



PEMURNIAN ENZIM SEFALOSPORIN-C ASILASE DAN OPTIMASI PROSES KROMATOGRAFI PENUKAR ION

Purification of Cephalosporin-C Acylase and Its Optimization of Ion-Exchange Chromatography

Uli Julia Nasution^{1*}, Silvia Melinda Wijaya², Ahmad Wibisana¹, Anna Safarrida¹, Indra Rachmawati¹, Dian Japany Puspitasari¹, Sidrotun Naim², Anis Herliyanti Mahsunah¹, Sasmito Wulyoadi¹, Suyanto¹

¹Balai Bioteknologi, BPPT. Gedung 630 Kawasan Puspipetek, Setu, Tangerang Selatan 15314
²Universitas Surya, Grand Serpong Mall Lt. 1 unit F8 & F9, Jl. M.H. Thamrin Km 2.7, Panunggangan Utara, Pinang, Kota Tangerang, Banten 15143
*Email: uli.julia@bppt.go.id

ABSTRACT

Cephalosporin-C acylase (CCA) has an important role in the one-step conversion of cephalosporin-C into 7-ACA. Purification process aims to increase specific activity of CCA enzyme. Purification began with cell lysis, ammonium sulphate precipitation, dialysis, ion exchange chromatography (IEC) and size exclusion chromatography. IEC optimization of elution step was also done to compare gradient and isocratic elution. Purification was capable to increase the enzyme purity upto 33.66 fold, with specific activity of 3.00 U/mg and the yield reached 41.41%. Optimization of elution during IEC showed that isocratic protein elution was more efficient (taking shorter time, 3 column volume (CV) only) than that of gradient batch (up to 9 CV). SDS-PAGE analysis demonstrated that the recombinant CCA enzyme existed in two types, active enzyme containing α -subunit (25 kDa) and β -subunit (58 kDa), and inactive enzyme (83 kDa) as precursor. Furthermore, 30% ammonium sulphate saturated precipitation was able to precipitate this inactive CCA.

Keywords: 7-ACA, CCA, cephalosporin C, protein purification, specific activity

ABSTRAK

Sefalosporin-C asilase (CCA) merupakan enzim yang berperan penting dalam konversi satu tahap sefalosporin-C menjadi 7-ACA. Proses purifikasi merupakan salah satu cara untuk meningkatkan aktivitas spesifik enzim CCA. Proses purifikasi dimulai dari memecah sel, diikuti dengan tahap presipitasi menggunakan amonium sulfat, dialisis, kromatografi penukar ion (IEC) dan kromatografi eksklusi. Optimasi proses IEC pada tahap elusi juga dilakukan untuk membandingkan elusi enzim CCA secara gradien dan isokratik. Proses purifikasi pada penelitian ini mampu meningkatkan kemurnian enzim hingga 33,66 kali, dengan aktivitas spesifik sebesar 3,00 U/mg dan perolehan enzim sebesar 41,41%. Hasil optimasi IEC pada proses elusi secara isokratik lebih efisien dari segi waktu (hanya membutuhkan 3 kolom volume (CV) dibandingkan dengan secara gradien (sampai 9 CV). Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa CCA rekombinan merupakan enzim dengan 2 macam bentuk yaitu enzim aktif, yang terdiri dari subunit α (25 kDa) dan β (58 kDa), dan enzim tidak aktif berupa prekursor (83 kDa). Proses presipitasi menggunakan amonium sulfat 30% tersaturasi dapat mengendapkan prekursor CCA.

Kata Kunci: 7-ACA, aktivitas spesifik, CCA, purifikasi protein, sefalosporin C

PENDAHULUAN

7-Aminocephalosporanic acid (7-ACA) merupakan senyawa antara yang paling penting untuk membuat antibiotik sefalosporin semi-sintetis dengan spektrum yang luas (Gaurav et al. 2010; Kong et al. 2009), yang dapat dihasilkan dari proses kimiawi atau proses enzimatik. Proses kimiawi memberikan hasil 90%, namun metodenya rumit, tidak ekonomis dan tidak ramah lingkungan dengan penggunaan bahan kimia berbahaya dan pelepasan limbah beracun (Shin et al. 2009; Wang et al. 2012). Maka dari itu, metode kimiawi (Fechtig et al. 1968; Morin et al. 1969) telah digantikan dengan metode enzimatik (Parmar et al. 1998) yang lebih diterima sebagai metode yang ekonomis dan ramah lingkungan (Jobanputra dan Vasait 2015). Proses enzimatik produksi 7-ACA ada 2 macam yaitu proses 2 tahap yang melibatkan 2 macam enzim dan proses 1 tahap yang melibatkan 1 enzim (Pollegioni et al. 2013). Sefalosporin-C asilase (*Cephalosporin-C Acylase/CCA*) merupakan enzim asilase β -laktam yang dapat memotong ikatan amida yang berada diantara inti β -laktam dan rantai samping tanpa merusak cincin siklik β -laktam dari senyawa sefalosporin C (Cep-C) menjadi senyawa 7-ACA (Gaurav et al. 2010). CCA termasuk dalam protein multimerik dengan subunit heterogen atau heterodimer alpha-beta (He et al. 2015). Proses biokonversi menggunakan enzim CCA merupakan proses deasilasi dan merupakan proses 1 tahap yang hanya melibatkan satu macam enzim. Namun, aktivitas enzim CCA terhadap substrat Cep-C sangat rendah (Conti et al. 2014) sehingga penelitian untuk meningkatkan aktivitas enzim CCA banyak dilakukan.

Purifikasi atau pemurnian enzim merupakan salah satu cara untuk meningkatkan aktivitas spesifik enzim CCA. Beberapa metode purifikasi yang dapat dilakukan diantaranya adalah presipitasi dengan amonium sulfat dan dialisis. Pada penelitian ini, presipitasi amonium sulfat dilakukan untuk mengendapkan pengotor dan menjaga enzim CCA tetap dalam keadaan terlarut, dengan menambahkan sedikit garam amonium sulfat. Proses ini disebut *salting in*. Proses presipitasi dengan

amonium sulfat sebaiknya diikuti dengan proses dialisis yang dapat menghilangkan sisa garam amonium sulfat dalam sampel (Duong-Ly dan Gabelli 2014).

Kromatografi penukar ion (*ion exchange chromatography/IEC*) dan kromatografi eksklusi (*size exclusion chromatography/SEC*) juga merupakan salah satu cara untuk memurnikan enzim. Proses ini memisahkan protein berdasarkan pada muatan ion permukaannya, menggunakan resin yang dimodifikasi dengan gugus kimia bermuatan positif (*anion exchanger*) atau negatif (*cation exchanger*) (Tan dan Yiap 2009). Proses ini biasanya cukup efektif pada tahap awal purifikasi (Robinson 2015). Sementara itu, SEC merupakan proses pemisahan protein berdasarkan ukurannya. Proses ini merupakan proses pemisahan yang paling sederhana, karena sampel tidak berikatan dengan media sehingga komposisi buffer tidak mempengaruhi resolusi (Tan dan Yiap 2009). Karena sampel tidak berikatan dengan media dan prosesnya yang tidak memerlukan garam, SEC dapat digunakan untuk menghilangkan sisa garam (Block et al. 2009) dari proses purifikasi sebelumnya dan tidak akan mempengaruhi proses purifikasi selanjutnya. Proses kromatografi afinitas juga dapat dilakukan untuk memurnikan enzim. Namun, proses ini membutuhkan resin yang harganya tergolong lebih mahal dibandingkan resin IEC maupun SEC. Selain itu, proses ini membutuhkan garam berkonsentrasi tinggi yang dapat mengganggu proses purifikasi selanjutnya (Cheung et al. 2012).

Escherichia coli adalah bakteri yang populer digunakan dalam produksi protein rekombinan termasuk enzim rekombinan (Rosano dan Ceccarelli 2014). Saat ini enzim CCA dapat diproduksi menggunakan sistem ekspresi *E. coli* rekombinan yang menghasilkan enzim CCA rekombinan. CCA non-rekombinan memiliki aktivitas yang rendah terhadap substrat Cep-C (bervariasi dari 0-4% relatif terhadap GL-7-ACA) (Xiao et al. 2014). CCA yang aktif terhadap Cep-C telah ditemukan pada beberapa mikroorganisme dan beberapa gen CCA telah diklon dan disekuens. Namun, CCA tersebut tidak cukup aktif untuk menghidrolis ikatan amida pada posisi ke-7 dari Cep-C, maka tidak cocok untuk proses enzimatik 1

tahap untuk mendapatkan 7-ACA dari Cep-C. Beberapa studi genetik telah dilakukan untuk meningkatkan aktivitas CCA terhadap Cep-C (Shin et al. 2009). Sebagai contoh, 2 mutan penghasil CCA dari *Pseudomonas* N176, M31 β F / H57 β S / H70 β S dan A215 α Y/ M31 β F/H70 β S, masing-masing menunjukkan 3,3 kali dan 4,3 kali peningkatan aktivitas spesifik terhadap CPC, dibandingkan dengan *template* awalnya (M31 β F), dengan penghapusan inhibisi substrat dan pengurangan inhibisi produk (Xiao et al. 2014). Contoh lainnya adalah mutan penghasil CCA *acyII* dari *Pseudomonas* SE83, V122 α A / G140 α S / F58 β N/I75 β T / I176 β V/S471 β C (disebut juga S12) yang menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik sebesar 7,5 kali lipat jika dibandingkan dengan *wild-type* (Xiao et al. 2014; Shin et al. 2009).

Salah satu cara untuk meningkatkan aktivitas spesifik enzim CCA rekombinan adalah dengan memurnikan enzim dan melibatkan beberapa tahap purifikasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan purifikasi enzim CCA yang dihasilkan oleh *E. coli* BL21(DE3)/S12 dan melakukan optimasi pada tahap kromatografi penukar ion.

BAHAN DAN METODE

Bahan kimia

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Luria Broth (LB) cair dan agar media (Trypton 1% (Oxoid™), NaCl 1% (Merck), *yeast extract* 0,5% (Oxoid™), agar 2% (Oxoid™); NaOH 1 N (Merck); *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) (Thermo Scientific™), ampicilin (MP Biomedicals); *phenylmethane sulfonyl fluoride* (PMSF) (MP Biomedicals); Tris (Bio Basic Canada); HCl (Merck); amonium sulfat (Merck); NaCl (Merck); Etanol 96%; *Coomasie brilliant blue* R250 (Merck), metanol (Merck), asam asetat (Merck); *mercaptoethanol* (Bio Basic Canada); gliserol (Merck), bromophenol blue (ACS); Cephalosporin-C (Biorbyt); 7-Amino Cephalosporanic Acid (Tokyo Chemical Industry Ltd.); *para*-Dimethylaminobenzaldehyde (PDMAB); Pierce™ *Coomasie Plus* (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific™); Diethylaminoethanol Sepharose Fast Flow (DEAE Sepharose FF).

Preparasi media pertumbuhan bakteri

Untuk regenerasi dan pemeliharaan mikroba, bakteri penghasil CCA ditumbuhkan dalam media LB agar dengan komposisi (g/L): 10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g *yeast extract* dan 20 g agar. Kemasaman pH diatur menjadi 7,5 dengan NaOH 1 N. Media disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. Sebanyak 100 μ g/mL larutan Ampisilin dengan konsentrasi 100 mg/mL ditambahkan ke dalam media setelah suhu turun menjadi \pm 55°C. Sebagai media untuk pembuatan inokulum digunakan media LB cair dengan komposisi yang sama seperti media regenerasi/pemeliharaan tanpa penambahan agar.

Bakteri dan fermentasi CCA

Bakteri *E. coli* BL21(DE3), hasil transformasi dengan gen S12 dalam plasmid pET21a, digunakan untuk memproduksi enzim CCA rekombinan. Gen S12 merupakan hasil modifikasi gen *Acy II* dari *Pseudomonas* SE83. Produksi CCA dilakukan mengacu pada metode Martius et al. (2018) dengan sedikit modifikasi. Koloni tunggal dari *E. coli* yang telah diregenerasi selama 18 jam ditumbuhkan pada 5 mL media LB yang mengandung ampicilin 100 μ g/mL dan dikultivasi dalam *orbital shaker* dengan kecepatan 200 rpm dan suhu 37°C. Setelah itu, kultur *overnight* sebanyak 1% diinokulasikan pada 50 mL media LB dan diinkubasi selama 2 jam, suhu 37°C dan kecepatan 200 rpm, menggunakan *New Brunswick™ Innova® 44 incubator orbital shaker*. Induksi IPTG sebanyak 0,8 mM dilakukan jika nilai absorbansi sel OD₆₀₀ telah mencapai 0,4-0,8. Inkubasi kembali dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm.

Purifikasi enzim: presipitasi dan dialisis

Sel dari 50 mL media fermentasi dipanen dan dipisahkan antara supernatan dan sel dengan cara mensentrifugasi kultur fermentasi menggunakan sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet sel yang telah dipisahkan dari supernatannya dicuci dengan buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 sebanyak 1 kali. Pelet diresuspensi dengan 5 mL Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 dan ditambahkan PMSF sebanyak 1 mM. Sel dipecah (*lysis*) menggunakan alat *Branson Ultrasonic Sonifier™ S-450* dengan

kondisi *pulse ON* 5 detik, *pulse OFF* 20 detik, amplitudo 25%, *pulse temperature* 10°C, suhu maksimum 20°C, selama 5 menit. Suspensi hasil lisis disentrifugasi pada suhu 4°C, kecepatan 12.000 rpm, selama 20 menit. Supernatan dipisahkan dari pelet pecahan sel. Pelet diresuspensi dengan buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 menjadi 5 mL dan disimpan dalam pendingin suhu -20°C untuk pengecekan enzim CCA yang masih menempel di pecahan sel.

Supernatan hasil lisis dipresipitasi menggunakan amonium sulfat dengan konsentrasi akhir 30% tersaturasi. Pengadukan larutan dilakukan dalam ruang dingin selama 45 menit menggunakan alat *Stuart® Stirrer Hotplate CB162* dan kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dari peletnya. Pelet diresuspensi dengan buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 menjadi 5 mL dan disimpan dalam suhu -20°C.

Supernatan hasil presipitasi didialisis menggunakan filter *Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units* Molecular Weight Cut_off (MWCO) 50.000 Da dengan melakukan sentrifugasi pada suhu 4°C, kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit.

Pemurnian via kromatografi penukar ion

Sebanyak 10 mL larutan hasil dialisis dicampur dengan resin DEAE Sepharose FF yang telah diekuilibrasi dengan buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 dalam tabung Falcon dan diinkubasi dalam *shaker (Stuart® Mini Orbital Shaker SSM-1)* dengan kecepatan 100 rpm selama satu malam (16 jam). Campuran resin dan sampel yang telah diinkubasi dimasukkan ke dalam kolom dan dibiarkan ±30 menit. Selanjutnya dilakukan pencucian resin dengan Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 yang mengandung 50 mM NaCl sebanyak 5 CV (*column volume*).

Setelah dilakukan pencucian resin, enzim CCA yang terikat pada resin dielusi menggunakan dua metode, yaitu metode elusi secara bertahap (*batch step wise*) dan cara isokratik. Elusi secara bertahap dilakukan dengan menggunakan eluen buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 yang mengandung NaCl dengan konsentrasi 100, 150, 200 dan 300 mM. Setiap elusi dilakukan menggunakan volume eluen sebanyak 3 CV. Elusi secara isokratik dilakukan menggunakan buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 dan

mengandung NaCl 200 mM sebanyak 3 CV. Fraksi hasil elusi ditampung setiap 3 hingga 4 mL. Fraksi yang mengandung enzim CCA digabung untuk proses pemurnian selanjutnya. Pencucian resin selanjutnya dilakukan menggunakan NaCl 2 M sebanyak 5 CV untuk menghilangkan sisa protein yang masih terikat sehingga resin dapat digunakan untuk proses pemurnian berikutnya.

Pemurnian via kromatografi eksklusi

Sampel hasil IEC dimasukkan ke dalam kolom berisi Sephadex G-50 yang telah diekuilibrasi. Elusi dilakukan dengan Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 sebanyak 1 CV dan fraksi ditampung setiap 4 mL.

Analisis aktivitas enzim

Aktivitas enzim CCA ditentukan dengan mengukur jumlah senyawa 7-ACA yang terbentuk sebagai hasil hidrolisis senyawa Cep-C oleh enzim CCA. Larutan enzim dan substrat Cep-C yang digunakan, masing-masing diinkubasi terlebih dahulu ke dalam *waterbath* sehingga suhunya mencapai 37°C. Sebanyak 25 µL larutan substrat Cep-C 2% dimasukkan ke dalam *mikrotube* dan ditambahkan dengan 25 µL larutan enzim sehingga terjadi reaksi hidrolisis. Reaksi hidrolisis dilakukan selama 10 menit dan suhu dipertahankan pada 37°C. Selanjutnya, sampel diinkubasi dalam *waterbath* sehingga suhunya 37°C selama 10 menit. Reaksi hidrolisis dihentikan dengan menambahkan 300 µL larutan stop reaksi. Larutan hasil hidrolisis yang telah dihentikan reaksinya selanjutnya ditambah dengan 50 µL PDMAB 0,5% untuk pewarnaan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Selanjutnya larutan disentrifugasi pada suhu 4°C, pada kecepatan 10.000 rpm selama 3 menit. Sebanyak 100 µL supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam *microplate* 96-sumur, dan selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 415 nm menggunakan *Microplate Reader*. Satu unit aktifitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 7-ACA sebanyak 1 µmol pada suhu 37°C per menit.

Analisis protein via Bradford Assay

Konsentrasi protein dalam sampel diukur menggunakan metode *Bradford Assay*, sesuai dengan prosedur dari *Thermo Scientific™*. Sampel disiapkan dengan



Gambar 1. Kolom Sephadex G-50 (kiri), kolom DEAE Sepharose FF (tengah), hasil elusi IEC fraksi 2-6 (kanan)

menambahkan 45 μL sampel ke dalam 2.250 μL *Coomassie Protein Assay Reagent* dan selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Absorbansi sampel selanjutnya diukur pada panjang gelombang 595 nm. Sebagai blanko digunakan buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0 untuk menggantikan sampel dan sebagai larutan standar digunakan *Protein Bovine Serum Albumin* (BSA).

Analisis SDS-PAGE

Elektroforesis gel poliakrilamida (SDS-PAGE) dilakukan menurut Laemmli (1970) menggunakan protokol Bio-Rad Protean II gel apparatus. Gel SDS PAGE 10% digunakan untuk menganalisa protein hasil pemurnian. Sampel dilarutkan dalam 6 \times *loading sample buffer* (Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) 75%, gliserol 63%, SDS 9%, dan bromophenol blue 0,03% dalam DW). β -mercaptoethanol ditambahkan sebanyak 3% ke dalam setiap sampel. Elektroforesis dilakukan menggunakan *running buffer* (Tris 0,3%, glisin 0,14%, dan SDS 0,1% dalam DW) dengan alat ATTO AE-6500 Dual Mini Slab, pada 30-40 mA selama 1,5 jam. Pewarnaan gel untuk visualisasi pita protein pada gel dilakukan menggunakan *Coomassie blue R250 staining solution*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Purifikasi Sefalosporin-C Asilase

Purifikasi enzim adalah proses yang bertujuan untuk meningkatkan kemurnian enzim yang dinyatakan sebagai aktivitas spesifik enzim. Kemurnian enzim ini penting karena adanya beberapa senyawa kontaminan yang dapat mempengaruhi kerja enzim, misalnya menghambat aktivitas enzim (*inhibitor*) atau memiliki kemampuan

yang mirip dengan enzim target namun menghasilkan produk yang berbeda atau tidak diinginkan.

Purifikasi CCA diawali dengan memecah sel (*cell lysis*) dalam buffer Tris-HCl 20 mM menggunakan alat sonikator karena enzim ini berupa enzim intraselular. Pemecahan sel ditujukan untuk melepaskan protein dari sel inang menjadi bentuk terlarut (Tan dan Yiap 2009; Ma et al. 2014). PMSF 1 mM ditambahkan untuk mencegah degradasi enzim target oleh enzim protease. Pecahan sel dan pengotor dipisahkan dengan sentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit. Sebagai tahap awal pemurnian, presipitasi dilakukan dengan menambahkan amonium sulfat dengan konsentrasi 30% kejenuhan yang dilakukan pada suhu 10°C. Presipitasi dengan amonium sulfat ditujukan untuk mengendapkan zat-zat pengotor dan protein-protein kecil (Tan dan Yiap 2009; Ma et al. 2014). Larutan hasil presipitasi dipisahkan dari endapan protein dan selanjutnya didialisis untuk menghilangkan garam amonium sulfat yang tersisa pada sampel (Duong-Ly dan Gabelli 2014). Kemurnian enzim yang diperoleh meningkat 1,20 kali dengan perolehan nilai sebesar 65,97% (Tabel 1).

Pemurnian via kromatografi penukar ion

Pemisahan enzim dengan kromatografi penukar ion (IEC) menggunakan resin DEAE Sepharose FF (*anion exchanger*) dilakukan berdasarkan muatan ionik permukaannya (Gambar 1). Pada pH di atas nilai *pI* (*point of isoelectric*), maka protein akan bermuatan negatif sehingga protein akan berikatan dengan resin yang bermuatan positif (*anion exchanger*). Sebaliknya, pada pH di bawah

nilai pI, protein akan mengikat senyawa-senyawa dalam medium yang bermuatan negatif (*cation exchanger*). Protein yang berikatan lemah dengan resin akan terelusi dengan buffer yang mengandung garam berkonsentrasi rendah, sedangkan protein yang berikatan kuat dengan resin akan membutuhkan konsentrasi garam yang lebih tinggi untuk elusinya (Tan dan Yiap 2009; Tripathi 2016). Pada penelitian ini, pada proses elusi enzim CCA secara isokratik menggunakan buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8 yang mengandung NaCl sebesar 200 mM menunjukkan hasil yang lebih baik jika dibandingkan dengan elusi dengan metode gradien secara bertahap. Pada elusi isokratik kemurnian enzim secara keseluruhan (*overall fold*) meningkat 14,11 kali dengan perolehan keseluruhan (*overall yield*) sebesar 23,87% (Tabel 1). Sementara

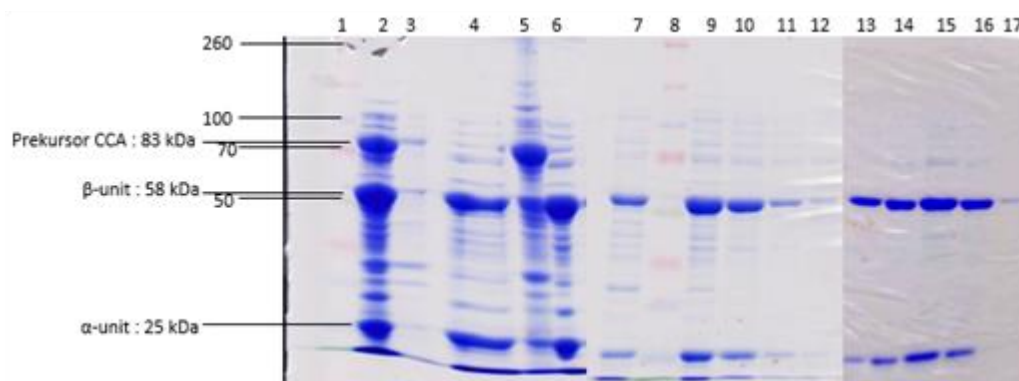
itu pada elusi *stepwise* kemurnian enzim secara proses individual meningkat sebesar 11,45 kali dengan perolehan individual sebesar 36,51% (Tabel 2). Secara individual, proses pemurnian enzim menggunakan kromatografi penukar ion menghasilkan peningkatan kemurnian sebesar 11,41 kali dan perolehan sebesar 36,51% (Tabel 1).

Pemurnian via kromatografi eksklusi

Proses purifikasi dilanjutkan dengan proses kromatografi eksklusi (SEC) dengan kolom berisi resin Sephadex G-50 (Gambar 1), yang memisahkan protein berdasarkan ukuran molekulnya. Protein yang berukuran lebih kecil akan terperangkap dalam pori-pori resin sehingga terelusi lebih lambat, sedangkan protein besar akan terelusi lebih cepat (Tan dan Yiap 2009; Tripathi 2016). Pada penelitian ini, pemurnian enzim CCA

Tabel 1. Data analisis sampel tiap tahapan purifikasi CCA yang dihasilkan oleh *E. coli* BL21(DE3)/S12

Tahapan purifikasi	Aktivitas enzim (U/mL)	Konsentrasi protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Perolehan enzim (%)	Perolehan enzim secara individual [%]	Peningkatan kemurnian/ <i>fold</i> (x)	Peningkatan kemurnian/ <i>fold</i> (secara proses individual) (x)
Supernatan hasil lisis	1,91	21,46	0,09	100,00	100,00	1,00	1,00
Supernatan presipitasi setelah didialisis	1,26	11,77	0,11	65,97	65,97	1,20	1,20
DEAE Sepharose FF (IEC)	0,46	0,36	1,26	23,87	36,51	14,11	11,45
Sephadex G-50 (SEC)	0,79	0,26	3,00	41,41	171,74	33,66	2,38



Keterangan:

- | | |
|---|--|
| 1. Marka protein | 9. Elusi IEC fraksi 3 (Tris-HCl 20 mM pH 8 + 200 mM NaCl) |
| 2. Supernatan hasil lisis | 10. Elusi IEC fraksi 4 (Tris-HCl 20 mM pH 8 + 200 mM NaCl) |
| 3. Pelet hasil lisis | 11. Elusi IEC fraksi 5 (Tris-HCl 20 mM pH 8 + 200 mM NaCl) |
| 4. Supernatan hasil presipitasi | 12. Elusi IEC fraksi 6 (Tris-HCl 20 mM pH 8 + 200 mM NaCl) |
| 5. Pelet hasil presipitasi | 13. Elusi SEC fraksi 5 |
| 6. Hasil dialisis | 14. Elusi SEC fraksi 6 |
| 7. Elusi IEC fraksi 2 (Tris-HCl 20 mM pH 8 + 200 mM NaCl) | 15. Elusi SEC fraksi 7 |
| 8. Marka protein | 16. Elusi SEC fraksi 8 |
| | 17. Elusi SEC fraksi 9 |

Gambar 2. Analisis hasil purifikasi batch 1 dengan metode SDS PAGE

Tabel 2. Perbandingan purifikasi CCA dengan metode IEC yang dilusi isokratik dan gradient secara bertahap

Tahapan purifikasi	Aktivitas enzim (U/mL)		Konsentrasi protein (mg/mL)		Aktivitas spesifik (U/mg)		Perolehan enzim (%)		Peningkatan kemurnian/ <i>fold</i> (×)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Supernatan lisis	1,91	0,76	21,46	4,51	—	0,17	100,00	100,00	—	1,00
Supernatan presipitasi dialisis	1,26	0,80	11,77	2,81	—	0,28	65,97	104,98	—	1,69
Elusi IEC :										
100 mM	—	0,08	—	0,03	—	2,49	—	9,94	—	14,77
150 mM	—	0,10	—	0,07	—	1,39	—	13,43	—	8,25
200 mM	0,46	0,14	—	0,12	1,26	1,18	23,87	18,04	14,11	6,98
300 mM	—	0,09	—	0,06	—	1,50	—	11,68	—	8,87

Keterangan: A = isokratik; B = bertahap

menggunakan kromatografi eksklusi dapat meningkatkan kemurnian enzim secara keseluruhan sebesar 33,66 kali dengan perolehan secara keseluruhan sebesar 41,41%. Secara individual, proses pemurnian enzim menggunakan kromatografi eksklusi menghasilkan peningkatan kemurnian sebesar 2,38 kali dan perolehan sebesar 171,74% (Tabel 1). Aktifitas spesifik enzim murni pada akhir proses pemurnian yang diperoleh mencapai 3,00 U/mg.

Karakterisasi awal enzim CCA

Konfirmasi hasil pemurnian enzim CCA dilakukan dengan melihat pita protein menggunakan gel SDS PAGE seperti ditunjukkan pada Gambar 2. Pada proses fermentasi dihasilkan enzim CCA dengan 2 macam bentuk yaitu enzim aktif dan enzim tidak aktif yang berupa prekursor. Kedua enzim ini mempunyai ukuran yang mirip sekitar 83 kDa. Pada proses pemurnian menggunakan amonium sulfat 30% tersaturasi, prekursor enzim CCA dapat dipisahkan (Gambar 2, lajur 4 dan 5). Prekursor enzim CCA merupakan enzim tidak aktif yang berbentuk dimer terdiri dari 2 subunit, yaitu subunit α dan β , dan masih memiliki peptida antara (*spacer peptide*) yang terdiri dari 9 asam amino dan tidak tereduksi dengan teknik SDS-PAGE terdenaturasi. Enzim CCA aktif merupakan enzim yang sudah tidak memiliki *spacer peptide*, dan terdenaturasi menjadi subunit α dan β dengan ukuran, berturut-turut, sekitar 25 dan 58 kDa pada saat analisa dengan SDS-PAGE. Pemurnian selanjutnya

menggunakan kromatografi penukar ion dan eksklusi juga menunjukkan peningkatan kemurnian enzim CCA yang ditunjukkan dengan hilangnya pita protein pengotor.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini pemurnian enzim CCA dilakukan melalui metode pengendapan dengan amonium sulfat, kromatografi penukar ion dan kromatografi eksklusi. Dengan metode pengendapan amonium sulfat diperoleh peningkatan kemurnian sebesar 1,2 kali dengan perolehan sebesar 65,97%. Pemurnian enzim dengan metode kromatografi penukar ion diperoleh peningkatan kemurnian sebesar 14,11 kali dengan perolehan sebesar 23,87%. Tahap pemurnian terakhir dilakukan dengan menggunakan kromatografi eksklusi dan diperoleh peningkatan kemurnian enzim sebesar 33,66 kali dengan perolehan sebesar 41,41%. Aktifitas spesifik enzim CCA hasil pemurnian adalah 3,00 U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J, Schafer F (2009) Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): A review. *Methods Enzymol* 463:439-473. doi:10.1016/S0076-6879(09)63027-5
- Cheung RC, Wong JH, Ng TB (2012) Immobilized metal ion affinity chromatography: A review on its applications. *Appl Microbiol Biotechnol*

- 96:1411-1420. doi: 10.1007/s00253-012-4507-0
- Conti G, Pollegioni L, Molla G, Rosini E (2014) Strategic manipulation of an industrial biocatalyst – Evolution of a cephalosporin C acylase. *FEBS J* 281:2443-2455. doi: 10.1111/febs.12798
- Duong-Ly KC, Gabelli SB (2014) Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods Enzymol* 541:85-94. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0
- Fechtig B, Peter H, Bickel H, Wischer E (1968) Concerning the preparation of 7-amino-cephalosporanic acid. *Helv Chim Acta* 51:1108-1119. doi: 10.1002/hlca.19680510513
- Gaurav K, Kundu K, Kundu S (2010) Biosynthesis of Cephalosporin-C Acylase Enzyme: Optimal Media Design, Purification, and Characterization. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 38:277-283. doi: 10.3109/10731199.2010.482036
- He H, Luo H, Li X, Wang X, Liang C, Wei YY, Shen Z (2015) Immobilization and stabilization of cephalosporin C acylase on aminated support by crosslinking with glutaraldehyde and further modifying with aminated macromolecules. *Biotechnol Prog* 31:387-395. doi: 10.1002/btpr.2044
- Jobanputra AH, Vasait R (2015) Cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* species: Production and enhancement of its activity by optimization of process parameters. *Biocatal Agric Biotechnol* 4:465-470. doi: 10.1016/j.bcab.2015.06.009
- Kong K-F, Schnepfer L, Mathee K (2009) Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* 118:1-36. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. doi: 10.1038/227680a0
- Ma X, Su E, Deng S, Xie Y, Wei D (2014) An efficient method for recovering recombinant Cephalosporin C deacetylase from the cytoplasm of *E. coli* cells. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 28:349-355. doi: 10.15255/CABEQ.2013.1904
- Martius E, Wibisana A, Ardiyani Y (2018) The optimization of soluble cephalosporin C acylase expression in *E. coli*. *IJES* 7:29-34. doi:10.9790/1813-0703012934
- Morin R, Jackson B, Flynn E, Roseske R, Andrews S (1969) Chemistry of cephalosporin antibiotics XIV: reaction of cephalosporin C with nitrosyl chloride. *J Am Chem Soc* 91:1396-1400. doi: 10.1021/ja01034a022
- Parmar A, Kumar H, Marwaha S, Kenedy J (1998) Recent trends in enzymatic conversion of Cephalosporin C to 7-Aminocephalosporanic Acid (7-ACA). *Crit Rev Biotechnol* 18:1-12. doi: 10.1080/0738-859891224194
- Pollegioni L, Rosini E, Molla G (2013) Cephalosporin C acylase: dream and(/or) reality. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2341-2355. doi: 10.1007/s00253-013-4741-0
- Robinson PK (2015) Enzymes: principle and biotechnological applications. *Essays Biochem* 59:1-41. doi:10.1042/bse0590001
- Rosano G, Ceccarelli E (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5:172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172
- Shin YC, Jeon J, Jung KH, Park MR, Kim Y. (2009) Cephalosporin C acylase mutant and method for preparing 7-ACA using same. United States of America Paten No. US 7,592,168 B2.
- Tan SC, Yiap BC (2009) DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J Biomed Biotechnol*. 2009:1-10. doi: 10.1155/2009/574398
- Tripathi N (2016) Production and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*. *ChemBioEng Reviews* 3:116-133. doi: 10.1002/cben.201600002
- Wang Y, Yu H, Song W, An M, Zhang J, Luo H, Shen Z (2012) Overexpression of synthesized cephalosporin C acylase containing mutations in the substrate transport tunnel. *J Biosci Bioeng* 113:36-41. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.08.027
- Xiao Y, Huo X, Qian Y, Zhang Y, Chen G, Ouyang P, Lin Z (2014) Engineering of a CPC acylase using a facile pH indicator assay. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:1617-1625. doi: 10.1007/s10295-014-1501-9