| Lampiran 11 | Skema Alur Kerja Penelitian | 82 |



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sukrosafosforilase (SPase) adalah suatu enzim yang mengkatalisis sejumlah reaksi pemindahan gugus glukosil misalnya reaksi yang mengkatalisis sukrosa menjadi α -D-glukosa-1-fosfat dengan adanya fosfat inorganik (Sylverstein R., Voet, J., Reed, D., & Abeles, R. H., 1966). Enzim ini merupakan bagian dari fosforilase dan termasuk ke dalam 13 kelas glikosil hidrolase (Henrissat, 1991). SPase dapat digunakan untuk penentuan fosfat inorganik dalam analisis klinik, untuk penentuan konsentrasi sukrosa dalam transport gula secara spesifik dan cepat, untuk metode aliran injeksi untuk menentukan konsentrasi sukrosa tanpa gangguan dari elektroda glukosa atau sukrosa. (Lee, J.-H., Yoon, S.-H., Nam, S.-H., Moon, Y.-H., Moon, Y.-Y., & Kim, D., 2006). SPase berpotensi untuk dimanfaatkan pada berbagai macam proses pada makanan, kesehatan, dan industri kosmetik, sebagai contoh, sebagai penghasil prekursor obat, sebagai pengubah senyawa aktif biologi, untuk meningkatkan karakteristik dan menambah kegunaannya (Kwon, Taeyeon., Kim, C. T., & Lee, J.-H., 2007; Nomura, Koji., Sugimoto, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al., 2008).

SPase telah dilakukan pemurnian dan karakterisasi dari beberapa organisme, yaitu sukrosafosforilase yang dihasilkan oleh *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus mutans*, dan *Pseudomonas saccharophila* (Takuro K., 1991; Henrissat, B., 1991). Telah dilaporkan isolasi enzim SPase dari bakteri hasil rekombinan dari berbagai strain *Escherichia coli* yang diekspresikan dari penyisipan plasmid penyandi SPase dari *Leuconostoc mesenteroides* (Kitao & Sekine, 1994).

SPase telah berhasil diisolasi dari bakteri rekombinan *E. coli* BL-21 StarTM. Bakteri *E. coli* BL-21 StarTM merupakan bakteri rekombinan yang telah disisipkan plasmid penyandi SPase asal *Leuconostoc mesenteroides* pAM_SpaseWRS3. SPase hasil ekspresi tersebut dilakukan pengujian aktivitas dan diperoleh hasil 50% dari aktivitas SPase standar dengan metode Sylverstein (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011).

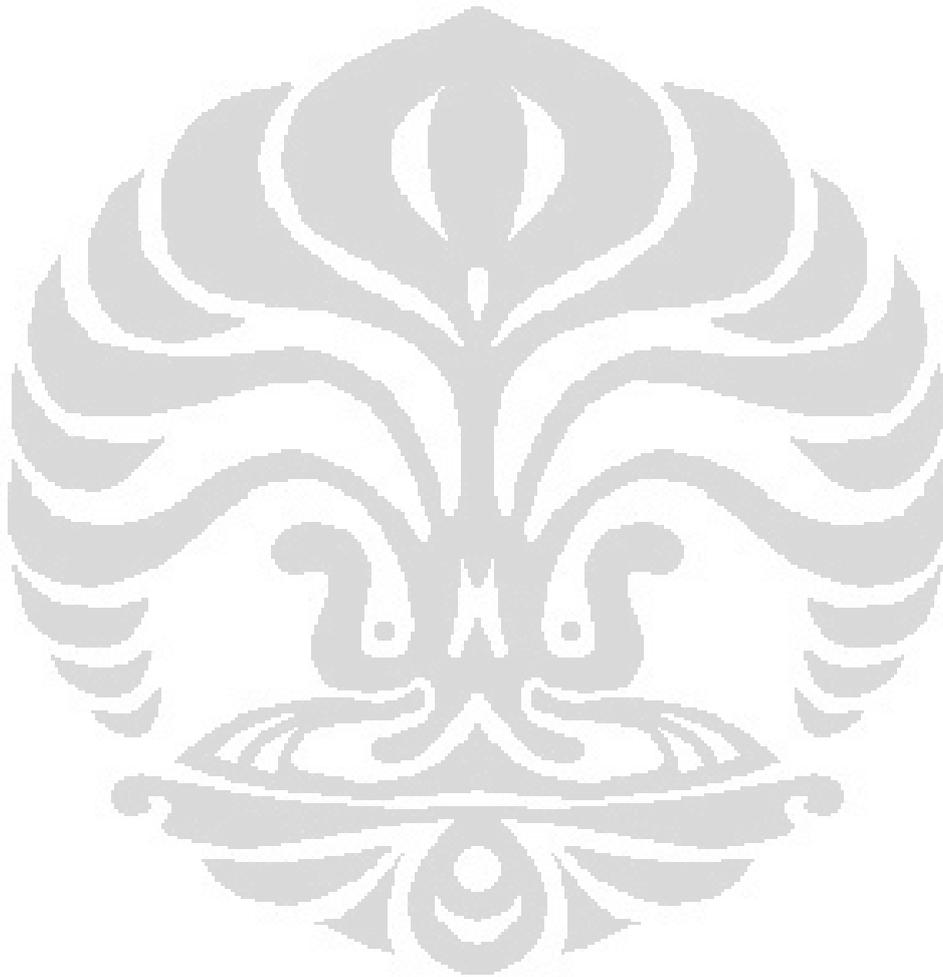
Berbagai macam SPase rekombinan telah dipelajari untuk aktivitas transglukosilasi. Transglukosilasi adalah metode penting dalam modifikasi struktur senyawa bioaktif. Transglukosilasi dapat digunakan untuk membuat senyawa tidak larut air menjadi senyawa larut air (Sugimoto, K., Nomura, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al., 2007). Transglukosilasi diketahui dapat meningkatkan karakteristik dari bahan makanan, seperti meningkatkan kelarutan rutin, mengurangi rasa pahit neohesperidin, dan mengurangi kepedasan kapsaisin (Nomura, Koji., Sugimoto, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al., 2008).

Asam askorbat merupakan mikronutrien esensial atau kofaktor yang diperlukan pada beberapa fungsi biologi dan biokimia. Asam askorbat memiliki banyak kegunaan yang menguntungkan, misalnya sebagai antioksidan yang digunakan pada beberapa makanan untuk mengatur kualitas rasa serta dapat melindungi komponen dari oksidasi (Kwon, Taeyeon., Kim, C. T., & Lee, J.-H., 2007). Asam askorbat memiliki banyak keuntungan yang dapat digunakan, namun terdapat kekurangan, yaitu tidak stabil karena mudah teroksidasi sehingga dibuat produk asam askorbat yang lebih stabil. Modifikasi dilakukan dengan cara transglukosilasi SPase rekombinan terhadap asam askorbat sehingga menghasilkan produk yang lebih stabil, yaitu 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (Kwon, Taeyeon., Kim, C. T., & Lee, J.-H., 2007).

Asam benzoat biasa digunakan sebagai pengawet baik dalam makanan maupun kosmetik. Asam benzoat memiliki kelarutan yang kurang baik terutama pada pH yang rendah. Kekurangan ini yang melatarbelakangi dilakukan penelitian untuk meningkatkan karakteristik dari senyawa tersebut agar dapat lebih berguna baik pada makanan dan bahan kosmetik. Modifikasi dilakukan terhadap asam benzoat dengan cara transglukosilasi SPase rekombinan sehingga diperoleh turunan asam benzoat dengan karakteristik yang lebih baik yaitu asam benzoat glukosida (Sugimoto, K., Nomura, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al., 2007).

1.2 Tujuan

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



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sukrosafosforilase

Sukrosafosforilase (SPase) adalah suatu enzim yang mengkatalisis sejumlah reaksi pemindahan gugus glukosil misalnya reaksi yang mengkatalisis sukrosa menjadi α -D-glukosa-1-fosfat dengan adanya fosfat inorganik (Sylverstein R., Voet, J., Reed, D., & Abeles, R. H., 1966). 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 (Satoshi K. & H. Sekine, 1992; Satoshi K. & H. Sekine, 1994).

SPase adalah anggota dari kelas fosforilase yang merupakan anggota 13 dari *glycosyl hydrolase*. Enzim tipe ini secara reversibel dapat mengkatalisis reaksi fosforilasi dari sukrosa menjadi α -D-glukosa-1-fosfat dan D fruktosa (Sylverstein R., Voet, J., Reed, D., & Abeles, R. H., 1966). Sejauh ini SPase yang telah dimurnikan dan dikarakterisasi hanyalah SPase yang dihasilkan oleh *Pseudomonas saccharophila*, *Leuconostoc mesenteroides*, dan *Streptococcus mutans* (Koga T., K Nakamura, Y. Shirokane, K. Mizusawa, S. Kitao, M. Kikuchi., 1991).

Mekanisme SPase dalam mengkonversi sukrosa menjadi D-fruktosa dan α -D-glukosa-1-fosfat telah banyak dipelajari. Dalam reaksi konversi sukrosa menjadi D-fruktosa dan α -D glukosa-1-fosfat, sukrosa terlebih dahulu berikatan dengan sisi aktif enzim dan melepaskan D-fruktosa. Gugus glukosa masih terikat dengan enzim membentuk kompleks glukosa-enzim (*glucose-enzyme complex*) dengan ikatan beta antara atom oksigen dari gugus karboksil residu aspartat dengan atom C-1 dari glukosa. Reaksi tahap akhir adalah pemecahan ikatan glikosida menghasilkan α -D-glukosa-1-fosfat (Voet, J.G., & R.H. Abeles, 1970; Mirza, O., Skov, L. K., M, L. A., Broek, V. D., & Beldman, G., 2006).

SPase tersusun atas empat domain yang disebut domain A, B, B', dan C. Domain A, B', dan C terdapat sebagai dimer disekeliling sisi aktif enzim (Sprogøe, D., Van Den Broek, L., Mirza, O., Kastrup, J., Voragen, A., Gajhede, M., et al., 2004). Ukuran SPase adalah 55 kDa yang terdiri dari 488 asam amino

(Koga T., K Nakamura, Y. Shirokane, K. Mizusawa, S. Kitao, M. Kikuchi., 1991).

SPase dapat berasal dari mikroba, yaitu dari bakteri-bakteri tertentu. Contoh bakteri yang mengandung sukrosafosforilase adalah *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc citreum*. SPase dari bakteri tersebut biasa di masukkan ke dalam bakteri rekombinan yang akan membawa enzim penyandi tersebut. Bakteri rekombinan yang sering digunakan adalah *Escherichia coli* (Malik, A. et al Malik, A., Ishikawa, S., Sahlan, M., Ogasawara, N., Ngunyen, U. Q., & Suryadi, H., 2011).

2.2 Bakteri Penghasil Sukrosafosforilase

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

Spesies bakteri yang secara alami menghasilkan SPase, antara lain *Pseudomonas putrefasciens*, *Pseudomonas saccharophila*, *Clostridium pasteurianum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Streptococcus mutans*, dan *Agrobacterium vitis* (Kitao & Sekine, 1994; Broek, Boxtel, Kievit, Verhoef, Beldman & Voragen, 2004; Shin, Jung, Lee, Kim, 2008). Penelitian terakhir melaporkan bahwa gen penyandi SPase dapat diekspresikan pada bakteri rekombinan, diantaranya adalah beberapa gen penyandi Spase diklon dari berbagai macam strain *Leuconostoc mesenteroides*, yaitu gen klon (727sp) dari strain NRRL B-742 yang menghasilkan protein 742SPase (55,3 kDa) (Lee, J.-H., Moon, Y.-H., Kim, N., Kim, Y.-M., Kang, H.-K., Jung, J.-Y., et al., 2008), gen klon 1355SPase dari strain B-1355 yang menghasilkan protein 1355SPase (56,6 kDa), dan gen klon

spWRS-3(1) dari strain MBFWRS-3(1) yang menghasilkan *SPaseWRS-3(1)* (57 kDa) (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Ngunyen, & Suryadi, 2011). Kloning gen Spase juga dilaporkan dapat dihasilkan dari organisme lain, diantaranya adalah gen penyandi Spase *splP* dan *splR* dari *Bifidobacterium longum* SJ32 yang menghasilkan protein Spase 56 kDa (Kim, M., Kwon, T., Lee, H. J., Kim, K. H., Chung, D. K., Ji, G. E., et al., 2003), gen klon *SucP* penyandi Spase 56,189 kDa dari *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083 (Shin, Jung, Lee, Kim, & Kim, 2008), dan gen klon *supE* dari *Stertococcus mutans* (Nomura, Koji., Sugimoto, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al., 2008).

Berbagai macam metode dan strategi kloning untuk menghasilkan bakteri rekombinan telah dilakukan oleh banyak peneliti, dan yang terbaru adalah kloning Spase dari *Leuconostoc mesenteroides* MBWRS-3(1), yang menghasilkan SPase WRS-3(1) 57 kDa (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Ngunyen, & Suryadi, 2011). Pada penelitian tersebut dilakukan kloning 1476-bp gen *spWRS-3(1)* fragmen dari *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3(1), yang kemudian diekspresikan oleh dua jenis *host*, yaitu *Escherichia coli* DH5 α dan *Escherichia coli* BL21 StarTM. Strategi mengekspresikannya ialah dengan mengisolasi DNA genom dari sumber organisme asalnya yaitu *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3(1), yang kemudian dilakukan amplifikasi konstruksi dengan metode PCR yang menggunakan system pDONR201 hingga menjadi fragmen *spWRS-3(1)*. Fragmen gen tersebut didesain sehingga sesuai dengan vektor tujuan, yaitu pO-GW. Selanjutnya fragmen *spWRS-3(1)* dan vektor pO-GW diligasi dengan enzim LR-clonase[®] menjadi pAM_SpaseWRS-3(1), yang kemudian ditransformasikan dengan metode *heat shock* ke dalam organisme *Escherichia coli* DH5 α dan *Escherichia coli* BL21 StarTM.

2.3 *Escherichia coli* BL21 StarTM

Dalam teknologi DNA rekombinan, tahap yang paling penting adalah transfer molekul DNA rekombinan ke dalam sel hospes. Beberapa spesies bakteri yang sering digunakan dalam industri bioteknologi antara lain adalah *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (Radji, M., 2011). *Escherichia*

coli merupakan salah satu sel hospes yang paling sering digunakan karena paling banyak dipelajari dan menghasilkan ekspresi protein rekombinan yang baik, biasanya dengan aktivitas transkripsi bakteriofage T7 RNA polimerase.

E. coli BL21 StarTM didisain untuk *strain* yang berisi λ DE3 lisogen yang membawa gen T7 RNA polimerase diatur oleh *lacUV5*. IPTG digunakan untuk menginduksi ekspresi T7 RNA polimerase. *Strain* pada *E. coli* BL21 StarTM membawa mutasi gen *rne* (*rne131*) yang mengkodekan enzim RNase E. Mutasi *rne131* bertujuan untuk meningkatkan kemampuan ekspresi dari tiap *strain*.

2.4 Aktivitas Enzim

Reaksi katalisis enzimatik sangat penting dalam sistem kehidupan. Dibawah kondisi biologis, reaksi-reaksi yang tidak dikatalisis oleh enzim berlangsung sangat lambat (sebagian besar molekul biologis sangat stabil pada pH netral, temperatur sedang, dan lingkungan air dalam sel). Reaksi-reaksi yang diperlukan dalam proses pencernaan makanan, pengiriman sinyal saraf, atau kontraksi otot adalah contoh-contoh reaksi yang hampir tidak mungkin terjadi tanpa adanya katalis (Nelson, D.L., 2005). Enzim merupakan katalisator biologis yang berfungsi untuk megubah substrat menjadi produk dengan tingkat energi aktivasi yang lebih rendah (Mikkelsen, S.R., 2004).

Enzim merupakan katalis yang sangat selektif karena satu jenis enzim hanya mengakatalisis satu tipe reaksi untuk satu jenis substrat (Murray R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell., 2003). Enzim dapat berupa suatu protein atau glikoprotein dan mengandung sekurang-kurangnya satu gugus polipeptida. Area pada enzim yang secara langsung berhubungan dengan proses katalisis dinamakan *active site*. Gugus protein atau glikoprotein pada enzim dinamakan apoenzim, sedangkan gugus nonprotein dianamakan gugus prostetik. Kombinasi dari apoenzim dengan gugus prostetik dinamakan holoenzim (Mikkelsen, S.R., 2004).

2.4.1 Temperatur

Kenaikan temperatur secara umum meningkatkan kecepatan reaksi baik reaksi yang dikatalis maupun reaksi yang tidak dikatalis. Kenaikan temperatur dapat meningkatkan kecepatan reaksi karena meningkatkan energi kinetik dan memperbanyak frekuensi tumbukan molekuler.

Dalam hal reaksi yang dikatalisis oleh enzim, peningkatan suhu dapat meningkatkan kecepatan reaksi, namun pada suatu titik dimana temperatur merusak ikatan nonkovalen dalam struktur enzim sehingga enzim tidak mampu mempertahankan struktur tiga dimensinya (denaturasi) maka enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya. Dengan demikian peningkatan suhu justru dapat menurunkan kecepatan reaksi. Oleh sebab itu, agar reaksi katalisis oleh enzim berlangsung dengan optimal, maka suhu harus dipertahankan pada suhu optimum dimana enzim akan bekerja. Enzim pada manusia umumnya masih menunjukkan stabilitas pada suhu 45°– 55° C.

2.4.2 Konsentrasi Substrat

Suatu enzim memiliki kekhasan yaitu hanya bekerja pada satu reaksi saja. Untuk dapat bekerja terhadap suatu zat atau substrat harus ada hubungan antara enzim dengan substrat. Secara umum, peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan kecepatan reaksi. Semakin banyak substrat yang tersedia, maka akan semakin banyak pula substrat yang terikat pada *active site* enzim sehingga reaksi akan berlangsung lebih cepat (Murray R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell., 2003).

Pada konsentrasi tertentu, peningkatan konsentrasi substrat tidak akan meningkatkan kecepatan reaksi. Dalam kondisi seperti ini, enzim dikatakan telah mengalami kejenuhan. Hal ini disebabkan karena tidak ada lagi enzim yang dapat mengikat substrat karena jumlah substrat yang lebih banyak daripada jumlah enzim sehingga peningkatan jumlah substrat tidak dapat lagi meningkatkan kecepatan reaksi (Murray R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell., 2003).

2.4.3 pH

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif, atau ion bermuatan ganda. Perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat (Poedjiadi, A., 1994). Disamping pengaruh terhadap struktur ion pada enzim, pH rendah atau pH tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim (Poedjiadi, A., 1994).

Sebagian besar, kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim menunjukkan ketergantungan yang signifikan dengan konsentrasi ion hidrogen. Sebagian besar enzim intraselular menunjukkan aktivitas yang optimal pada pH antara 5 dan 9. Keterkaitan antara aktivitas enzim dengan konsentrasi ion hidrogen disebabkan karena terjadinya proses denaturasi enzim pada pH yang terlalu rendah atau terlalu tinggi. Sebagian besar gugus bermuatan negatif pada enzim adalah gugus karboksilat, sedangkan gugus bermuatan positif adalah amin yang terprotonasi sehingga perubahan keseimbangan ion hidrogen akan mempengaruhi gugus-gugus bermuatan dan secara tidak langsung akan mempengaruhi ikatan substrat pada enzim (Murray R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell., 2003).

2.5 Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan molekul yang menggunakan medan listrik sebagai penggerak molekul dan matriks penyangga berpori. Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang Bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk, dan ukuran.

Elektroforesis untuk makromolekul memerlukan matriks penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang digunakan. Gel poliakrilamid merupakan matriks penyangga yang banyak di pakai untuk pemisahan protein .

Gel poliakrilamid dibentuk dari polimerisasi antara akrilamid dan bis akrilamid dimana reaksi polimerisasinya dikatalis oleh APS dan TEMED. Polimer

yang terbentuk menyebabkan gel berpori-pori. Konsentrasi polimerisasinya bergantung dari komposisi campuran akrilamid dan bis akrilamid dalam pelarut air. Konsentrasi akrilamid dan bis akrilamid yang rendah menghasilkan ukuran pori-pori yang besar sehingga baik untuk melakukan pemisahan protein dengan berat molekul yang relatif besar, sedangkan konsentrasi akrilamid dan bis akrilamid yang tinggi menghasilkan ukuran pori-pori yang lebih kecil sehingga baik untuk melakukan pemisahan protein dengan berat molekul yang relatif kecil (Boyer, R., 2000).

Prinsip pemisahan menggunakan filtrasi gel poliakrilamid adalah pemisahan berdasarkan ukuran molekul. Keunggulan dari teknik elektroforesis gel poliakrilamid adalah dapat memperkirakan ukuran protein dengan membandingkan dengan penanda protein (Boyer, R., 2000). Semakin rendah berat molekul, maka semakin jauh protein bergerak dari sumuran, dengan kata lain mobilitas tinggi. Sebaliknya, protein dengan berat molekul lebih besar akan bergerak pada jarak yang lebih pendek dari sumuran, dengan kata lain mobilitas rendah.

Berdasarkan preparasi sampel, elektroforesis dibagi dua, yaitu *native* atau nondenaturing atau *non-dissosiation* PAGE, dan denaturing atau disosiasi atau SDS-PAGE (Fatchiyah, 2011). Berat molekul dari protein dapat diestimasi dengan teknik denaturing elektroforesis atau SDS-PAGE. Adanya deterjen *sodium dodecyl sulphate* (SDS) dan agen pereduksi ikatan disulfida, merkaptotanol, dapat mendenaturasi protein. Ketika protein dipaparkan dengan SDS, deterjen ini akan merusak struktur sekunder, tersier, dan kuartener dari protein dan menghasilkan rantai polipeptida linear yang terselubungi oleh muatan negatif dari molekul SDS. Adanya merkaptotanol akan membantu proses denaturasi protein dengan cara mereduksi ikatan disulfida. Muatan negatif yang terjadi akibat terselubungnya protein dengan SDS akan menghasilkan mobilitas elektroforetik dalam medan listrik sehingga molekul protein akan memisah semata-mata berdasarkan berat molekulnya saja (Boyer, R., 2000).

Protein tidak akan terlihat pada kondisi tidak diwarnai karena protein dalam sampel tidak berwarna. Salah satu zat pewarna yang umum digunakan

untuk mewarnai pita-pita protein yang diperoleh sebagai hasil elektroforesis adalah Coomassie *Brilliant Blue*. Coomassie *Brilliant Blue* dapat mendeteksi 1-10 gram protein dalam suatu pita. Sebagian besar strukturnya berupa gugus non-polar sehingga biasanya digunakan dalam larutan metanol dan asam asetat. Protein yang tidak berwarna akan menjadi berwarna biru karena mengikat Coomassie *Brilliant Blue*. Kelebihan pewarna yang terkumpul di dalam gel dapat dihilangkan dengan aquadest atau dengan campuran metanol dan asam asetat. Protein akan terdeteksi sebagai pita berwarna biru dengan latar belakang jernih (Boyer, R., 2000).

2.6 Purifikasi Protein Rekombinan dengan Menggunakan Kromatografi

Afinitas

Kromatografi afinitas atau seringkali dikenal dengan nama *Immobilized Metalchelate Affinity Chromatography* (IMAC) merupakan salah satu cara yang cukup baik untuk memurnikan protein. Teknik ini didasarkan pada sifat beberapa asam amino misalnya histidin, triptofan, tirosin, atau 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 (Walsh, G., 2007).

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).

Molekul-molekul protein yang tidak terikat pada ligan dapat dihilangkan dengan mencuci kolom menggunakan dapan yang sesuai sedangkan protein yang terikat pada ligan dapat dilepaskan ikatannya dengan mengubah komposisi dapan yang mengandung senyawa lain yang dapat berkompetisi dengan protein dalam hal mengikat ligan misalnya imidazol sehingga ikatan antara protein dengan ligan dapat dilepaskan (Walsh, G., 2007).

Kromatografi afinitas memiliki banyak keuntungan jika dibandingkan dengan jenis kromatografi yang lain. Spesifisitas dan selektifitasnya tidak dapat disamai oleh teknik kromatografi yang lain terutama karena sifat *biospecific*

affinity-nya. Kemurnian yang diperoleh dapat mencapai hampir 100 persen (Walsh, G., 2007).

2.7 Pengukuran Konsentrasi Protein

Protein dapat diukur secara kuantitatif dengan menggunakan beberapa metode diantaranya adalah metode spektroskopi, metode biuret, dan metode *dye-binding* (Holme, D.J., & Hazel Peck, 1998).

Metode spektroskopi didasarkan pada serapan yang dihasilkan oleh residu asam amino yang mengandung gugus aromatik, misalnya triptofan, pada panjang gelombang 280 nm. Namun metode ini tidak secara kuantitatif mengukur konsentrasi protein karena adanya variasi asam amino yang ada dalam struktur protein. Nilai yang dihasilkan hanyalah nilai pendekatan saja (Holme, D.J., & Hazel Peck, 1998).

Metode biuret dapat mendeteksi ikatan peptida yang didasarkan pada reaksi antara ion tembaga dengan gugus amin dari protein. Ion tembaga akan membentuk ikatan kompleks koordinasi dengan empat gugus $-NH$ pada residu asam amino menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 330 dan 545 nm (Holme, D.J., & Hazel Peck, 1998).

Metode *dye-binding* didasarkan pada reaksi antara zat pewarna protein yang dapat menyebabkan munculnya serapan yang dapat diukur dengan spektrofotometer. Metode Bradford adalah salah satu metode *dye-binding* yang sering digunakan untuk mengukur konsentrasi protein berdasarkan serapan yang dihasilkan ketika protein berikatan dengan zat warna. Metode ini sering digunakan karena tidak membutuhkan waktu yang lama dan memiliki sensitifitas yang cukup tinggi. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 595 nm (Holme, D.J., & Hazel Peck, 1998; Bradford, M., 1976). Uji Bradford sensitif terhadap sekitar 5-200 μ g protein, tergantung pada kualitas pewarna (Bintang, M., 2010).

Metode *bicinchoninic acid* (BCA) adalah salah satu metode pengukuran konsentrasi protein yang diukur menggunakan teknik kolorimetri. Metode BCA memiliki beberapa keuntungan, yaitu sensitif, sederhana, stabil terhadap kromofor

dan variasi antar protein rendah. Metode ini melibatkan reduksi Cu^{2+} menjadi Cu^+ dengan adanya protein (Schoel, Bernd., Manuela Welzel, Stefan Kaufmann, 1995). Reduksi Cu^{2+} menjadi Cu^+ ditandai dengan terbentuknya warna ungu yang akan diukur pada panjang gelombang 562 nm (Bainor, Anthony, 2010).

2.8 Analisis Aktivitas Sukrosafosforilase

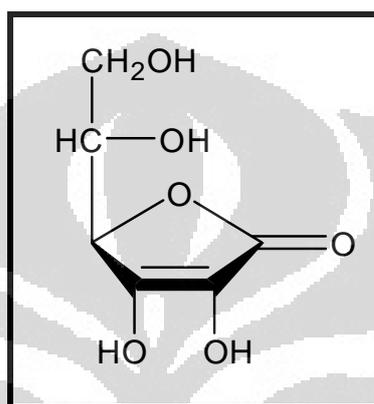
Beberapa reaksi enzimatik dapat diukur secara langsung baik dengan mengukur penurunan jumlah substrat maupun dengan mengukur kenaikan jumlah produk dengan menggunakan suatu metode tertentu. Meskipun demikian banyak reaksi enzimatik yang menghasilkan produk atau spesi yang tidak dapat diukur. Dalam kondisi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

Dalam metode spektrofotometri, senyawa yang dapat diukur adalah senyawa yang memiliki warna atau yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi (gugus kromofor) yang dapat memberikan serapan baik pada daerah UV maupun visible sehingga senyawa-senyawa yang tidak memiliki gugus kromofor atau warna tidak dapat diukur menggunakan metode spektrofotometri salah satu contohnya adalah glukosa-1-fosfat dari substrat sukrosa yang merupakan produk reaksi katalisis dengan enzim sukrosafosforilase. Oleh karena itu agar reaksi enzimatik SPase 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).

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. Peningkatan jumlah NADPH berbanding lurus dengan peningkatan aktivitas sukrosafosforilase. Satu unit aktivitas Spase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan tereduksinya 1 μmol

NADP⁺ menjadi NADPH per menit pada kondisi analisis. Koefisien daya serap molar untuk NADPH adalah $6.22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Sylverstein R., Voet, J., Reed, D., & Abeles, R. H., 1966; Lee, J.-H., Yoon, S.-H., Nam, S.-H., Moon, Y.-H., Moon, Y.-Y., & Kim, D., 2006; *Sucrose Phosphorylase*, n.d.).

2.9 Asam Askorbat



[Sumber : Windholz, M., Budavari, S., Stroumtsos, L. Y., Fertig, M.N., 1976]

Gambar 2.1 Struktur Asam Askorbat

2.9.1 Sifat Fisiko Kimia

Asam askorbat adalah senyawa dengan enam atom karbon. Asam askorbat termasuk ke dalam vitamin yang larut air. Asam askorbat memiliki karakteristik antara lain serbuk hablur putih atau hampir putih, atau kristal tak berwarna, mudah larut air, larut dalam alkohol, praktis tidak larut dalam eter, tidak larut dalam kloroform, dan benzen. Struktur asam askorbat disajikan pada gambar 2.1.

2.9.2 Stabilitas Asam askorbat

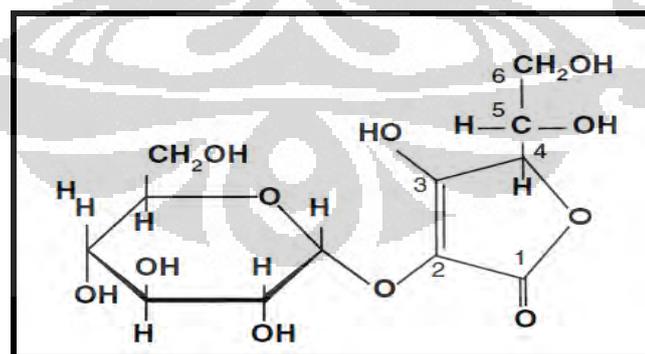
Larutan asam askorbat dalam air akan teroksidasi dengan cepat membentuk asam dehidroaskorbat (reaksi reversibel). Asam dehidroaskorbat dalam larutan bersifat netral dan dengan adanya agen pereduksi seperti hidrogen sulfida atau homosistein akan tereduksi kembali menjadi asam askorbat. Reaksi oksidasi yang terjadi, dipengaruhi oleh pH dan konsentrasi oksigen. Reaksi ini dikatalisasi oleh ion logam, terutama Cu^{2+} dan ion Fe^{2+} . Asam dehidroaskorbat

dapat mengalami reaksi hidrolisis (irreversibel) membentuk asam diketoglutamat dan asam oksalat, yang tidak memiliki aktivitas antiskorbut. Reaksi ini terjadi di atas pH 7. Degradasi asam askorbat juga dapat terjadi pada keadaan anaerob, membentuk furfural dan karbondioksida.

2.9.3 Fungsi Asam Askorbat

Asam askorbat berfungsi dalam pencegahan dan penyembuhan skorbut. Sebagai salah satu substituen dalam reaksi hidrolasi, asam askorbat diperlukan untuk sintesis kolagen pada jaringan ikat. Beberapa jaringan yang memiliki kandungan kolagen tinggi seperti kulit, membran mukosa, gigi, dan tulang membutuhkan asupan asam askorbat dari makanan, karena asam askorbat tidak disintesis oleh tubuh. Asam askorbat merupakan antioksidan yang kuat, sehingga dapat membantu mengurangi pembentukan radikal bebas. Asam askorbat juga berperan dalam penyembuhan penyakit flu. Asam askorbat membantu mengurangi durasi flu dan mengurangi gejala flu. Dalam banyak formulasi kosmetik, asam askorbat digunakan sebagai pH *adjuster* dengan konsentrasi 0,3%-0,6%.

2.9.4 Asam Askorbat Terglikosilasi



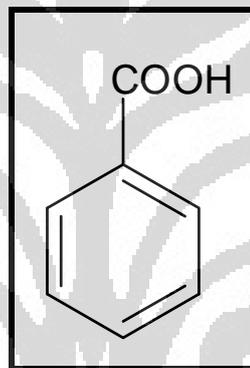
[Sumber : Taeyeon Kwon, Cheong Tae Kim, & Jong-Hoon Lee, 2007]

Gambar 2.2 Struktur 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G)

Asam askorbat terglukosilasi atau yang dikenal dengan asam askorbat 2-glukosida (AA-2G) merupakan salah satu turunan dari asam askorbat. Struktur

AA-2G disajikan pada gambar 2.2. Asam askorbat 2-glukosida stabil secara *in vitro*. Kestabilan turunan asam askorbat ini digunakan sebagai salah satu bahan untuk produk perawatan kulit dan dapat digunakan sebagai tambahan pada produk kosmetik komersial (Kwon, Taeyeon., Kim, C. T., & Lee, J.-H., 2007). Hasil enzimatis AA-2G lebih dapat diaplikasikan dibandingkan turunan asam askorbat dari hasil sintesis secara kimia karena langkah reaksi yang lebih sederhana dan harga produksi yang cukup rendah (Zhang, Z., Li, J., Liu, L., Sun, J., Hua, Z., Du, G., et al., 2011).

2.10 Asam Benzoat



[Sumber : Windholz, M., Budavari, S., Stroumtsos, L. Y., Fertig, M.N., 1976]

Gambar 2.3 Struktur Asam Benzoat

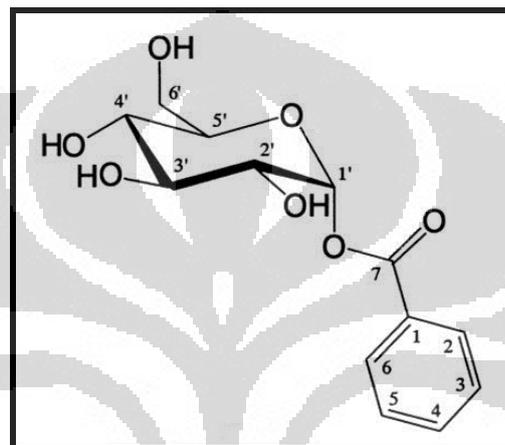
2.10.1 Sifat Fisiko Kimia

Asam benzoat adalah senyawa golongan karboksilat. Asam benzoat memiliki karakteristik antara lain serbuk hablur halus dan ringan, tidak berwarna, dan tidak berbau. Asam benzoat larut dalam lebih kurang 350 bagian air, dalam lebih kurang 3 bagian etanol, dalam 8 bagian kloroform, dan dalam 3 bagian eter. Struktur asam benzoat disajikan pada gambar 2.3.

2.10.2 Fungsi dan Stabilitas Asam Benzoat

Asam benzoat berfungsi sebagai pengawet baik dalam makanan maupun kosmetik. Asam benzoat memiliki kekurangan sifat fisikokimia yaitu sukar larut dalam air sehingga dilakukan modifikasi untuk memperbaiki kekurangan ini.

2.10.3 Asam Benzoat Terglikosilasi



[Sumber : Sugimoto, et. al., 2007]

Gambar 2.4 Struktur Asam Benzoat Terglikosilasi

Asam benzoat terglukosilasi atau benzoil glukosida merupakan salah satu turunan dari asam benzoat. Asam benzoat memiliki tiga turunan glikosil hasil reaksi antara asam benzoat sebagai molekul akseptor dan sukrosa sebagai molekul donor, yaitu 1-O-benzoyl α -D-glucopyranoside, 2-O-benzoyl α -D-glucopyranose, dan 2-O-benzoyl β -D-glucopyranose. 1-O-benzoyl α -D-glucopyranoside merupakan hasil reaksi transglukosilasi dari enzim, sedangkan 2-O-benzoyl α -D-glucopyranose, dan 2-O-benzoyl β -D-glucopyranose merupakan turunan dari 1-O-benzoyl α -D-glucopyranoside (Sugimoto, K., Nomura, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al., 2007). Struktur asam benzoat terglukosilasi disajikan pada gambar 2.4.

2.11 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut di antara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi, atau gabungannya. Komponen-komponen yang terpisahkan pada metode ini diidentifikasi berdasarkan nilai Rf (Retardation Factor) pengamatannya. Nilai Rf merupakan karakteristik komponen khusus, didefinisikan oleh hubungan:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh pusat bercak sampel}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Komponen dalam campuran yang akan dipisahkan dan mudah larut dalam fase gerak akan memiliki nilai Rf mendekati atau sama dengan satu. Sebaliknya jika komponen dalam campuran kelarutannya dalam fase gerak lebih rendah akan memiliki nilai Rf mendekati nol.

Nilai Rf merupakan harga yang konsisten dalam suatu percobaan kromatografi. Akan tetapi pada percobaan menggunakan kromatografi lapis tipis sulit diperoleh harga Rf yang sama pada setiap waktu. Hal ini dipengaruhi oleh kondisi percobaan, yakni: temperatur, ukuran spot, lapisan tipis yang digunakan sifat adsorben, aktivitas adsorben, fase gerak yang digunakan, kejenuhan bejana kromatografi, waktu perambatan dan sebagainya.

Kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk mengetahui kemurnian suatu zat secara sederhana, mengusahakan pemisahan dan identifikasi komponen senyawa tertentu dalam suatu campuran, memperoleh analisis kuantitatif terhadap satu atau lebih komponen senyawa yang ada. Kelebihan kromatografi lapis tipis yakni memerlukan biaya yang relatif lebih sedikit dan prosesnya sederhana memerlukan lebih sedikit pelarut pada pemisahan spesifik, polaritas pelarut atau jenis campuran pelarut dapat diubah berdasarkan percobaan, mudah untuk mengubah fase gerak, waktu untuk pengembangan dengan eluen cukup singkat, merupakan metode kromatografi yang paling mudah pengaturannya untuk komponen senyawa spesifik, sejumlah sampel dapat ditangani dalam waktu

bersamaan, fase gerak dapat diupayakan sebelum deteksi dilakukan sehingga tidak mengganggu determinasi posisi bercak larutan, tidak memerlukan kemurnian sampel yang sama seperti yang dilakukan dalam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Ketidakmurnian sampel mula-mula dapat dipindahkan oleh fase gerak atau dapat tertinggal pada bercak awal sehingga tidak mempengaruhi hasil akhir analisis. Jadi, metode purifikasi untuk analisis dengan kromatografi lapis tipis sederhana.

Kromatografi lapis tipis juga memiliki kekurangan yakni keterulangan yang buruk bila analisis dilakukan pada lempeng yang berbeda. Hal ini disebabkan adanya kesulitan untuk membuat lempeng yang terulangan, bahkan dalam satu pabrik sekalipun. Perbedaan keterulangan ini dapat disebabkan variasi dari ukuran partikel ataupun ketebalan lempeng.

2.12 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

KCKT memiliki kecepatan dan sensitivitas yang lebih baik dari kromatografi lainnya dan digunakan untuk pengujian semua jenis molekul biologi atau dalam teknik pemurnian. Komponen utama yang perlu diperhatikan dalam sistem KCKT adalah injektor, kolom, dan detektor. Cara memasukkan sampel ke dalam kolom KCKT merupakan faktor penting untuk mencapai pemisahan yang sempurna. Terdapat dua metode yang umum digunakan untuk memasukkan sampel yang benar ke dalam kolom KCKT, yaitu (1) metode yang menggunakan *microsyringe* untuk memasukkan sampel, baik secara langsung ke dalam kolom atau melalui tutup sumbatan kecil dari bahan lebam di atas kolom. Injeksi ini dapat dilakukan pada sistem yang sedang berjalan, atau pompa dimatikan dulu dan kemudian tekanan menurun sampai tekanan atmosfer, baru kemudian sampel diinjeksikan dan pompa dinyalakan kembali, sehingga disebut injeksi pada saat aliran dihentikan; (2) metode pada saat tekanan kolom dipertahankan, dengan menggunakan sebuah injektor melingkar. Injektor ini terbuat dari logam dengan volume kecil tertentu yang dapat diisi dengan sampel (Bintang, M., 2010).

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom yang ada telah tersedia dalam berbagai macam ukuran. Kolom dibuat dari bahan

yang kokoh seperti stainless steel atau campuran logam dengan gelas untuk menahan tekanan tinggi. Penghubung dan sambungan harus dirancang tanpa ada ruang kosong. Isi kolom dijaga oleh penahan yang ada di ujung-ujung kolom.

Kolom standar mempunyai diameter dalam antara 4-5 mm. Isi kolom harus berukuran homogen dan stabil secara mekanik. Diameter partikel berkisar antara 4-7 μm . Panjang kolom standar berkisar antara 10-30 cm. Bila kecepatan analisis merupakan pertimbangan utama, misalnya pada pekerjaan kontrol kualitas, kolom pendek (3-6 cm) akan sangat membantu. Kolom dengan diameter dalam yang kecil (2 mm) dibandingkan dengan kolom standar pada kondisi isokratik akan menghasilkan waktu analisis yang sama (Harmita, 2006).

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya. Idealnya, suatu detektor yang baik mempunyai sifat sebagai berikut, yaitu sensitivitas tinggi, noisy rendah, memiliki range linier yang dinamis, responnya tidak dipengaruhi variasi parameter (misal : suhu, tekanan, kecepatan alir), respon terlepas dari komponen fase gerak, mudah digunakan dan dapat dipercaya, tidak merusak analit, tidak mahal (harga, biaya operasi, dan perawatan), respon stabil untuk jangka waktu yang lama, mampu memberikan informasi kualitatif mengenai analit, respon universal, dapat diaplikasikan pada semua analit (Harmita, 2006).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

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

3.2 Alat

Mikrosentrifus berkecepatan tinggi berpendingin [Tomy MX-305, Jepang], mirosentrifuse dengan pendingin [Sorvall Fresco, Jerman], mikropipet [Gilson, Perancis], inkubator [Orbital Shaker Incubator], pemanas dengan *magnetic stirrer* [Torrey Pines Scientific, USA], autoklaf [Hirayama, Jepang], dry bath thermoblock, pH meter [Eutech Instruments pH510 CyberScan, Singapura], timbangan analitik [Scout dan Acculab, USA], lemari pendingin [GEA, Korea dan Toshiba, Jepang], *Ultra Low Temperature Freezer* -80 °C [New Brunswick Scientific U101 Innova, Inggris], *Freezer* -20 °C [GEA, Korea], oven pengering [Lab-line, USA], oven penyimpanan [WTB Binder, Jerman], alat SDS-PAGE [Biometra, Jepang], spektrofotometer GeneQuantTM 100 [GE Healthcare, Swedia], Sonikator [Ultrasonic Homogenizer Labsonic, Jerman], His Spin Trap[®] Kit [GE Healthcare, Swedia], HisTrap[®] FF kolom 1 ml [GE Healthcare, Swedia], Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) [Shimadzu, Jepang] terdiri dari pompa [LC-20], auto sampler [SIL-20C], kolom oven [Supelco, CTO-20C 15cm x 4,6mm, diameter partikel 5 µm], detektor UV/Vis [SPD-20AV], dan pengolah data pada computer [LC-Solution], TLC Silica gel 60 F₂₅₄ [Merck, Jerman], *chamber*, pipa kapiler, dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

3.3 Bahan

3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah *Escherichia coli* BL-21 Star™ (pAM_SPaseWRS3) rekombinan stok beku milik Laboratorium Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI.

3.3.2 Bahan Kimia

Medium agar dan cair Luria Bertani [Difco, USA], Natrium hidroksida [Merck, Jerman], Asam klorida [Merck, Jerman], Kalium dihidrogen fosfat [Merck, Jerman], Dikaliun hidrogen fosfat [Merck, Jerman], His Buffer® Kit [GE Healthcare, Swedia], aquadest, aquabidest steril [Otsuka, Indonesia], Protein Staining Solution [Fermentas, USA], Tris base [Amersham Bioscience, Swedia], Natrium Dodesil Sulfat [Wako, Jepang], Trisin [Aldrich, Jerman], Loading Buffer [Fermentas, USA], 2-merkaptioetanol [Fermentas, USA], Akrilamid/bisakrilamid [BioRad, Inggris], Amonium persulfat [Merck, Jerman], TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamin) [Merck, Jerman], Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis [GE Healthcare, Swedia], BCA [Merck Bioscience, Jerman], Isopropanol [Aldrich, Jerman], asam asetat [Aldrich, Jerman], IPTG (Isopropil β-D-thiogalaktosida) [Wako, Jepang], Tetrasiklin [Aldrich, Jerman], sukrosa [Merck, Jerman], Na₂EDTA [Merck, Jerman], MgCl₂, NADP⁺ [Wako, Jepang], fosfoglukomutase [Sigma, USA], glukosa-1,6-difosfat [Sigma, USA], glukosa-6-fosfat dehidrogenase [Wako, Jepang], Sukrosafosforilase Standar [Wako, Jepang], asetonitril [Merck, Jerman], H₂SO₄ [Merck, Jerman], asam askorbat [Nacalai Tesque, Jepang], AA-2G (2-O-α-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid) [Wako, Jepang], butanol [Merck, Jerman], asam benzoat [Merck, Jerman].

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Medium dan Pembuatan Medium

3.4.1.1 Medium

Medium yang digunakan adalah medium agar dan cair Luria Bertani (LB). Adapun kandungan dari medium LB adalah : *bactotryptone*, *bacto yeast* dan

NaCl. Dalam penelitian ini digunakan medium LB yang sudah jadi sehingga tidak perlu diracik lagi.

3.4.1.2 Pembuatan Medium

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

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

Untuk membuat 500 ml medium cair LB ditimbang 10 g serbuk medium cair dan dilarutkan dalam 500 ml aquadest dalam labu bulat. Medium yang sudah jadi selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Medium cair selanjutnya dapat langsung digunakan untuk pembuatan kultur cair atau disimpan dalam lemari pendingin untuk digunakan keesokan harinya.

3.4.2 Pembuatan Larutan, Dapar, dan Pereaksi

3.4.2.1 Dapar Fosfat pH 5,0; 6,0; 6,8; 7,0; 7,5; 8,0 $1,23 \times 10^{-1}$ (DeAngelis K.M., 2007)

Dikalium hidrogen fosfat dan Kalium dihidrogen fosfat ditimbang dengan seksama seperti berikut untuk membuat larutan dengan konsentrasi masing-masing 1,23 M :

- Untuk 250 ml Larutan $1,23 \text{ M K}_2\text{HPO}_4$ ($174,18 \text{ g mol}^{-1}$) = 53,560 g
 - Untuk 250 ml Larutan $1,23 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ($136,09 \text{ g mol}^{-1}$) = 41,848 g
- kemudian masing-masing dilarutkan dalam 250 ml aquadest.

Untuk membuat larutan dapar pH 5,0; 100 ml, dilakukan dengan membuat campuran kedua larutan seperti berikut :

- a. Larutan 1,23 M K_2HPO_4 ($174.18g\ mol^{-1}$) = 0,14 ml
- b. Larutan 1,23 KH_2PO_4 ($136.09g\ mol^{-1}$) = 9,86 ml

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

- a. Larutan 1,23 M K_2HPO_4 ($174.18g\ mol^{-1}$) = 1,32 ml
- b. Larutan 1,23 KH_2PO_4 ($136.09g\ mol^{-1}$) = 8,68 ml

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

- a. Larutan 1,23 M K_2HPO_4 ($174.18g\ mol^{-1}$) = 6,15 ml
- b. Larutan 1,23 KH_2PO_4 ($136.09g\ mol^{-1}$) = 3,85 ml

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

- a. Larutan 1,23 M K_2HPO_4 ($174.18g\ mol^{-1}$) = 8,14 ml
- b. Larutan 1,23 KH_2PO_4 ($136.09g\ mol^{-1}$) = 1,86 ml

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

- a. Larutan 1,23 M K_2HPO_4 ($174.18g\ mol^{-1}$) = 0,6 ml
- b. Larutan 1,23 KH_2PO_4 ($136.09g\ mol^{-1}$) = 9,4 ml

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

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

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

3.4.2.2 Larutan Stok IPTG 1 M

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

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

Sebanyak 9,1 g tris base dan 0,2 g SDS ditimbang kemudian tris base dilarutkan dalam kurang lebih 30 ml. Atur pH dengan penambahan larutan HCl 1 N hingga tercapai pH 8,8. Selanjutnya SDS ditambahkan dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml. Kemudian dapar disimpan dalam lemari pendingin suhu 4° C.

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

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

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

Sebanyak 6,05 g tris base; 8,96 g trisin dan 0,5 g SDS ditimbang dan semua bahan dilarutkan dalam 500 ml aquadest steril secara aseptis. Tidak perlu pengaturan pH. Selanjutnya dapar disimpan dalam lemari pendingin suhu 4° C.

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

Sebanyak 24,22 g tris base ditimbang dan dilarutkan dalam 500 ml aquadest. Selanjutnya pH diatur dengan penambahan HCl 1 N hingga dicapai pH 8,9. Kemudian dapar disimpan dalam lemari pendingin suhu 4° C.

3.4.2.7 Larutan Campuran Akrilamid-Bis Akrilamid 29:1

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

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

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

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

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

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

Sebanyak 37,1 mg Na_2EDTA ditimbang dan dilarutkan dalam 50 ml aquabidest steril.

3.4.2.11 Larutan Stok MgCl_2 $9,96 \times 10^{-1} \text{ M}$ (*Sucrose Phosphorylase*, n.d.)

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

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

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

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

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

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

Sebanyak 40,65 ml larutan dapar fosfat $1,23 \times 10^{-1}$ M pH 6,8 diambil dan diencerkan dengan aquabidest steril hingga volume 100 ml.

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

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

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

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

3.4.2.17 Larutan Fosfoglukomutase (EC 5.4.2.2) 0,2 unit/ μ l (*Sucrose Phosphorylase*, n.d.)

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

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

Sebanyak 1,12 mg (tertera dilabel) serbuk enzim yang setara dengan 1000 unit aktivitas dilarutkan dengan 1000 μ l larutan dapar fosfat 0,05 M pH 6,8

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 menghasilkan 500 μ l larutan glukosa-6-fosfat dehidrogenase 0,2 unit/ μ l. Larutan selanjutnya disimpan dalam *freezer* - 20°C.

3.4.2.19 Larutan Sukrosafosforilase (EC 2.4.1.7) 0,2 unit/ μ l

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

3.4.2.20 Larutan Stok Tetrasiklin 5mg/ml

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

3.4.3 Pembiakan dan Peremajaan Kultur (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011)

Kultur yang digunakan adalah kultur beku *E. coli* BL21 StarTM rekombinan yang telah membawa gen penyandi SPase rekombinan asal *Leuconostoc mesenteroides* MBFWRS-3(1) (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Suryadi, 2011). Pembiakan kultur dilakukan dengan cara menggoreskan satu ose bakteri ke medium agar LB yang mengandung 5 μ g/ μ l tetrasiklin secara aseptis, kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 16 jam. Kultur yang digunakan harus selalu dari kultur beku untuk menjaga kualitas dan kuantitas produk yang nantinya akan dihasilkan.

3.4.4 Pembuatan Inokulum (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011)

Penumbuhan produk protein rekombinan diawali dengan membuat kultur inokulum dengan cara menginokulasikan satu ose bakteri ke dalam 5 ml medium

cair LB dan penambahan 5 µl tetrasiklin. Kultur inokulum ini selanjutnya di inkubasi pada suhu 37 °C selama 16 jam dan di *shake* pada 175 rpm.

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

Kultur inokulum kemudian dimasukkan ke dalam 500 ml medium cair LB. Ukur OD pertama dengan estimasi 0,2 dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Penambahan tetrasiklin sebanyak 500 µl dilakukan setelah selesai inkubasi dan dilanjutkan kembali dengan inkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam pada 200 rpm. Dilakukan pengukuran OD kedua dengan estimasi 0,6 dilanjutkan dengan penambahan IPTG sebanyak 500 µl dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 2 jam. Sel dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 4000 x g selama 15 menit pada suhu 4 °C (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Suryadi, 2011).

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

Pelet sel yang telah diperoleh selanjutnya dipecah dengan alat sonikator. Sonikasi dilakukan dalam dapar fosfat pH 6,8 dan PMSF selama 15 menit dengan amplitudo 100% diatas penangas es. Setelah sel dipecah, debris sel dipisahkan dari filtrat pelet sel dengan cara disentrifugasi pada 6000 x g selama 10 menit pada suhu 4 °C.

3.4.7 Pemurnian Protein Rekombinan dengan Menggunakan Kolom Afinitas (*GE HisTrap FF® Protocol, 2005*).

Sebelum dilakukan purifikasi terlebih dahulu dilakukan pemekatan filtrat pelet sel dengan menggunakan konsentrator dengan ukuran 30 kDa. Pemekatan dilakukan dengan sentrifugasi pada 7500 x g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Volume akhir pemekatan diharapkan kurang lebih 500 µl (Millipore Corporation, 2003).

Filtrat pelet sel yang telah dipekatkan selanjutnya diaplikasikan pada kolom afinitas untuk memperoleh protein rekombinan yang murni. Pertama-tama

digunakan kolom dengan skala kecil terlebih dahulu untuk konfirmasi. Kolom afinitas yang digunakan adalah His Spin Trap[®] Kit yang memiliki kapasitas hingga 750 µg protein per kolom (*His Spin Trap[®] Kit manual*, 2007).

Mula-mula kolom disentrifuse pada 100 x g selama 30 detik untuk menghilangkan cairan penyimpan fase diam. Selanjutnya kolom dicuci sebanyak dua kali masing-masing dengan 600 µl dapar pencuci kolom yang mengandung 20 mM fosfat, 500 mM NaCl dan 60 mM imidazol. Kolom dicuci dengan cara disentrifugasi pada 100 x g selama 30 detik. Setelah itu sebanyak 500 µl filtrat pelet sel yang telah dipekatkan dimasukkan dalam kolom dan disentrifugasi pada 100 x g selama 30 detik untuk menghilangkan protein-protein pengotor. Kolom selanjutnya dicuci satu kali dengan larutan dapar pencuci sebanyak 600 µl. Kolom dicuci dengan cara disentrifugasi pada 100 x g selama 30 detik. Selanjutnya kolom dielusi menggunakan larutan dapar pengelusi sebanyak 200 µl (*His Spin Trap[®] Kit manual*, 2007). Fraksi yang diperoleh selanjutnya dikumpulkan untuk SDS-PAGE. Setelah dilakukan konfirmasi, digunakan kolom dengan skala besar.

Kolom yang digunakan adalah His Spin Trap[®] Kit 1 ml. Mula-mula kolom dicuci dengan 10 ml dapar pencuci yang mengandung 20 mM fosfat, 500 mM NaCl, dan 60 mM imidazol sebanyak dua kali. Setelah itu sebanyak 10 ml filtrat pelet sel yang telah disonikasi dimasukkan ke dalam kolom afinitas. Kolom dicuci dengan 10 ml dapar pencuci dan ditampung. Selanjutnya kolom dielusi dengan 10 ml larutan dapar pengelusi yang mengandung 20 mM fosfat, 500 mM NaCl, dan 500 mM imidazol. Fraksi yang diperoleh ditampung untuk kemudian dilakukan pengujian.

Fraksi yang diperoleh dari hasil purifikasi kemudian dilakukan proses pemekatan dengan sentrifugasi pada 7500 x g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Hasil pemekatan kemudian disimpan dalam gliserol 40% sebagai protein rekombinan yang telah murni .

3.4.8 Analisis Protein Rekombinan SPase dengan Elektroforesis Gel Poliakrilamid (Laemli, Cleaveland, Fischer, & Kirschner, 1977; Schägger, 2006)

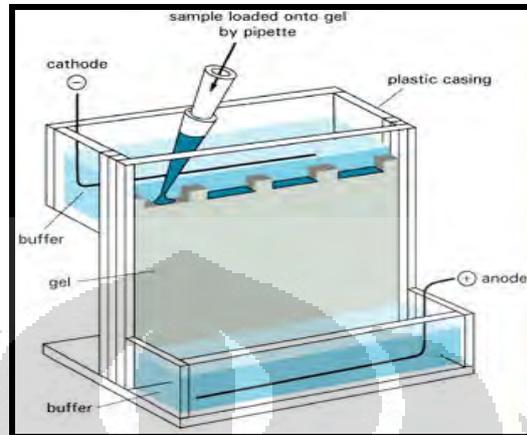
Sebelum melakukan elektroforesis dilakukan pembuatan dapar dan larutan yang diperlukan untuk elektroforesis dan pembuatan gel yaitu dapar katoda dan anoda serta dapar Tris-HCl/SDS pH 6,8 dan 8,8. Gel yang digunakan ada dua macam yaitu gel penahan dan gel pemisah. Konsentrasi gel penahan yang digunakan adalah 3,9 % dan gel pemisah adalah 10 % (Coligan, J.E., et al., 1995).

Formulasi gel penahan terdiri dari 0,39 ml larutan campuran akrilamid/bis akrilamid; 0,75 ml larutan 4X Tris-HCl/SDS pH 6,8; 1,83 ml aquabidest steril; 0,015 ml larutan Ammonium persulfat (APS) 10%; 0,003 ml TEMED. Formulasi gel pemisah terdiri dari 2 ml larutan campuran akrilamid/bis akrilamid; 1,5 ml larutan 4X Tris-HCl/SDS pH 8,8; 2,5 ml aquabidest steril; 0,020 ml larutan Ammonium persulfat (APS) 10%; 0,004 ml TEMED. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam *beaker glass* dan setiap larutan diambil dengan menggunakan mikropipet (Coligan, J.E., et al., 1995).

Cetakan untuk gel diisi dengan larutan gel pemisah dan di atasnya diisikan larutan isopropanol untuk menjaga gel tetap lurus ketika membeku dan sekaligus untuk mencegah terbentuknya gelembung udara dalam gel. Setelah gel pemisah membeku, lapisan isopropanol dibuang dan cetakan diisikan dengan larutan gel penahan. Segera setelah gel penahan dimasukkan, sisir yang akan digunakan untuk mencetak sumuran gel dimasukkan. Setelah gel membeku, sisir dapat diangkat dan terbentuk sumuran-sumuran pada gel penahan. Gel dapat langsung digunakan atau disimpan dalam aquadest steril di lemari pendingin untuk digunakan keesokan harinya. Penyimpanan dalam aquadest steril dilakukan agar gel tidak kering dan pecah (Coligan, J.E., et al., 1995).

Setelah gel siap digunakan, gel dipasang pada alat elektroforesis. *Chamber* atas diisi dengan dapar katoda dan *chamber* bawah diisi dengan dapar anoda. *Chamber* atas harus diisi dengan dapar katoda sehingga semua sumuran terendam dengan larutan dapar (Coligan, J.E., et al., 1995). Sampel disiapkan dengan cara mencampurkan 4 μ l *reducing agent* berupa 2-merkaptotanol, 16 μ l *loading buffer*, dan 10 μ l larutan sampel. Campuran itu selanjutnya dipanaskan di

atas *dry bath* suhu 95 °C selama kurang lebih 3 menit. Kemudian 10 µl sampel dan 4 µl penanda protein dimasukkan dalam tiap-tiap sumuran seperti pada gambar 3.1 (Coligan, J.E., et al., 1995).



[sumber: www.bioinformatics.com]

Gambar 3.1 Skema SDS PAGE

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

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

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

3.4.9 Pengukuran Konsentrasi Protein SPase Rekombinan

Protein sukrosafosforilase rekombinan stok diukur konsentrasinya dengan tujuan untuk mengkonfirmasi menggunakan metode *bicinchoninic acid* (BCA). Terlebih dahulu dibuat kurva kalibrasi menggunakan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai standar protein, sebagai berikut:

Tabel 3.1 Konsentrasi Kurva Kalibrasi BSA Standar

| Volume BSA | Dapar fosfat 0,05 M pH 6,8 (µl) | Konsentrasi akhir BSA (µg/ml) |
|--------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Stok 2 mg/ml | - | 2.000 |
| 250 µl dari stok 2 mg/ml | 250 | 1.000 |
| 250 µl dari tube 1 | 250 | 500 |
| 250 µl dari tube 2 | 250 | 250 |
| 300 µl dari tube 3 | 300 | 125 |
| 100 µl dari tube 4 | 400 | 25 |

BSA yang digunakan adalah kit dengan stok 2 mg/ml dengan konsentrasi 2000 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran dengan memipet 250 µl stok BSA 2 mg/ml dan ditambahkan 250 µl dapar fosfat 0,05 M pH 6,8 dan diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan memipet 250 µl dari konsentrasi 1000 ppm dan ditambahkan 250 µl dapar fosfat sehingga diperoleh konsentrasi akhir 500 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran dengan memipet 250 µl dari konsentrasi 500 ppm dan ditambahkan dapar fosfat 250 µl sehingga diperoleh konsentrasi 250 ppm. Pengenceran dilakukan dengan memipet 300 µl dari konsentrasi 250 ppm dan ditambahkan 300 µl dapar fosfat sehingga konsentrasi akhir 125 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran dengan memipet 100 µl konsentrasi 125 ppm dan ditambahkan 400 µl dapar fosfat sehingga diperoleh konsentrasi akhir 25 ppm.

Selanjutnya dibuat reagen BCA dengan menggunakan larutan BCA dan 4% tembaga (II) sulfat dengan perbandingan 50:1. Masing-masing larutan BSA dipipet 50 µl dan dicampur dengan 1 ml reagen BCA, dihomogenkan dengan *pipetting* dan diinkubasi pada 37 °C selama 30 menit. Campuran yang telah diinkubasi kemudian didiamkan pada suhu ruang. Campuran dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur serapan pada panjang gelombang 562 nm. Selanjutnya

dibuat persamaan kurva kalibrasi dari hasil yang diperoleh. Hal yang sama juga dilakukan pada sampel (Olson, B.J.S.C., & J. Markwell., 2007).

3.4.10 Uji Aktivitas Enzim SPase Rekombinan (Lee, Yoon, Nam, Moon, Moon, & Kim, 2006)

Aktivitas enzim sukrosa fosforilase di uji dengan menggunakan metode yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Uji standar berisi 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 yang mengandung 10 unit aktivitas; 0,05 ml glukosa-6-fosfat dehidrogenase yang mengandung 10 unit aktivitas.

Campuran larutan tersebut dimasukkan ke dalam mikrotube, lalu diinkubasi selama lima menit pada beberapa kondisi pH untuk memperoleh pH optimum, yaitu pH 5; 6; 7; 7,5; dan 8, juga pada beberapa kondisi temperatur yang berbeda, yaitu 25, 30, 35, 37, dan 40 °C untuk memperoleh temperatur optimum. Selanjutnya sebanyak 0,01 ml sampel dimasukkan dalam campuran larutan. Larutan akhir yang diperoleh sebanyak 1,66 ml yaitu setengah kali dari volume larutan uji standar dengan komposisi akhir 50 mM dapar fosfat; 140 mM sukrosa; 0,09 mM EDTA; 15 mM $MgCl_2$; 0,36 mM $NADP^+$; 0,0015 mM Glukosa-1,6-bifosfat; 10 Unit fosfoglukomutase; 10 Unit Glukosa-6-fosfat dehidrogenase. Peningkatan serapan akibat terbentuknya NADPH diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm.

Dalam uji ini digunakan kontrol positif (SPase standar) dan negatif. Kontrol positif dilakukan dengan mengganti 0,01 ml sampel dengan 0,01 ml SPase standar sedangkan kontrol negatif dilakukan dengan mengganti 0,01 ml sampel dengan 0,01 ml aquabidest steril. Selanjutnya serapan yang dihasilkan oleh kontrol positif, negatif, dan sampel dibandingkan untuk mengetahui apakah protein rekombinan yang dihasilkan memiliki aktivitas enzimatis.

3.4.11 Analisis Produk Transglukosilasi Asam Askorbat dengan KLT (Kwon, Taeyeon., Kim, C. T., & Lee, J.-H., 2008)

Glukosilasi asam askorbat dilakukan menggunakan 100 mM HEPES buffer (pH 7,5) berisi 0,5% (b/v) asam askorbat dan 30% (b/v) sukrosa. Reaksi dilakukan dengan mencampurkan 20 μ l larutan tersebut dengan enzim SPase sebanyak 0,4 unit, yaitu dengan memipet 2 μ l SPase 0,2 Unit/ μ l lalu diinkubasi pada 37 °C selama 16 jam. Hasil reaksi dianalisis menggunakan KLT dengan metode *ascending* menggunakan silika gel dan fase gerak butanol : asam asetat : air (3:1:1). Pada analisis KLT, bercak dapat dideteksi pada panjang gelombang 254 nm.

3.4.12 Analisis Produk Transglukosilasi Asam Askorbat dengan KCKT (Kwon, Taeyeon., Kim, C. T., & Lee, J.-H., 2007)

Glukosilasi asam askorbat dilakukan menggunakan 100 mM HEPES buffer (pH 7,5) berisi 0,5% (b/v) asam askorbat dan 30% (b/v) sukrosa. Reaksi dilakukan dengan mencampurkan 500 μ l larutan tersebut dengan enzim SPase sebanyak 10 unit, yaitu dengan memipet 50 μ l SPase 0,2 Unit/ μ l lalu di inkubasi pada 37 °C selama 16 jam. Hasil reaksi dianalisis dengan KCKT kolom ODS M80 (4,6 x 250 mm) menggunakan 0,1 M dapar kalium fosfat/asam fosfat (pH 2) sebagai fase gerak pada 0,5 ml/min. Puncak dideteksi pada serapan 243 nm.

3.4.13 Analisis Produk Transglukosilasi Asam Benzoat dengan KLT (Sugimoto, K., Nomura, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al., 2007)

Larutan berisi 0,4% asam benzoat dan 20% sukrosa dilarutkan dalam air dan pH diatur hingga 5,1 menggunakan NaOH 1 N. Reaksi dilakukan dengan mencampurkan 20 μ l larutan tersebut dengan enzim SPase sebanyak 2 unit, yaitu dengan memipet 10 μ l SPase 0,2 Unit/ μ l lalu diinkubasi pada 37 °C selama 16 jam. Hasil reaksi dianalisis menggunakan KLT dengan metode *ascending* menggunakan silika gel dan fase gerak asetonitril : air (70:30). Pada analisis KLT, bercak dapat dideteksi pada panjang gelombang 254 nm.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembiakan dan Peremajaan Kultur

Tahap awal penelitian dilakukan dengan menumbuhkan *E. coli* BL-21 StarTM rekombinan yang membawa plasmid penyandi SPase rekombinan asal *Leuconostoc mesenteroides*. Pembiakan kultur *E. coli* BL21 StarTM rekombinan menghasilkan koloni-koloni yang berwarna putih dan berbentuk bulat dengan permukaan yang halus seperti pada gambar 4.1. Kultur tumbuh dengan baik pada medium cair dan agar LB yang mengandung tetrasiklin dengan konsentrasi 5 µg/ml.



Gambar 4.1 Kultur *E. coli* BL-21 StarTM rekombinan pada medium agar LB yang mengandung 5 µg/ml tetrasiklin.

4.2 Pembuatan Inokulum

Kultur yang telah dibiakkan kemudian digunakan untuk pembuatan kultur inokulum dengan cara menginokulasikan satu ose bakteri ke dalam medium cair LB dan penambahan 5 µl tetrasiklin. Penambahan tetrasiklin bertujuan untuk membunuh bakteri yang tidak resisten terhadap tetrasiklin sehingga *E. coli* BL-21 StarTM yang resisten terhadap tetrasiklin akan tetap bertahan. Selanjutnya kultur inokulum diinkubasi pada suhu 37 °C selama 16 jam dan di *shake* pada 175 rpm. Hasil inokulasi yang telah diinkubasi selama 16 jam menjadi keruh karena telah terjadi pertumbuhan bakteri pada kultur inokulum tersebut, terlihat pada gambar 4.2.



Keterangan: [Kiri] Setelah Inkubasi; [Kanan] Sebelum Inkubasi

Gambar 4.2 Hasil Inokulasi

4.3 Pembuatan Kultur Cair dan Pemanenan Sel

Kultur inokulum kemudian dimasukkan ke dalam 500 ml medium cair LB agar mendapatkan jumlah sel yang cukup banyak. Pengukuran OD dilakukan untuk mengontrol pertumbuhan bakteri pada medium. Nilai OD pertama ialah 0,254 setara dengan 254 sel/ml. Penambahan tetrasiklin kembali dilakukan untuk membunuh bakteri-bakteri yang tidak resisten terhadap tetrasiklin sehingga tersisa *E. coli* BL21 StarTM yang resisten. Nilai OD kedua sebelum ditambahkan IPTG adalah 0,673. Selanjutnya sel diinduksi menggunakan IPTG 1 mM agar diperoleh pelet sel yang banyak dan kemudian diinkubasi pada suhu 30° C selama sekitar 2 jam. IPTG merupakan suatu senyawa yang berfungsi sebagai inducer ekspresi protein rekombinan (Spangler, 2002). Sel dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 6000 x g selama 10 menit pada suhu 4 °C.

Pada penelitian ini dilakukan penumbuhan produk protein rekombinan dalam skala besar. Starter inokulum yang dibuat sebanyak 5 ml x 6 tabung reaksi dan diperbanyak menggunakan 6 x 500 ml medium cair LB atau dalam 3 liter medium cair LB seperti pada gambar 4.3. Pelet sel hasil penumbuhan produk protein rekombinan seperti pada gambar 4.4 kemudian akan dipecah dan digunakan untuk pengujian baik sebagai *quality control* menggunakan SDS PAGE, uji aktivitas, pengukuran konsentrasi protein, maupun untuk *screening* aktivitas transglukosilasi SPase rekombinan.



Gambar 4.3 *E. coli* BL-21 StarTM rekombinan pada medium cair LB yang mengandung 5 µg/ml tetrasiklin.



Gambar 4.4 Pelet sel bakteri hasil pemanenan dengan cara sentrifugasi pada 4000 x g selama 15 menit.

4.4 Pemecahan Sel dan Perolehan Supernatan

Pelet sel yang diperoleh dari stok beku sebanyak 3 liter kemudian dipecah menggunakan alat sonikator untuk mengeluarkan protein rekombinan dari dalam sel. Selanjutnya debris sel dipisahkan dari filtratnya dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 6000 x g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Diperoleh filtrat sebanyak 24 ml di bagian atas dan debris sel mengendap di bagian bawah.

Sel yang telah disimpan kemudian diresuspensikan dalam dapar fosfat pH 6,8 dan ditambahkan PMSF dengan tujuan untuk menjaga stabilitas enzim SPase dengan cara inhibisi enzim protease yang kemungkinan dapat merusak SPase. Sel dipecah dengan sonikasi menggunakan alat sonikator dengan amplitudo 100% dalam dapar fosfat pH 6,8. Sonikasi dilakukan diatas penangas es untuk menjaga

agar suhu sel tidak naik karena proses sonikasi sehingga menyebabkan enzim kehilangan aktivitas biologis. Debris sel dipisahkan dari filtrat dengan cara sentrifugasi agar enzim yang sudah larut dalam filtrat tidak dirusak oleh protease yang terdapat dalam sel.

4.5 Pemurnian Protein Rekombinan dengan Menggunakan Kolom Afinitas

Teknik pemurnian dengan kolom afinitas atau seringkali dikenal pula dengan nama *Immobilized Metal-chelate Affinity Chromatography* (IMAC), bekerja berdasarkan kemampuan asam amino tertentu, dalam hal ini histidin, untuk berikatan secara reversibel dengan ion logam transisi, dalam hal ini Ni^{2+} yang terikat kuat pada suatu matriks penahan. Protein rekombinan yang telah dirancang dengan suatu *tag* berupa deretan asam amino histidin dapat dimurnikan dengan teknik ini karena deretan asam amino histidin sebanyak 12 kali yang telah di *tag* pada protein rekombinan akan berikatan secara reversibel dengan ion logam Ni^{2+} sehingga tertahan dalam kolom. Sementara itu protein-protein lain yang bukan merupakan rekombinan akan lolos dari kolom karena tidak membawa *tag* berupa deretan asam amino histidin tersebut. Protein rekombinan yang tertahan dalam kolom dapat dilepaskan dari ion logam Ni^{2+} dengan zat yang dapat berkompetisi dalam hal berikatan dengan ion Ni^{2+} , yaitu imidazol konsentrasi tinggi, sehingga ikatan antara *tag* asam amino histidin dengan ion logam digantikan oleh imidazol. Konsentrasi imidazol yang tinggi diperlukan agar dapat melepaskan ikatan antara protein rekombinan dengan logam Ni^{2+} sehingga diperoleh protein rekombinan yang murni. Adapun larutan dapar pengelusi yang digunakan mengandung 20 mM fosfat, 500 mM NaCl dan 500 mM imidazol. Protein rekombinan yang berhasil dilepaskan selanjutnya ditampung fraksinya dalam mikrotube untuk selanjutnya dikonfirmasi dengan elektroforesis gel poliakrilamid (Mikkelsen, S.R., & E. Corton, 2004).

Purifikasi dilakukan dalam dua tahap, yaitu menggunakan kolom dengan skala kecil dan kolom dengan skala besar. Kolom dengan skala kecil ini digunakan untuk melakukan konfirmasi apakah protein rekombinan yang diinginkan sudah murni. Setelah berhasil melakukan purifikasi dengan skala kecil kemudian dilanjutkan menggunakan kolom dengan skala besar.

Purifikasi skala kecil dilakukan menggunakan His Spin Trap[®] Kit dengan kapasitas kolom hingga 750 µg protein. Volume elusi yang digunakan adalah 200 µl dan diperoleh protein rekombinan yang telah murni untuk selanjutnya diaplikasikan pada SDS-PAGE untuk konfirmasi apakah protein rekombinan tersebut telah murni.

Setelah memastikan protein rekombinan telah murni, dilakukan purifikasi dalam skala besar. Purifikasi skala besar dilakukan menggunakan His Trap[™] FF 1 ml. Volume elusi yang digunakan adalah 10 ml atau 10 kali volume kolom. SPase hasil purifikasi kemudian dikumpulkan hingga diperoleh 30 ml SPase rekombinan murni dalam dapar pengelusi.

Protein rekombinan yang telah dipurifikasi kemudian dilakukan proses pemekatan menggunakan konsentrator (*Millipore*) yang berukuran 30 kDa. Konsentrator ini memiliki ukuran pori-pori yang dapat dilewati oleh protein yang berukuran kurang dari 30 kDa, sehingga selain protein yang berukuran lebih besar dari 30 kDa akan terbuang karena lolos dari pori-pori. SPase asal *Leuconostoc mesenteroides* berdasarkan hasil dari penelitian Koga et al memiliki ukuran kurang lebih 55 kDa (Takuro K.,1991) sehingga secara teori sukrosafosforilase rekombinan tidak akan lolos dari konsentrator.

SPase rekombinan hasil purifikasi dalam dapar pengelusi sebanyak 30 ml kemudian dilakukan pemekatan hingga diperoleh 3 ml protein rekombinan yang telah murni. Protein rekombinan ini selanjutnya akan digunakan untuk SDS-PAGE, uji aktivitas, pengukuran konsentrasi protein, dan *screening* aktivitas transglukosilasi.

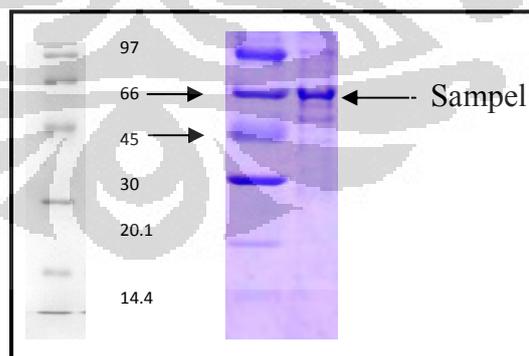
4.6 Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Protein yang telah dipurifikasi kemudian di elektroforesis dengan metode SDS gel poliakrilamid untuk memastikan apakah protein tersebut merupakan protein yang diinginkan, yaitu SPase. SDS PAGE dilakukan pada konsentrasi gel penahan 3,9% dan gel pemisah 10% dan 15%. SDS PAGE dilakukan menggunakan konsentrasi gel pemisah 15% dan menghasilkan pita-pita yang tertahan diatas gel seperti pada gambar 4.5.



Gambar 4.5 Gel SDS PAGE dengan Konsentrasi Gel Pemisah 15%

SDS PAGE dengan konsentrasi gel pemisah 10% memberikan hasil yang baik. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada gambar 4.6. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita protein tunggal pada daerah antara 45 hingga 66 kDa. Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa enzim SPase rekombinan memiliki bobot protein sekitar 56 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa protein tersebut memiliki ukuran yang sesuai dengan SPase rekombinan sebelumnya yang berkisar antara 45 hingga 66 kDa (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen, & Suryadi, 2011). Pada penelitian SPase rekombinan dari *Escherichia coli* DH5 α diperoleh bobot protein sebesar 55 kDa (Hadi, 2010). Hal ini menunjukkan bahwa bobot molekul yang dihasilkan SPase rekombinan sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya.



Gambar 4.6 Gel SDS PAGE dengan Konsentrasi Gel Pemisah 10%

Gel poliakrilamid adalah gel yang sering digunakan untuk memisahkan dan menentukan ukuran protein. Gel poliakrilamid dibentuk dari polimerisasi

antara akrilamid dan bis akrilamid dimana reaksi polimerisasi dikatalisis oleh APS dan TEMED. Konsentrasi polimerisasi bergantung dari komposisi campuran akrilamid dan bis akrilamid. Dalam penelitian ini campuran akrilamid dan bis akrilamid yang digunakan adalah 29:1 dan formula gel yang digunakan adalah 10%. Formula gel 10% dipilih karena baik untuk memisahkan protein yang berukuran kecil. Gel yang digunakan ada dua macam yaitu gel penahan dan gel pemisah. Gel penahan berfungsi untuk menahan sampel agar bergerak bersamaan saat proses elektroforesis berjalan sedangkan gel pemisah berfungsi untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran molekulnya (Boyer, R., 2000).

Sampel disiapkan dengan cara mencampurkan 4 μl *reducing agent* berupa 2-merkaptotanol, 16 μl *loading buffer*, dan 10 μl larutan sampel sehingga diperoleh volume akhir 30 μl . Campuran itu selanjutnya dipanaskan di atas *dry bath* suhu 95 °C selama kurang lebih 3 menit. *Reducing agent* yang berupa 2-merkaptotanol berfungsi untuk memutus ikatan-ikatan disulfida dalam struktur protein sehingga protein terurai membentuk rantai lurus polipeptida. Sedangkan SDS yang terkandung dalam *loading buffer* berfungsi untuk menyelubungi molekul protein dengan muatan negatif. Hal ini bertujuan agar protein memiliki mobilitas elektroforetik sehingga dapat bergerak dari katoda menuju anoda saat dielektroforesis. Pemanasan pada suhu 95 °C bertujuan untuk lebih mendenaturasi protein. *Loading buffer* juga mengandung glisin yang berfungsi sebagai pemberat, sehingga protein dapat turun ke sumuran saat dimuatkan (Boyer, R., 2000).

Hasil elektroforesis dapat dilihat setelah gel direndam dalam *staining solution* yang mengandung Coomassie *Brilliant Blue*. Prinsip dari proses staining ini adalah protein dapat mengikat zat warna Coomassie *Brilliant Blue* dan selanjutnya kelebihan zat warna dapat dihilangkan dengan *destaining solution*. Hanya bagian gel yang terdapat protein saja yang akan membentuk pita warna biru.

4.7 Pengukuran Konsentrasi Protein Sukrosafosforilase Rekombinan

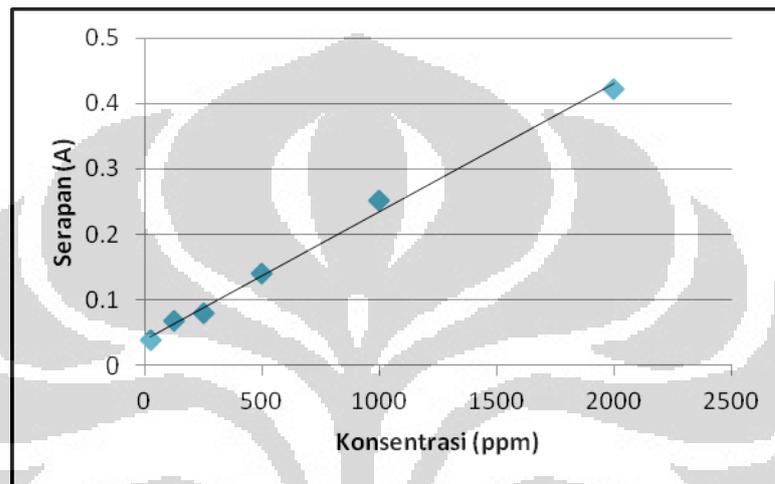
Protein yang telah diperoleh dari hasil kultur yang telah dilakukan sebelumnya kemudian diukur konsentrasinya dengan metode BCA. Serapan yang

dihasilkan oleh larutan standar dapat dilihat pada tabel 4.1. Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh adalah

$$Y = 0,039328 + 1,95 \cdot 10^{-4} X \dots\dots\dots(4.1)$$

$$r = 0,99775$$

Kurva kalibrasi yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 4.7 Kurva kalibrasi BSA diukur pada panjang gelombang 562 nm.

Tabel 4.1 Tabel kurva kalibrasi BSA diukur pada panjang gelombang 562 nm

| Konsentrasi (ppm) | Serapan (A) |
|------------------------------|------------------------|
| 25 | 0,038 |
| 125 | 0,067 |
| 250 | 0,079 |
| 500 | 0,141 |
| 1000 | 0,251 |
| 2000 | 0,422 |

Selanjutnya dengan cara yang sama sampel juga diukur serapannya pada panjang gelombang 562 nm dan konsentrasinya ditentukan menggunakan persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh. Pengukuran dilakukan terhadap SPase rekombinan. Serapan yang dihasilkan oleh SPase rekombinan yang sebelumnya telah dilakukan pengenceran sebesar 5 kalinya adalah 0,084 A. Setelah diukur

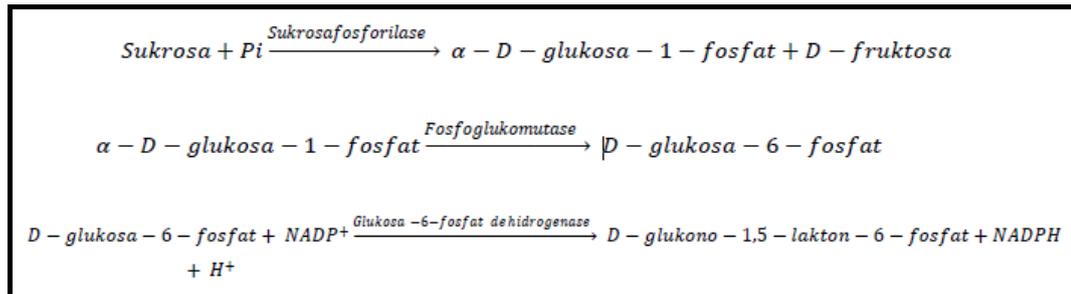
menggunakan persamaan kurva kalibrasi (persamaan 4.1) dan dikalikan faktor pengenceran maka konsentrasi protein yang diperoleh adalah 1117,5 µg/ml.

Prinsip pengukuran konsentrasi protein dengan menggunakan metode BCA adalah terjadinya pengurangan ion Cu^{2+} dari CuSO_4 menjadi Cu^+ . Jumlah Cu^{2+} yang berkurang sebanding dengan jumlah protein dalam larutan. Selanjutnya kompleks Cu^+ dan protein membentuk warna ungu yang menyerap cahaya pada panjang gelombang 562 nm.

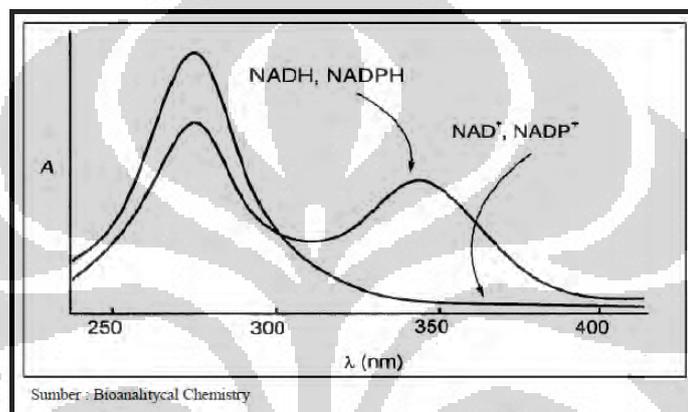
4.8 Uji Aktivitas Enzim Sukrosafosforilase Rekombinan

Protein standar maupun rekombinan dilakukan pengujian aktivitas untuk mengetahui aktivitas dari enzim dan untuk mengetahui ekspresi dari SPase rekombinan tersebut. Setelah semua larutan yang akan digunakan dicampur dengan baik, selanjutnya diinkubasi dan hasil reaksi dimasukkan ke dalam spektrofotometer dan direkam peningkatan serapannya pada panjang gelombang 340 nm. Pada penelitian ini digunakan SPase standar dan rekombinan dengan variasi pH, yaitu 5; 6; 7; 7,5; 8 serta variasi suhu, yaitu 25, 30, 35, 37, 40 °C. Tujuan dilakukan variasi ini adalah untuk mengetahui kondisi optimum aktivitas enzim baik SPase standar maupun rekombinan. Kondisi optimum merupakan kondisi pada saat laju reaksi enzim paling tinggi mengubah substrat (Bintang, M., 2010).

Pada reaksi uji aktivitas ini, jumlah NADP^+ yang direduksi menjadi NADPH adalah sebanding dengan jumlah sukrosa yang dikonversi menjadi glukosa-1-fosfat dan fruktosa. SPase dapat mengkonversi sukrosa 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 (Mikkelsen, S.R., & E. Corton, 2004). Reaksi lengkap dapat dilihat pada gambar 4.8.



Gambar 4.8 Reaksi Assay Aktivitas Enzim SPase (Sylverstein R., Voet, J., Reed, D., & Abeles, R. H., 1966)

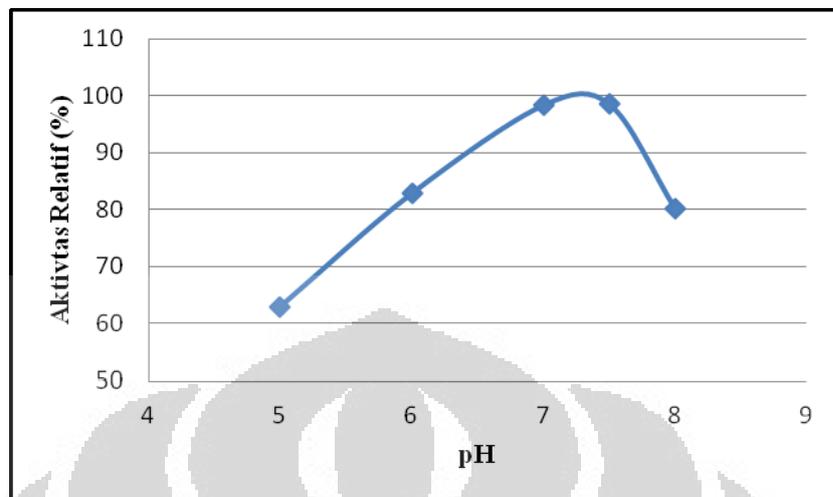


Gambar 4.9 Perbandingan serapan antara NADH, NADPH dengan NAD⁺, NADP⁺

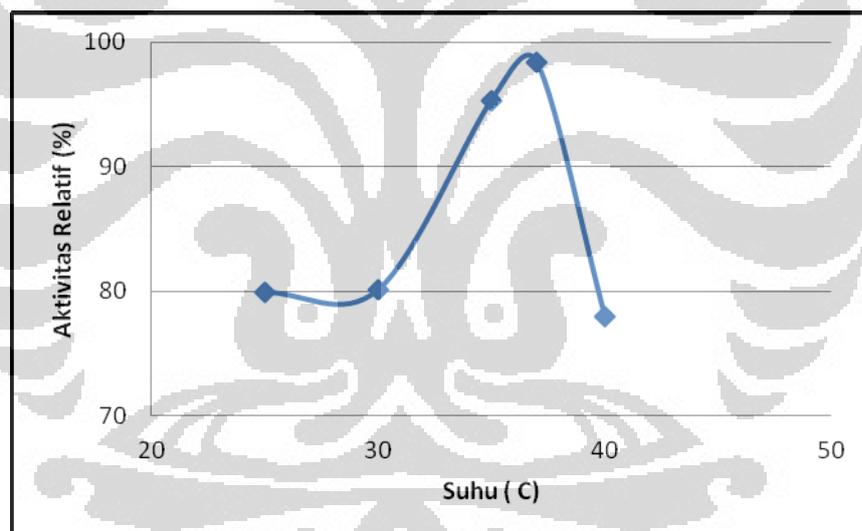
Hasil reaksi yang telah diinkubasi selama 10 menit selanjutnya diukur serapannya. Pada gambar 4.10 terlihat hasil optimasi pH SPase. Kondisi pH optimum SPase rekombinan terhadap SPase standar terlihat pada pH 7,5 dengan aktivitas relatif 98,52 %. Pada gambar 4.11 terlihat kondisi suhu optimum SPase rekombinan terhadap SPase standar terlihat pada suhu 37 °C dengan aktivitas relatif 98,34 %. Data disajikan dalam tabel 4.2. Berdasarkan hasil pengukuran diperoleh serapan kontrol negatif sebesar 0,02 A. Pengamatan serapan dilakukan pada panjang gelombang 340 nm, pada panjang gelombang tersebut NADP⁺ tidak memberikan serapan, sehingga kontrol negatif memiliki serapan yang kecil, terlihat pada gambar 4.9.

Aktivitas relatif dihitung berdasarkan perbandingan antara SPase rekombinan dan SPase standar seperti persamaan 4.2 berikut:

$$\% \text{ Aktivitas Relatif} = \frac{\text{Aktifitas SPase rekombinan}}{\text{Aktifitas SPase standar}} \times 100\% \dots\dots\dots(4.2)$$



Gambar 4.10 Hubungan antara pH terhadap aktivitas relatif SPase rekombinan



Gambar 4.11 Hubungan antara suhu terhadap aktivitas relatif SPase rekombinan

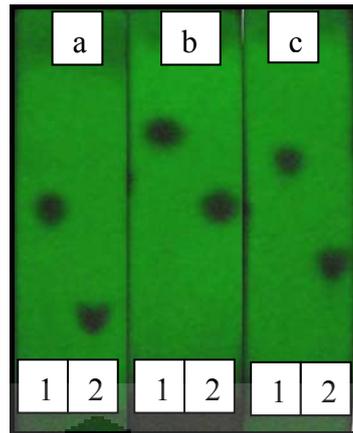
Tabel 4.2 Hubungan antara suhu dan pH terhadap aktivitas relatif SPase rekombinan

| Suhu | Aktivitas Relatif (%) | pH | Aktivitas Relatif (%) |
|------|-----------------------|-----|-----------------------|
| 25 | 79,876 | 5 | 62,7275 |
| 30 | 80,0853 | 6 | 82,7495 |
| 35 | 95,311 | 7 | 98,3425 |
| 37 | 98,3425 | 7,5 | 98,5238 |
| 40 | 78,0049 | 8 | 80,0423 |

Uji aktivitas SPase rekombinan telah dilakukan pada SPase dari *Escherichia coli* DH5 α dan *E. coli* BL21 StarTM dalam skala kecil. Pada SPase dari *E. coli* DH5 α dihasilkan serapan yang kecil dibandingkan dengan serapan SPase standar sehingga aktivitas enzimatis yang dihasilkan sangat kecil. Hal ini karena SPase yang berhasil diisolasi masih berada dalam bentuk campuran dengan berbagai komponen dapar elusi seperti imidazol dan NaCl yang mungkin dapat berinteraksi dengan molekul protein sehingga mempengaruhi aktivitas enzimatisnya (Hadi, 2010). Pada SPase dari *E. coli* BL21 StarTM skala kecil diperoleh aktivitas relatif SPase rekombinan dibandingkan dengan SPase standar adalah 50% (Malik, Ishikawa, Sahlan, Ogasawara, Nguyen,& Suryadi, 2011). Dibandingkan dengan penelitian sebelumnya diperoleh hasil aktivitas relatif yang paling baik adalah SPase dari *E. coli* BL21 StarTM yang diperoleh dalam skala besar dengan aktivitas relatif sekitar 98%.

4.9 Analisis Produk Transglukosilasi Asam Askorbat dengan KLT

Protein standar maupun rekombinan digunakan untuk menganalisa aktivitas dari protein tersebut dengan menggunakan salah satu model substrat, yaitu asam askorbat. Asam askorbat 0,5% dan sukrosa 30% dalam dapar HEPES 0,1 M pH 7,5 direaksikan dengan menambahkan sukrosafosforilase dan diinkubasi pada 37 °C selama 16 jam. Hasil reaksi dianalisa menggunakan kromatografi lapis tipis menggunakan lempeng silica gel GF 60 dan fase gerak butanol : asam asetat : air (3:1:1). Fase gerak ini digunakan setelah membandingkan pemisahan yang paling baik antara asam askorbat standar dan AA2G standar menggunakan fase gerak butanol:asam asetat:air (4:1:1); (2:1:1); (3:1:1) seperti pada gambar 4.12.



Keterangan: a. butanol: asam asetat: air (4:1:1) : 1. asam askorbat $R_f = 0,5$; 2. AA2G $R_f = 0,2$
 b. butanol: asam asetat: air (2:1:1) : 1. asam askorbat $R_f = 0,85$; 2. AA2G $R_f = 0,5$
 c. butanol: asam asetat: air (3:1:1) : 1. asam askorbat $R_f = 0,6$; 2. AA2G $R_f = 0,3$

Gambar 4.12 Hasil pemisahan asam askorbat dan AA2G menggunakan KLT

Kromatografi lapis tipis merupakan teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut di antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Pada penelitian ini fase gerak yang digunakan adalah butanol : asam asetat : air (3:1:1) dan fase diam silika gel GF 60. Silika gel bersifat polar sehingga zat yang bersifat polar akan tertahan sedangkan zat yang bersifat kurang polar akan naik terbawa oleh fase gerak yang bersifat kurang polar. Asam askorbat dan asam askorbat terglisosilasi merupakan dua senyawa dengan kepolaran yang berbeda. Asam askorbat terglisosilasi bersifat lebih polar dibandingkan asam askorbat sehingga terjadi pemisahan yaitu asam askorbat terglisosilasi akan tertahan lebih dibawah dibandingkan dengan asam askorbat yang akan lebih diatas.

KLT hasil reaksi yang diperoleh tidak memberikan hasil pemisahan ditandai dengan posisi spot yang tidak berubah seperti pada gambar 4.13. Hal serupa terjadi pada waktu yang berbeda tetapi hasil pemisahan tetap tidak terjadi. Hasil KLT kemudian dianalisa menggunakan densitometri namun puncak yang dihasilkan tidak signifikan untuk menyimpulkan apakah terdapat produk yang diinginkan atau tidak karena terdapat banyak puncak yang tidak teratur.



Keterangan: a. asam askorbat $R_f = 0,75$; b. reaksi dengan sukrosafosforilase standar $R_f = 0,72$; c. reaksi dengan sukrosafosforilase rekombinan $R_f = 0,72$; d. AA2G $R_f = 0,5$ menggunakan fase gerak butanol: asam asetat: air (3:1:1)

Gambar 4.13 Hasil pemisahan asam askorbat, hasil reaksi, dan AA2G menggunakan KLT.

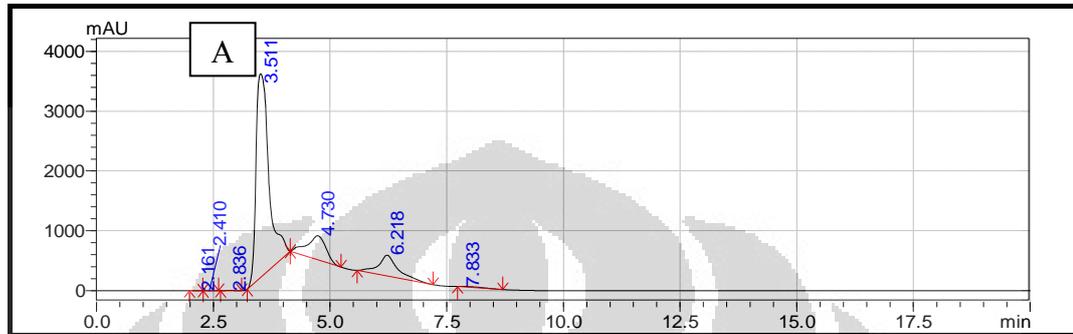
4.10 Analisis Produk Transglukosilasi Asam Askorbat dengan KCKT

Protein standar dan rekombinan dilakukan pengujian aktivitas transglukosilasi terhadap asam askorbat dengan mereaksikan asam askorbat 0,5% dan sukrosa 30% dalam dapar HEPES 0,1 M pH 7,5. SPase ditambahkan dan diinkubasi pada 37 °C selama 15 jam. Hasil reaksi kemudian dilakukan analisa menggunakan KCKT. Dalam penelitian ini kondisi KCKT yang digunakan adalah kolom C₁₈ dengan fase gerak dapar kalium fosfat/asam fosfat pH 2 pada laju alir 0,5 ml/min (Kwon, Kim, & Lee, 2007).

SPase mengkatalisis transfer dari jumlah glukosa dari sukrosa menjadi α -D-glukosa 1-fosfat (G 1-P) dengan adanya fosfat anorganik. Pada reaksi transglukosilasi reversibel, jumlah G 1-P dapat ditransfer menjadi D-fruktosa. Enzim ini memiliki substrat spesifik yang cukup ketat sebagai donor glukosil, yaitu hanya sukrosa, G 1-P, dan glukosa 1-florida yang diketahui dapat mentransfer glukosil mereka. Sebagai aseptor glukosil, substrat dengan spesifikasi senyawa grup OH fenolik dan alkoholik telah dilaporkan (Kitao & Sekine, 1994).

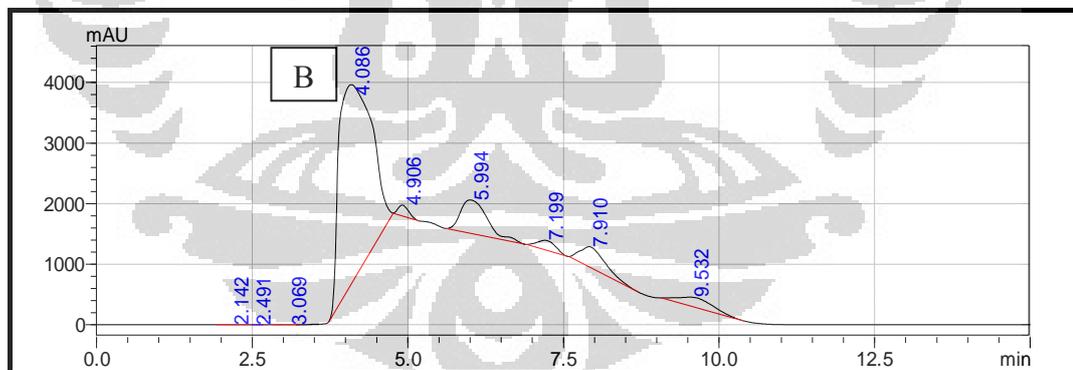
Pada penelitian ini digunakan asam askorbat sebagai substrat untuk mengetahui aktivitas transglukosilasi SPase standar dan rekombinan. Pada analisa

menggunakan KCKT ini, dilakukan penginjekan terhadap substrat yang digunakan, yaitu asam askorbat dan hasil produk yang diharapkan yaitu asam askorbat terglisosilasi (AA2G). Waktu retensi asam askorbat adalah 3,511 sedangkan AA2G adalah 4,086. Gambar dapat dilihat pada 4.14 dan 4.15.



Keterangan: A. Asam Askorbat

Gambar 4.14 Kromatogram asam askorbat 0,25% menggunakan KCKT dengan kolom C_{18} dan fase gerak 0,1 M dapar kalium fosfat/asam fosfat pH 2 dengan laju alir 0,5 ml/min detektor UV pada panjang gelombang 243 nm.

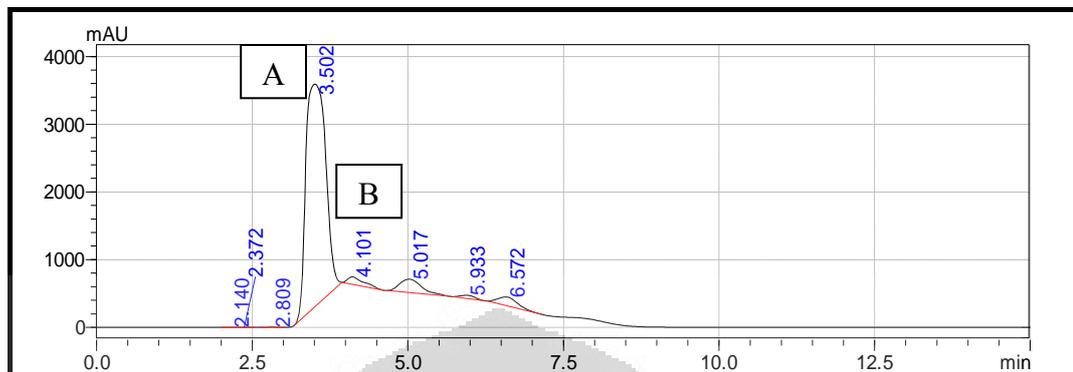


Keterangan: B. AA2G

Gambar 4.15 Kromatogram AA2G 0,1 M menggunakan KCKT dengan kolom C_{18} dan fase gerak 0,1 M dapar kalium fosfat/asam fosfat pH 2 dengan laju alir 0,5 ml/min detektor UV pada panjang gelombang 243 nm.

Penginjekan dilakukan terhadap reaksi yang belum ditambahkan sukrosafosforilase dan terdapat waktu retensi asam askorbat yaitu 3,502 juga

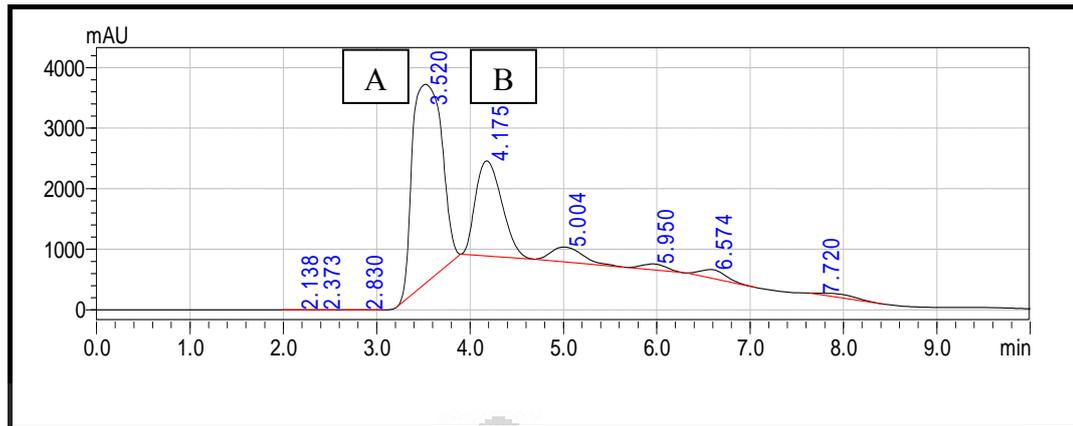
waktu retensi yang mendekati AA2G, yaitu 4,101. Dapat dilihat pada gambar 4.16.



Keterangan: A. Asam Askorbat; B. AA2G

Gambar 4.16 Kromatogram asam askorbat 0,5 % dan sukrosa 30% dalam dapar HEPES 0,1 M menggunakan KCKT dengan kolom C_{18} dan fase gerak 0,1 M dapar kalium fosfat/asam fosfat pH 2 dengan laju alir 0,5 ml/min detektor UV pada panjang gelombang 243 nm.

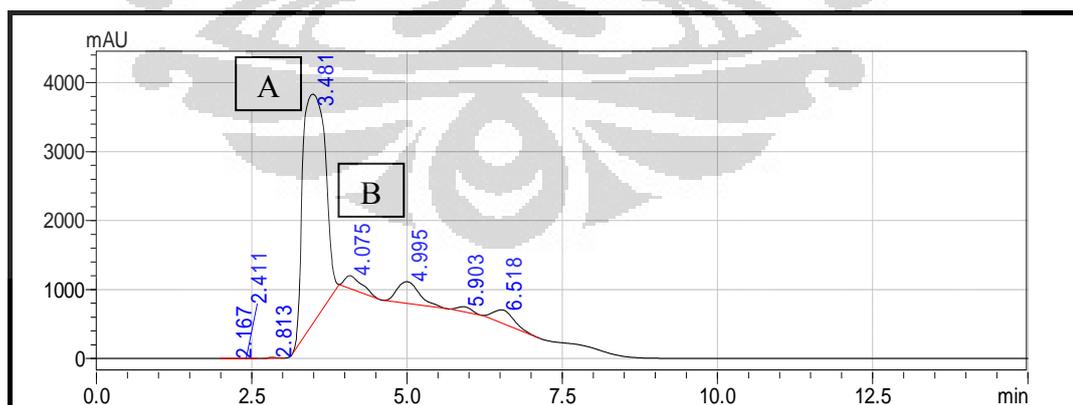
Untuk melihat pemisahan yang terjadi maka dilakukan penginjekan terhadap reaksi asam askorbat tanpa enzim yang ditambahkan dengan AA2G. Hasil pemisahan yang diperoleh kurang baik yaitu terlihat pemisahan antara asam askorbat dan AA2G dilihat dari waktu retensinya yaitu 3,520 dan 4,175 dengan resolusi 0,818. Dapat dilihat pada gambar 4.17.



Keterangan: A. Asam Askorbat; B. AA2G

Gambar 4.17 Kromatogram asam askorbat 0,5 % , AA2G 0,1 M dan sukrosa 30% dalam dapar HEPES 0,1 M menggunakan KCKT dengan kolom C₁₈ dan fase gerak 0,1 M dapar kalium fosfat/asam fosfat pH 2 dengan laju alir 0,5 ml/min detektor UV pada panjang gelombang 243 nm.

Selanjutnya dilakukan penginjekan terhadap reaksi menggunakan SPase standar dan terlihat pada gambar 4.18 bahwa kromatogram yang dominan terdapat pada waktu retensi 3,481 yang mendekati kromatogram asam askorbat. Terdapat pula kromatogram yang mendekati AA2G yang muncul sangat kecil muncul pada waktu retensi 4,075.

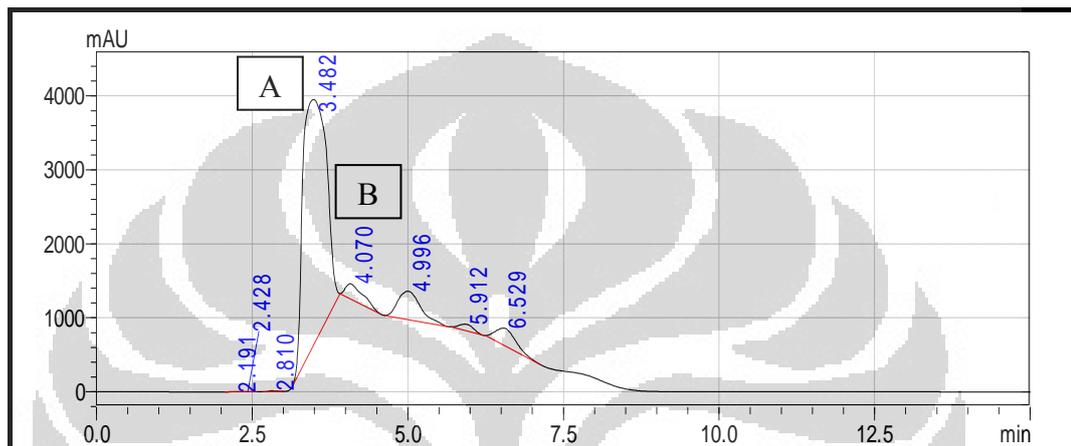


Keterangan: A. Asam Askorbat; B. AA2G

Gambar 4.18 Kromatogram hasil reaksi dengan SPase standar menggunakan KCKT dengan kolom C₁₈ dan fase gerak 0,1 M dapar kalium

fosfat/asam fosfat pH 2 dengan laju alir 0,5 ml/min detektor UV pada panjang gelombang 243 nm.

Hal serupa juga terlihat pada hasil reaksi dengan SPase rekombinan. Pada gambar 4.19 terlihat bahwa kromatogram yang dominan terdapat pada waktu retensi 3,482 yang menyerupai kromatogram asam askorbat. Kromatogram lain yang mendekati AA2G terlihat pada waktu retensi 4,070.



Keterangan: A. Asam Askorbat; B. AA2G

Gambar 4.19 Kromatogram hasil reaksi dengan SPase rekombinan menggunakan KCKT dengan kolom C_{18} dan fase gerak 0,1 M dapar kalium fosfat/asam fosfat pH 2 dengan laju alir 0,5 ml/min detektor UV pada panjang gelombang 243 nm.

Namun hasil yang diperoleh dari hasil reaksi menggunakan SPase standar maupun rekombinan tidak dapat langsung disimpulkan membentuk produk yang diinginkan. Kromatogram yang mendekati AA2G pada sampel baik dari protein standar maupun rekombinan juga terlihat pada kontrol negatif, yaitu reaksi yang belum ditambahkan enzim. Pada gambar 4.16 terlihat bahwa terdapat kromatogram yang mendekati AA2G yaitu pada waktu retensi 4,101. Hasil analisa ini membuktikan bahwa sebelum ditambahkan enzim sudah terbentuk kromatogram yang mendekati AA2G dan setelah ditambahkan enzim juga terbentuk pada waktu retensi yang mendekati. Hal ini membuktikan bahwa tidak terjadi aktivitas transglukosilasi SPase dari *Leuconostoc mesenteroides* dengan

asam askorbat yang digunakan dalam penelitian ini. Disisi lain, transglukosilasi asam askorbat menjadi asam askorbat 2-glukosida dengan adanya SPase rekombinan dari *Bifidobacterium longum* menunjukkan terjadinya reaksi ditandai dengan terdapatnya puncak yang cukup signifikan dengan waktu retensi yang sama dengan puncak asam askorbat terglukosilasi. Pada penelitian sebelumnya belum dilakukan pembuatan SPase rekombinan dengan skala besar, tetapi sintesis AA2G dari AA dan sukrosa telah diperoleh (Kwon, Taeyeon., Kim, C. T., & Lee, J.-H., 2007). Perbedaan sumber bakteri SPase inilah yang memungkinkan terjadinya perbedaan reaksi transglukosilasi sehingga tidak diperoleh produk asam askorbat terglukosilasi pada SPase yang berasal dari *Leuconostoc mesenteroides* karena terdapat perbedaan asam amino terhadap *Bifidobacterium longum* sehingga ekspresi menjadi berbeda dan aktivitas transglukosilasi juga menjadi berbeda.

4.11 Analisis Produk Transglukosilasi Asam Benzoat dengan KLT

Analisa produk transglukosilasi asam askorbat memberikan hasil yang kurang baik dan dilakukan analisa menggunakan model lain. Model yang digunakan adalah asam benzoat. Reaksi transglukosilasi asam benzoat terjadi antara 0,4% asam benzoat dan 20% sukrosa dan pH diatur menggunakan NaOH hingga 5,1. SPase ditambahkan ke dalam reaksi dan diinkubasi pada 37 °C selama 16 jam. Hasil reaksi menggunakan SPase rekombinan kemudian dianalisa menggunakan KLT dengan fase gerak asetronitril : air (70:30) (Sugimoto, K., Nomura, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al., 2007). Dari hasil KLT terjadi pemisahan yang cukup baik sehingga dapat disimpulkan terdapat zat dengan kepolaran yang berbeda seperti pada gambar 4.20. Berdasarkan hasil reaksi dapat disimpulkan sementara bahwa terjadi reaksi antara asam benzoat dan sukrosa dengan katalisis SPase.



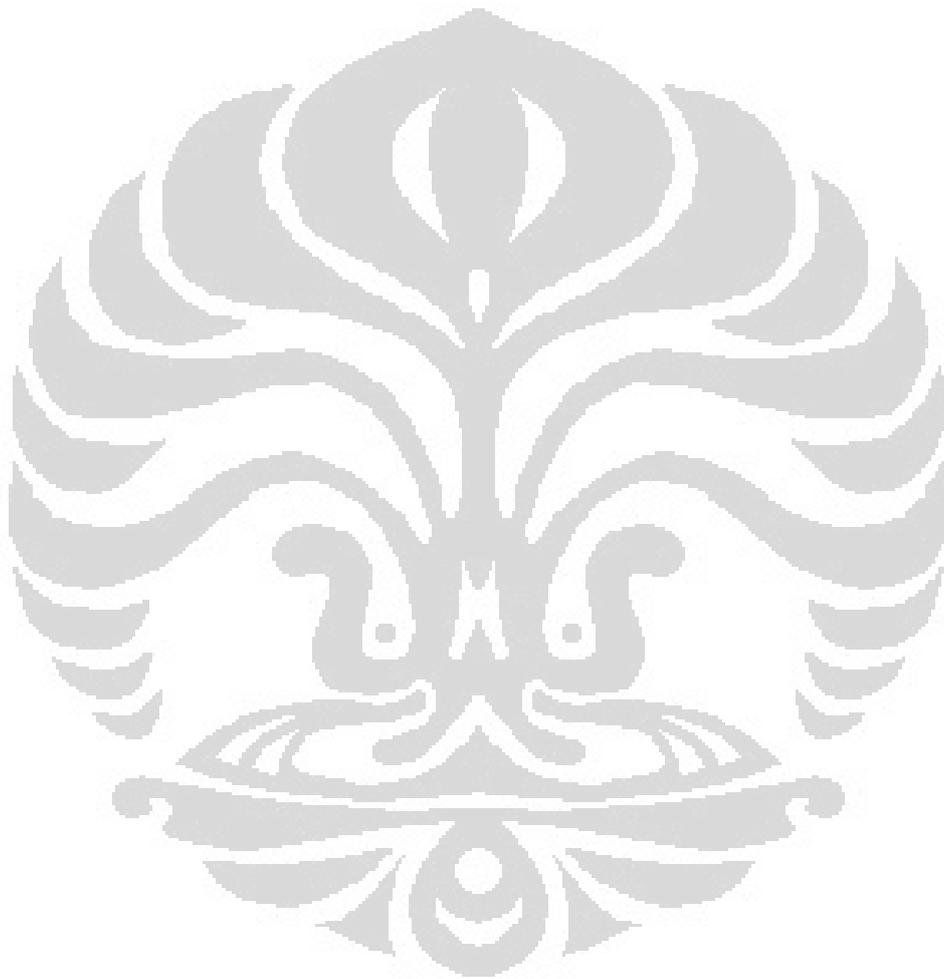
Keterangan: a. asam benzoat $R_f = 0,55$; b. reaksi dengan sukrosafosforilase standar $R_f = 0,15$; c. reaksi dengan sukrosafosforilase rekombinan $R_f = 0,2$ menggunakan fase gerak asetronitril : air (70:30)

Gambar 4.20 Hasil pemisahan asam benzoat, reaksi dengan SPase standar, dan Spase rekombinan menggunakan KLT

SPase dari *Streptococcus mutans* dan *Leuconostoc mesenteroides* menunjukkan aktivitas transglukosilasi terhadap asam benzoat. Efisiensi transglukosilasi pada pH rendah telah diamati pada SPase dari *Leuconostoc mesenteroides* dan ditemukan bahwa enzim mengkatalisis reaksi transglukosilasi asam benzoat pada pH 5. Transfer efisiensi SPase dari *Streptococcus mutans* pada asam benzoat lebih tinggi dibandingkan SPase dari *Leuconostoc mesenteroides*. Aktivitas Spase rekombinan dari *Leuconostoc mesenteroides* tidak terdeteksi pada pH 4 sedangkan Spase rekombinan dari *Streptococcus mutans* memiliki aktivitas enzim yang signifikan pada pH 4. Aktivitas dan stabilitas dibawah kondisi asam dapat menjadi penyebab terjadinya perbedaan transfer efisiensi ini (Sugimoto, K., Nomura, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al., 2007).

Pada penelitian sebelumnya dilakukan isolasi dan elusidasi hasil reaksi transglukosilasi untuk mengetahui produk yang dihasilkan apakah merupakan produk yang diinginkan. Berdasarkan hasil isolasi dan elusidasi dideteksi tiga senyawa dari reaksi asam benzoate dan sukrosa dengan adanya SPase. Senyawa tersebut adalah 1-O-benzoyl α -D-glucopyranoside, 2-O-benzoyl α -D-

glucopyranoside, dan 2-O-benzoyl β -D-glucopyranoside dengan menggunakan analisa NMR dan MS (Sugimoto, K., Nomura, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al., 2007). Namun pada penelitian ini tidak dilakukan analisa lebih lanjut setelah dilakukan KLT karena keterbatasan waktu. Maka hanya dilakukan analisa menggunakan KLT untuk melihat perubahan reaksi transglukosilasi yang dihasilkan.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Enzim SPase rekombinan telah berhasil diperoleh dalam skala besar dari *Escherichia coli* BL-21 Star™.
2. Berat molekul sesuai dengan SPase pada umumnya yaitu berkisar antara 45 hingga 66 kDa dan aktivitas relatif SPase rekombinan adalah sekitar 98 %.
3. Hasil reaksi transglukosilasi SPase rekombinan menggunakan asam benzoat menunjukkan terbentuknya kemungkinan produk turunan glikosil. Namun yang menggunakan asam askorbat tidak berhasil membentuk produk yang diinginkan.

5.2 SARAN

1. Enzim SPase rekombinan yang diproduksi dalam jumlah besar disiapkan dalam bentuk kering beku untuk penyimpanan dalam jangka panjang dan untuk pengukuran kuantitatif dan penggunaan dalam reaksi transglukosilasi lainnya.
2. Aktivitas transglukosilasi diuji terhadap substrat lain, antara lain rutin, asam asetat, dll.

DAFTAR ACUAN

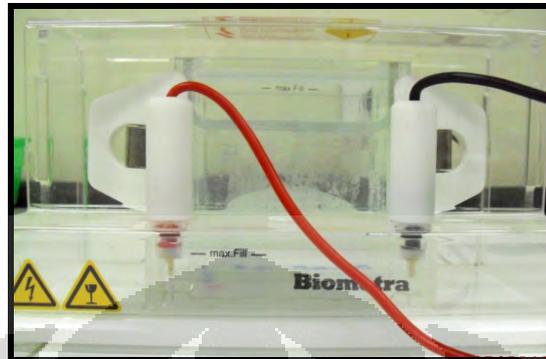
- Abada, E., Osman, M., Lee, J., & Kim, D. (2008). Molecular cloning of the gene 13555SPase encoding a sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Biotechnol*, 7, 463-468.
- Bainor, A., Chang, L., McQuade, T. J., Webb, B., Gestwicki, J. E. (2011). Bicinchoninic Acid (BCA) Assay in Low Volume. *Anal Biochem*. 410, 310-312.
- Bintang, Maria. (2010). *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Penerbit Erlangga, 37-42, 161-166.
- Boyer, R. (2000). *Modern experimental biochemistry*. California: Addison Wesley, 75.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Connors, KA, Gordon LA & Valentino JS. (1992). *Stabilitas Kimia Sediaan Farmasi edisi satu* diterjemahkan dari *Chemical Stability of Pharmaceuticals* oleh Didik G. IKIP Semarang Press : 181-182.
- David, S. (1997). *Prinsip-prinsip Biokimia*. Jakarta: Penerbit Erlangga, 54.
- Departemen Kesehatan RI. (1995). *Farmakope Indonesia IV*. (1995). Jakarta, 39, 47.
- Firdausi, W. (2009). *Karakterisasi Enzim Sukrase dari Isolat-isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Ekspolisakarida dengan SDS PAGE*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Hadi, E. S. (2010). *Eksresi dan Karakterisasi Sukrosafosforilase Rekombinan dari Escherichia coli DH5α Asal Galur Bakteri Asam Laktat Leuconostoc mesenteroides MBFWRS-3(1) Menggunakan SDS PAGE dan Berdasarkan Produk Transglukosilasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, 115-127.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid. *J. Biol. Chem.*, 280, 309-316.
- Holme, D.J., & Hazel Peck. (1998). *Analytical biochemistry 3rd edition*. London: Addison Wesley Longman, 45, 77.

- Jeffery, G. H. et al. (1989). *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis fifth edition*. New York : Longman Scientific and Technical, 194, 220, 229.
- Kim, M., Kwon, T., Lee, H. J., Kim, K. H., Chung, D. K., Ji, G. E., et al. (2003). Cloning and Expression of Sucrose Phosphorylase Gene From *Bifidobacterium longum* in *E. coli* and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Biotechnol Lett*, 25, 1211-1217.
- Kitao, S., & Sekine, H. (1994). Synthesis of Two Kojic Acid Glucosides with Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 419-420.
- Koga T., K Nakamura, Y. Shirokane, K. Mizusawa, S. Kitao, M. Kikuchi. (1991). Purification and Some Properties of Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Agri. Bio. Chem.*, 35, 1805-1810.
- Kwon, Taeyeon., Kim, C. T., & Lee, J.-H. (2007). Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid 2- glucoside by a recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium longum*. *Biotechnol Lett.*, 29, 611-615.
- Kyung, H., Lee, S.-B., Park, C.-S., Shim, J.-H., Lee, H.-Y., Kim, M.-J., et. al. (2002). Modification of Ascorbic Acid Using Transglycosylation Activity of *Bacillus stearothermophilus* Maltogenic Amylase to Enhance Its Oxidative Stability. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3309-3316.
- Laemli, U. K., Cleaveland, D. W., Fischer, S. G., & Kirschner, M. W. (1977). Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 252, 1102-1106.
- Lee, J.-H., Moon, Y.-H., Kim, N., Kim, Y.-M., Kang, H.-K., Jung, J.-Y., et al. (2008). Cloning and Expression of the Sucrose Phosphorylase Gene From *Leuconostoc mesenteroides* in *E. coli*. *Biotechnol Lett.*, 30, 749-754.
- Lee, J.-H., Yoon, S.-H., Nam, S.-H., Moon, Y.-H., Moon, Y.-Y., & Kim, D. (2006). Molecular Cloning of a Gene Encoding the Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1149 and the Expression in *Escherichia coli*. *Enzyme Microbial Technol.*, 39 (4), 612-620.
- Malik, A., Ishikawa, S., Sahlan, M., Ogasawara, N., Ngunyen, U. Q., & Suryadi, H. (2011). Screening for sucrose phosphorylase in exopolysaccharide producing-lactic acid bacteria reveals SPaseWRS-3(1) in *Leuconostoc mesenteroides* isolated from sugar containing-beverage "Wedang Ronde" from Indonesia. *African J. Biotechnol.*, 74, 10, 16915-16923.
- Mikkelsen S.R., E. Corton. (2004). *Bioanalytical Chemistry*. New Jersey: A John Wiley & Sons Inc, 63.

- Mirza, O., Skov, L. K., M, L. A., Broek, V. D., & Beldman, G. (2006). Structural Rearrangements of Sucrose Phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* during Sucrose Conversion. *J. Biol. Chem.*, 281, 35576-35584.
- Murray R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell. (2003). *Harper's Illustrated Biochemistry 26th edition*. McGraw-Hill Inc. New York, 14-72.
- Nelson D.L., M.M. Cox. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry 4th edition*. New York: WH Freeman and Company, 41, 85.
- Nomura, Koji., Sugimoto, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al. (2008). Glucosylation of acetic acid by sucrose phosphorylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1, 82-87.
- Robichon, C., Luo, J., Causey, T., Benner, J., Samuelson, J. (2011). Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) Derivative Strains To Minimize *E. coli* Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 4634-4646.
- Schagger, H. (2006). *Tricine-SDS-PAGE*. Frankfurt: Nature Protocols.
- Schoel, B., Welzel, M., Kaufmann, S. H. E. (1995). Quantification of Protein in Dilute and Complex Samples: Modification of the Bicinchoninic Acid Assay. *J. Biochem. Biophys.* 30, 199-206.
- Shin, M. H., Cheong, N.-Y., Lee, J.-H., & Kim, K. H. (2009). Transglucosylation of Caffeic Acid by a Recombinant Sucrose Phosphorylase. *Food Chem.*, 115, 1028-1033.
- Shin, M. H., Jung, M. W., Lee, J.-H., Kim, M. D., & Kim, K. H. (2008). Strategies for Producing Recombinant Sucrose Phosphorylase Originating from *Bifidobacterium longum* in *Escherichia coli* JM109. *Process Biochem.*, 43, 822-828.
- Sprogøe, D., Van Den Broek, L., Mirza, O., Kastrup, J., Voragen, A., Gajhede, M., et al. (2004). Crystal Structure of Sucrose Phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis*. *J. Biochem.*, 43(5), 1156-1162.
- Sugimoto, K., Nomura, K., Nishiura, H., Ohdan, K., Nishimura, T., Hayasi, H., et al. (2007). Novel transglucosylating reaction of sucrose phosphorylase to carboxylic compounds such as benzoic acid. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 1, 22-29.
- Silverstein R., Voet, J., Reed, D., & Abeles, R. H. (1966). Purification and Mechanism of Action of Sucrose Phosphorylase. *J. Bio. Chem.*, 242 (6): 1338-1346.

- Takuro K, (1991). Purification and some properties of sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Agri. Bio. Chem.*, 55 (7), 1805-1810.
- Tedokon, M., Suzuki, K., Kayamori, Y., Fujita, S., & Katayama, Y. (1992). Enzymatic Assay of Inorganic Phosphate with Use of Sucrose Phosphorylase and Phosphoglucomutase. *Clin. Chem.*, 38 (4), 512-515.
- Tranggono, RI dan Fatma L. (2007). *Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik*. Jakarta : Gramedia: 119.
- Van Den Broek, L. A., Van Boxtel, E. L., Kievit, R. P., Verhoef, R., Beldman, G., & Voragen, A. G. (2004). Physico-chemical and Transglucosylation Properties of Recombinant Sucrose Phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. *Appl. Microbiol. Cell. Physi.*, 65, 219-227.
- Walsh, G. (2007). *Pharmaceutical biotechnology concepts and applications*. West Sussex: John Wiley & Sons, 29.
- Windholz, M., Budavari, S., Stroumstos, L. Y., Fertig, M.N. (1976). *The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals and Drugs, Ninth Edition*. USA: Merck & Co., Inc.
- Zhang, Z., Li, J., Liu, L., Sun, J., Hua, Z., Du, G., et al. (2011). Enzymatic transformation of 2-O- α -d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid (AA-2G) by immobilized α -cyclodextrin glucanotransferase from recombinant *Escherichia coli*. *J. Mol. Catalysis B: Enzy.*, 68, 223–229.



LAMPIRAN 1: Gambar Alat-alat yang Digunakan Dilaboratorium

Gambar 4.21 Alat Elektroforesis



Gambar 4.22 Mikrosentrifuse dengan pendingin



Gambar 4.23 *Orbital Shaker Incubator*



Gambar 4.24 Spektrofotometer GeneQuant[®]



Gambar 4.25 Spektrofotometer UV-Vis



Gambar 4.26 Sonikator pemecah sel.



Gambar 4.27 Proses purifikasi protein rekombinan menggunakan His TrapTM FF 1 ml



Gambar 4.28 His TrapTM FF 1 ml

LAMPIRAN 2: Sertifikat Analisis Sukrosafosforilase standar

ORIENTAL YEAST CO., LTD.



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

PHONE:03(3968) 1192
+81-3-3968-1192
FAX :03(3968) 4863
+81-3-3968-4863

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

ASSAY DATA

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

Standard: SP-93

Lot No.: 32793102

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

Date of assay: October 13, 2011 *K. Totouya*

Approved by: M. Kagei Shipment: Conformable

Storage: below -20 °C

Other details of the assay procedure are available upon request.

for laboratory use only

LAMPIRAN 3: 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 (6384) 1222 FAX : 06 (6338) 3474 | |
| ASSAY DATA | | | |
| GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE | | | |
| <i>from Leuconostoc mesenteroides</i> | | | |
| D-Glucose-6-phosphate: NADP⁺ 1-oxidoreductase (EC 1.1.1.49) | | | |
| Standard: G-6-PDH(L.M.)-63 | | | |
| Lot No.: <u>36063902</u> | | | |
| | Specification | Result | |
| Activity | — | <u>1,000</u> | U/vial |
| Specific activity | > 400 U/mg protein | <u>892</u> | U/mg protein |
| Contaminants (as G-6-PDH activity = 100%): | | | |
| Hexokinase | < 0.01 % | <u>0.000</u> | % |
| Phosphoglucose isomerase | < 0.005 % | <u>0.000</u> | % |
| Phosphogluconate dehydrogenase | < 0.001 % | <u>0.000</u> | % |
| Creatine kinase | < 0.001 % | <u>0.000</u> | % |
| Glutathione reductase | < 0.001 % | <u>0.000</u> | % |
| Phosphoglucomutase | < 0.001 % | <u>0.000</u> | % |
| Myokinase | < 0.001 % | <u>0.000</u> | % |
| Lactate dehydrogenase | < 0.01 % | <u>0.000</u> | % |
| State: Lyophilized powder of highly purified enzyme | | | |
| One mg of powder contains the following | | | |
| Protein | 400 ± 300 µg | <u>500</u> | µg |
| K-PO ₄ | 200 ± 150 µg | <u>200</u> | µg |
| Na-citrate | 400 ± 300 µg | <u>300</u> | µg |
| Date of assay: | <u>2009/01/06</u> |  | |
| Approved by: | <u>M. Kagei</u> | Shipment : <u>Conformable</u> | |
| Storage: below -20°C | | | |
| Other details of the assay procedure are available upon request. | | | |
| for laboratory use only | | | |

LAMPIRAN 4: Sertifikat Analisis Glukosa-1,6-bifosfat

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=G5875&LotNo=025K3793...>

Certificate of Analysis
SIGMA-ALDRICH

Product Name
α-D-Glucose, 1,6-bisphosphate trihydrate (α-D-glucopyranosylammonium salt hydrate)
95-100%

Product Number
G5875

Product Brand
SIGMA

CAS Number
71862-13-0

Molecular Formula
C₆H₁₂O₁₂P₂ · 4C₂H₅NH₃⁺ · H₂O

Molecular Weight
736.37 (anhydrous basis)

Storage Temp
-20°C

TEST

APPEARANCE
WHITE TO OFF-WHITE POWDER

SOLUBILITY
CLEAR COLORLESS TO VERY PASTY YELLOW SOLUTION AT 50 MG/ML IN WATER

WATER BY KARL FISCHER
NMT 5 MOLES/MOLE

SOLVENT CONTENT BY GC
APPROX. 4 MOLES/MOLE

CYCLOHEXYLAMINE CONTENT
NLT 95% BASED ON ENZYMIC ASSAY, PHOSPHORUS AND ELEMENTAL ANALYSIS

PURITY*
CORRECTED FOR WATER, SOLVENT, SALT AND ELEMENTAL ANALYSIS

LOT IDENTIFICATION RESULTS

WHITE POWDER

CLEAR COLORLESS

4 MOLES/MOLE

0.4% METHANOL

3.5 MOLES/MOLE

95%

JANUARY 2008

QC RELEASE DATE

Kenny Burbeck
Kenny Burbeck, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri, USA

LAMPIRAN 5 : Sertifikat Analisis NADP⁺

ORIENTAL YEAST CO.,LTD.

OSAKA BIO PLANT

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

PHONE : 06 (6384) 1222
FAX : 06 (6338) 3474

ASSAY DATA

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

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

Lot No. 045906

| | Specification | Result |
|--|--|---|
| Purity | ≥93% | <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> |

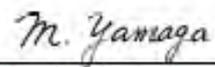
Date of assay: 2009/05/28 *Michiko. V*

Approved: M. Kagei Shipment: Conformable

Other details of the assay procedure are available upon request.

for laboratory use only

LAMPIRAN 6: Sertifikat Analisis Asam Askorbat

|  | | CERTIFICATE OF ANALYSIS | | February 8 2011 | |
|---|----------------------|---|--|-----------------|--|
| Product name | : L(+)-Ascorbic Acid | NACAL TESQUE, INC. Manufacturing Department 17 Ishihashi, Keicho-cho Wako, Kyoto 617-0004 TEL: +81-(0)75-251-1730 FAX: +81-(0)75-251-1763 | | | |
| Product number | : D3420-52 | | | | |
| Grade | : GR | | | | |
| Lot number | : M1B6244 | | | | |
| Package size | : 25g | | | | |
| Test Item | Specification | Results | | | |
| Assay(C ₆ H ₈ O ₆)% | min. 99.6 | 99.6 | | | |
| Solubility in water | Passes test | Passed test | | | |
| Specific rotation[α] _D 20 deg. | +20.5 - +21.5 | +21.3 | | | |
| Loss on drying(at 105 deg.-C)% | max. 0.1 | max. 0.1 | | | |
| Residue on Ignition(as sulfate)% | max. 0.05 | max. 0.05 | | | |
| Chloride(Cl)% | max. 0.005 | max. 0.005 | | | |
| Sulfate(SO ₄)% | max. 0.002 | max. 0.002 | | | |
| Copper(Cu)ppm | max. 0.3 | max. 0.3 | | | |
| Zinc(Zn)ppm | max. 0.2 | max. 0.2 | | | |
| Lead(Pb)ppm | max. 5 | max. 5 | | | |
| Iron(Fe)ppm | max. 2 | max. 2 | | | |
| Nickel(Ni)ppm | max. 5 | max. 5 | | | |
|  Inspecting Section Manager | | | | | |

LAMPIRAN 7: Sertifikat Analisis AA2G

CERTIFICATE OF ANALYSIS : 070-04583 1/1 ページ



Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan

Certificate of Analysis

Product Number : 070-04583
 Chemical Name : 2-O-alpha-D-Glucopyranosyl-L-ascorbic Acid
 Grade : for Biochemistry
 Lot Number : LAE3706
 Unit : 10g

| TEST | SPECIFICATION | RESULT |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------|
| Appearance | White-pale yellow crystalline powder | Passed |
| Solubility in water | to pass test (clear-nearly clear) | Clear |
| Loss on drying (105 deg.C) | max. 0.2% | 0.0% |
| Assay (HPLC) | min. 99.0% | 99.9% |
| Date of QC-Release | | Nov. 24, 2011 |

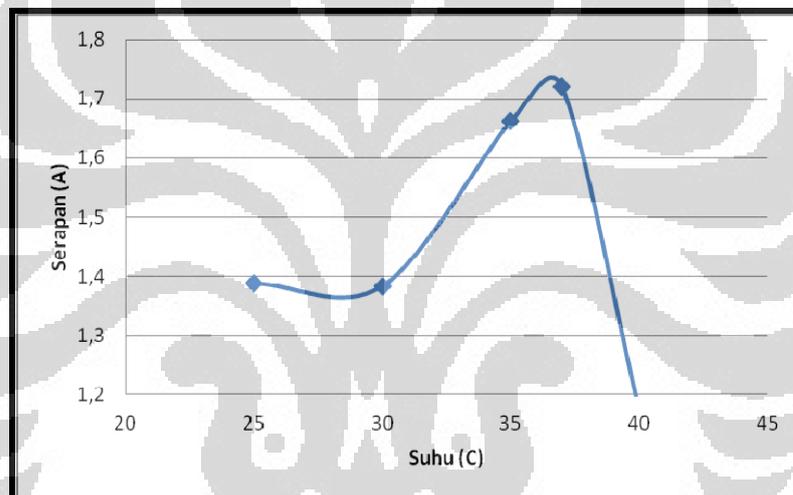
M. Nanaura
Mitsuo Nanaura General Manager
Q.A. Department

Date of issue : Apr. 23, 2012
Issuing Number : 7836338

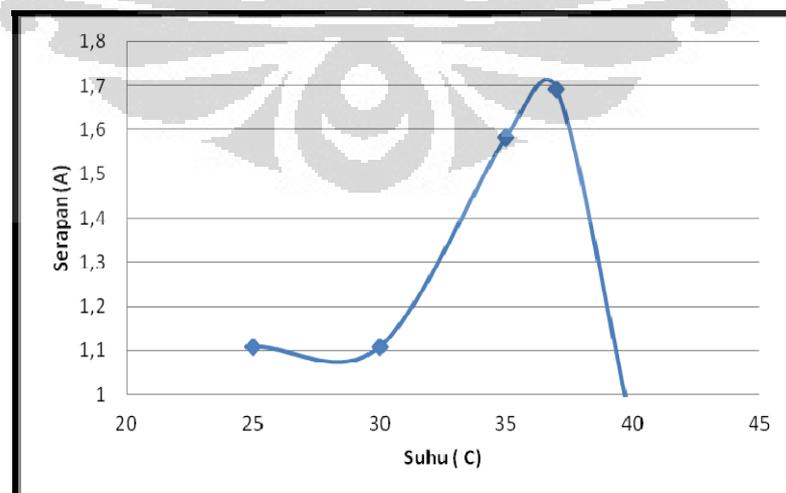
This is an electronically generated document

LAMPIRAN 8 : Hubungan Antara Suhu dan Aktivitas SPase Standar dan Rekombinan

| Suhu (°C) | Serapan Std (A) | Serapan Rek (A) |
|------------|-----------------|-----------------|
| 25 | 1,3879 | 1,1086 |
| 30 | 1,3834 | 1,1079 |
| 35 | 1,6614 | 1,5835 |
| 37 | 1,7195 | 1,691 |
| 40 | 1,1739 | 0,9157 |



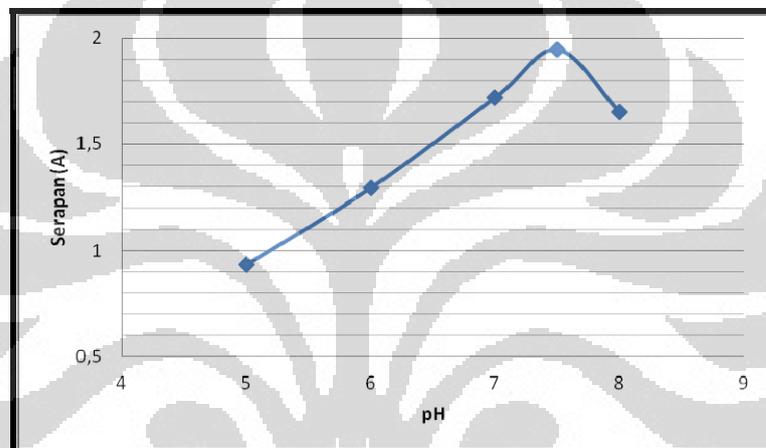
Serapan SPase Standar terhadap Suhu



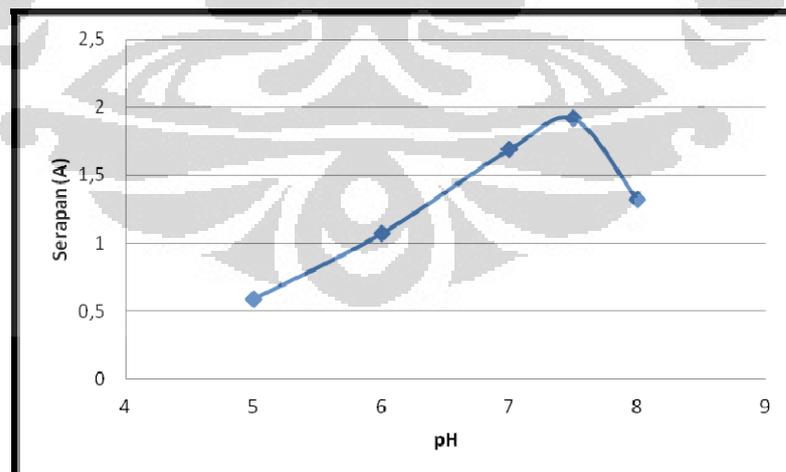
Serapan SPase Rekombinan terhadap Suhu

LAMPIRAN 9 : Hubungan Antara pH dan Aktivitas SPase Standar dan Rekombinan

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



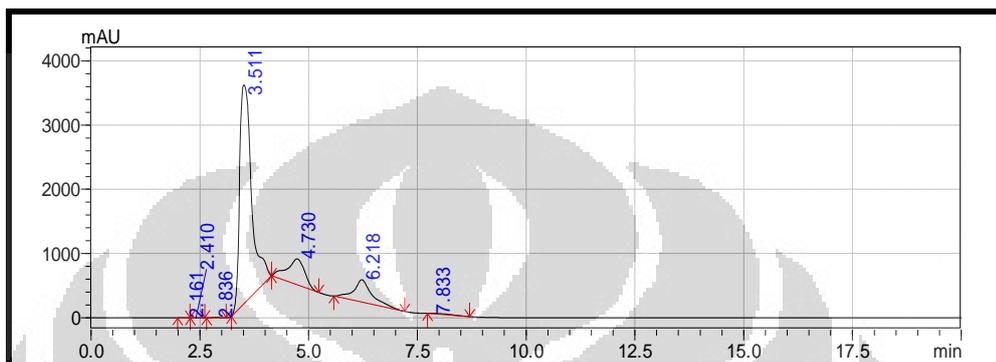
Serapan SPase Standar terhadap pH



Serapan SPase Rekombinan terhadap pH

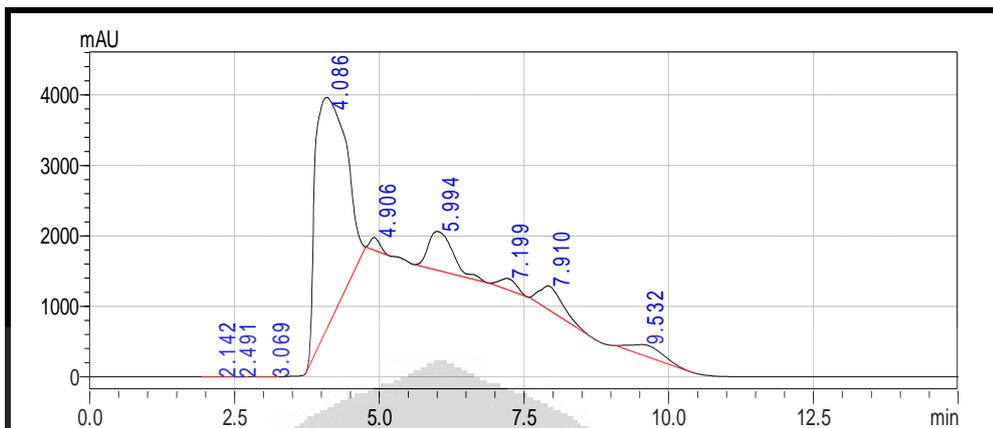
LAMPIRAN 10 : Kromatogram menggunakan KCKT dengan kolom C₁₈ dan fase gerak 0,1 M dapar kalium fosfat/asam fosfat pH 2 dengan laju alir 0,5 ml/min detektor UV pada panjang gelombang 243 nm.

1. Asam askorbat 0.25 %



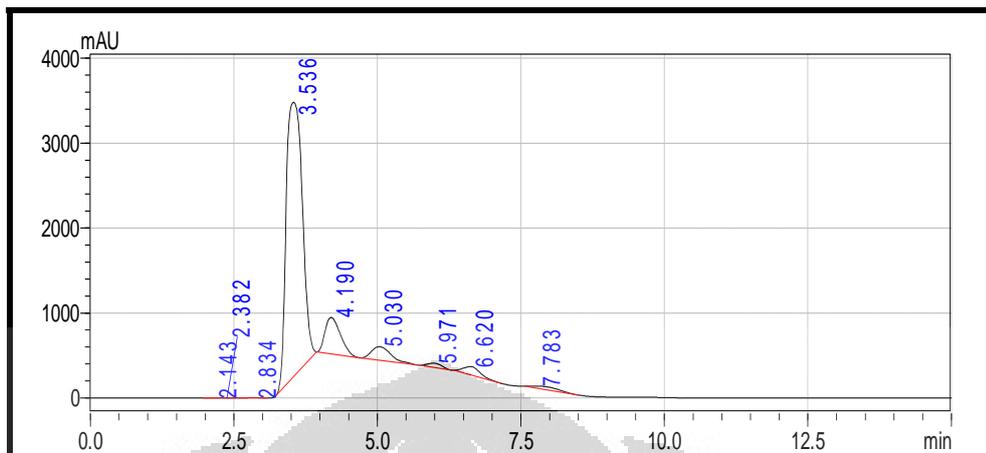
| Ret. Time | Area |
|-----------|----------|
| 2.161 | 7130 |
| 2.410 | 16293 |
| 2.836 | 53725 |
| 3.511 | 65349012 |
| 4.730 | 11341804 |
| 6.218 | 10097400 |
| 7.833 | 350468 |

2. AA2G 0.1 M



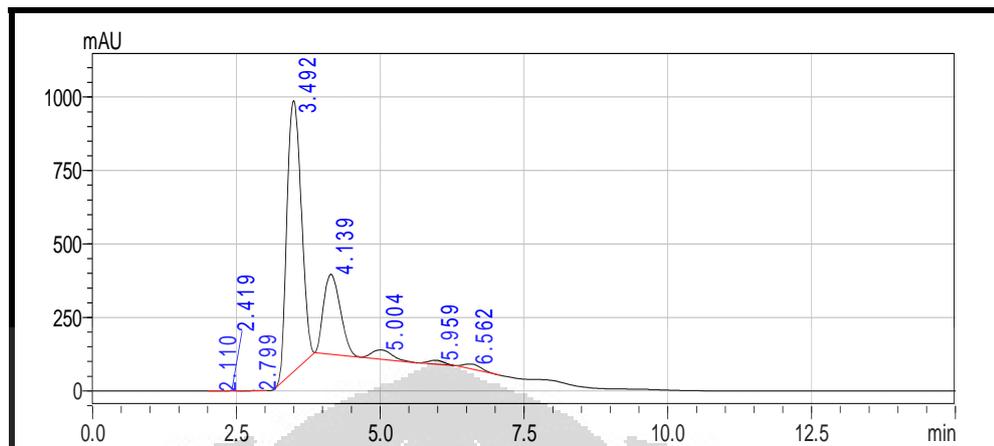
| Ret. Time | Area | Area% |
|-----------|-----------|---------|
| 2.142 | 20755 | 0.0133 |
| 2.491 | 7597 | 0.0049 |
| 3.069 | 11963 | 0.0076 |
| 4.086 | 118952870 | 76.0422 |
| 4.906 | 2042109 | 1.3054 |
| 5.994 | 16511217 | 10.5550 |
| 7.199 | 3201195 | 2.0464 |
| 7.910 | 9542572 | 6.1002 |
| 9.532 | 6139712 | 3.9249 |

3. HEPES 0.1 M



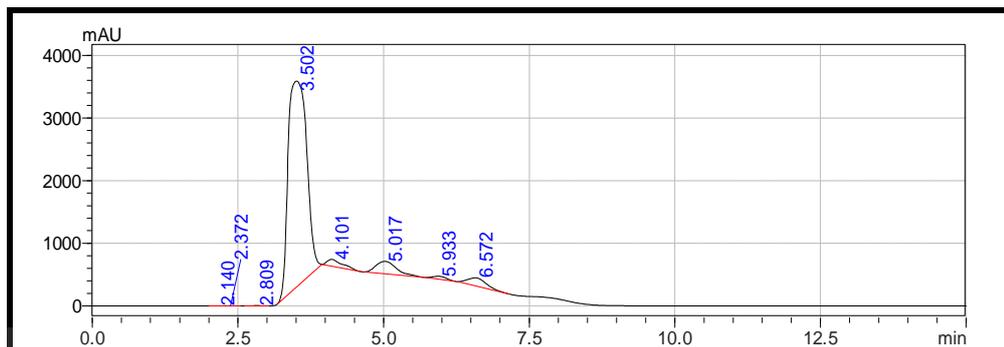
| Ret. Time | Area | Area% |
|-----------|----------|---------|
| 2.143 | 5092 | 0.0064 |
| 2.382 | 2606 | 0.0033 |
| 2.834 | 82812 | 0.1045 |
| 3.536 | 63346144 | 79.9696 |
| 4.190 | 8054189 | 10.1678 |
| 5.030 | 3783074 | 4.7758 |
| 5.971 | 845971 | 1.0680 |
| 6.620 | 2031454 | 2.5646 |
| 7.783 | 1061420 | 1.3400 |

4. Sukrosa 30%



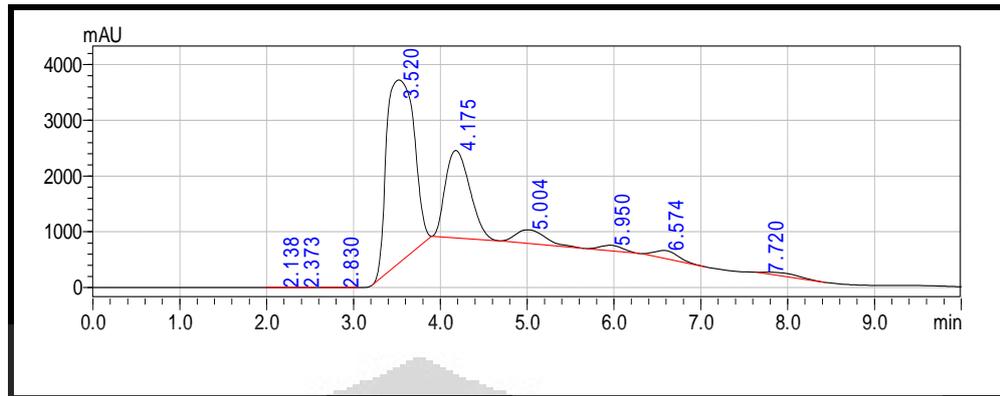
| Ret. Time | Area | Area% |
|-----------|----------|---------|
| 2.110 | 3258 | 0.0142 |
| 2.419 | 10159 | 0.0441 |
| 2.799 | 12828 | 0.0557 |
| 3.492 | 16093463 | 69.9298 |
| 4.139 | 5530172 | 24.0299 |
| 5.004 | 774093 | 3.3636 |
| 5.959 | 244968 | 1.0644 |
| 6.562 | 344790 | 1.4982 |

5. Asam askorbat 0.5% + Sukrosa 30% + HEPES 0.1 M



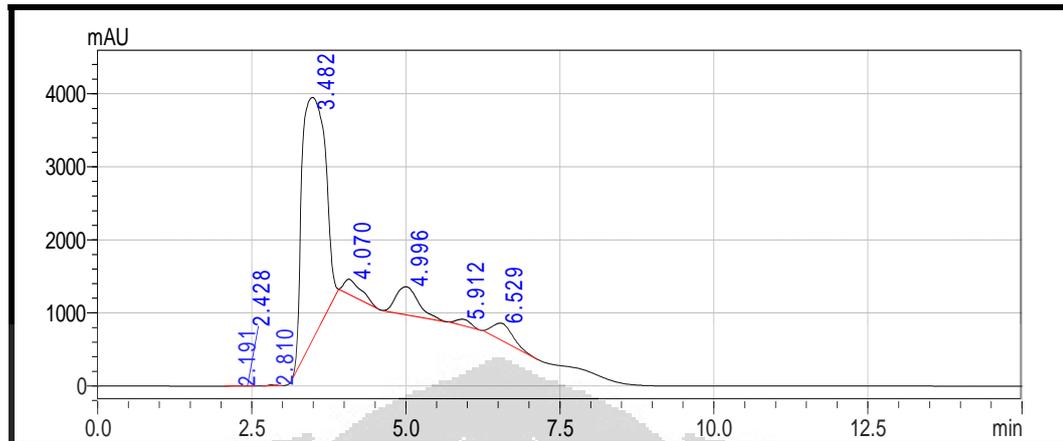
| Ret. Time | Area | Area% |
|-----------|----------|---------|
| 2.140 | 3370 | 0.0040 |
| 2.372 | 4141 | 0.0049 |
| 2.809 | 39142 | 0.0467 |
| 3.502 | 73075393 | 87.2747 |
| 4.101 | 2080627 | 2.4849 |
| 5.017 | 4904721 | 5.8578 |
| 5.933 | 747109 | 0.8923 |
| 6.572 | 2875805 | 3.4346 |

6. Asam askorbat 0.5% + AA2G 0.1 M + Sukrosa 30% +HEPES 0.1M



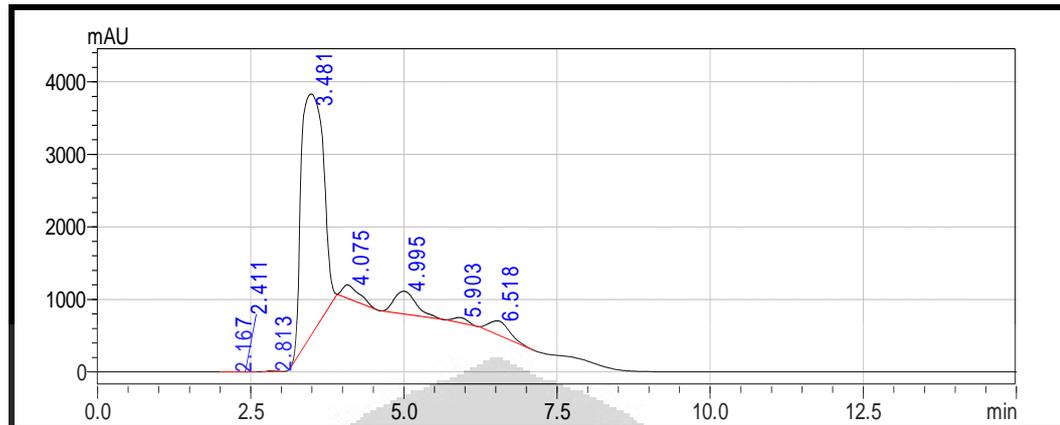
| Ret. Time | Area | Area% |
|-----------|----------|---------|
| 2.138 | 2685 | 0.0023 |
| 2.373 | 7403 | 0.0064 |
| 2.830 | 35224 | 0.0307 |
| 3.520 | 72590049 | 63.1678 |
| 4.175 | 30851412 | 26.8469 |
| 5.004 | 5760076 | 5.0124 |
| 5.950 | 1727084 | 1.5029 |
| 6.574 | 2644531 | 2.3013 |
| 7.720 | 1297719 | 1.1293 |

7. Sampel Spase Rekombinan



| Ret. Time | Area | Area% |
|-----------|----------|---------|
| 2.191 | 478 | 0.0004 |
| 2.428 | 14400 | 0.0133 |
| 2.810 | 92222 | 0.0852 |
| 3.482 | 87522879 | 80.8256 |
| 4.070 | 4263979 | 3.9377 |
| 4.996 | 9692438 | 8.9508 |
| 5.912 | 1412969 | 1.3048 |
| 6.529 | 5286725 | 4.8822 |

8. Sampel Spase Standar



| Ret. Time | Area | Area% |
|-----------|----------|---------|
| 2.167 | 1456 | 0.0014 |
| 2.411 | 15938 | 0.0158 |
| 2.813 | 118077 | 0.1170 |
| 3.481 | 83627530 | 82.8559 |
| 4.075 | 3753393 | 3.7188 |
| 4.995 | 7925799 | 7.8527 |
| 5.903 | 1130841 | 1.1204 |
| 6.518 | 4358216 | 4.3180 |

LAMPIRAN 11 : Skema Alur Kerja Penelitian