

1. ENZYMES

2. ELECTROPHORESIS



LAPORAN PENELITIAN
DIK RUTIN UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2000

KCC

KK

541.372

Bak

P.

SELESAI

PENGEMBANGAN METODE PINTAS PEMURNIAN ENZIM DENGAN ELEKTROFORESIS GEL

Peneliti :

Dra. AFAF BAKTIR, MS.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

3000146023141

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : DIK Rutin Universitas Airlangga 2000

Nomor SK. Rektor 4935/JO3/PG/2000

Nomor Urut : 19

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Januari, 2001



LEMBAGA PENELITIAN

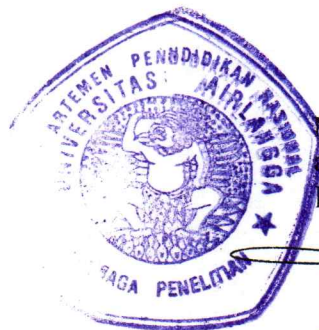
- | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Puslit Pembangunan Regional. | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | Pembangunan (5995719) |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 7. Puslit Olahraga | 10. Puslit/Kesehatan Reproduksi |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995346
E-mail: lpunair @ rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

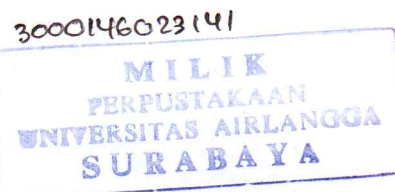
1. a. Judul Penelitian : Pengembangan Metode Pintas Pemurnian Enzim Dengan Elektroforesis Gel
- b. Macam Penelitian : Fundamental, Terapan, Pengembangan
- c. Katagori Penelitian : I II III
2. Kepala Proyek Penelitian
- a. Nama Lengkap dan Gelar : Dra. Afaf Baktir. MS
- b. Jenis Kelamin : Laki - Laki
- c. Pangkat/Golongan dan NIP : Penata Tk. I / III-b / 131 280 710
- d. Jabatan Sekarang : Staf Pengajar
- e. Fakultas/Puslit/Jurusan : Ilmu Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
- f. Univ./Inst. /Akademi : Universitas Airlangga
- g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Kimia Organik
3. Jumlah Tim Peneliti : 1 (Satu) orang
4. Lokasi Penelitian : FMIPA Unair
5. Kerjasama dengan Instansi Lain
- a. Nama Instansi : -
- b. A l a m a t : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 (enam) bulan
7. Biaya Yang Diperlukan : Rp 3.000.000.00
8. Seminar Hasil Penelitian
- a. Dilaksanakan Tanggal : 23 Maret 2001
- b. Hasil Penelitian : Baik Sekali Baik
 Sedang Kurang

Surabaya, 23 Maret 2001



Mengetahui/Mengesahkan :
n. Rektor
Ketua Lembaga Penelitian,

Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S. f



RINGKASAN

PENGEMBANGAN METODE PINTAS PEMURNIAN ENZIM DENGAN PAGE

(Afaf Baktir, 2001, 36 halaman)

Selama ini pemurnian protein melibatkan langkah-langkah berurutan yang panjang, meliputi fraksinasi garam, fraksinasi pelarut organik (etanol atau aseton), dialisis, kromatografi penukar ion, kromatografi filtrasi, dan prosedur atau teknik lain yang sering dipakai. Semua rangkaian dilakukan secara berurutan untuk memperoleh preparat protein murni. Hal ini dapat berakibat penurunan aktivitas apabila yang dimurnikan adalah protein aktif semisal enzim, juga berakibat hilangnya sebagian protein di setiap tahap sehingga diperoleh hasil akhir yang sedikit, di samping terkait pula dengan biaya yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode pintas pemurnian protein enzim dengan elektroforesis gel poliakrilamid serta untuk memperoleh enzim dekstranase murni dari *Streptococcus sp.* B7.

Keberhasilan metode yang akan dikembangkan ini sangat ditentukan oleh tingginya resolusi pita-pita protein hasil elektroforesis. Oleh karena itu perlu dilakukan upaya untuk memperoleh pemisahan pita protein secara sempurna dengan metode PAGE.

Migrasi protein pada gel selama elektroforesis berlangsung ditentukan oleh berat molekul dan densitas muatan protein. Maka dengan melakukan variasi kadar akrilamid dan pH bufer elektroforesis diharapkan dapat memperoleh kondisi yang optimal untuk pemisahan pita protein target dari pita-pita protein yang lain.

Sebagai model protein dalam penelitian ini digunakan enzim dekstranase. Enzim dekstranase diperlukan di industri gula untuk mengatasi problema akibat dekstran, yaitu penurunan kadar sukrosa, penghambatan kristalisasi gula dan penyebab *false highly positive* dalam analisis sukrosa. Dekstranase juga digunakan sebagai komponen pasta gigi untuk pencegahan *plaque* gigi, serta untuk produksi isomaltosa dari dekstran.

Telah dilakukan fraksinasi ekstrak kasar enzim dekstranase dengan PAGE, dan ditentukan aktivitas setiap fraksi untuk menentukan fraksi yang mempunyai aktivitas dekstranase. Kemudian fraksi aktif dipisahkan pita-pitanya dan ditentukan pita yang mempunyai aktivitas dekstranase. Setelah ditentukan pH dan kadar akrilamid optimum

untuk pemisahan pita dekstranase, dilakukan elektroforesis berulang kali pada kondisi optimum ini untuk mengumpulkan potongan pita dengan aktivitas dekstranase, kemudian enzim dekstranase dilepas dari gel dengan cara elektroelusi, dan dilakukan presipitasi dengan aseton pada suhu -20°C . Serbuk enzim dekstranase yang diperoleh diuji kemurnian dan aktivitasnya.

Pita-pita protein hasil elektroforesis dikelompokkan menjadi empat fraksi, aktivitas dekstranase terdapat pada fraksi-2, yaitu pada pita yang pertama. Pemisahan pita dekstranase dilakukan dengan PAGE pada kondisi optimum yaitu kadar akrilamid 10 % dan pH 8,8. Uji kemurnian preparat dekstranase yang diperoleh menggunakan PAGE menunjukkan sebuah pita, dan uji aktivitas dengan agar-blue dextran menunjukkan adanya aktivitas dekstranase.

Berdasarkan hasil penelitian, disimpulkan bahwa enzim dekstranase dapat dimurnikan dari ekstrak kasarnya menggunakan satu tahap proses pemurnian yaitu dengan metode PAGE, dan pemisahan optimum protein dekstranase dengan PAGE terjadi pada pH 8,8 dan kadar akrilamid 10 %.

Disarankan untuk mengaplikasikan metode pemurnian dengan PAGE ini untuk enzim atau protein yang lain. Apabila tidak dapat diperoleh kondisi optimum (pH dan kadar akrilamid) yang dapat memisahkan pita protein target dari pita protein yang lain, maka disarankan menggunakan metode PAGE dua dimensi. Untuk memperoleh protein murni dalam skala yang lebih besar dapat dilakukan dengan metode PAGE model tabung.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, seluruh pujian dan syukur hanya tertuju kepada Allah SWT, yang telah memberikan rahmatNya sehingga penelitian yang berjudul "PENGEMBANGAN METODE PINTAS PEMURNIAN ENZIM DENGAN PAGE" dapat diselesaikan.

Kami menyampaikan terima kasih kepada Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan dan fasilitas penelitian. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

Semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat.

Surabaya, Maret 2001

Penulis

DAFTAR ISI

| | <u>Halaman</u> |
|---|----------------|
| LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN | ii |
| RINGKASAN | iii |
| KATA PENGANTAR | iv |
| DAFTAR ISI | v |
| DAFTAR GAMBAR | vi |
| DAFTAR TABEL | vii |
| BAB I. PENDAHULUAN | |
| 1.1. Latar Belakang Permasalahan | 1 |
| 1.2. Masalah Penelitian | 2 |
| BAB II. TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1. Prinsip Elektroforesis | 3 |
| 2.2. Ragam Teknik Elektroforesis | 5 |
| 2.3. Prinsip Analisis Protein dengan Elektroforesis Gel | 11 |
| 2.4. Elektroforesis Gel Poliakrilamid | 12 |
| BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN | |
| 3.1. Tujuan Penelitian | 16 |
| 3.2. Manfaat Penelitian | 16 |
| BAB IV. METODE PENELITIAN | |
| 4.1. Sampel Penelitian | 17 |
| 4.2. Bahan Penelitian | 17 |
| 4.3. Alat | 17 |
| 4.4. Prosedur Kerja | 17 |
| 4.4.1. Persiapan pereaksi | 17 |
| 4.4.2. Preparasi sampel | 19 |
| 4.4.3. Pembuatan gel | 19 |
| 4.4.4. Fraksinasi ekstrak kasar enzim dekstranase | 20 |
| 4.4.5. Penentuan lokasi pita enzim dekstranase dalam fraksi aktif | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4.6. Optimasi pH dan kadar akrilamid gel untuk pemisahan pita dekstranase | 24 |
| 4.4.7. Pengumpulan gel yang mengandung pita enzim dekstranase | 24 |
| 4.4.8. Pelepasan enzim Dekstranase dari gel | 24 |
| 4.4.9. Presipitasi | 25 |
| 4.4.10. Uji aktivitas dekstranase | 25 |
| 4.4.11. Uji kemurnian | 26 |
| | |
| BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN | |
| 5.1. Fraksinasi Ekstrak Kasar Enzim Dekstranase | 27 |
| 5.2. Lokasi Pita Dekstranase pada Fraksi Aktif | 28 |
| 5.3. Kadar Akrilamid dan pH Optimum untuk Pemisahan Pita Dekstranase | 29 |
| 5.4. Metode Pintas Memperoleh Dekstranase Murni dengan PAGE | 32 |
| 5.5. Hasil Uji Aktivitas dan Kemurnian | 33 |
| | |
| BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN | |
| 6.1. Kesimpulan | 35 |
| 6.2. Saran | 35 |
| | |
| DAFTAR PUSTAKA | 36 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| Gambar 1. Sistem elektroforesis tanpa medium penyangga | 7 |
| 2. Sistem elektroforesis dengan medium penyangga | 9 |
| 3. Elektroforesis gel diskontinyu | 11 |
| 4. Pemisahan fragmen DNA dengan <i>capillary gel electrophoresis</i> | 11 |
| 5. Persiapan gel dan pembagian sumur pada gel penyusun | 21 |
| 6. Pemotongan gel sebelum diberi pewarna | 22 |
| 7. Gambar skematis fraksinasi pita-pita protein | 23 |
| 8. Diagram rangkaian peralatan elektroelusi | 24 |
| 9. Pola pita protein ekstrak kasar enzim dekstranase | 27 |
| 10. Hasil uji aktivitas dekstranase setiap fraksi | 28 |
| 11. Hasil uji aktivitas dekstranase pita-pita protein dalam fraksi aktif | 29 |
| 12. Hasil elektroforesis ekstrak kasar dekstranase pada beberapa kadar akrilamid | 29 |
| 13. Hasil elektroforesis ekstrak kasar dekstranase pada beberapa pH | 31 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 1. Perhitungan larutan stok untuk gel berkadar akrilamid X % | 19 |
| 2. Harga R_f dan ΔR_f pada variasi kadar akrilamid | 30 |
| 3. Harga R_f dan ΔR_f pada variasi pH | 31 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Selama ini prosedur pemurnian protein melibatkan tahapan atau langkah kerja yang cukup panjang. Sebagai contoh, Wanda and Curtiss (1994) memurnikan dekstranase dari sel *E. coli* rekombinan menggunakan rangkaian tahapan berikut: preparasi protein fraksi periplasmik dengan kejutan osmotik, kemudian kromatografi kolom menggunakan hemoglobin-Sepharose 4B, kemudian kromatografi penukar ion FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), kemudian kromatografi gel filtrasi FPLC, dan terakhir dilakukan dialisis dan liofilisasi. Tahapan prosedur pemurnian protein yang lebih panjang dikerjakan oleh Lee et al. (1996), untuk karakterisasi metiltransferase.

Di setiap tahap pada prosedur pemurnian protein, tidak dapat dihindari hilangnya sebagian protein yang dikehendaki, sehingga di akhir proses preparat protein murni yang diperoleh amat sedikit. Di samping itu, untuk protein aktif semacam enzim, dapat terjadi penurunan aktivitas akibat berbagai kondisi proses pemurnian yang dilalui.

Elektroforesis gel poliakrilamid (PAGE = *polyacrylamide gel electrophoresis*) dapat memisahkan protein-protein berdasarkan perbedaan densitas muatan dan massanya. Setiap protein memiliki rasio muatan terhadap massa yang berbeda antara satu dengan yang lain, sehingga memungkinkan dipisahkan untuk mendapatkan protein murni asalkan pita protein target dapat diidentifikasi dari pita-pita yang lain. Namun selama ini metode elektroforesis *slab gel* belum pernah diaplikasikan untuk memurnikan protein, melainkan hanya dipakai untuk identifikasi kemurnian suatu preparat protein dan karakterisasinya.



Pada penelitian ini akan dicoba mengaplikasikan elektroforesis gel poliakrilamid untuk memperoleh protein enzim murni dari ekstrak kasarnya.

Metode pemurnian protein yang dikembangkan pada penelitian ini menghapus langkah-langkah berurutan panjang yang biasa dilakukan untuk pemurnian protein, meliputi fraksinasi garam, fraksinasi pelarut organik (etanol atau aseton), dialisis, kromatografi penukar ion, kromatografi filtrasi, dan prosedur atau teknik lain yang sering dipakai.

Keberhasilan metode yang dikembangkan ini sangat ditentukan oleh tingginya resolusi pita-pita protein hasil elektroforesis. Oleh karena itu perlu dilakukan upaya untuk memperoleh pemisahan pita protein secara sempurna dengan metode PAGE.

Migrasi protein pada gel selama elektroforesis berlangsung ditentukan oleh berat molekul dan densitas muatan protein. Maka dengan melakukan variasi kadar akrilamid dan pH bufer elektroforesis diharapkan dapat memperoleh kondisi yang optimal untuk pemisahan pita protein target dari pita-pita protein yang lain.

Sebagai model protein dalam penelitian ini digunakan enzim dekstranase. Enzim dekstranase diperlukan di industri gula untuk mengatasi problema akibat dekstran, yaitu penurunan kadar sukrosa, penghambatan kristalisasi gula dan penyebab *false highly positive* dalam analisis sukrosa. Dekstranase juga digunakan sebagai komponen pasta gigi untuk pencegahan *plaque* gigi, serta untuk produksi isomaltosa dari dekstran.

1.2. Masalah Penelitian

Dari latar belakang yang telah diuraikan dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut.

1. Dapatkah metode elektroforesis gel poliakrilamid diterapkan untuk pemurnian enzim (model: dekstranase) dari ekstrak kasarnya?
2. Pada kadar akrilamid dan pH berapakah diperoleh pemisahan optimum pita-pita protein dalam ekstrak kasar dekstranase dengan menggunakan PAGE?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Prinsip Elektroforesis

Metode elektroforesis berdasarkan atas fakta bahwa molekul-molekul DNA, RNA atau protein memiliki muatan, sehingga akan bergerak bila diletakkan dalam medan listrik. Pada awal ditemukan, elektroforesis menggunakan medium larutan sukrosa, selanjutnya berkembang menggunakan medium kertas, gel pati, gel agarosa dan gel akrilamid (Hames, 1990).

Prinsip metode elektroforesis sebagai berikut. Apabila muatan bersih sebesar q ditempatkan dalam medan listrik, maka molekul ini akan dikenai gaya (F) yang besarnya tergantung pada besar muatan yang dimiliki dan kekuatan medan listrik di sekelilingnya. Hubungan tersebut diekspresikan secara matematis sebagai berikut (Cooper, 1991).

$$F = \frac{E}{d} q$$

E = perbedaan potensial antar elektroda
 d = jarak antar elektroda
 q = jumlah muatan dalam molekul

$$6\pi r\eta v = \frac{E}{d} q$$

r = radius molekul bulat
 η = viskositas larutan

$$v = \frac{E q}{d \delta \pi \eta} \quad v = \text{kecepatan migrasi}$$

Persamaan terakhir menunjukkan bahwa kecepatan pergerakan molekul proporsional dengan kekuatan medan listrik dan muatan molekul, serta berbanding terbalik dengan ukuran molekul dan viskositas larutan (Cooper, 1991).

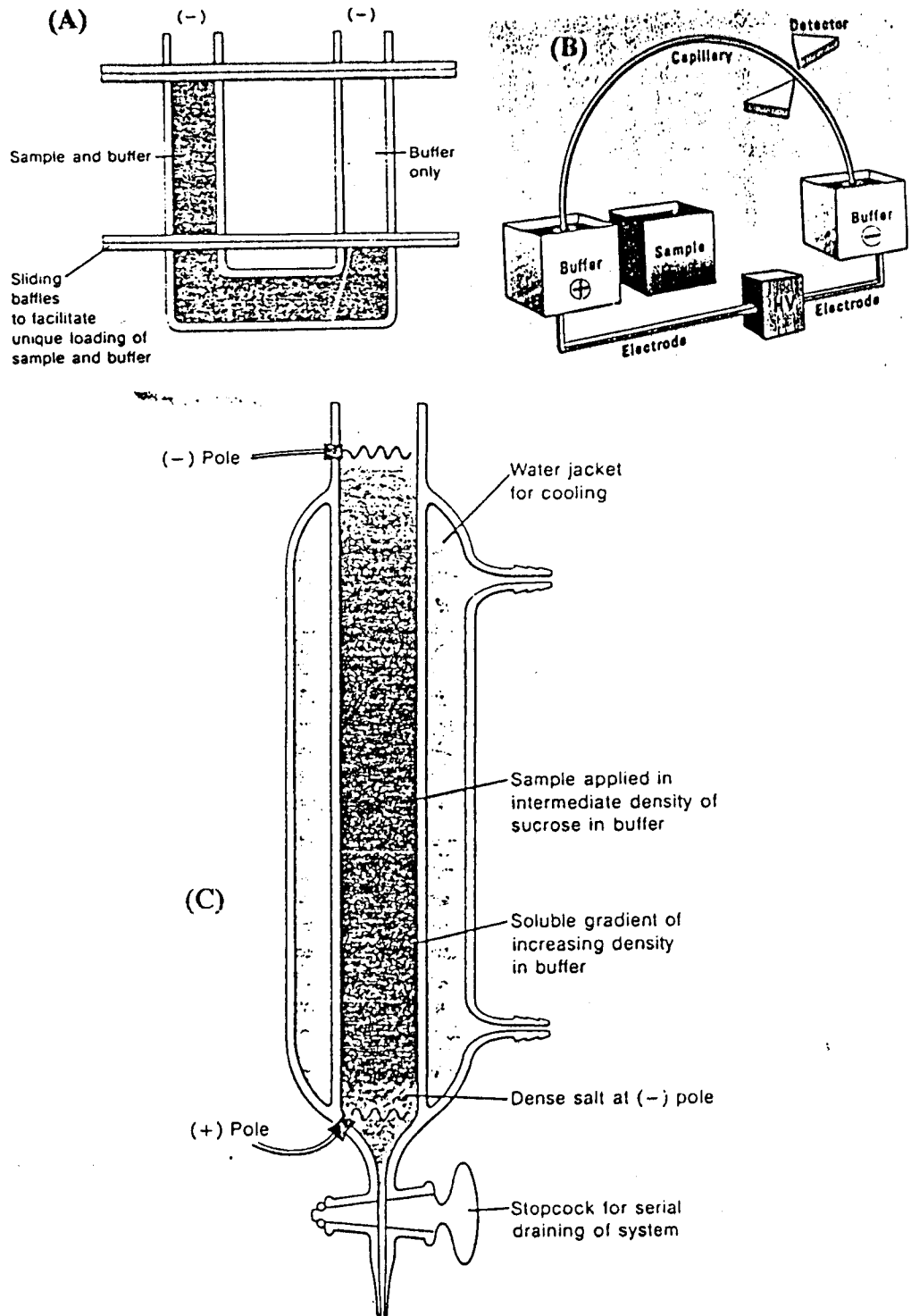
2.2. Ragam Teknik Elektroforesis

Elektroforesis dapat dikerjakan dalam sistem larutan tanpa medium penyangga yang dinamakan *moving boundary electrophoresis*, atau dalam sistem yang berisi medium penyangga yang disebut *zonal electrophoresis* (Clark et al., 1977).

2.2.1. Sistem elektroforesis tanpa medium penyangga

Dalam sistem elektroforesis tanpa medium penyangga, tahanan friksi antara ion-ion sampel dan larutan menjadi minimal sehingga migrasi berlangsung sangat cepat. Namun sistem demikian dapat mengalami pencampuran sampel dan lolosnya resolusi selama aplikasi dan pengambilan sampel. Oleh karena itu diperlukan berbagai modifikasi agar sistem larutan menjadi stabil dalam sel elektroforesis. Sebagai contoh, pada sistem elektroforesis Tiselius digunakan *slide buffer* untuk menstabilkan batas tajam antara sampel dan bufer; pada sistem elektroforesis gradien larut digunakan variasi densitas solut nonionik (misal: sukrosa, gliserol) serta elektroforesis kapiler untuk memperoleh efek yang sama (gambar 1).

Generasi elektroforesis kapiler yang terbaru adalah HPCE (*high performance capillary electrophoresis*), yang merupakan teknik pemisahan bermacam-macam senyawa bermuatan maupun netral, meliputi protein, oligopeptida, DNA, obat, molekul kiral, ion anorganik dan lain-lain, dengan automasi. HPCE tersusun atas kapiler berlapis silika dengan diameter internal 50-100 μm , yang dipenuhi dengan bufer (gambar 1). Bila sampel diinjeksikan dan diberi medan listrik, solut akan terpisah atas dasar perbedaan mobilitas. Pada suatu lokasi sepanjang perjalanan solut, ada jendela detektor UV-VIS.

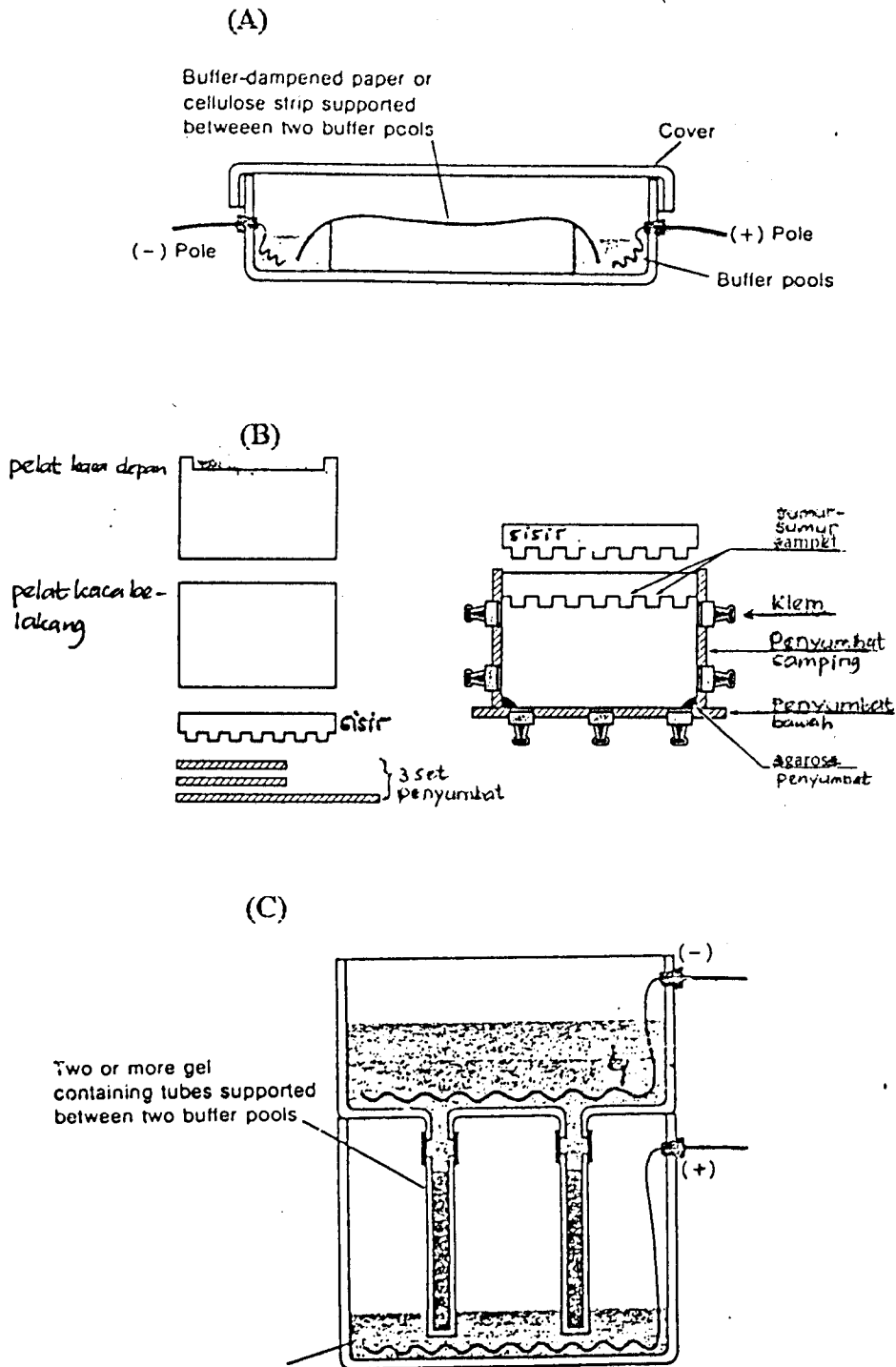


Gambar 1. Sistem elektroforesis tanpa medium penyangga
 A) Elektroforesis Tiselius, B) HPCE dan C) Elektroforesis gradien larut

2.2.2. Sistem elektroforesis dengan medium penyangga

Berdasarkan jenis medium penyangganya dikenal beberapa jenis *zonal electrophoresis*, yaitu elektroforesis kertas, elektroforesis lembaran selulosa dan elektroforesis gel (gambar 2).

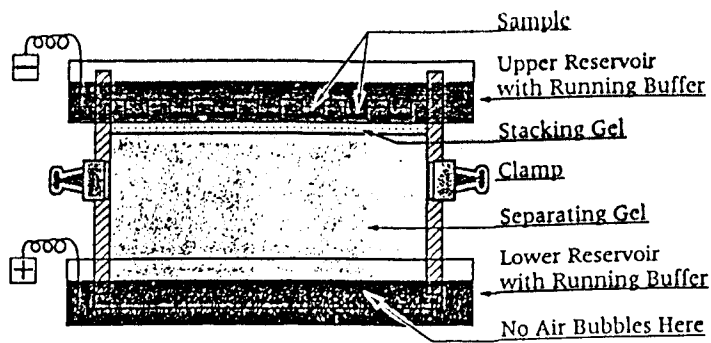
Gel elektroforesis memiliki beberapa keuntungan dari sistem elektroforesis lain, yaitu: (1) Dapat untuk menangani sampel jumlah besar, dan dapat dipakai untuk elektroforesis preparatif berbagai makromolekul. (2) Karakter matriks gel dapat diatur sesuai keperluan (Rosenberg, 1996).



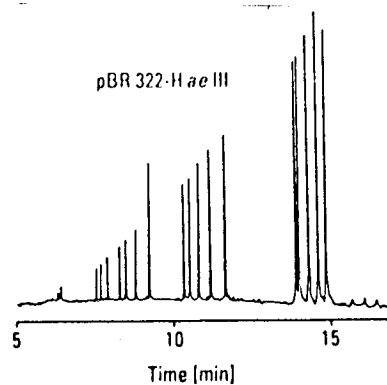
Gambar 2. Sistem elektroforesis dengan medium penyangga ()

- A) Elektroforesis kertas dan lembaran selulosa,
 B) Elektroforesis *slab-gel*, C) Elektroforesis *rod-gel*

Elektroforesis gel kapiler (*Capillary gel electrophoresis* / CGE) adalah analog HPCE dari elektroforesis *slab-gel* yang tradisional. Digunakan untuk pemisahan makromolekul biologi atas dasar perbedaan ukuran, misal oligonukleotida, fragmen restriksi DNA (gambar 4), dan protein. Pemisahan tersebut diproses oleh medium penyangga yang terdapat dalam kapiler berdiameter kecil seperti pada HPCE. Medium penyangga meliputi polimer berikatan silang (poliakrilamid, agarosa) atau larutan polimer linier. Keuntungan CGE dari elektroforesis *slab-gel* biasa adalah: kisaran komposisi matriks gel yang digunakan lebih luas, sistem deteksinya *on-line*, dapat untuk analisis kuantitatif, dan aplikasi sistem automasi .



Gambar 3. Elektroforesis gel diskontinyu

Gambar 4. Pemisahan fragmen DNA dengan *capillary gel electrophoresis*

2.3. Prinsip Analisis Protein dengan Elektroforesis Gel

Semenjak keberhasilan Tiselius pada tahun 1937 memisahkan protein-protein pada serum manusia, maka metode yang digunakan saat itu, yaitu elektroforesis, menjadi teknik yang esensial dalam riset biomedis. Teknik elektroforesis ini terus berkembang, sehingga kini dikenal teknik PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) yang merupakan prosedur penting dalam karakterisasi protein, diagnosis kesehatan, penentuan BM penentuan kemurnian protein, penentuan struktur sub-unit protein dan lain-lain.

Bahan dasar pembuatan gel untuk elektroforesis gel meliputi pati (Smithies, 1955), poligalaktosa yang disebut agarosa (Edgall et al., 1969) dan poliakrilamid. Gel agarosa

dan poliakrilamid telah terbukti baik untuk makromolekul yang sangat besar ukurannya, seperti asam nukleat, lipoprotein dan lain-lain. Gel dapat dicetak dalam bentuk tabung (*rod-gel*) atau empat persegi panjang (*slab-gel*). Keuntungan *slab-gel* adalah: (1) memungkinkan elektroforesis 10-20 sampel secara simultan pada kondisi yang sama, sehingga dapat dibandingkan, (2) panas yang timbul selama elektroforesis (penyebab distorsi gel) lebih mudah dilepas, (3) bentuk *slab* lebih mudah diperlakukan pada analisis selanjutnya (Rosenberg, 1996).

2.4. Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Sistem elektroforesis yang paling banyak dipakai (untuk protein) adalah elektroforesis gel poliakrilamid, utamanya yang berbentuk diskontinyu (*disc gel electrophoresis*), metode yang pertama kali dikenalkan oleh Davis (1964) dan Ornstein (1964). Pada sistem ini terdapat gel berpori besar (*stacking gel*) dilapiskan pada bagian atas dari gel berpori kecil (*separating/resolving gel*). Setiap lapisan gel tersebut dibuat dengan bufer yang berbeda, dan bufer pengelusi berbeda pula dari bufer gel. Pada gel bawah, biasanya terdiri atas 5-20 % poliakrilamid dengan bufer pH 8,8, di sini terjadi pemisahan protein. Gel atas dengan ketebalan 1 cm di bagian atas, biasanya dibuat pada pH sebesar 2 unit lebih rendah daripada pH gel bawah. Perbedaan ini bertujuan agar protein terkonsentrasi dalam bentuk pita tipis dan tajam sebelum memasuki gel bawah yang akan mengadakan pemisahan (gambar 3) (Rosenberg, 1996).

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) adalah metode elektroforesis untuk penentuan kuantitatif, komparasi dan karakterisasi protein, yang akurat, cepat dan murah. Metode ini memisahkan protein berdasarkan BM (Laemmli,



1970). SDS mengikat bagian hidrofob molekul protein sehingga merusak struktur lipatnya, akibatnya protein berada dalam konformasi panjang (*extended*) di dalam larutan.

Elektroforesis gel non-denaturasi (PAGE) dioperasikan menggunakan bufer pH tinggi (pH 8,8). Pada pH ini semua protein bermuatan negatif, dan bermigrasi menuju anoda. Protein murni yang diperoleh dengan metode ini tidak terdenaturasi dan masih bertahan aktivitasnya.

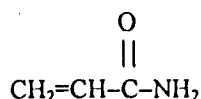
Teknik operasional SDS-PAGE maupun PAGE meliputi *linear slab gel* (gel dibentuk berupa irisan/lapisan tipis di antara dua buah papan gelas tipis) dan *tube gel* (gel dibentuk dengan pendukung tabung gelas). Keuntungan slab gel adalah: pada gel yang sama dapat dikembangkan banyak sampel sehingga keseragaman dapat dicapai. Untuk aplikasi analitis dapat digunakan mini slab gel, yang memberikan peningkatan resolusi dan penghematan waktu serta jumlah bahan yang digunakan.

Penggunaan teknik SDS-PAGE dan PAGE meliputi:

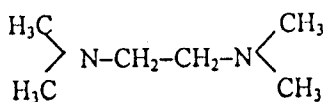
1. Analisis kemurnian protein
2. Penentuan berat molekul protein
3. Verifikasi kadar protein
4. Deteksi proteolisis
5. Identifikasi protein *immunoprecipitated*
6. Tahap pertama *immunoblotting*
7. Deteksi modifikasi protein

Medium penyangga gel poliakrilamid dibuat dari monomer akrilamid yang diikat-silangkan oleh N-N'-metilen-bis(akrilamid) melalui reaksi polimerisasi

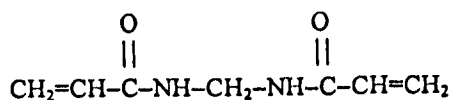
dengan inisiator amonium persulfat dan katalisator TEMED (tetrametil-etilendiamin).



Akrilamid



Tetrametil-etilendiamin (TEMED)

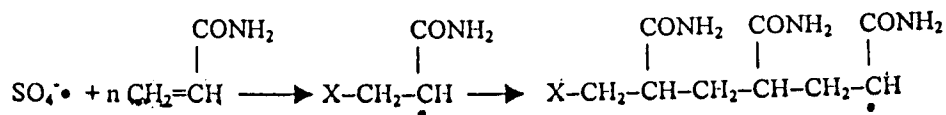


N,N' - metilen - bis(akrilamid)

Amonium persulfat dalam air membentuk radikal bebas sebagai berikut.

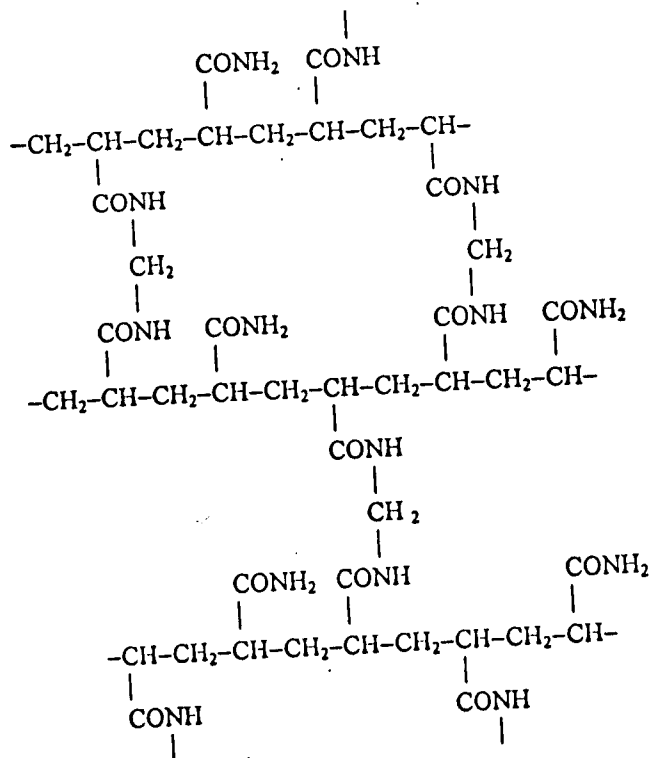
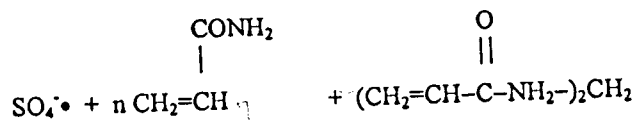


Radikal bebas tersebut akan segera bereaksi dengan akrilamid. Maka radikal bebas akan senantiasa terjaga dalam molekul akrilamid sehingga terbentuk radikal bebas akrilamid.



Radikal bebas akrilamid bersifat sangat reaktif, sehingga akan bereaksi satu sama lain membentuk rantai polimer panjang. Rantai polimer demikian tidak dapat membentuk gel, namun hanya berupa cairan kental. Untuk pembentukan gel poliakrilamid diperlukan adanya struktur ikatan silang pada polimer akrilamid. Struktur demikian dapat diperoleh dengan melakukan polimerisasi monomer

akrilamid dan N-N'-metilen-bis(akrilamid). Molekul dimer ini dapat membuat dua molekul akrilamid merangkai kepala dengan kepala (*head to head*).



Ukuran pori dalam struktur kimia poliakrilamid ditentukan oleh jarak ikatan silang dan jumlah akrilamid yang digunakan per unit volume dalam medium reaksi (Cooper, 1991).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan sebagai berikut.

1. Mengembangkan metode pintas pemurnian protein enzim dengan elektroforesis gel poliakrilamid.
2. Memperoleh enzim dekstranase murni dari *Streptococcus sp. B7*.

3.2. Manfaat Penelitian

Penelitian ini di samping menghasilkan enzim dekstranase murni, juga mencoba metode PAGE sebagai metode pintas pemurnian protein. Maka manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Metode pemurnian protein satu tahap yang dikembangkan dalam penelitian ini dapat digunakan untuk pemurnian protein-protein lain, khususnya protein enzim yang keutuhan aktivitasnya ditentukan oleh kondisi dan panjangnya proses pemurnian.
2. Enzim dekstranase murni yang didapat dari penelitian ini akan digunakan sebagai pola dalam sintesis primer *degenerate*, guna mengklon gen dekstranase dari *Streptococcus sp. B7* menggunakan metode *degenerate PCR*. Klon dekstranase yang diperoleh akan dipakai untuk produksi dekstranase rekombinan, sehingga dapat mengatasi problema yang timbul dalam produksi gula di Indonesia.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa ekstrak kasar enzim dekstranase dari *Streptococcus sp* B7, yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi P3GI Pasuruan.

4.2. Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan meliputi: akrilamid (*electrophoresis grade*), bis-akrilamid (N,N'-metilenbisakrilamid), tris (2-hidroksimetil-2-metil-1,3-propanadiol), HCl (*hydrochloric acid*), TEMED (*N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine*), glisin, gliserol, amonium persulfat, , bromfenol biru, metanol, asam asetat glasial, aseton, etanol. Bahan-bahan tersebut berderajat kemurnian pro analisis (p.a) apabila tidak disebut lain.

4.3. Alat

Bio-Rad Mini-Protean II Gel Elektroforesis Cell, *power supply*

4.4. Prosedur Kerja

4.4.1. Persiapan Pereaksi

1. Larutan stok akrilamid (larutan A)

Komposisi untuk 5 buah gel (40 ml/gel):

Akrilamid 60 gram (30%)

Bis-akrilamid 1,6 gram (0,8%)

Akuades sampai 200 ml

Larutan A bersifat neuro-toksik, iritatif, serta dapat terabsorpsi melalui kulit. Oleh karena itu harus selalu menggunakan sarung tangan.

2. Bufer untuk gel pemisah (larutan B)

(1,5 M Tris HCl pH 8,8)

Tris 18,2 gram (dalam 40 ml akuades)

HCl sampai pH 8,8

Akuades sampai 100 ml

3. Bufer untuk gel penyusun (larutan C)

(0,5 M Tris-HCl pH 6,8)

Tris 6 gram (dalam 40 ml akuades)

HCl sampai pH 6,8 dan akuades sampai 100 ml

4. Amonium persulfat 10 %

Amonium persulfat 0,5 gram dalam akuades 5 ml

5. Bufer elektroforesis

Tris 3 gram

Glisin 14,4 gram

Akuades sampai 1 liter (pH akhir 8,8)

6. Bufer sampel

Tris -HCl pH 6,8 3,1 ml

Gliserol 5 ml

Bromfenol biru 1 % 0,5 ml

Akuades 1,4 ml

3.4.2. Preparasi sampel

Ekstrak kasar enzim dekstranase dipusingkan pada 10.000 g selama 15 menit untuk menghilangkan materi tidak larut, kemudian dicampur dengan Bufer Sampel sebanyak 5 kali volume dalam tabung Eppendorf.

3.4.3. Pembuatan gel

Perhitungan jumlah larutan stok untuk gel berkadar akrilamid X % terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Perhitungan larutan stok untuk gel berkadar akrilamid X %

| Gel Pemisah | | Gel Penyusun | |
|------------------------|----------------|-------------------|------------|
| Larutan A | $X/3$ ml | Akuades | 2,3 ml |
| Larutan B | 2,5 ml | Larutan A | 0,67 ml |
| Akuades | $7,5 - X/3$ ml | Larutan C | 1,0 ml |
| Am.persulfat 10 % | 50 μ l | Am.persulfat 10 % | 30 μ l |
| TEMED | 5 μ l | TEMED | 5 μ l |
| Volume total 10,055 ml | | Volume total 4 ml | |

Pembuatan gel pemisah (berkadar akrilamid 8 %)

Disiapkan peralatan sesuai dengan gambar 2B (bab II). Dicampur larutan A dan B serta akuades dalam labu Erlenmeyer atau gelas Beaker 100 ml, dengan komposisi sesuai dengan tabel 1 untuk nilai $X = 8\%$. Ditambahkan amonium persulfat dan TEMED, diaduk

perlahan (di tahap ini harus berkerja cepat, agar tidak terjadi pemadatan sebelum larutan gel berada dalam cetakan gel). Dimasukkan larutan gel ke dalam cetakan gel, kemudian bagian atasnya dilapisi akuades setinggi 1-5 mm di atas gel. Ditunggu larutan tersebut terpolimerisasi (30-60 menit), yaitu sampai tampak batas jelas antara lapisan air dan gel.

Pembuatan gel penyusun (berkadar akrilamid 4 %)

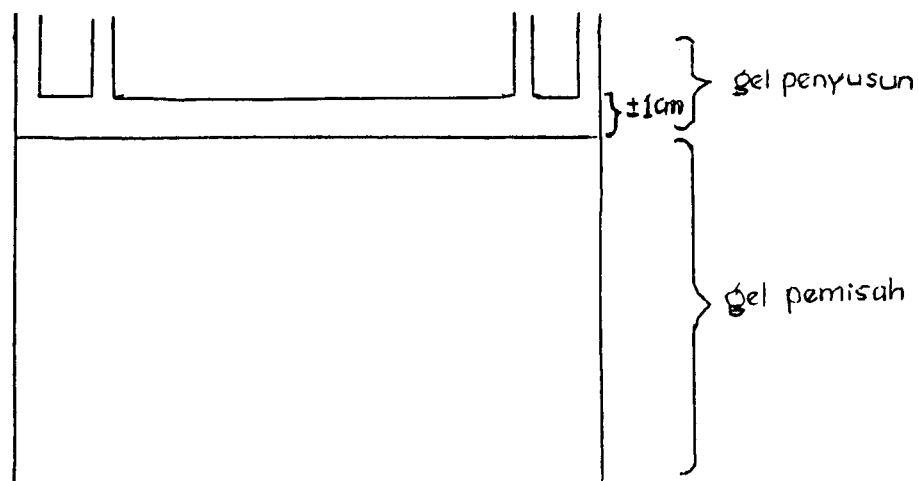
Air yang melapisi gel pemisah dibuang. Dicampur larutan A dan C serta air dalam labu Erlenmeyer atau gelas Beaker berukuran 50 ml, dengan komposisi sesuai dengan tabel 1 untuk nilai $X = 4\%$. Ditambahkan amonium persulfat dan TEMED, dicampur perlahan. Larutan gel penyusun dituang ke atas gel pemisah sampai larutan mencapai bagian atas pelat kaca. Dimasukkan sisir secara hati-hati sampai bagian pangkal dari gigi mencapai permukaan atas pelat kaca (gambar 2B dan 3). Cara memasukkan sisir harus dalam posisi kemiringan tertentu untuk menghindari terjebaknya gelembung udara. Dibiarkan terjadi polimerisasi (± 30 menit). Setelah gel penyusun terpolimerisasi, sisir diangkat secara perlahan agar tidak melukai/merusak umbai sumur. Gel diletakkan dalam bejana elektroforesis. Bufer elektroforesis dimasukkan ke dalam reservoir atas dan bawah, sampai bagian bawah dan atas gel terendam dalam bufer tersebut.

4.4.4. Fraksinasi ekstrak kasar enzim dekstranase

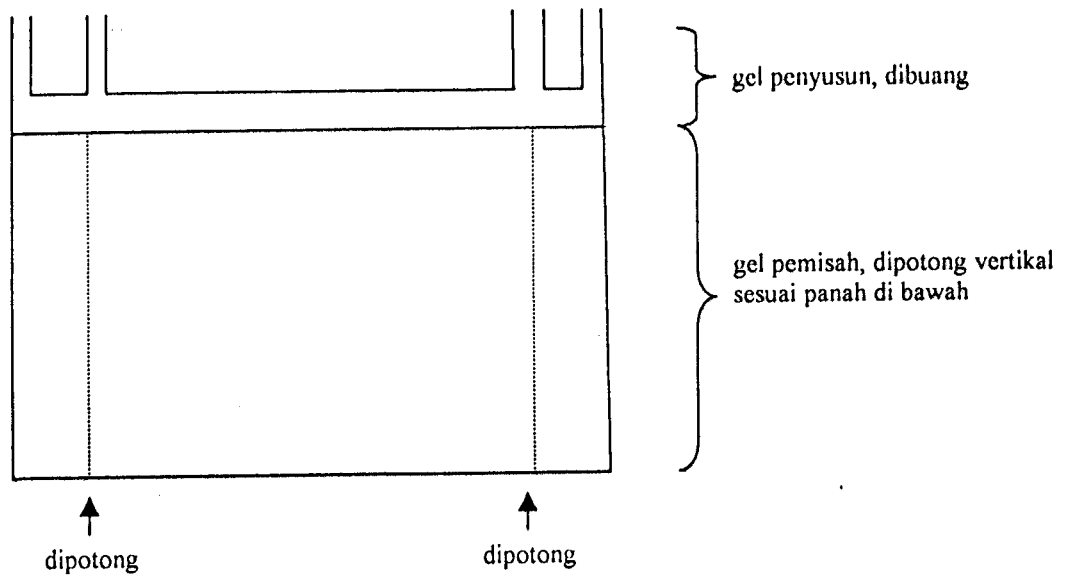
Disiapkan gel (sesuai prosedur pembuatan gel pemisah dan penyusun) dengan tiga buah sumur pada gel penyusun yang terdiri dari: sebuah sumur di tepi kiri, sebuah sumur besar (gabungan 5-10 buah sumur, sesuai dengan lebar gel) di tengah, dan sebuah sumur di tepi kanan, sebagai pada gambar 5. Sumur di tepi kanan dan kiri diisi sampel $\pm 20 \mu\text{l}$

sesuai dengan kapasitas sumur, sedang sebuah sumur besar di tengah dapat diisi sampel dalam volume lebih besar.

Setelah perangkat elektroforesis disiapkan, dilangsungkan elektroforesis dengan sumber arus 100-200 V (arus konstan), sampai pewarna bromfenol biru bermigrasi mencapai 1-5 mm dari dasar gel. Kemudian arus dimatikan, gel beserta cetakannya diambil, dan gel dipotong menjadi tiga bagian dengan potongan vertikal sesuai lebar tiga buah sumur. Maka akan diperoleh tiga potong gel: dua potongan kecil gel kiri dan kanan, serta satu potongan besar gel tengah, sebagai pada skema di gambar 6.



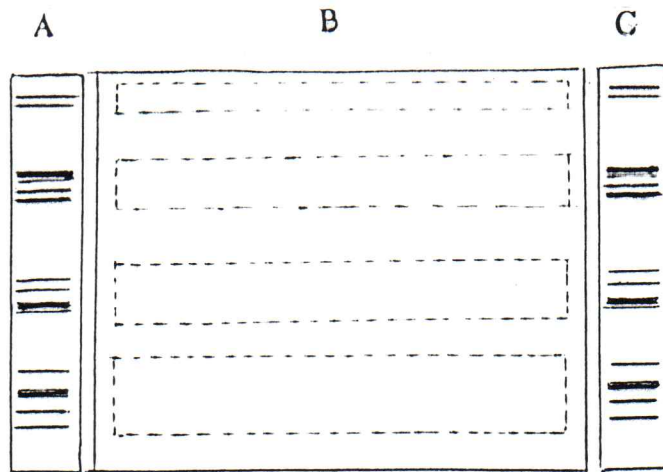
Gambar 5. Persiapan gel dan pembagian sumur pada gel penyusun



Gambar 6. Pemotongan gel sebelum diberi pewarna

Dua buah potongan gel kecil dipindah ke wadah mengandung larutan pewarna komasi sebanyak 20 ml, kemudian digoyang perlahan pada alat pengocok (*rotary atau rocking*) selama 10-20 menit. Kemudian larutan pewarna dituang, dan diganti dengan larutan penghilang warna sebanyak 50 ml dan digoyang perlahan. Untuk penyempurnaan penghilangan warna dapat diulang dengan larutan penghilang warna yang baru dan digoyang perlahan selama semalam.

Potongan gel kecil kiri dan kanan yang berisi pita-pita protein berwarna biru ini dipakai sebagai petunjuk untuk melakukan fraksinasi protein pada potongan gel besar yang tidak diwarnai, dengan cara sebagai skema pada gambar 7.



Gambar 7. Gambar skematis fraksinasi pita-pita protein
Potongan gel besar (B) dipotong horizontal (sesuai garis putus) menjadi beberapa (empat) fraksi, berdasarkan pita-pita pada gel kecil A dan C.

Ketiga potongan gel diatur di atas pelat kaca (dibasahi air yang cukup) sehingga seakan-akan berbentuk gel utuh seperti sebelum dipotong. Apabila gel kanan dan kiri lebih pendek, maka dapat dikembalikan pada panjang semula dengan merendamnya dalam air.

Potongan gel besar difraksinasi (dipotong-potong horizontal) sesuai petunjuk pita-pita yang terdapat pada tepi kiri dan kanan. Pita-pita yang ada dikelompokkan menjadi beberapa kelompok, sehingga diperoleh beberapa fraksi (gambar 7).

Setiap fraksi disimpan dalam tabung yang berbeda. Selanjutnya protein dilepas dari gel dengan difusi pasif, yaitu gel dilumatkan dengan batang pengaduk sehingga diperoleh butiran gel yang halus, kemudian direndam dalam bufer yang sesuai selama 1-2 jam, dipusingkan, dan supernatan dipisahkan. Supernatan dari setiap fraksi diuji untuk menentukan fraksi manakah yang memberikan aktivitas enzim dekstranase.



4.4.5. Penentuan lokasi pita enzim dekstranase dalam fraksi aktif

Dilakukan pemisahan pita-pita protein pada fraksi aktif dengan cara memotong setiap pita, menggunakan petunjuk pita-pita di sebelah kiri dan kanan, seperti teknik pada butir 3.4.4. Setiap potongan pita disimpan pada wadah yang berbeda, kemudian dilakukan difusi pasif seperti pada prosedur butir 3.4.4. Supernatan dari setiap pita diuji aktivitasnya, sehingga dapat diketahui posisi pita protein target (dekstranase) pada gel.

4.4.6. Optimasi pH dan kadar akrilamid gel untuk pemisahan pita dekstranase

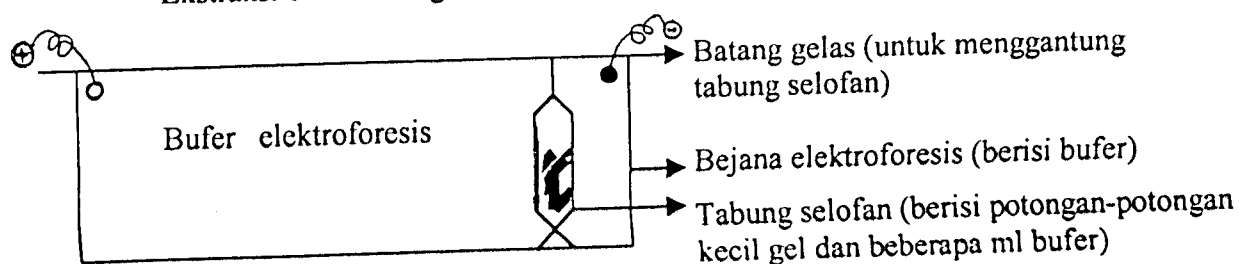
Dilakukan variasi kadar akrilamid (8, 10, 11 dan 12 %) dan pH bufer (8,3; 8,8 dan 9,3) pada gel pemisah untuk memperoleh pemisahan pita dekstranase terbaik, sehingga mudah dipisahkan dari pita protein lain.

4.4.7. Pengumpulan gel yang hanya mengandung pita enzim dekstranase

Dilakukan elektroforesis beberapa kali untuk memotong dan mengumpulkan gel yang hanya mengandung pita enzim, dengan cara: menggunakan pita kiri dan kanan sebagai petunjuk pemotongan, sedang pita besar di tengah harus tetap dalam keadaan tidak diwarnai, karena dari pita besar inilah potongan pita gel yang hanya mengandung protein enzim diperoleh dan dikumpulkan.

4.4.8. Pelepasan enzim dekstranase dari gel

Ekstraksi enzim dari gel dilakukan dengan elektroelusi sebagai pada gambar 8.



Gambar 8. Diagram rangkaian peralatan elektroelusi

Potongan gel dimasukkan ke dalam tabung selofan yang salah satu sisinya telah diikat dengan benang, ditambahkan 2 ml bufer elektroforesis, kemudian sisi lain tabung selofan diikat. Tabung selofan beserta isinya dicelupkan dalam bufer elektroforesis pada tangki elektroforesis horizontal. Elektroforesis dilangsungkan selama 2 jam, maka protein akan bergerak meninggalkan gel menuju larutan bufer dalam tabung selofan.

4.4.9. Presipitasi

Larutan dekstranase hasil elektroelusi sebanyak 2 ml ditambahkan 10 ml aseton (-20 °C), endapan dekstranase dipisahkan dari supernatan dengan sentrifugasi pada 10.000 g suhu -20 °C selama 5 menit. Endapan dikeringkan di udara terbuka, serbuk enzim yang diperoleh disimpan pada suhu -20 °C.

4.4.10. Uji aktivitas dekstranase

Disiapkan larutan agar 2% yang mengandung *blue dextran* 0,5 % dalam bufer fosfat 0,1 M pH 7. Larutan tersebut dalam keadaan panas dituang ke dalam cawan petri berdiameter 8 cm. Setelah larutan agar dingin dan memadat, dibuat lubang/sumur dengan bantuan bagian pangkal tip kuning. Larutan sampel sebanyak 50 µl dimasukkan ke dalam sumur dengan bantuan pipet mikro. Kemudian diinkubasi pada 40 °C selama 5 jam. Adanya aktivitas dekstranase ditandai dengan terbentuknya daerah bening tidak berwarna di sekitar sumur.

4.4.11. Uji kemurnian

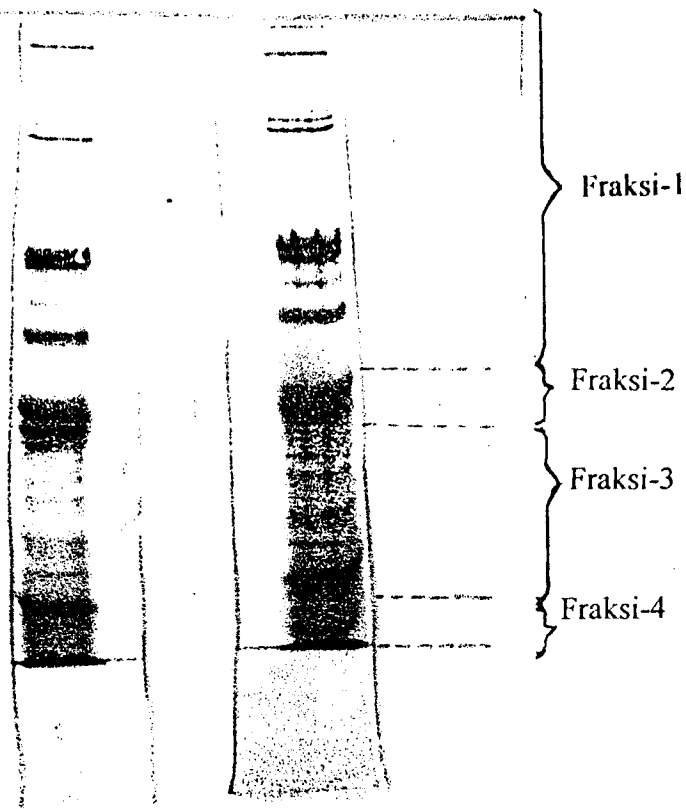
Uji kemurnian dekstranase dilakukan dengan menentukan adanya sebuah pita dekstranase pada elektroforesis.

BAB V**HASIL DAN PEMBAHASAN**

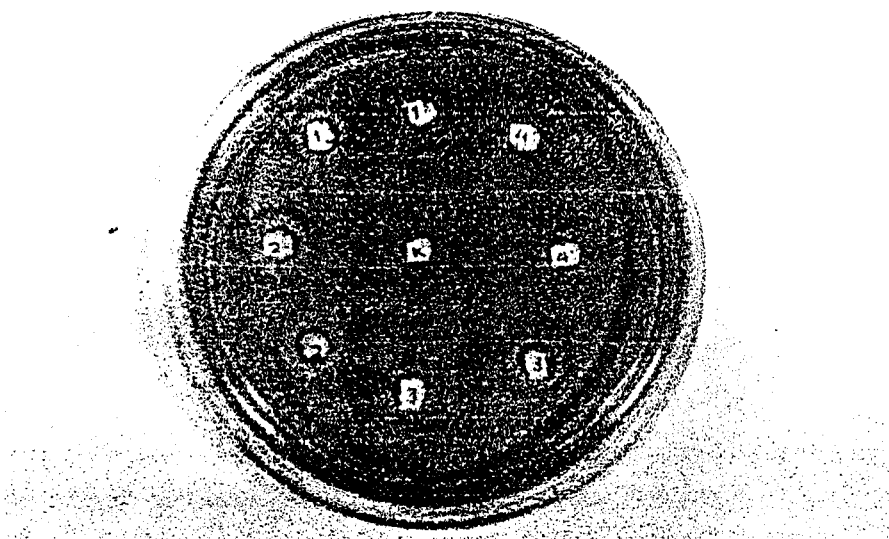
Enzim dekstranase telah dimurnikan dari ekstrak kasarnya dengan metode PAGE melalui prosedur yang telah diuraikan dengan hasil sebagai berikut.

5.1. Fraksinasi Ekstrak Kasar Enzim Dekstranase

Hasil elektroforesis ekstrak kasar enzim dekstranase memberikan pola pita protein sebagai pada gambar 9. Pita-pita tersebut dibagi menjadi 4 fraksi. Hasil uji aktivitas dekstranase setiap fraksi terdapat pada gambar 10.



Gambar 9. Pola pita protein ekstrak kasar enzim dekstranase



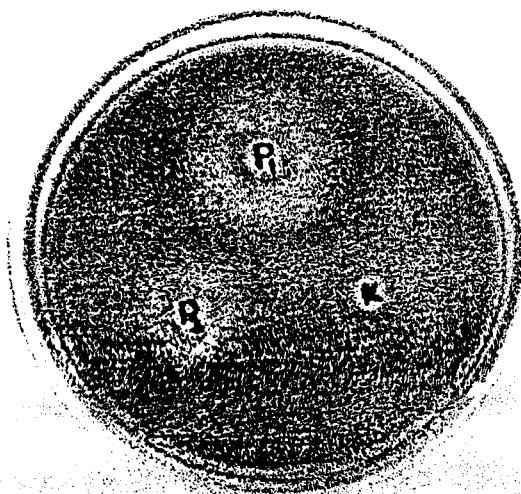
Gambar 10. Hasil uji aktivitas dekstranase setiap fraksi
K= percobaan kontrol (bufer fosfat pH 7); 1,2,3, dan 4= berturut-turut fraksi 1,2,3, dan 4

Dari hasil uji aktivitas dekstranase tersebut tampak bahwa fraksi-2 menunjukkan aktivitas dekstranase, sedang fraksi 1,3 dan 4 tidak menunjukkan aktivitas dekstranase. Daerah bening di sekitar fraksi aktif terjadi karena dekstran yang berwarna biru (*blue dextran*) dihidrolisis oleh dekstranase menjadi produk yang tidak berwarna.

5.2. Lokasi Pita Dekstranase pada Fraksi Aktif

Selanjutnya dilakukan elektroforesis terhadap fraksi-2 untuk memisahkan pita-pita yang terdapat dalam fraksi tersebut dan menentukan aktivitas dekstranase setiap pita.

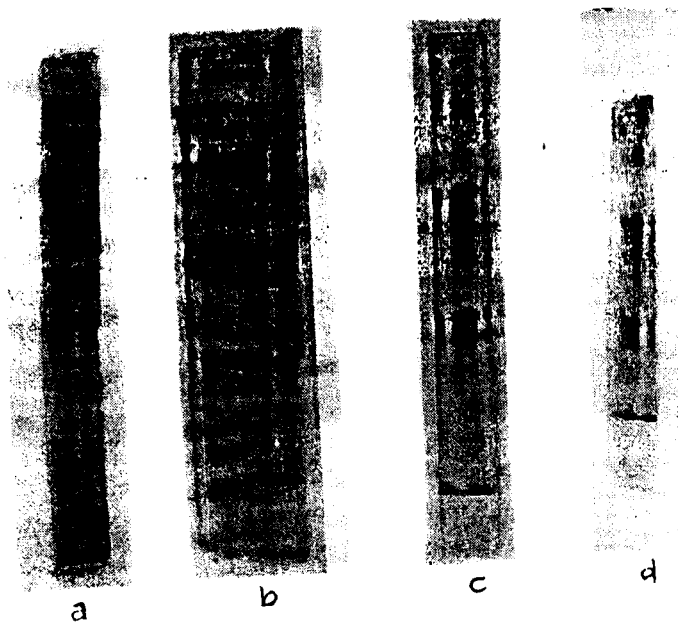
Hasil uji aktivitas (gambar 11) tampak bahwa pita-1 (P_1) pada fraksi-2 menunjukkan aktivitas dekstranase, yaitu dengan adanya daerah tidak berwarna yang luas di sekitar sumur P_1 . Sedang pita-2 (P_2) juga menunjukkan daerah tersebut yang sempit, hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut. Pita-1 dan pita-2 sangat berdekatan sehingga melakukan pemisahan keduanya tidak dapat sempurna. Maka disimpulkan bahwa dekstranase hanya terdapat pada pita-1 karena daerah tidak berwarna di sekitar P_1 luas, sedang pada P_2 terdapat pita-2 yang tercampur dengan sedikit pita-1.



Gambar 11. Hasil uji aktivitas dekstranase pita-pita protein dalam fraksi aktif
K = kontrol (bufer fosfat pH 7), P₁ dan P₂ = berturut-turut pita -1 dan pita-2

5.3. Kadar Akrilamid dan pH Optimum untuk Pemisahan Pita Dekstranase

Kadar akrilamid dan pH optimum untuk pemisahan pita dekstranase dari pita protein yang lain adalah berturut-turut 10 % (gambar 12 dan tabel 2) dan pH 8,8 (gambar 13 dan tabel 3).



Gambar 12. Hasil elektroforesis ekstrak kasar dekstranase pada beberapa kadar akrilamid
(a= 8%; b= 10 %; c= 11 %; d= 12 %)

Tabel 2. Harga R_f dan ΔR_f pada variasi kadar akrilamid

| kadar akrilamid | | | | | | | |
|-----------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|
| 8% | | 10% | | 11% | | 12% | |
| R_f | ΔR_f | R_f | ΔR_f | R_f | ΔR_f | R_f | ΔR_f |
| 0,121 | | 0,022 | | 0,026 | | 0,031 | |
| 0,138 | 0,017 | 0,043 | 0,021 | 0,043 | 0,017 | 0,046 | 0,015 |
| | | 0,049 | 0,006 | 0,052 | 0,009 | 0,050 | 0,004 |
| | | 0,052 | 0,003 | 0,060 | 0,008 | 0,054 | 0,004 |
| 0,189 | 0 | 0,203 | 0,151 | 0,164 | 0,104 | 0,146 | 0,092 |
| 0,198 | 0,009 | 0,246 | 0,043 | 0,198 | 0,034 | 0,169 | 0,023 |
| 0,279 | 0,081 | 0,413 | 0,167 | 0,388 | 0,190 | 0,346 | 0,177 |
| | | 0,449 | 0,036 | 0,405 | 0,017 | 0,362 | 0,016 |
| 0,483 | 0 | 0,478 | 0,029 | 0,431 | 0,026 | 0,392 | 0,030 |
| 0,629 | 0,146 | 0,638 | 0,160 | 0,707 | 0,276 | 0,623 | 0,231 |
| | | 0,659 | 0,021 | 0,724 | 0,017 | 0,638 | 0,015 |
| 0,767 | 0 | 0,681 | 0,022 | 0,746 | 0,022 | 0,654 | 0,016 |

Catatan

0 : ΔR_f untuk pita menumpuk atau hampir menumpuk

Dari data pada tabel 2 tampak bahwa harga ΔR_f untuk pita dekstranase ($R_f = 0,449$) pada kadar akrilamid 10, 11, dan 12 % berturut-turut adalah 0,036; 0,017 dan 0,016. Harga ΔR_f tertinggi untuk pita dekstranase adalah pada kadar akrilamid 10 %. Oleh karena itu untuk pengumpulan pita protein dekstranase dilakukan elektroforesis menggunakan gel pemisah berkadar akrilamid 10 %.



Gambar 13. Hasil elektroforesis ekstrak kasar dekstranase pada beberapa pH
(a= 8,3; b= 8,8; c= 9,3)

Tabel 3. Harga R_f dan ΔR_f pada variasi pH

| pH 8,3 | | pH 8,8 | | pH 9,3 | |
|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|
| R_f | ΔR_f | R_f | ΔR_f | R_f | ΔR_f |
| | | 0,022 | | 0,020 | |
| | 0 | 0,043 | 0,021 | | 0 |
| | 0 | 0,049 | 0,006 | 0,070 | 0 |
| 0,221 | 0 | 0,052 | 0,003 | 0,090 | 0,020 |
| 0,286 | 0,065 | 0,203 | 0,151 | | 0 |
| 0,298 | 0,012 | 0,246 | 0,043 | 0,150 | 0 |
| 0,454 | 0,156 | 0,413 | 0,167 | 0,204 | 0,054 |
| 0,480 | 0,026 | 0,449 | 0,036 | 0,236 | 0,032 |
| 0,727 | 0,247 | 0,480 | 0,029 | | 0 |
| 0,753 | 0,026 | 0,638 | 0,160 | 0,495 | 0 |
| | 0 | 0,659 | 0,021 | 0,548 | 0,053 |
| 0,974 | 0 | 0,681 | 0,022 | | |

Catatan

0 : ΔR_f untuk pita menumpuk atau hampir menumpuk

Dari data ΔR_f di tabel 3 tampak bahwa pada pH 8,3 dan 9,3 banyak terjadi penumpukan pita-pita protein, sedang pada pH 8,8 pita-pita tidak menumpuk dengan harga ΔR_f yang pada umumnya lebih besar. Demikian pula untuk pita dekstranase, dihasilkan ΔR_f tertinggi bila menggunakan pH 8,8. Oleh karena itu untuk pengumpulan pita-pita protein dekstranase digunakan gel penyusun yang dibuffer pada pH 8,8.

5.4. Metode Pintas Memperoleh Dekstranase Murni dengan PAGE

Setelah lokasi pita dengan aktivitas dekstranase pada gel diketahui, dan kondisi optimum (pH dan kadar akrilamid) untuk pemisahan pita tersebut ditentukan, maka metode pintas untuk memperoleh enzim dekstranase murni dapat dikerjakan dengan cara sebagai berikut. Pertama, mengumpulkan gel yang hanya mengandung pita protein dekstranase. Kedua, melepas protein tersebut dari gel dengan cara elektroelusi.

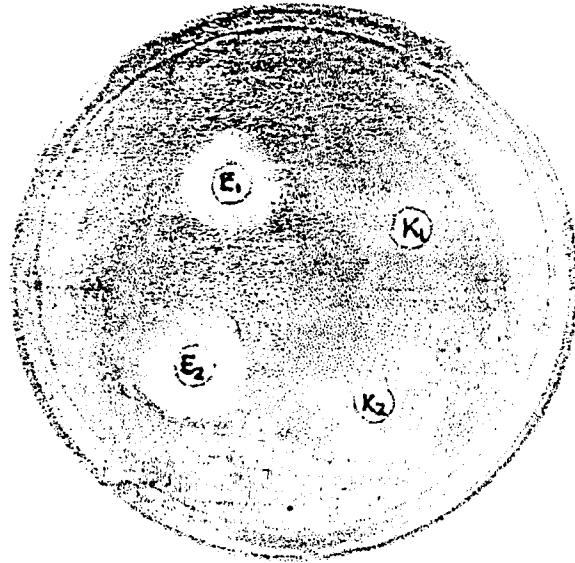
Pengumpulan pita protein dekstranase dilakukan dengan cara elektroforesis menggunakan gel penyusun berkadar akrilamid 10 % yang dibuffer pada pH 8,8. Lokasi pita protein dekstranase ($R_f=0,449$) pada gel yang tidak diberi warna dipotong berdasarkan petunjuk dari gel yang telah difiksasi dengan pewarna (pita-pita protein tampak).

Pelepasan dekstranase dari gel dilakukan dengan elektroelusi. Dengan cara ini semua dekstranase akan ditransfer dari gel menuju larutan bufer yang terdapat di dalam tabung selofan.

Serbuk dekstranase diperoleh dengan cara presipitasi dekstranase dari larutan pekatnya (hasil elektroelusi) menggunakan aseton bersuhu -20°C , kemudian presipitat dibiarkan di udara terbuka sampai kering.

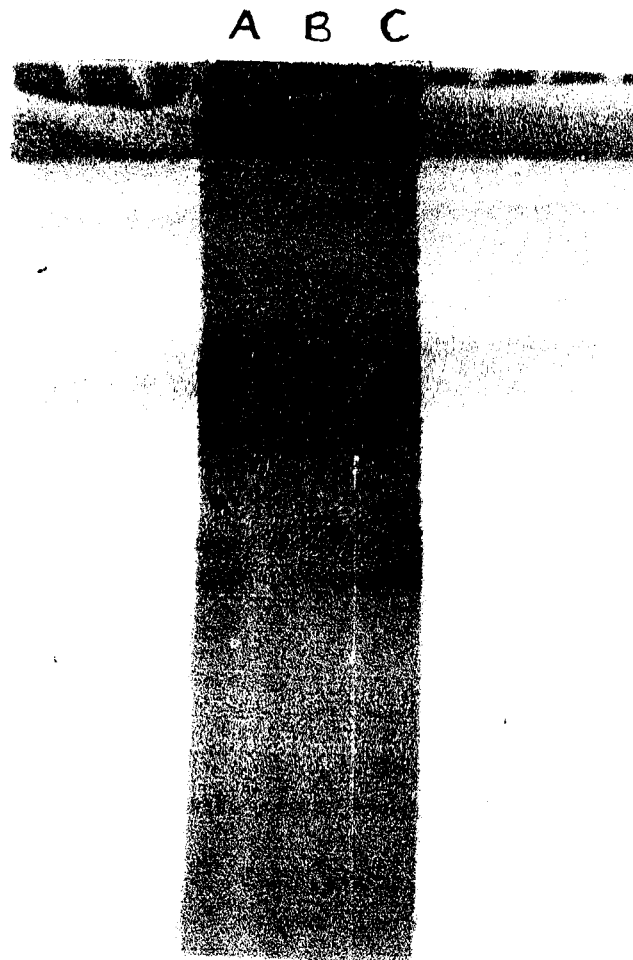
5.5. Hasil uji aktivitas dan kemurnian

Hasil uji aktivitas dekstranase dan uji kemurnian preparat dekstranase hasil pemurnian dengan metode PAGE terdapat pada gambar 14 dan 15.



Gambar 14. Hasil uji aktivitas dekstranase hasil pemurnian dengan metode PAGE. K_1 dan K_2 = percobaan kontrol (bufer fosfat pH 7), E_1 dan E_2 = eksperimen (larutan dekstranase dalam bufer fosfat pH 7)

Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa dekstranase hasil pemurnian menggunakan PAGE menunjukkan aktivitas dekstranase.



Gambar 15. Hasil uji kemurnian hasil pemurnian dekstranase dengan PAGE
A dan C = profil elektroforesis ekstrak kasar dekstranase
B = profil elektroforesis dekstranase murni.

Hasil uji kemurnian menunjukkan bahwa dalam preparat dekstranase hasil pemurnian menggunakan metode PAGE mengandung sebuah pita protein, yang berdasarkan hasil uji aktivitas pada gambar 14 menunjukkan aktivitas dekstranase.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

4.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan dapat dibuat kesimpulan sebagai berikut.

1. Enzim dekstranase dapat dimurnikan dari ekstrak kasarnya menggunakan satu tahap proses pemurnian yaitu dengan metode PAGE
2. Pemisahan optimum protein dekstranase dengan PAGE terjadi pada pH 8,8 dan kadar akrilamid 10 %

4.2. Saran

1. Disarankan untuk mengaplikasikan metode pemurnian dengan PAGE ini untuk enzim atau protein yang lain.
2. Apabila tidak dapat diperoleh kondisi optimum (pH dan kadar akrilamid) yang dapat memisahkan pita protein target dari pita protein yang lain, maka disarankan menggunakan metode PAGE dua dimensi.
3. Untuk memperoleh protein murni dalam skala yang lebih besar dapat dilakukan dengan metode PAGE model tabung.

DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel, F., Roger, B., Robert, E.K., David, D.M., J.G. Seidman, John, A.S., Kevin, S. (Editor) (1995), Short protocol in molecular biology, 3rd Ed., John Wiley & Sons, Inc., Canada.
- Clark, J.M. and Switzer, R.L, 1987, *Experimental Biochemistry*, Second Edition, W.H. Freeman and Company, San Fransisco
- Cooper, T.G., 1987, *The Tools of Biochemistry*, John Wiley and Sons, New Yor
- Lee, KAI-Fai, Yen-Chywan Liaw and Pang-Chui Shaw, 1996, Overproduction, purification and characterization of M.EcoHK31I, a bacterial methyltransferase with two polypeptides, *Biochem. J.* **314**, 321-326
- Murdiyatmo, U., Laksmi A, Wiwik E.W., dan Laksmi H., 1994, Dekstranase Bakterial: Produksi dan Penggunaannya di Pabrik Gula, *Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II, Cibinong*
- Rosenberg, I.M., 1996, *Protein Analysis and Purification*, Benchtop Techniques, Birkhauser, Boston.
- Southern, E.M., 1975, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol Biol*, **98**: 503-517 in Ausubel, F., Roger, B., Robert, E.K., David, D.M., J.G. Seidman, John, A.S., Kevin, S. (Editor) (1995), Short protocol in molecular biology, 3rd Ed., John Wiley & Sons, Inc., Canada.
- Wanda, S.Y. and Curtiss III, R., 1994, Purification and Characterization of *Streptococcus sobrinus* Dextranase Produced in Recombinant *Escherichia coli* and Sequence Analysis of the Dextranase Gene, *Journal of Bacteriology* **176**, 3839-3850