

**ANALISIS FUNGSIONAL DUA GLIKOSILTRANSFERASE  
DALAM BIOSINTESIS KANAMYSIN**

**HILDA SUCIPTO**

**0304037043**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN KIMIA  
DEPOK  
2008**

**ANALISIS FUNGSIONAL DUA GLIKOSILTRANSFERASE  
DALAM BIOSINTESIS KANAMYSIN**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

**Oleh:**

**HILDA SUCIPTO**

**0304037043**



**DEPOK**

**2008**

SKRIPSI : ANALISIS FUNGSIONAL DUA GLIKOSILTRANSFERASE  
DALAM BIOSINTESIS KANAMYSIN

NAMA : HILDA SUCIPTO

NPM : 0304037043

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, 22 DESEMBER 2008



Prof. Usman Sumo Friend Tambunan

PEMBIMBING

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana : 22 Desember 2008

Penguji I : .....

Penguji II : .....

Penguji III : .....

**Life is like a novel ,**

**I have no idea what's going to happen until I turn the page.**

**" Page 1 : Life is like a box of chocolate ,**

**You'll never know what you will get.**

**Page 2 : Life is like rock climbing,**

**You'd better try many rocks before moving up .**

**Page 3 : Life is like sea kayaking ,**

**Paddling evenly, right and left .**

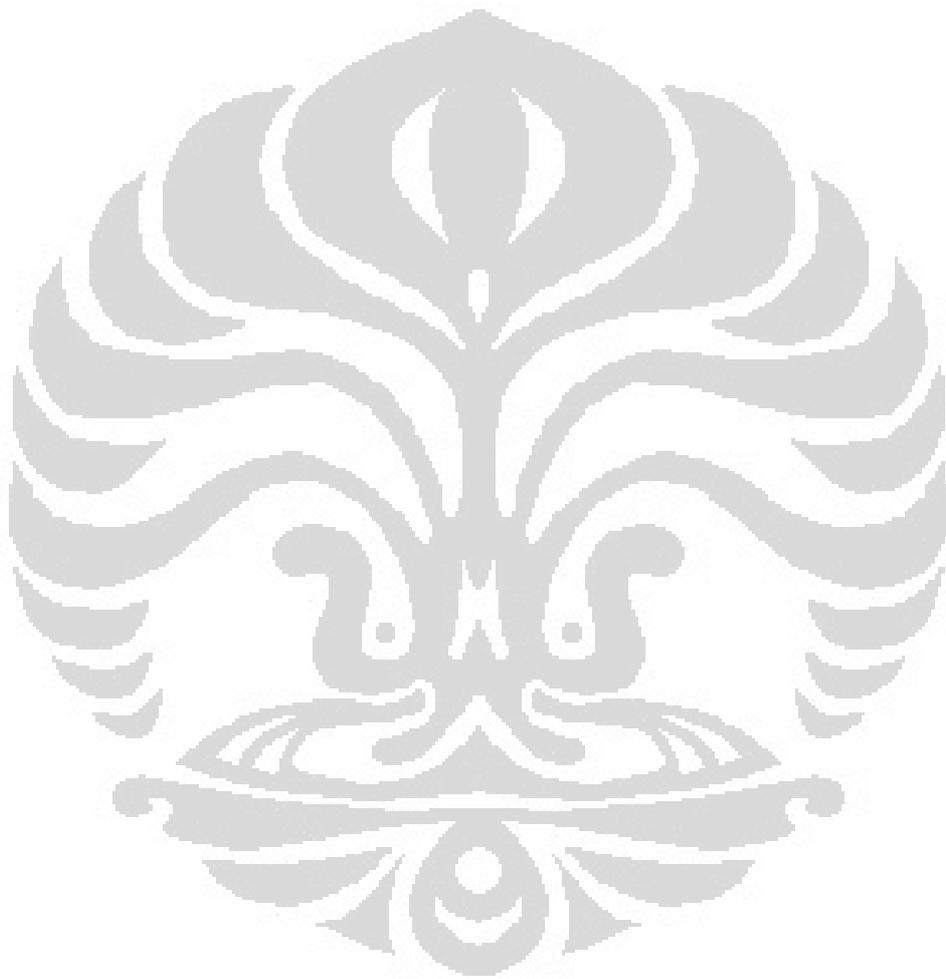
**Page 4 : Life is like climbing Mt. Fuji ,**

**The top seems so close ,**

**Only a patient and perseverant person will reach it. "**

**I can't wait the excitement of the next page that I'm going to write  
patiently and thoughtfully.**

**For all the people and all the things that have filled up my previous  
chapters of life.**



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Sang Buddha atas karma baik ini sehingga penulisan skripsi berjudul " Analisis Fungsional Dua Glikosiltransferase dalam Biosintesis Kanamycin" ini dapat diselesaikan dengan baik dan tepat pada waktunya.

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Prof. Tadashi Eguchi dan Prof. Usman Sumo F.T selaku pembimbing penelitian yang telah memberikan waktu, perhatian dan bimbingannya selama setahun penelitian ini. Rasa terima kasih juga ingin diucapkan penulis kepada Dr. Fumitaka Kudo, Dr. Eriko Nango, Kenichi Yokoyama serta seluruh anggota laboratorium Eguchi yang telah banyak mengajarkan berbagai pengetahuan kepada penulis selama penulis melakukan penelitian.

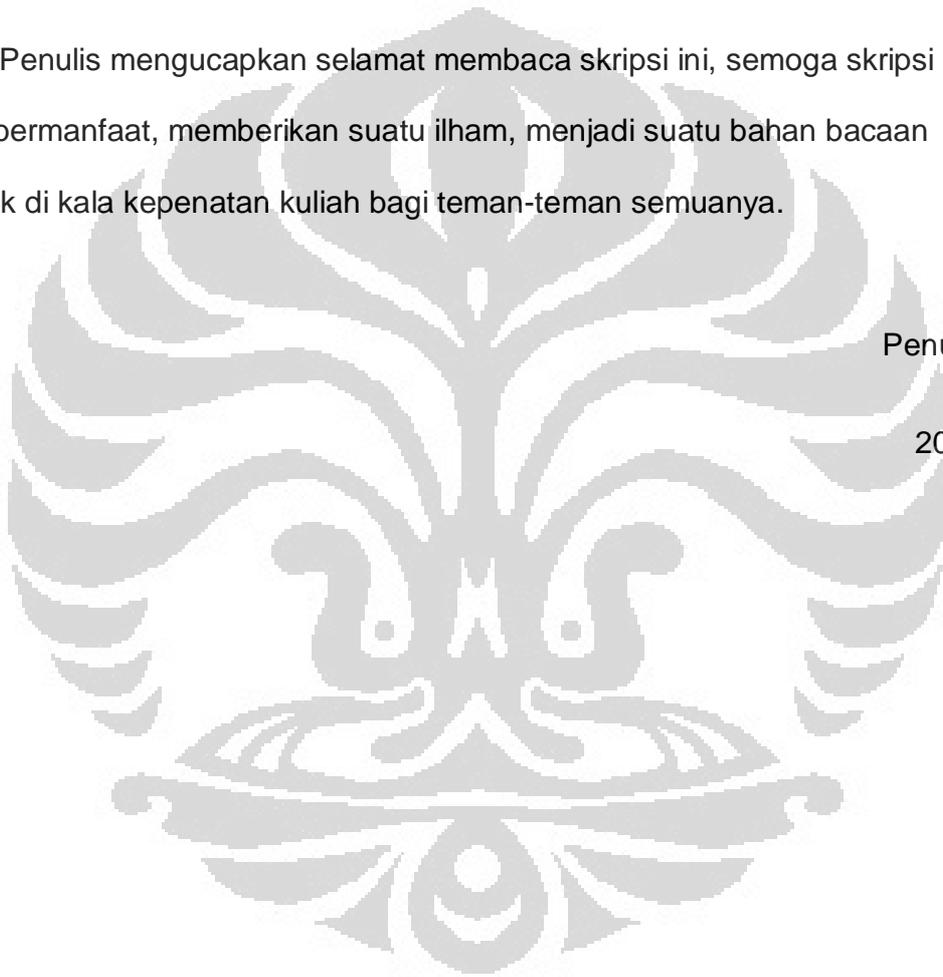
Rasa penghargaan juga ingin disampaikan penulis kepada Dr. Endang Saepudin selaku pembimbing akademis, Prof. Endang Asijati, Dr. rer.nat Widayanti Wibowo, Drs. Widyastuti, Dr. Jarnuzi Gunlazuardi, Dr. Ivandini Tribidasari, Drs. Tresye Utari, Ibu Yani Humusta, Pak Sumi Hudyono, Ibu Susi, Dra. Siswati Setiasih yang telah memberikan pencerahan, pendapat, ide, berbagi pandangan hidup dan pengalaman dengan penulis. Terima kasih juga kepada seluruh staff pengajar dan seluruh staff pendukung Departemen Kimia FMIPA UI atas kerja sama dan dukungannya.

Terima kasih kepada teman-teman angkatan 2004 ( Alex, Kurnia, Tina Wuri, dan lain-lain), teman-teman angkatan atas maupun bawah, dan teman-

teman di luar kampus yang telah memberikan semangat kepada penulis selama ini, semoga kita semua menjadi orang yang berguna bagi orang lain.

Skripsi ini dipersembahkan penulis untuk ayah, ibu dan kakak yang tidak pernah berhenti memberikan dukungan, kepercayaan dan kasih kepada penulis.

Penulis mengucapkan selamat membaca skripsi ini, semoga skripsi ini dapat bermanfaat, memberikan suatu ilham, menjadi suatu bahan bacaan menarik di kala kepenatan kuliah bagi teman-teman semuanya.



Penulis

2008

## ABSTRAK

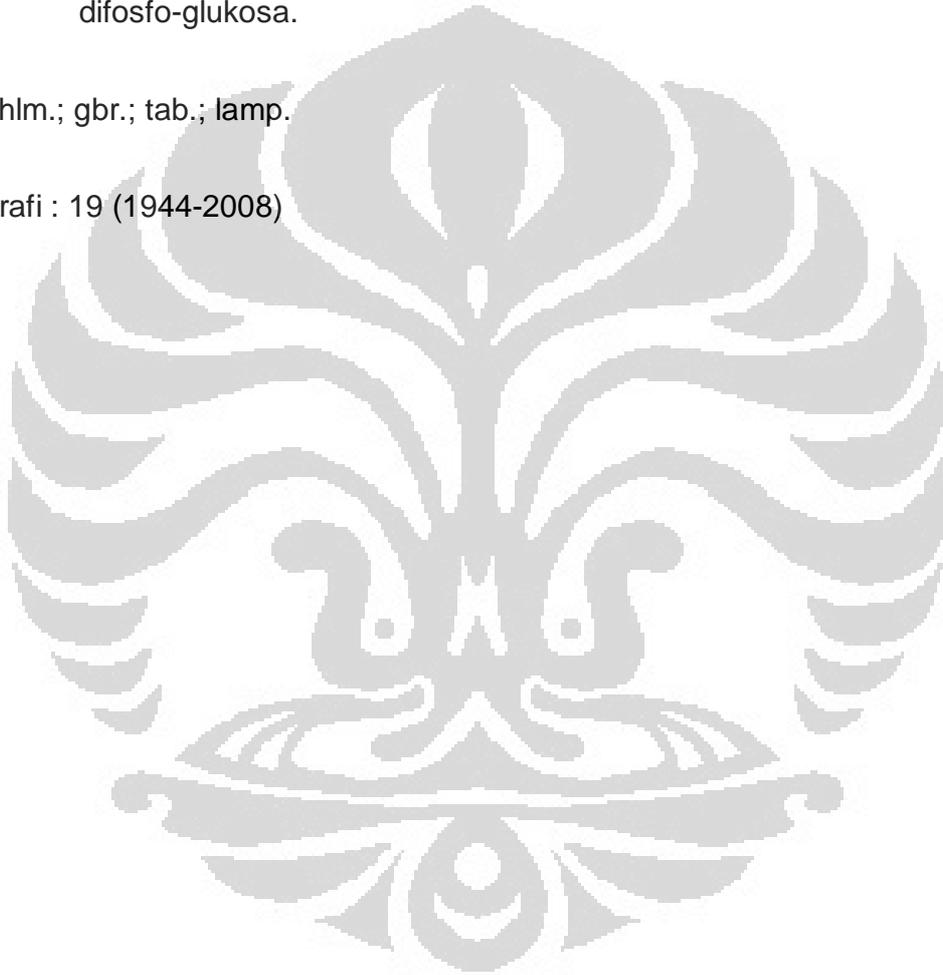
Kanamysin adalah salah satu antibiotik aminoglikosida terkenal yang banyak digunakan sebagai agen anti-tuberkulosis. Kanamysin mengandung sebuah aminosiklitol 2-deoksistreptamin (DOS) yang unik sebagai pusat aglikon, dilengkapi dengan kanosamin pada C-6 dan 6-amino-6-deoksiglukosa atau neosamin C atau glukosamin pada C-4. Pada tahun 2004, kluster gen biosintesis kanamysin diidentifikasi dari mikroorganisme produser *Streptomyces kanamyceticus* dan ada dua glikosiltransferase putatif yaitu Orf14 dan Orf20 yang diperkirakan terlibat dalam pembentukan ikatan glikosida. Dalam studi ini, analisis fungsional dari Orf14 dan Orf20 dilakukan melalui protein rekombinan. Diawali dengan melakukan variasi kondisi ekspresi *Escherichia coli* (vektor dan temperatur induksi). Sebagai hasilnya, Orf14 didapatkan sebagai protein yang larut ketika ekspresi dilakukan pada suhu 15°C, sedangkan Orf20 tidak. Kemudian, Orf14 dipurifikasi sebagian dengan fraksinasi amonium sulfat (10-40%) dan reaksi enzimatik diinvestigasi dengan substrat yang telah diprediksi kecocokannya. Setelah dilakukan derivatisasi dinitrofenil, analisis HPLC menunjukkan adanya puncak baru pada campuran antara paromamin dan uridin 5'-difosfo(UDP)-glukosa dengan Orf14. Selanjutnya, analisis NMR dan MS dari produk reaksi Orf14 memastikan terjadinya pembentukan pseudotrisakarida. Oleh karena itu,

Orf14 dikarakterisasi sebagai UDP-glukosa : paromamin glikosiltransferase dalam biosintesis kanamycin.

Kata kunci : kanamycin, antibiotik aminoglikosida, biosintesis, glikosiltransferase, 2-deoksistreptamin, paromamin, uridin 5'-difosfo-glukosa.

xi+ 78 hlm.; gbr.; tab.; lamp.

Bibliografi : 19 (1944-2008)



## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2. 1    Antibiotik.....	7
2. 2    Aminoglikosida.....	8
2. 3    Kanamysin.....	10
2. 4    Glikosiltransferase.....	12
2. 5    Teknologi DNA Rekombinan.....	13
2. 6    Protein <i>Overexpression</i> .....	16
2. 7    Sistem Ekspresi.....	16
2. 7. 1    Sistem pET.....	17
2. 7. 2    pCold, pMAL, IMPACT, ko-ekspresi dengan GroES/GroEL.....	19
2. 8    Pemurnian Protein.....	21
2. 8. 1    Pemurnian dengan Fraksinasi Amonium Sulfat...	21
2. 8. 2    Pemurnian dengan IMAC ( <i>Immobilized Metal                     Affinity Chromatography</i> ).....	21
2. 8. 3    Kromatografi Penukar Ion.....	23
2. 8. 4    Kromatografi Interaksi Hidrofobik.....	23
2. 8. 5    Gel Filtrasi.....	24

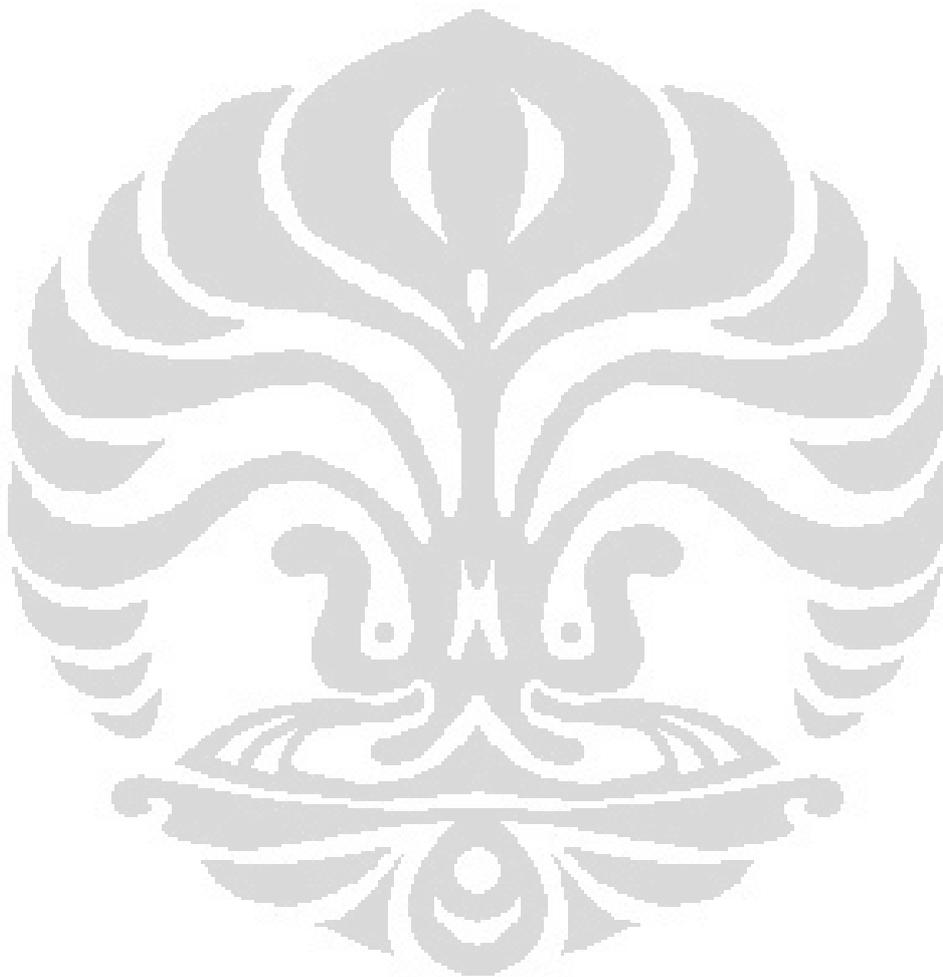
BAB III. Percobaan.....	25
3. 1 Bahan.....	25
3. 2 Peralatan.....	26
3. 3 Cara Kerja.....	27
3. 3. 1 Pembuatan Medium Luria-Bertani (LB).....	27
3. 3. 2 Detail Eksperimen Secara Umum.....	27
3. 3. 3 Kloning <i>orf14</i> dan <i>orf20</i> .....	28
3. 3. 4 Ekspresi dari Orf14.....	29
3. 3. 5 Analisis Enzim.....	30
3. 3. 6 Optimasi Keadaan Reaksi	32
3. 3. 7 Sistem Ekspresi.....	32
3. 3. 8 Pemurnian melalui Resin Ni <sup>2+</sup> His-Bind.....	33
3. 3. 9 Pemurnian melalui Resin Hi-Trap His-Bind, 0.5%; 2% Triton X 100.....	34
3. 3. 10 Pemurnian melalui Resin Ni <sup>2+</sup> His-Bind, fraksionasi (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	35
3. 3. 11 Pemurnian melalui Resin Ni-NTA His-Bind.....	36
3. 3. 12 Pemurnian melalui Resin TALON.....	36
3. 3. 13 Pemurnian melalui DEAE Sepharose <i>FastFlow</i> ....	37
3. 3. 14 Pemurnian melalui HiTrap DEAE <i>FastFlow</i> .....	38
3. 3. 15 Pemurnian melalui CM-Sephadex C-25.....	39
3. 3. 16 Pemurnian melalui HiTrap SP Sepharose FastFlow.....	39
3. 3. 17 Pemurnian melalui Kromatografi Interaksi Hidrofobik.....	40
3. 3. 18 Pemurnian melalui Gel Filtrasi.....	41
3. 3. 19 Isolasi Produk Reaksi Enzimatik dari Orf14.....	42
 BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	 45
4.1 Ekspresi dari Orf14 dan Orf20.....	45

4.2	Analisis Enzim.....	47
4.3	Optimasi Keadaan Reaksi.....	51
4.4	Pemurnian melalui Resin His-Bind.....	53
4.5	Pemurnian melalui Resin TALON.....	55
4.6	Pemurnian melalui Kromatografi Penukar Ion.....	56
4.6.1	Penukar Anion.....	56
4.6.2	Penukar Kation.....	58
4.7	Pemurnian melalui Kromatografi Interaksi Hidrofobik.....	59
4.8	Pemurnian melalui Gel Filtrasi.....	60
4.9	Isolasi Produk Reaksi Orf14 dengan UDP-Glc dan Paromamine.....	61
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....		67
5.1	Kesimpulan.....	67
5.2	Saran.....	68
DAFTAR PUSTAKA.....		69
LAMPIRAN.....		73

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. 1 Biosintesis 2-deoksistreptamin oleh kluster gen biosintesis neomysin.....	3
1. 2 Prediksi jalur biosintesis untuk kanamysin.....	4
2. 1 Antibiotik aminoglikosida berdasarkan strukturnya .....	9
2. 2 Struktur Molekul Kanamysin.....	11
2. 3 Struktur Molekul Dibekasin, Arbekasin, dan Amikasin.....	12
2. 4 Kloning DNA.....	16
2. 5 Protein <i>Overexpression</i> .....	17
2. 6 Sistem Ekspresi pET dengan Induksi IPTG dalam Sel Inang	19
4. 1 Ekspresi dari rekombinan Orf14 dan Orf20 dalam pET28...	45
4. 2 Proses pemotongan dan ligasi pada transformasi Orf14 ke pET-30c(+)	46
4. 3 Kromatogram HPLC dan LCMS Reaksi Enzimatik Orf14....	49
4. 4 Kromatogram HPLC dari pCold GroES/GroEL.....	51
4. 5 Buffer yang digunakan untuk mempertahankan stabilitas Orf14	52
4. 6 Kebutuhan logam untuk reaksi Orf14.....	53
4. 7 SDS PAGE untuk DEAE Sepharose.....	57
4. 8 SDS PAGE untuk SP FastFlow.....	59
4. 9 SDS PAGE untuk G-75 Sephadex.....	61
4. 10 Spektrum $^1\text{H}$ NMR untuk produk reaksi ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) dengan paromamine dan UDP-Glc .....	64
4. 11 Spektrum $^{13}\text{C}$ NMR produk reaksi Orf14 dengan paromamine dan UDP-Glc.....	65

4. 12 Pembentukan deaminokanamysin melalui glikosilasi paromamin menggunakan UDP-Glc dengan Orf14.....	66
---	----



## DAFTAR TABEL

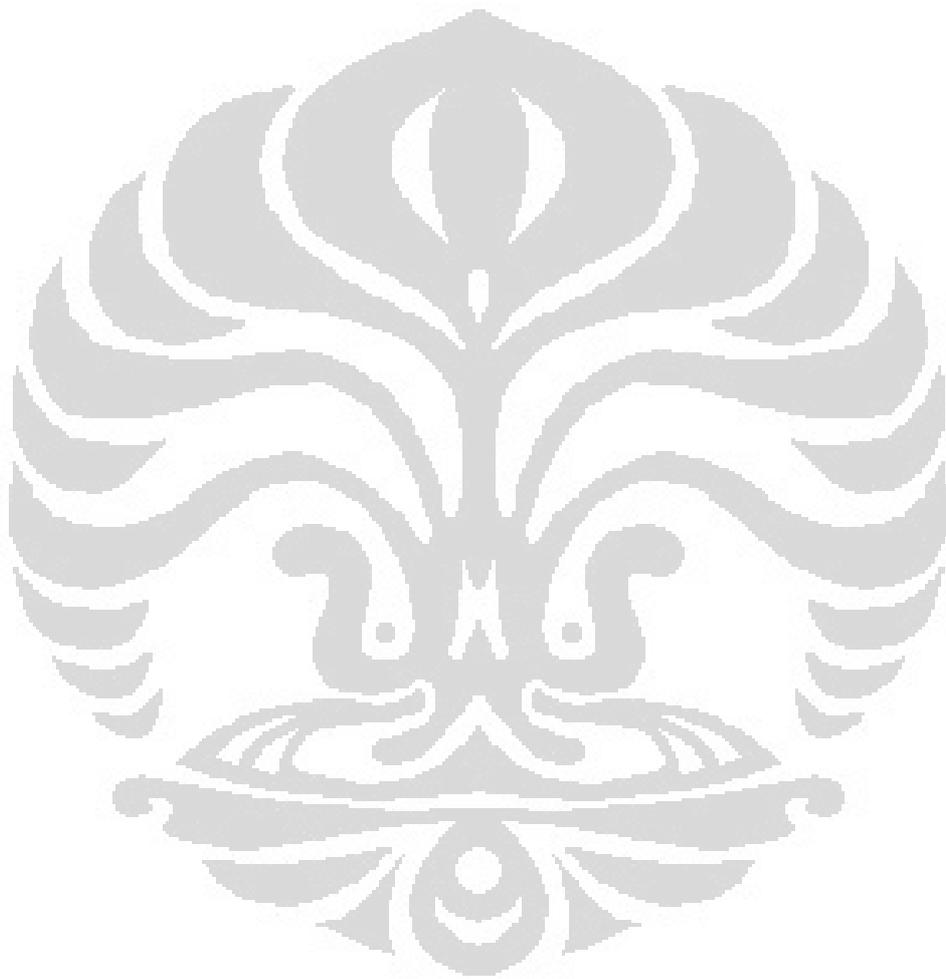
Tabel	Halaman
1. 1 Homologi sekuens dari enzim yang terlibat dalam produksi aminoglikosida turunan deoksistreptamin.....	3
3. 1 Sistem Ekspresi untuk Orf14 dan Orf20.....	32
4. 1 Kelarutan Orf14 dalam beberapa Sistem Ekspresi dan Temperatur pertumbuhan.....	45
4. 2 Kelarutan Orf20 dalam beberapa Sistem Ekspresi dan Temperatur pertumbuhan.....	45
4. 3 Hasil Analisis Kombinasi Enzim untuk Orf14.....	46
4. 4 Hasil Analisis Kombinasi Enzim untuk Orf20.....	46
4. 5 Aktivitas Orf14 dalam Beberapa Sistem Ekspresi dan Suhu Pertumbuhan.....	48
4. 6 Aktivitas Orf20 dalam Beberapa Sistem Ekspresi dan Suhu Pertumbuhan.....	48
4. 7 Rasio konversi pembentukan produk dari reaksi antara Orf14/pET28b(+), UDP-Glc dan Paromamin.....	62

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Daftar Singkatan.....	75
2. Skema Prosedur Kerja.....	76
3. Tabel Amonium Sulfat untuk Pengendapan Protein	77
4. Low Resolution FAB MS	78





## BAB I

### PENDAHULUAN

Mikroorganisme seperti bakteri dan jamur telah diketahui secara luas sangat berperan dalam penemuan senyawa bioaktif yang kemudian menjadi sumber agen antibakteri seperti sefalosporin, tetrasiklin, aminoglikosida dan rifamysin. Terapi antibiotik aminoglikosida diawali pada tahun 1944 sejak penemuan streptomisin, aminoglikosida pertama, oleh Waksman dan grupnya (Schatz, *et al.*, 1944). Penemuan streptomisin menjadi titik awal penemuan senyawa-senyawa yang mirip, mula-mula pada spesies *Streptomyces*, kemudian pada *Micronospora* dan *Bacillus* sehingga akhirnya ditemukan neomysin, paromomysin, kanamysin, gentamisin dan lain-lain yang masih termasuk dalam kelompok aminoglikosida (Llewellyn, *et al.*, 2006).

Aminoglikosida termasuk grup antibiotik yang efektif dalam melawan tipe bakteri tertentu terutama aerobik dan gram negatif seperti *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* dan beberapa bakteri gram positif. Aminoglikosida dikategorikan sebagai agen bakterisidal karena dapat mempengaruhi sintesis protein pada bakteri dengan cara berikatan pada subunit ribosomal 30S (Magnet, *et al.*, 2005). Interferensi ini menghambat translokasi peptidil-tRNA dari A-site ke P-site dan menyebabkan kesalahan

membaca mRNA, sehingga bakteri tidak dapat mensintesis protein yang penting untuk pertumbuhannya.

Kanamysin adalah sebuah antibiotik aminoglikosida yang diproduksi oleh *Streptomyces kanamyceticus* (Umezawa *et al.*, 1957). Kanamysin merupakan representasi kelas aminoglikosida 4,6-disubstitusi. Pada kelas ini, posisi C-4 pada 2-deoksistreptamin disubstitusi dengan aminoglukosa fungsional (contoh : 6-amino-6-deoksi-D-glukosa pada kanamysin A, neosamin C pada kanamysin B atau D-glukosamin pada kanamysin C). Sedangkan pada posisi C-6, 2-deoksistreptamin disubstitusi oleh gugus kanosamin (3-amino-3-deoksi-D-glukosa).

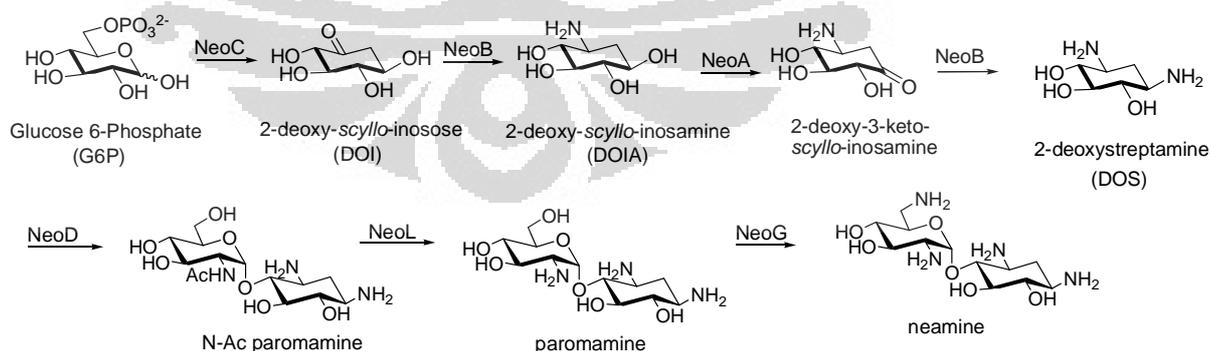
Berdasarkan studi biosintesis secara mendalam dan menyeluruh terhadap kelas aminoglikosida ini seperti butirosin, neomysin, gentamisin, dan tobramysin, ditemukan bahwa aminosiklitol, 2-deoksistreptamin (DOS) dibiosintesis dari glukosa 6-phosphat oleh 3 enzim biosintesis, 2-deoksi-scyllo-inosose (DOI) sintase, L-glutamine (Gln) :DOI aminotransferase, dan 2-deoksi-scyllo-inosamin (DOIA) dehidrogenase (Tabel 1.1) (Flatt *et al.*, 2007).

Dari hasil studi lainnya, neamine pseudodisakarida ditemukan dibentuk oleh *N*-acetylparomamin sintase, *N*-acetylparomamin deasetilase, paromamin dehidrogenase, dan 6'-oksoparomamin aminotransferase dalam biosintesis neomysin (Kudo *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005) (Gambar 1.1).

Pada tahun 2004, 24 *open reading frames (orfs)* diidentifikasi dalam kluster gen biosintesis kanamysin (Yanai *et al.*, 2004). Namun hingga saat ini, hanya enzim biosintesis DOS dalam kluster ini yang telah dikarakterisasi.

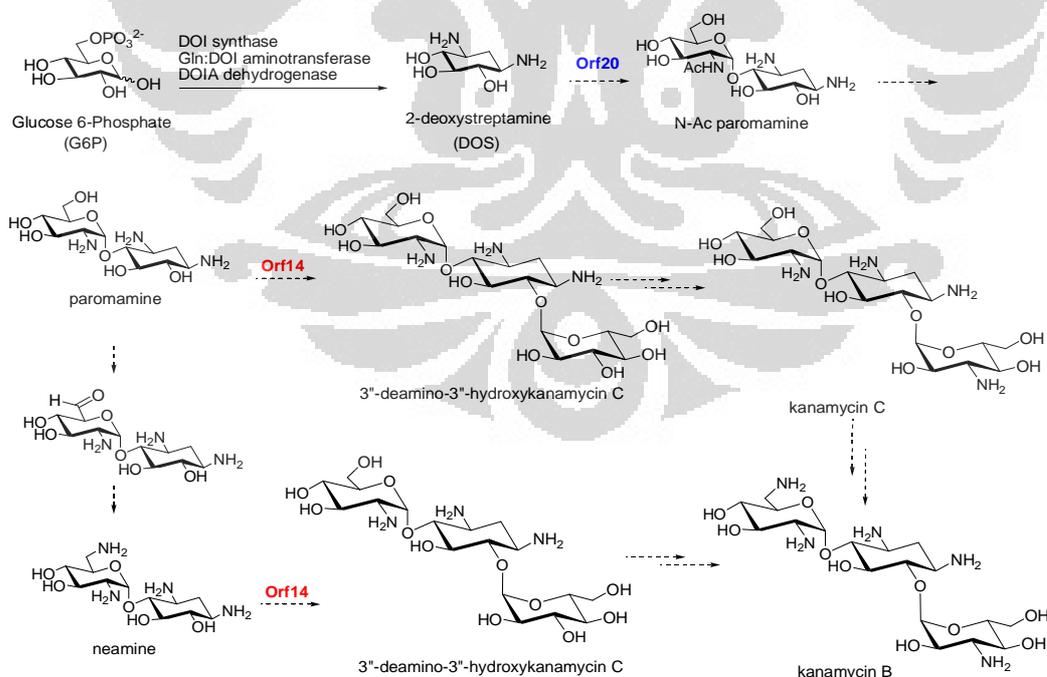
**Tabel 1.1** Homologi sekuens dari enzim yang terlibat dalam produksi 4,6-disubstitusi aminoglikosida turunan deoksistreptamin (kanamysin, gentamisin dan tobramysin) dan 4,5-disubstitusi aminoglikosida turunan deoksistreptamin (butirosin dan neomysin)

Fungsi Putatif	Kanamysin	Gentamisin	Tobramysin	Butirosin	Neomysin
DOI-sintase	Orf11	GntB	TobC	BtrC	NeoC
DOI-aminotransferase	Orf10, 16	GntA, F	TobS1	BtrB	NeoN
Dehidrogenase	Orf6	GntP	TobE	BtrE	NeoA
Glikosiltransferase	Orf14, 20	GntD, Z	Tob M1,M2	BtrM	NeoD
FAD dependent oksidoreduktase	Orf9	GntX	TobQ	BtrQ	NeoG
6'-Oksoparomamin aminotransferase	Orf8	GntH,J,L,W	TobB	BtrB	NeoN
Regulator Putatif	Orf3				
Regulator Putatif	Orf2				
Deasetilase	Orf15		TobN		NeoL*
Dehidrogenase	Orf12	GntC	TobD2		
Asetiltransferase	Orf1				
Regulator Putatif	Orf5				
Protein Transpor Putatif	Orf7		TobT		
Deoksigenase	Orf17				
Dehidrogenase	Orf18				
Metiltransferase Ribosomal	Orf19				



**Gambar 1.1** Biosintesis neamin oleh kluster gen biosintesis neomysin

Tujuan penelitian ini adalah mengkarakterisasi glikosiltransferase, yang berfungsi sebagai katalis pembentukan ikatan glikosida dalam membangun struktur dasar kanamysin. Dalam kluster gen biosintesis kanamysin, dua glikosiltransferase putatif Orf14 dan Orf20 yang diekspresikan (Tabel 1), salah satunya diperkirakan sebagai enzim yang dapat mengkatalisis pembentukan pseudodisakarida dan yang lainnya mengkatalisis pembentukan pseudotrisakarida (Gambar 1.2). Di antara, kedua glikosiltransferase tersebut, Orf20 lebih mirip dengan *N*-asetilparomamin sintase yang telah dikarakterisasi sebelumnya. Oleh karena itu, dalam biosintesis kanamysin, Orf20 diprediksi mengkatalisis pembentukan pseudodisakarida sedangkan Orf14 diharapkan mengkatalisis pembentukan pseudotrisakarida.

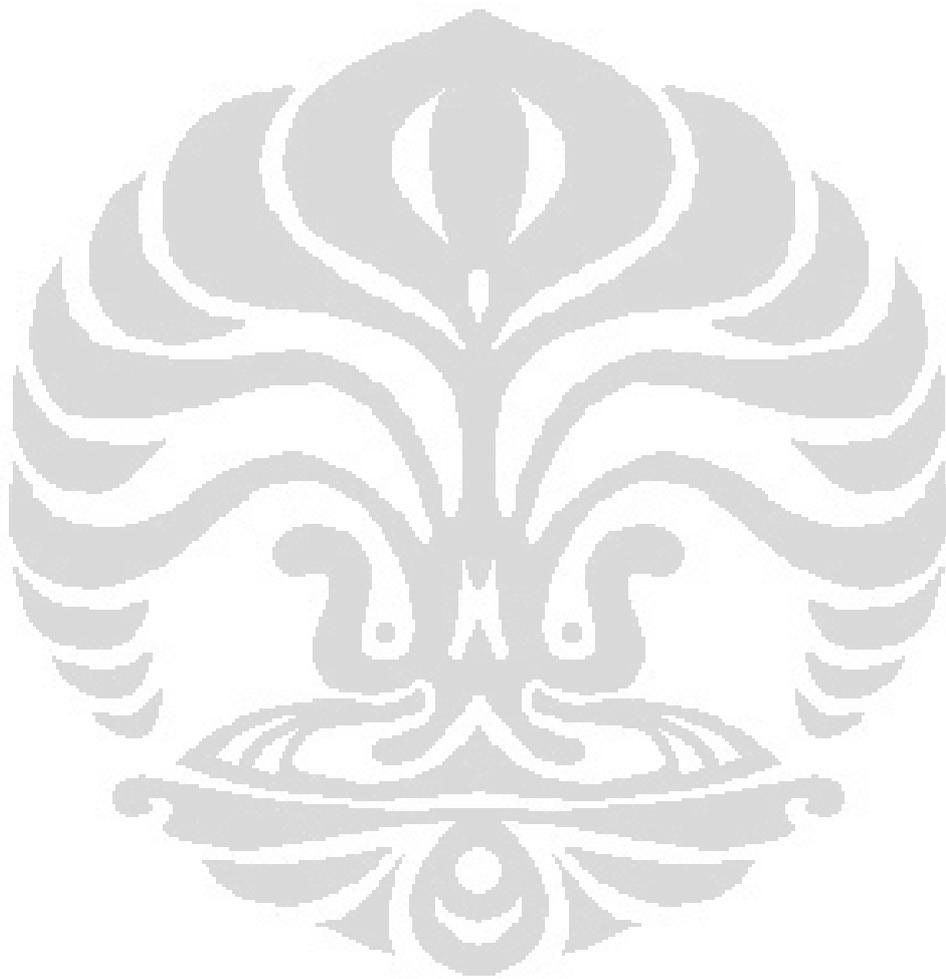


**Gambar 1.2** Prediksi jalur biosintesis untuk kanamysin

Reaksi transfer glikosil memainkan peranan penting dalam menghasilkan keberagaman struktur dalam aminoglikosida dengan mengkatalisis pembentukan sambungan antara aminosiklitol dan unit gula. Dan berdasarkan pengetahuan akan mekanisme reaksi enzimatik, kita dapat melakukan rekayasa biosintesis untuk membuat enzim yang lebih efisien dalam sebuah kluster gen biosintesis. Atau bahkan dimungkinkan membuat glikosida baru ( atau intermediate glikosida) dengan mengkombinasikan enzim-enzim secara *in vitro*.

Dalam percobaan, protein dalam *Escherichia coli* akan diekspresikan dan menginvestigasi aktivitas enzim dengan beberapa akseptor glikosil (DOS, paromamin, dan neamin) dan donor (uridin 5'-difosfat-glukosa (UDP-Glc), UDP-*N*-asetilglukosamin (UDP-GlcNAc)).

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Tadashi Eguchi, Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology, Japan selama melakukan program pertukaran pelajar dari September 2007 hingga Agustus 2008.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Antibiotik

Antibiotik merupakan golongan senyawa kimia, baik alami maupun sintetik, yang dapat menghambat pertumbuhan dan reproduksi dari bakteri dan jamur (Koolman *et al.*, 2005). Berdasarkan toksisitasnya, antibiotik dibagi menjadi dua kelompok, yaitu antibiotik dengan aktivitas bakteriostatik dan aktivitas bakterisida. Antibiotik dengan aktivitas bakteriostatik bersifat menghambat pertumbuhan mikroba sedangkan antibiotik dengan aktivitas bakterisida bersifat membinasakan mikroba lain.

Antibiotik yang baik idealnya mempunyai aktivitas antimikroba yang efektif dan selektif serta mempunyai aktifitas bakterisida. Antibiotik yang sesuai untuk terapi penyakit infeksi pada manusia harus mempunyai sifat toksisitas selektif yaitu aktifitas gangguan pada mikroba penginfeksi lebih besar daripada gangguan pada sel inang ([www.kalbe.co.id](http://www.kalbe.co.id), 27 Agustus 2007, 11.12 WIB).

Antibiotik dapat digolongkan berdasarkan sasaran kerja senyawa tersebut dan susunan kimiawinya. Ada enam kelompok antibiotik dilihat dari

sasaran kerjanya (<http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiotik>, 27 Agustus 2007

11.10 WIB) :

- a. Inhibitor sintesis dinding sel bakteri, mencakup golongan Penicillin, sefalosporin, misalnya ampisilin, penisilin G.
- b. Inhibitor transkripsi dan replikasi, mencakup golongan Quinolone, misalnya rifamicin, aktinomysin D.
- c. Inhibitor sintesis protein, mencakup golongan Aminoglikosida dan tetrasiklin misalnya gentamisin, kanamysin, streptomysin.
- d. Inhibitor fungsi membran sel, misalnya ionomysin, valinomysin.
- e. Inhibitor fungsi sel lainnya seperti golongan sulfa atau sulfonamida misalnya oligomysin, tunicamycin.
- f. Antimetabolit, misalnya azaserine.

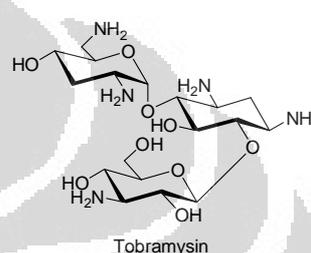
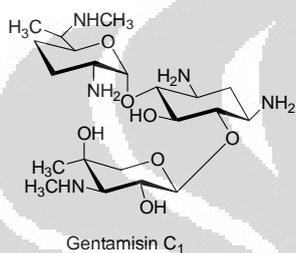
## 2.2 Aminoglikosida

Terapi antibiotik aminoglikosida dimulai pada tahun 1944 sejak ditemukannya streptomysin sebagai aminoglikosida pertama. Penemuan ini telah membangkitkan semangat komunitas kedokteran karena streptomysin memiliki spektrum aktifitas yang luas, khususnya terhadap bakteri gram negatif yang sulit dihambat oleh penisilin dan sulfonamida. Streptomysin juga merupakan antibiotik bagi tuberkulosis yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Sejak saat itu, ditemukan juga senyawa-senyawa yang mirip

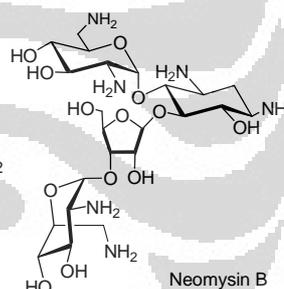
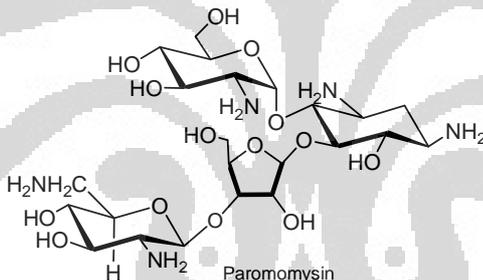
dari spesies *Streptomyces*, *Micronospora* dan *Bacillus* yaitu neomysin, paromomysin, kanamysin, gentamisin, dan kelompok aminoglikosida lainnya

Aminoglikosida dapat dibagi menjadi tiga tipe berdasarkan struktur posisi ikatan glikosidanya yaitu 4,6-disubstitusi 2-deoksistreptamin, 4,5-disubstitusi 2-deoksistreptamin dan lain-lain (Gambar 2.1).

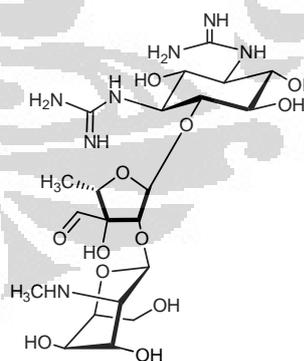
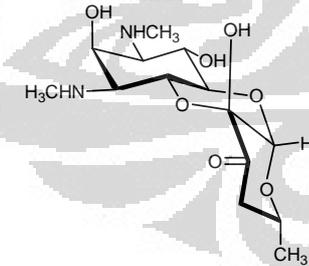
**A. 4,6-Disubstitusi 2-deoksistreptamin**



**B. 4,5-Disubstitusi 2-deoksistreptamin**



**C. Lain-lain**



Spektinomysin

Streptomysin

**Gambar 2.1** Antibiotik aminoglikosida berdasarkan strukturnya

Secara umum, sifat kimia dari aminoglikosida adalah basa dan larut dalam air. Aminoglikosida sulit diserap oleh sistem pencernaan dan sulit menembus dinding pembuluh darah pada otak. Melalui muatan positifnya, aminoglikosida dapat berikatan dengan liposakarida pada dinding sel bakteri yang bermuatan negatif, dan juga pada molekul anionik membran sel seperti DNA, RNA dan fosfolipid (Zembower *et al.*, 1998).

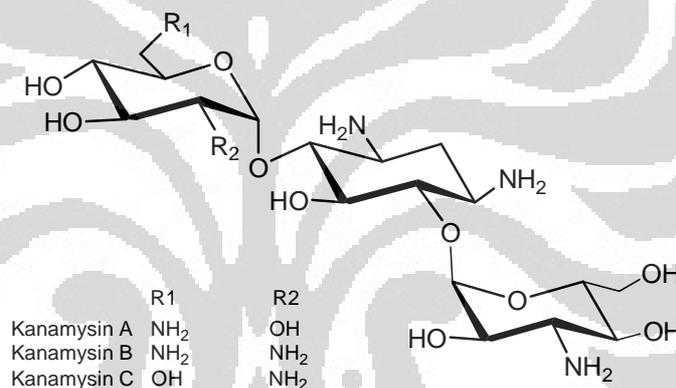
Aminoglikosida seperti streptomisin biasanya digunakan bersamaan dengan antibiotik lain. Salah satu contohnya yaitu aminoglikosida dengan tetrasiklin untuk mengobati tularemia dan dengan isoniazid dan rifampin untuk mengobati tuberkulosis. Aminoglikosida merupakan antibiotik bersifat bakterisida karena bekerja dengan cara menghambat sintesis protein pada bakteri melalui ikatannya dengan subunit ribosom 30S. Interferensi ini menghambat translokasi peptidil t-RNA dari A-site ke P-site dan menyebabkan kesalahan membaca m-RNA pada saat translasi sehingga pada akhirnya bakteri tidak dapat mensintesis protein yang penting bagi pertumbuhannya.

### 2.3 Kanamysin

Kanamysin adalah antibiotik aminoglikosida yang dihasilkan oleh *Streptomyces kanamyceticus*. Kanamysin (Gambar 2.2) merupakan representasi kelas aminoglikosida 4,6-disubstitusi. Pada kelas ini, posisi C-4

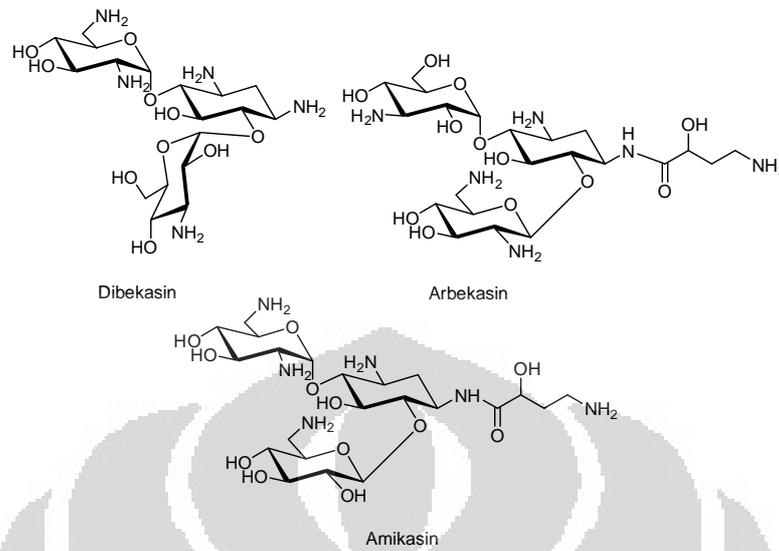
pada 2-deoksistreptamin disubstitusi dengan aminoglukosa fungsional (contoh: 6-amino-6-deoksi-D-glukosa pada kanamysin A, neosamin C pada kanamysin B atau D-glukosamin pada kanamysin C). Sedangkan pada posisi C-6, 2-deoksistreptamin disubstitusi oleh gugus kanosamin (3-amino-3-deoksi-D-glukosa).

Walaupun kanamysin memiliki aktifitas antibakteria yang luas, namun terdapat bakteri yang resistan terhadap kanamysin, oleh karena itu penggunaan klinisnya terbatas pada tuberkulosis.



**Gambar 2.2** Struktur Molekul Kanamysin

Bakteri resistan menginaktivasi kanamysin dengan memodifikasi gugus spesifik amino- atau hidroksi- melalui asetiltransferase, fosfattransferase, dan nukleotidiltransferase. Adanya bakteri resistan ini memicu penemuan turunan kanamysin semisintesis seperti dibekasin, amikasin, dan arbekasin (Kondo *et al.*, 1999) (Gambar 2.3) dan turunan kanamysin ini banyak digunakan sebagai agen kemoterapi.



**Gambar 2.3** Struktur Molekul Dibekasin, Arbekasin, dan Amikasin

## 2.4 Glikosiltransferase

Glikosiltransferase adalah enzim yang berfungsi untuk mengkatalisis transfer suatu gugus glikosil dari suatu donor ke akseptor untuk membentuk ikatan glikosidik.

Dari 24 *open reading frames* (orfs) yang telah diidentifikasi dari kluster gen biosintesis kanamysin, terdapat dua orf yang mengkodekan glikosiltransferase yaitu Orf14 dan Orf20. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (Kudo *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Yokoyama *et al.*, 2008) dan analisis homolog terhadap gen kluster biosintesis neomysin (Tabel 1), dapat terlihat bahwa Orf20 memiliki kemiripan yang lebih tinggi terhadap NeoD (protein yang mengkodekan glikosiltransferase dalam kluster gen biosintesis neomysin). Hal lain yang mendukung hipotesis ini yaitu

pengujian tingkat kemiripan identitas Orf20 dengan NeoD sebesar 64%. Sedangkan tingkat kemiripan identitas Orf14 dengan NeoD sebesar 32%. NeoD dalam biosintesis neomysin (Gambar 1) merupakan katalis reaksi 2-deoksistreptamin menjadi *N*-Asetil paromamin atau dengan kata lain katalis dalam pembentukan pseudodisakarida. Oleh karena itu, Orf14 diprediksikan sebagai katalis dalam pembentukan pseudotrisakarida dalam biosintesis kanamysin.

## 2.5 Teknologi DNA Rekombinan

Hampir seluruh segmen DNA, contoh : gen, hanya ada dalam jumlah yang sangat kecil di dalam sel. Untuk melakukan penelitian yang berkaitan dengan gen dibutuhkan sejumlah besar salinan identik (klon) gen. Penggandaan DNA ini dilakukan melalui teknologi DNA rekombinan. Konsep dari teknologi ini adalah menggabungkan gen-gen dengan vektor menjadi molekul DNA rekombinan. Penggabungan DNA ini tidak terbatas pada organisme yang sama saja juga dari organisme lain ke dalam bakteri. Molekul DNA rekombinan tersebut lalu di klon (propagasi) ke dalam sel inang secara *in vivo*. Dalam teknologi DNA rekombinan ada dua faktor yang berperan penting yaitu enzim restriksi dan vektor.

Enzim restriksi disebut juga endonuklease, terdapat dalam sebagian besar sel bakteri dan berfungsi untuk memotong ikatan tulang punggung fosfodiester (gula-fosfat) pada DNA secara spesifik. Endonuklease dapat

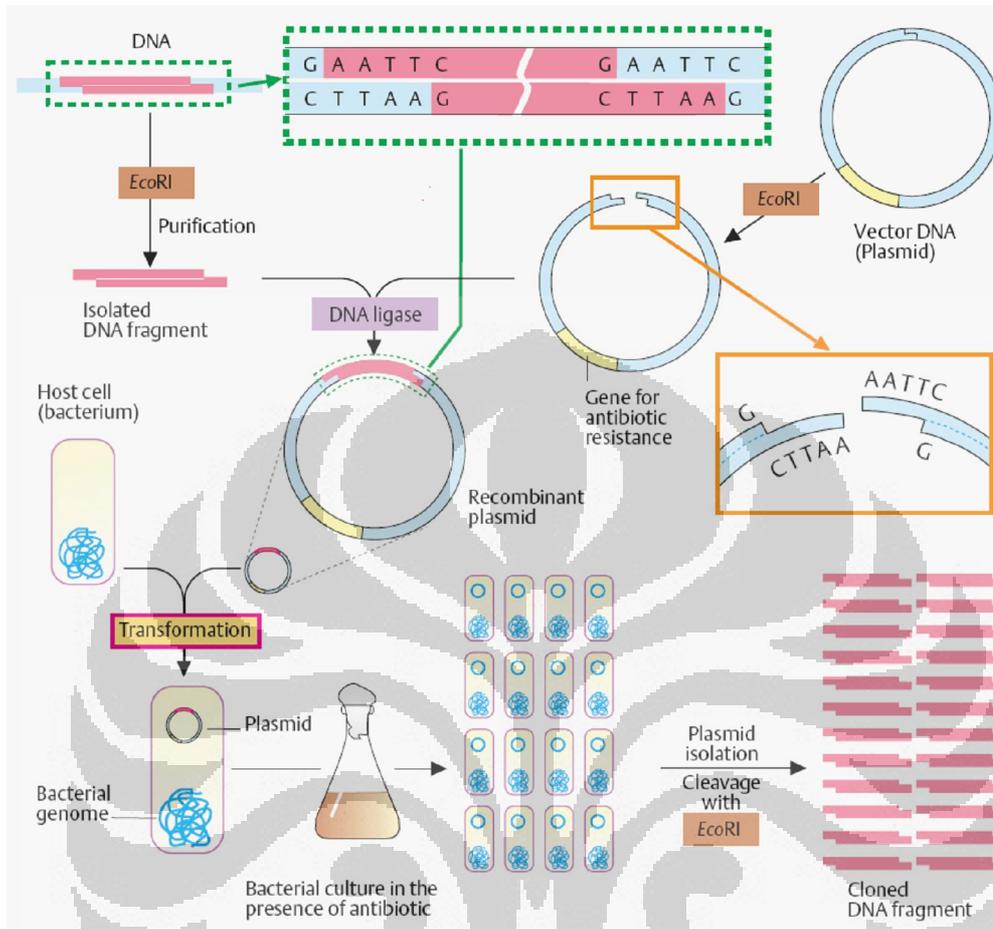
mengenali dan memotong urutan basa nukleotida spesifik berisi 4-6 bp (*base pair*) atau *recognition sequence*. Enzim restriksi ini juga berfungsi untuk melindungi sel inang terhadap invasi DNA asing seperti faga-DNA. Enzim ini diberi nama dari bakteri yang menghasilkannya, contoh Eco RI, pertama kali diisolasi dari *E.coli* strain RI lalu enzim Hind III, enzim ke tiga yang diisolasi dari Haemophilus influenza. Hasil pemotongan melalui enzim restriksi dapat membentuk fragmen dengan ujung yang lengket (*sticky end*) atau ujung yang rata (*blunt end*).

Vektor merupakan wahana untuk memindahkan DNA ke organisme inang baru sehingga DNA dapat diekspresikan atau bereplikasi dalam sel inang tersebut (Omoto *et al.*, 2004). Beberapa jenis vektor yang tersedia antara lain plasmid, bakteriofaga, cosmid dan tranfosom. Plasmid sebagai vektor yang umum digunakan merupakan molekul DNA ekstrakromosom yang berbentuk sirkuler berukuran 1-250Kb. Plasmid memiliki paling sedikit satu sekuen atau urutan DNA sebagai titik asal replikasi sehingga plasmid dapat memperbanyak diri tanpa tergantung pada kromosom. Biasanya plasmid juga membawa satu atau lebih gen misalnya sifat resisten terhadap antibiotik tetrasiklin atau ampisilin.

Tahapan-tahapan untuk melakukan DNA rekombinan (Gambar 2.4) yaitu awalnya plasmid dipotong menggunakan enzim restriksi (misal EcoRI) pada suatu sisi sehingga menghasilkan dua ujung lengket (*sticky*). Kemudian sampel DNA dari organisme lain juga dipotong menggunakan Eco RI untuk memperoleh ujung *sticky* yang sama. Kedua sampel tersebut dicampur dan

dibiarkan berhibridisasi, beberapa molekul akan terbentuk dengan DNA sampel yang telah tersisip dalam plasmid pada sisi pemotongan EcoRI. DNA ligase digunakan untuk menggabungkan fragmen-fragmen tersebut secara kovalen.

Jika plasmid tersebut dimasukkan ke dalam sejumlah besar sel inang, maka sel inang tersebut akan mengambil plasmid tersebut melalui proses yang disebut transformasi, kemudian memperbanyak plasmid tersebut bersamaan dengan reproduksi genom sel inang itu sendiri. Untuk memastikan bahwa hanya bakteri sel inang yang mengandung plasmid yang melakukan replikasi, maka plasmid yang digunakan biasanya mengandung gen resisten antibiotik. Sehingga pada saat bakteri diinkubasi dalam medium yang mengandung antibiotik tersebut, hanya sel dengan plasmid tersebut yang akan bereplikasi. Setelah masa inkubasi, plasmid diisolasi dari sel inang, dipotong lagi dengan EcoRI, kemudian fragmen-fragmennya dipisahkan dengan elektroforesis gel agarose. Fragmen yang diinginkan diidentifikasi melalui ukurannya, kemudian diekstraksi dari gel dan digunakan untuk eksperimen selanjutnya.

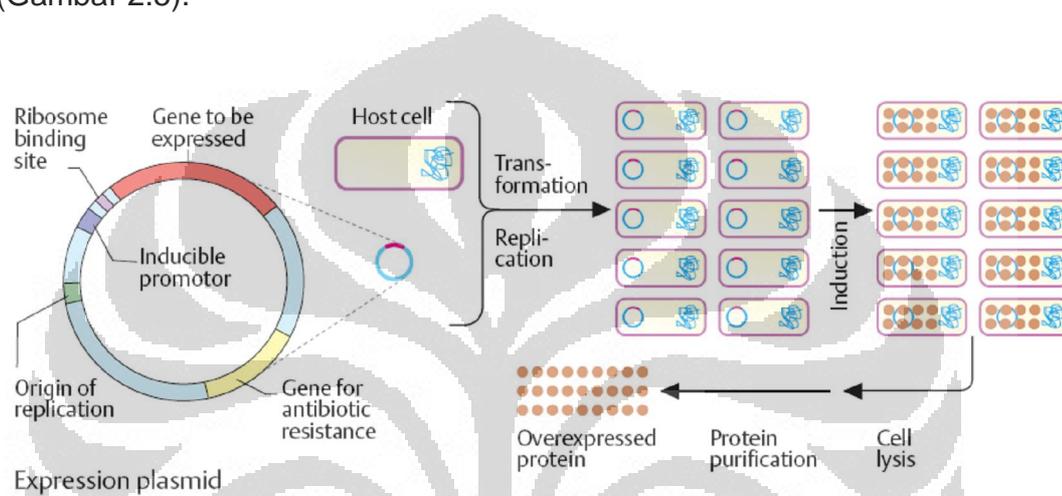


**Gambar 2.4** Kloning DNA. Sumber : [Koolman *et al.*, 2005]

## 2.6 Protein Overexpression

Dalam melakukan penelitian mengenai protein dibutuhkan juga dalam jumlah banyak. Untuk mengatasi hal ini maka protein dapat dihasilkan dengan *overexpression* dalam sel bakteri. Gen yang berkaitan diisolasi dari suatu organisme dan disisipkan ke dalam *expression plasmid*. Selain gen itu sendiri, plasmid juga harus mengandung segmen DNA yang membuat sel

inang dapat mereplikasi dan mentranskripsi gen tersebut. Setelah transformasi dan replikasi menggunakan sel inang yang cocok, dilakukan induksi untuk memicu transkripsi gen yang efisien. Translasi mRNA yang terbentuk di dalam sel inang akan meningkatkan hasil protein yang diinginkan (Gambar 2.5).



**Gambar 2.5 Protein Overexpression.** Sumber : [Koolman *et al.*, 2005]

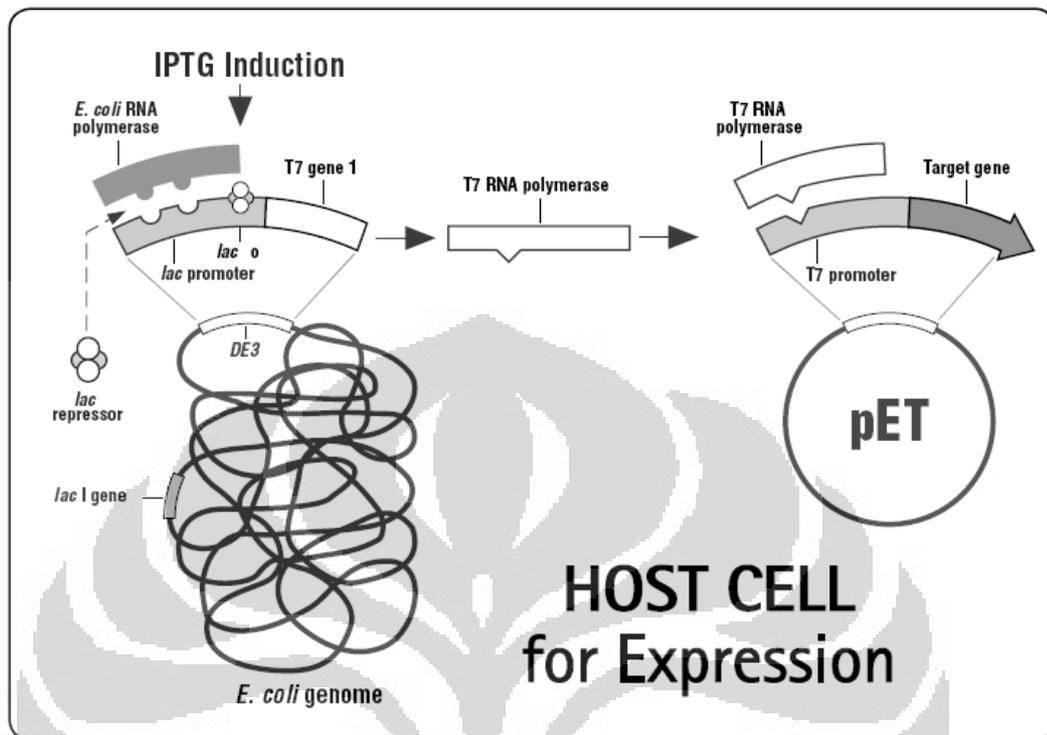
## 2.7 Sistem Ekspresi

### 2.7.1 Sistem pET

Sejauh ini, sistem pET merupakan sistem yang paling efektif untuk melakukan kloning dan ekspresi protein rekombinan dalam *E.coli*. Gen target diklon dalam plasmid pET dibawah kontrol transkripsi bakteriofage T7 dan signal translasi; ekspresi lalu diinduksi dengan menyediakan sumber T7 RNA

polymerase dalam sel inang. T7 RNA polymerase sangat selektif dan aktif sehingga dibawah kondisi represif , ia tidak diproduksi, dan transkripsi gen target terhambat. Tapi, setelah induksi, T7 RNA polymerase diproduksi dan hampir seluruh mesin sintesis protein dalam sel akan memfokuskan diri untuk menghasilkan protein target.

Sel inang BL21(DE3) membawa fragmen DNA yang mengandung gen *lacI*, promoter *lacUV5* dan gen untuk T7 RNA polymerase. Promoter *lacUV5* memiliki kapasitas duplikat vektor yang tinggi, sehingga memungkinkan induksi ekspresi melalui penambahan IPTG (isopropil- $\beta$ -D-thiogalaktosida) ke dalam medium kultur dan akhirnya bakteri dapat melakukan *overexpression* protein target. Induksi *lac* operon oleh IPTG menyebabkan transkripsi terjadi karena IPTG berikatan dengan *lac* repressor dan secara signifikan mengurangi afinitas ikatan kepada *lac* operator (Gambar 2.6).



**Gambar 2.6** Sistem Ekspresi pET dengan Induksi IPTG dalam Sel Inang. Sumber : [Novagen, pET System Manual]

### 2.7.2 pCold, pMAL, IMPACT, Ko-ekspresi dengan GroEL/GroES

Selain sistem pET terdapat sistem-sistem ekspresi lainnya. Pemilihan sistem ekspresi ini bertujuan untuk mencari sistem ekspresi yang paling sesuai untuk menghasilkan protein target dalam bentuk terlarut.

Sistem vektor pCold merupakan vektor ekspresi *cold-shock*. Vektor ini dapat menampilkan ekspresi protein yang efisien melalui promotor yang diturunkan dari gen *csp A* yang merupakan gen *cold-shock*.

Dalam sistem vektor pMAL, gen yang diklon disisipkan ke *downstream* dari gen *malE* yang mengkodekan *maltose-binding protein* (MBP). Hal ini akan menghasilkan ekspresi dari protein MBP-*fusion*. Dengan menggunakan pMAL, protein target menjadi lebih mudah dimurnikan dengan menggunakan satu tahap pemurnian saja misalnya dengan kromatografi afinitas amilase.

Sedangkan pada sistem IMPACT (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*), protein target digabungkan kepada sebuah tag yang mengandung intein (elemen *splicing* protein) dan domain ikatan kitin. Hal ini memungkinkan dilakukannya proses pemurnian afinitas melalui kolom kitin.

*E.coli* seringkali memproduksi protein rekombinan dalam bentuk agregat tak terlarut atau disebut juga badan inklusi (*inclusion bodies*). Hal ini disebabkan oleh ketidakmampuannya membentuk struktur tersier yang benar sehingga protein menjadi tidak aktif. *Molecular chaperone* adalah protein yang berinteraksi dengan polipeptida yang baru sebagian terlipat ataupun terlipat tidak sempurna, kemudian memfasilitasi jalur *foldng* yang benar (Nelson *et al.*, 2005). Untuk menstimulasi pelipatan protein *in vivo* yang benar, meningkatkan protein yang larut, dan protein rekombinan yang aktif, dilakukan ko-ekspresi dengan *molecular chaperone* yang dinamakan *chaperonin* seperti GroEL dan GroES.

## 2.8 Pemurnian Protein

### 2.8.1 Pemurnian dengan Fraksionasi Amonium Sulfat

Enzim dapat diendapkan dan difraksionasi dengan “salting out”.

Proses “salting out” ini berfungsi untuk menyingkirkan molekul non-protein dan protein yang tidak diinginkan. Garam yang paling sering digunakan adalah amonium sulfat karena harganya murah, mudah larut, tidak bersifat toksik dan kebanyakan enzim tidak rusak oleh garam ini.

Protein bersifat larut dalam air karena memiliki rantai asam amino hidrofilik yang menghadap ke luar sehingga bisa berinteraksi dengan air. Protein-protein itu adalah asam amino basa (arginin, histidin, dan lisin), asam amino asam (aspartat dan glutamat), dan asam amino netral (asparagin, glutamin, serin, threonin, tirosin, dan sistein).

Kehadiran amonium sulfat dalam larutan akan mengurangi jumlah air yang ada dan membuat kelarutan protein berkurang. Seiring dengan berkurangnya interaksi antara air dan protein, maka interaksi antara protein dan protein menjadi lebih menonjol dan protein akhirnya membentuk agregat. Pada suhu rendah sekitar 4°C, protein akan terdenaturasi secara reversibel dan endapan dapat dilarutkan kembali dalam buffer. Untuk mengetahui banyaknya amonium sulfat yang dibutuhkan untuk mendapatkan derajat kejenuhan yang diinginkan dapat dilihat pada lampiran 3.

### 2.8.2 IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*)

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

Banyak protein rekombinan yang direkayasa agar mengandung paling sedikit 6 residu histidin pada N atau C terminalnya dan protein ini sering disebut sebagai protein His-Tag. Kehadiran His-Tag ini memfasilitasi proses pemurnian protein berdasarkan afinitas selektif protein dengan polihistidin tersebut terhadap adsorben yang dilengkapi pengkelat metal seperti  $\text{Ni}^{2+}$  atau  $\text{Co}^{2+}$ . Interaksi antara residu histidin dengan ion logam ini bersifat reversibel dan protein yang terikat dapat dielusi dengan imidazole atau dengan merendahkan nilai pH. Karena imidazole identik dengan rantai samping histidin, maka pada saat konsentrasi imidazole ditingkatkan, imidazole akan menggantikan posisi polihistidin pada resin, dan polihistidin akan terelusi keluar.

Beberapa jenis IMAC antara lain Nickel His-bind Resin dan Ni-NTA (*nitriloacetic acid*) His-Bind resin yang memiliki pengkelat metal  $\text{Ni}^{2+}$ . Dan TALON dengan pengkelat metal berupa  $\text{Co}^{2+}$ -*carboxymethylaspartate*.

### 2.8.3 Kromatografi Penukar Ion

Kromatografi penukar ion merupakan teknik kromatografi berdasarkan interaksi reversibel antara protein bermuatan dengan medium kromatografi yang memiliki muatan berlawanan. Muatan pada permukaan protein bergantung pada pH mediumnya, ketika pH medium di atas pI protein, maka protein akan terikat pada penukar anion. Sebaliknya ketika pH medium di bawah pI protein, maka protein akan terikat pada penukar kation. Protein dapat dielusi dengan gradien konsentrasi garam atau pH. Pada saat muatan protein menjadi netral, maka protein akan terelusi dari kolom kromatografi. Semakin kuat ikatan protein pada kolom, dibutuhkan konsentrasi garam yang lebih tinggi untuk mengelusnya.

### 2.8.4 Kromatografi Interaksi Hidrofobik

Seperti kita ketahui bahwa protein memiliki daerah hidrofobik dan hidrofilik. Asam amino yang paling hidrofilik akan terlipat di sebelah dalam, namun ada beberapa residu hidrofilik yang terletak di luar. Area hidrofobik inilah yang dapat digunakan untuk memisahkan protein dengan kromatografi interaksi hidrofobik. Pemisahan didasarkan pada interaksi reversibel antara sebuah protein dan permukaan hidrofobik medium kromatografi.

Jumlah protein yang terikat pada medium kromatografi ini akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi garam yang digunakan.

Dan elusi dilakukan dengan cara mengurangi konsentrasi garam, semakin hidrofobik protein tersebut maka protein itu yang akan terelusi paling akhir.

### **2.8.5 Gel Filtrasi**

Gel filtrasi merupakan kromatografi eksklusi yang menggunakan fase gerak cair. Gel filtrasi memisahkan molekul berdasarkan perbedaan ukuran, dan di sini molekul tidak berikatan pada medium kromatografi. Proses pemisahan dilakukan dengan mengelusi protein menggunakan buffer. Molekul yang lebih besar dari pori-pori matriks tidak dapat berdifusi ke dalam pori sehingga molekul tersebut akan melewati kolom lebih cepat, sedangkan molekul kecil berdifusi ke dalam pori dan tinggal lebih lama di dalam kolom.

## BAB III

### PERCOBAAN

#### 3.1 Bahan-bahan

Bakteri *E.coli* strain DH5 $\alpha$ , bakteri *E.coli* strain BL21(DE3), vektor pT7-blue T (Novagen), oligonukleotida (Fasmac), vektor pET28a, pET21b, pET-30c(+) (Novagen), vektor pColdI (Takara), vektor pMALc4E dan vektor pTYB12 (New England Biolabs), enzim restriksi *NdeI* dan *XhoI* (Takara), GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Bioscience), Qiaprep Miniprep (Qiagen), *Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit*, medium Luria-Bertani ( 1% tripton, 0.5% ekstrak yeast, 1% NaCl (% w/v)), IPTG, ampisilin, kanamysin, paromamin, neamin, DOS, UDP-Glc, UDP-GlcNAc, gliserol, buffer Tris, buffer HEPES, buffer MES, buffer fosfat, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, DNFB, DMSO, etil asetat, metanol (Merck), imidazole, amonium sulfat, Triton X-100, D<sub>2</sub>O (Acros Organics), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, CH<sub>3</sub>Cl, etanol, NH<sub>4</sub>OH, HCl, CH<sub>3</sub>COOH dan ninhidrin. Resin Ni<sup>2+</sup> His-Bind, resin Ni-NTA His Bind, resin TALON, resin kromatografi penukar anion DEAE Sepharose, resin kromatografi penukar kation CM Sephadex C-25 dan SP Sepharose, resin interaksi hidrofobik Phenyl Sepharose HP, resin gel filtrasi G-75 Sephadex (GE Healthcare), resin penukar kation NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Amberlite CG50, resin penukar anion SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

DOWEX AG1X8 (Sigma Aldrich)

### 3.2 Peralatan

GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystem), LONG READER 4200 (Li-Cor), Sonicator (Sonifier Type-250, Branson), centrifugator (Beckman), autoklaf, plat alumina TLC, *centrifugal evaporator*, *High Performance Liquid Chromatography* (pompa : L-7100, Hitachi; kolom oven : L-7300, Hitachi; kolom *reverse-phase* PEGASIL ODS : Senshu Pak, 4.6 x 250 mm; UV detektor : L-7405, Hitachi; *Chromato-Integrator* : D-2500, Hitachi), Mili-Q *Water Purificator*, *Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (LCQ mass spectrometer : Finnigan, Nanospace HPLC : Shiseido, Nanospace SE-1 UV detector : Shiseido, kolom RP-18 GP : Kanto), SDS PAGE, ultrafiltrasi (Vivaspin 20, 10.000 MW, Vivascience), *seamless cellulose tube* (Viskase Companies, Inc), *High Resolution Fast Atomic Bombardment Mass Spectrometry*, *Nuclear Magnetic Resonance* (Bruker DRX-500).

### 3.3 Cara Kerja

#### 3.3.1 Pembuatan Medium Luria-Bertani (LB)

Bubuk tripton, bubuk ekstrak yeast dan NaCl ditimbang sebanyak 10 gram, 5 gram, dan 10 gram secara berurutan kemudian dilarutkan dalam 1 L akuades hingga menjadi warna kuning jernih. Larutan LB dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan aluminium foil kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C.

#### 3.3.2 Detail Eksperimen Secara Umum

*Streptomyces kanamyceticus* JCM433 yang diambil dari Japan Collection of Microorganism merupakan sumber DNA kromosom untuk mengklon gen biosintesis kanamycin. Data sekuens DNA untuk *orf14* dan *orf20* berada di bawah *accession number* AB1646428.

Ekstraksi DNA genomik dilakukan dengan metode standard (Kieser *et al.*, 2000). Manipulasi DNA secara umum terhadap *Escherichia coli* juga dilakukan berdasarkan protokol standard (Sambrook *et al.*, 1989). *E.coli* DH5α digunakan sebagai *strain* inang untuk subkloning fragmen DNA. *E.coli* BL21(DE3) digunakan untuk ekspresi gen biosintesis kanamycin. Vektor pT7-blue digunakan sebagai vektor plasmid untuk subkloning melalui PCR. *E.coli*

yang telah mengandung plasmid dikultur dalam medium LB dengan antibiotik (100 µg/mL ampicillin atau 30 µg/mL kanamycin) pada suhu 37°C sepanjang malam untuk mengekstraksi plasmidnya.

Pemurnian plasmid dilakukan dengan GFX Micro Plasmid Prep Kit dan Qiaprep Miniprep. PCR dilakukan dengan GeneAmp PCR System 9700 menggunakan PrimeSTAR HS polymerase. Analisis sekuens DNA dilakukan menggunakan LONG READER 4200 dan *Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit* sesuai dengan protokolnya.

### 3.3.3 Kloning *orf14* dan *orf20*

Gen *orf14* diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer Orf14-N : 5'-GCATATGACCGAGCCTGCCAAGGGTG-3' dan Orf14-C: 5'-CGGGGTGGGGGGACTCGAGGAGGACC-3'. Sedangkan gen *orf20* diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer Orf20-N: 5'-ACCATATGCGCGTACTCCGGCTACC-3' dan Orf20-C : 5'-GAACAGGACCTCGAGTGTTCGTACGGC-3'. Untuk mengklon gen-gen ini ke dalam vektor pMAL, digunakan sebuah primer 30-EcoRI-NdeI : 5'-AACTTTAAGAAGAAGAATTCCATATG-3' untuk memasukkan sebuah situs *EcoRI* ke terminal 5'- dalam gene tersebut. Kondisi PCR yang digunakan yaitu 30 siklus dari 98°C, 10 detik; 55°C atau 58°C, 5 detik; 72°C, 120 detik untuk pemanjangan DNA dalam 2 µL 5 x PrimeSTAR buffer, 0.8 µL dNTP

(masing-masing 2.5 mM), 0.5  $\mu$ L DMSO, 0.3  $\mu$ L primer-N (10  $\mu$ M), 0.3  $\mu$ L primer-C (10  $\mu$ M), 0.1  $\mu$ L PrimeSTAR polymerase, 0.5  $\mu$ L DNA genomik (9 ng/  $\mu$ L) dan 5.5  $\mu$ L air.

Produk PCR yang telah teramplifikasi dicampurkan dengan Ex Taq Polymerase dan dNTP untuk meletakkan A pada ujung fragmen (72°C, 2 min) kemudian fragmen DNA yang dihasilkan disubklon ke vektor T dari pT7Blue untuk menghasilkan pT7Blue-Orf14 dan pT7Blue-Orf20. Setelah mengkonfirmasi sekuens DNA, plasmid yang sesuai dipotong dengan *Nde*I dan *Xho*I. Lalu hasil potongan fragmen DNA tersebut dimasukkan ke *situs* yang cocok pada pET28a untuk menghasilkan pET28-Orf14 dan pET28-Orf20, dan juga ke *situs* yang cocok pada pColdI untuk menghasilkan pColdI-Orf14 dan pColdI-Orf20. Plasmid tersebut dimasukkan ke dalam *E.coli* BL21(DE3) dengan transformasi kimia standard.

#### 3.3.4 Ekspresi dari Orf14

*Overexpression* Orf14/pET28 dilakukan dalam *E.coli* BL21(DE3). Mula-mula, Orf14/pET28 diinokulasi dalam 3 mL medium LB (pre-kultur) yang mengandung 30  $\mu$ g/ml kanamisin. Setelah inkubasi dilakukan selama 15 jam pada suhu 37°C, pre-kultur tersebut digunakan untuk menginokulasi 200 mL medium LB. Bakteri dikultur hingga mencapai OD<sub>600</sub> 0.6 – 1.0 . Setelah itu, dilakukan induksi dengan menambahkan IPTG hingga konsentrasi akhir

0.5 mM dan kultur dilanjutkan selama 19 jam lagi pada suhu 15°C atau 28°C. Sel-sel dikumpulkan dengan sentrifugasi pada 8.000 rpm selama 30 menit dan disimpan pada suhu -30°C untuk penggunaan selanjutnya.

Sel basah sebanyak 1 g *Cell-Free Extracts* (CFE) dalam 10 mL buffer disiapkan dengan cara melakukan sonifikasi selama 1 menit sebanyak 5 kali (1 min x 5), *output* 2, *duty cycle* 50%. Supernatan dan pelet dipisahkan dengan sentrifugasi 7.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan digunakan sebagai *Cell-Free Extract* yang mengandung protein target. Protein yang dihasilkan dianalisis dengan SDS PAGE (12,5 %, Comassie Brilliant Blue). Ekspresi dari Orf20 dilakukan dengan cara yang sama dengan ekspresi Orf14.

### 3.3.5 Analisis Enzim

Untuk menganalisis substrat yang sesuai untuk Orf14 dan Orf20, maka dilakukan beberapa kombinasi reaksi enzim. Hingga saat ini, kondisi buffer optimum untuk reaksi "Orf14" hingga saat ini adalah buffer Tris atau HEPES pH 8.0 yang mengandung 10% gliserol dan 1 mM MgCl<sub>2</sub>. CFE yang mengandung protein target dimasukkan ke dalam tabung eppendorf, lalu dicampurkan dengan 2 mM akseptor gula ( 20 mM, 2 µL paromamin ; neamine ; DOS) dan 2 mM donor glycosyl ( 20 mM, 2 µL UDP-Glc ; UDP-GlcNAc) hingga volume total 20 µL, dan diinkubasi pada suhu 28°C selama

18 jam.

Reaksi enzimatik dihentikan dengan menambahkan 20  $\mu\text{L}$  etanol lalu disentrifugasi dan diambil supernatannya. Produk reaksi ini dikonversi menjadi turunan dinitrofenil dengan DNFB. Mula-mula, dari supernatan diambil aliquot sebanyak 20  $\mu\text{L}$ , lalu ditambah 10  $\mu\text{L}$  DMSO, 20  $\mu\text{L}$  5% DNFB dalam metanol, dan 2  $\mu\text{L}$  2 M NaOH kemudian campuran ini diinkubasi pada suhu 60°C selama 1,5 jam. Setelah itu ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  akuades dan turunan dinitrofenil diekstraksi dengan 500  $\mu\text{L}$  etil asetat. Lapisan etil asetat dipisahkan dengan *centrifugal evaporator*. Residu yang tersisa dilarutkan kembali dalam 100  $\mu\text{L}$  metanol untuk analisis HPLC dan LCESI-MS.

Kondisi HPLC untuk analisis produk reaksi enzimatik yaitu fase gerak yang terdiri atas air Mili-Q dan metanol dengan gradien : 0-30 menit gradien linear dari 50%-90% MeOH, 31-35 menit isokratik pada 100% MeOH. Fase diam berupa kolom *reverse-phase* PEGASIL ODS 4.6 x 250 mm. Sampel yang diinjeksikan ke dalam HPLC sebanyak 5  $\mu\text{L}$ , laju alir 0.9 mL/menit, kolom oven 40°C dan absorpsi UV diukur pada panjang gelombang 350 nm.

Kondisi LCESI-MS (Yokoyama *et al.*, 2008) adalah sebagai berikut, sampel sebanyak 2  $\mu\text{L}$  diinjeksikan ke dalam sistem HPLC, dan elusi dilakukan dengan 10% asetonitril (aq) selama 5 menit, diikuti gradien linear asetonitril 50%-80% selama 40 menit pada laju alir 50  $\mu\text{L}$ /menit, suhu 40°C. Elusi dimonitor pada panjang gelombang 350 nm, ESI-MS dioperasikan pada mode ion negatif.

### 3.3.6 Optimasi Kondisi Reaksi

Untuk optimasi kondisi reaksi enzimatik digunakan CFE Orf14 direaksikan dengan UDP-Glc dan paromamin sebagai substrat. Beberapa macam buffer yang dicoba yaitu buffer Tris, HEPES, fosfat yang mengandung 10% gliserol, 1 mM  $Mg^{2+}$  dengan konsentrasi 50 mM, pH 8.0.

Selain itu pH optimum juga ditentukan melalui buffer fosfat pH 6.5-8.0, buffer HEPES pH 7.0-8.0, dan buffer Tris pH 8.0. Kebutuhan ion logam pada reaksi enzimatik ditentukan menggunakan  $MgCl_2$  dan  $MnCl_2$ , keadaan tanpa logam dianggap sebagai kontrol.

Sel basah (*wet cells*) sebanyak 0.02 g disuspensikan dalam 200  $\mu$ L buffer Tris (50 mM, pH 8.0, gliserol 10%). Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 3 x 10s, *output 2*, *duty cycle 50%* lalu disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Reaksi enzim dilakukan menggunakan UDP-Glc dan paromamin sebagai substrat.  $MgCl_2$  atau  $MnCl_2$  ditambahkan hingga konsentrasi akhir 1 mM. Produk reaksi dikonversi menjadi turunan dinitrofenil, dan dianalisis dengan HPLC.

### 3.3.7 Sistem Ekspresi

Untuk mencari sistem ekspresi yang memberikan protein yang larut maka beberapa sistem ekspresi dicoba untuk mengekspresikan protein

target. *orf14* diklon dalam vektor pT7Blue T dipotong dengan *NdeI* dan *XhoI* lalu dimasukkan ke dalam *situs* yang cocok dalam pET-30c (+). Plasmid Orf14/pET30 dimasukkan ke dalam *E.coli* BL21(DE3) dengan transformasi kimia standard. Sel ditumbuhkan dalam medium LB yang mengandung kanamisin 30 µg/mL pada suhu 37°C hingga mencapai OD<sub>600</sub> 0.8. IPTG juga ditambahkan untuk induksi hingga konsentrasi akhir 0.5 mM, dan kultur dilanjutkan sepanjang malam pada suhu 15°C. Sistem ekspresi yang lain untuk Orf14 dan Orf20 juga dibuat dengan cara yang sama (Tabel 3.1) dan ekspresi ini juga dicek dengan SDS PAGE dan analisis enzim.

**Tabel 3.1** Sistem Ekspresi untuk Orf14 dan Orf20

Orf14	Orf20
a. pColdI ( <i>amp</i> <sup>R</sup> )	a. pColdI ( <i>amp</i> <sup>R</sup> )
b. pMALc4E ( <i>amp</i> <sup>R</sup> )	b. pColdI co-expressed with GroES-GroEL( <i>kan</i> <sup>R</sup> and <i>amp</i> <sup>R</sup> )
c. pTYB12 ( <i>amp</i> <sup>R</sup> )	c. pET-21 ( <i>amp</i> <sup>R</sup> )
	d. pET-21 co-expressed with GroES-GroEL( <i>kan</i> <sup>R</sup> and <i>amp</i> <sup>R</sup> )
	e. pMALc4E ( <i>amp</i> <sup>R</sup> )

### 3.3.8 Pemurnian melalui Resin Ni<sup>2+</sup> His Bind

Sel basah sebanyak 1 g disuspensikan dalam 10 mL buffer HEPES (50 mM, pH 8.0) 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 7 x 1 menit, *output* 2, *duty cycle* 50% dan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 20 menit.

CFE yang mengandung protein target dimasukkan ke dalam kolom resin Ni<sup>2+</sup> His-Bind (1.5 cm x 3 cm) yang telah diekuilibrasikan dengan buffer HEPES yang sama. Protein yang teradsorb dielusi menggunakan imidazole secara gradien bertahap (1 mM ; 5 mM ; 20 mM ; 200 mM) dan dideteksi dengan UV 280 nm. Eluat dari 20 mM dan 200 mM imidazole dikonsentrasikan hingga 1 mL dengan ultrafiltrasi pada 6,500 rpm selama 30 menit dan dibilas dengan buffer beberapa kali. Konsentrat yang dihasilkan digunakan untuk analisis enzim dan SDS PAGE.

### **3.3.9 Pemurnian melalui Resin Hi-Trap His-Bind, 0.5% ; 2% Triton X-100**

Sel basah sebanyak 1 g disuspensikan dalam 10 mL buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10% dengan tambahan 0.5% atau 2% Triton X-100. Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 12 x 1 menit, *output* 2, *duty cycle* 50% dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 20 menit.

CFE yang mengandung protein target dimasukkan ke dalam kolom HisTrap HP (*pre-packed* 1 mL) yang telah diekuilibrasikan dengan buffer Tris yang sama. Protein yang teradsorb dielusi menggunakan imidazole yang mengandung 500 mM NaCl (untuk 0.5% Triton 100-X) secara gradien bertahap (5 mM ; 20 mM ; 100 mM; 150 mM; 300 mM).

Eluat dari 20 mM ; 100 mM dan 300 mM imidazole dikonsentrasikan hingga 1 mL dengan ultrafiltrasi. Konsentrat digunakan untuk analisis enzim dan SDS PAGE.

### 3.3.10 Pemurnian melalui Resin Ni<sup>2+</sup> His-Bind, fraksionasi (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Sel basah sebanyak 0.8 g disuspensikan dalam 8 mL buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 13 x 1 menit, *output 2, duty cycle 50%* dan disentrifugasi pada 7.000 rpm selama 30 menit menghasilkan CFE.

Setelah itu, dilakukan fraksionasi amonium sulfat dengan derajat kejenuhan 30%, 40%, 60% menggunakan 90% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dalam 50 mM buffer Tris pH 8. Setiap fraksionasi dilakukan melalui pengadukan dengan stirrer magnet selama 30 menit pada suhu 4°C. Setiap endapan yang terbentuk di tiap rentang fraksionasi dikumpulkan dengan sentrifugasi selama 15 menit pada 7.000 rpm, 4°C. Lalu endapan dilarutkan kembali dalam 0.5 mL buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi tersebut didialisis dengan *seamless cellulose tube* dan direndam dalam 1 L buffer Tris (50 mM, pH 8.0) selama 4 jam sambil distirrer, lalu buffer diganti dengan buffer Tris (50 mM, pH 8.0) 1 L lagi selama 20 jam.

Ekspresi protein diperiksa dengan SDS PAGE dan aktivitasnya diuji dengan HPLC. Dua fraksi aktif yaitu 0-30% dan 30-40% digabungkan dan dimasukkan ke dalam kolom resin Ni<sup>2+</sup> His-Bind (1.5 cm x 3 cm) yang telah diekuilibrasikan dengan buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Protein target yang diharapkan dielusi dengan imidazole secara gradien bertahap ( 100 mM ; 200 mM ; 300 mM). Eluat dari 100 mM imidazole

dikonsentrasikan hingga 1 mL dengan ultrafiltrasi kemudian diuji dengan SDS PAGE. Analisis enzim dilakukan setiap tahap pemurnian dari CFE, fraksionasi amonium sulfat dan fraksi hasil dialisis.

### **3.3.11 Pemurnian melalui Resin Ni-NTA His-Bind**

Sel basah sebanyak 1 g disuspensikan dalam 10 mL buffer HEPES (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 7 x 1 menit, *output 2, duty cycle 50%* dan disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 30 menit menghasilkan CFE.

CFE dimasukkan ke dalam kolom resin Ni-NTA His-Bind (1.5 cm x 3 cm) yang telah diekuilibrasikan dengan buffer HEPES yang sama. Protein yang teradsorpsi dielusi menggunakan imidazole secara gradien bertahap (5 mM ; 50 mM ; 300 mM ; 500 mM). Eluat dari 50 mM imidazole dikonsentrasikan hingga 1 mL dengan ultrafiltrasi. Konsentrat digunakan untuk melakukan analisis enzim dan SDS PAGE.

### **3.3.12 Pemurnian melalui Resin TALON**

Sel basah sebanyak 0.5 g disuspensikan dalam 5 mL buffer HEPES (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 12 x 1 menit, *output 2, duty cycle 50%* dan disentrifugasi pada

12.000 rpm selama 20 menit.

CFE yang mengandung protein target dimasukkan ke dalam kolom resin TALON yang telah diekuilibrasikan dengan buffer HEPES yang sama. Protein yang teradsorpsi dielusi menggunakan imidazole secara gradien bertahap (5 mM ; 20 mM ; 150 mM). Eluat dari 20 mM dan 150 mM imidazole dikonsentrasikan hingga 1 mL dengan ultrafiltrasi. Konsentrat digunakan untuk melakukan analisis enzim dan SDS PAGE.

### **3.3.13 Pemurnian melalui DEAE Sepharose *Fast Flow***

Sel basah sebanyak 2.6 g disuspensikan dalam 30 mL buffer HEPES (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 17 x 1 menit, *output 2, duty cycle 50%* dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 menit.

CFE yang mengandung protein target dimasukkan ke dalam kolom resin DEAE Sepharose (2.5 cm x 3 cm) yang telah diekuilibrasikan dengan buffer Tris yang sama. Protein yang teradsorpsi dielusi menggunakan gradien linear NaCl (0 – 1 M, total 600 mL), laju alir 4 menit/fraksi. Fraksi-fraksi (16-56, bagian genap) dicek dengan SDS PAGE. Lalu analisis enzim dilakukan bagi fraksi 16; 18; 19; 20; 22; 24; 26; 28; 30; 32; 34; 36.

### 3.3.14 Pemurnian melalui HiTrap DEAE *Fast Flow*

Sel basah sebanyak 1 g disuspensikan dalam 10 mL buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 13 x 1 menit, *output 2*, *duty cycle 50%* dan disentrifugasi pada 7.000 rpm selama 30 menit.

Setelah itu, dilakukan fraksionasi amonium sulfat dengan derajat kejenuhan 30%, 40%, 60% menggunakan 90% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dalam 50 mM buffer Tris pH 8. Setiap fraksionasi dilakukan melalui pengadukan dengan stirrer magnet selama 30 menit pada suhu 4°C. Setiap endapan yang terbentuk di tiap rentang fraksionasi dikumpulkan dengan sentrifugasi selama 15 menit pada 7.000 rpm, 4°C. Lalu endapan dilarutkan kembali dalam 0.5 mL buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi tersebut didialisis dengan *seamless cellulose tube* dan direndam dalam 1 L buffer Tris (50 mM, pH 8.0) selama 4 jam sambil distirrer, lalu buffer diganti dengan buffer Tris (50 mM, pH 8.0) 1 L lagi selama 20 jam.

Ekspresi protein diperiksa dengan SDS PAGE dan aktivitasnya diuji dengan HPLC. Dua fraksi aktif yaitu 0-30% dan 30-40% digabungkan dan dimasukkan ke dalam kolom resin HiTrap DEAE FF (1 mL) yang telah diekuilibrasi dengan buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Protein target yang diharapkan dielusi dengan gradien linear NaCl 0 – 1 M (total 200 mL), laju alir 5 menit/fraksi. Analisis enzim dilakukan setiap tahap

pemurnian dari CFE, fraksinasi amonium sulfat dan fraksi hasil dialisis.

### 3.3.15 Pemurnian melalui CM Sephadex C-25

Sel basah sebanyak 1 g disuspensikan dalam 10 mL buffer Tris (50 mM, pH 8.0) atau buffer fosfat (50 mM, pH 7.54), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 13 x 1 menit, *output 2, duty cycle* 50% dan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 25 menit.

CFE yang mengandung protein target dimasukkan ke dalam kolom resin CM Sephadex C-25 (2.5 cm x 3 cm) yang telah diekuilibrasi dengan buffer yang sama. Protein yang teradsorpsi dielusi menggunakan gradien linear NaCl (0 – 400 mM, total 600 mL), laju alir 3 menit/fraksi.

### 3.3.16 Pemurnian melalui HiTrap SP Sepharose Fast Flow

Sel basah sebanyak 1 g disuspensikan dalam 10 mL buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 12 x 1 menit, *output 2, duty cycle* 50% dan disentrifugasi pada 7.000 rpm selama 30 menit.

CFE dimasukkan ke dalam kolom resin HiTrap SP FF (*prepacked column* 1 mL) yang telah diekuilibrasi dengan buffer HEPES yang sama. Protein yang teradsorpsi dielusi menggunakan NaCl secara gradien bertahap

(0.2 M ; 0.4 M ; 0.6 M ; 0.8 M; 1 M) sebanyak 5 mL untuk masing-masing konsentrasi.

### 3.3.17 Pemurnian melalui Kromatografi Interaksi Hidrofobik

Sel basah sebanyak 1 g disuspensikan dalam 10 mL buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM  $MgCl_2$ , gliserol 10%. Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 7 x 1 menit, *output 2*, *duty cycle* 50% dan disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 30 menit.

Setelah itu, dilakukan fraksinasi amonium sulfat dengan derajat kejenuhan 10% dan 40% menggunakan 90%  $(NH_4)_2SO_4$  dalam 50 mM buffer Tris pH 8. Setiap fraksinasi dilakukan melalui pengadukan dengan stirrer magnet selama 30 menit pada suhu 4°C. Setiap endapan yang terbentuk di tiap rentang fraksinasi dikumpulkan dengan sentrifugasi selama 15 menit pada 7.000 rpm, 4°C. Lalu endapan dari 40% derajat kejenuhan dilarutkan kembali dalam 0.5 mL buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM  $MgCl_2$ , gliserol 10%. Suspensi tersebut dimasukkan ke dalam kolom resin Phenyl Sepharose HP (*prepacked column* 1 mL) yang telah diekuilibrasikan dengan buffer HEPES yang sama yang mengandung (I) 0.4 M  $(NH_4)_2SO_4$  atau (II) 0.8 M  $(NH_4)_2SO_4$ . Protein yang teradsorpsi dielusi melalui gradien bertahap negatif menggunakan buffer HEPES yang mengandung  $(NH_4)_2SO_4$ . (I) 0.4 M ; 0.2 M ; 0 M atau (II) 0.8 M ; 0.6 M ; 0.4 M ; 0.2 M ; 0 M.

Kepada setiap eluat, ditambahkan amonium sulfat hingga konsentrasi akhir 2 M, lalu disimpan pada suhu 4°C selama 2-3 jam. Kemudian disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 15 menit. Setelah sentrifugasi, eluat yang menunjukkan endapan dipisahkan. Pelet tersebut dilarutkan kembali dengan buffer yang sama. Analisis enzim dilakukan untuk setiap tahap pemurnian dari CFE, setiap eluat dan eluat yang telah dipekatkan dan menunjukkan endapan.

### 3.3.18 Pemurnian melalui Gel Filtrasi

Sel basah sebanyak 1 g disuspensikan dalam 10 mL buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi disonifikasi dengan osilasi sonik 7 x 1 menit, *output* 2, *duty cycle* 50% dan disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 30 menit.

Setelah itu, dilakukan fraksionasi amonium sulfat dengan derajat kejenuhan 10% dan 40% menggunakan 90% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dalam 50 mM buffer Tris pH 8. Setiap fraksionasi dilakukan melalui pengadukan dengan stirrer magnet selama 30 menit pada suhu 4°C. Setiap endapan yang terbentuk di tiap rentang fraksionasi dikumpulkan dengan sentrifugasi selama 15 menit pada 7.000 rpm, 4°C.

Lalu endapan dari 40% derajat kejenuhan dilarutkan kembali dalam 0.5 mL buffer Tris (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi

tersebut dimasukkan ke dalam kolom resin G-75 Sephadex (1.2 cm x 1.2 m) yang telah diekuilibrasi dengan buffer HEPES yang sama. Proses pemurnian ini dilakukan di dalam ruangan dingin 4°C. Elusi dilakukan menggunakan buffer yang sama dengan laju alir 2 ml/fraksi. Fraksi 11 hingga 30 dicek dengan SDS PAGE, lalu analisis enzim dilakukan untuk fraksi 14 hingga 26.

### 3.3.19 Isolasi Produk Reaksi Enzimatik dari Orf14

Sel basah Orf14/pET28 sebanyak 2 g dilarutkan dalam 2 mL buffer HEPES (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%. Suspensi didisrupsi dengan osilasi sonik (10 x 1 menit), *output 2*, *duty cycle 50%* dan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 30 menit, 4°C.

Setelah itu dilakukan fraksinasi amonium sulfat terhadap CFE pada 10% dan 40% derajat kejenuhan menggunakan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> padat. Fraksinasi dilakukan dengan mengaduk larutan selama 50 menit pada suhu 4°C. Setiap derajat kejenuhan disentrifugasi pada 10.000 rpm, 4°C selama 15 menit. Endapan yang didapat dilarutkan kembali dalam 1.5 mL buffer HEPES (50 mM, pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, gliserol 10%.

Larutan enzim ini digunakan untuk reaksi enzim skala besar yang terdiri atas larutan enzim (1 mL), paromamin (4.1 mM, 10 mg), UDP-Glc (4.65 mM, 28.8 mg), buffer HEPES (50 mM, pH 8.0, 1 mM Mg<sup>2+</sup>, gliserol 10%) hingga 10 mL larutan dan diinkubasi pada suhu 28°C. Setelah 30 jam, 5 mg

UDP-Glc dan 0.25  $\mu$ L larutan enzim ditambahkan. Setelah direaksikan lagi 25 jam, 5 mg UDP-Glc dan 0.25  $\mu$ L larutan enzim ditambahkan lagi. Total waktu reaksi enzim ini yaitu 92 jam.

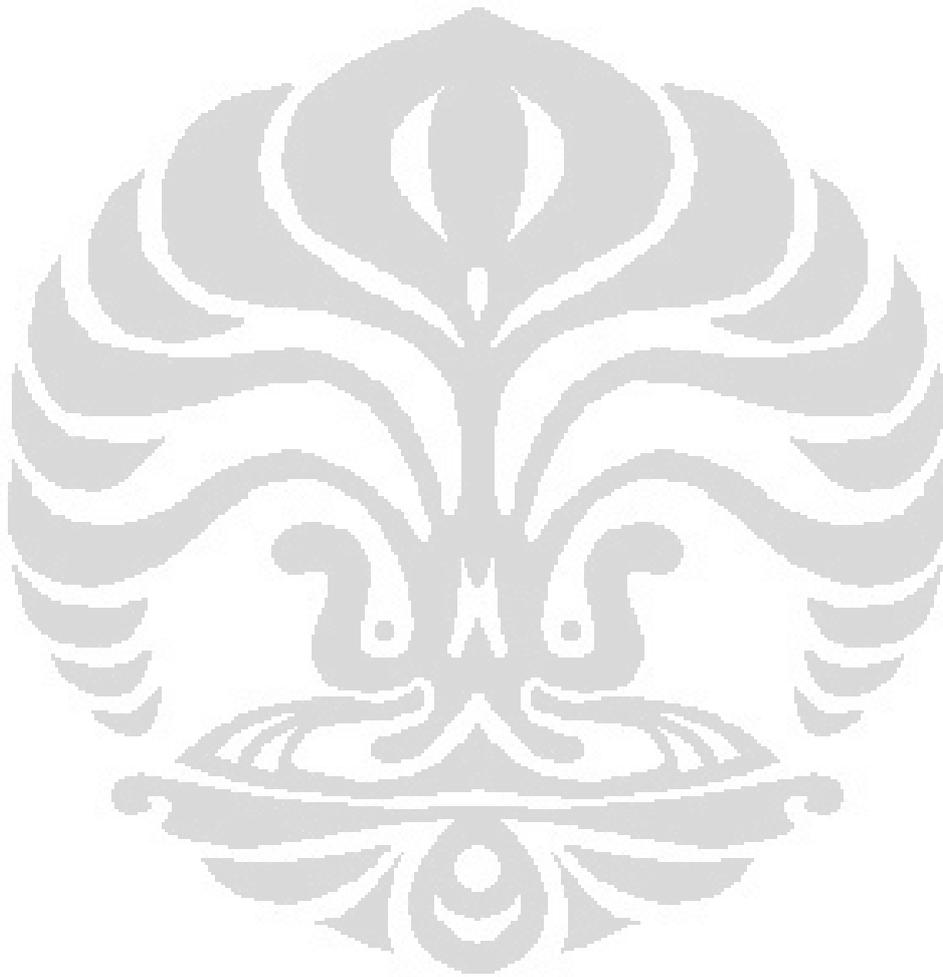
Untuk mengkonsumsi paromamin yang tersisa, reaksi enzimatis kedua dilakukan dengan cara yang sama seperti di atas menggunakan sel segar sebanyak 1 g dan 18.9 mg UDP-Glc. Setelah itu, sebanyak 18 mg UDP-Glc dan larutan enzim ditambahkan setiap hari sebanyak dua kali (total 96 jam). Kemudian, reaksi enzimatis ketiga pun dilakukan selama 2 hari (42 jam) dengan metode yang sama seperti reaksi kesatu dan kedua.

Setiap penambahan enzim dan UDP-Glc, rasio konversi diperkirakan dengan mengambil 10  $\mu$ L alikuot dari larutan reaksi. Alikuot tersebut diubah menjadi turunan dinitrofenil untuk analisis HPLC.

Larutan enzim diasamkan dengan asam asetat hingga pH 5.0. Kemudian, larutan tersebut dimasukkan ke dalam kolom resin Amberlite CG50 (bentuk  $\text{NH}_4^+$ , 0.5 x 12 cm), dibilas dengan air (50 mL), diikuti 0.1 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$  (aq) sebanyak 100 mL, dan produk yang diharapkan dielusi dengan 1.0 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  (aq) sebanyak 100 mL. Setiap fraksi elusi yaitu 8 mL. Setiap fraksi dicek dengan TLC melalui larutan pengembang  $\text{CH}_3\text{Cl} : \text{MeOH} : \text{NH}_4\text{OH} : \text{EtOH} = 4 : 6 : 7 : 1$  dan dideteksi dengan mencelupkannya ke dalam ninhidrin.

Pelarut dalam fraksi yang mengandung produk disingkirkan dengan *rotary evaporator* dan konsentrasinya dimasukkan ke dalam kolom resin DOWEX AG1X8 (bentuk  $\text{SO}_4^{2-}$ , 0.5 x 10 cm) untuk menghasilkan

aminoglikosida sulfat sebanyak 7.9 mg. Produk (masih tercampur dengan paromamin) dilarutkan dalam deuterium oksida (99.8% atom D) untuk analisis NMR.



## BAB IV

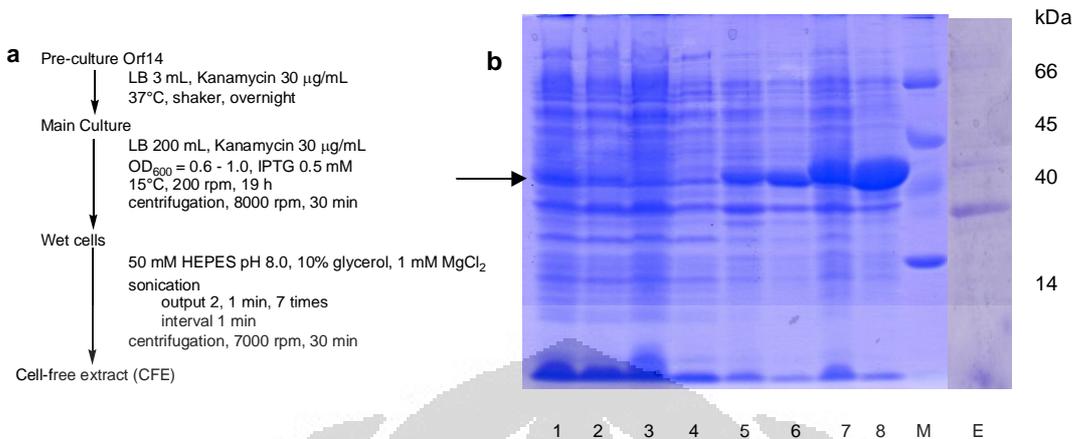
### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Ekspresi dari Orf14 dan Orf20

Protein target diekspresikan dalam *E.coli* karena *E.coli* memiliki ekspresi tingkat tinggi, hemat biaya, mudah digunakan dan manipulasi genetiknya bersifat langsung. Orf14 dan Orf20 diklon dalam pET-28b(+) (oleh F.Kudo) dikultur dalam medium LB yang mengandung kanamisin 30 µg/mL. Dan bakteri ditumbuhkan pada suhu 37°C hingga OD<sub>600</sub> mencapai 0.6 dan diinduksi dengan IPTG hingga konsentrasi akhir 0.5 mM (Gambar 4.1a).

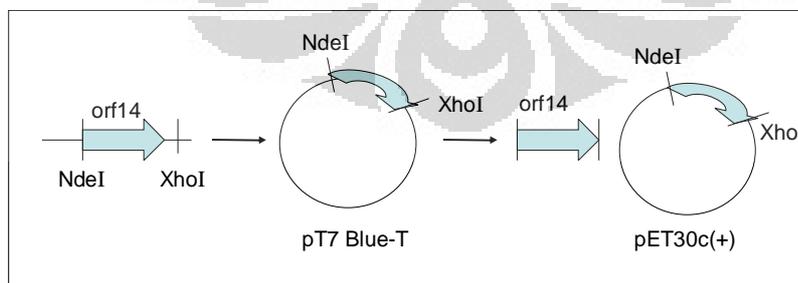
Untuk menghasilkan protein yang larut, dicoba variasi suhu pertumbuhan 15°C atau 28°C setelah induksi IPTG. Sebagai hasilnya, protein yang larut didapatkan pada saat BL21(DE3) yang menjadi sel inang Orf14/pET28 dikultur pada suhu 15°C. Hal ini diperkirakan dari hasil SDS PAGE yang menunjukkan adanya protein pada 40 kDa, sesuai ukuran protein target Orf14 (ditunjukkan dengan panah hitam pada gambar 4.1b).

Pada suhu yang lebih rendah, protein rekombinan cenderung terlipat sempurna sehingga dapat meningkatkan stabilitas dan kelarutannya. Oleh karena itu, suhu pertumbuhan 15°C akan digunakan untuk analisis fungsional Orf14 selanjutnya dalam penelitian ini.



**Gambar 4.1.** Ekspresi dari rekombinan Orf14 dan Orf20 dalam pET28. (a). Prosedur Ekspresi Orf14 dan Orf20. (b). Kolom 1 : CFE Orf14 15°C; kolom 2 : CFE Orf14 28°C; kolom 3 : CFE Orf20 15°C; kolom 4 : CFE Orf20 28°C; kolom 5 : pelet Orf14 15°C; kolom 6 : pelet ORF14 28°C; kolom 7 : pelet Orf20 15°C; kolom 8 : pelet Orf20 28°C; M : *protein marker*, E: *Empty plasmid pET28*

Untuk mencari protein Orf14 dan Orf20 yang larut, maka beberapa sistem ekspresi pun dicoba. Sistem ekspresi yang dicoba yaitu sistem pET (pET-21b(+), pET-28b(+), pET-30c(+)) (Gambar 4.2), pCold (pColdI), pMAL (pMALc4E), IMPACT (pTYB12), dan ko-ekspresi dengan *molecular chaperone* GroEL/GroES.



**Gambar 4.2** Proses pemotongan dan ligasi pada transformasi Orf14 ke pET-30c(+)

Sebagai hasilnya, protein Orf14 yang larut ditemukan pada saat diekspresikan dalam pET-28b(+) dan pET-30c(+) (Tabel 4.1). Sedangkan Orf20 ditemukan sebagai protein yang tidak larut pada semua sistem ekspresi (Tabel 4.2). Berdasarkan hasil-hasil ini dan juga mempertimbangkan proses pemurniannya, Orf14/pET-28b(+), 15°C digunakan untuk analisis fungsional Orf14.

**Tabel 4.1** Kelarutan Orf14 dalam beberapa Sistem Ekspresi dan Temperatur pertumbuhan

Vektor untuk Orf14	Temperatur	Kelarutan
pET-28b(+)	15°C	O
pET-30c(+)	15°C	O
pMALc4E	28°C, 37°C	X
pTYB12	28°C, 37°C	X

**Tabel 4.2** Kelarutan Orf20 dalam beberapa Sistem Ekspresi dan Temperatur pertumbuhan

Vektor untuk Orf20	Temperatur	Kelarutan
pET-28b(+)	24°C	X
pColdI	24°C	X
pColdI, GroES/EL	24°C	X
pET-21b(+)	24°C	X
pET-21b(+), GroES/EL	24°C	X
pMALc4E	28°C, 37°C	X

## 4.2 Analisis Enzim

Orf14 dan Orf20 diprediksikan sebagai glikosiltransferase putatif. Dalam biosintesis kanamycin, Orf20 diperkirakan mengkatalisis pembentukan pseudodisakarida, sedangkan Orf14 diasumsikan mengkatalisis

pembentukan pseudotrisakarida (Gambar 1.2). Aktivitas enzim diidentifikasi dengan mereaksikan Orf14 atau Orf20 dengan akseptor gula (DOS, paromamin, atau neamine) dan donor glikosil (UDP-Glc dan UDP-GlcNAc).

Proses skrining akseptor gula dan donor glikosil pun dilakukan, semua kombinasi akseptor gula dan donor glikosil yang mungkin dilakukan untuk Orf14 (Tabel 4.3) dan Orf20 (Tabel 4.4).

**Table 4.3** Hasil Analisis Kombinasi Enzim untuk Orf14

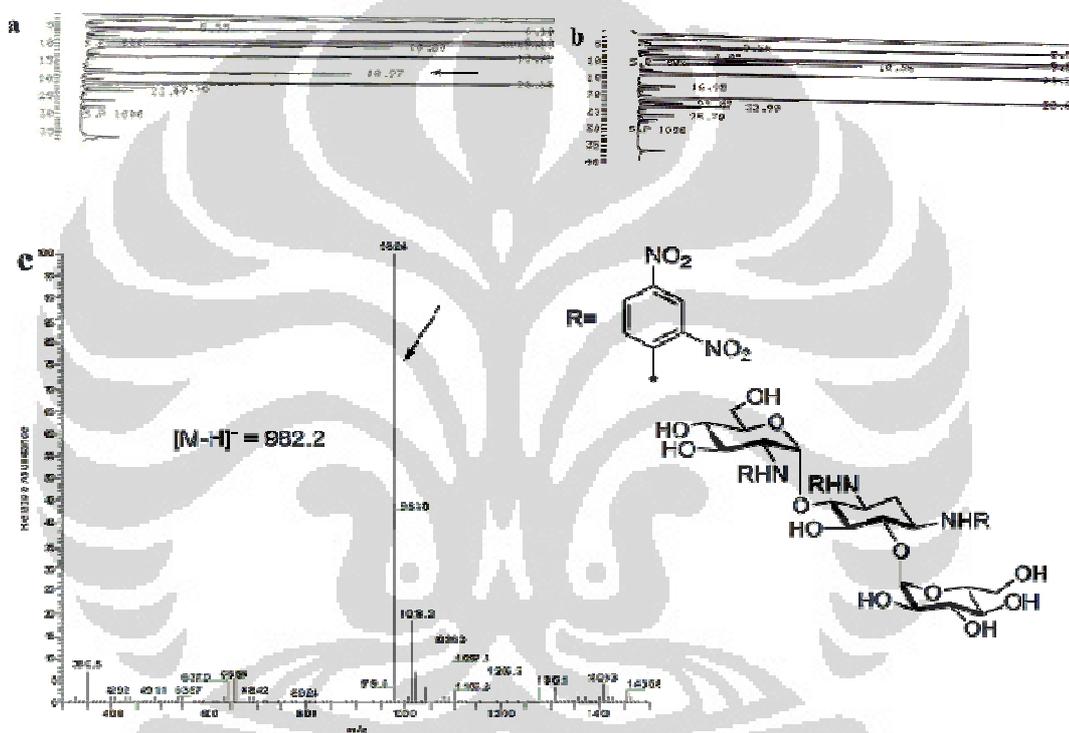
	Donor Glikosil	Akseptor Gula	Hasil
1	UDP-Glc	Paromamin	O
2	UDP-Glc	Neamin	X
3	UDP-GlcNAc	Paromamin	X
4	UDP-GlcNAc	Neamin	X

**Tabel 4.4** Hasil Analisis Kombinasi Enzim untuk Orf20

	Donor Glikosil	Akseptor Gula	Hasil
1	UDP-Glc	DOS	X
2	UDP-GlcNAc	DOS	X

Produk reaksi enzim diubah menjadi turunan dinitrofenil dengan 2,4-dinitrofluorobenzen untuk memfasilitasi analisis HPLC dan LCESI-MS. Sebagai hasilnya, Orf14 dengan paromamin dan UDP-Glc memberikan sebuah puncak baru yang teramati pada waktu retensi 18.27 menit (Gambar 4.3a), sedangkan tidak ada puncak yang muncul pada reaksi kontrol antara Orf14 dan paromamin tanpa UDP-Glc (Gambar 4.3b). Puncak baru ini juga menunjukkan  $m/z$  982.4 pada analisis LCESI-MS mode negatif (Gambar

4.3c). Hal ini mengindikasikan bahwa telah terbentuk tri-(2,4-dinitrofenil)-3''-deamino-3''-hidroksikanamysin C ([M-H]<sup>-</sup> 982.2). Donor glikosil dan akseptor gula yang lain tidak memberikan puncak baru. Hasil ini memperkuat dugaan bahwa Orf14 mengkatalisis glikosilasi dari paromamin dengan UDP-Glc untuk membentuk pseudotrisakarida, 3''-deamino-3''-hidroksikanamysin C.



**Gambar 4.3** Analisis produk yang terbentuk setelah inkubasi dengan paromamin, UDP-Glc dan protein Orf14. (a) Kromatogram HPLC dari produk yang terbentuk dari CFE Orf14. (b) Kromatogram HPLC untuk kontrol, produk yang terbentuk dari inkubasi enzimatik yang identik tanpa UDP-Glc. (c) Spektra LCESI-MS dari produk turunan 2,4-dinitrofluorobenzen. Panah hitam menunjukkan tri-(2,4-dinitrofenil)-3''-deamino-3''-hidroksikanamysin C.

Selanjutnya, aktivitas Orf14 dan Orf20 dalam beberapa sistem ekspresi juga diteliti (Tabel 4.5 dan Tabel 4.6).

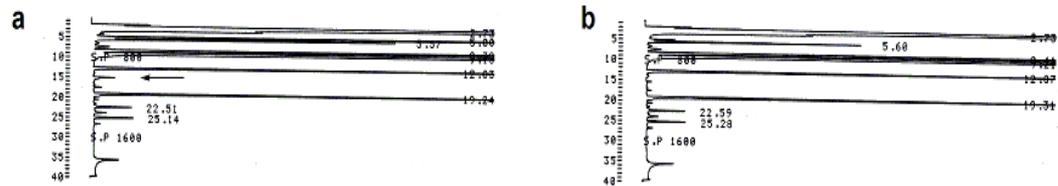
**Tabel 4.5** Aktivitas Orf14 dalam Beberapa Sistem Ekspresi dan Suhu Pertumbuhan

Vektor untuk Orf14	Temperatur	Aktivitas
pET-28b(+)	15°C	O
pET-30c(+)	15°C	O
pMALc4E	28°C, 37°C	X
pTYB12	28°C, 37°C	X

**Table 4.6** Aktivitas Orf20 dalam Beberapa Sistem Ekspresi dan Suhu Pertumbuhan

Vektor untuk Orf20	Temperatur	Aktivitas
pET-28b(+)	24°C	X
pColdI	24°C	X
pColdI, GroES/EL	24°C	X
pET-21b(+)	24°C	X
pET-21b(+),GroES/EL	24°C	X
pMALc4E	28°C, 37°C	X

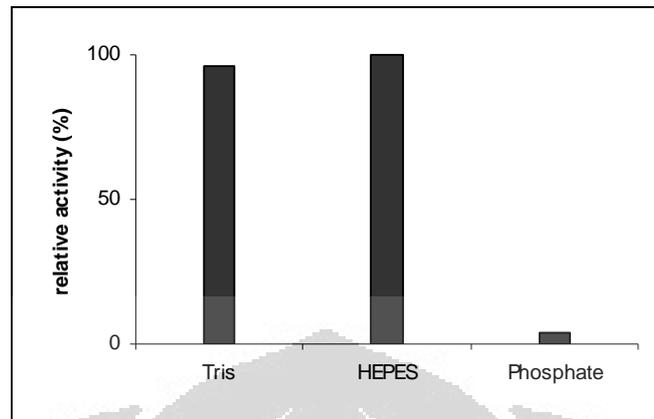
Dari percobaan ini ditemukan bahwa Orf14/pET30, 15°C juga aktif walaupun kurang aktif dibandingkan Orf14/pET28, 15°C. Sedangkan Orf20 ditemukan sedikit aktif ketika diekspresikan dalam pColdI dengan ko-ekspresi GroES/EL (Gambar 4.4).



**Gambar 4.4** (a) Kromatogram HPLC dari produk yang terbentuk dari campuran pColdI dengan ko-ekspresi GroES/EL, DOS dan UDP-Glc. (b) Kromatogram HPLC dari kontrol reaksi tanpa UDP-Glc.

### 4.3 Optimasi Kondisi Reaksi

Untuk mempertahankan aktivitas protein sepanjang proses pemurnian dan reaksi enzim, dibutuhkan beberapa usaha optimasi. Mula-mula, dibutuhkan buffer yang tepat untuk menjaga aktivitas Orf14. Pengujian bufer yang sesuai dilakukan melalui buffer Tris-HCl, buffer HEPES-NaOH dan buffer fosfat pada pH 8, mengandung gliserol 10% dan  $Mg^{2+}$ . Kemudian dilakukan reaksi enzimatik antara CFE dari Orf14/pET28 dengan substrat UDP-Glc dan paromamin. Produk yang dihasilkan dikonversi menjadi turunan dinitrofenil untuk analisis HPLC. Hasilnya, buffer Tris dan buffer HEPES tidak memberikan perbedaan yang berarti terhadap aktivitas Orf14, sedangkan buffer fosfat terlihat menurunkan aktivitas Orf14 (Gambar 4.5).

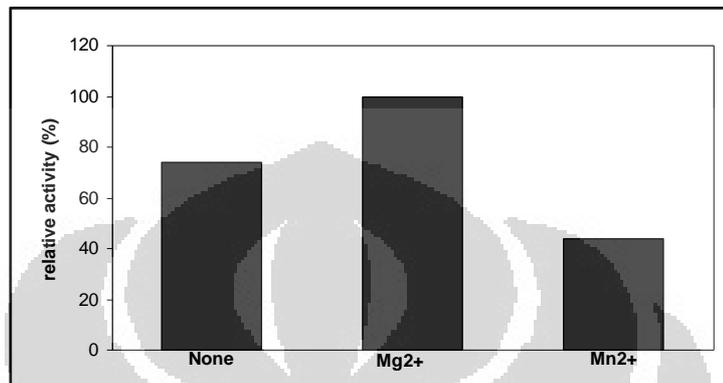


**Gambar 4.5** Buffer yang digunakan untuk mempertahankan stabilitas Orf14 (50 mM buffer Tris, HEPES, fosfat, pH 8, Gliserol 10%, 1 mM  $Mg^{2+}$ )

Kelebihan jumlah gugus fosfat dapat mempengaruhi ikatan substrat terhadap situs aktif Orf14 dan juga mempengaruhi ikatan logam, sehingga kehadirannya cenderung merendahkan aktivitas enzim. Buffer pH (6.5 – 8.0) juga diuji dan pH 7.0-8.0 dianggap merupakan pH optimum untuk reaksi enzimatik.

Logam biasanya dibutuhkan untuk aktivitas glikosiltransferase. Interaksi ionik antara sebuah enzim dan substrat dapat membantu mengorientasikan substrat untuk bereaksi atau menstabilkan muatan reaksi pada saat transisi. Oleh karena itu, pengaruh dari beberapa logam seperti ( $Mg^{2+}$  ( $MgCl_2$ ) dan  $Mn^{2+}$  ( $MnCl_2$ )) terhadap aktivitas enzim pun diperiksa. Sebagai hasilnya, kehadiran  $Mg^{2+}$  meningkatkan aktivitas Orf14 sedangkan  $Mn^{2+}$  terlihat menurunkan aktivitas (Gambar 4.6). Namun, ketika tidak ada logam yang ditambahkan pada reaksi enzimatik, Orf14 tetap menunjukkan

aktivitas. Dalam hal ini, aktivitas Orf14 tetap terlihat karena adanya *trace* logam yang berada di medium.



**Gambar 4.6** Kebutuhan logam untuk reaksi Orf14.

#### 4.4 Pemurnian melalui Resin His-Bind

Untuk mencegah gangguan dari protein non-target dalam pengujian sifat-sifat biokimia dari sebuah protein rekombinan, kita perlu memurnikan protein rekombinan tersebut. Orf14/pET-28b(+) merupakan protein dengan His<sub>6</sub>-tag pada N terminalnya. Oleh karena itu, IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) menjadi pilihan pertama untuk proses pemurnian ini. *Cell-Free Extract*, disiapkan dari 1 g sel basah Orf14/pET28 dalam buffer HEPES, dimasukkan ke dalam kolom resin Ni<sup>2+</sup> His-Bind. Elusi dilakukan sambil dimonitor dengan deteksi UV pada panjang gelombang 280 nm dan beberapa puncak muncul pada saat elusi dengan 20 mM dan 200 mM imidazole. Setelah menyingkirkan imidazole dengan ultrafiltrasi, protein yang terelusi dicek dengan SDS PAGE. Protein target yang terelusi pada 20 mM

imidazole sangat sedikit dan tidak ada protein target pada 200 mM imidazole. Dan ketika hasil elusi dengan 20 mM imidazole dikonversi menjadi turunan dinitrofenil, analisis HPLC tidak menunjukkan adanya aktivitas dari protein tersebut.

Karena jumlah protein target yang terikat pada resin sangat kecil, maka ada kemungkinan bahwa protein target merupakan protein yang terikat pada membran. Protein yang terikat kuat pada bagian hidrofobik membran sel dapat didisosiasi dengan detergen. Detergen biologis biasa digunakan dalam laboratorium penelitian untuk menghancurkan lipid bipolar pada membran sel. Proses ini dapat membebaskan protein yang terikat pada membran sel dan melarutkannya.

Dalam percobaan ini digunakan Triton X-100 yang dapat melarutkan protein membran di dalam kondisi tidak terdenaturasi dan menjaga kelangsungan aktivitas biologis. 0.5% dan 2% Triton 100-X ditambahkan pada saat melarutkan sel basah sebelum sonifikasi namun kedua konsentrasi ini tidak meningkatkan kelarutan dari protein. Pada kenyataannya, Triton 100-X ini membuat CFE yang digunakan pada reaksi enzimatis menjadi tidak aktif. Sehingga, kesimpulannya Triton 100-X tidak meningkatkan kelarutan protein dan membuat protein menjadi tidak aktif.

Metode preparasi lain yang dilakukan sebelum kromatografi resin His-Bind yaitu fraksinasi amonium sulfat yang dilakukan pada rentang kejenuhan 0-30%, 30-40%, dan 40-60%. Fraksi-fraksi ini didialisis dan setelah itu dilarutkan kembali dalam buffer Tris pH 8. Analisis enzim

dilakukan sebelum dan sesudah dialisis. Berdasarkan analisis HPLC, 0-30% dan 30-40% sebelum dialisis menunjukkan aktivitas, namun terjadi penurunan setelah dialisis. Hal ini disebabkan karena larutan buffer yang digunakan pada dialisis tidak mengandung gliserol dan  $Mg^{2+}$ , sehingga ada kemungkinan terjadi presipitasi protein dan protein kehilangan aktivitasnya selama dialisis.

Walaupun tidak menunjukkan aktivitas, fraksi-fraksi ini digabungkan dan dicoba dimasukkan ke dalam resin His-Bind. Terdapat sebuah puncak pada eluat 100 mM imidazole, namun pada saat pengujian SDS PAGE, tidak terdapat pita protein pada ukuran yang diharapkan.

Tipe resin His-bind yang lain yaitu Ni-NTA His-bind juga dicoba untuk memurnikan protein tersebut, namun SDS PAGE menunjukkan hanya sejumlah kecil protein target saja yang terikat dan tidak aktif. Walaupun, CFE dan fraksi *flow-through* (fraksi di saat supernatan dimasukkan ke dalam resin tanpa penambahan larutan pengelusi) menunjukkan protein tersebut aktif.

#### **4.5 Pemurnian melalui Resin TALON**

CFE dalam buffer HEPES dimasukkan ke dalam resin TALON dan protein dielusi dengan imidazole. Selama proses elusi, beberapa puncak muncul pada 5 mM, 20 mM, dan 150 mM imidazole. Namun, analisis HPLC menunjukkan bahwa tidak ada aktivitas pada eluat 20 mM dan 150 mM. Eluat

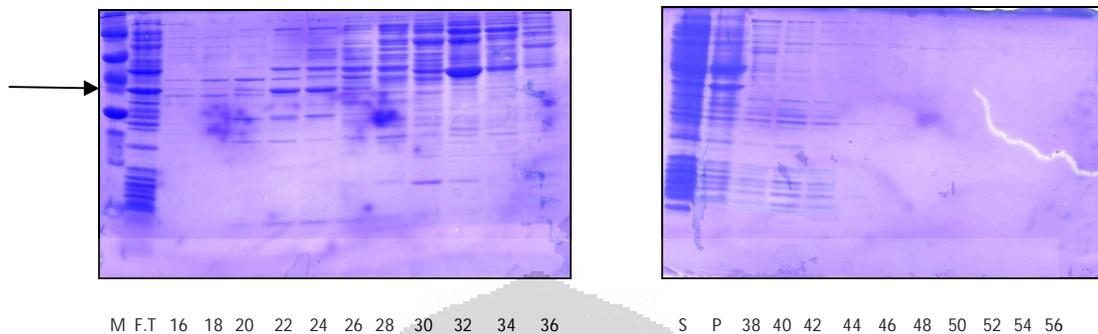
5 mM tidak digunakan untuk reaksi enzimatik karena pada konsentrasi tersebut yang terelusi merupakan protein non-target. Karena sistem IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) tidak memberikan hasil yang memuaskan maka diperkirakan bahwa His-tag dari protein target tidak terdapat di permukaan protein sehingga resin afinitas logam tidak dapat mengikat protein target yang diinginkan.

#### **4.6 Pemurnian melalui Kromatografi Penukar Ion**

Kromatografi penukar ion merupakan proses pemisahan berdasarkan interaksi reversibel antara protein bermuatan dan medium kromatografi yang memiliki muatan berlawanan. Ketika berada di atas titik isoelektriknya, protein akan terikat pada penukar anion, sedangkan ketika di bawah titik isoelektriknya, protein akan terikat pada penukar kation. Pada umumnya, penukar anion lebih sering digunakan karena kebanyakan protein memiliki muatan ion negatif pada kondisi alaminya.

##### **4.6.1 Penukar Anion**

Mula-mula DEAE Sepharose sebagai penukar anion lemah dicoba untuk pemurnian protein target. Protein dielusi dengan gradien linear NaCl dari 0 – 1 M. Setelah elusi, dilakukan SDS PAGE untuk fraksi genap dari fraksi 16 hingga 56 (Gambar 4.7).



**Gambar 4.7** SDS PAGE dengan jalur yang menunjukkan alikuot supernatan CFE Orf14/pET-28b(+) dan fraksi dari DEAE Sepharose. M : *Marker*, F.T : *Flow Through*, S : supernatant, P : pelet. Nomor : nomor fraksi. Panah hitam menandakan posisi protein target.

Hampir seluruh protein terelusi pada fraksi 16 hingga 36, oleh karena itu fraksi-fraksi ini digunakan untuk reaksi enzimatik. Namun, enzim ini kehilangan aktivitasnya selama proses pemurnian, karena hanya CFE yang ditemukan aktif sedangkan fraksi lain termasuk fraksi *flow through* tidak aktif.

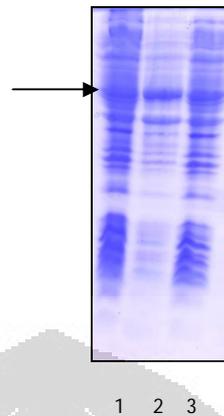
HiTrap DEAE Fast Flow (kolom prepacked 1 mL) juga dicoba dengan CFE yang telah difraksinasi dengan amonium sulfat. Kemudian, fraksi yang telah didialisis 0-30% dan 30-40% digabungkan dan dimasukkan ke dalam resin, namun kali ini protein tidak terikat sama sekali kepada resin.

#### 4.6.2 Penukar Kation

Berdasarkan sekuens asam amino Orf14 diketahui bahwa  $pI$  Orf 14 yaitu 9.1. Seperti telah dituliskan sebelumnya, ketika  $pH$  di sekitarnya lebih rendah dari  $pI$  maka protein akan bermuatan positif. Oleh karena itu dicoba kromatografi penukar kation untuk memurnikan Orf14.

Percobaan pertama yaitu menggunakan CM Sephadex C-25 (Karboksimetil) sebagai penukar kation lemah. Protein dielusi dengan gradien linear NaCl 0-1 M dalam buffer Tris. Namun, buffer Tris yang bermuatan negatif tidak sesuai untuk kromatografi penukar kation sehingga hampir seluruh protein keluar pada fraksi pertama. Walaupun buffer fosfat yang lebih sesuai telah dicoba, ternyata seluruh protein juga keluar pada fraksi pertama.

Oleh karena itu, penukar kation lain SP Sepharose Fast Flow sebagai penukar kation kuat dicoba. Elusi dilakukan dengan gradien bertahap NaCl dalam buffer HEPES  $pH$  7. Pada percobaan ini, protein juga tidak terikat pada resin. Dari SDS PAGE dapat terlihat bahwa CFE dan fraksi *flow through* sangat mirip (Gambar 4.8).



**Gambar 4.8** SDS PAGE dari CFE yang dimasukkan ke penukar kation SP FF. Kolom 1 : Supernatant, kolom 2 : Pelet, kolom 3: *Flow through*.

Dari hasil percobaan di atas, maka untuk sementara disimpulkan bahwa kromatografi penukar kation tidak dapat diaplikasikan untuk pemurnian protein target. Untuk selanjutnya, kondisi percobaan lain seperti pH yang lebih rendah diperlukan untuk membuat protein terikat pada resin, walaupun ada risiko pH yang rendah menyebabkan protein menjadi tidak aktif.

#### 4.7 Pemurnian melalui Kromatografi Interaksi Hidrofobik

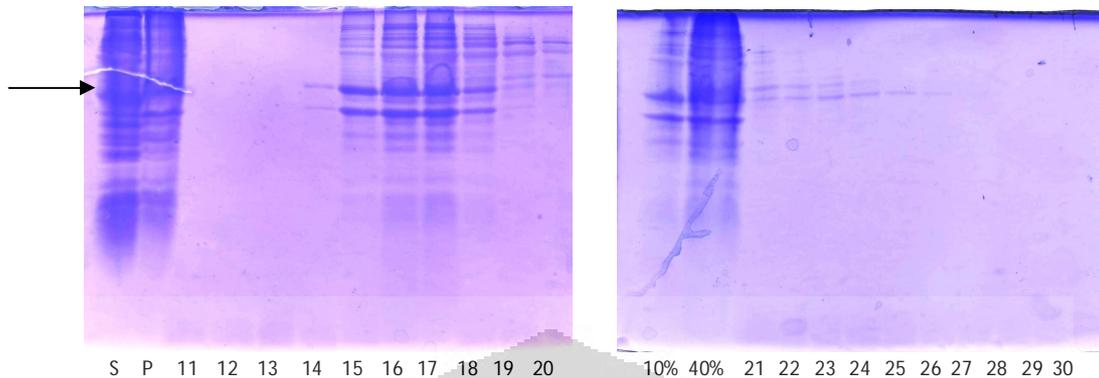
Selama percobaan memurnikan protein menggunakan fraksinasi amonium sulfat telah dicoba beberapa derajat kejenuhan. Mula-mula derajat kejenuhan setiap 10% dari 10% hingga 60% dicoba untuk menentukan di mana protein target mengendap. Lalu dilakukan beberapa penyempurnaan derajat kejenuhan seperti 0-30%, 30-40%, 40-60% lalu 0-20%, 20-40%. Pada akhirnya didapatkan derajat kejenuhan optimum yang dapat mengendapkan

protein target dan memaksimalkan penyingkiran protein non-target yaitu 10-40%. Derajat kejenuhan ini dapat mempertahankan aktivitas protein setelah fraksinasi amonium sulfat.

Pada kromatografi interaksi hidrofobik ini, mula-mula digunakan buffer Tris yang mengandung 0.4 M amonium sulfat sebagai buffer pengikat, namun aktivitas protein rendah. Sehingga, diasumsikan bahwa protein yang terikat tidak banyak, sehingga ditingkatkan lagi konsentrasi amonium sulfat pada buffer pengikat menjadi 0.8 M. Tapi dari percobaan ini, protein tidak terikat pada resin dan protein yang aktif keluar pada saat fraksi *flow through*. Dari hasil ini, protein target tidak terikat pada kromatografi ini dan mungkin dibutuhkan penyesuaian-penyesuaian kondisi pemurniannya.

#### **4.8 Pemurnian melalui Gel Filtrasi**

Medium gel filtrasi yang digunakan dalam percobaan ini yaitu G-75 Sephadex. Medium ini memiliki kapasitas fraksinasi untuk protein globular berukuran 3000-80000 Da. CFE yang telah difraksinasi dengan amonium sulfat 10-40% dimasukkan ke dalam medium gel filtrasi dan dielusi menjadi 50 fraksi masing-masing 2 mL. Setelah itu dilakukan SDS PAGE untuk fraksi 11 hingga 30. Dari SDS PAGE (Gambar 4.9) dapat terlihat bahwa hampir seluruh protein yang berukuran mirip terelusi bersamaan pada fraksi 15 hingga 19 dan beberapa protein lain hingga fraksi 26.



**Gambar 4.9** SDS PAGE dengan kolom yang mengandung alikuot dari supernatan CFE Orf14 pET-28b(+) dan fraksi dari filtrasi gel G-75 Sephadex. S : Supernatan, P: pelet, Nomor : nomor fraksi. Panah hitam menunjukkan protein target.

Berdasarkan analisis HPLC untuk fraksi 14 hingga 26, terdapat aktivitas pada fraksi 16 hingga 18. Fraksi 16, 17 dan 18 memiliki rasio konversi 15.4%, 18% dan 7.5%. Namun, protein yang kecil tidak berdifusi dengan baik terhadap matriks dan terelusi bersamaan dengan protein yang lebih besar. Oleh karena itu, protein ini tidak terpisahkan dengan baik.

#### 4.9 Isolasi Produk Reaksi Orf14 dengan Paromamin dan UDP-Glc

Dengan kondisi pertumbuhan bakteri dan kondisi optimum reaksi yang telah ditemukan hingga saat ini, maka isolasi produk reaksi pun dilakukan.

Protein dimurnikan sebagian melalui fraksinasi amonium sulfat dengan derajat kejenuhan 10-40%. Lalu digunakan untuk reaksi enzim skala besar (10 mL) dengan paromamin (3.1 mmol, 10 mg) dan UDP-Glc (4.65

mmol, 136 mg yang dibagi menjadi beberapa kali penambahan). Rasio konversi substrat menjadi produk didapatkan dengan mengubah alikot larutan reaksi menjadi turunan dinitrofenil dan dianalisis dengan HPLC (Tabel 4.7).

Dari tabel ini dapat kita amati bahwa laju reaksi cukup lambat pada hari-hari pertama dari 1.1 hingga 1.4 sehingga hanya 37.7% produk yang terbentuk. Penambahan enzim segar yang dihasilkan dari 1 g sel segar (2.1-2.4) meningkatkan rasio konversi menjadi 82.5% pembentukan produk. Untuk memaksimalkan pembentukan produk, maka penambahan enzim segar yang ketiga pun dilakukan dan rasio konversi meningkat menjadi 83.61% pada hari 3.2. Setelah itu reaksi dihentikan dan dilakukan isolasi produk.

**Tabel 4.7** Rasio konversi pembentukan produk dari reaksi antara Orf14/pET28b(+), UDP-Glc dan Paromamin

Hari	Rasio Konversi (%)
1.1	11.49
1.2	23.44
1.3	30.14
<b>1.4</b>	<b>37.68</b>
2.1	54.74
2.2	61.60
2.3	67.98
<b>2.4</b>	<b>82.47</b>
3.1	81.15
<b>3.2</b>	<b>83.61</b>

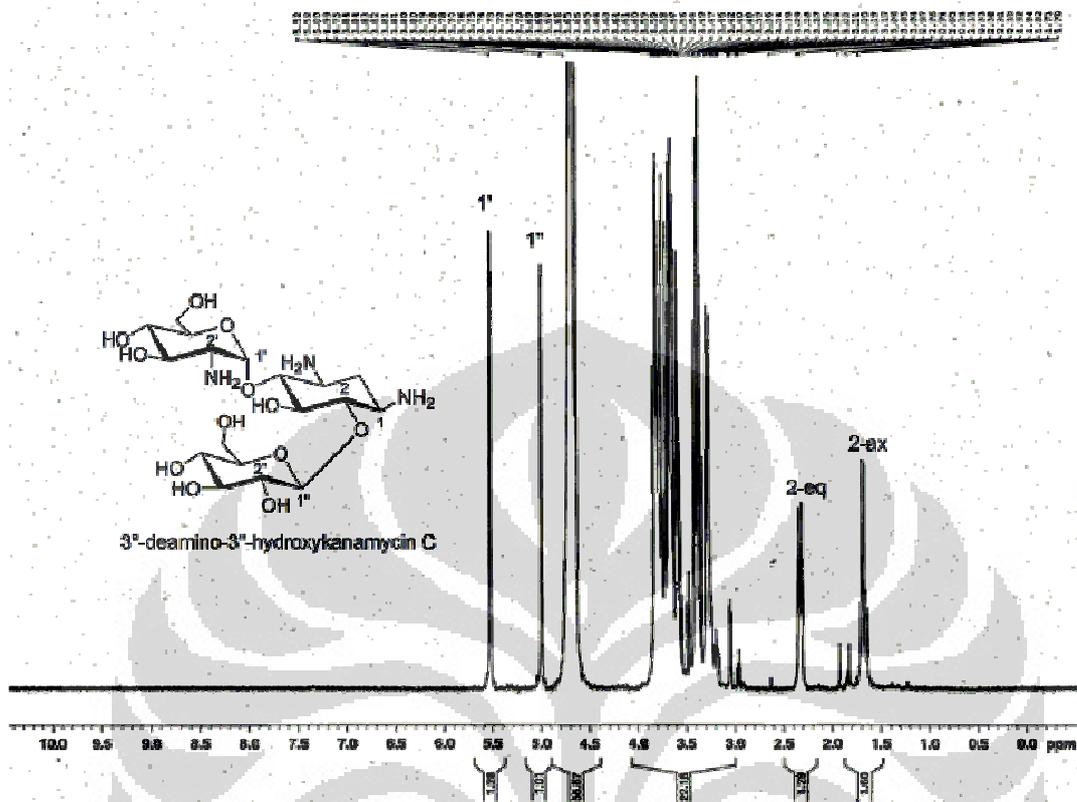
Catatan : 1.1 adalah penambahan enzim pertama pada hari pertama.

Setelah pengasaman larutan reaksi, larutan dimasukkan ke dalam resin penukar kation Amberlite CG50 bentuk  $\text{NH}_4^+$  dan dilanjutkan dengan memasukkannya ke dalam resin penukar anion DOWEX AG1X8 bentuk

$\text{SO}_4^{2-}$ . Proses memasukkan larutan ke dalam kedua resin tersebut sehingga didapatkan sampel yang lebih bersih untuk analisis NMR.

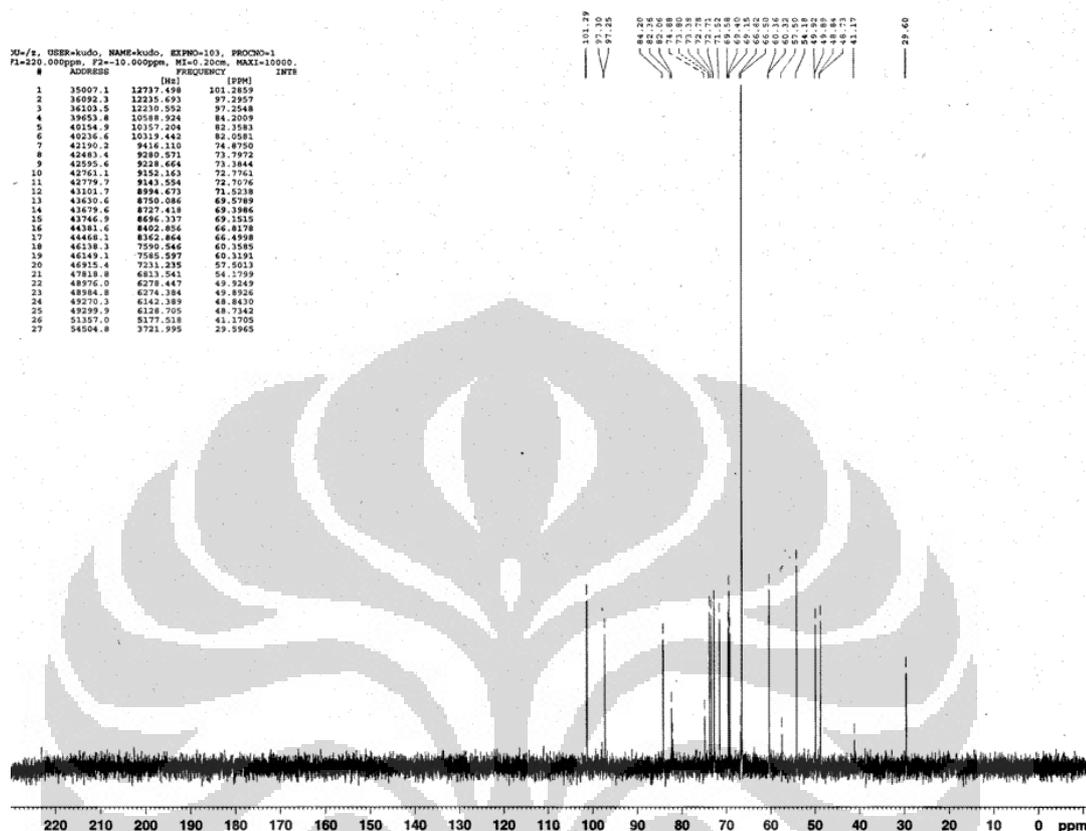
Pengujian sampel melalui FABMS resolusi rendah dengan gliserol sebagai matriksnya menunjukkan  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  486 (Lampiran 4). Dengan FABMS resolusi tinggi didapatkan rumus molekular produk ini sebagai  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_{12}$  :486.2307 terhitung 486.2299.

Sedangkan dari analisis  $^1\text{H}$  NMR,  $\text{D}_2\text{O}$  mengindikasikan adanya proton anomerik H-1' sebagai gugus glukosamin pada 5.52 ppm (dibandingkan dengan paromamin H-1' pada 5.54 ppm) dan gugus glukosa H-1'' pada 4.99 ppm. Dari H NMR ini ditemukan juga dua proton deoksi yang ciri khas DOS yaitu H-2ax pada 1.66 ppm dan H-2eq pada 2.31 ppm. Puncak-puncak lain teramati pada 3.2-3.8 ppm (Gambar 4.10).



**Gambar 4.10** Spektrum <sup>1</sup>H NMR untuk produk reaksi ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) dengan paromamin dan UDP-Glc (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

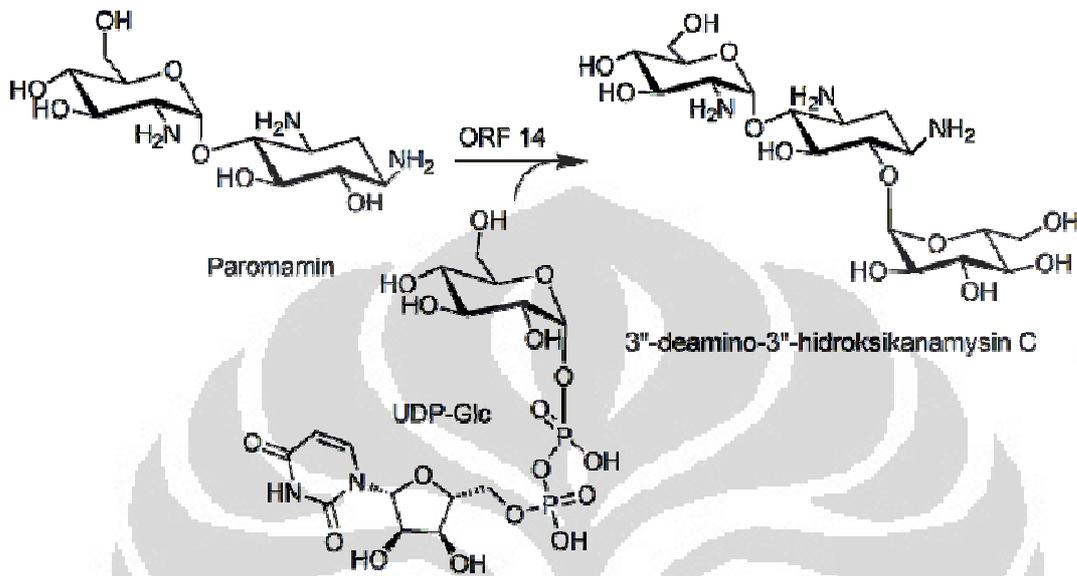
Dari spektrum <sup>13</sup>C NMR dapat diamati adanya 18 puncak karbon yang meliputi dua karbon anomerik ( $\delta$  97.3 ppm, 101.3 ppm), satu karbon deoksi C-2 ( $\delta$  29.6 ppm), tiga karbon yang terikat pada nitrogen pada C1, C3, C-2' ( $\delta$  49.9, 48.8, 54.18 ppm), C4 ( $\delta$  84.2 ppm), C6 ( $\delta$  82.36 ppm) dan dua karbon hidrosimetil pada C-6' atau C-6'' ( $\delta$  60.32 ppm, 60.36 ppm). Puncak-puncak lain teramati pada 69-75 ppm (Gambar 4.11).



**Gambar 4.11** Spektra  $^{13}\text{C}$  NMR produk reaksi Orf14 dengan paromamin dan UDP-Glc (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

Dari spektrum NMR, dapat diamati bahwa ada puncak-puncak dari paromamin yang tumpang tindih dengan puncak dari senyawa baru, hal ini disebabkan oleh paromamin yang masih tersisa. Sehingga struktur molekul produk ini belum dapat ditentukan. Untuk menentukan struktur produk tersebut secara lengkap dibutuhkan protein yang lebih murni lagi atau dapat dilakukan analisis 2D-NMR. Namun, dari penelitian ini dapat terlihat bahwa Orf14 dapat mengkatalisis secara spesifik reaksi glikosilasi akseptor gula

paromamin menggunakan donor glikosil UDP-Glc untuk membentuk pseudotrisakarida, yang diduga deaminokanamysin (Gambar 4.12).



**Gambar 4.12** Pembentukan deaminokanamysin melalui glikosilasi paromamin menggunakan UDP-Glc dengan Orf14

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Analisis fungsional glikosiltransferase yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan protein Orf14. Protein rekombinan Orf14 yang terlarut didapatkan melalui ekspresi protein dalam vektor pET-28b(+) dalam *E. coli* BL21(DE3) yang ditumbuhkan pada suhu rendah 15°C setelah induksi dengan IPTG. Kondisi reaksi optimum didapatkan melalui 50 mM buffer HEPES atau buffer Tris pH 8, Mg<sup>2+</sup> dan 10% gliserol.

Orf14 dimurnikan sebagian melalui pengendapan protein amonium sulfat 10-40% derajat kejenuhan lalu digunakan untuk reaksi enzim skala besar. Produk reaksi dianalisis dengan NMR dan FABMS. NMR menunjukkan adanya puncak khas yang berasal dari H-1' dan H-1" yang menandakan terjadinya pembentukan pseudotrisakarida dan FABMS memastikan berat molekular produk yang diharapkan.

Orf14 dikarakterisasi sebagai UDP-Glukosa : paromamin glikosiltransferase dalam biosintesis kanamysin. Orf14 secara spesifik mengkatalisis proses glikosilasi akseptor gula paromamin menggunakan donor glikosil UDP-Glc untuk membentuk pseudotrisakarida yang diduga deaminokanamysin. Dalam biosintesis kanamysin, pembentukan

deaminokanamysin merupakan prekursor dari pembentukan kanamysin C dan lebih jauh lagi pembentukan kanamysin B.

## 5.2 Saran

Untuk menentukan struktur molekul yang sesungguhnya dari produk reaksi Orf14 ini diperlukan pemurnian protein lebih lanjut. Ada beberapa metode kromatografi yang masih harus diuji kembali untuk memurnikan Orf14 ini. Selain itu, analisis NMR 2D juga dapat digunakan untuk membantu menentukan struktur produk tersebut.

Dalam penelitian selanjutnya, pemurnian Orf14 dibutuhkan untuk mempelajari sifat biokimia seperti spesifisitas substrat. Studi-studi ini berguna untuk menghasilkan informasi penting bagi rekayasa glikosiltransferase sehingga dapat dilakukan pembentukan antibiotik aminoglikosida struktural melalui enzim-enzim.

## DAFTAR PUSTAKA

- Flatt Patricia M, Mahmud T. Biosynthesis of aminocylitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds. *Nat Prod Rep.* **2007**, 24, 358-392.
- Gabere-Porekar, V. and Menart, V. Perspective of immobilized-metal affinity chromatography. *J.Biochem. Biophys. Methods.* **2001**. 49 : 335-360
- Huang, F., Haydock SF, Mironenko T, Spiteller D, Li Y, Spencer JB. The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233 : characterization of an aminotransferase involved in the formation of 2-deoxystreptamine. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1410-1418.
- Kieser, T., M.J.Bibb, M.J.Buttner, K.F.Chater & D.A.Hopwood. Practical *Streptomyces* genetics. England : John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney Norwich NR4 7UH, 2000.
- Koolman, J. and K.H.Roehm. Color Atlas of Biochemistry. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2005.
- Kondo, S. & K.Hotta. Semisynthetic aminoglycoside antibiotics : Development and enzymatic modifications. *J.Infect.Chemother.* **1999**, 5, 1-9.
- Kudo, F., T.Fujii, S.Kinoshita, T.Eguchi. Biosynthesis of 2-deoxystreptamine by Three Crucial Enzymes in *Streptomyces fradiae* NBRC 12773. *J. Antibiot.* **2005**, 58, 766-774.

- Llewellyn, Nicholas M., Spencer, Jonathan B. Biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics. *Nat. Prod.Rep.* **2006**, 23, 864-874.
- Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev.* **2005**, 105, 477-498.
- Nelson, David L., Cox, Michael M. *Lehninger Principles of Biochemistry 4<sup>th</sup> Ed.* New York : W.H.Freeman, 2005.
- Omoto, Charlotte K. Dan Paul F.Lurquin. Genes and DNA : a beginner's guide to genetics and its applications. New York : University Columbia Press, 2004.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual 2<sup>nd</sup> Ed.* New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- Schatz A, Bugie E, Waksman SA. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram positive and gram negative bacteria. *Proc .Soc. Exp. Med.Biol.* **1944**, 55, 66-69.
- Umezawa, H., M.Ueda, K.Maeda, K.Yagishita, S.Kondo, Y.Okami, R.Utahara, Y.Osato, K.Nitta & T.Takeuchi. Production and isolation of a new antibiotic, kanamycin. *J Antibiot.* **1957**, 10, 181-188.
- Yanai K, Murakami T. The Kanamycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces kanamyceticus*. *J Antibiot.* **2004**, 57, 351-354.
- Yokoyama, Y., Y.Yamamoto, F.Kudo & T.Eguchi. Involvement of Two Distinct N-Acetylglucosaminyltransferase and a Dual-Function

Deacetylase in Neomycin Biosynthesis. *ChemBioChem*. **2008**, 9, 865-869.

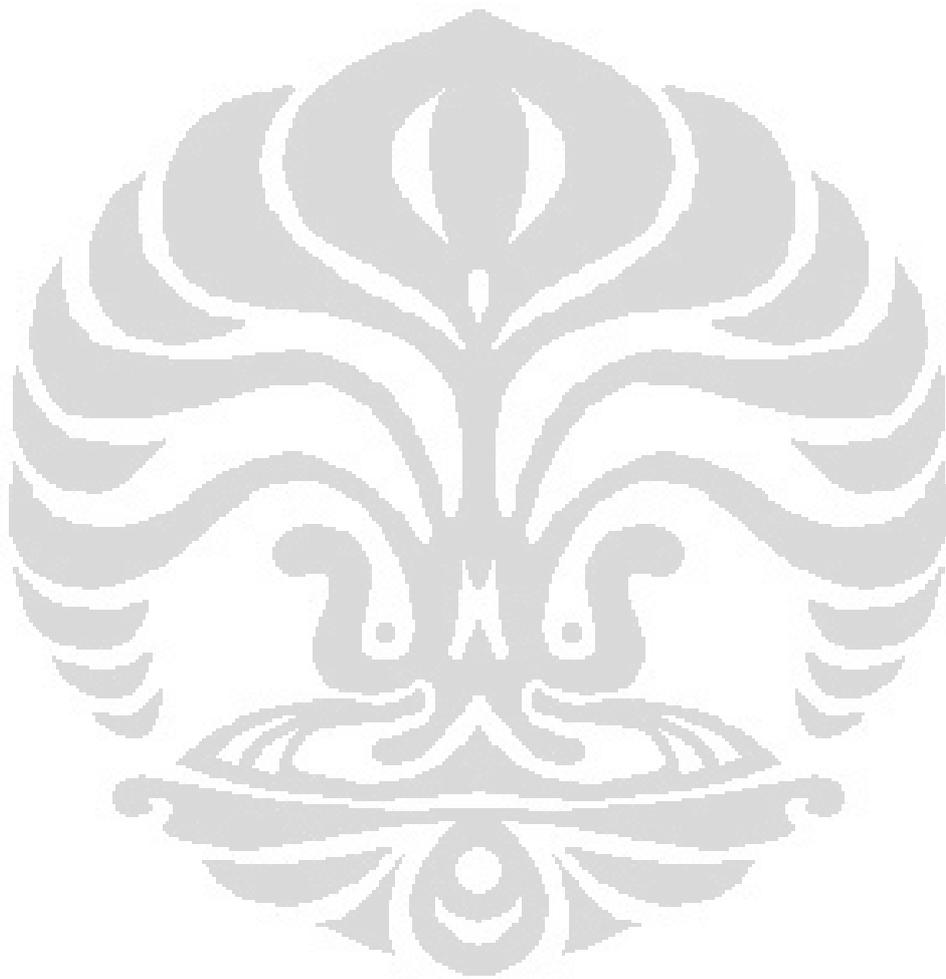
Zembower TR, Noskin GA, Postelnick MJ, Nguyen C, Peterson LR. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. *Int J Antimicrob Agents*. **1998**, 10, 95-105.

[http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/18\\_MekanismeKerjaAntibiotik.pdf](http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/18_MekanismeKerjaAntibiotik.pdf)

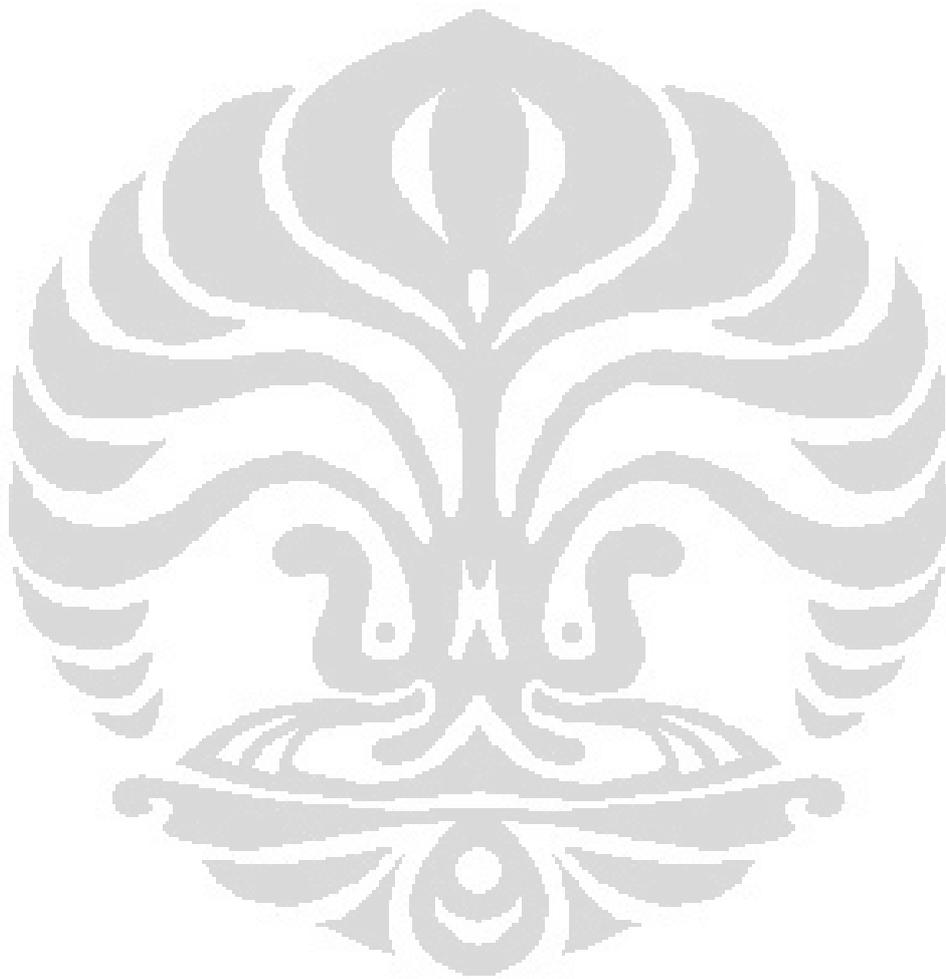
27 Agustus 2007, 11:12 WIB

<http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiotik>, 27 Agustus 2007, 11:10 WIB

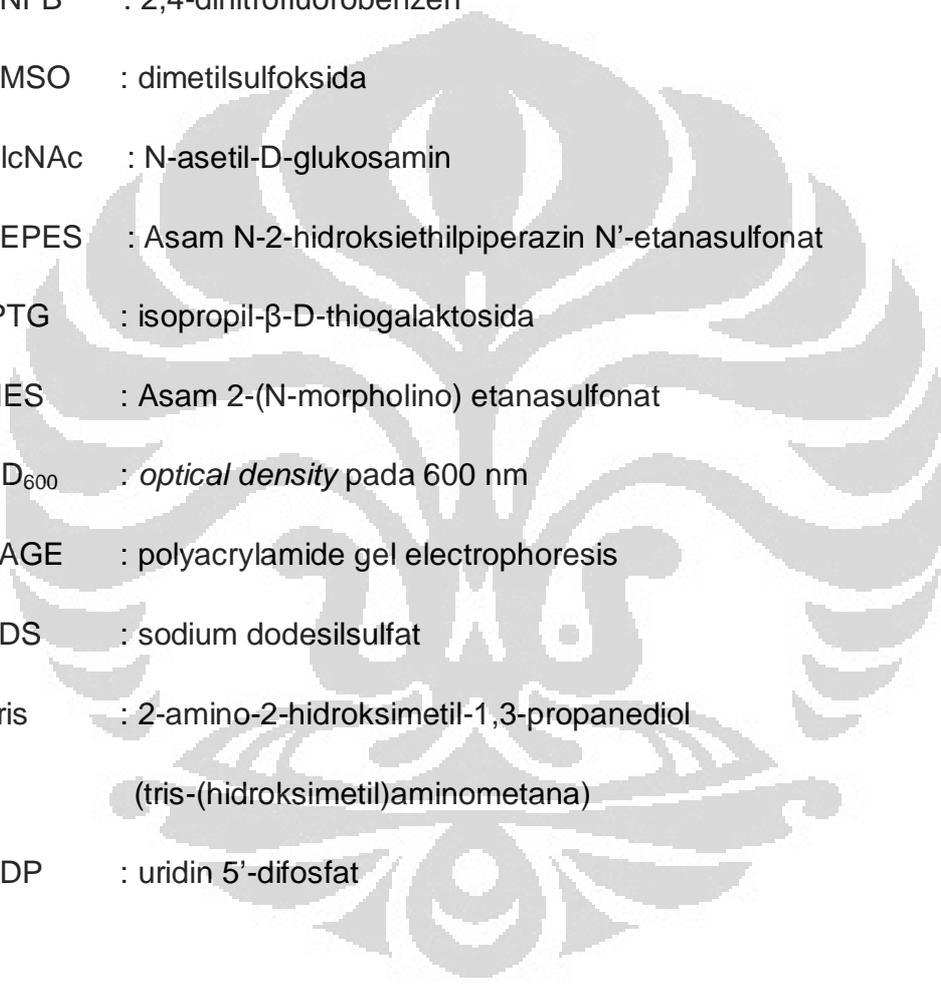






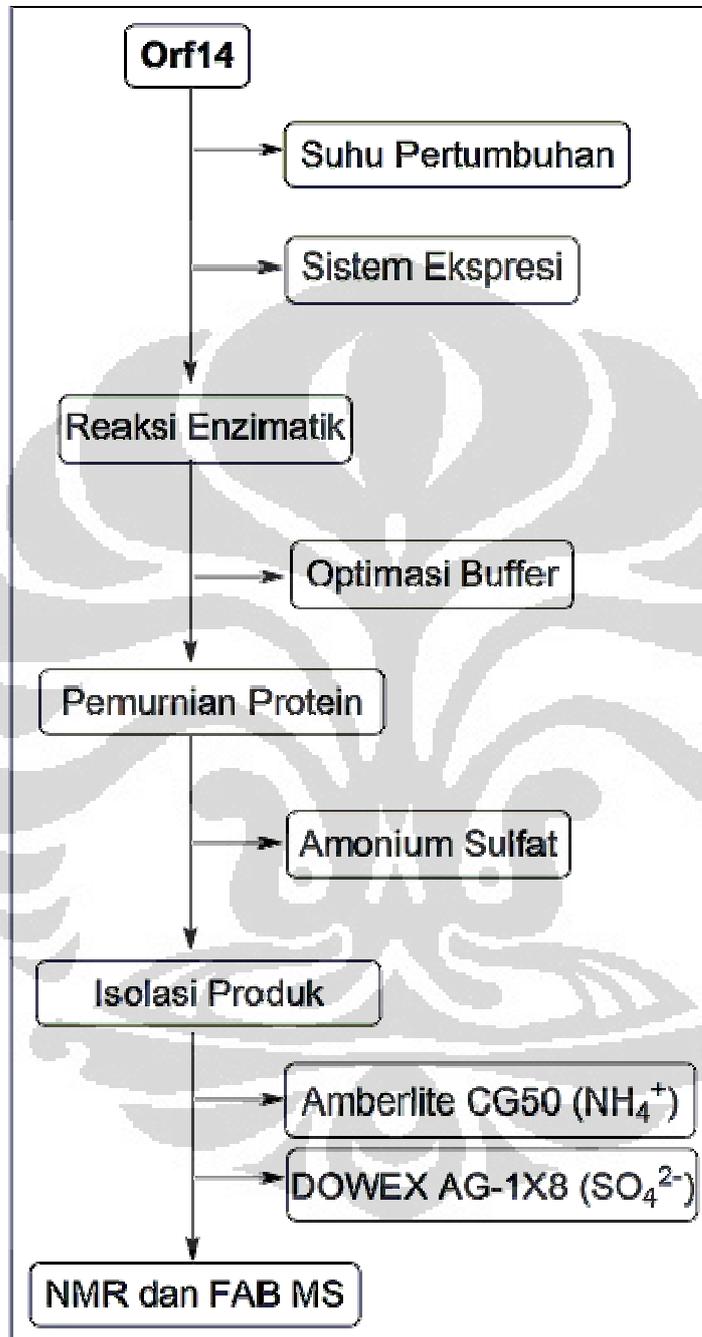


## Lampiran 1 : Daftar Singkatan



DEAE	: dietilaminoetil
DOS	: 2-deoksistreptamin
DNFB	: 2,4-dinitrofluorobenzen
DMSO	: dimetilsulfoksida
GlcNAc	: N-asetil-D-glukosamin
HEPES	: Asam N-2-hidroksiethylpiperazin N'-etanasulfonat
IPTG	: isopropil- $\beta$ -D-thiogalaktosida
MES	: Asam 2-(N-morpholino) etanasulfonat
OD <sub>600</sub>	: <i>optical density</i> pada 600 nm
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
SDS	: sodium dodesilsulfat
Tris	: 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propanediol (tris-(hidroksimetil)aminometana)
UDP	: uridin 5'-difosfat

Lampiran 2 : Skema Prosedur Kerja



Lampiran 3 : Tabel Amonium Sulfat untuk Pengendapan Protein

%	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767
10		28	57	86	118	137	190	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694
15			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657
20				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619
25					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583
30						19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	365	401	449	496	546
33							12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522
35								31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506
40									31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469
45										32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431
50											33	66	101	137	176	214	256	302	345	392
55												33	67	103	141	179	220	264	307	353
60													34	69	105	143	183	227	269	314
65														34	70	107	147	190	232	275
70															35	72	110	153	194	237
75																36	74	115	155	198
80																	38	77	117	157
85																		39	77	118
90																			38	77
95																				39

Tabel ini menandakan banyaknya amonium sulfat padat dalam gram yang harus ditambahkan kepada 1 L larutan untuk menghasilkan kejenuhan amonium sulfat yang diinginkan. Cara menggunakan tabel ini yaitu mula-mula dipilih konsentrasi mula-mula amonium sulfat dalam persen dari kolom sebelah kiri, kemudian dipilih konsentrasi akhir amonium sulfat yang diinginkan dalam persen pada kolom sebelah atas. Pertemuan kolom dan baris menandakan banyaknya amonium sulfat dalam gram yang harus ditambahkan ke dalam 1 L larutan awal

## Lampiran 4 : Low Resolution FAB MS

