



**IDENTIFIKASI SISI AKTIF REKOMBINAN *SUCROSE PHOSPHATE*
SYNTHASE MENGGUNAKAN METODE
*SITE-DIRECTED MUTAGENESIS***

SKRIPSI

Oleh:

Siti Nurul Afidah

NIM 131810401025

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2017



**IDENTIFIKASI SISI AKTIF REKOMBINAN *SUCROSE PHOSPHATE*
SYNTHASE MENGGUNAKAN METODE
*SITE-DIRECTED MUTAGENESIS***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi Strata 1 (S1) Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Oleh:

Siti Nurul Afidah

NIM 131810401025

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2017

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, karya tulis ilmiah ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Shofiatul Kholisoh, Ayahanda Suharto tercinta, dan Saudariku Ana Maulidatun Ni'mah yang telah memberikan doa tiada henti, segala kasih sayang, dukungan dan semangatnya selama ini.
2. Kakek dan nenek, Alm. Mbah Marianah, Alm. Mbah Marsuki, Alm. Mbah Satun, Alm. Mbah Kusman yang telah memberikan kenangan indah dan nasehat yang berharga.
3. Seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, dukungan dan semangat untuk menuntut ilmu.
4. Guru-guru TK Dewi Masyithoh 7 Jombang-Jember
5. Guru-guru MI Al-Ma'arif 02 Jombang-Jember
6. Guru-guru Mts. Mabda'ul Ma'arif Jombang-Jember
7. Guru-guru MAN 3 Jember
8. Dosen-dosen dan almamaterku Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember
9. Sahabat dan teman-temanku

MOTTO

“MAN JADDA WA JADA”

Siapa yang bersungguh-sungguh pasti berhasil

“MAN SHABARA ZHAFIRA”

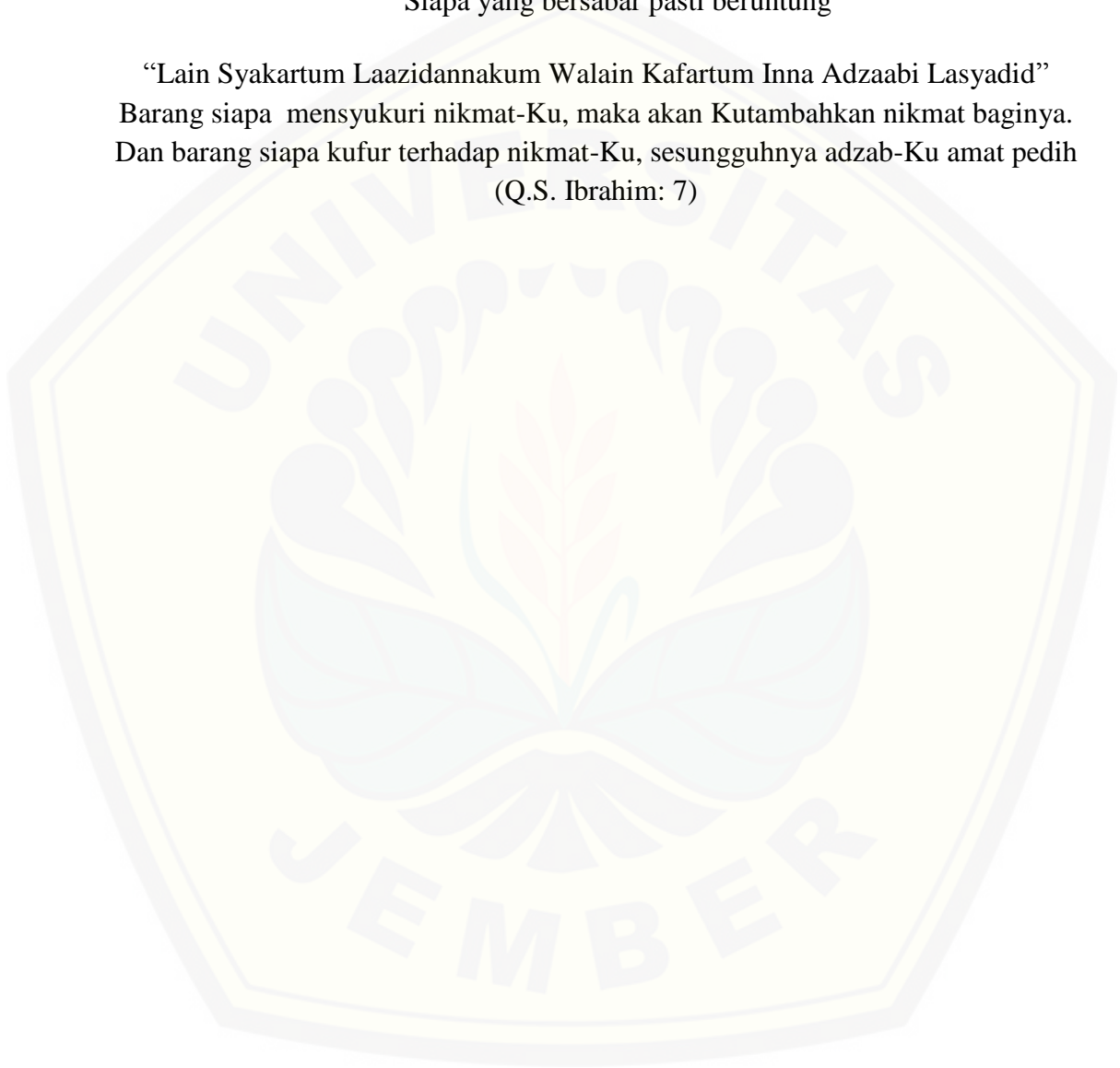
Siapa yang bersabar pasti beruntung

“Lain Syakartum Laazidannakum Walain Kafartum Inna Adzaabi Lasyadid”

Barang siapa mensyukuri nikmat-Ku, maka akan Kutambahkan nikmat baginya.

Dan barang siapa kufur terhadap nikmat-Ku, sesungguhnya adzab-Ku amat pedih

(Q.S. Ibrahim: 7)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Siti Nurul Afidah

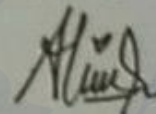
NIM : 131810401025

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul :
"Identifikasi Sisi Aktif Rekombinan *Sucrose Phosphate Synthase*
Menggunakan Metode *Site-Directed Mutagenesis*" adalah benar-benar karya
sendiri merupakan sub tema dari penelitian Prof. Bambang Sugiharto, M. Agr. Sc
yang berjudul "Pengujian Keamanan Lingkungan Tebu Produk Rekayasa
Genetika Rendemen Tinggi", kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan
sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya
jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai
dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan
dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika
ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 07 Desember 2017

Yang menyatakan,



Siti Nurul Afidah
NIM 131810401025

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI SISI AKTIF REKOMBINAN *SUCROSE PHOSPHATE*
SYNTHASE MENGGUNAKAN METODE
*SITE-DIRECTED MUTAGENESIS***

Oleh:

**Siti Nurul Afidah
NIM 131810401025**

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc

Dosen Pembimbing Anggota : M. Su'udi, Ph.D

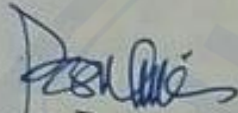
PENGESAHAN

Karya tulis ilmiah berjudul “Identifikasi Sisi Aktif Rekombinan *Sucrose Phosphate Synthase* Menggunakan Metode *Site-Directed Mutagenesis*” telah diuji dan disahkan oleh Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari : **JUM'AT**
tanggal : **12 JAN 2018**
tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

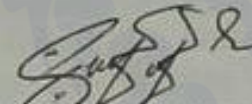
Tim Penguji:

Ketua,



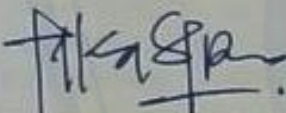
Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc
NIP. 195510221982121001

Sekretaris,



M. Su'udi, Ph.D
NRP. 760016788

Dosen Penguji I,



Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si, M.Si
NIP. 197509132000032001

Dosen Penguji II,



Dra. Dwi Setyati, M.Si
NIP. 196404171991032001

Mengesahkan,
Dekan



Drs. Sujito, Ph.D
NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Identifikasi Sisi Aktif pada Rekombinan *Sucrose Phosphate Synthase* Menggunakan Metode *Site-Directed Mutagenesis*;

Siti Nurul Afidah, 131810401025; 2017; 45 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Sucrose Phosphate Synthase (SPS) adalah enzim kunci yang berperan dalam sintesis sukrosa. Pada tanaman, SPS mengkatalisis pembentukan *sucrose-6-phosphate* (S6P) dari *uridin diphosphate glucose* (UDP-G) dan *fructose-6-phosphate* (F6P). SPS tanaman umumnya terdiri dari tiga domain: domain N-terminal, wilayah tengah, dan domain terminal C. Penelitian sebelumnya melaporkan penghilangan pada domain N-terminal menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik SPS rekombinan hingga 10 kali lipat (Sawitri *et al.*, 2016). Domain tengah berisi domain glycosyltransferase (GTD) dan berperan untuk fungsi katalitik SPS. Namun, mekanisme pengikatan katalitik dan substrat masih belum jelas karena kurangnya informasi mengenai struktural SPS tanaman. Sehingga pada penelitian ini dilakukan identifikasi sisi aktif enzim SoSPS1 dengan tujuan untuk menemukan asam amino penting yang berperan dalam pengikatan substrat pada SoSPS1.

Dalam penelitian ini, cDNA dari SoSPS1 dimutasi pada bagian GTD menggunakan metode *site-directed mutagenesis* dan diekspresikan pada *Escherichia coli* untuk mendapatkan rekombinan SoSPS1. Asam amino yang dijadikan target mutasi pada penelitian ini diperoleh dari studi bioinformatika, yaitu dengan menghomologikan SoSPS1 dengan enzim lain yang sefamili. Analisis yang digunakan untuk melihat ekspresi dan karakter biokimia rekombinan SoSPS adalah analisis *Western blot* dan uji aktivitas enzim. Hasil yang diperoleh yaitu terdapat beberapa asam amino pada bagian GTD yang berperan dalam fungsi katalitik SoSPS1, diantaranya yaitu R496 dan D498. Rekombinan SoSPS1 dapat diekspresikan pada bakteri *E. coli* yang ditunjukkan dengan terbentuknya pita protein pada ukuran ± 100 kDa. Uji aktivitas enzim dilakukan untuk mengetahui karakter biokimia dari rekombinan SoSPS1. Selain dilakukan analisis pada R496 dan D498, juga dilakukan analisis beberapa asam amino yang berada di sebelahnya seperti S495 dan P497. S495A dan P497A menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi daripada kontrol positif, R496A dan D498A menunjukkan aktivitas yang lebih rendah daripada kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa asam amino R496 dan D498 memiliki peranan penting dalam regulasi aktivitas SoSPS1 dan dalam pengikatan substrat.

Dengan diketahuinya sisi aktif SoSPS1 terhadap substrat, maka selanjutnya dapat dilakukan rekayasa protein pada sisi aktif tersebut sebagai strategi baru untuk meningkatkan afinitas pengikatan substrat dan untuk meningkatkan proses sintesis sukrosa.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Identifikasi Sisi Aktif Rekombinan *Sucrose Phosphate Synthase* Menggunakan Metode *Site-Directed Mutagenesis***” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Ibunda Shofi'atul Kholisoh, Ayahanda Suharto serta Adinda Ana Maulidatun Ni'mah atas do'a, dukungan, motivasi, perhatian dan kasih sayang tiada henti sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S1;
2. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr.Sc selaku dosen pembimbing utama dan M. Su'udi, Ph.D selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, dan saran dalam penulisan skripsi ini;
3. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si, M.Si dan Dra. Dwi Setyati, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. Dra. Mahriani, M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan S1;
5. Dr. Widhi Dyah Sawitri, yang sudah bersedia membimbing saya selama bekerja di laboratorium dan memberikan motivasi, saran demi kesempurnaan skripsi ini;
6. Teknisi laboratorium CDAST Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Tanaman : Purnama Oktaviandari, S.P, M.P., Arsetyo Rahardianto, S. Si, Nurul Hidayati, S.Si, Ni Putu Frida Okta W., S.Si., Ken Melati, S.Si yang telah meluangkan waktu untuk membantu penelitian ini;

7. Rekan-rekan kerja di laboratorium : Moch. Rosyadi Adnan, Lutfiana Riski, Retna Hermawati, Intan Neliana, Retnosari Apriasti, Nurul Mufitdah, Firdha Narulita, Risky Maulana, Fragaria Vesca, Suwinda Fibriani, Weny Nailul, Suvia Widyaningrum, Reza Anugrah, A Bagus Sudrajat, Arina Amalia, Femin Damayanti, Anisatul Mukarromah yang senantiasa memberikan motivasi dan waktunya untuk membantu penelitian ini;
8. Teman-teman seperjuangan Biologi 2013 “Biogas” dan sahabat Kosan Putri 39 yang senantiasa memberikan dukungan dan bantuan dalam penyusunan skripsi ini;
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Jember, Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | ii |
| HALAMAN MOTTO | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iv |
| HALAMAN PENGESAHAN | vi |
| RINGKASAN | vii |
| PRAKATA | viii |
| DAFTAR ISI | x |
| DAFTAR TABEL | xii |
| DAFTAR GAMBAR | xiii |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 2 |
| 1.3 Batasan Masalah..... | 2 |
| 1.4 Tujuan Penelitian..... | 3 |
| 1.5 Manfaat Penelitian..... | 3 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1 <i>Sucrose Phosphate Synthase</i> (SPS) dan Peranannya dalam Metabolisme Sukrosa..... | 4 |
| 2.2 <i>Alanine Scanning Mutation</i> (ASM) dan <i>Site-Directed Mutagenesis</i> (SDM)..... | 5 |
| 2.3 Produksi Protein Rekombinan..... | 7 |
| 2.3.1 <i>Escherichia Coli</i> Strain BL21..... | 7 |
| 2.3.2 Plasmid pTrcHisA..... | 8 |
| 2.3.3 Mekanisme Induksi Isopropyl B-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) | 8 |
| 2.4 Purifikasi Protein Rekombinan SoSPS1..... | 9 |
| BAB 3. METODE PENELITIAN | 11 |
| 3.1 Tempat dan Waktu..... | 11 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 Alat dan Bahan..... | 11 |
| 3.3 Prosedur Penelitian..... | 11 |
| 3.3.1 Studi Bioinformatika dan Desain Primer..... | 11 |
| 3.3.2 Melakukan Mutasi SoSPS1 menggunakan Metode <i>Site-directed Mutagenesis</i> | 12 |
| 3.3.3 Transformasi Plasmid pTrcHisA-Rekombinan SoSPS1 ke <i>E. coli</i> BL21..... | 12 |
| 3.3.4 Produksi Protein Rekombinan SoSPS1 pada Bakteri <i>E. coli</i> BL21..... | 13 |
| 3.3.5 Ekstraksi Protein Rekombinan SoSPS1..... | 13 |
| 3.3.6 Purifikasi Protein Rekombinan SoSPS1 menggunakan Resin DE52 dan Ni-NTA..... | 14 |
| 3.3.7 Analisis Western Blot..... | 14 |
| 3.3.8 Uji Aktivitas Enzim..... | 15 |
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 17 |
| 4.1 Studi Bioinformatika Protein dan Desain Primer..... | 17 |
| 4.2 Transformasi Plasmid pTrcHisA-Rekombinan SoSPS1 pada <i>E. coli</i> BL21..... | 18 |
| 4.3 Ekspresi, Produksi, dan Purifikasi Protein Rekombinan SoSPS1.... | 20 |
| 4.4 Uji Aktivitas Enzim Rekombinan SoSPS1..... | 22 |
| BAB 5. PENUTUP..... | 24 |
| 5.1 Kesimpulan..... | 24 |
| 5.2 Saran..... | 24 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 25 |
| LAMPIRAN..... | 27 |
| Lampiran 1. Primer yang Digunakan untuk <i>Site-directed Mutagenesis</i> cDNA SoSPS1..... | 27 |
| Lampiran 2. Tabel Perhitungan Uji Aktivitas Enzim..... | 28 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabel 3.1 | Program PCR untuk <i>Site-directed Mutagenesis</i> | 12 |
| Tabel 4.1 | Desain Primer untuk beberapa mutan SoSPS1..... | 18 |



DAFTAR GAMBAR

| | | |
|------------|--|----|
| Gambar 2.1 | Biosintesis sukrosa pada tanaman yang dikatalisis oleh SPS..... | 5 |
| Gambar 2.2 | <i>Cassette Mutagenesis</i> | 6 |
| Gambar 2.3 | Peta plasmid pTrcHis A, B, C..... | 8 |
| Gambar 4.1 | Homologi enzim yang memiliki domain glikosiltransferase | 17 |
| Gambar 4.2 | Struktur kristal <i>Sucrose Synthase</i> dari <i>Arabidopsis thaliana</i> yang mengikat substrat UDP | 18 |
| Gambar 4.3 | Hasil sekuensing DNA pengkode rekombinan SoSPS1..... | 19 |
| Gambar 4.4 | Hasil elektroforesis DNA pengkode protein SoSPS1 produk PCR koloni..... | 20 |
| Gambar 4.5 | Hasil <i>Western Blot</i> protein rekombinan SoSPS1 yang diekspresikan pada <i>E. coli</i> strain BL21 menggunakan penanda antibodi anti-SoSPS1..... | 21 |
| Gambar 4.6 | Hasil purifikasi rekombinan SoSPS1 menggunakan resin DE52 dan resin afinitas kromatografi Ni-NTA..... | 22 |
| Gambar 4.7 | Aktivitas rekombinan SoSPS1..... | 23 |

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sukrosa merupakan komponen penting dalam kehidupan tanaman. Sukrosa berperan sebagai gula transportasi dalam mekanisme pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Selain itu, sukrosa juga berfungsi sebagai produk simpanan fotosintesis dan transduksi sinyal dan stres. Enzim yang berperan dalam metabolisme sukrosa diantaranya adalah SPS (*Sucrose phosphate synthase*), SuSy (*sucrose synthase*), dan SPP (*sucrose phosphate phosphatase*) yang dikelompokkan dalam *sucrose biosynthesis related proteins* (SBRP) (Cumino *et al.*, 2002; Salerno dan Curatti, 2003). Struktur protein SBRP mempunyai fungsional domain yang sama yaitu *glycosyltransferase* domain (GTD). SPS merupakan enzim kunci yang berperan dalam sintesis sukrosa dan memainkan peran fisiologis untuk mengatur fluks karbon menjadi sukrosa. SPS tanaman umumnya terdiri dari tiga domain yaitu domain N-terminal, domain C-terminal, dan daerah tengah yang merupakan GTD dan berperan untuk fungsi katalitik dari SPS (Castleden *et al.*, 2004). Enzim SPS berperan sebagai katalisator pembentukan *sucrose-6-phosphate* (S6P) dari *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine diphosphate glucose* (UDP-G) (Barker *et al.*, 2000).

Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa terdapat 2 macam gen pengkode SPS pada tanaman tebu, yaitu *SoSPS1* dan *SoSPS2*. Kedua gen pengkode SPS tersebut diketahui mempunyai ekspresi yang berbeda. *SoSPS1* diekspresikan pada organ fotosintetik, sedangkan *SoSPS2* diekspresikan pada organ non-fotosintetik (Sugiharto *et al.*, 1997). Penelitian ini menggunakan *SoSPS1* (*Saccharum officinarum Sucrose Phosphate Synthase*) karena *SoSPS1* dianggap menjadi enzim yang bertanggung jawab dalam biosintesis sukrosa pada tanaman tebu. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa *SoSPS1* telah dikarakterisasi dan diekspresikan di *Escherichia coli* dan *insect cell* melalui teknik rekombinan protein. Pada penelitian tersebut dilaporkan bahwa penghilangan pada domain N-terminal *SoSPS1* dapat mengakibatkan peningkatan spesifik aktivitas SPS hingga 10 kali lipat (Sawitri *et al.*, 2016). Sampai saat ini informasi mengenai

sisi aktif pada GTD SoSPS1 sendiri masih belum banyak dilaporkan, sehingga dilakukan penelitian identifikasi sisi aktif enzim SoSPS1 untuk mempelajari peran fisiologis dari SoSPS1 terkait dengan kemampuan enzim mengikat substrat.

Sisi aktif enzim berperan penting dalam reaksi katalitik enzim dengan substrat dan pengaturan metabolisme sel (Berg *et al.*, 2007). Salah satu metode yang digunakan untuk identifikasi sisi aktif SoSPS1 adalah dengan *alanine scanning mutation* (ASM). ASM adalah *screening* asam amino dengan mengganti asam amino target menjadi *alanine* menggunakan metode *site-directed mutagenesis* (SDM). Pada prinsipnya ASM dan SDM merupakan metode yang mirip. SDM adalah metode untuk mengubah sekuen nukleotida DNA dengan melakukan perubahan nukleotida dari sumber manapun tanpa memerlukan vektor khusus (Brown, 2010). Dengan diketahuinya sisi aktif SoSPS1 terhadap substrat, maka selanjutnya dapat dilakukan rekayasa protein pada sisi aktif tersebut sebagai strategi baru untuk meningkatkan afinitas pengikatan substrat dan meningkatkan proses sintesis sukrosa.

Dalam penelitian ini, cDNA dari SoSPS1 dimutasi pada bagian GTD menggunakan metode SDM dan diekspresikan pada *Escherichia coli* untuk mendapatkan rekombinan SoSPS1. Hasil ekspresi rekombinan mutan SoSPS1 akan memberikan informasi mengenai sisi aktif enzim melalui analisis aktifitas enzim dan *Western blot* untuk mengetahui ekspresinya.

1.2 Rumusan Masalah

Dalam melakukan rekayasa protein perlu adanya informasi mengenai sisi aktif pada GTD enzim SoSPS1 yang berperan dalam pengikatan substrat, sedangkan sampai saat ini belum tersedianya informasi yang jelas mengenai posisi sisi aktif dan asam amino yang berperan dalam pengikatan substrat pada enzim SoSPS1 karena belum ditemukannya struktur protein SPS tanaman. Oleh karena itu pada penelitian ini perlu dilakukan identifikasi asam amino yang berperan penting dalam fungsi katalitik pada SoSPS1.

1.3 Batasan Masalah

Asam amino SoSPS1 yang dijadikan sebagai target mutasi pada penelitian ini merupakan asam amino yang diperoleh berdasarkan hasil studi bioinformatika. Mutasi dilakukan pada satu asam amino yang dianggap paling berperan dalam fungsi katalitik dan beberapa asam amino di sebelahnya untuk dijadikan sebagai pembandingan. Analisis yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji aktivitas enzim dan *Western blot*.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi sisi aktif pada GTD enzim SoSPS1 dengan metode *site-directed mutagenesis* untuk mengetahui asam amino penting yang berperan dalam pengikatan substrat pada SoSPS1.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi mengenai asam amino penyusun enzim SoSPS1 yang berperan aktif dalam pengikatan substrat, sehingga selanjutnya dapat dilakukan rekayasa protein pada sisi aktif tersebut sebagai strategi baru untuk meningkatkan afinitas pengikatan substrat dan meningkatkan sintesis sukrosa.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

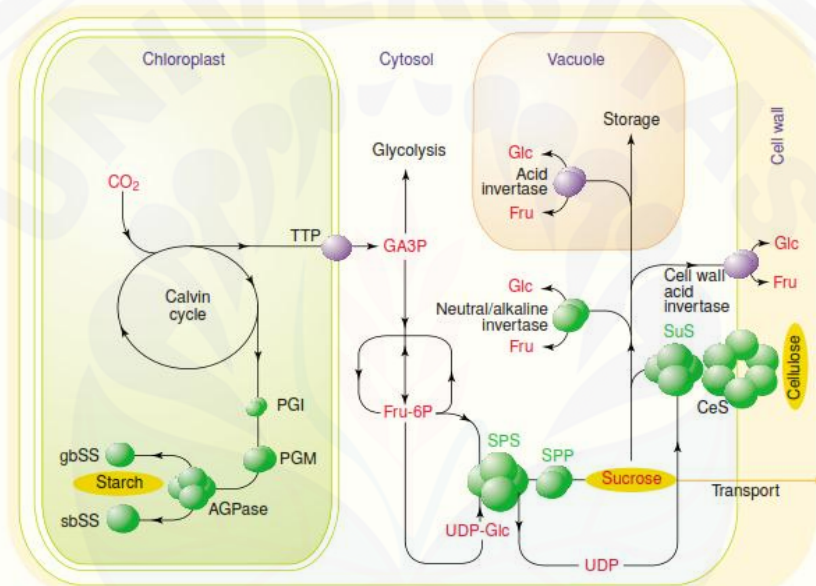
2.1 *Sucrose Phosphate Synthase (SPS)* dan Peranannya dalam Metabolisme Sukrosa

Sukrosa merupakan komponen penting bagi kehidupan tanaman. Sukrosa merupakan gula transportasi yang berperan dalam mekanisme pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Selain itu, sukrosa juga berfungsi sebagai produk simpanan fotosintesis dan berperan dalam transduksi sinyal dan stres. Metabolisme sukrosa dalam tanaman diperantarai oleh beberapa enzim yang dikelompokkan dalam *sucrose biosynthesis related proteins* (SBRP). Salah satu dari SBRP tersebut adalah SPS. SPS merupakan salah satu enzim yang berperan penting dalam memainkan peran fisiologis untuk mengatur fluks karbon menjadi sukrosa. Enzim SPS berperan dalam pembentukan *sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dengan cara mengkatalisis transfer gugus glikosil dari gula donor yang diaktifkan seperti UDP-G ke gula akseptor F6P (Barker *et al.*, 2000; Chua *et al.*, 2008). Terdapat berbagai gula donor dalam biosintesis sukrosa antara lain UDP-G, NDP-G (*nucleoside diphosphate glucose*) dan lain-lain. SPS bakteri spesifik terhadap substrat NDP-G, sedangkan SPS tumbuhan hanya spesifik terhadap substrat donor UDP-G (Lunn *et al.*, 1999; Chua *et al.*, 2008).

Enzim lain yang termasuk dalam SBRP adalah *Sucrose Phosphate Phosphatase* (SPP) dan *Sucrose Synthase* (SuSy). Enzim SPP berperan memutuskan ikatan *phosphate* dari *sucrose-6-phosphate* sehingga dihasilkan sukrosa dan *phosphate anorganik*. Sedangkan SuSy merupakan enzim yang mengkatalisis pembentukan S6P, namun SuSy cenderung melakukan reaksi pemecahan molekul sukrosa (Cumino *et al.*, 2002; Salerno dan Curatti, 2003). Proses biosintesis sukrosa dapat dilihat pada Gambar 2.1.

Kloning SPS pertama kali dilakukan pada beberapa tanaman seperti jagung, bayam, kentang, *sugarbeet*, padi. Namun terdapat perbedaan kuantitatif yang signifikan antara spesies tanaman seperti sifat regulasi SPS secara *in vitro* (aktivasi *Glucose-6-P* dan penghambatan Pi) serta modulasi SPS secara *in vivo*. SoSPS1 (*Saccharum officinarum Sucrose Phosphate Synthase*) merupakan SPS

yang berasal dari tanaman tebu. SoSPS1 diekspresikan pada organ fotosintetik dan memiliki aktivitas (Sugiharto *et al.*, 1997). SPS tanaman termasuk SoSPS1 terdiri atas 3 domain yaitu *glycosyltransferase* (55 kDa), C-terminal *phosphohydrolase* (30 kDa) dan N-terminal (20 kDa). Domain *glycosyltransferase* bertanggung jawab untuk fungsi katalitik SPS, domain N-terminal bertanggung jawab dalam regulasi alosterik enzim, sedangkan C-terminal berperan penting dalam regulasi katalitik enzim seperti halnya SPP (Sawitri *et al.*, 2016).



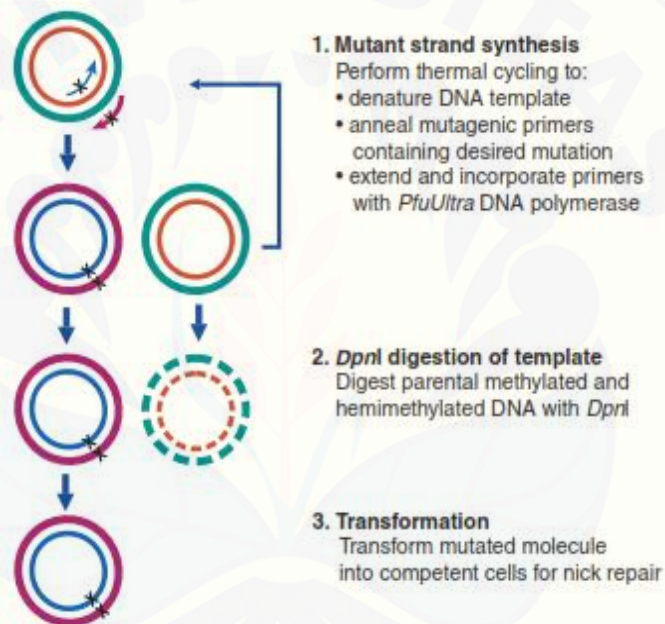
Gambar 2.1 Biosintesis sukrosa pada tanaman yang dikatalisis oleh SPS (Salerno dan Curatti, 2003)

2.2 Alanine Scanning Mutation (ASM) dan Site-directed Mutagenesis (SDM)

ASM adalah skrining asam amino dengan mengganti asam amino menjadi alanin menggunakan metode SDM. Alanin merupakan residu substitusi yang umum dipilih untuk melakukan mutasi. Hal ini dikarenakan penggantian asam amino dengan alanin tidak mempengaruhi atau mengubah konformasi rantai utama suatu protein. Alanin juga tidak menimbulkan efek elektrostatis dan efek sterik yang ekstrim. Selain itu, penggunaan alanin dinilai lebih efektif dalam melakukan mutasi *single amino* untuk menganalisis protein (Lefevre *et al.*, 1997).

SDM merupakan metode untuk mengubah sekuen nukleotida DNA dengan melakukan substitusi, delesi, atau sisipan nukleotida dari sumber manapun tanpa vektor khusus. Aplikasi dari SDM dapat digunakan untuk mempelajari perubahan aktivitas protein akibat rekayasa, untuk memilih target mutasi serta untuk memperkenalkan dan menghapus situs endonuclease restriksi. Selain itu, aplikasi SDM juga dapat digunakan untuk mempelajari unsur-unsur ekspresi gen (Brown, 2010; Kunkel, 1985).

Metode SDM dilakukan menggunakan mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Prinsip dasar SDM dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Cassette Mutagenesis (Smith, 2007)

Prinsip dasar SDM adalah memanfaatkan ikatan antara vektor *double-strand* DNA (dsDNA) dengan *insert* yang diinginkan dan dua primer oligonukleotida sintetik. Primer oligonukleotida yang digunakan dalam melakukan SDM merupakan primer yang didesain khusus untuk menghasilkan mutasi yang diinginkan (Kunkel, 1985). SDM biasanya dilakukan menggunakan kit PCR tertentu yang komposisinya telah disesuaikan atau telah didesain untuk melakukan mutasi. Kit SDM juga dilengkapi enzim restriksi *DpnI* untuk mendigest *template* DNA yang diamplifikasi (Gambar 2.2). *DpnI* sendiri

merupakan enzim endonuclease yang diisolasi dari golongan bakteri *Pneumoniae*. *DpnI* memiliki sisi pemotongan yang spesifik yaitu pada bagian 5'GmATC- 3' dari sekuen DNA (de la Campa *et al.*, 1988).

2.3 Produksi Protein Rekombinan

Protein rekombinan merupakan protein yang diperoleh dengan memanfaatkan teknologi rekayasa genetika. Protein rekombinan dibuat dengan cara mengkloning DNA tertentu ke dalam plasmid vektor ekspresi yang kemudian ditransformasikan ke dalam sel. Gen target yang diinginkan diisolasi, lalu dipindahkan ke dalam plasmid vektor kloning untuk memperbanyak jumlah gen. Setelah itu gen target disubkloning pada plasmid vektor ekspresi sehingga dapat diekspresikan atau diproduksi suatu protein (Schumann *et al.*, 2004).

Dalam memproduksi protein rekombinan SoSPS1 diperlukan komponen-komponen sebagai berikut:

2.3.1 *Escherichia coli* strain BL21

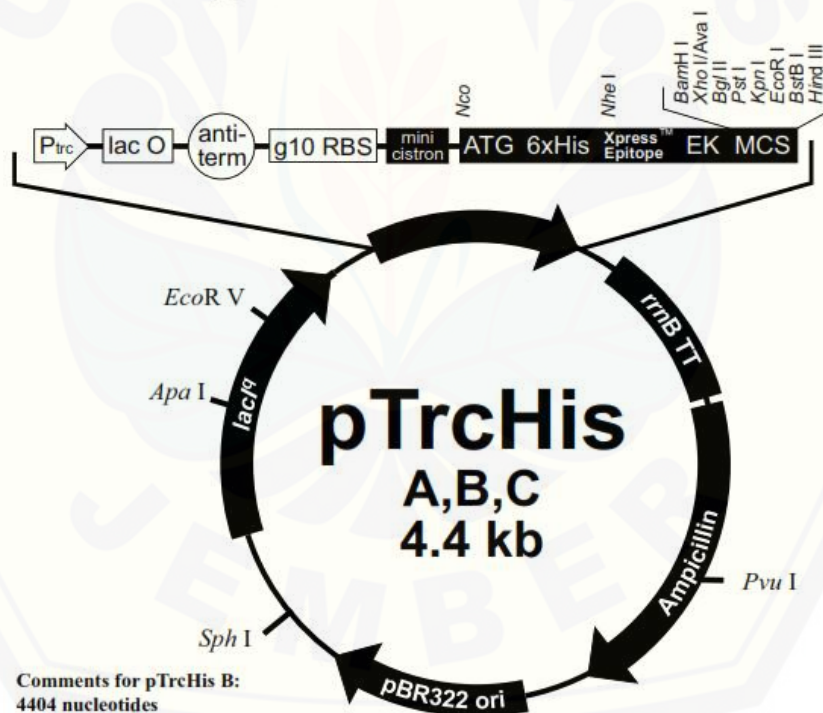
Escherichia coli merupakan suatu bakteri yang umum digunakan sebagai inang dalam ekspresi protein rekombinan (Robinchon *et al.*, 2011). Kelebihan penggunaan *E. coli* adalah waktu regenerasinya yang relatif cepat yaitu ± 20 menit, sehingga memungkinkan protein dapat diproduksi dengan jumlah banyak dalam waktu singkat (Rosano *et al.*, 2014). Strain BL21 dari *E. coli* umum digunakan untuk ekspresi protein rekombinan karena strain ini tidak menghasilkan Lon dan ompT protease. Lon dan ompT protease merupakan enzim yang dapat mendegradasi protein rekombinan. Selain itu, *E. coli* strain BL21 juga mampu hidup pada media yang miskin nutrisi (Grodberg dan Dunn, 1988). Oleh karena itu, strain ini sangat memungkinkan untuk ekspresi protein rekombinan terutama yang rentan terhadap enzim hidrolisis.

Transkripsi protein rekombinan dalam *E. coli* strain BL21(DE3) dilakukan oleh T7 RNA polymerase. T7 RNA polymerase dalam genom *E. coli* strain BL21 tersebut mampu mentranskripsi delapan kali lebih cepat daripada *E. coli* yang menghasilkan RNA polimerase. Enzim T7 RNA polymerase bekerja dibawah

kendali T7 promoter atau lacUV5 promoter (Studier dan Moffatt, 1986; Zhang *et al.*, 2015).

2.3.2 Plasmid pTrcHis A

Plasmid pTrcHis A merupakan salah satu sistem yang digunakan untuk produksi protein rekombinan dalam *E. coli*. Penggunaan plasmid pTrcHis A dalam ekspresi protein memungkinkan terjadinya tingkat ekspresi yang tinggi. Hal ini dikarenakan pada plasmid pTrcHis A terdapat *trc* promoter. *trc* promoter merupakan promoter hybrid antara -35 (*trpB*) dan -10 (*lacUV5*) (Brosius *et al.*, 1985; Amman *et al.*, 1983; Mulligan *et al.*, 1985). Plasmid pTrcHis A juga memiliki gen pengkode histidine tag 6x yang memfasilitasi pemurnian protein rekombinan menggunakan kromatografi affinitas logam nikel (Saeed *et al.*, 2006). Peta plasmid pTrcHis A secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Peta Plasmid pTrcHis A, B, C (Saeed *et al.*, 2006)

2.3.3 Mekanisme Induksi isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) merupakan reagen induksi yang umum digunakan dalam produksi protein rekombinan (Collins *et al.*, 2013). Mekanisme induksi IPTG yaitu IPTG akan berikatan dengan protein repressor *lac*.

Ikatan tersebut menyebabkan perubahan struktur protein repressor *lac*. Perubahan struktur protein repressor *lac* menyebabkan protein tersebut terlepas dari sekuen operator *lac* pada genom *E. coli*. Terlepasnya repressor *lac* memungkinkan RNA polimerase untuk dapat berikatan dan dapat mentranskripsi T7 RNA polimerase. T7 RNA polimerase akan mentranskripsi *insert* yang terdapat pada vektor plasmid (Berg *et al.*, 2007).

Sebelum daerah *multiple cloning site* (MCS) pada plasmid pTrcHis A terdapat *operator lac* yang berfungsi sebagai pengontrol. Selain itu juga terdapat *lacI* yang berperan sebagai protein repressor bagi *operator lac*. *LacI* diekspresikan ketika bakteri berada pada fase awal pertumbuhan, sehingga menginaktifkan operator *lac* dan menyebabkan protein rekombinan tidak dapat ditranskripsi. Namun ketika dilakukan induksi, IPTG akan berikatan dengan *lacI* sehingga operator *lac* aktif dan ekspresi protein rekombinan dapat terjadi (Bell dan Lewis, 2000; Daber *et al.*, 2007).

2.4 Purifikasi Protein Rekombinan SoSPS1

Purifikasi protein rekombinan SoSPS1 dilakukan dengan metode afinitas menggunakan resin Ni-NTA (nikel-nitriloatriacetic acid). Resin Ni-NTA adalah resin dengan muatan ion nikel (Ni^{2+}) yang mampu mengikat 6x histidin-tag yang telah bergabung dengan N- atau C-terminus protein rekombinan (Higgins dan Hames, 1999). Histidin merupakan asam amino yang berperan penting sebagai mediator pengikatan sebagian besar protein pada ion Ni^{2+} dalam kolom. Jika protein target telah terikat pada resin Ni-NTA, maka protein tersebut perlu dielusi untuk dapat dikeluarkan dari kolom. Elusi protein target dilakukan dengan menggunakan larutan buffer yang mengandung imidazol. Imidazol memiliki struktur yang sama dengan rantai samping histidin, sehingga secara efektif keduanya bersaing untuk dapat berikatan dengan ion Ni^{2+} pada konsentrasi yang lebih tinggi (Janknecht *et al.*, 1991).

Pada penelitian Sawitri *et al.*, (2016) purifikasi SoSPS1 dilakukan dengan mengombinasikan metode afinitas purifikasi his-tag dengan purifikasi menggunakan *ion exchange*. Purifikasi menggunakan *ion exchange* merupakan

purifikasi protein yang didasarkan pada muatan dari setiap protein. Resin *ion exchange* yang biasa digunakan untuk purifikasi ada 2 macam yaitu *anion exchanger* dan *cation exchanger*. Sedangkan yang digunakan untuk purifikasi SoSPS1 yang diekspresikan pada bakteri *E. coli* adalah *anion exchange*. Purifikasi protein tersebut dilakukan untuk mendapatkan protein murni yang siap digunakan untuk melakukan analisis lebih lanjut seperti *Western blot* dan aktivitas enzim (Janson, 2011; Sawitri *et al.*, 2016).



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember mulai April – Oktober 2017.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *micropipet*, *sentrifuge*, *laminar air flow* (LAF), *shaker*, *autoclave*, mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR), kromatografi resin Ni-NTA, kromatografi resin *ion exchange*, *plate microtiter reader*, SDS-PAGE dan membran transfer.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sel bakteri *E. coli* strain BL21, vektor pTrHisA yang telah disisipi cDNA enzim SoSPS1, kit *Quick Change Lighting Site-directed Mutagenesis* (Agilent), *readymix* PCR Promega, marker DNA 1 kb ladder (Geneaid), UDP-*glucose* dan *Fructose-6-P*, antibodi poliklonal SPS dan antibodi sekunder *rabbit* (BioRad), media Luria Berthani (LB), buffer ekstraksi, Tris-HCl, NaCl, Ampisilin, *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG), imidazole, gliserol, *nitro blue tetrazolium* (NBT), *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate* (BCIP), HCl, NaOH dan resolsinol.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Studi Bioinformatika dan Desain Primer

Studi bioinformatika dilakukan untuk menentukan asam amino sebagai target mutasi. Penentuan asam amino target dilakukan dengan cara menghomologikan enzim-enzim yang memiliki domain *glycosyltransferase* atau satu famili dengan SoSPS1. Studi bioinformatika dilakukan menggunakan program *Protein BLAST* di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Multiple Sequence Aligment* di *Clustal Omega* dan software Pymol (Marchel-Bauer *et al.*, 2017; Sievers *et al.*, 2011; Delano, 2002). Setelah ditemukan asam amino target, maka dilakukan desain primer sesuai target mutasi.

3.3.2 Melakukan Mutasi SoSPS1 Menggunakan Metode *Site-directed Mutagenesis* (SDM)

Mutasi SoSPS1 dibuat dengan metode SDM yang dilakukan dengan mesin PCR, sehingga untuk melakukannya diperlukan kit PCR tertentu dan primer yang telah didesain khusus sesuai mutasi yang diinginkan. SDM dilakukan dengan kit *Quick Change Lightning Site-directed Mutagenesis* (Agilent) yang terdiri atas 5 μL 10x buffer reaksi, 2 μL plasmid pTrcHisA-SoSPS1, 1.25 μL primer oligonukleotida 1, 1.25 μL primer oligonukleotida 2, 1 μL dNTP mix, 38.5 μL ddH₂O dan 1 μL DNA *polymerase PfuUltra* HF. Program PCR yang digunakan untuk melakukan SDM dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Program PCR untuk *Site-directed Mutagenesis*

| Segmen | Siklus | Suhu | Waktu |
|--------|--------|------|----------|
| 1 | 1 | 95°C | 30 detik |
| | | 95°C | 30 detik |
| 2 | 16 | 55°C | 1 menit |
| | | 68°C | 3 menit |

Produk hasil amplifikasi ditambahkan 1 μL enzim restriksi *DpnI* dan di-*pipeting* hingga tercampur. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

3.3.3 Transformasi Plasmid pTrcHisA-rekombinan SoSPS1 ke *E. coli* strain BL21

Transformasi plasmid dilakukan dengan metode *heat shock*. 1 μL plasmid pTrcHisA-rekombinan SoSPS1 ditransformasikan ke 50 μL sel kompeten *E. coli* BL21 (DE3). Campuran tersebut diinkubasi dalam es selama 30 menit dan dilakukan *heat shock* pada 42°C selama 40 detik. Campuran plasmid dan sel kompeten diinkubasi kembali dalam es selama 2-3 menit. Setelah itu, campuran tersebut ditambah media LB cair 500 μl (10 g/l tripton, 5 g/l ekstrak yeast, dan 10 g/l NaCl) dan digojog selama 1 jam pada 37°C dengan kecepatan 150 rpm. Sel *E. coli* transforman sebanyak 150 μl ditumbuhkan pada media LB padat (10 g/l tripton, 5 g/l ekstrak yeast, dan 10 g/l NaCl dan 15g/l agar) dan diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C (Sambrook *et al.*, 1989). Konfirmasi keberhasilan transformasi dilakukan melalui PCR koloni dengan menggunakan primer spesifik

gen *SoSPS1*. Primer yang digunakan untuk PCR koloni yaitu *SPS-F* (5'-GATGTTGCTGCTCTCCTTTC-3') dan *SPS-R* (5'-CTTGACAACGCGAGGATCAT-3'). PCR koloni dilakukan dengan menggunakan *readymix* PCR dari PROMEGA sebanyak 5 µl, 0.5 µl primer (*forward* dan *reverse*) dan ddH₂O ditambahkan sampai 10 µl. PCR dilakukan dalam 30 siklus dengan program sebagai berikut : pre-denaturation 95°C 3 menit, denaturation 95°C 10 detik, annealing 50°C 1 menit, extension 72°C 2 menit dan final extension 5 menit. Hasil PCR kemudian dideteksi dan dielektroforesis pada 1% gel agarose selama 30 menit 100 V dan diwarnai dengan ethidium bromida. Marker yang digunakan adalah 1 kb Ladder dari Geneaid. Hasil elektroforesis dilihat dengan Gel Imagine System dari Major Science. Selain dilakukan konfirmasi dengan PCR koloni juga dilakukan isolasi plasmid pTrcHisA-rekombinan *SoSPS1* dari *E.coli* menggunakan kit (Tiangen). Isolasi plasmid dilakukan dengan tujuan untuk memverifikasi keberhasilan mutasi melalui sekuensing DNA (Sawitri *et al.*, 2016).

3.3.4 Produksi Protein Rekombinan *SoSPS1* pada Sel Bakteri *E. coli* strain BL21

Koloni tunggal *E. coli* BL21 (DE3) positif transforman ditumbuhkan dalam 20 ml Luria Broth (LB) yang mengandung 20 µg/ml ampisilin dan diinkubasi *overnight* pada suhu ruang (kultur *starter*). Kemudian sebanyak 10 ml kultur *starter* ditumbuhkan pada 50 ml LB yang mengandung 50 µg/ml ampisilin dan 0.05 mM *isopropil β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG). Setelah itu diinkubasi *overnight* pada suhu 20°C. Sel-sel bakteri dipanen dengan sentrifugasi pada 6000 rpm selama 5 menit pada 4°C (Sawitri *et al.*, 2016). Supernatant hasil sentrifugasi dibuang dan pellet sel bakteri digunakan untuk ekstraksi protein.

3.3.5 Ekstraksi Protein Rekombinan *SoSPS1*

Pellet yang diperoleh ditambah buffer ekstraksi [50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl, 1 mM EDTA]. Selanjutnya dilakukan sonikasi sebanyak 280 siklus dan disentrifugasi pada suhu 4°C selama 20 menit dengan

kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang dihasilkan dimurnikan menggunakan pemurnian his-tag.

3.3.6 Purifikasi Protein Rekombinan SoSPS1 menggunakan resin DE52 dan Ni-NTA

Supernatan yang diperoleh (sampel protein *soluble*) dilewatkan pada kolom yang berisi resin DE52 (*anion exchanger*) yang telah diekuilibrasikan menggunakan buffer ekstraksi. Larutan yang keluar ditampung (protein target) dalam wadah dan ditambah buffer A [50 mM Tris HCl dan 10% gliserol]. Kemudian dilewatkan dalam kolom berisi resin DE52 baru. Campuran dalam kolom dicuci dengan buffer A. Setelah itu protein target yang terikat pada resin dielusi menggunakan buffer B [50 mM Tris HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl]. Larutan yang keluar dari kolom ditampung untuk dilakukan purifikasi lanjutan.

Larutan hasil purifikasi resin DE52 dipurifikasi lanjut dengan resin Ni-NTA. Sebelum digunakan resin Ni-NTA diekuilibrasikan dengan buffer B. Kemudian sampel dimasukkan dalam kolom dengan perbandingan sampel dan resin (1:1). Larutan yang keluar dari kolom (protein tidak terikat) ditampung dalam *epENDORF*. Setelah itu, campuran dalam kolom dicuci secara bertahap dengan menggunakan buffer B yang ditambah 10 mM, 20 mM, dan 30 mM imidazol untuk menghilangkan kontaminan yang ada dalam sampel. Kontaminan juga ditampung dalam *epENDORF*. Protein murni yang telah terikat pada resin Ni-NTA dielusi dengan menggunakan buffer elusi [50 mM Tris HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl dan 100 mM imidazol] dan ditampung dalam wadah untuk dilakukan analisis.

3.3.7 Analisis *Western Blot*

a. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Gel yang digunakan untuk analisis SDS-PAGE ada 2 macam yaitu *separating gel* dan *stacking gel*. *Separating gel* dibuat dengan konsentrasi akrilamida 10% dengan stok 30% akrilamida 3125 μ l, 2750 μ l Tris-HCl pH 8,8, 75 μ l SDS 10%, 75 μ l ammonium persulfat (APS) dan 625 μ l N, N, N', N'-

tetramethylethylenediamine (TEMED), akuabides 1505 μl . Sedangkan *stacking gel* dibuat dengan stok 30% akrilamida 450 μl , 380 μl 1 M Tris-HCl pH 6.8, 30 μl SDS 10%, 30 μl APS, 5 μl (TEMED) dan akuabides 2110 μl . Sampel protein rekombinan ditambah buffer loading dengan perbandingan 1:1, kemudian didenaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit. 10-20 μl sampel yang sudah didenaturasi dimasukkan ke dalam sumuran gel dan dilakukan elektroforesis pada 70 volt selama 2,5 - 3 jam.

b. Transfer ke membran *Polyvinylidene Difluoride* (PVDF)

Protein yang telah dipisahkan dengan SDS-PAGE ditransfer ke membrane PVDF dengan dialiri listrik (250 mA) selama 2 jam. Kemudian membran dicuci dengan TBS (*Tris Buffered Saline*) sebanyak 3 kali masing-masing selama 10 menit. Setelah dicuci, dilakukan *blocking* dengan cara merendam membran pada 1% skim milk dalam TBS selama 30 menit.

c. Deteksi protein rekombinan SoSPS1 dengan immunoblotting

Deteksi protein rekombinan SoSPS1 dilakukan dengan memberikan antibodi poliklonal SPS pada membran dan diinkubasi shaker *overnight*. Membran dicuci dengan TBS sebanyak 3 kali masing-masing 10 menit. Kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder *rabbit* yang telah ditambahkan pada skim milk dalam TBS selama 1 jam. Membran dicuci kembali dengan TBS 3 kali masing-masing 10 menit. Setelah itu, dilakukan pewarnaan dengan 25 μl BCIP dan 50 μl NBT yang dilarutkan dalam 10 ml buffer alkalin phospat.

3.3.8 Uji Aktivitas Enzim

Aktivitas protein rekombinan sebagai suatu katalisator (enzim) ditentukan dengan melihat aktivitasnya dalam merubah substrat menjadi produk. Protein rekombinan SoSPS1 yang berhasil diisolasi (50 μl) direaksikan dengan *assay buffer* (50 mM Hepes-NaOH pH 7.5, 20 mM F6P dan 20 mM UDP-G). Campuran tersebut diinkubasi pada 25°C selama 10 menit. Reaksi enzim dengan substrat dihentikan dengan menambahkan 35 μl 1 M NaOH dan dilakukan inkubasi pada 95°C selama 10 menit untuk mendegradasi F6P yang tidak bereaksi. Untuk menentukan sukrosa yang dihasilkan dari reaksi enzim adalah dengan

menambahkan 125 μl 0,1% (w / v) resolcinol dalam etanol 95% dan 375 μl 30% (w/v) HCl pada sampel. Kemudian dipanaskan pada 95°C selama 5 menit. Diukur absorbansinya menggunakan *plate microtiter reader* pada panjang gelombang 520 nm (Sawitri *et al.*, 2016).



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan studi bioinformatika ditemukan dua asam amino yang diduga berperan dalam fungsi katalitik enzim SoSPS1 yaitu R496 dan D498. Dugaan terkait kedua asam amino tersebut telah dikonfirmasi lanjutan dengan dilakukan analisis *Western blot* dan uji aktivitas enzim. Rekombinan SoSPS1 menunjukkan pola ekspresi protein yang sama dengan kontrol positif (ΔN). Namun hasil uji aktivitas enzim menunjukkan R496A dan D498A memiliki aktivitas lebih rendah daripada kontrol positif (ΔN). Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa keduanya adalah asam amino penting dalam fungsi katalitik enzim SoSPS1.

5.2 Saran

Sisi aktif enzim SoSPS1 masih belum jelas diketahui karena pada penelitian ini hanya dilakukan substitusi satu asam amino untuk setiap rekombinan. Efek yang ditimbulkan dari metode mutasi ini masih terbatas pada peranan asam amino yang bekerja sendiri-sendiri dalam mengikat substrat dan tidak secara berkesinambungan dengan asam amino lain. Oleh karena itu perlu adanya konfirmasi lanjutan dengan melakukan mutasi dua atau lebih asam amino yang menjadi kandidat dan berperan dalam fungsi katalitik enzim SoSPS1.

DAFTAR PUSTAKA

- Amman, E., J. Brosius and M. Ptashne. 1983. Vectors Bearing a Hybrid trp-lac promoter Useful for Regulated Expression of Cloned Genes in *Escherichia coli*. *Gene*. 25: 167-178.
- Barker, L., C. Kühn, H. Hellmann, A. Weise, W. Schulze, A. Schulz, J. M. Ward, C. Gebhardt, B. Hirner, and W. B. Frommer. 2000. SUT2, a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *The Plant Cell*. 12: 1153–1164.
- Bell, C. E. dan Lewis, M. 2000. A Closer View of The Conformation of Lac Repressor Bound to Operator. *Nature Structural Biology*. 7 (3): 209-214.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer. 2007. *Biochemistry*. Sixth Edition. New York: W.H. Freeman and Company.
- Brosius, J., M. Erfie and J. Storella. 1985. Spacing of the -10 and -35 Regions in The tac Promoter- Effect on Its in vivo Activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 260 (6): 3539-3541.
- Brown, T. A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis*. Sixth Edition. Hong Kong: Graphcraft Limited.
- Castleden, C. K., N. Aoki, V. J. Gillepsie, E. A. MacRae, W. P. Quick, P. Buchner, C. H. Foyer, R. T. Furbank, and J. E. Lunn. 2004. Evolution and Function of the Sucrose-Phosphate Synthase Gene Families in Wheat and Other Grasses. *Plant Physiology*. 135: 1753–1764.
- Chua, T. K., J. M. Bujnicki, T. C. Tan, F. Huynh, B. K. Patel, and J. Sivaraman. 2008. The Structure of Sucrose Phosphate Synthase from *Halothermothrix orenii* Reveals Its Mechanism of Action and Binding Mode. *The Plant Cell*. 20 : 1059-1072.
- Collins, T., J. A. Silva, A. D. Costa, F. Branca, R. Machado and M. Casal. 2013. Batch Production of a Silk-elastin-like Protein in *E.coli* BL21(DE3): Key Parameters for Optimization. *Microbial Cell Factories*. 12: 1-16.
- Cumino, A., L. Curatti, L. Giarrocco, and G. L. Salerno. 2002. Sucrose Metabolism: Anabaena Sucrose Phosphate Synthase and Sucrose Phosphate Phosphatase Define Minimal Functional Domains. *FEBS Letters*. 517: 19-23.
- Daber, R., S. Stayrook, A. Rosenberg dan M. Lewis. 2007. Structural Analysis of Lac Repressor Bound to Allosteric Effectors. *J. Mol. Biol.* 370: 609-619.

- DeLano, W. L. 2002. *The PyMOL Molecular Graphics System*. San Carlos, California: Delano Scientific.
- De La Campa, A. G., S. S. Springhorn, P. Kale, and S. A. Lacks. 1988. Proteins Encoded by the DpnI Restriction Gene Cassette: Hyperproduction and Characterization of The DpnI Endonuclease. *The Journal of Biological Chemistry*. 263 (29): 14696-14702.
- Grodberg, J. and Dunn, J. J. 1988. ompT Encodes the Escherichia coli Outer Membrane Protease That Cleaves T7 RNA Polymerase during Purification. *Journal of Bacteriology*. 170 (3): 1245-1253.
- Higgins, S. J. and Hames, B. D. 1999. *Protein Expression – A Practical Approach*. New York : Oxford University Press.
- Huber, S. C. and Huber, J. L. 1996. Role and Regulation of Sucrose-Phosphate Synthase in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 431-444.
- Janknecht, R., G. D. Martynoff, J. Lou, R. A. Hipskind, A. Nordheim dan H. G. Stunnenberg. 1991. Rapid and Efficient Purification of Native Histidine-Tagged Protein Expressed by Recombinant Vaccinia Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 8972-8976.
- Janson, Jan-Christer. 2011. *Protein Purification*. Third Edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Kunkel, T. A. 1985. Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis without Phenotypic Selection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82 (2): 488-492.
- Lefevre, F., M. H. Remy and J. M. Masson. 1997. Alanine-Stretch Scanning Mutagenesis: A Simple and Efficient Method to Probe Protein Structure and Function. *Nucleic Acids Research*. 25 (2): 447-448.
- Mulligan, M. E., J. Brosius and W. R Meclure. 1985. Characterization in Vitro of the Effect of Spacer Length on Activity of *Escherichia coli* RNA Polymerase at the TAC Promoter. *The journal of Biological Chemistry*. 260 (6): 3529-3538.
- Marchler-Bauer, A., Y. Bo, L. Han, J. He, C. J. Lanczycki, S. Lu, F. Chitsaz , M. K. Derbyshire, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, F. Lu, G. H. Marchler, J. S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R. A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng, L. Y. Geer, and S. H. Bryant. 2017. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleid Acid Research*. 45.

- Nelson, D. L. and M. M. Cox. 2005. *Lehninger Principle of Biochemistry* (4th Edition). New York: W.H. Freeman and Company.
- Robinchon, C., J. Luo, T. B. Causey, J. S. Banner and J. C. Samuelson. 2011. Engineering *Escherichia coli* BL21 (DE3) Derivative Strains To Minimize *Escherichia coli* Protein Contamination after Purification by Immobilizes Metal Affinity Chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (13): 4634-4646.
- Rosano, G. L. dan E. A. Ceccarelli. 2014. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*: Advances and Challenges. *Frontiers in Microbiology*.
- Saeed, H. M., T. I. Zaghloul, A. I. Khalil dan M. T. Abdelbaeth. 2006. Molecular Cloning and Expressions in *Escherichia coli* of *Pseudomonas aeruginosa* lipase gene. *Biotechnology*. 5(1): 62-68.
- Salerno, G. L. and Curatti, L. 2003. Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why?. *TRENDS in Plant Science*. 8 (2): 63-69.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual Second Edition*. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawitri, W. D., H. Narita, E. Ishizaka-Ikeda, B. Sugiharto, T. Hase, and A. Nakagawa. 2016. Purification and Characterization of Recombinant Sugarcane Sucrose Phosphate Synthase Expressed in *Escherichia coli* and Insect Sf9 Cells: An Importance of The N-Terminal Domain for An Allosteric Regulatory Property. *Jurnal Biochem*. 159 (6): 599–607.
- Schumann, W. Carlos and L. S. Ferreira. 2004. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*. 27: 442-453.
- Sheng, F., X. Jia, A. Yep, J. Preiss, and J. H. Geiger. 2009. The Crystal Structures of the Open and Catalytically Competent Closed Conformation of *Escherichia coli* Glycogen Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (26) : 17796–17807.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineem, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson and D. G. Higgins. 2011. Fast, Scalable Generation of High-quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega. *Molecular System Biology*. 7 (539).
- Smith, Caitlin. 2007. Cloning and Mutagenesis: Tinkering With The Order of Things. *Nature Methods*. 4 (5): 455-461.

- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. 1986. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *Jurnal. Mol. Biol.* 189: 113-130.
- Sugiharto, B., H. Sakakibara, Sumadi and T. Sugiyama. 1997. Differential Expression of Two Genes for Sucrose-Phosphate Synthase in Sugarcane: Molecular Cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression. *Plant Cell Physiol.* 38 (8): 961-965.
- Wu, R., M. D. A. Diez, C. M. Figueroa, M. Machtey, A. A. Iglesias, M. A. Ballicora, and D. Liu. The Crystal Structure of *Nitrosomonas europaea* Sucrose Synthase Reveals Critical Conformational Changes and Insights into Sucrose Metabolism in Prokaryotes. *Jurnal of Bacteriology.* 197 (17) : 2734-2746.
- Zhang, Z., G. Kuipers, L. Niemiec, T. Baumgarten, D. J. Slotboom, J. D. Gier and A. Hjelm. 2015. High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. *Microb Cell Fact.* 14: 1-11.
- Zheng, Y., S. Anderson, Y. Zhang, and R. M Garavito. 2011. The Structure of Sucrose Synthase-1 from *Arabidopsis thaliana* and Its Functional Implications. *The Journal of Biological Chemistry.* 286(41) : 36108–36118.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Primer yang digunakan untuk *Site-directed Mutagenesis* cDNA SoSPS1

1. S495 → S495A

(UCA) (GCA)

F → 5'- GATGATCCTCGCGTTG**GC**CAAGGCCAGACCCGAAG -3'

R → 5'- CTTCTTCGGGTCTGGCCT**TG**CCAACGCGAGGATCATC -3'

%GC = (21/34)100% = 61.7%

%mismatch = (1/34)100% = 2.9%

Tm = 84.05 °C

2. R496 → R496A

(AGG) (GCG)

F → 5'- GATCCTCGCGTTGTCA**GC**CCAGACCCGAAGAAG -3'

R → 5'- CTTCTTCGGGTCTGG**CG**CTGACAACGCGAGGATC -3'

%GC = (21/34)100% = 61.7%

%mismatch = (2/34)100% = 5.88%

Tm = 81.06 °C

3. P497 → P497A

(CCA) (GCA)

F → 5'- CCTCGCGTTGTCAAGG**GC**AACCCGAAGAAGAAGAAC-3'

R → 5'- GTTCTTCTTCGGGTCT**TG**CCCTTGACAACGCGAGG -3'

%GC = (20/34)100% = 58.8%

%mismatch = (1/34)100% = 2.9%

Tm = 82.75 °C

4. D498 → D498A

(GAC) (GCC)

F → 5'- CGCGTTGTCAAGGCCAG**GC**CCGAAGAAGAAGAACATC -3'

R → 5'- GATGTTCTTCTTCGG**GC**CTGGCCTTGACAACGCG -3'

%GC = (20/34)100% = 58.8%

%mismatch = (1/34)100% = 2.9%

Tm = 82.75 °C

Lampiran 2. Tabel Perhitungan Uji Aktivitas Enzim

| Sampel | abs (OD = 520 nm) | | Sukrosa (µg) | | Protein (µg) | µg sukrosa/µg enzyme | | µg sukrosa/µg protein/ menit | | Rata2 |
|--------|-------------------|-------|--------------|--------|--------------|----------------------|-------|------------------------------|-------|-------|
| Vector | 0.210 | 0.210 | -0.041 | -0.041 | -0.236 | 0.175 | 0.175 | 0.018 | 0.018 | 0.018 |
| ΔN | 1.550 | 1.559 | 9.200 | 9.262 | 2.298 | 4.003 | 4.030 | 0.400 | 0.403 | 0.402 |
| S495A | 1.110 | 1.196 | 6.166 | 6.759 | 0.986 | 6.253 | 6.855 | 0.625 | 0.685 | 0.655 |
| R496A | 0.250 | 0.240 | 0.234 | 0.166 | 0.434 | 0.540 | 0.381 | 0.054 | 0.038 | 0.046 |
| P497A | 1.079 | 1.094 | 5.952 | 6.055 | 0.986 | 6.036 | 6.141 | 0.604 | 0.614 | 0.609 |
| D498A | 0.234 | 0.241 | 0.124 | 0.172 | 0.313 | 0.397 | 0.551 | 0.040 | 0.055 | 0.047 |

